



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y
Antropología Física

**Estudio de la quiescencia y activación de las
células madre neurales adultas por uniones
adherentes: papel de la N-cadherina.**

Beatriz Martí Prado

Directoras de la Tesis Doctoral en Neurociencias

Isabel Fariñas Gómez

Eva Porlan Alonso

Valencia, mayo de 2017

Dña. Isabel Fariñas Gómez, Catedrática del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia y, Dña. Eva Porlan Alonso, Investigadora "Ramón y Cajal" del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN

que Dña. Beatriz Martí Prado, licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "*Estudio de la quiescencia y activación de las células madre neurales adultas por uniones adherentes: papel de la N-cadherina*", y que hallándose concluido, autorizan su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente para la obtención del grado de Doctor en Neurociencias.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación, firman el presente certificado en Burjassot, a 31 de mayo del 2017.



Dra. Isabel Fariñas Gómez



Dra. Eva Porlan Alonso

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI), financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad, y a dos contratos predoctorales de la RETIC de Terapia Celular del ISCIII. La investigación ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- “*Dinámica celular y auto-renovación en poblaciones de células madre del cerebro adulto*”. Ministerio de Economía y Competitividad, SAF2011-13332 (2012-2014).

- “*Estudio de células madre en el ámbito de las investigaciones básicas en terapia celular*”, Fundación Botín-Banco Santander (2014-2018).

- “*CIBER en Enfermedades Neurodegenerativas*” (CIBERNED), ISCIII, CB06/05/0086 (2006-actualidad).

A mis padres, Francisco y M^a Ángeles

A mis abuelos

A David

Agradecimientos

Durante este largo camino han sido muchas las personas que han supuesto una diferencia en mi día a día. Es por esto que no podía estar completa esta Tesis Doctoral sin dedicar un espacio a todos los que la han hecho posible.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, Isabel y Eva. A Isabel, por dirigirme y darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por ser mi mentora y referente durante estos años, trazando el camino y mostrándome el ritmo al que crece el apasionante mundo de la ciencia. A Eva, por guiarme de la mano en mis primeros pasos, por enseñarme con cariño la realidad de un laboratorio y por poner orden cuando parecía que el caos ganaba la batalla. Nunca podré agradeceréoslo lo suficiente.

En segundo lugar estoy muy agradecida a mis compañeros de laboratorio, que están o han estado conmigo codo con codo y me facilitan los largos y duros días de trabajo. A Paco, Martina y Sacri, porque vuestro cariño, consejos y experiencia nos dan aliento. A José Manuel, Salomé y Ana Pérez por brindarme su sonrisa y su apoyo cuando más lo necesitaba. A Germán, porque haber hecho este recorrido a la vez que tú me ha ayudado a no desfallecer. A Anna Lozano, Pau, Pere, Sara y Thaianis, porque su aire fresco y su alegría contagian, con ellos el laboratorio tendrá un gran futuro. A nuestros técnicos de laboratorio, Miquel, Fabrice, M^a José, Elba y Cristina, porque aunque no siempre sea reconocido, vuestra labor ha sido esencial para llegar hasta donde hoy me encuentro. A María, Raquel, Alex y Ana Domingo, por mostrarme que la distancia entre lo profesional y lo personal no existe, contad conmigo siempre. Debo destacar la aportación que a esta tesis han realizado Ana Domingo y Pau Carrillo; la primera ha contribuido al diseño artístico de algunas de las figuras, y Pau ha prestado sus conocimientos al desarrollo de herramientas para los recuentos celulares que plagan este trabajo. Son innumerables los recuerdos y anécdotas que guardaré en mi memoria de cada uno de vosotros. Gracias por cada momento.

En tercer lugar he de reconocer a aquellos con los que he podido colaborar a lo largo de mi corta etapa científica, no sería de justicia no mencionarlos, porque han contribuido a mi formación. Gracias al laboratorio de la Dra. Teresa Iglesias, por hacerme un hueco y acogerme con cariño durante mi estancia. Gracias a Paola Bovolenta, Pilar Esteve, Carlos López Otín, Robert Kypka y Antonella Consiglio, por formar parte de este maravilloso proyecto.

En cuarto lugar, agradecer al SCSIE (*Servei Central de Suport a la Investigació Experimental*) de la Universidad de Valencia. En especial a Quique y Pilar de la sección de microscopia, a Ana Flores de la sección de cultivos celulares y citometría de flujo, y a Inma Noguera de la sección de producción animal, por ser tan accesibles y brindarse a echar una mano.

En quinto lugar, personas que me han apoyado todo este tiempo de forma más personal. A Alba, Fran, Cris, Irene, Carles, Javi, Vicente, Eli, Marimón, Juanvi y Clara, por enseñarme el significado de la amistad, no sería quién soy si no hubieseis estado ahí. Entre las miles de palabras que conforman esta tesis y las muchas que conozco, jamás encontraría las palabras adecuadas para hacer justicia a todo lo que he recibido.

En sexto lugar agradecer a mi familia. A mis padres Francisco y Ángeles, de vosotros he aprendido lo que es el trabajo duro y la perseverancia, valores que me han formado como persona y que tanto me han ayudado en la ciencia. A mis abuelos, Francisco, Elvira, Juan y Raimunda, aunque no todos estéis conmigo, por cuidarme siempre y darme tanto cariño. Os querré siempre. A mi segunda familia, Emilio, Verónica y Laura, porque desde que nos conocemos me habéis tratado como a una hija o hermana, y siempre he notado vuestro amor. Muchas gracias.

En séptimo lugar, y no menos importante, a David, por innumerables razones. Nada de lo que escriba aquí podrá describir todo lo que me haces sentir. Por ser mi contrapunto, mi mayor crítico y al mismo tiempo mi mejor amigo, mi apoyo y mi alegría. Por tu enorme ayuda y paciencia durante esta fase final de la tesis. Te agradezco de todo corazón que hayas estado a mi lado, porque sin ti no hubiera sido capaz de superar los baches del camino. Por todo ello, te dedico esta tesis, que es tan tuya como mía. Te quiero.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Células madre adultas	2
2. Neurogénesis adulta	4
2.1. Citoarquitectura de la SEZ	6
2.2. Identificación de las células madre neurales adultas: células B-GFAP+	8
2.3. Migración, diferenciación e integración de la descendencia generada	10
2.4. Neurogénesis en el cerebro humano.....	11
2.5. Regulación del nicho neurogénico subependimario.....	14
3. El papel de las cadherinas clásicas en los nichos neurogénicos	17
3.1. Cadherinas: clasificación y estructura.....	17
3.2. Las cadherinas clásicas.....	18
3.3. El papel de las cadherinas clásicas durante el desarrollo embrionario	20
3.4. Relevancia de las cadherinas clásicas en los nichos neurogénicos	21
4. Regulación de los niveles y actividad de las cadherinas clásicas	22
4.1. Regulación transcripcional de las cadherinas clásicas	22
4.2. Regulación del tráfico de las cadherinas clásicas.....	24
4.3. Proteólisis regulada de las cadherinas clásicas	26
4.4. Señalización mediada por cadherinas clásicas	29
OBJETIVOS	32
MATERIAL Y MÉTODOS	34
1. Animales	35
1.1. Colonias y mantenimiento de ratones	35
1.2. Genotipado	37
2. Estudios <i>in vivo</i>	38
2.1. Inyección de nucleósidos trazables	38
2.2. Infusión intracerebral	39
2.3. Técnicas histológicas.....	41
2.3.1. Técnica inmunohistoquímica.....	42
2.3.2. Tinción con violeta de cresilo.....	42

2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	43
2.3.4. Recuentos celulares	43
3. Estudios <i>in vitro</i>	45
3.1. Cultivos celulares	45
3.1.1. Células madre neurales adultas.....	45
3.1.2. Líneas celulares	46
3.2. Transducción celular	47
3.2.1. Clonaje de vectores de transferencia	47
3.2.2. Transfección de células HEK293T	48
3.2.3. Infección con lentivirus	48
3.3. Ensayos celulares	50
3.3.1. Experimentos de adhesión	50
3.3.2. Ensayos de ciclo celular	51
3.3.3. Técnicas inmunocitoquímicas	52
3.3.4. Recuento celular	52
4. Ensayos enzimáticos	53
5. Análisis de los niveles de ARN mensajero	53
6. Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot	54
7. Análisis estadístico	56
ANEXO	57
RESULTADOS	62
1. Las uniones adherentes mediadas por N-cadherina promueven la quiescencia de las células B-GFAP+	63
1.1. Las células B-GFAP+ interactúan con el nicho neurogénico mediante uniones dependientes de N-cadherina.....	63
1.2. La N-cadherina regula el balance entre proliferación y quiescencia de las células B-GFAP+	67
1.3. La neurogénesis y oligodendrogénesis adulta dependen de la integridad de las uniones mediadas por N-cadherina en el nicho neurogénico	74
1.4. Las uniones mediadas por N-cadherina son esenciales para el mantenimiento de la citoarquitectura del nicho neurogénico	74

2. La proteólisis regulada de N-cadherina modula la activación de las células B-GFAP+: papel de la metaloproteasa MT5	75
2.1. La metaloproteasa MT5 regula la activación de células B-GFAP+ y la neurogénesis adulta	76
2.2. La actividad de MT5 regula la adhesión celular mediada por N-cadherina.....	80
2.3. La generación y mantenimiento de las células B-GFAP+ es independiente de la actividad de MT5	83
2.4. MT5 regula la activación de las células B-GFAP+ en condiciones fisiológicas y de regeneración	84
3. Regulación de la proteólisis de N-cadherina por elementos del nicho neurogénico: papel de ADAM10 y la molécula secretada sFRP-1	90
3.1. ADAM10 regula la adhesión de las células B-GFAP+ mediada por N-cadherina	90
3.2. La proteína sFRP-1 es un factor de nicho y regula la actividad de ADAM10.....	92
3.3. La proteína sFRP-1 regula las uniones adherentes por N-cadherina en el nicho neurogénico	95
3.4. La proteína sFRP-1 actúa como un factor de quiescencia <i>in vivo</i>	102
DISCUSIÓN	105
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFÍA	120

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Test estadístico de análisis de varianza
aNSC	Célula madre neural adulta activada
AraC	Citosina β -D-arabinofuranosido clorhidrato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASC	Célula madre adulta
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
cADN	ADN complementario
CC	Cuerpo calloso
CldU	5-cloro-2'-desoxiuridina
CRD	Dominio rico en cisteínas
CSC	Célula madre cancerosa
CSF	Líquido cefalorraquídeo
CTF	Fragmentos intracelulares de la N-cadherina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro
DCX	Doblecortina
DDAO-SE	Trazador celular con emisión en la franja del rojo lejano
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECM	Matriz extracelular
EC-NCad	Anticuerpo bloqueante de la porción extracelular de la N-cadherina
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ESC	Célula madre embrionaria
FBS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FL-NCad	Proteína completa de N-cadherina
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GIX	GI254023X; Inhibidor farmacológico de ADAM10

IdU	5-iodo-2'-desoxiuridina
iPSC	Célula madre pluripotente inducida
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
LV	Ventrículo lateral
NSC	Célula madre neural adulta
NTR	Dominio homólogo a las Netrinas
OB	Bulbo olfatorio
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
qNSC	Célula madre neural adulta quiescente
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RER	Retículo endoplasmático rugoso
rhADAM10	Proteína recombinante de ADAM10 de origen humano
RMS	Camino migratorio rostral
rsFRP-1	Proteína recombinante de sFRP-1 de origen murino
SC	Célula madre
s.e.m.	Error estándar de la media
SEZ	Zona subependimaria
SGZ	Zona subgranular del giro dentado del hipocampo
SNC	Sistema nervioso central
Str	Estriado
Ta	Temperatura ambiente
TAP	Progenitor de rápida amplificación
TBS	Tampón tris salino
TGN	Red del trans Golgi
V-SVZ	Zona ventricular-subventricular
β -MEtOH	β -mercaptoetanol

Introducción

1. Células madre adultas

El nombre de célula madre (SC; del inglés *Stem Cells*) se otorga a aquellas células indiferenciadas con elevada capacidad para auto-replicarse, sin alcanzar la senescencia, y producir uno o más tipos celulares diferenciados, jugando un papel esencial en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis y reparación de los tejidos del organismo adulto (Nadig, 2009; Singh et al., 2015). Según su potencial de desarrollo, las SC pueden ser totipotentes (capaces de generar todos los tipos celulares embrionarios y extra-embryonarios), pluripotentes (pueden formar todos los tipos celulares embrionarios), multipotentes (pueden establecer un conjunto de linajes celulares), oligopotentes (generan un conjunto de linajes más reducido y restringido que las células multipotentes) o unipotentes (capaces de generar un único tipo de célula diferenciada) (Wagers y Weissman, 2004). Existen cuatro tipos de células madre si tenemos en cuenta su origen: las SC embrionarias (ESC; del inglés *Embryonic Stem Cells*) y las SC adultas o somáticas (ASC; del inglés *Adult Stem Cells*) se pueden encontrar en distintas fases del desarrollo y en situaciones fisiológicas, las SC inducidas o iPSC (*induced Pluripotent Stem cells*) se obtienen mediante ingeniería genética y, se ha hipotetizado que en algunos casos, las SC cancerosas (CSC; *Cancer Stem Cells*), podrían ser las causantes de ciertos cánceres (Alvarez et al., 2012).

Las ESC son pluripotentes, presentan capacidad indiferenciada y auto-renovante ilimitada y se localizan en la masa celular interna del blastocisto durante la etapa embrionaria de la gastrulación. Pero a medida que el desarrollo embrionario continúa, las ESC van perdiendo sus características de SC pluripotente con cada división mitótica, dando paso a las células madre germinal y somática multipotentes, generando las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo). Las ASC se encuentran en localizaciones específicas de los tejidos postnatales y adultos, denominados nichos, y mantienen algunas características de las ESC, como la expresión de ciertos factores de transcripción (Oct4, Klf4 y Sox2), el estado indiferenciado, la capacidad auto-renovante y la expresión de filamentos intermedios como la vimentina. Sin embargo, expresan marcadores característicos de su linaje celular o tejido. Las CSC son ASC que han sufrido alteraciones genéticas (Alvarez et al., 2012). Las iPSC son células somáticas reprogramadas a SC pluripotentes mediante la transducción viral de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y Nanog), manteniendo el potencial de diferenciación a células maduras (Takahashi y Yamanaka, 2006; Okita et al., 2007) (**Figura 1**).

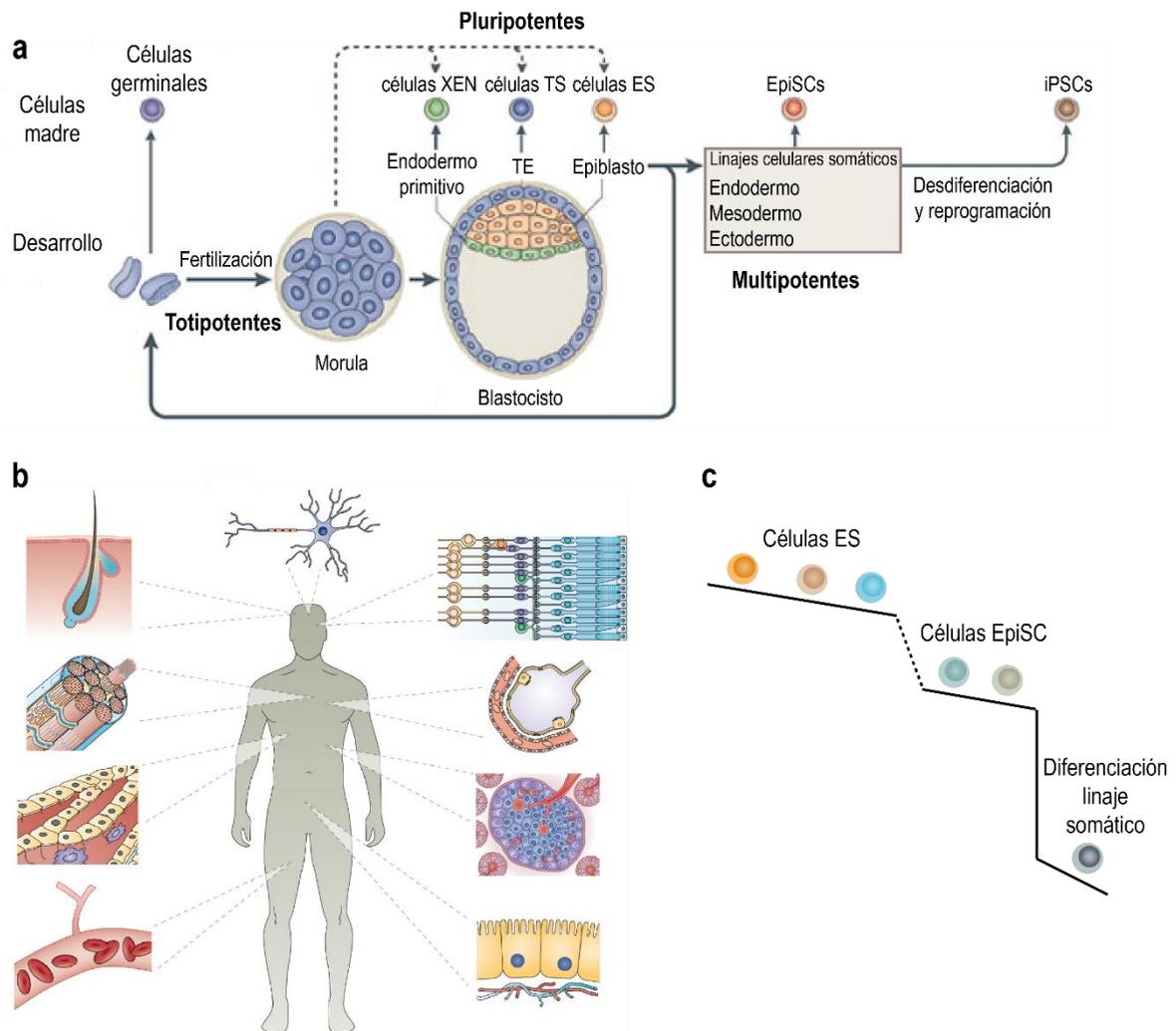


Figura 1. Representación de los tipos de SC y su potencialidad. (a) Esquema de los distintos tipos de SC producidas durante el desarrollo del embrión y su potencialidad. Imagen modificada de (Hemberger et al., 2009) (b) Imágenes de algunos tejidos que contienen ASC, como son los folículos capilares, el cerebro, la médula ósea, el intestino, la epidermis o el músculo esquelético. Imagen modificada de (Kimbrel y Lanza, 2015) (c) Esquema representativo de la pérdida de pluripotencia que sufren las ESC tras las sucesivas divisiones durante el desarrollo. XEN: células madre del endodermo extraembrionario; TS: células madre de trofoblasto; ES: células madre embrionarias; EpiSC: célula madre del epiblasto; iPSC: célula madre pluripotente inducida; TE: trofoectodermo.

Los avances en el conocimiento de la biología de las SC suscita grandes expectativas en la búsqueda de herramientas que permitan su extracción y/o cultivo y expansión *in vitro* y que, además, permitan la generación de tipos celulares específicos para combatir situaciones de daño o lesión o enfermedades degenerativas mediante trasplante. Las ESC parecen el tipo celular idóneo para las estrategias de medicina regenerativa al tratarse de células pluripotentes, con capacidad para generar cualquier tipo celular, además de su ilimitada tasa de proliferación. Sin embargo, conlleva grandes dilemas éticos debido al uso de embriones como fuente de las ESC o a la necesidad de obtener óvulos donados para su posterior fertilización *in vitro* en las técnicas de clonación terapéutica. Además de los

factores éticos, la posibilidad de rechazo y su elevada tasa proliferativa que puede ser fuente de carcinomas, descarta a las ESC como candidatas al ensayo clínico, al menos por el momento. Las ASC en cambio son buenas candidatas porque, además de tener un ciclo celular más regulado, permitirían la posibilidad de realizar trasplantes autólogos, minimizando la probabilidad de generar rechazo. La principal limitación de este tipo celular es que el número de células obtenidas es limitado, no tienen elevada tasa replicativa y tienen potencialidad restringida. Las iPSC también serían buenas candidatas para la aplicación en terapias regenerativas ya que permiten la utilización de células pluripotenciales con características genéticas idénticas al paciente a tratar. Sin embargo, se corre el riesgo de generar mutaciones génicas que promuevan la aparición de teratomas como con las ESC (Leeper et al., 2010; Singh et al., 2015).

2. Neurogénesis adulta

Durante los años 20 del siglo pasado, en el campo de la Neurociencia se estableció una corriente de pensamiento que impuso el dogma de que la neurogénesis, entendida como el proceso mediante el cual células progenitoras son capaces de generar nuevas neuronas funcionales, únicamente se daba durante el desarrollo embrionario y postnatal, mientras que el sistema nervioso central adulto (SNC) era incapaz de regenerarse (Ramón y Cajal, 1913).

El trabajo pionero de Joseph Altman, en la década de 1960, fue el responsable del abandono del dogma predominante hasta momento, sugiriendo la existencia de neurogénesis durante la fase juvenil y adulta del cerebro de mamífero. Los estudios de Altman se llevaron a cabo en el cerebro de ratas adultas inyectadas con timidina tritiada, un nucleósido capaz de incorporarse en el ADN de las células durante la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular y ser detectable por su radioactividad, lo que le permitió observar la presencia de células proliferativas de fenotipo neural en el neocórtex, el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio (OB) (Altman y Das, 1965, 1966; Altman, 1969). Posteriormente, mediante microscopía electrónica se pudo confirmar el origen neural de dichas células (Kaplan y Hinds, 1977). Estos resultados fueron acogidos con susceptibilidad y no tuvieron demasiada trascendencia. Sin embargo, el uso de vectores virales para permitir el trazado de linaje celular en la década de 1990 (del Rio y Soriano, 1989; Luskin y McDermott, 1994; Belluzzi et al., 2003), permitió el renacimiento de nuevas e irrefutables evidencias sobre la existencia de proliferación, neurogénesis e integración funcional y sináptica de las nuevas neuronas generadas en el SNC de los mamíferos adultos (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y

Nottebohm, 1984; Alvarez-Buylla y Nottebohm, 1988; van Praag et al., 2002; Carleton et al., 2003).

Entendemos por nicho neurogénico una región del cerebro en la que su citoarquitectura y los factores del entorno permiten la supervivencia, proliferación y diferenciación de las SC. Durante las últimas décadas se han descrito diversos nichos neurogénicos en el cerebro adulto. Algunos de ellos como el hipotálamo, la sustancia nigra, el cerebelo y la amígdala han sido descritos recientemente (Lin y Iacovitti, 2015). El nicho hipotalámico se sitúa próximo al tercer ventrículo, extendiéndose desde el quiasma óptico hasta los cuerpos mamilares, y está compuesto por células ependimarias multiciliadas, tanicitos y células con características astrocitarias capaces de contactar con el líquido cefalorraquídeo mediante un proceso apical (Perez-Martin et al., 2010). En la sustancia nigra se encuentra un tipo celular con morfología ramificada, que expresa marcadores de glía y es capaz de proliferar localmente (Lie et al., 2002). El aislamiento y cultivo de células cerebelares indica que hay una población celular, todavía indeterminada, capaz de proliferar y diferenciarse en glía y neuronas *in vitro* (Klein et al., 2005). Estudios recientes indican que en la amígdala, algunas células son capaces de proliferar y generar astrocitos y oligodendrocitos. Sin embargo, su papel como nicho neurogénico no está todavía completamente establecido (Oyarce et al., 2014).

En contraste con estos nichos neurogénicos emergentes, hay otras dos regiones del cerebro descritas claramente como reservorios de células madre neurales adultas (NSCs) y que han sido ampliamente estudiadas. Se trata de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ del inglés *subgranular zone*) y la zona ventricular-subventricular (V-SVZ, del inglés *subventricular zone*) o subependimaria (SEZ, del inglés *subependymal zone*). Las NSCs presentes en la SGZ generan progenitores intermedios que a su vez, darán lugar a neuroblastos que se diferencian en neuronas granulares glutamatérgicas de la capa granular inmediatamente adyacente. Las nuevas neuronas generadas, extienden dendritas hacia la capa molecular y proyectan axones hasta la región CA3 del hipocampo, estableciendo nuevas conexiones sinápticas dentro del circuito existente. La SEZ se localiza a lo largo de la pared de los ventrículos laterales y, al igual que ocurre en el hipocampo, las NSCs presentes en la SEZ dan lugar a progenitores intermedios de rápida amplificación que generan neuroblastos, los cuales migran de forma tangencial hasta el OB, siguiendo el camino migratorio rostral o RMS, donde se diferenciarán en interneuronas (Ming y Song, 2011). La SEZ es el nicho neurogénico proliferativamente más activo y más grande

encontrado en el cerebro adulto, generando tres veces más neuronas que el giro dentado del hipocampo (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Cameron y McKay, 2001; Seaberg y van der Kooy, 2002; Mirzadeh et al., 2008).

2.1. Citoarquitectura de la SEZ

Joseph Altman fue el primero en sugerir que en la SEZ se localizan progenitores capaces de dar origen a las nuevas neuronas del OB (Altman, 1969). Estudios *in vitro* llevados a cabo con células disociadas de la SEZ revelan la presencia de NSCs, dado que son capaces de auto-renovarse y crecer formando agregados clonales esféricos en suspensión (neuroesferas) en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés *Epidermal Growth Factor*) y del fibroblástico (FGF; del inglés *Fibroblast Growth Factor*) en el medio de cultivo, además de ser capaces de diferenciarse en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos bajo condiciones que promueven la diferenciación (Reynolds y Weiss, 1992; Levison y Goldman, 1997; Gritti et al., 2002).

La SEZ está compuesta principalmente por NSCs, endimocitos, astrocitos, progenitores de rápida amplificación (TAPs) y neuroblastos, que difieren en cuanto a su morfología, ultraestructura, capacidad proliferativa y marcadores moleculares (Doetsch et al., 1997; Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008; Mirzadeh et al., 2008). Las células endimarias forman una monocapa o pared de células que tapiza la pared de los ventrículos laterales y permanece en contacto directo con el lumen del ventrículo. Las células endimarias exponen hacia el lumen del ventrículo una superficie apical multiciliada que contribuye a la circulación del líquido cefalorraquídeo (CSF; *Cerebrospinal Fluid*) que regula la orientación y migración de las cadenas de neuroblastos (Sawamoto et al., 2006). Su papel como potencial NSC, propuesto inicialmente por el grupo de Frisén, a finales de los años 90, fue descartado debido a que el epéndimo es incapaz de proliferar en condiciones fisiológicas (Chiasson et al., 1999; Doetsch et al., 1999a; Johansson et al., 1999).

Las NSCs de la SEZ también denominadas células tipo B derivan de la glía radial embrionaria y pertenecen al linaje astrocitario (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Presentan rasgos distintivos como morfología elongada, menos ramificada que los astrocitos y filamentos intermedios constituidos por la misma proteína, la proteína fibrilar ácida glial o GFAP. En el nicho subependimario, estas NSCs B-GFAP+ se sitúan adyacentes a la capa endimaria, constituyendo el elemento central de las estructuras en forma de roseta o

molinillo (del inglés *pinwheel*), que se observan en imágenes obtenidas de preparaciones *en face* de la superficie ventricular. En las rosetas, las células B extienden un cilio corto desde la región apical y a través de los endimocitos, para alcanzar el lumen del ventrículo, mientras que otra extensión emana de su extremo basal, contactando con los vasos sanguíneos presentes en el nicho (Doetsch et al., 1997; Merkle et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008). Las NSCs tipo B poseen un ciclo celular largo, por lo que son relativamente quiescentes, y son capaces de dividirse de forma simétrica para mantener el reservorio de NSCs en el nicho o bien de forma asimétrica, permitiendo la repoblación y la generación de los TAPs (Morshead et al., 1998; Doetsch et al., 1999b).

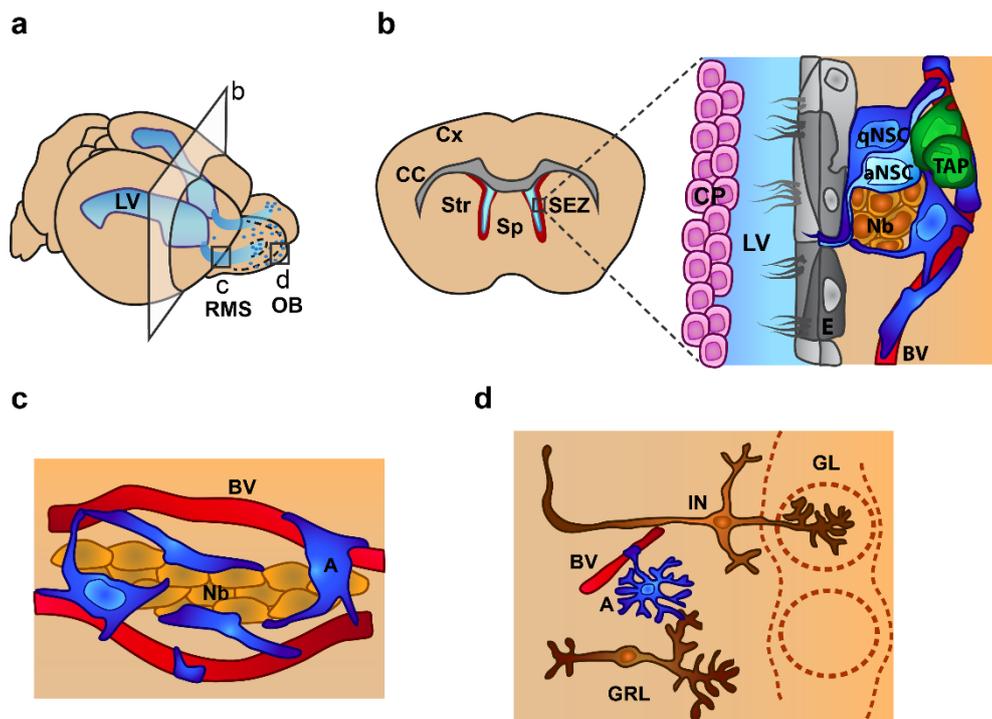


Figura 2. Neurogénesis adulta en la SEZ. (a) Esquema representativo del cerebro de ratón, donde se muestran las estructuras anatómicas implicadas en la neurogénesis adulta. (b) Izquierda: Corte coronal correspondiente al plano de corte indicado en la figura 2 a. Derecha: Ampliación de una región de la SEZ que muestra la citoarquitectura característica del nicho. (c) Representación de los componentes celulares que conforman los gliotubos del RMS. (d) Esquema representativo de los tipos de interneuronas en los que se diferencian los neuroblastos a su llegada al OB. LV: ventrículo lateral; RMS: camino migratorio rostral; OB: bulbo olfatorio; Cx: córtex; CC: cuerpo calloso; Str: estriado; Sp: septum; SEZ: zona subependimaria; CP: plexo coroideo; E: células endimarias; aNSC: NSC activada; qNSC: NSC quiescente; Nb: neuroblastos; TAP: progenitores de rápida amplificación; BV: vasos sanguíneos; A: astrocitos; GRL: capa granular; IN: interneuronas; GL: capa glomerular. Imagen modificada de (Chaker et al., 2016; Gengatharan et al., 2016).

Las células TAP son precursores inmaduros que poseen nucléolos atípicos, grandes y reticulados, carecen de filamentos intermedios, muestran una elevada capacidad proliferativa y se distribuyen en grupos dispersos de células que, tras dividirse de forma rápida 3-4 veces (Ponti et al., 2013), dan lugar a neuroblastos migradores que continúan su migración hasta el OB por el RMS (Doetsch et al., 1997; Zhao et al., 2008).

Los neuroblastos generados en la SEZ presentan una morfología fusiforme, con un proceso apical largo y otro corto en el polo opuesto, tienen una capacidad proliferativa limitada, dividiéndose una o dos veces tan sólo (Ponti et al., 2013), se producen de forma continuada y se organizan en grupos. Los grupos de neuroblastos se organizan formando cadenas, envueltas por células de glía, constituyendo las estructuras denominadas gliotubos, que migran paralelas al ventrículo lateral y se extienden rostralmente por el RMS desde la SEZ hasta el OB. Tras su llegada al OB, se diferencian en interneuronas de las capas granular y glomerular del OB (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Yoon et al., 1996; Lledo et al., 2008) (**Figura 2**).

2.2. Identificación de las células madre neurales adultas: células B-GFAP+

A lo largo de las últimas dos décadas se han realizado numerosos trabajos dirigidos a esclarecer la identidad y características de las NSCs de la SEZ, más allá de su naturaleza astrocitaria.

Mediante estudios de infusión con drogas antimetabólicas en la zona, se observó que las células que permanecen en el nicho tras el tratamiento, son las células endimarias y las células tipo B-GFAP+. Dado que las células endimarias no proliferan en condiciones fisiológicas (Chiasson et al., 1999; Doetsch et al., 1999a; Johansson et al., 1999), se postuló que la regeneración de la zona tras la eliminación del antimetabólico, se producía a partir de una subpoblación de células B altamente quiescentes. Estos trabajos indicaron que la población de NSCs de la SEZ co-existen en dos estados de activación: las NSC quiescentes (qNSCs) y las NSC activadas (aNSCs) (Pastrana et al., 2009; Silva-Vargas et al., 2013; Codega et al., 2014). En los últimos tres años, el desarrollo de nuevas tecnologías está permitiendo generar estrategias ingeniosas para definir, caracterizar y clasificar estos estados de activación, lo que ha permitido encontrar marcadores con expresión diferencial en ambos tipos de NSC. Mediante el uso de animales transgénicos, las técnicas de trazado celular, el marcaje inmunohistoquímico o la citometría de flujo, sabemos que, tanto las qNSCs como las aNSCs, expresan GFAP, GLAST, CD133/Prominina-1, CD9, LeX, Bmi1, Plexin B2, Hes5 y, sin embargo, son negativas para S100 β o CD24. Los marcadores que caracterizan a las aNSC, a diferencia de las qNSC, son el receptor de EGF y la nestina (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Chaker et al., 2016) (**Figura 3**). Recientemente, y a partir de diversos marcadores descritos anteriormente, se ha conseguido aislar individualmente NSCs y analizar el transcriptoma a nivel de célula única por técnicas de ARN-Seq, permitiendo

clasificarlas según sus características moleculares con más precisión (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

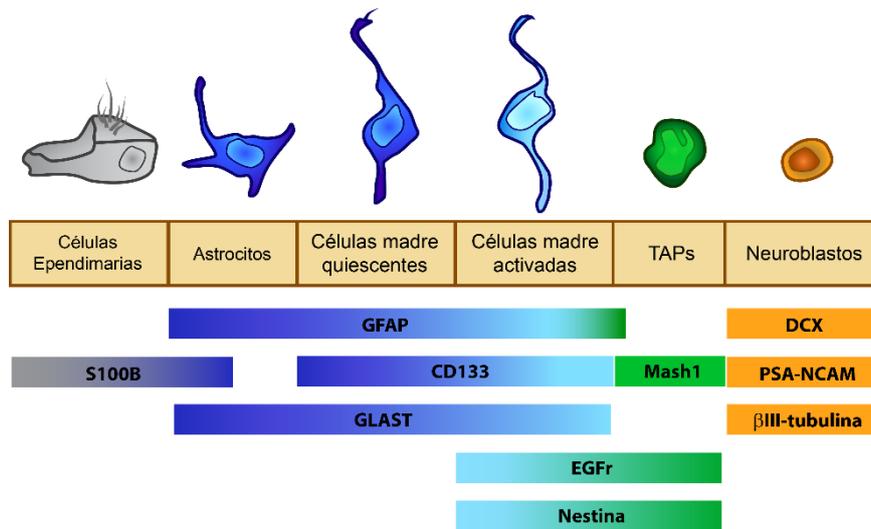


Figura 3. Identificación celular del nicho neurogénico. Esquema de las poblaciones celulares más significativas localizadas en la SEZ adulta, mostrando algunos de los marcadores más representativos para la identificación de cada tipo celular. Imagen modificada de (Codega et al., 2014).

La conclusión directa de estos experimentos es que dado que las células remanentes han sido capaces de resistir al tratamiento antimitótico, se trataría de una población relativamente quiescente, capaz de regenerar el nicho por completo a través de la aparición de una subpoblación de NSCs derivadas proliferativas, que son capaces de autorrenovarse y poseen un ciclo celular más activo, aunque son capaces de retener nucleósidos trazables por periodos de tiempo relativamente largos. A partir de ésta población ‘activada’, se generan en primer lugar los progenitores transitorios de rápida amplificación y de éstos últimos, los neuroblastos migradores (Andreu-Agullo et al., 2009; Pastrana et al., 2009). También se generan precursores oligodendrogiales y oligodendrocitos maduros mielinizantes que se incorporan a la fimbria del estriado y al cuerpo calloso (CC) (Menn et al., 2006; Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008; Jackson y Alvarez-Buylla, 2008; Pastrana et al., 2009).

A pesar de todos los esfuerzos que se han realizado en los últimos años para identificar y estudiar el comportamiento de las NSCs en su estado fisiológico o en condiciones regenerativas, no se han descubierto marcadores exclusivos de este tipo celular que pudieran ser utilizados *in vivo* (Nam y Benezra, 2009; Pastrana et al., 2009; Ming y Song, 2011; Llorens-Bobadilla et al., 2015). El descubrimiento de marcadores específicos de NSCs, quiescentes o activadas, podría facilitar la localización de estas células en el nicho y permitiría estudiar mejor su dinámica celular, cómo se ven afectadas por factores exógenos y qué interacciones establecen con otras células.

2.3. Migración, diferenciación e integración de la descendencia generada

Los TAPs se generan mediante divisiones asimétricas de las NSCs de la SEZ, su ciclo celular es activo y relativamente corto, de unas 13 h de duración, expresan el receptor de EGF o factores de transcripción como *Dlx2* (*distal-less homeobox 2*) y *Mash1* (*mammalian achaete-schute homolog 1*; también conocido como *Ascl1*) (Morshead et al., 1998; Doetsch et al., 2002; Parras et al., 2004; Kim et al., 2011). A partir de dichos progenitores, se obtienen precursores de astrocitos, precursores de oligodendrocitos y precursores neuronales. Los precursores de oligodendrocitos u OPC, que expresan *Olig2*, *nestina*, *NG2* (*neural/glía antígeno 2*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFR α*), migran al cuerpo calloso para diferenciarse en células inmaduras *NG2+/O4+*, las cuales continúan dividiéndose localmente o maduran hasta convertirse en células mielinizantes (Menn et al., 2006; Gonzalez-Perez et al., 2009). Los precursores de astrocitos han sido identificados recientemente y pueden diferenciarse en astrocitos maduros residentes en la SEZ o bien, astrocitos capaces de migrar hasta el CC (Gross et al., 1996; Bond et al., 2012; Sohn et al., 2015).

Los precursores neuronales son los más extensamente estudiados y generan en la SEZ neuronas inmaduras denominadas neuroblastos. Los neuroblastos se localizan por todo el nicho formando grupos en forma de cadenas rodeadas por astrocitos (gliotubos) que se extienden rostralmente desde la SEZ hasta el OB, generando el RMS. Los grupos de neuroblastos establecen interacciones adherentes homofílicas mediante la expresión de la glicoproteína de adhesión neural PSA-NCAM. La porción polisializada (PSA) de esta proteína permite modular la adhesión entre células, disminuyendo la fuerza de las interacciones homofílicas para permitir a las células despegarse y desplazarse a lo largo de las cadenas. Durante la migración hacia el OB, los neuroblastos son capaces de proliferar, acción que contribuye a la amplificación del número de neuronas generadas (Rutishauser y Landmesser, 1991; Menezes et al., 1995; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997).

Una vez en el OB, los neuroblastos migran radialmente hacia las capas granular y glomerular donde inician su diferenciación y maduración, un proceso que dura unos 5-10 días. Durante este periodo, los neuroblastos desarrollan árboles y espinas dendríticos y se convierten en interneuronas de distinto tipo funcionalmente integradas en el circuito olfatorio (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003). Según la localización de los progenitores en la SEZ, la posición de sus cuerpos celulares y dendritas y la expresión

de diversos marcadores moleculares, se ha podido identificar tres tipos de interneuronas periglomerulares, cinco tipos de interneuronas granulares, así como células satélite y perimitrales. Las interneuronas periglomerulares derivan de precursores formados en la región ventral, en la dorsal de la SEZ o en el subcalloso, y pueden expresar calbindina, calretinina y tirosina hidroxilasa. Las interneuronas granulares proceden de precursores del subcalloso o de la zona ventral, dorsal o anterior de la SEZ y expresan calretinina. Se han descrito cinco subtipos (G_I-G_V) según la localización de sus cuerpos celulares y la región dónde se extienden sus dendritas. Las interneuronas satélite expresan calretinina y tanto el cuerpo celular como sus dendritas se extienden en la capa plexiforme externa. Las interneuronas perimitrales expresan calretinina, en la capa mitral se localizan los cuerpos celulares y dendritas, que también se extienden por la capa plexiforme interna, y su axón se extiende hacia la capa plexiforme externa (Merkle et al., 2014). Todas estas interneuronas ejercen un papel importante en la modulación de la actividad de las células mitrales y en penacho del OB, constituyendo las proyecciones neuronales que transmiten la información olfativa directamente al córtex (Lledo et al., 2008) (**Figura 4**).

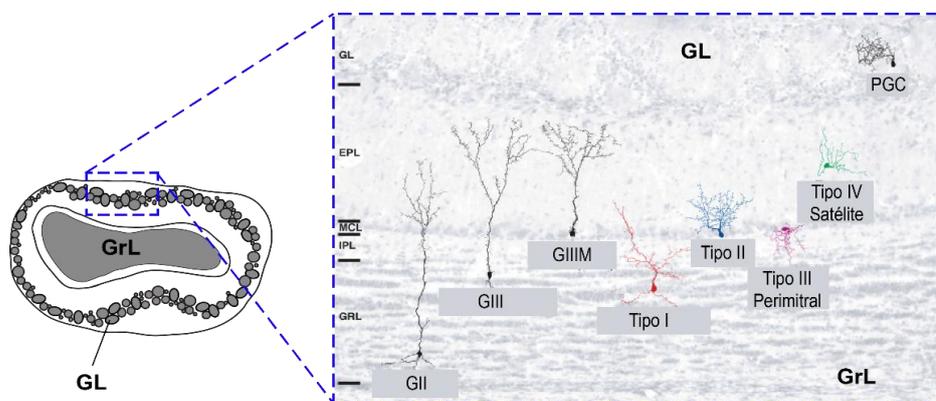


Figura 4. Interneuronas generadas en el OB a partir de NSCs residentes en la SEZ. Izquierda: Dibujo representativo de la citoarquitectura de un corte coronal medial de OB de ratón. Derecha: Aumento del recuadro indicado en el dibujo de la izquierda. Esquema representativo de las interneuronas generadas *de novo* en las distintas capas del OB. GrL: Capa granular; GL: Capa glomerular; EPL: Capa plexiforme externa; IPL: Capa plexiforme interna; MCL: Capa mitral; PGC: Células periglomerulares; G: Células granulares. La barra de escala de la imagen corresponde a 25 μm. Imagen modificada de (Merkle et al., 2014).

2.4. Neurogénesis en el cerebro humano

Según las estimaciones del Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2064 la población humana de más de 65 años de edad se incrementará en algo más de un 20 %. El envejecimiento es el factor de riesgo más importante en la aparición y desarrollo de demencias causadas por enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Hindle, 2010). En ambas enfermedades se ha observado la aparición de

agregados proteicos en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo, el córtex o la sustancia nigra, donde finalmente se induce una muerte neuronal masiva, causante de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades (Nussbaum y Ellis, 2003). Sin embargo, no son las únicas causas de daño neurológico cuya incidencia está aumentando en la actualidad. Las lesiones cerebrovasculares y el daño cerebral adquirido, son una de las principales causas de muerte y discapacidad, provocando graves alteraciones neurocognitivas, y psicosociales (Alberdi et al., 2014). Los tratamientos clínicos existentes son paliativos, capaces de reducir ligeramente los avances de la degeneración tisular, pero sin embargo, todavía no existen estrategias capaces de revertir y restablecer de nuevo el tejido cerebral dañado (Shoulson, 1998). La estimulación de la diferenciación de las NSCs del cerebro adulto hacia un linaje celular concreto, podría convertirse en la estrategia óptima para combatir las enfermedades causadas por daño cerebral, dado que haría posible la renovación progresiva del tejido celular dañado (Curtis et al., 2007; Lindvall y Kokaia, 2010; Feng y Gao, 2012). Para ello, es imprescindible averiguar cuáles son los factores endógenos que inducen a las NSCs a dividirse de forma asimétrica, para generar los tres linajes celulares del sistema nervioso, y cuáles son las señales que promueven la migración de los progenitores y su maduración e integración funcional en el tejido dañado.

Con este objetivo, desde finales del siglo XX se ha estudiado la neurogénesis en el cerebro humano. Ensayos *in vitro* con células procedentes de lobectomías del lóbulo temporal y del córtex, o de SEZ y de SGZ extraídas a partir de biopsias, sugirieron la presencia de NSCs en cerebro adulto, dado que eran capaces de proliferar formando neuroesferas y de diferenciarse en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos (Kirschenbaum et al., 1994; Pincus et al., 1997; Kukekov et al., 1999), y que subpoblaciones de astrocitos de la SEZ, eran las NSCs del cerebro humano adulto (Sanai et al., 2004). El análisis *post mortem* del tejido cerebral de pacientes que habían sido tratados con nucleósidos como la bromodesoxiuridina (BrdU) en protocolos de diagnóstico oncológico años antes de su fallecimiento, confirmó la presencia de células proliferativas en la SGZ del giro dentado del hipocampo (Eriksson et al., 1998). Ya en el siglo XXI, los ingeniosos experimentos del grupo de Jonas Frisén en el Instituto Karolinska, permitieron determinar el año de nacimiento de neuronas obtenidas de muestras post mortem de individuos de distintas edades como aquel en el que el nivel de ^{14}C atmosférico se correspondía con el medido en su ADN. Estos estudios nos han enseñado que los humanos producimos neuronas olfativas sólo durante la infancia, pero que a lo largo de toda la vida producimos neuronas que se integran

en el núcleo estriado (Bergmann et al., 2015; Ernst y Frisen, 2015; Frisén, 2016). La abundancia de progenitores encontrados en la SEZ del cerebro humano, respecto a los encontrados en el hipocampo, es muy superior, por lo que convierte a la SEZ en un nicho potencialmente relevante para el estudio de la neurogénesis humana adulta (Curtis et al., 2012).

La SEZ se localiza en la pared lateral de los ventrículos laterales y en humanos está compuesta por cuatro capas celulares (Quinones-Hinojosa et al., 2006). La capa adyacente al ventrículo lateral, o capa I, está formada por una monocapa de células endimarias con morfología celular cúbica, que extienden microvellosidades en su superficie apical en dirección paralela o perpendicular a la superficie ventricular (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Algunas de estas expansiones interaccionan con las ramificaciones astrocitarias presentes en la capa II o capa hipocelular, nombrada de este modo debido a la baja densidad de cuerpos celulares (Sanai et al., 2004). En esta capa se localiza un tipo de astrocitos pequeños que poseen proyecciones horizontales largas y cuya función se desconoce todavía (Quinones-Hinojosa et al., 2006). La capa III está formada por un anillo de cuerpos celulares de astrocitos. Una subpoblación de estos astrocitos tiene capacidad proliferativa (GFAP+Ki67+) y se ha postulado que podrían ser las células multipotentes capaces de proliferar *in vitro*, aunque su función *in vivo* todavía no está clara (Sanai et al., 2004; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Quinones-Hinojosa et al., 2007; Sanai et al., 2011). Los astrocitos de la capa III se han clasificado en dos tipos, según criterios morfológicos y ultraestructurales. Un primer grupo lo forman astrocitos grandes, que están situados entre las capas II y III y poseen abundantes orgánulos, y el segundo grupo de astrocitos se localiza en la parte ventral del cuerno temporal de los ventrículos laterales, son grandes y poseen pocos orgánulos (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Mediante microscopía electrónica, se ha identificado en la capa III la presencia de oligodendrocitos no mielinizantes y células endimarias, que no contactan con el ventrículo pero forman pequeñas agrupaciones y expresan abundantes microvellosidades y cilios. La capa IV es la transición entre la capa de astrocitos (capa III) y el parénquima, siendo característica la presencia de abundante mielina (Quinones-Hinojosa et al., 2006) (**Figura 5**).

El descubrimiento de células madre en el cerebro humano, representa un incentivo para el estudio de nuevas terapias clínicas frente al daño neurológico.

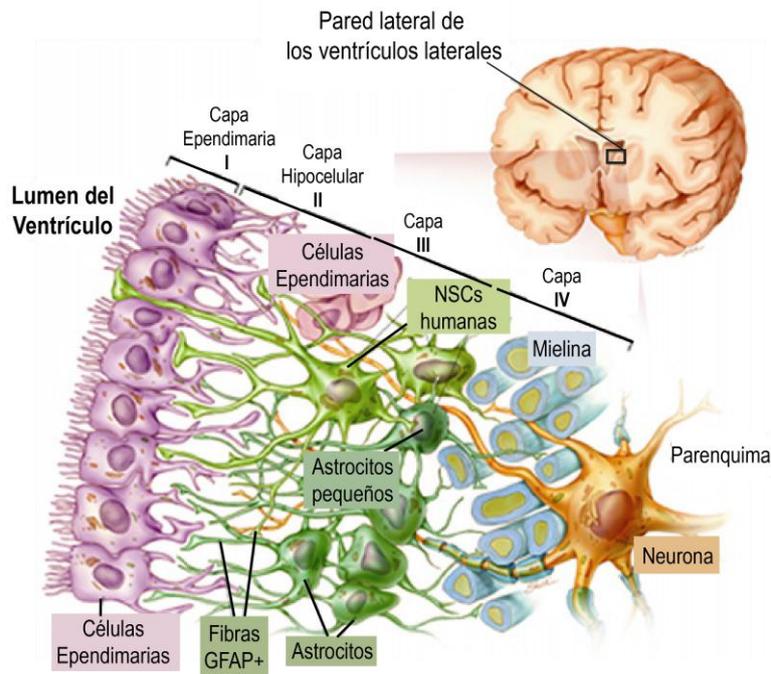


Figura 5. Dibujo de la distribución celular de la SEZ de cerebro humano. Con corchetes se indica el límite entre las capas y el nombre de cada estrato celular. Las células endodimarias se localizan en la capa I y se han indicado en rosa. La capa hipocelular está compuesta por ramificaciones de GFAP. La capa III está compuesta por astrocitos (verde) y NSCs. La capa IV separa los anillos de astrocitos del parénquima estriatal y está formada por fibras de mielina (azul). Imagen modificada de (Quinones-Hinojosa et al., 2007).

2.5. Regulación del nicho neurogénico subependimario

El nicho neurogénico subependimario es una región dinámica del cerebro que mantiene un entorno adecuado para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las NSCs. La decisión de proliferar o diferenciarse, dependerá del balance entre las señales extracelulares que reciben del entorno y las interacciones celulares que establecen en la SEZ, así como de elementos intrínsecos (**Figura 6**).

Algunos factores de crecimiento que regulan la neurogénesis adulta se liberan desde los plexos coroideos, células epiteliales presentes en el ventrículo encargadas de producir el CSF. Las células endodimarias redistribuyen los factores liberados por los plexos, mediante el batido de sus cilios, generando gradientes de factores de crecimiento a lo largo de la superficie ventricular, y regulan de forma activa la absorción de iones y el transporte de los factores que contiene el CSF hacia el parénquima (Bjornsson et al., 2015). Algunos de los factores secretados por los plexos coroideos son SLIT1/2, IGF-2 (*Insulin Growth Factor-2*), TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) o NT-3 (*Neurotrophin-3*), relacionados con la regulación de las NSC, la migración o la neurogénesis (Bjornsson et al., 2015). En el caso de la neurotrofina NT-3, es liberada en los plexos coroideos y el endotelio vascular. La liberación en la SEZ promueve la quiescencia de las NSCs a través de una cascada de señalización mediada por el óxido nítrico (Delgado et al., 2014).

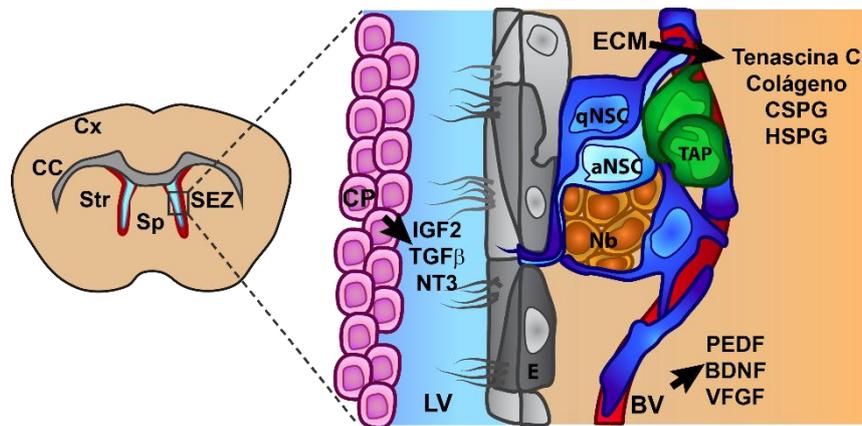


Figura 6. Regulación del nicho neurogénico. Izquierda: Esquema de un corte coronal de cerebro de ratón adulto, indicando la localización de la SEZ. Derecha: Ampliación del recuadro indicado en la imagen de la derecha, correspondiente al nicho subependimario. Esquema de la citoarquitectura de la SEZ, indicando algunos factores liberados que influyen sobre la dinámica celular de las NSCs. LV: ventrículo lateral; Cx: córtex; CC: cuerpo calloso; Str: estriado; Sp: septum; SEZ: zona subependimaria; CP: plexo coroideo; E: células epéndimarias; aNSC: NSC activadas; qNSC: NSC quiescentes; Nb: neuroblastos; TAP: progenitores de rápida amplificación; BV: vasos sanguíneos; ECM: matriz extracelular. Imagen modificada de (Chaker et al., 2016).

Las células epéndimarias, debido a su situación en la citoarquitectura del nicho, actúan como barrera y sostén estructural, pero también como sensores de los factores liberados en el CSF. Las células B-GFAP⁺ de la SEZ emiten un cilio corto hacia el lumen del ventrículo, intercalado entre la pared de células epéndimarias multiciliadas que residen en la superficie, y en su extremo basal, extienden una ramificación que contacta directamente con la lámina basal de los vasos sanguíneos (Doetsch et al., 1997; Mirzadeh et al., 2008). El acceso de las células madre al CSF y el contacto con la vasculatura, fuentes secretoras de factores de crecimiento, permite que actúen como sensores, integradores y reguladores de las señales procedentes del nicho neurogénico. Además, las NSCs mantienen comunicaciones por uniones en hendidura, con otras NSC y con las células epéndimarias, y pueden secretar factores difusibles, lo que les permite propagar señales de forma local o generalizada por todo el nicho, regulando así su activación y diferenciación (Riquelme et al., 2008).

Las células epéndimarias permiten crear un ambiente favorable en el nicho mediante la secreción de factores como noggin, un antagonista de las proteínas morfogénicas del hueso o BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) (Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). Las BMP son miembros de la superfamilia del TGF (*Transforming Growth Factor*), morfógenos relevantes durante el desarrollo. La regulación de la señalización mediada por BMPs puede favorecer la neurogénesis, gliogénesis o bien la proliferación de las NSCs (Gross et al., 1996; Bond et al., 2012; Porlan et al., 2013). Además de noggin, otros factores liberados por las

células endimarias son el SDF1, citoquina importante en procesos como la migración o la supervivencia (Riquelme et al., 2008; Kazanis, 2009) capaz de interactuar con el receptor CXCR4 (Stumm et al., 2002), o el PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*) (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

La vasculatura está implicada en la regulación de la proliferación y diferenciación de las NSCs mediante la liberación de diversos factores como es el caso del factor de crecimiento VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), implicado tanto en la regulación de la neurogénesis, como de la angiogénesis del nicho, o beta-celulina (Jin et al., 2002; Fabel et al., 2003; Cao et al., 2004; Ottone et al., 2014; Rafii et al., 2016). Las células endoteliales, al igual que las endimarias, son capaces de secretar PEDF, un factor de nicho implicado en la regulación de la auto-renovación y multipotencia de las NSC mediante la activación de la vía de Notch (Andreu-Agullo et al., 2009). La vasculatura también regula la quiescencia/activación mediante interacciones directas célula-célula mediadas por la acción conjunta de Notch y efrinas (Ephs) (Ottone et al., 2014; Rafii et al., 2016).

Las interacciones que establecen las células B-GFAP+ con su entorno, a través de contactos célula-célula o mediante la transducción de señales mediada por factores exógenos, pueden regular su estado proliferativo. Los factores de crecimiento son relevantes para la regulación de la proliferación de las células madre: las NSCs expresan los receptores de EGF (*Epidermal Growth Factor*) y FGF (*Fibroblast Growth Factor*), implicados en la regulación de su proliferación (Reynolds y Weiss, 1992; Ferron et al., 2010). Las NSCs establecen contactos con diversos componentes de la matriz celular. Algunos de ellos como, laminina, colágeno tipo I, CSPG (*Chondroitin Sulphate Proteoglycans*), HSPG (*Heparan Sulphate Proteoglycans*) o Tenascina-C, modulan la accesibilidad de estas células a los factores de crecimiento (Riquelme et al., 2008). La laminina se localiza en astrocitos, vasos sanguíneos y en la capa endimaria, e interviene en la regulación de la proliferación de las aNSC (Hall et al., 2008). En cuanto a la Tenascina-C modula la expresión del receptor de EGF y está implicada en la proliferación y migración de los oligodendroblastos (Garcion et al., 2001; Peretto et al., 2005). El carbohidrato LeX/SSEA-1 presente en la superficie celular de las NSCs próximas a los vasos sanguíneos, es capaz de unir FGF y ligandos de la vía de Wnt, y el ectodominio está implicado en la inhibición de la angiogénesis (Dvorak et al., 1998; Capela y Temple, 2002; Sottile, 2004; Shen et al., 2008). Recientemente se ha descrito la expresión de la proteína de adhesión VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) en la extensión apical que emiten las células B-GFAP+ al lumen del ventrículo, y favorece el

mantenimiento de la citoarquitectura del nicho y la quiescencia de las células madre (Kokovay et al., 2012). El ligando Dlk-1 del receptor de Notch se expresa en la membrana de las NSCs y se ha descrito su papel en la neurogénesis y en la regulación de la proliferación de estas células (Ferron et al., 2011).

La SEZ está abundantemente inervada por terminaciones nerviosas locales o procedentes de regiones más alejadas, como la sustancia nigra. La liberación de neurotransmisores dopaminérgicos por terminales axónicos procedentes de la sustancia nigra, promueve la neurogénesis en la SEZ. Los neurotransmisores GABAérgicos son liberados localmente y estimulan la migración de los neuroblastos en detrimento de la auto-renovación de las NSCs (Kazanis, 2009). La producción de óxido nítrico por los terminales de las neuronas nitrérgicas de la SEZ promueven la quiescencia y, la inervación colinérgica promueve la supervivencia de los neuroblastos (Riquelme et al., 2008). Otros neurotransmisores regulan el nicho de la SEZ de manera compleja (Berg et al., 2013; Tong et al., 2014).

3. El papel de las cadherinas clásicas en los nichos neurogénicos

3.1. Cadherinas: clasificación y estructura

Las cadherinas (*calcium-dependent adherent proteins*) pertenecen a una superfamilia de glicoproteínas transmembrana dependientes de calcio e implicadas en la adhesión celular. Poseen un extremo amino terminal (N-ter) muy conservado, formado por varios dominios cadherina extracelulares (EC) en tándem de unos 110 aminoácidos cada uno, entre los cuales hay secuencias de reconocimiento, AXDXD, LDRE, o DXNDN, que median la unión de hasta tres iones calcio (Ca^{+2}) y modulan la fuerza de adhesión (Takeichi et al., 1981; Hatta et al., 1988; Shapiro et al., 1995). Las cadherinas tienen un único segmento transmembrana y otro citoplásmico (C-ter), cuya secuencia difiere entre los distintos miembros de la superfamilia (Tanihara et al., 1994).

Se han descubierto más de 110 moléculas de adhesión pertenecientes a esta superfamilia de proteínas que difieren en estructura y función. Las clasificaciones que se han llevado a cabo se basan en su descubrimiento histórico, su estructura molecular, la función que desarrollan, su capacidad de captación de calcio o su especificidad de adhesión a otras proteínas. Teniendo en cuenta estos criterios, algunas de las subfamilias más destacadas son las cadherinas clásicas, cadherinas desmosomales, protocadherinas, Fat, Flamingo,

Calsinteninas o Ret (Hirano y Takeichi, 2012). Las más estudiadas hasta el momento, debido a su relevante papel en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario, han sido las cadherinas clásicas (**Figura 7**).

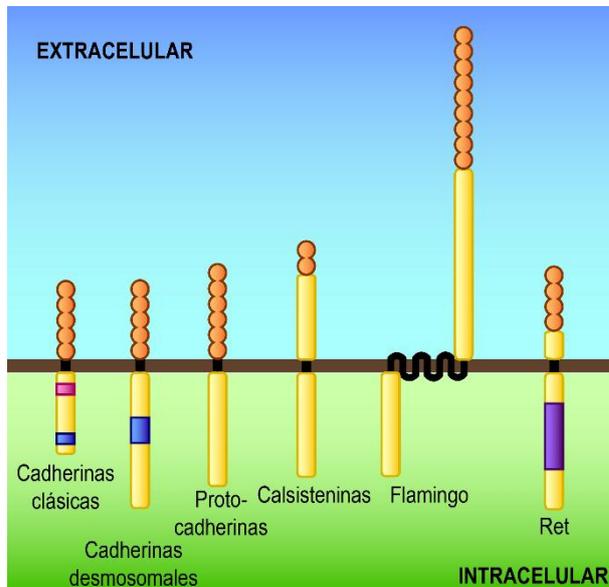


Figura 7. Miembros de la superfamilia de las cadherinas. Dibujos representativos de las principales características estructurales de las subfamilias más distintivas. Los dominios cadherina o EC están representados como círculos naranjas en la región extracelular. Los dominios citosólicos de interacción con p120 están indicados en rosa, los de interacción con la β-catenina están coloreados en azul oscuro y los dominios quinasa están representados en morado.

3.2. Las cadherinas clásicas

La subfamilia de las cadherinas clásicas se caracteriza por tener el extremo N-ter formado por cinco dominios cadherina EC en tándem denominados EC1-5, un segmento transmembrana y un dominio citoplásmico que posee secuencias de unión a las cateninas β, α y p120 (**Figura 8 a**). Los miembros pertenecientes a esta subfamilia de cadherinas pueden ser de Tipo I o de Tipo II en base a pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos del extremo N-ter y C-ter (Tanihara et al., 1994). Un ejemplo de ello es que las cadherinas tipo I poseen en el dominio EC1 un triptófano (Trp2) que media la unión específica con otra proteína de adhesión, mientras que las cadherinas tipo II median dicha acción con dos triptófanos (Trp2 y Trp4) (Overduin et al., 1995; Parisini et al., 2007). Las cadherinas pertenecientes al grupo I fueron nombradas en relación al tejido donde fueron descritas por primera vez y son E-cadherina o CDH1 (epéndimo), N-cadherina o CDH2 (neural), P-cadherina o CDH3 (placenta), R-cadherina o CDH4 (retina) y M-cadherina o CDH15 (musculo), y el grupo de cadherinas Tipo II está compuesto por 13 miembros, nombrados de la CDH5 a la CDH12, de la CDH18 a la CDH20, la CDH22 y la CDH24 (ver revisión Hirano y Takeichi, 2012).

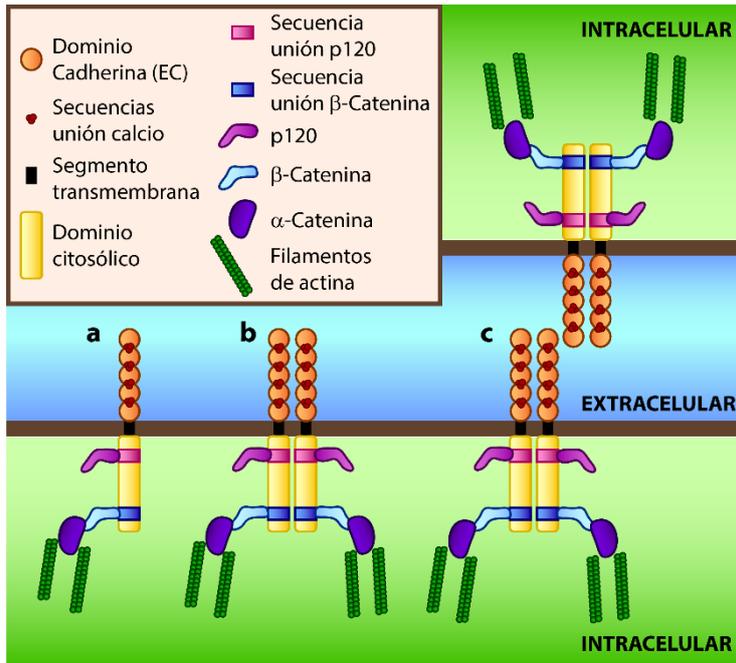


Figura 8. Conformaciones que pueden adoptar las cadherinas clásicas en la membrana celular. (a). Dibujo representativo de la estructura de un monómero de cadherina, donde se observan los cinco dominios cadherina extracelulares unidos mediante secuencias de captación de Ca^{+2} , el segmento transmembrana y el dominio citosólico que interacciona con las cateninas p120 y β -catenina, la cual modula el citoesqueleto de actina mediante su interacción con la α -catenina. **(b).** Esquema de la formación de un dímero a partir de dos monómeros de cadherina. **(c).** Representación de la unión adherente entre dos dímeros de cadherina presentes en células adyacentes.

Las cadherinas están presentes en la célula en tres conformaciones diferentes, que según fuerza de adhesión se ordenan en monómeros, dímeros y clústeres, siendo el monómero la conformación más débil y el clúster la que presenta mayor fuerza de adhesión (Yap et al., 1997; Tamura et al., 1998). Análisis mediante rayos X sugieren que los dominios de dos cadherinas se alinean en paralelo formando dímeros, los cuales a su vez interaccionan por su extremo N-ter (EC1) con otro dímero de cadherina presente en la membrana de otra célula (**Figura 8 b, c**), estableciendo los denominados dímeros de adhesión (Takeichi, 1995). Los dímeros se establecen entre cadherinas del mismo tipo principalmente (adhesiones homofílicas), aunque en algunos casos se establecen uniones entre cadherinas de diferentes subfamilias o con integrinas (adhesiones heterofílicas) (Takeichi, 1977; Cepek et al., 1994; Shapiro et al., 1995). La robustez de las interacciones entre cadherinas está mediada por el número de moléculas de cadherina que pueden interaccionar entre sí y por la cantidad de iones de calcio captados en los dominios EC1-5, permitiendo la adquisición de la conformación adecuada de la molécula y la modulación de su rigidez (Overduin et al., 1995; Pertz et al., 1999), imprescindible en procesos biológicos como el crecimiento axónico, donde se postula que las interacciones deben ser débiles, o la formación de las uniones sinápticas, donde las interacciones deben ser más fuertes (Colman, 1997).

3.3. El papel de las cadherinas clásicas durante el desarrollo embrionario

Las interacciones célula-célula son especialmente importantes durante el desarrollo embrionario, período en el cual, la expresión de proteínas de adhesión tipo cadherina es muy dinámica. La E-cadherina se expresa inicialmente en todas las células embrionarias y permite la compactación de la mórula al pasar de 8 a 16 blastómeros (Hyafil et al., 1980; Damsky et al., 1983; Shirayoshi et al., 1983; Thiery et al., 2009; Nieto, 2013). En la siguiente etapa, denominada blastocisto, se produce la reordenación de los blastómeros para formar una cavidad interna rodeada de células y con una masa celular interna en uno de los polos, a partir de la cual se formará el epiblasto que dará lugar a las tres capas germinales durante la gastrulación (ectodermo, mesodermo y endodermo). En esta última etapa, las células del epiblasto que van a invaginarse comienzan a expresar no sólo la E-cadherina, sino también N-cadherina. Para permitir la organización en las tres capas germinales, las células del mesodermo deben migrar entre el ectodermo y el endodermo, proceso durante el cual la expresión de E-cadherina se ve disminuida y la expresión de N-cadherina se mantiene en el polo apical de dichas células. Tras la invaginación de la placa neural, el ectodermo situado sobre el tubo neural pierde la expresión de E-cadherina y empieza a expresar, de manera uniforme, N-cadherina. Sin embargo, el resto de ectodermo y todo el endodermo siguen expresando E-cadherina, incluso tras diferenciarse en células epiteliales. El ectodermo formado por las células de la cresta neural deja de expresar E-cadherina tras la formación del tubo neural y en cambio, empieza a expresar N-cadherina temporalmente, durante su migración dejan de expresar de nuevo N-cadherina y cuando llegan a su destino y se diferencian, la expresión de N-cadherina se retoma de nuevo (para más detalles ver revisiones de Takeichi, 1988; Hirano y Takeichi, 2012). Las cadherinas no solo promueven la neurulación, sino que además, participan en la formación y maduración de diversos órganos a partir de las tres capas germinales (Thiery et al., 2009; Nieto, 2013; Combes et al., 2015; Happe y Engler, 2016), entre ellos el SNC, en el que impulsan diversos y complejos mecanismos como son la compartimentalización, la lateralización del cerebro, el crecimiento axónico, la formación de sinapsis o la migración celular (Kadowaki et al., 2007; Redies et al., 2011; Beste et al., 2016). Por lo tanto, la dinámica expresión de las cadherinas a lo largo del desarrollo embrionario y en la etapa adulta, su detallado patrón de expresión espacio-temporal, su diversidad y su distribución, permiten establecer complejas interacciones intercelulares homofílicas específicas que favorecen la separación de capas celulares, la segmentación del tubo neural o la migración en momentos concretos del desarrollo.

3.4. Relevancia de las cadherinas clásicas en los nichos neurogénicos

Los nichos neurogénicos presentes en el organismo adulto son regiones muy plásticas y dinámicas, en constante cambio y renovación, dónde las interacciones célula-célula son decisivas para responder a las señales del entorno. Por lo tanto, es lógico pensar que las uniones adherentes mediadas por cadherinas puedan estar ejerciendo un papel relevante. Los primeros indicios de que esto podía ser así, derivan del análisis de las células madre germinales presentes en los testículos u ovarios de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) que expresan E-cadherina, la cual media el anclaje de las SC al nicho, participa en la orientación del huso mitótico durante su división celular y promueve la migración de las células más diferenciadas, preservando en el nicho a las SC (Song et al., 2002; Yamashita y Fuller, 2008).

Las SC situadas en la capa basal de la epidermis de mamíferos, expresan proteínas de adhesión implicadas en la regulación de la orientación del huso mitótico, determinando el modo de división simétrico o asimétrico de las SC epiteliales (Lechler y Fuchs, 2005). Por su parte, las células satélites son las SC presentes en el músculo esquelético y se sitúan a lo largo de las fibras musculares y bajo la lámina basal. Están unidas a la lámina basal por uniones adherentes mediadas por integrinas y su extremo apical está unido a las fibras musculares por uniones de M-cadherina. Dicha distribución polarizada de proteínas de adhesión, determina la orientación del plano de división y por tanto el destino celular de las células hijas (Kuang et al., 2007; Kuang et al., 2008). Las SC hematopoyéticas residentes en la médula ósea no parecen expresar E-cadherina y la función de la N-cadherina en el anclaje de las células madre al nicho o en el mantenimiento del reservorio de células madre, está en entredicho (Kiel et al., 2007; Haug et al., 2008; Kiel et al., 2009; Li y Zon, 2010). Las SC van perdiendo capacidad proliferativa durante la vejez, promovida por el descenso en los niveles de expresión de E-cadherina (Boyle et al., 2007; Pan et al., 2007).

Las cadherinas clásicas E-cadherina y N-cadherina se expresan abundantemente durante el desarrollo del sistema nervioso, y su expresión perdura hasta la etapa adulta (Shimamura y Takeichi, 1992; Redies y Takeichi, 1993). En las últimas décadas, numerosos estudios se han enfocado en determinar cuál es la función que ejercen estas cadherinas en los reservorios de SC presentes en el SNC durante la etapa adulta. En el hipocampo, ambas cadherinas están presentes y se ha descrito su implicación en la estabilización de las LTP (*Long-Term Potentiation*), en el desarrollo del cono de crecimiento, en la formación de las

sinapsis y en la regulación del tráfico de las vesículas sinápticas de las neuronas presentes en la región CA3 del hipocampo (Fannon y Colman, 1996; Tang et al., 1998; Stan et al., 2010; Bodrikov et al., 2011). La E-cadherina y la N-cadherina han sido detectadas en la SEZ; sin embargo sus implicaciones en el mantenimiento y proliferación de las NSCs del nicho son todavía poco conocidas (Chen et al., 2006; Karpowicz et al., 2009). Así como se ha descrito el papel de la E-cadherina en la proliferación de los TAPs, la función de la N-cadherina se desconocía al inicio del presente trabajo (Karpowicz et al., 2009).

4. Regulación de los niveles y actividad de las cadherinas clásicas

Como se ha dicho ya, las cadherinas son proteínas de adhesión implicadas en diversos procesos biológicos relevantes como, el desarrollo embrionario, la plasticidad sináptica, el anclaje celular de las SC al nicho, la orientación del huso mitótico o la migración celular (Takeichi, 1988; Fannon y Colman, 1996; Tang et al., 1998; Song et al., 2002; Lechler y Fuchs, 2005; Yamashita y Fuller, 2008; Stan et al., 2010; Bodrikov et al., 2011; Hirano y Takeichi, 2012). La robustez de las interacciones entre cadherinas, está mediada por el número de moléculas cadherina que pueden interaccionar entre sí a través de sus dominios extracelulares, permitiendo así la modulación de su rigidez (Overduin et al., 1995; Pertz et al., 1999), factor imprescindible en procesos biológicos como el crecimiento axónico, donde se postula que las interacciones deben ser débiles, o la formación de las uniones sinápticas, donde las interacciones deben ser más fuertes (Colman, 1997). Por ello, es imprescindible la regulación de los niveles de cadherinas en la superficie. Las células disponen de una amplia batería de mecanismos fisiológicos mediante los cuales modulan los niveles de cadherinas expuestas en la superficie celular, los más relevantes son: modulación de la cantidad total por regulación transcripcional, la degradación lisosomal, la exocitosis, la endocitosis o internalización, la escisión proteolítica o la modulación de la rigidez de las uniones establecidas.

4.1. Regulación transcripcional de las cadherinas clásicas

Durante las primeras etapas del desarrollo neural, la expresión de la N-cadherina en el neuroepitelio es muy abundante (Hatta et al., 1987; Paulson et al., 2014). Uno de los primeros factores de transcripción que se activan para generar neuronas en la placa neural y en las placodas, es Sox2 (*sry-box containing gene 2*) (Matsumata et al., 2005; Smith et al., 2009; Dady et al., 2012). Sox2 es capaz de inducir la activación de la expresión de la

NCadherina en estas regiones, mediante la regulación de 3 secuencias potenciadoras (*enhancer*) situadas en el gen que codifica para la N-cadherina (Matsumata et al., 2005; Smith et al., 2009). Algunos trabajos demuestran que, en determinados momentos durante el desarrollo, los factores de transcripción de la familia Pax (*Paired Box transcription factor*) pueden promover la expresión del gen de la N-cadherina (*Cdh2*). El factor Pax2 es capaz de regular la expresión de la N-cadherina durante el desarrollo de las placodas ópticas y Pax6 durante el desarrollo de la retina (Christophorou et al., 2010; Rungger-Brandle et al., 2010).

Sin embargo, las cadherinas también pueden sufrir una regulación negativa a nivel de su transcripción (Thiery et al., 2009; Nieto, 2013). Un estudio reciente demuestra la acción negativa que ejerce el factor de transcripción Foxp2/4 sobre la expresión del ARNm de la N-cadherina, de manera directa, o indirecta a través de la represión de Sox2, que permite la migración y diferenciación de las nuevas neuronas generadas durante la neurogénesis en el neuroepitelio (Rouso et al., 2012). La familia de reguladores transcripcionales Slug/Snail y SIP1 (*Smad-Interacting Protein 1*) actúan como represores de la transcripción génica de la E-cadherina, promoviendo la liberación de la β -catenina de la membrana y favoreciendo la activación de los factores de transcripción TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*) (Cano et al., 1996; Batlle et al., 2000; Comijn et al., 2001; Conacci-Sorrell et al., 2003). Por otro lado, se ha descrito que las proteínas Snail y Twist son capaces de reprimir la expresión de la E-cadherina mediante su unión directa a las secuencias cajas-E (del inglés *E-box*) situadas en el promotor del gen y posee un sitio de unión independiente de LEF (Nieto, 2002; Jamora et al., 2003; Yang et al., 2004; Lin et al., 2014). La familia de proteínas Snail interviene en la señalización mediada por factores de crecimiento como TGF- β , BMP o FGF (Nieto, 2002), por lo que puede actuar como nexo para integrar las diversas señales celulares (Niessen et al., 2011). La expresión de estos represores transcripcionales está mediada por microARN, como los de la familia miR200, que mantienen la expresión de la E-cadherina mediante la inhibición de ZEB1 (*Zinc finger E-Box-binding homeobox-1*) y ZEB2 (*Zinc finger E-Box-binding homeobox-2*) (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008).

Durante el proceso de carcinogénesis, se ha observado que la metilación en residuos de citosina de islas de dinucleótidos CpG, en la secuencia de ADN del promotor de la E-cadherina, promueven la inhibición de su expresión (Strathdee, 2002).

4.2. Regulación del tráfico de las cadherinas clásicas

La traducción del ARNm generado tras transcripción, genera un péptido inmaduro, pre-pro-cadherina, que es dirigido hasta el retículo endoplasmático rugoso (RER) para su escisión y maduración (Koch et al., 2004). El péptido resultante, pro-cadherina, no tiene propiedades adherentes, debido a impedimentos estéricos (Koch et al., 2004), y es transportado desde el RER hasta la red del trans Golgi (TGN), desde donde se dirige el transporte de las nuevas proteínas sintetizadas, a través de vesículas, hacia su correcta localización en la membrana plasmática (Chen et al., 1999; Bryant y Stow, 2004). Las nuevas proteínas generadas contienen una secuencia conservada que es reconocida por otras proteínas para dirigir su transporte hacia su destino celular (Mellman y Warren, 2000; Spiliotis y Nelson, 2003). En el caso de la E-cadherina, la presencia de un dominio rico en leucinas localizado en la región citoplasmática, promueve la regionalización baso-lateral en células epiteliales (Miranda et al., 2001). Se ha demostrado que el transporte de las cadherinas, desde la red TGN hasta la membrana, está mediado por la interacción de la catenina p120 o β -catenina, ancladas al extremo citosólico de la cadherina (Chen et al., 1999; Chen et al., 2003; Franz y Ridley, 2004; Yanagisawa et al., 2004; Fagotto, 2013).

Las pro-cadherinas transportadas, son procesadas previamente o tras la incorporación en la membrana plasmática (Maret et al., 2010; Reines et al., 2012). Se ha planteado que la regulación del corte del pro-dominio podría estar implicada en el control de la plasticidad sináptica, dado que su procesamiento ocurre coincidiendo con la sinaptogénesis, y el bloqueo de la escisión promueve el retardo del proceso de formación sináptica (Latefi et al., 2009; Reines et al., 2012).

La integridad de las cadherinas, una vez insertadas en la membrana celular, puede llevarse a cabo mediante procesos de fosforilación o ubiquitinización. Las proteínas CKII (*Casein Kinase-II*) y GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*) están implicadas en la fosforilación de tres residuos de serina presentes en el dominio citoplasmático (S684, S686 y S692) de la E-cadherina. La fosforilación de los residuos de serina incrementa la afinidad entre la β -catenina y la E-cadherina, promoviendo su interacción en la membrana (Huber y Weis, 2001). En cambio, la fosforilación de la β -catenina por Src o EGF (Nelson y Nusse, 2004), en los residuos de tirosina Y489 o Y654, o en la tirosina Y142 de la α -catenina, promueven su disociación de la E-cadherina (Nelson y Nusse, 2004). La ubiquitinización mediada por la E3 ubiquitin ligasa Hakai (Fujita et al., 2002), o bien, la fosforilación mediada

por las tirosina-quinazas Fer, promueven la disrupción del complejo cadherina-catenina y promueve su internalización por endocitosis (Avizienyte et al., 2002; Nelson y Nusse, 2004), por lo que es un modo de regular la integridad en la membrana (Lilien y Balsamo, 2005).

La interacción de la catenina p120 con el dominio intracelular de las cadherinas, promueve la estabilización de las mismas en la membrana plasmática, debido a que interacciona con los residuos de leucinas y tirosinas, evitando así la endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, la fosforilación de p120, por las quinazas Src o Fer, induce la ruptura del complejo cadherina-catenina p120 de la superficie celular (Nelson y Nusse, 2004). Estudios de pérdida de función indican que el déficit de p120 promueve la endocitosis y degradación de las cadherinas.

Las proteínas de membrana pueden ser internalizadas una vez expuestas en la superficie de la membrana plasmática, mediante mecanismos dependientes o independientes de vesículas de clatrina, probablemente dependiendo del contexto celular (Niessen et al., 2011; Cadwell et al., 2016). Una vez internalizadas, las cadherinas pueden ser conducidas de nuevo hacia la membrana para su reciclaje (Le et al., 1999) o bien son conducidas a degradación. Generalmente, las cadherinas son degradadas en los lisosomas (Davis et al., 2003; Xiao et al., 2003), aunque también se ha descrito que pueden ser degradadas por el proteasoma, pero su efecto sobre el reciclaje todavía no está claro (Davis et al., 2003). Al igual que receptores de membrana, como el receptor de la transferrina, las cadherinas pueden sufrir muchas rondas de reciclaje antes de ser conducidas a degradación (Niessen et al., 2011). El reciclaje puede tener diversas funciones biológicas: podría prevenir a las cadherinas internalizadas, procedentes del reciclaje o de la síntesis de novo, de la degradación, extendiendo así su tiempo de vida medio (Niessen et al., 2011); podría actuar como un mecanismo endógeno para remodelar las interacciones adherentes formadas, promoviendo la redistribución de los contactos adherentes (Lock y Stow, 2005), o podría servir para la internalización de otras proteínas con las que interaccionan (Bryant et al., 2005).

4.3. Proteólisis regulada de las cadherinas clásicas

Tras la transcripción, el transporte intracelular y las modificaciones post-traduccionales, las nuevas moléculas de N-cadherina generadas se intercalan en la membrana plasmática celular, dónde las propiedades funcionales de las uniones adherentes pueden modularse de forma rápida y aguda, a través del procesamiento proteolítico.

Las proteasas capaces de escindir el dominio extracelular de la N-cadherina, conocidas como *shedases*, pertenecen a un grupo diverso de enzimas proteolíticas más conocidas como metaloproteinasas de matriz extracelular (ECM) o MMPs. A pesar del nombre, también pueden degradar proteínas de membrana (Yong, 2005). El grupo comprende más de 20 endopeptidasas dependientes de zinc que actúan sobre todo en la proteólisis reguladas de macromoléculas de ECM, tales como los colágenos de la membrana intersticial y basal, los proteoglicanos agregano, decorina, biglicano, fibromodulina o versican, y de proteínas accesorias de la ECM como la fibronectina (Yong, 2005; Page-McCaw et al., 2007). Mientras que la mayoría de los miembros de la familia de MMPs son secretadas (las MMP clásicas), existen seis MMPs de tipo membrana denominadas MT-MMPs (MT, de *membrane type*), localizadas en la membrana plasmática de ciertas células bien a través de un dominio transmembrana (MT1-, MT2-, MT3- y MT5-MMP) o mediante una molécula de glicosil-fosfatidilinositol (MT4- y MT6-MMP) (Zucker et al., 2003). Las MT-MMPs se caracterizan por poseer una secuencia peptídica que es procesada por serín-proteasas de tipo furina para dar lugar a la activación intracelular del pro-enzima (Zucker et al., 2003). La familia de MMPs también incluye las denominadas ADAM (del inglés *A Disintegrin And Metalloproteinase* o *adamlysins*) y ADAMTS (del inglés *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motif*). Las adamilisinás son MMPs unidas a la membrana que pueden degradar moléculas de ECM como el agregano y múltiples proteínas de membrana. La más conocida acción de estas ADAM es la acción de ADAM-17 como la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) que activa el pro-TNF-alfa (Rose-John, 2013).

Estas MMPs están emergiendo como importantes reguladores de una serie de procesos biológicos, no sólo a través de su papel tradicional en la remodelación de la ECM, sino también a través de acciones menos entendidas. Aunque son sobre todo conocidas por sus efectos en el remodelado proteolítico de la ECM, sobre todo durante el desarrollo fetal, en los últimos años se han acumulado datos que sugieren que las tanto las MMP como las

ADAM, desempeñan, además, un papel importante en la función adulta del SNC y periférico (Page-McCaw et al., 2007). Así, por ejemplo, miembros de la familia ADAM contienen un dominio de adhesión celular además de su dominio catalítico y están implicados en la escisión regulada de moléculas que modulan el crecimiento y la guía axonal y la formación de conexiones (McFarlane, 2003). De hecho, una acción concertada de diferentes MMPs parece ser relevante para la construcción y la fisiología de los circuitos neurales (Kaczmarek et al., 2002).

En este contexto, se ha demostrado que MMPs específicas participan en la proteólisis de moléculas de la superficie celular, actuando como *shedases* de motivos extracelulares de ciertas cadherinas o ligandos de membrana, entre otros (Chang y Werb, 2001). Este es el caso de MT5-MMP (MMP-24), la quinta MMP de tipo membrana identificada en tejidos humanos (Llano et al., 1999; Zucker et al., 2003). En marcado contraste con el patrón de expresión de otras MMPs, la expresión de MT5-MMP está principalmente circunscrita a células neuronales tanto del SNC como del periférico (Hayashita-Kinoh et al., 2001). Curiosamente, la expresión de MT5-MMP en los tejidos neurales se regula espacial y temporalmente durante el desarrollo embrionario y postnatal en roedores (Jaworski, 2000; Sekine-Aizawa et al., 2001). Como miembro de la familia de las MMPs, MT5-MMP puede degradar varios componentes presentes en la ECM, tales como proteoglicanos inhibidores de sulfato de condroitina, promoviendo de este modo el crecimiento de neuritas *in vitro* (Wang et al., 1999; Hayashita-Kinoh et al., 2001). Aunque la información disponible acerca de la relevancia funcional *in vivo* de MT5-MMP en procesos normales y patológicos es muy escasa (Komori et al., 2004; Folgueras et al., 2009), esta MMP de membrana parece capaz de mediar la escisión de la molécula de adhesión celular N-cadherina en células heterólogas (Noe et al., 2001; McGuire et al., 2003; Monea et al., 2006; Folgueras et al., 2009).

Todas las ADAM están ancladas en la membrana y son capaces de escindir los dominios extracelulares de varias proteínas que coexisten con ellas en la superficie celular. ADAM10 es una de las más importantes *shedases* del cerebro y los estudios de hibridación *in situ* indican que su ARNm se encuentra ampliamente distribuido por todo el cerebro del ratón adulto (Karkkainen et al., 2000). Algunas de sus proteínas sustrato incluyen la proteína precursora amiloide (APP), neuroligina 1, N-cadherina, NCAM, Efrina A2 y A5 o Delta-like 1 (Saftig y Lichtenthaler, 2015). La acción proteolítica de ADAM10 sobre las cadherinas ha sido de las más estudiadas; sin embargo, se han descrito otras proteínas capaces de

escindir las uniones cadherina como kallikreinas (Klucky et al., 2007) o la metaloproteasa meprin β (Huguenin et al., 2008).

La actividad de las MMPs está estrechamente controlada por diferentes mecanismos, incluyendo la transcripción de genes, la activación pro-enzima y la inhibición de MMP. La mayoría de las MMPs se sintetizan como enzimas inactivas y la eliminación proteolítica de sus pro-dominios por la convertasa furina da como resultado su activación irreversible. Es importante destacar que su actividad enzimática está regulada por una serie de moléculas secretadas, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), que se unen de forma reversible a las MMPs convertidas y bloquean su actividad (Jackson et al., 2017). Otros mecanismos reguladores incluyen su degradación o su tráfico/reciclado a la superficie celular para secreción o incorporación a la membrana plasmática (Linford et al., 2012). Además, varias moléculas pueden asociarse con ADAM10, a través de interacciones físicas con sus dominios citoplásmicos o extracelulares. Entre estos últimos, la proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos de Kazal (RECK) regula críticamente la señalización Notch antagonizando el procesamiento del ectodominio de ligandos de Notch por ADAM10 (Muraguchi et al., 2007). Del mismo modo, las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (sFRPs) 1 y 2, que son conocidas como moduladores Wnt solubles, pueden asociarse con ADAM10 y regular su actividad (Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015; Saftig y Bovolenta, 2015).

A pesar de que los sitios de reconocimiento y escisión de las cadherinas pueden variar ligeramente entre las diversas proteasas, el corte proteolítico de la región extracelular de las cadherinas se produce cerca del dominio transmembrana, generando un fragmento soluble extracelular de unos 90 KDa y otro intracelular de 40 KDa, denominado CTF1 (fragmento C-terminal 1). El fragmento intracelular a su vez, puede sufrir otro corte proteolítico llevado a cabo por la γ -secretasa, liberando otro fragmento intracelular de 35 KDa denominado CTF2 (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005). La liberación del fragmento CTF2 al citosol se ha relacionado con la activación de diversas rutas de señalización (Marambaud et al., 2002; Reiss et al., 2005). Para el fragmento CTF1 se ha descrito recientemente un papel en la enfermedad de Alzheimer, dónde altera la sinapsis y promueve la formación del péptido β -amiloide (Andreyeva et al., 2012). La fracción extracelular generada también tiene actividad biológica y puede servir como soporte para el anclaje de otras células, como atrayente para favorecer la migración de otras células hacia ese punto, o para interferir con

otras uniones adherentes y bloquear la unión, mediante la interacción con el dominio extracelular (Paradies y Grunwald, 1993; Noe et al., 2001; Symowicz et al., 2007).

4.4. Señalización mediada por cadherinas clásicas

El dominio citoplásmico de las cadherinas posee secuencias de unión a las cateninas β , α y p120. La β -catenina puede interaccionar con el dominio citosólico de las cadherinas y juega un papel importante en la organización estructural y en la función de las cadherinas, estableciendo un nexo entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina (Gumbiner, 2000; Jamora y Fuchs, 2002). La catenina p120, interacciona con el dominio citosólico de las cadherinas próximo a la región transmembrana y está implicada en la regulación de la integridad de las uniones adherentes (Davis et al., 2003). La interacción β -catenina y catenina p120, con la cadherina, está regulada por fosforilaciones, induciendo la endocitosis y promoviendo la liberación de las cateninas al citosol. La estabilización y acumulación de la β -catenina en el citoplasma, es un factor relevante para la inducción de diversas vías de señalización (Nelson y Nusse, 2004).

La glicoproteína de secreción Wnt (procedente de la fusión de los nombres *Wingless* e *Int*,) está implicada en mecanismos que dirigen la proliferación o la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario (Logan y Nusse, 2004). Las proteínas Wnt inician una cascada de señalización tras su unión a dos receptores de membrana, Frizzled y LRP-5/6 (*Lipoprotein receptor-related protein 5/6*). La vía de señalización canónica de Wnt induce la fosforilación de ambos receptores en su extremo citosólico, mediante las fosfatasas CK1 y GSK-3 β . De este modo, el reclutamiento de las fosfatasas en la membrana, favorece la liberación, acumulación y estabilización de la β -catenina en el citosol, promoviendo su entrada en el núcleo e interacción con el factor de transcripción TCF/LEF, implicado en la activación de la transcripción génica. En ausencia de los ligandos Wnt, se interrumpe la señalización mediada por los receptores Frizzled y LRP-5/6, lo que promueve el retorno al citosol de las fosfatasas CK1 y GSK-3 β . Una vez en el citoplasma, ambas fosfatasas, forman un complejo proteico junto con las proteínas Axin2 y APC (*Adenomatous polyposis coli*), capaz de fosforilar a la β -catenina citosólica en residuos serina/treonina. Tras la fosforilación, la β -catenina interacciona con el b-TrCP (*b-transducin repeat-containing protein*), un componente del complejo E3 ubiquitin ligasa, que marca a la β -catenina para la ubiquitinización y degradación en el proteasoma 26S. De este modo, se reducen los niveles de β -catenina en el citosol y se promueve la activación de la transcripción mediada por

TCF/LEF (más información en las revisiones: Nelson y Nusse, 2004; Heuberger y Birchmeier, 2010; Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015).

Algunos componentes de la vía de Wnt participan en procesos morfogénicos que no implican directamente la transcripción génica vía β -catenina/TCF/LEF, sino que promueven cambios en el citoesqueleto y la polaridad celular mediante otras vías de señalización. La vía de señalización, independiente de β -catenina/TCF/LEF, más conocida es la PCP (*Planar Cell Polarity*). Los receptores Frizzled activan una cascada de señalización a través de las GTPasas Rac1 y RhoA y la quinasa JNK (*JUN-N-terminal Kinase*). Las vías de señalización PCP y Wnt, son antagónicas, cuando se activa una vía, generalmente la otra permanece inhibida, probablemente debido a la especificidad entre ligando y receptor. Por ejemplo, se ha descrito que Wnt5a activa preferencialmente a la vía PCP, compitiendo con el ligando Wnt3a en su unión a Frizzled, inhibiendo de este modo la activación de la vía de Wnt (Sato et al., 2010). La vía de señalización PCP requiere a los receptores Ror y PTK7 como correceptores (revisado en: (Niessen et al., 2011; Niehrs, 2012; Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015).

Otra vía de señalización independiente de Wnt, es la vía Wnt-Ca²⁺, inicialmente descrita en *X. laevis* y pez cebra. En este caso, la vía se inicia en los receptores Frizzled y a través de la activación de proteínas G heterodiméricas. Las proteínas G median la activación de la fosfolipasa C (PLC), que a su vez estimula la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP3). El IP3 promueve la liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares y la activación de efectores como CAMKII (*Ca²⁺- and calmodulin-dependent Kinase II*), calcineurina y PKC (*Protein Kinase C*), que activan la transcripción génica mediada por NFAT (*nuclear factor associated with T cells*). La vía Wnt-Ca²⁺ se ha descrito en cáncer, inflamación y neurodegeneración (revisado en: (Niessen et al., 2011; Niehrs, 2012; Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015).

Algunos factores de crecimiento pueden mediar en la señalización de las cadherinas. La activación del factor de crecimiento IGF-2 (*Insulin-like growth factor-2*), promueve la traslocación de la β -catenina citosólica al núcleo, donde interacciona con el factor de transcripción TCF/LEF. En el caso del IGF-1, únicamente tras la estabilización de la β -catenina, se induce su entrada al núcleo (Playford et al., 2000; Morali et al., 2001).

Por otro lado, se ha descrito que los fragmentos intracelulares generados tras el corte proteolítico de la γ -secretasa, también pueden intervenir en la activación de rutas de

señalización. Se ha descrito el papel del fragmento intracelular CTF2 en la regulación de la expresión génica, mediante la liberación de la β -catenina anclada a membrana, de modo que la β -catenina puede difundir hasta el núcleo y activar la secuencia potenciadora LEF1 para la transcripción de genes diana como la ciclina D1 (Marambaud et al., 2002; Reiss et al., 2005). Además, el fragmento CTF2 liberado, también puede unirse a CBP (*CREB-binding protein*) y promover su degradación, inhibiendo así su interacción con CREB (*cAMP response element-binding protein*) e inhibiendo el complejo de transcripción mediado por CREB (Marambaud et al., 2003).

Objetivos

Este trabajo se fundamenta en la hipótesis de que las interacciones directas de las NSCs adultas con elementos celulares adyacentes, a través de uniones adherentes, juega un papel en la regulación del estado de quiescencia-activación de estas células.

Los objetivos que se han desarrollado en este trabajo son:

- 1.** Estudiar la contribución de la adhesión mediada por N-cadherina en la organización del nicho subependimario y en el ciclo de quiescencia-proliferación de las NSCs adultas.
- 2.** Estudiar la implicación de la proteólisis regulada del ectodominio de la N-cadherina por metaloproteinasas específicas, en el mecanismo molecular que regula la adhesión de las NSCs subependimarias adultas al nicho y su comportamiento.
- 3.** Estudiar la modulación de los mecanismos de proteólisis regulada de la N-cadherina por elementos del nicho subependimario.

Material y Métodos

1. Animales

1.1. Colonias y mantenimiento de ratones

En este trabajo se han usado ratones jóvenes de edades comprendidas entre las seis semanas y los cuatro meses de vida. Las hembras se han destinado preferentemente al mantenimiento de la colonia y los machos para la realización de los experimentos. Todos fueron criados y mantenidos en el *Servicio de Producción y Experimentación Animal* del Campus de Burjasot bajo la supervisión de la veterinaria jefe de la Universidad de Valencia y siguiendo las directrices de la Unión Europea 86/609/EEC y la normativa española RD-1201/2005. Los procedimientos realizados a los ratones a lo largo de esta tesis han sido aprobados por la Generalitat Valenciana, acorde a los artículos 31 y 33 del Real Decreto 53/2013, y por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (CEEA).

A continuación se listan las cepas de ratones modificados genéticamente generados por otros grupos de investigación, bien cedidas por estos grupos o adquiridas comercialmente:

Cepa *Mmp24*<*tm1Otin*>: El grupo del Dr. Carlos López-Otín generó los ratones MT5-MMP (nombrada como MT5 en este trabajo) nulos sobre un fondo genético mixto C57BL/6J y 129S1/SvImJ, mediante la sustitución de los exones 5 a 7 del gen *Mmp24* por una secuencia de expresión del antibiótico Neomicina bajo el promotor PGK, causando así la pérdida del dominio catalítico en la proteína MT5 mutante. Mediante *Northern blot* demostraron la delección de parte del gen *Mmp24* y, dado que la proteína mutante generada era incapaz de activar a la metaloproteasa pro-MMP2 (Zucker et al., 2003), corroboraron la falta de actividad enzimática en estos ratones (*Mmp24 KO*; **Figura 9 a**; Folgueras et al., 2009). En el texto y las figuras de esta memoria, esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado *Mmp24 KO*.

Cepa *Sfrp1*<*tm1Aksh*>: La generación de los ratones deficientes para sFRP-1 se llevó a cabo por el grupo del Dr. Akihiko Shimono, sobre un fondo genético mixto 129S1/SvImJ y C57BL/6J, mediante la sustitución de la metionina que inicia la pauta de lectura y del exón 1 del gen *Sfrp1* por el gen de la β -galactosidasa (*LacZ*), impidiendo su expresión y la detección del mRNA transcrito (*Sfrp1 KO*; **Figura 9 b**; Satoh et al., 2006). La cepa nos fue cedida por la Dra. Paola Bovolenta. El fenotipo de los ratones mutantes generados es aparentemente normal, indistinguible de los ratones hermanos de camada de

fenotipo salvaje. Los ratones son viables y fértiles, el desarrollo se sucede con normalidad, sobreviven durante largos períodos de tiempo, llegando hasta la vejez, y no muestran ningún tipo de anomalía de forma aparente. En el texto y las figuras de esta memoria esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado *Sfrp1 KO*.

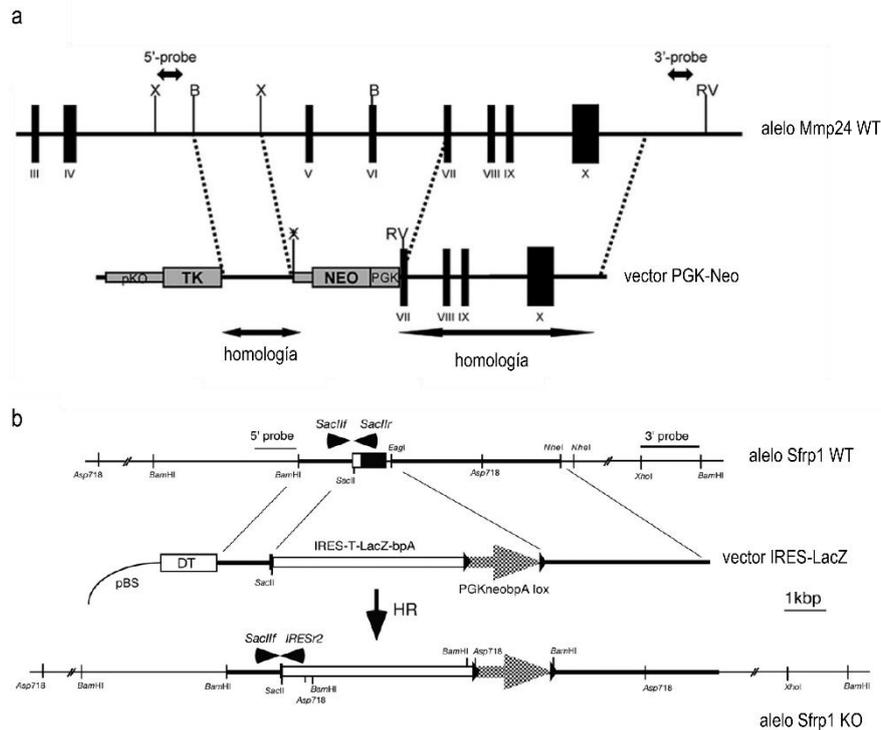


Figura 9. Estrategias seguidas para la generación de los ratones deficientes en MT5 y sFRP-1. (a) Los ratones nulos para MT5-MMP se generaron en el laboratorio del Dr. Carlos López-Otín, sobre un fondo genético mixto C57BL/6J y 129S1/SvImJ, mediante la sustitución de los exones 5 a 7 del gen *Mmp24* por una secuencia de expresión del antibiótico Neomicina bajo el promotor PGK. Imagen modificada de (Folgueras et al., 2009) (b) La generación de los ratones deficientes para sFRP-1 se llevó a cabo por el grupo del Dr. Akihiko Shimono, sobre un fondo genético mixto 129S1/SvImJ y C57BL/6J, mediante la sustitución de la metionina que inicia la pauta de lectura y del exón 1 del gen *Sfrp1* por el gen de la β -galactosidasa (*LacZ*). Imagen modificada de (Sato et al., 2006).

Cepas de ratones modificados genéticamente y adquiridos comercialmente:

Cepa de mutantes condicionales del gen *Cdh2* <B6.129S6(SLJ)-*Cdh2tm1Glr/J*> de *The Jackson Laboratory*: esta cepa fue generada en un fondo genético mixto C57BL/6J y 129S1/SvImJ, y posee sitios loxP flanqueando al exón 1 del gen *Cdh2* (N-Cadherina) (Kostetskii et al., 2005). En el texto y las figuras de esta memoria esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado *Cdh2^{floxed}*.

Cepa de ratones transgénicos de expresión selectiva de recombinasa Cre <FVB-Tg(*GFAP-cre*)25Mes/J> de *The Jackson Laboratory*: esta cepa fue generada en un fondo genético FVB/N, y expresa la proteína recombinasa Cre bajo el promotor del gen *GFAP*

humano (Zhuo et al., 2001). En el texto y las figuras de esta memoria esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado GFAP(Cre). Con el objeto de estudiar el efecto de la pérdida de las uniones mediadas por N-Cadherina en las células GFAP+, se realizaron cruces entre esta cepa y la $Cdh2^{floxed}$ y se obtuvieron hermanos de camada con genotipos $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y $Cdh2^{floxed}$.

Cepa de ratones transgénicos reporteros $\langle FVB.CG-Tg(CAG-eGFP)B5Nagy/J \rangle$ de *The Jackson Laboratory*: generados en un fondo congénico FVB/N, expresan la versión más brillante (e, *enhanced*) de la proteína verde fluorescente (eGFP) en todas sus células, dado que su expresión está controlada bajo el promotor de la β -actina (Hadjantonakis et al., 1998). En el texto y las figuras de esta memoria esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado CAG(GFP).

Cepa de ratones transgénicos reporteros $\langle Tg(GFAP-lacZ, eGFP)7Kdmc \rangle$ de MMRRC: en esta cepa la proteína eGFP se expresa bajo el control del promotor de la GFAP (Casper et al., 2007; Nam y Benezra, 2009). En el texto y las figuras de esta memoria esta cepa de ratones modificados genéticamente se ha denominado GFAP(GFP).

En algunos ensayos *in vitro* o en los experimentos de pérdida o ganancia de función, llevados a cabo tras la infección intraestriatal o intraventricular con partículas lentivirales, se utilizaron hembras C57BL/6J de 6 semanas de edad obtenidas de *The Jackson Laboratory*.

1.2. Genotipado

Cuando los ratones de las nuevas camadas alcanzan los 21 días de edad y se destetan de sus madres, se realiza una extracción de ADN a partir de un trozo de cola u oreja, siguiendo las instrucciones del Kit comercial *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit* (ThermoFisher). Sobre las muestras de tejido obtenido se añaden 8 μ L del tampón de lisis, que consiste en 7,8 μ L del tampón de dilución del *kit* y 0,2 μ L de un compuesto denominado *DNARelease Additive*, que permite la extracción del ADN. A continuación se incuban en el tampón de lisis durante 2-5 minutos a temperatura ambiente y se calientan a 98°C durante otros 2 minutos. En este punto, se recupera el sobrenadante y se procede al análisis y determinación del genotipo de los ratones. Para ello, el sobrenadante obtenido se diluye seis veces en agua libre de nucleasas, y se usan 2 μ L de la dilución para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y amplificar fragmentos del ADN genómico deseado. Las condiciones de PCR adecuadas para la amplificación y determinación génica de cada modelo

animal usado en el trabajo, se detallan en la **Tabla 1 (Anexo)**. Los fragmentos de ADN genómico se amplifican con la GoTaq® G2 Flexi polimerasa (Promega) y se analizan mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 2-3% en tampón TAE (tampón Tris-HCl 40 mM a pH 7.6, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM).

2. Estudios *in vivo*

2.1. Inyección de nucleósidos trazables

Para los ensayos de proliferación *in vivo* se administran análogos de timidina a una dosis final de 50 mg/Kg en ratones de 2 meses de edad. El régimen de inyecciones dependerá de la población celular que deseemos detectar (Ferron et al., 2007).

Para marcar las células tipo B, son necesarias 7 inyecciones intraperitoneales (una cada dos horas durante un total de 12 horas) intraperitoneales de una solución de 5-cloro-2'-desoxiuridina (CldU; Sigma) o 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU; Sigma) a 10 mg/ml en solución salina (cloruro sódico al 0.9% en agua destilada estéril). Se inyecta un volumen adecuado al peso del animal para conseguir una dosis final de 50 mg/Kg. Los ratones inyectados se sacrifican 21-28 días después (**Figura 10**), tiempo suficiente para que las células con ciclo de división activo y corto (progenitores de rápida amplificación o TAPs) hayan sido capaces de diluir la marca y las células con un ciclo de división lento o postmitóticas retengan la marca (*Label Retaining Cells* o LRC). Por lo tanto con este método, detectaremos marca de CldU/BrdU en células madre en la SEZ, en neuronas del OB diferenciadas a partir de neuroblastos marcados en su última fase S o en oligodendrocitos del cuerpo calloso diferenciados a partir de oligodendroblastos marcados en su última fase S (Porlan et al., 2013; Delgado et al., 2014).

Para marcar células de ciclo celular rápido, como TAPs y neuroblastos, se realiza una única inyección intraperitoneal de una solución de 5-iodo-2'-desoxiuridina (IdU; Sigma) a una concentración 10 mg/ml en dimetil sulfóxido (DMSO) al 40% en solución salina para conseguir una dosis final de 50 mg/Kg peso del animal. Se sacrifican los ratones una hora después de la inyección (Porlan et al., 2013; Delgado et al., 2014) (**Figura 10**).



Figura 10. Régimen de inyecciones de los análogos de Timidina inyectados. Para marcar las células con un ciclo celular lento, como es el caso de las células B residentes en la SEZ, se realizan 7 pinchazos de BrdU o CldU, uno cada 2 horas durante un total de 12 h, y los ratones sobreviven otros 21-28 días. Transcurrido ese período de tiempo y una hora antes del sacrificio, los ratones son inyectados de nuevo con un análogo de timidina diferente (IdU), para poder identificar las células con un ciclo celular activo y diferenciarlas de las marcadas 21-28 días antes.

2.2. Infusión intracerebral

Para la implantación de mini-bombas osmóticas, el día previo a la operación, se rellenan y montan las bombas según las instrucciones del fabricante (Alzet®) y se dejan toda la noche en el baño a 37 °C inmersas en solución salina para equilibrarlas y asegurar la posterior correcta liberación del compuesto. Las mini-bombas osmóticas usadas en este trabajo (1007D), acopladas a un *kit* de infusión (*Brain Infusion Kit 3; Alzet®*) son capaces de liberar el compuesto cargado a un flujo de 0,5 µl/hora durante un máximo de 7 días (**Figura 11**).



Figura 11. Componentes del Kit de infusión acoplado a la minibomba osmótica 1007D. Imagen extraída de la página *web* de Alzet®.

Se prepara una solución anestésica compuesta por 1 mg de Medetomidina y 75 mg de Ketamina por kilo de peso del ratón en solución salina estéril y se inyectan 125 µl intraperitonealmente. Cuando los ratones pierden el reflejo podal, se rasura la piel de la cabeza (entre las orejas) y se esteriliza la zona con iodopovidona o etanol al 70%. A continuación se fija cuidadosamente la cabeza del ratón en el equipo estereotáxico (*NeuroLab, Leica Biosystems*), por boca y oídos, y se aplica lubricante oftálmico en los ojos. Con la ayuda de un bisturí se hace un corte longitudinal de 1 cm en la piel de la cabeza, dejando al descubierto el cráneo. El estereotáxico nos permite localizar las coordenadas en las que deseamos implantar las bombas (**Tabla 2; Anexo**), usando Bregma como referencia. Las coordenadas se ajustan dependiendo de la edad y la cepa de ratón usado. En las coordenadas correctas y con la ayuda de un taladro eléctrico, realizamos un agujero en el cráneo evitando daños en el cerebro para poder introducir y fijar la cánula de la bomba. Tras la fijación de la bomba con un pegamento quirúrgico (*Histoacryl®*), se realiza un pequeña

incisión en el lomo del animal y con un fórceps se genera una bolsa intracutánea donde se inserta y oculta el resto de la bomba.

Liberamos al ratón del estereotáxico y lo depositamos sobre una cama calefactora, dónde le cerramos la herida con pegamento quirúrgico y revertimos la anestesia con atipamezol a 0,1 mg/Kg en suero glucosalino (glucosa 0,3%). Para minimizar el daño post-operatorio, se aplica en las orejas una solución de lidocaína al 2% en suero salino y se inyecta por vía intracutánea el analgésico butorfanol a 0.5 mg/Kg en salino (Porlan et al., 2016).

En el estudio de regeneración celular del nicho, las mini-bombas osmóticas se cargan con una solución al 2% de antimetabólico Ara-C (citosina β -D-arabinofuranósido; Sigma) en solución salina o únicamente solución salina. El tratamiento dura 6 días, tras los cuales los ratones se sacrifican a diferentes tiempos para permitir la regeneración del nicho (Doetsch et al., 1999b). La eficiencia del tratamiento en la ablación de los TAPs y de los neuroblastos se comprueba mediante la inmunodetección del marcador de ciclo celular Ki67 y el marcador de neuroblastos DCX (doblecortina). Para evaluar el papel de las uniones mediadas por N-Cadherina, se rellenan las mini-bombas osmóticas con 80 μ g de anticuerpo EC-N-Cadherina (EC-NCad; Sigma) o con IgGs del mismo isotipo (Sigma) en salino.

En el caso de la inoculación de partículas lentivirales, se inyectan 1.2 μ L de lentivirus concentrado ($1 \cdot 10^6$ TU/ μ l) en hembras C57BL/6J de 1.5 meses a velocidad controlada automáticamente de 0,2 μ L/min, usando una jeringa Hamilton (33G) acoplada a un inyector (*MyNeuroLab*). En el caso de la infección intraestriatal, los daños producidos durante la operación generan astrogliosis en la zona. Para evitar los efectos derivados del daño post-operatorio causado, los ratones fueron sacrificados 2 meses más tarde. La infección en el ventrículo causa menor daño en el tejido circundante a la SEZ; por ello, los ratones fueron sacrificados 15 días después, tiempo suficiente, por otra parte, para permitir la expresión del transgén. Para el análisis de la nueva descendencia generada, los ratones se inyectaron con nucleósidos 10 días después de la infección intraventricular, para permitir la expresión del transgén y se sacrificaron 21 días después (**Figura 12**; Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b; Consiglio et al., 2004; Geraerts et al., 2006; Porlan et al., 2016).

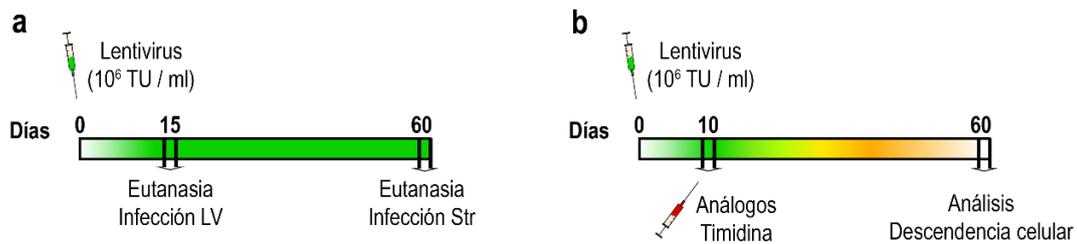


Figura 12. Esquema de trabajo seguido para la infección del estriado y/o ventrículo lateral con lentivirus. (a) Los ratones infectados en el ventrículo se sacrificaron 15 después, dado que la operación no genera astrogliosis en la zona y es tiempo suficiente para la expresión del transgén. En el caso de la infección intraestriatal, sí se genera daño en el tejido, por lo que, para evitar efectos provocados por la astrogliosis, los ratones fueron analizados 60 días más tarde. (b) Para el estudio de la progenie neuronal y oligodendroglial que llega hasta al OB y al cuerpo calloso, respectivamente, se inyectó CldU 10 días después de la infección.

2.3. Técnicas histológicas

Los ratones, generalmente de 25 gramos de peso, se anestesian profundamente mediante inyección de 200 µl de una mezcla de medetomidina (1,5 mg/Kg peso ratón) y ketamina (150 mg/Kg peso ratón) en suero salino. Cuando los ratones pierden el reflejo podal, se perfunden intracardiácamente a una velocidad de flujo de 5,5 ml/min con 27,5 ml de PBS 0,1 M (*Phosphate Buffer Saline*) y 82,5-110 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0,1 M. El cerebro se extrae y se post-fija con PFA al 4% durante una hora más a temperatura ambiente. Tras la post-fijación, el tejido se lava abundantemente con PBS 0,1 M y tanto la SEZ como el OB se seccionan con un vibratomo (Leica VT1000), obteniéndose cortes coronales seriados de 30 µm de grosor. La superficie del OB que se secciona y se recoge para su análisis llega aproximadamente hasta el nivel de Bregma 2,46 mm. En el caso de la SEZ, el área seccionada está entre Bregma 1,7 mm y -0,22 mm, aproximadamente. Cada corte generado se recoge de forma seriada, en una solución de PBS y azida sódica al 0,05%. Las series correspondientes a la SEZ están compuestas por unos 5-6 cortes y en las series del OB podemos encontrar unos 10-11 cortes por serie.

También se puede estudiar la SEZ a partir de la extracción de tejido fresco (preparaciones *in toto* o *wholemout*). En este caso, se extrae el cerebro de ratones sacrificados por dislocación cervical. A continuación se disecciona la pared del ventrículo lateral en toda su extensión y ésta se fija levemente durante toda una noche con una solución de PFA al 4% y Triton-X100 al 0,1% en PBS 0,1 M.

2.3.1. Técnica inmunohistoquímica

Las secciones de tejido obtenidas se incuban a temperatura ambiente (Ta) durante 1 h y en agitación, en una solución bloqueante que contiene FBS (*Fetal Bovine Serum*) al 5%, glicina al 1%, BSA (*Bovine Serum Albumin*) al 1%, TritonX-100 al 0,1-0,2% y azida sódica al 0,05% en PB 0,1M. Posteriormente las muestras se incuban a 4 °C durante otras 24-48 h, con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (**Tabla 3; Anexo**).

Para la detección de análogos de timidina, antes del bloqueo de las uniones inespecíficas y de la incubación con los anticuerpos primarios, el tejido se trata con ácido clorhídrico (HCl) 2N durante 20 min y después se reestablece el pH del tejido con abundantes lavados de borato sódico al 1%.

En la detección fluorescente de los anticuerpos primarios, el tejido se incuba durante 1 h a Ta con los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes diluidos en solución bloqueante. En el caso de los anticuerpos primarios N-cadherina y EC-N-cadherina, que reconocen el dominio intracelular y extracelular de la N-cadherina, respectivamente, se requiere amplificar la señal, por lo que se realiza una primera incubación con anticuerpos secundarios biotinilados seguidos de una incubación con estreptoavidinas fluorescentes. Ambos anticuerpos se diluyen en solución bloqueante y se incuban durante 1 h a Ta (**Tabla 4; Anexo**).

Para identificar todas las células presentes en la muestra, incubamos el tejido durante 5 minutos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro; 1 mg/ml en agua destilada) tras lo cual se lava el tejido con PBS o agua destilada. Para preservar la fluorescencia, se monta el tejido con un medio de montaje específico (*FluoromountG*; EMS).

2.3.2. Tinción con violeta de cresilo

Las muestras de tejido en flotación se tratan con una solución de violeta de cresilo al 0,1% durante 5-10 minutos. A continuación, la muestra se lava rápida y brevemente con agua destilada, para eliminar los restos de colorante y se observa en el microscopio de campo claro, para comprobar que la marca de la tinción es la adecuada y está lo suficientemente contrastada. Finalmente, se montan los cortes sobre portaobjetos, se deshidratan con lavados de 5 minutos en baños con concentraciones crecientes de etanol (2 lavados al 70%, 96% y 100%) y por último, se realizan dos lavados de 5 minutos con xileno:etanol (1:1), y dos

lavados más con xileno al 100%. Para preservar la muestra, se monta la preparación con un medio de montaje permanente (*Eukitt*, EMS).

2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras de tejido fresco de SEZ, se diseccionan y fijan durante toda la noche en el interior de cápsulas microporosas (30 μm ; *Ted pella*; ref. 4619), inmersas en una solución de PFA al 4% en PBS 0,1M. Al día siguiente, se deshidratan las muestras con dos lavados, de 10 minutos cada uno, de etanol de concentraciones crecientes (70%, 96% y 100%). Tras la deshidratación, se secan las muestras por punto crítico (*Tousimis Auto samdri-814*). Después del secado, las muestras son muy frágiles, por lo que, con ayuda de un pincel, se depositan sobre un soporte metálico mediante cinta adhesiva de doble cara y se somborean con una mezcla monoatómica de oro-paladio. Finalmente, las muestras pueden fotografiarse en el microscopio electrónico de barrido (HitachiFE S4100). El voltaje usado en este trabajo para la obtención de las imágenes es de 10kV. Los estudios de microscopía electrónica se han realizado en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, bajo la supervisión de los técnicos de la sección de *Microscopía Electrónica y Confocal*.

2.3.4. Recuentos celulares

Para el análisis de las poblaciones celulares presentes en la SEZ, al menos dos cortes mediales de tejido de 30 μm , por cada animal de estudio, se fotografiaron en un microscopio confocal *Olympus FluoView FV10i* equipado con láseres que excitan a las longitudes de onda de 405, 458, 488 y 633 nm. Las capturas se realizan de forma seriada por todo el nicho, realizando planos que distan entre sí 1,5 μm y que abarcan todo el grosor del corte. Las imágenes obtenidas de diversos genotipos o grupos experimentales, se obtienen usando los mismos parámetros (intensidad de láseres, resolución, grosor de los planos, etc.) para poder compararlos posteriormente. Las imágenes capturadas se procesaron usando el software FV10-ASW 2.1 correspondiente, aplicando los mismos parámetros a todas las imágenes procedentes de un mismo grupo experimental. Los recuentos celulares se llevaron a cabo en las imágenes procesadas y teniendo en cuenta únicamente los planos separados entre sí 9 μm , para evitar el recuento de una misma célula por duplicado. Los datos resultantes del recuento se transforman en forma de porcentajes sobre el total de células muestreadas o sobre el porcentaje de una de las poblaciones analizadas. Para validar los recuentos, los valores

obtenidos de los grupos control se comparan sistemáticamente con los ya existentes en el laboratorio, y con los disponibles en la literatura científica del campo según las cepas de ratón y los fondos genéticos.

La estimación del número de células LRC totales se realizó mediante el recuento manual en un microscopio de fluorescencia (*Nikon Eclipse Ni*) de todas las presentes en dos series enteras de tejido (10-11 cortes) y aplicando la fórmula de Cavalieri, que tiene en cuenta el número de células contabilizadas, el número total de series que componen la muestra, el número de cortes analizados y el grosor del tejido. En el caso de las LRC totales del OB o del cuerpo calloso, la capa glomerular o el cuerpo calloso próximo a la SEZ fueron escaneados en un confocal (*Olympus FluoView FV10i*) y posteriormente, se contaron las LRC presentes en cada región. La estimación de las LRC se hizo relativizando el número total de células positivas presentes en la zona respecto al área rastreada en cada muestra. El área de cada región se midió con el programa *Image J* (NIH). En ambos casos se realizó una inmunofluorescencia frente a CldU/BrdU en una serie entera de tejido, lo que supone unos 5-6 cortes por animal en el caso del cuerpo calloso y unos 10-11 cortes en el caso del OB, aunque en este último caso fueron muestreados 4 cortes representativos de la zona (**Figura 13**).

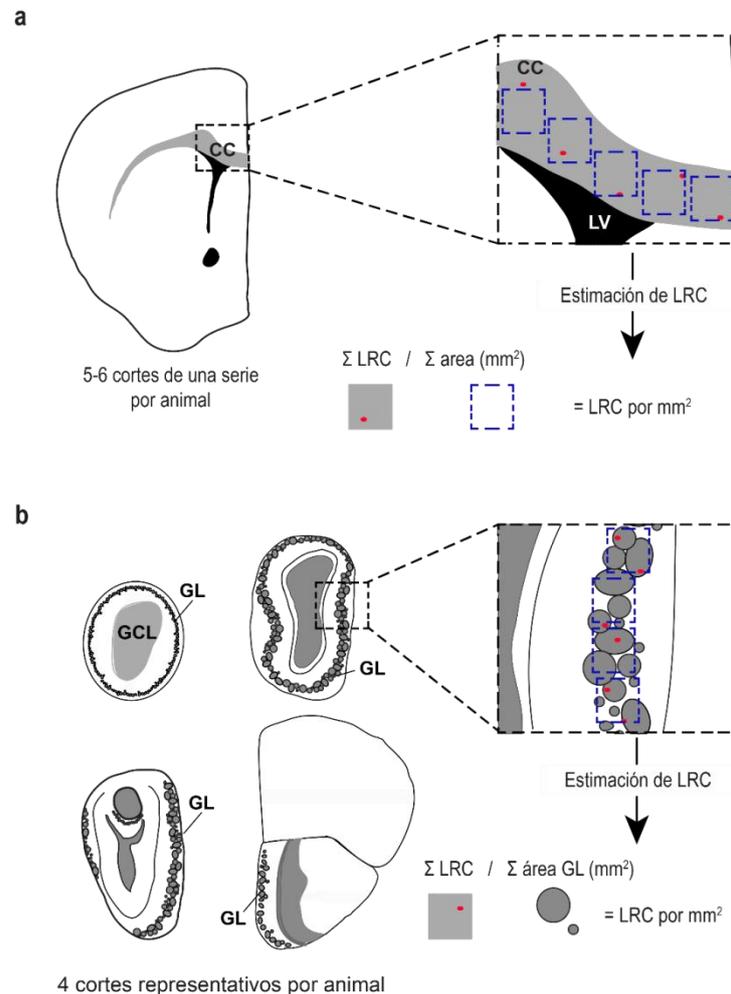


Figura 13. Estimación del número de LRC en el cuerpo caloso y el OB. (a) Representación del modo en el que se realiza el rastreo y cuantificación de LRC en el cuerpo caloso. En primer lugar, el cuerpo caloso más próximo a la SEZ, de una serie entera de cortes de cada animal a analizar, se fotografía en un microscopio confocal. Después, se efectúa el recuento manual del número de LRC en cada campo rastreado, teniendo en cuenta el área de dicho campo, obteniendo así el número de células LRC por área rastreada. (b) Representación del modo en el que se realiza el rastreo y cuantificación de LRC en la capa glomerular del OB. Del mismo modo que en el cuerpo caloso, por cada animal a analizar, se fotografía en el confocal, toda la capa glomerular presente en 4 cortes representativos de una serie. Después se analizan las imágenes obtenidas, contando el número de LRC que aparecen en cada fotografía y teniendo en cuenta el área rastreada. CC=Cuerpo caloso; LV=Ventrículo Lateral; GL=Capa Glomerular; GCL=Capa Granular.

3. Estudios *in vitro*

3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Células madre neurales adultas

El aislamiento y cultivo de las NSCs de la SEZ se detalla en (Belenguer et al., 2016). Brevemente, ratones de entre 2 y 4 meses de edad son sacrificados por dislocación cervical para la extracción del cerebro, que se deposita en placas Petri de plástico con

DPBS frío y estéril hasta el momento de la disección de la SEZ. Después, y con la ayuda de una lupa y un par de bisturíes, se disecciona la pared del ventrículo lateral de los dos hemisferios. El tejido aislado somete a un tratamiento de 30 minutos de papaína a 37 °C (12 U/ml; *Worthington Biochemical Corporation*; ref. LS003120) para facilitar la digestión y disgregación del tejido. Tras el tratamiento, se lava la papaína y se disocia el tejido mecánicamente en presencia de “medio control” (**Tablas 5 y 6; Anexo**). En un cultivo primario estándar, las células del tejido disgregado se centrifugan y resuspenden en “medio completo” (**Tabla 7; Anexo**) para poder contarlas y sembrarlas equitativamente en varios pocillos de una placa de cultivo. Generalmente, las células procedentes de dos SEZs se siembran en 8 pocillos de una placa de 48 pocillos o bien se cuentan las células mediante un sistema automático (*ADAM-MC; NanoEntek*) y se siembran 15.000-20.000 células por cm². Tras 7-10 días en un incubador a 37 °C y 5% de CO₂, y con una atmósfera húmeda, las células diferenciadas mueren mientras que las NSCs y algunos progenitores empiezan a proliferar y a formar neuroesferas. Transcurridos 5-6 días desde la siembra, las neuroesferas tienen el tamaño adecuado como para poder realizar una cuantificación del número y/o diámetro de las mismas. El número de esferas primarias se realiza de forma manual en un microscopio invertido con contraste de fases.

Transcurridos unos 7-10 días aproximadamente, las neuroesferas se subcultivan: el pase consiste en la disgregación de las neuroesferas para la obtención de NSCs individuales y su posterior cultivo, con el objetivo de aumentar el número de NSCs. Con este fin, las neuroesferas se recogen, se centrifugan a 200g durante 10 min., se lavan con PBS estéril y el *pellet* se disgrega mediante un tratamiento enzimático con Acutasa (*Sigma*; ref. A6964) durante 10 min y/o se disgregan mecánicamente. A continuación, se diluye la Acutasa con medio completo y se cuenta el número total de células mediante el *ADAM-MC*. Las NSCs se subcultivan a una densidad de 15.000-20.000 células por cm².

3.1.2. Líneas celulares

Las células HEK293 (*Human Embryonic Kidney cells 293*) son una línea celular generada a partir de células embrionarias de riñón humano transformadas con adenovirus. La variante HEK293T expresa de forma estable el antígeno T del virus SV40, lo que permite la replicación episomal de plásmidos con el origen de replicación del virus SV40. De hecho, las modificaciones de las células HEK293T las hacen óptimas para la expresión y producción

de lentivirus (Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b). Estas células crecen como una monocapa en condiciones adherentes sobre placas de plástico y en presencia de DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium-high glucose*; Gibco) o IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*; Gibco) suplementado con 10% FBS, 6 mM L-Glutamina (Gibco), 1 mM piruvato sódico y Penicilina/Estreptomina al 1% (Gibco) (**Tabla 8; Anexo**). Es necesario subcultivar las células cuando se alcanza el 80-90% de confluencia para evitar el sobrecrecimiento y se hace mediante diluciones tras un tratamiento con tripsina-EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético).

Las células L929 proceden de tejido adiposo y subcutáneo areolar de ratón C3H/An. Las células NCad-L929 y ECad-L929 derivan de las anteriores, salvo que expresan de forma estable las proteínas N-cadherina y E-cadherina respectivamente. Estas células fueron generosamente cedidas por el Dr. Robert Kypta del CiCBIogune (Bilbao), y son cultivadas como las HEK293T.

3.2. Transducción celular

3.2.1. Clonaje de vectores de transferencia

Para los experimentos con partículas lentivirales fue necesario clonar los genes que codifican para MT5-MMP y una versión truncada de la E-Cadherina humana (DN-CDH), en vectores lentivirales. En el caso de MT5-MMP, el ADN complementario (cADN) es amplificado con una polimerasa de alta fidelidad de lectura (*KAPA HiFi DNA polimerase*; Kapabiosystems), mediante cebadores que añaden a cada extremo del cADN las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción XhoI y EcoRI (Fermentas; Thermo Fisher Scientific). El fragmento generado, XhoI-MT5-EcoRI, se clona en el plásmido pcDNA₃, justo antes de la secuencia Flag. Para hacer posible la inserción de la secuencia XhoI-MT5-EcoRI en el plásmido pcDNA₃, ambos son digeridos con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI y posteriormente fusionados mediante la acción de la ligasa (*T4 DNA Ligase*; New England BioLabs). El vector resultante, pcDNA₃-MT5-Flag, es purificado con el Kit *MiniElute cleanup* (QIAGEN) e insertado en bacterias electro-competentes para amplificarlo. Tras un rastreo de las colonias positivas, que contienen el vector, éstas se crecen en 5 ml de medio LB (Luria Bertani) líquido durante toda la noche, en agitación suave (300 rpm) y a 37 °C. A continuación, el ADN plasmídico se extrae y purifica mediante el *kit* comercial *Miniprep Kit* (QIAGEN), para llevarlo a secuenciar y comprobar que no se ha

producido ninguna mutación en la secuencia que pueda alterar la expresión de la proteína. Sólo el ADN plasmídico que cumple este requisito, se utiliza de molde para subclonar la secuencia MT5-Flag en el vector lentiviral pRRL-SIN-PPT_hPGK-GFP-WPRE (PGK-GFP; Addgene #12252; Consiglio et al., 2004), usando en este caso XhoI y SpeI como secuencias diana (PGK-GFP-MT5).

El plásmido DN-CDH-GFP fue gentilmente cedido por la Dra. A. Chenn (Noles y Chenn, 2007) y se subclonó también en el vector lentiviral PGK-GFP, usando la misma estrategia que en MT5, mediante las enzimas de restricción XhoI y SpeI (PGK-GFP-DN-CDH). Al igual que con PGK-GFP-MT5, los vectores lentivirales resultantes de la clonación, se enviaron al *Servicio de Genómica* de la Universidad de Valencia para su secuenciación. Los cebadores se detallan en la **Tabla 9** del **Anexo**.

3.2.2. Transfección de células HEK293T

Se siembran $4\text{-}5 \cdot 10^6$ de células HEK293T en una placa de cultivos de 56 cm² para que al día siguiente alcancen un porcentaje de confluencia de entre el 70 u 80%, y se refresca el medio de cultivo con un medio libre de antibióticos, el “medio de transfección”, dos horas antes para promover la eficiencia del proceso (**Tabla 10; Anexo**). La transfección se realiza a partir de dos soluciones diferentes, la “solución plásmido” que contiene 10-20 µg de ADN plasmídico en 450 µl de medio IMDM y la “solución liposomal” que está formada por 20 µL de *Lipofectamine2000* (Invitrogen) en 450 µl de IMDM. Ambas soluciones deben incubarse a Ta durante 5 min y luego, se mezclan e incuban durante otros 20 min. Después, la solución final se añade gota a gota al medio de cultivo y se mezcla suavemente. Transcurridas 14-16 h tras la transfección, el medio de cultivo debe renovarse y, si nuestro vector de transferencia expresa alguna proteína fluorescente, podremos analizar la eficiencia de la transfección en un citómetro de flujo como el *LSR Fortessa* (Becton Dickinson).

3.2.3. Infección con lentivirus

El protocolo para la generación y concentración de partículas lentivirales se detalla en (Porlan et al., 2016). En primer lugar, se transfectan células HEK293T con los plásmidos de empaquetamiento pMDLg/pRRE y pRSV.REV (Addgene; #12251 y #12253, respectivamente), el plásmido de transferencia deseado, en nuestro caso PGK-GFP, PGK-GFP-MT5 y PGK-GFP-DN-CDH, y el plásmido de la envuelta pMD2G (Addgene; #12259),

siguiendo el protocolo comentado anteriormente. En este caso, la “solución plásmido” contiene 10 µg del vector de transferencia, 2,5 µg de pRSV.REV, 5 µg de pMDLg/pRRE y 3,5 µg de pMD2G en un volumen final de 450 µl de medio IMDM. Transcurridas 14-16 h, el medio de cultivo de las HEK293T se sustituye por el medio completo de las NSC, para el condicionamiento del medio, y se comprueba la eficiencia de la transfección mediante citometría de flujo, ya que nuestro vector de transferencia expresa la proteína GFP.

Cuando la producción de partículas lentivirales es máxima, alrededor de 30 h tras la transfección, se recoge y filtra el medio de cultivo con un filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de poro, para eliminar cuerpos multivesiculares y restos de membranas celulares, y empezamos la concentración del virus. El proceso de concentración de partículas virales conlleva dos rondas de ultracentrifugación. En primer lugar, el medio condicionado recogido se ultracentrifuga a 50.800g o 19.600 rpm con el rotor SW-28 (Beckman Coulter; ref. 358126) durante 2 horas y 20 min a Ta. El *pellet* generado se resuspende en 200 µl de PBS estéril y se guarda, durante toda una noche, en agitación a 4 °C, para favorecer la re-suspensión de las partículas virales generadas. Al día siguiente, para limpiar las partículas lentivirales, se vuelve a ultracentrifugar a 50.200g o 23.000 rpm, a Ta, con el rotor SW-55 (Beckman Coulter; ref. 326819) y durante otras 2 h 20 min. El *pellet* generado en esta última ultracentrifugación se resuspende en PBS, en una milésima parte del volumen inicial, se facilita la re-suspensión a 4 °C y se alícuota y guarda a -80 °C. Antes de utilizar el lentivirus generado, se debe calcular el título o carga lentiviral. Para ello se siembran 50.000 células HeLa o HEK293T y, cuando alcanzan el 70-80 % de confluencia, se infectan con diluciones seriadas del lentivirus generado (desde 10^{-3} a 10^{-8}) junto con 4 µg/ml de polibreno (*hexadimethrine bromide*; Sigma). Después de 72 h de infección, para permitir la expresión del vector, se recogen las células adherentes mediante un tratamiento corto con tripsina-EDTA y se fijan con una solución al 1% de PFA y 2% de FBS en PBS. En este punto, las células están listas para su análisis por citometría de flujo usando un láser de argón a 488 nm. El título viral se calcula siguiendo esta fórmula: % células GFP+/100 x número de células infectadas x factor dilución (FD) = unidades de transducción (TU)/ml. En este trabajo, hemos obtenido títulos virales de entre $9 \cdot 10^8$ y $9 \cdot 10^9$ TU/ml y para los ensayos *in vivo* e *in vitro* se han utilizado los lentivirus a una concentración de $1 \cdot 10^6$ TU/ml.

El protocolo de inyección de virus para los ensayos *in vivo* se ha explicado anteriormente en el apartado 2.2. Las infecciones de NSCs con lentivirus *in vitro*, se llevan

a cabo en $2.5 \cdot 10^5$ - 10^6 células individuales y 4 ml de medio completo suplementado con 4 μ l de polibreno a 4 mg/ml, para favorecer la fusión entre la cápside pseudoviral y la membrana celular. El tratamiento dura 4-8 h, durante las cuales las células se mantienen en el incubador a 37 °C y con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Una exposición demasiado prolongada al polibreno podría ser tóxica para las células, por lo que tras las 4-8 h de tratamiento, se lavan y se incuban en medio completo fresco para promover la expresión del vector de transferencia. Después de 3-4 días desde la infección, igual que en el caso de la transfección de HEK293T, podemos comprobar el porcentaje de infección celular por citometría de flujo y separar las células transducidas mediante un citómetro-separador celular equipado con un láser de 488 nm, dado que nuestro vector expresa GFP.

3.3. Ensayos celulares

3.3.1. Experimentos de adhesión

Se siembran $4 \cdot 10^4$ ó $9 \cdot 10^4$ células L929 parentales o con sobreexpresión estable de E-cadherina o N-cadherina en pocillos de placas de 96 o en *chamber-slides* de cristal respectivamente, y se deja que alcancen la confluencia tras 24-48 h de cultivo *in vitro*. El mismo día de la realización de los ensayos de adhesión, se disgregan mecánicamente neuroesferas o tejido de SEZ. Mientras tanto, el medio de las células L929 se cambia un par de veces por medio completo de NSCs para eliminar las trazas de FBS del medio propio de las L929. Una vez disgregadas y contadas las NSC o las células subependimarias, se siembran 15.000 células sobre las L929 en medio completo y se dejan adherirse durante 1-3 h. Tras el tiempo de adhesión, las células se lavan repetidas veces con medio completo para eliminar todas las células que han sido incapaces de adherirse durante ese tiempo, y se cultivan otras 10-12 h en el mismo medio suplementado con FGF y/o se fijan con PFA al 2% durante 15-20 min. Para poder evaluar el número de células adheridas es necesario poder diferenciarlas de las L929, por lo que se marcan antes de la siembra con el trazador celular DDAO-SE (Invitrogen; #C34553) o bien se marcan al final del experimento con una inmunocitoquímica frente a nestina, GFAP o S100 β tras la fijación.

Algunos ensayos de adhesión se llevaron a cabo pre-tratando las células antes de sembrarlas sobre las L929 con GI254023X (GIX; TOCRIS) a 50 μ M o con rsFRP-1 (proteína sFRP-1 recombinante; R&D) de origen murino a 10 μ g/ μ l durante 24-48 h, o con

EC-NCad (Sigma) o inmunoglobulinas del mismo isotipo (IgG; Sigma) a 50 µg/ml durante 1 hora y a 37 °C.

El rescate del fenotipo del mutante *Mmp24* en los ensayos de adhesión, se llevó a cabo con neuroesferas cultivadas del *Mmp24 KO* e infectadas con un lentivirus de sobreexpresión de MT5-MMP (Lent-GFP-MT5) o su control Lent-GFP, usando 10⁶ TU/ml en presencia de polibreno a 4µg/ml. Las NSCs infectadas se separan mediante un citómetro-separador celular equipado con un láser de 488 nm (*MoFlo Legacy*; Bekman Coulter) antes de sembrarlas sobre las L929.

3.3.2. Ensayos de ciclo celular

En este tipo de ensayos, las células procedentes de homogenados de SEZ o bien NSCs infectadas con lentivirus y separadas por citometría, se recogen y lavan con PBS estéril. Las células individuales obtenidas se centrifugan a 200g durante 10 minutos y el *pellet* se re-suspende gota a gota en un mililitro de etanol al 70 % y se incuba a 4 °C durante 30 min, para prevenir el entrecruzamiento proteico. Después, las células se deben centrifugar de nuevo para eliminar el etanol, pero éste impide la formación del *pellet*, por lo que se añaden 14 ml del tampón FACS (PBS 1X con Triton X-100 al 0,1% en agua destilada autoclavada) para favorecer la recuperación del *pellet* de células. Por último, las células se re-suspenden en tampón FACS suplementado con yoduro de propidio a 25 µg/ml y RNasa A libre de DNasas a una concentración de 25 µg/ml, y tras 20 min de incubación a 37 °C, se analiza el contenido en ADN de las células mediante citometría de flujo (*FACSVerse*; Becton Dickinson). Los datos del ciclo celular y el porcentaje de células encontradas en cada fase del ciclo se determinaron usando el software *FlowJo* (**Figura 14**).

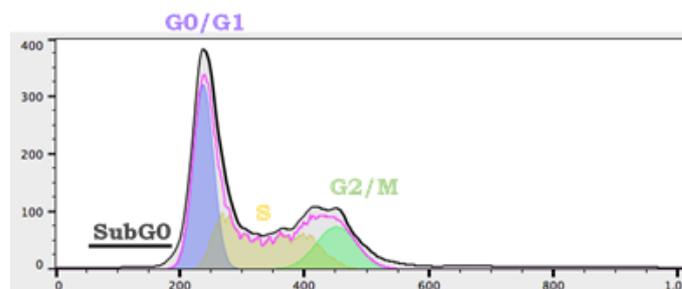


Figura 14. Análisis del ciclo celular mediante el software *FlowJo*. Imagen representativa del perfil de ciclo celular que presentan las NSCs. En la imagen se indican las distintas fases del ciclo celular, G0 en color negro, G0-G1 en morado, S en amarillo y G2-M en verde.

3.3.3. Técnicas inmunocitoquímicas

Las muestras se incuban en una solución de bloqueo compuesta por FBS al 5 %, glicina al 1%, BSA al 1%, TritonX-100 al 0-0,2% y azida sódica al 0,05% en PB 0,1M durante 1 h a Ta y con agitación suave. Después, las muestras se incuban con los anticuerpos primarios (**Tabla 3; Anexo**) diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. En el caso de la detección de análogos de timidina, antes de la incubación con la solución de bloqueo y con los anticuerpos primarios, se realiza un tratamiento con HCl 2N durante 20 minutos y luego se reestablece el pH de las muestras con repetidos y abundantes lavados con borato sódico al 1% o PBS.

Para la detección fluorescente de los anticuerpos primarios, las muestras se lavan con PBS y se incuban con los anticuerpos secundarios (**Tabla 4; Anexo**) diluidos en solución bloqueante durante otra hora a Ta y en agitación suave. Por último, se incuban las preparaciones con DAPI a 1 mg/ml disuelto en agua destilada durante 1-2 minutos, para poder detectar el núcleo de todas las células presentes en la muestra, y se lavan con PBS o agua destilada. Para preservar la fluorescencia, se montan las muestras con una solución como el *FluoromountG* (EMS) y se cubren con un cubreobjetos evitando generar burbujas.

3.3.4. Recuento celular

En los experimentos de adhesión se fotografía gran parte o todo el pocillo de manera manual, mediante un microscopio de fluorescencia (*Nikon Eclipse Ni*), o bien de forma automática mediante el *INCell Analyzer2000 System*. El conteo del número de células adheridas que aparece en cada campo rastreado, se analiza mediante el software *ImageJ* (NIH), de forma manual o con la ayuda de una macro automática, diseñada por un miembro bioinformático de nuestro laboratorio (Pau Carrillo Barberà). El procedimiento permite que el *software* reconozca de forma específica todos los núcleos celulares presentes en el campo fotografiado, mediante la identificación del marcaje con DAPI y el diámetro. Para estimar el área de monocapa, el programa dilata los núcleos identificados, aumentando el tamaño del núcleo para simular las dimensiones de la célula, con núcleo y citoplasma. Tras esta acción, el programa mide el área correspondiente a los núcleos dilatados, la cual será nuestra medida de monocapa. Por otro lado, identifica y cuantifica las células DDAO-SE por su marcaje fluorescente, que coincide a su vez con un núcleo celular, de forma que excluye restos celulares o precipitados fluorescentes de la preparación. De este modo conseguimos, de

forma automatizada, el recuento del número de células DDAO-SE adheridas por área de monocapa celular rastreada.

4. Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática de ADAM10 se midió mediante el uso del *kit* enzimático *SensoLyte520 ADAM10 Activity Assay Kit Fluorimetric* (anaSpec; #AS-72226). Este ensayo contiene un sustrato-5-FAM específico de ADAM10, la enzima ADAM10 recombinante de origen humano (rhADAM10) y un inhibidor específico de ADAM10 (GM-6001). El sustrato está marcado con una molécula fluorescente en un extremo (5-FAM) y en el extremo opuesto está unido a un *quencher*. Cuando ADAM10 corta el sustrato, éste es capaz de emitir fluorescencia a una longitud de onda de excitación/emisión de 490 nm/520 nm, y podemos medirla mediante lectores de fluorescencia como el VICTOR (*VictorTM₃ Multilabel Plate Reader*; PerkinElmer). Por lo tanto, este ensayo nos permite analizar la actividad de nuevos posibles inhibidores de ADAM10. El test de inhibición de los fármacos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del *kit* comercial. En pocillos de placas de 96 opacas y negras, para evitar la transferencia de fluorescencia entre pocillos adyacentes, se añaden 40 µl de rhADAM10 diluido 500 veces (8 ng finales) y 10 µl del inhibidor a ensayar. Mientras se prepara el ensayo, el VICTOR se atempera a 37 °C, y justo antes de medir, se añaden 50 µl del sustrato 5-FAM a 10 µM en cada pocillo a analizar, midiendo un volumen final de 100 µl.

5. Análisis de los niveles de ARN mensajero

Los ensayos de expresión se llevaron a cabo a partir de muestras de ARN de neuroesferas crecidas durante 3-4 días, extraído mediante el aparato *MAXWELL®* y siguiendo las instrucciones del *MAXWELL® 16LEV simplyRNA Kit* (Promega; ref. AS1280). La muestra de ARN se obtiene del *MAXWELL®* eluída en 35 µl de agua libre de nucleasas, y se cuantifica usando un sistema fluorimétrico preciso, el *Qubit® (RNA BR Assay Kit*; ThermoFisher; ref. Q32852). Mediante retro-transcripción con el *PrimeScriptTM RT-PCR Kit* (Clontech; RR014B), se convierte un microgramo de ARN en cADN, llevando en paralelo el control negativo de cada muestra sin polimerasa. La concentración final de cADN o de los controles negativos es de 50 ng/µl. Parte de la muestra generada se destina para los ensayos de expresión semi-cuantitativos, en los que el cADN generado se resuelve en un gel

de electroforesis al 2-3% de agarosa en tampón TAE. Las bandas correspondientes al cADN se detectan mediante un sistema documentador de geles digital, que nos permite además hacer una captura de imagen en formato digital. Las imágenes digitales se analizan por densitometría usando el software *ImageJ* (NIH). Los resultados obtenidos del análisis densitométrico se normalizan respecto al valor del gen endógeno usado como control. Para los ensayos de expresión de ARNm mediante la realización de una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), las muestras de cADN se diluyen hasta 6 ng/μl. La qRT-PCR se realiza con sondas Taqman (**Tabla 11; Anexo**), siguiendo las instrucciones del *kit Premix Ex Taq™* (Clontech; ref. RR390A) y se lleva a cabo en el *StepOnePlus™* (Applied Biosystems), que genera un archivo *Excel* con los resultados. Los datos obtenidos se analizan relativizando los valores Ct respecto a los ΔCt y se normalizan frente a uno o dos genes endógenos (Gapdh y/o HPRT).

6. Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Los extractos proteicos se obtienen a partir de tejido de SEZ o de neuroesferas cultivadas durante 3-4 días. El tejido de SEZ se obtiene mediante disección de la zona y a continuación, usamos el instrumento *MP FastPrep-24* para homogenizar el tejido y lisarlo con 300 μl de tampón de lisis para tejido cerebral, que contiene tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8.0, cloruro sódico 150 mM (NaCl), NP-40 al 1%, deoxicolato sódico (NaDoc) al 1%, SDS al 1%, ortovanadato sódico 1 mM (NaOVA3), pirofosfato sódico (PPiNa) 5 mM y β-glicerolfosfato 20 mM, suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete*; Roche; ref. 11836153001). Las neuroesferas se recogen y lavan con PBS estéril, para eliminar las trazas de BSA del medio de cultivo. El lisado se lleva a cabo en hielo con tampón de lisis para neuroesferas, que contiene tampón Tris-HCl 25 mM a pH 7.4, EDTA 1 mM, SDS al 1%, PPiNa 10 mM, β-glicerolfosfato 20 mM y NaOVA3 2 mM, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete*). El lisado celular es completo, por lo que el ADN se libera y a veces provoca mucha viscosidad en la muestra. En estos casos, debemos homogeneizar o sonicar la muestra.

Mediante intrapolación con una recta patrón de cantidades conocidas de albúmina y siguiendo las instrucciones del *Kit BCA Protein Assay* (Thermo Fisher, ref. 23227), sistema colorimétrico de alta precisión y compatible con detergentes, se obtienen los valores de absorbancia necesarios para calcular la concentración de proteína de cada una de las muestras. Una vez obtenidos los cálculos, se mezclan entre 30-50 μg de proteína de cada

muestra con un tampón de carga que contiene glicerol al 20%, SDS al 10%, tampón Tris-HCl 400 mM a pH 6.8, β -mercaptoetanol (β -MEtOH) al 10% y una pizca de azul de bromofenol. Con este tampón conseguimos reducir y desnaturalizar las muestras por choque térmico a 95-98 °C durante 5-10 min. Después, las muestras se resuelven mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10% o en geles en gradiente (4-15% *Mini-PROTEAN TGX gels*; Bio-Rad). A lo largo de este trabajo, se han utilizado para el proceso de transferencia los sistemas de Bio-Rad, el sistema semi-húmedo *Trans-Blot Turbo* o bien el sistema húmedo *Mini Trans-Blot Cell*, mediante el uso de membranas de PVDF (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack*) o de nitrocelulosa (*Hybond-ECL*; Amersham biosciences), respectivamente. Usando el programa estándar del sistema *Trans-Blot Turbo*, para la transferencia óptima de proteínas de alto y bajo peso molecular, y usando las membranas de PVDF *Trans-Blot Turbo Transfer Pack*, el proceso de transferencia tiene una duración aproximada de 30 minutos a 25 V. Con las membranas de nitrocelulosa y el sistema *Mini Trans-Blot Cell*, la transferencia se deja durante 80 minutos aproximadamente, a 400 mA y voltaje constante. A diferencia de las membranas de PVDF descritas anteriormente, las proteínas adheridas a las membranas de nitrocelulosa pueden teñirse con una solución de rojo Ponceau S (rojo Ponceau S al 2%, ácido tricloroacético al 30% y ácido sulfosalicílico al 30%), y en algunos casos se utilizó esta tinción como control de carga.

Para la inmunodetección de las proteínas de interés, las membranas se incuban en una solución bloqueante formada por leche en polvo desnatada al 5% o BSA al 3% en TBS-T (Tween-20 al 0,025% en Tris-HCl 0,1 M con cloruro sódico al 0.9% o *Tris-Buffer Saline*) durante una hora a Ta y en agitación suave. Después, se elimina el bloqueo y las membranas se incuban durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (**Tabla 3; Anexo**). Al día siguiente, las membranas se lavan bien del anticuerpo primario con TBS-T y se incuban, durante 1 h a Ta y en agitación suave, con los anticuerpos secundarios apropiados (**Tabla 4; Anexo**). La señal se obtiene mediante una reacción quimioluminiscente generada por reactivos como el *Western Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer) o el *SuperSignal West Femto* (Pierce), y se adquiere una imagen digital cuantificable mediante sistemas automatizados (*Alliance MiniHD9*; UVITEC) o películas autoradiográficas. El *Alliance MiniHD9* genera una imagen digital de la reacción quimioluminiscente; sin embargo, las películas tienen que ser escaneadas para obtener un

archivo electrónico con el que poder trabajar. Las imágenes digitales se analizan por densitometría usando el software apropiado, como es el caso del *ImageJ* (NIH).

7. Análisis estadístico

Durante la realización de este trabajo, la cuantificación de las diversas poblaciones celulares se ha estimado como un número total de células por estructura anatómica o se ha calculado como porcentajes o valores relativos. La normalidad de los datos se ha comprobado usando el programa informático *GraphPad Prism5*, usando el test D'Agostino-Pearson. Estos valores se han representado con la media \pm el error estándar de la media. Para poder realizar el análisis estadístico de los resultados, se ha utilizado la función arcoseno (raíz (valor %/100)) para transformar los datos porcentuales y el logaritmo en base 2 para transformar los datos normalizados. Los valores resultantes de la transformación se analizaron con el programa informático *GraphPad Prism5*, usando una t de Student, de dos colas de distribución y con variables pareadas o de igual varianza, en el caso de un grupo experimental a analizar, o bien mediante un análisis de varianzas de una vía (ANOVA; del inglés *ANalyses Of VAriance*), cuando se comparan dos o más grupos experimentales. El nivel de significatividad estadística corresponde a valores de p-valor inferiores a 0,05. (* = p-valor<0,05; **<0,01; ***<0,001). El tamaño muestral empleado en los experimentos de esta tesis (n=3-24), se ha indicado en cada gráfica mediante pequeños círculos, que indican el número de muestras biológicas independientes para cada genotipo o tratamiento aplicado, y está apoyado por bibliografía propia del campo y por otros trabajos publicados por el grupo (Ferron et al., 2010; Ponti et al., 2013; Porlan et al., 2013; Delgado et al., 2014; Tong et al., 2014).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores y condiciones usadas en las reacciones de PCR para el genotipado de las diversas cepas de ratones modificados genéticamente.

Secuencia 5' → 3'	Amplicon (pb)
<i>Mmp24</i>	
CACTGTGTTGAAGTTGCCATCGC	Nulo = 500
CGCCATCTGAGAGGAAGCACGAG	
AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG	Salvaje =100
AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG	
<i>hGfap:Cre</i>	
ACT CCT TCA TAA AGC CCT	Transgén =190
ATC ACT CGT TGC ATC GAC CG	Control positivo interno =700
<i>Cdh2^{tm1Glr}</i>	
CCA AAG CTG AGT GTG ACT TG	Mutante = 290
TAC AAG TTT GGG TGA CAA GC	Salvaje=250
<i>Tg (CAG-eGFP)B5Nagy/J</i>	
AAG TTC ATC TGC ACC ACC G	Transgén =173
TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG	
CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Control positivo interno =324
GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	
<i>Tg(GFAP-lacZ, eGFP)7Kdmc</i>	
ACAAGCAGAAGAACGGCATC	eGFP transgén = 251
CTTGTACAGCTCGTCCATGC	
TGAGCAACTACTAGATCCTTGG	GFAP transgén =363
TCTGCCTCTGGTGACTTTTC	
<i>Sfrp1</i>	
CTCACAACGTGGCACTGGGG	Nulo = 326
CTTGAATAAGGCCGGTGTGC	
CAGTGCCTGGACATCCCGG	Salvaje = 230
GCAGAGCCAGCGACACGG	

Tabla 2. Información y coordenadas de las infusiones cerebrales.

Coordenadas estereotáxicas para las infusiones cerebrales			
Región	Coordenadas estereotáxicas		
	Antero-Posterior (AP)	Medio-Lateral (ML)	Dorso-Ventral (DV)
SEZ/borde del estriado	+0,6 mm	+1,2 mm	-3,0 mm
Ventrículo lateral	-0,3 mm	+1,0 mm	-2,6 mm
Superficie cerebral		+1,1 mm	

* Coordenadas usando Bregma como referencia.

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpos primarios					
<i>Antígeno</i>	<i>Huésped</i>	<i>Compañía</i>	<i>Referencia</i>	<i>Técnica</i>	<i>Dilución</i>
Actina clon AC-40	Ratón	Sigma-Aldrich	A4700	WB	1/5000
β -catenina	Conejo	Cell Signaling	#9562	IF WB	1/100 1/1000
BrdU/CldU	Rata	Abcam	ab6326	IF	1/800
BrdU/IdU	Ratón	BD Biosciences	347580	IF	1/500
Doblecortina (C-18)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-8066	IF	1/200
ECadherina clon 36	Ratón	BD Biosciences	610181	IF	1/100
Flag clon M2	Ratón	Sigma	F1804	WB	1/1000
γ -Tubulina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-31779	IF	1/200
Gapdh	Ratón	Merck Millipore	MAB374	WB	1/5000
Gfap	Pollo	Merck Millipore	AB5541	IF	1/600
GFP	Cabra	Rockland	600-101-215	IF	1/500
GFP	Conejo	Abcam	ab290	IF	1/200
Id-1	Conejo	BioCheck, Inc.	BCH-1/#37-2	IF	1/200
Ki67	Conejo	Abcam	ab15580	IF	1/100
Mash-1	Ratón	BD Biosciences	556604	IF	1/100
MCM-2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-9839	IF	1/100
MT5-MMP	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-20912	IF	1/100
N-cadherina clon C-32	Ratón	BD Biosciences	610920	IF WB	1/100 1/1000
N-cadherina clon GC-4	Ratón	Sigma	C3865	IF AD ICV	1/100 50 μ g/ml 80 μ g
Nestina	Ratón	Abcam	ab6142	IF	1/500
Notch-ICD (dominio intracelular del receptor Notch)	Conejo	Abcam	ab8925	WB	1/1000
S100B	Conejo	Dako	Z0311	IF	1/100

*WB: *Western Blot*; IF: inmunofluorescencia. AD: ensayos de adhesión; ICV: inyección intracerebroventricular.

Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios.

Anticuerpos secundarios						
<i>Nombre</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Huésped</i>	<i>Compañía</i>	<i>Referencia</i>	<i>Técnica</i>	<i>Dilución</i>
Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂ Fragment	Ratón IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	715-546-151	IF	1/600
Cy3-AffiniPure	Ratón IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	715-165-151	IF	1/600
Alexa Fluor® 647-AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Ratón	Burro	Jackson ImmunoResearch	715-606-151	IF	1/600
Biotinilado	Ratón IgG (H+L)	Caballo	Vector	BA-2000	IF	1/300
Polyclonal HRP	Ratón IgGs	Cabra	Dako	P0447	WB	1/5000
Alexa Fluor® 488-AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Conejo IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-546-152	IF	1/600
Cy3-AffiniPure	Conejo IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-165-152	IF	1/600
Alexa Fluor® 647	Conejo IgG (H+L)	Burro	Molecular Probes	A31573	IF	1/600
ECL α -rabbit IgG, HRP-linked whole Ab	Conejo IgGs	Burro	Amersham (GE)	NA934	WB	1/5000
Alexa Fluor® 488-AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Cabra IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	705-546-147	IF	1/600
Cy3-AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Cabra IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	705-166-147	IF	1/600
Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂ Fragment	Pollo	Burro	Jackson ImmunoResearch	703-546-155	IF	1/600
DyLight 549-conjugated	Pollo IgY (IgG)	Burro	Jackson ImmunoResearch	703-506-155	IF	1/600
Alexa Fluor® 647	Pollo IgY (H+L)	Cabra	Molecular Probes	A21449	IF	1/600
Alexa Fluor® 488	Rata IgG (H+L)	Burro	Molecular Probes	A21208	IF	1/600
Cy3-AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Rata IgG (H+L)	Burro	Jackson ImmunoResearch	712-165-153	IF	1/600
DyLight 649-conjugated	Rata IgG	Burro	Jackson ImmunoResearch	712-495-150	IF	1/600

*WB: *Western Blot*; IF: inmunofluorescencia.

Tabla 5. Descripción de los componentes del medio control de NSCs.

Preparación del medio control			
<i>Producto</i>	<i>[conc.] trabajo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Referencia</i>
DMEM/F12(1:1)		Gibco, BRL	BRL11320-074
D(+)-Glucosa	0,6 %	Panreac	141341
NaHCO ₃	0,1 %	Biowest	L0680-500
HEPES	5 mM	Biowest	L0180-100
L-Glutamina	2 mM	Gibco, BRL	25030-081
Antibiótico/Antimicótico	1 %	Gibco, BRL	15240-062
“mezcla con hormonas” (<i>hormone mix</i>)	10 %		Tabla 6
Heparina	0,7 U/ml	Sigma-Aldrich	H3149
Albúmina de suero bovino (BSA)	4 mg/ml	Sigma-Aldrich	B4287

Tabla 6. Descripción de los componentes del medio hormonal.

Preparación de la “mezcla con hormonas”			
<i>Producto</i>	<i>[conc.] trabajo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Referencia</i>
DMEM/F12(1:1)		Gibco, BRL	BRL11320-074
D(+)-Glucosa	0,6 %	Panreac	141341
NaHCO ₃	0,1 %	Biowest	L0680-500
HEPES	5 mM	Biowest	L0180-100
Apo-transferrina	0,8 mg/ml	Sigma-Aldrich	T2252
Insulina bovina	500 nM	Sigma-Aldrich	I6634
Putrescina	0,1 mg/ml	Sigma-Aldrich	P7505
Progesterona	0,2 nM	Sigma-Aldrich	P6149
Selenito sódico	0,3 μM	Sigma-Aldrich	S9133

Tabla 7. Descripción de los componentes del medio completo de NSCs.

Preparación del medio completo			
<i>Producto</i>	<i>[conc.] trabajo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Referencia</i>
Medio Control			Como se describe arriba
EGF 20ng/ml	20 ng/ml	Gibco, BRL	53003-018
bFGF	10 ng/ml	Sigma-Aldrich	F0291

Tabla 8. Descripción de los componentes del medio de cultivo de las líneas celulares usadas durante este trabajo.

Preparación medio cultivo líneas celulares			
<i>Producto</i>	<i>[conc.] trabajo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Referencia</i>
DMEM/F12 (glucosa alta) sin L-Glutamina o IMDM.		Biowest	L0101
Suero fetal bovino inactivado por calor (FBS)	10 %	Biowest	S1810
L-Glutamina	6 mM	Gibco, BRL	25030-081
Piruvato sódico	1 mM	Gibco, BRL	11360-039
Penicilina/Estreptomicina	1 %	Sigma-Aldrich	P4458

Tabla 9. Cebadores empleados para los clonajes.

MT5-MMP	DN-CDH
Secuencia cebadores 5' --> 3'	Secuencia cebadores 5' --> 3'
Clonaje en Lent-GFP	Clonaje en Lent-GFP
ATTCTCGAGAATGCCGAGGAGCGCGGG	ATATCTCGAGACTGGTGTGGGAGCC
GCACTAGTCTACTTGTTCATCGTCGT	CGACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTC

Tabla 10. Descripción de los componentes del medio de transfección.

Preparación del medio de transfección			
<i>Producto</i>	<i>[conc.] trabajo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Referencia</i>
IMDM		Gibco, BRL	21980-032
L-Glutamina	6 mM	Gibco, BRL	25030-081
Piruvato sódico	1 mM	Gibco, BRL	11360-039
Suero fetal bovino inactivado por calor (FBS)	10 %	Biowest	S1810

Tabla 11. Listado de sondas *Taqman*.

Sondas Taqman			
<i>Sondas</i>	<i>Gen</i>	<i>Compañía</i>	<i>Referencia</i>
sFRP-1	<i>Sfrp1</i>	ThermoFisher	Mm00489161_m1
ADAM10	<i>Adam10</i>	ThermoFisher	Mm00545742_m1
N-cadherina	<i>Cdh2</i>	ThermoFisher	Mm01162497_m1
CiclinaD1	<i>Ccnd1</i>	ThermoFisher	Mm00432359_m1
Hes1	<i>Hes1</i>	ThermoFisher	Mm01342805_m1
Hes5	<i>Hes5</i>	ThermoFisher	Mm00439311_g1
Gapdh	<i>Gapdh</i>	ThermoFisher	Mm99999915_g1

Resultados

1. Las uniones adherentes mediadas por N-cadherina promueven la quiescencia de las células B-GFAP+

1.1. Las células B-GFAP+ interactúan con el nicho neurogénico mediante uniones dependientes de N-cadherina

Previamente a la realización de este estudio, se había descrito la expresión de la E-cadherina en células endoteliales que revisten la pared de los ventrículos laterales y células TAP y se le ha atribuido un papel en la regulación de la proliferación de estos progenitores (Karpowicz et al., 2009), mientras que la función de la N-cadherina en el nicho estaba por determinar. Estudios previos realizados con anticuerpos frente al dominio extracelular de la N-cadherina, la situaban en la capa de células endoteliales; sin embargo, otros estudios inmunohistoquímicos realizados con anticuerpos frente a dominios intracelulares, habían determinado su localización principalmente en los neuroblastos (Karpowicz et al., 2009; Yagita et al., 2009).

Para determinar la relevancia de las uniones adherentes mediadas por la N-cadherina en el nicho, utilizamos anticuerpos frente al dominio extracelular (clon GC4; en este trabajo denominados anticuerpos EC-NCad) y frente a epítomos intracelulares (clon C32; a lo largo de este trabajo se nombrarán como anticuerpos NCad). Las células endoteliales S100 β (*S100 calcium-binding protein B*), los neuroblastos que expresan DCX y los astrocitos y células B reconocibles por contener GFAP son reconocidos con el anticuerpo NCad; sin embargo, el anticuerpo EC-NCad detecta a los endotelios y a los astrocitos GFAP+ mayoritariamente (**Figura 15 a-d**).

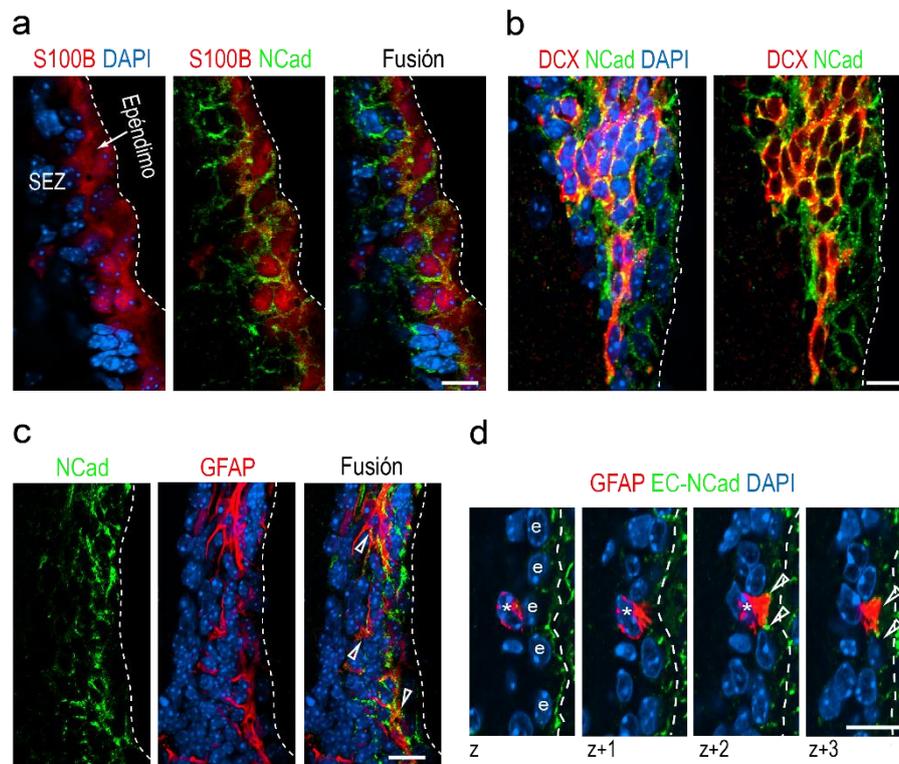


Figura 15. Expresión de la N-cadherina en la SEZ. (a) Tinción inmunohistoquímica de cortes coronales de SEZ con anticuerpos frente al dominio intracelular de N-cadherina (verde; NCad), al marcador de endimocitos S100 β (rojo), (b) al marcador de neuroblastos DCX (rojo) o (c) al marcador de células B GFAP en contacto con el ventrículo (rojo), indicando con puntas de flecha regiones de colocalización. (d) Inmunohistoquímica sobre cortes coronales de SEZ con anticuerpos frente al dominio extracelular de N-cadherina (verde; EC-NCad) y a GFAP (rojo), mostrando un grupo de imágenes de confocal consecutivas (de z a z+3). Se indica con una “e” las células endimarias y mediante puntas de flecha la colocalización de ambos marcadores en una célula GFAP⁺ (asterisco). La tinción con DAPI marca el núcleo de todas las células presentes. La línea blanca punteada de las imágenes indica el límite con el ventrículo. La escala superpuesta en las imágenes corresponde a 10 μ m.

La tinción *in toto* o *wholemout* de la SEZ proporciona una visión tridimensional de la superficie del ventrículo, permitiéndonos observar las estructuras repetidas en forma de roseta, o *pinwheels*, que configuran la organización de esta zona. En el centro de las rosetas, se sitúan las células B, que extienden un cilio corto desde su región apical a través de los endimocitos multiciliados que tapizan la superficie ventricular, hasta el lumen del ventrículo. Las estructuras en forma de roseta pueden identificarse mediante un triple marcaje frente a GFAP (marca a las células madre tipo B), β -catenina (para delimitar las membranas celulares) y γ -tubulina (marca los cuerpos basales de los cilios) (Figura 16 a) (Merkle et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008). Apoyándonos en esta técnica, observamos que entre las membranas de las células endimarias y las membranas de las células madre B-GFAP⁺ que contactan con el ventrículo, se establecen interacciones mediadas por la N-cadherina, identificadas mediante los anticuerpos frente a NCad y EC-NCad (Figura 16 b,

c). Estos datos nos indican que las células B-GFAP+, mediante uniones N-cadherina, establecen interacciones adherentes con las células de su entorno en el nicho.

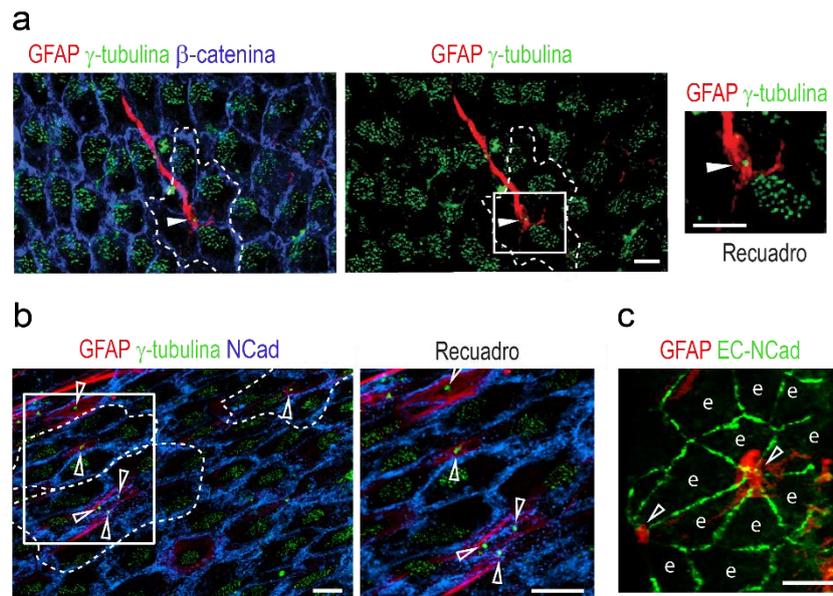


Figura 16. Las células B GFAP+ establecen uniones mediadas por N-cadherina. (a) Inmunohistoquímica fluorescente frente a GFAP (rojo), γ -tubulina (verde) y β -catenina (azul) sobre la pared del ventrículo para localizar las rosetas. La línea blanca punteada delimita la estructura de una roseta, donde las células ependimarias son las células multiciliadas y en el centro se sitúa el cilio único de las células B-GFAP+ (rojo), indicada con una punta de flecha. (b) Imagen confocal de una tinción fluorescente *in toto* de la SEZ frente a GFAP (rojo), γ -tubulina (verde) y NCad (azul), donde se observan varias rosetas (línea blanca punteada). Las puntas de flecha indican el cilio de las células B-GFAP+. (c) Detección inmunofluorescente de los ependimocitos, indicados con una “e”, y las células B-GFAP+ presentes en las estructuras en roseta de la SEZ mediante la GFAP y la EC-NCad. La escala de las imágenes indica 10 μ m.

Para determinar la relevancia de las uniones N-cadherina que establecen las células B-GFAP+ con su entorno, se realizaron ensayos funcionales de adhesión *in vitro*. Las células procedentes de la disgregación de la SEZ de ratones transgénicos CAG(GFP), que expresan la proteína fluorescente GFP bajo el promotor de la β -actina, se sembraron sobre una monocapa de células L929, modificadas para sobre-expresar las cadherinas E-cadherina (ECad-L929) o N-cadherina (NCad-L929) (Nose et al., 1988; Miyatani et al., 1989). Una vez establecida la monocapa, las células de la SEZ disgregadas se sembraron encima, y se permitió su adhesión durante tres horas. El número de células adheridas, identificadas mediante la GFP y una tinción inmunocitoquímica frente a GFAP, se incrementó en un 70% cuando la monocapa de células L929 sobre-expresaba N-cadherina. Sin embargo, la E-cadherina no parecía ser relevante en el anclaje de las células subependimarias GFAP+, ya que su número no aumentaba respecto del que se une a las células L929 sin modificar (Figura 17 a).

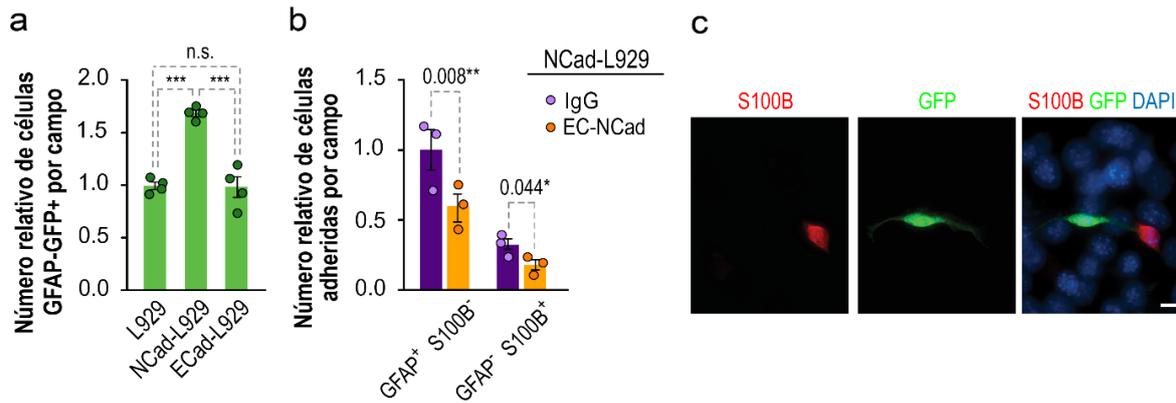


Figura 17. Las células B- GFAP+ presentes en la SEZ establecen uniones intercelulares mediadas por N-cadherina. (a) Cuantificación de los ensayos de adhesión realizados con células disociadas de la SEZ de ratones transgénicos CAG(GFP) y sembradas sobre una monocapa de células L929, L929 que sobre-expresan E-cadherina (ECad-L929) o N-cadherina (NCad-L929). Cada punto representado en las barras del histograma corresponde a una réplica biológica independiente, correspondiente a cada ratón a partir del cual se ha generado un homogenado de SEZ (n=4). ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni (b) Cuantificación de las células GFAP+/S100β- y GFAP-/S100β+ disgregadas de la SEZ de ratones transgénicos GFAP(GFP) y adheridas sobre una monocapa de células NCad-L929 tras un tratamiento de 1 hora con un anticuerpo bloqueante de las uniones extracelulares de N-cadherina (50 µg/mL ; EC-NCad) o con inmunoglobulinas del mismo isotipo como control (IgG). Cada punto representado en las barras del histograma corresponde a una réplica biológica independiente de ratón, a partir del cual se ha generado un homogenado de SEZ (n=3). Test t pareado con dos colas de distribución. (c) Inmunocitoquímica frente a S100β (rojo) para detectar los endimocitos en células de homogenados de SEZ procedente de ratones transgénicos GFAP(GFP) sembradas sobre una monocapa de células NCad-L929. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en el ensayo. La escala indica 5 µm. Datos representados como media ± s.e.m. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s.: no significativo.

Para determinar la especificidad del efecto observado en los ensayos de adhesión, se trataron las células individuales procedentes de homogenados de SEZ de ratones transgénicos GFAP(GFP) con el anticuerpo EC-NCad, que es capaz de bloquear las uniones homofílicas de la N-cadherina, o bien con inmunoglobulinas del mismo isotipo para usarlas como control del ensayo (IgG). Tras una hora de tratamiento, las células se sembraron sobre una monocapa de células NCad-L929 y se realizó una inmunocitoquímica frente a S100β, para detectar los endimocitos, y frente a GFP, para identificar las células B-GFAP+ y amplificar la señal de GFP+. Las interacciones que establecen las células B (GFAP+/S100β-) y los endimocitos (GFAP-/S100β+) se vieron mermadas en un 40-45 % tras el tratamiento con el anticuerpo bloqueante EC-NCad indicando que, efectivamente, dependen de N-cadherina. La adhesión mediada por N-cadherina parece ser más relevante en las células B-GFAP+, ya que mostraron una adhesión basal 3 veces superior a la mostrada por las células S100β+/GFAP- (**Figura 17 b, c**).

1.2. La N-cadherina regula el balance entre proliferación y quiescencia de las células B-GFAP+

Las uniones homofílicas de N-cadherina que establecen las células B-GFAP+ con el nicho podrían ser esenciales en el mantenimiento de su citoarquitectura y en la regulación de la dinámica celular. El análisis inmunohistoquímico de la SEZ para la detección simultánea de la GFAP y del marcador de ciclo celular activo Ki67, una proteína nuclear presente en las fases G1 tardía, S, G2 y M, mostró una aparente correlación inversa entre los niveles de N-cadherina y el estado proliferativo de las células B-GFAP+ (**Figura 18**). Esta observación parecía sugerir que la expresión de la N-cadherina podría estar implicada en el mantenimiento del equilibrio entre activación y quiescencia de las células B-GFAP+ *in vivo*.

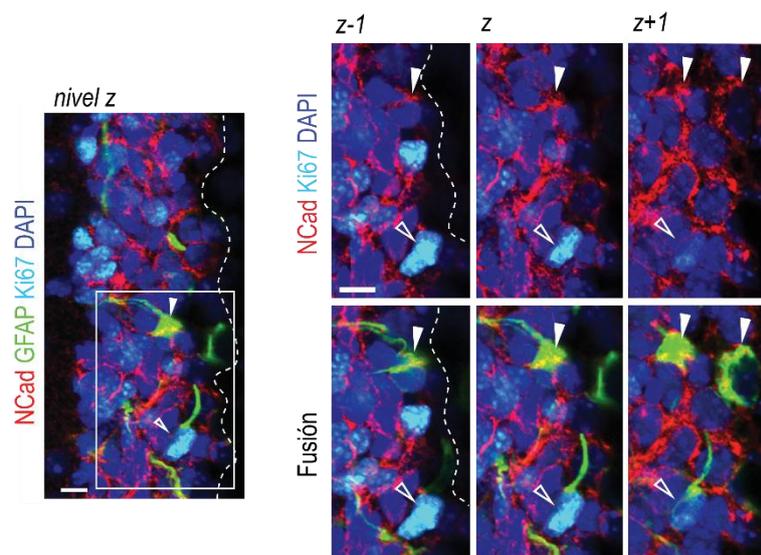


Figura 18. Las células B-GFAP+ proliferantes expresan niveles bajos de N-cadherina. Izquierda: Detección inmunofluorescente de GFAP, N-cadherina (NCad) y Ki67 en la SEZ de ratones control. La línea blanca punteada marca el límite del nicho con el lumen del ventrículo. La punta de flecha blanca indica células GFAP+ que expresan N-cadherina y la flecha hueca muestra una célula GFAP-Ki67+ que ha perdido o expresa menos N-cadherina. Derecha: Se muestran distintos planos en z del recuadro de la imagen de la derecha. En la parte de arriba se muestra la marca de NCad y Ki67 y en la de abajo se muestra el triple marcaje en los tres planos. La barra de escala de las imágenes corresponde a 5 µm.

Para corroborar esta hipótesis y debido a que la delección genética de la N-cadherina en ratones es letal embrionaria (Radice et al., 1997), se usaron ratones condicionales para el gen *Cdh2* (codifica la N-cadherina; ratones *Cdh2*^{floxed}), en los que el gen *Cdh2* está flanqueado por secuencias loxP, para poder llevar a cabo la ablación condicional del gen al cruzarlos con ratones GFAP(Cre). Los endimocitos y las células B-GFAP+, así como el resto de células neurales del cerebro adulto, derivan de las células de glía radial embrionaria, en las que la expresión de la proteína GFAP empieza el día 14 de la etapa embrionaria en ratones (Malatesta et al., 2003; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Así, y como podemos

observar en la **Figura 19 a y b**, la expresión de la N-cadherina desaparece en prácticamente todas las células de la SEZ de ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ, mientras que la marca de E-cadherina permanece inalterada.

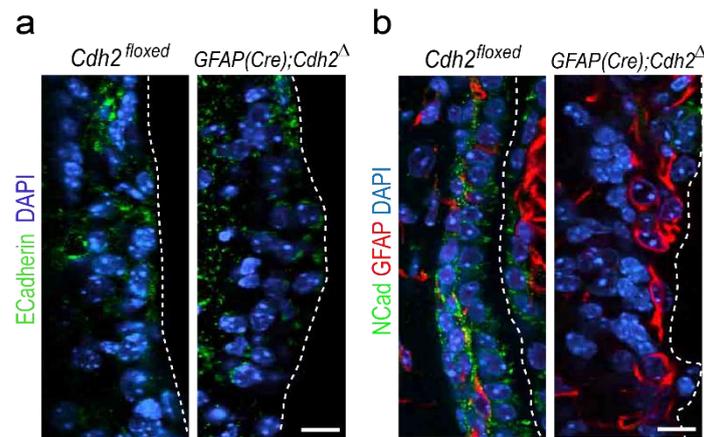


Figura 19. Expresión de E-cadherina y N-cadherina en tejido de ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ. (a) Inmunohistoquímica frente a E-cadherina (verde) en cortes coronales de tejido de ratones cuyas células GFAP positivas son deficientes en N-cadherina (GFAP(Cre);Cdh2^Δ) y en hermanos de camada Cdh2^{floxed}. (b) Tinción inmunohistoquímica frente a GFAP (rojo) y N-cadherina, NCad (verde) en cortes coronales de ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ o Cdh2^{floxed}. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en los cortes coronales. Las líneas blancas de puntos indican el límite con el ventrículo. Barras de escala: 10 μm.

Al estudiar en detalle estos ratones, pudimos observar que el déficit de N-cadherina desde etapas tempranas del desarrollo embrionario induce una hiperplasia de la SEZ, provocando un aumento en el número de células totales (promedio de núcleos por sección \pm s.e.m.: 61 ± 13 y 100 ± 4 en ratones Cdh2^{floxed}, $n=3$, y GFAP(Cre);Cdh2^Δ, $n=4$, respectivamente; $p=0,021$). Además, en los ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ se veía incrementado el porcentaje y la proliferación de células B-GFAP+ (**Figura 20 a, b**). La proporción de neuroblastos también está alterada. Mediante una tinción *in toto* frente a DCX, para observar las cadenas de neuroblastos, pudimos observar que, en la SEZ de ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ, hay más cadenas de neuroblastos pero en una disposición anómala. Estaban desorganizadas y parecía probable que no llegasen hasta su destino normal, dado que el tamaño del OB de los ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ presenta un tamaño inferior al de los ratones control Cdh2^{floxed} (**Figura 20 c, h**).

Mediante microscopía electrónica de barrido y análisis inmunohistoquímico con anticuerpos para la detección de las células B-GFAP+ y de la capa de células endimarias S100 β +, observamos que la citoarquitectura del nicho no estaba conservada. En la SEZ de los ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ, las células endimarias se habían desprendido y aparecían intercaladas con el resto de células (**Figura 20 d, e**), alterando la estructura tisular del nicho. Estudios previos en los que se inducía el bloqueo de las uniones de N-cadherina, mediante

el cruce entre ratones condicionales $Cdh2^{floxed}$ y ratones transgénicos que expresan la Cre recombinasa bajo el promotor D6 (Kadowaki et al., 2007), o bien mediante la inyección o electroporación en el ventrículo lateral e hipocampo de adenovirus que sobre-expresaban una forma truncada de la N-cadherina (Barnabe-Heider et al., 2008), habían demostrado que el bloqueo de las uniones por N-cadherina provoca graves alteraciones de la integridad estructural del córtex o del hipocampo.

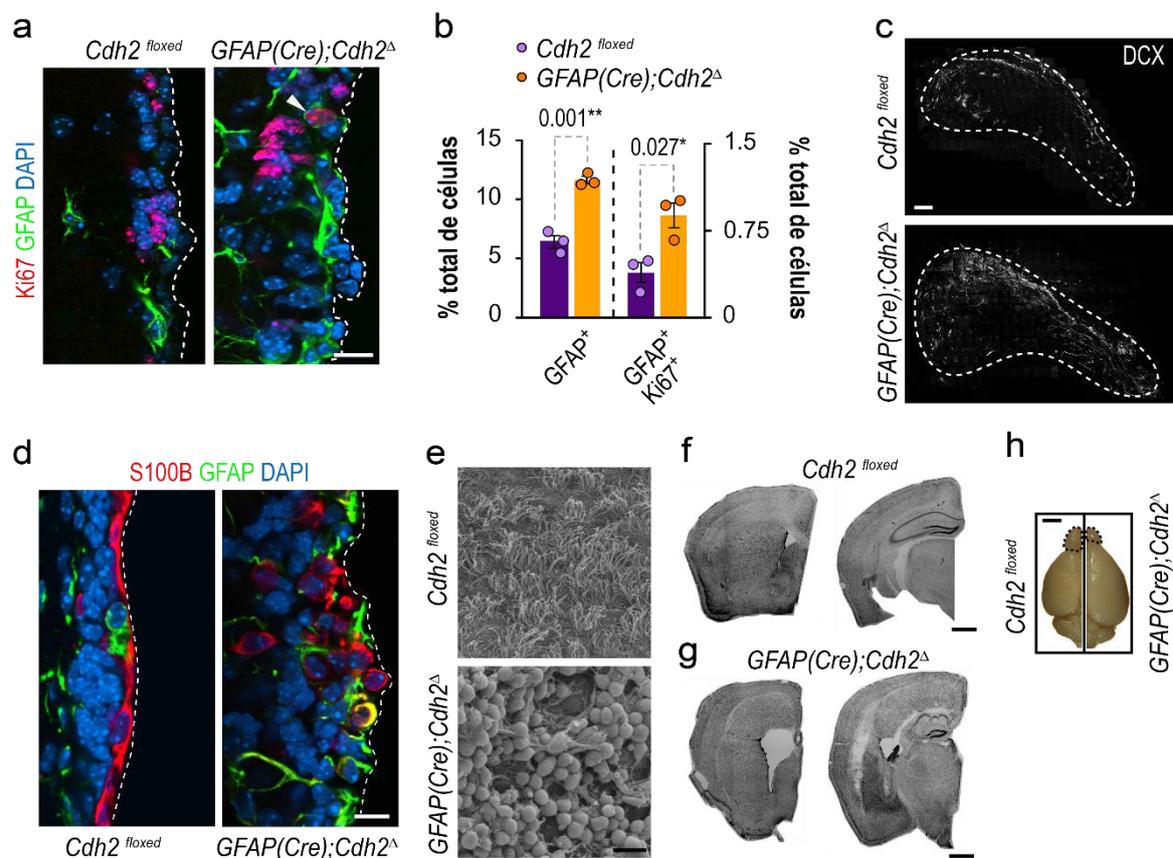


Figura 20. El déficit embrionario de N-cadherina genera hiperproliferación en la SEZ de ratones $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$. (a) Inmunohistoquímica frente a GFAP (verde) y Ki67 (rojo), un marcador de ciclo celular, en cortes de ratones $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y hermanos de camada $Cdh2^{floxed}$ como control. El DAPI marca el núcleo de todas las células. La línea blanca punteada indica el límite con el lumen del ventrículo y la punta de flecha blanca indica una célula doble positiva para GFAP y Ki67. (b) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+ o GFAP+Ki67+ presentes en la SEZ de ratones $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y sus controles $Cdh2^{floxed}$. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m. Cada punto representado en las barras del histograma corresponde a una réplica biológica independiente de ratón (n=3). (c) Reconstrucción de la SEZ a partir de imágenes de confocal correspondientes a la tinción *in toto* frente al marcador de neuroblastos DCX en ratones $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y $Cdh2^{floxed}$. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ. Imagen mostrada en blanco y negro. (d) Inmunohistoquímica frente a GFAP (verde) y S100 β (rojo) en cortes de ratones $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y $Cdh2^{floxed}$ como control. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en los cortes coronales. La línea blanca punteada indica el límite con el lumen del ventrículo. (e) Imágenes de la superficie de la SEZ realizadas mediante microscopía electrónica de barrido. (f) Reconstrucciones de dos cortes coronales de ratones $Cdh2^{floxed}$ y (g) $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ teñidos con Nissl, al nivel de Bregma 0,62 (izquierda) y -2,18 (derecha). (h) Imágenes del hemisferio de un ratón $GFAP(Cre);Cdh2^{\Delta}$ y $Cdh2^{floxed}$. Las líneas punteadas negras delimitan los OB de ambos hemisferios. Barras de escala: en a, d y e, 10 μ m; en c, 200 μ m; en f y g, 500 μ m y en h, 2.500 μ m.

Nuestros estudios histológicos, llevados a cabo mediante la tinción con violeta de cresilo en cortes coronales de ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ y Cdh2^{floxed}, ponían de manifiesto que la delección de la N-cadherina en las células de la glía radial no sólo provoca una desorganización estructural de la SEZ, sino que causa grandes defectos morfológicos en la corteza, el cuerpo caloso o el hipocampo, además de una hidrocefalia considerable. Las últimas capas celulares de la corteza están desorganizadas, y se disponen formando una gran masa celular que contacta con los ventrículos, dado que el cuerpo caloso es inexistente en estos ratones. Además, el hipocampo es más pequeño, siendo prácticamente inexistente en las regiones rostrales, y las neuronas piramidales se disponen anómalamente (**Figura 20 f, g**). Las alteraciones graves que presenta este modelo genético lo hacían poco útil para el estudio fino de las uniones por N-cadherina en la SEZ, y nos hizo plantearnos la búsqueda de otro modelo en el que no se produjesen defectos durante el desarrollo por activación temprana de la recombinasa Cre.

Otra manera de estudiar la implicación de la N-cadherina en la regulación de la proliferación de las células B-GFAP+ y en la arquitectura del nicho neurogénico, dejando a un lado los efectos derivados del desarrollo embrionario, es mediante la infección con partículas lentivirales de las células residentes en la SEZ. Para ello, se clonó la construcción DN-CDH, que codifica una versión truncada de la E-cadherina humana cuya sobreexpresión interfiere con la expresión de la E- y la N-cadherina desestabilizando las uniones adherentes (Noles y Chenn, 2007), en el vector lentiviral pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (nombrado en este trabajo como Lent-GFP; Addgene #12252) (Nieman et al., 1999; Consiglio et al., 2004). El vector lentiviral generado, nombrado en este trabajo como Lent-GFP-DN-CDH, fue inyectado en paralelo al vector lentiviral control Lent-GFP en el estriado adyacente a la SEZ de ratones C57BL/6J de 6 semanas en colaboración con la Dra. Antonella Consiglio (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona –IBUB-). Los ratones infectados fueron sacrificados 60 días después para evitar efectos derivados del daño post-operatorio o de la gliosis generada en la zona. El análisis de la interferencia de las uniones adherentes provocada por las partículas lentivirales, puso de manifiesto la disminución de uniones por N-cadherina en células subependimarias infectadas con el vector Lent-GFP-DN-CDH (**Figura 21 a-b**). Mediante la inmunodetección de la proteína GFAP y del marcador de ciclo Ki67, pudimos detectar un aumento en la población de células GFAP+ y que dicha población es más activa proliferativamente en los ratones infectados con el Lent-GFP-DN-CDH (**Figura 21 c**). Por tanto, al igual que habíamos visto con los ratones condicionales, las

uniones mediadas por N-cadherina parecen estar implicadas en la regulación de la proliferación de células B-GFAP⁺ residentes en la SEZ.

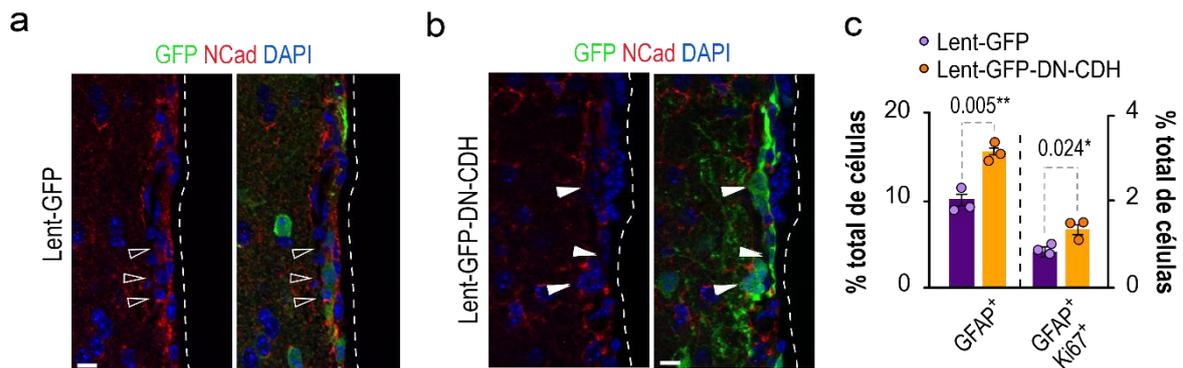
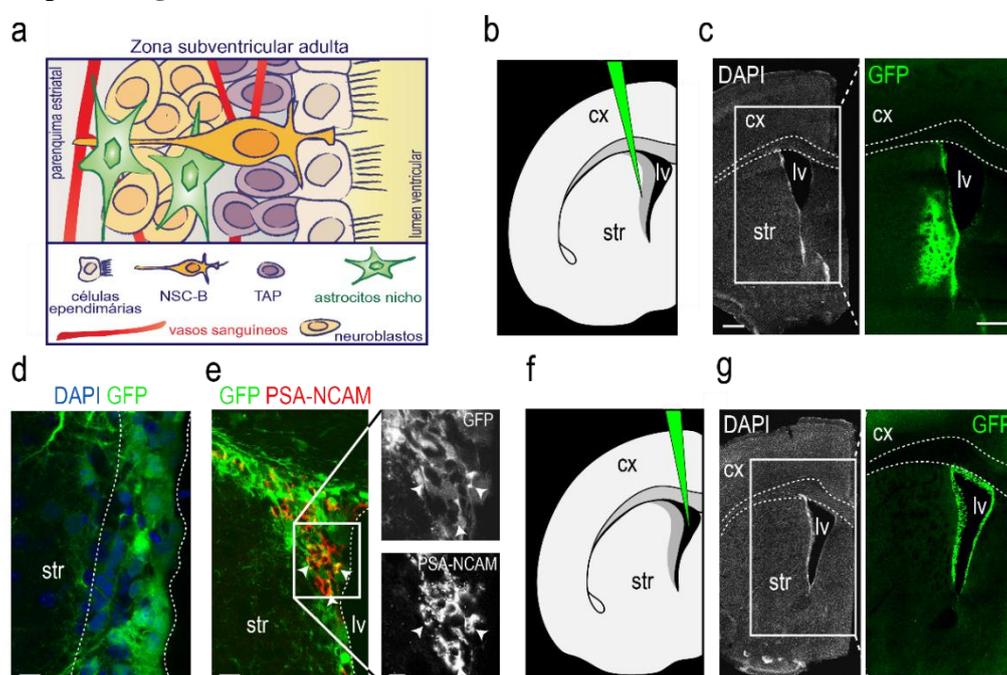


Figura 21. La interferencia de las uniones mediadas por cadherina promueve la activación de las células GFAP⁺ residentes en la SEZ. (a) Inmunohistoquímica frente a NCad y GFP, en un corte coronal de ratones infectados intraestriatalmente con la construcción Lent-GFP o (b) Lent-GFP-DN-NCad. Las puntas de flecha huecas indican células Lent-GFP⁺ que expresan NCad en su membrana. El DAPI marca el núcleo celular de todas las células presentes en los cortes. Las puntas de flecha blancas indican la pérdida de expresión de NCad por parte de las células infectadas con el Lent-GFP-DN-NCad. Las barras de escala indican 10 μ m y la línea blanca punteada el límite de la SEZ con el ventrículo. (c) Cuantificación de las células GFAP⁺ y GFAP⁺Ki67⁺ presentes en la SEZ de cortes coronales de ratones infectados con el Lent-GFP y el Lent-GFP-DN-CDH. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto representa muestras biológicas independientes (ratones) para cada genotipo.

Datos previamente publicados (Consiglio et al., 2004), que hemos reproducido en nuestro laboratorio (Porlan et al., 2016), indicaban que la introducción estereotáxica de un título controlado de partículas lentivirales no desestabiliza las uniones entre las células del epéndimo y conduce sólo a la transducción de las células ependimarias. En este caso, la cirugía no provoca gliosis en la región, por lo que los ratones infectados se sacrificaron 15 días después (Figura 22).



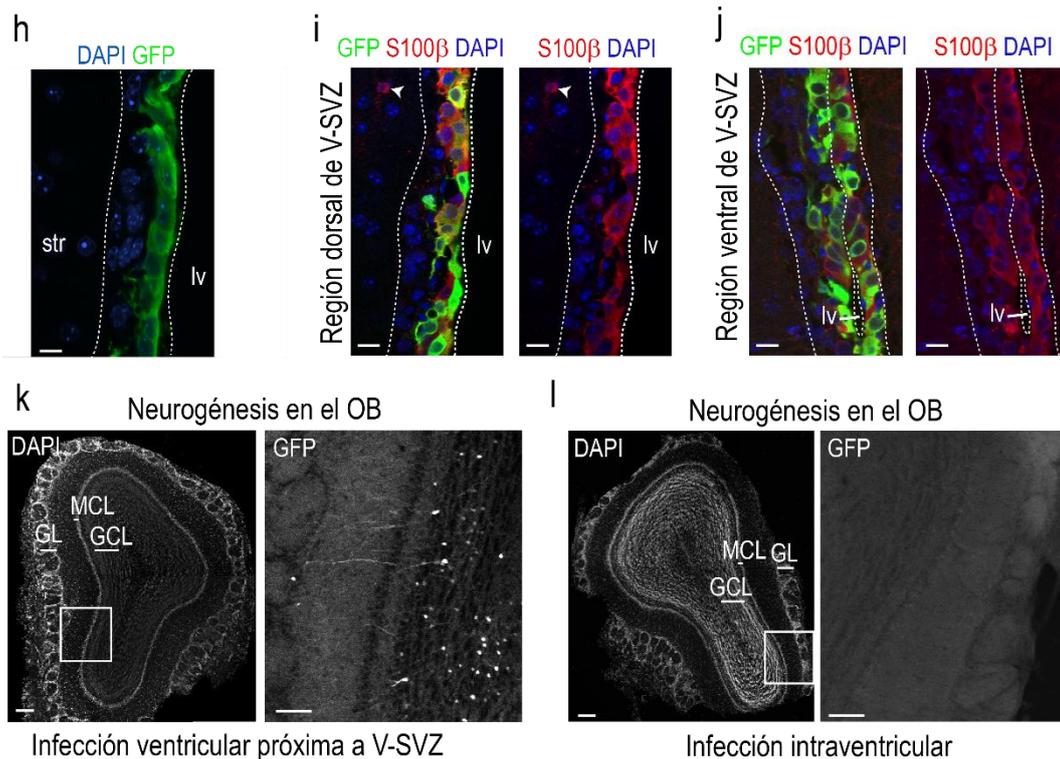


Figura 22. Detección inmunofluorescente del reportero del virus Lent-GFP en tejido de ratones infectados. (a) Simplificación de los componentes celulares de la SEZ. Las células B-GFAP⁺ tienen una morfología polarizada y se intercalan entre las células endoteliales que tapizan la superficie del ventrículo. (b) Esquema de un corte coronal de un hemisferio de ratón infectado, indicando la zona de la inyección y la posición de la aguja Hamilton en la proximidad del nicho. (c) Fotografía de un corte coronal de ratón infectado en el estriado próximo al nicho, que muestra la marca del reportero (GFP) 60 días tras la infección. (d) Ampliación de la inmunofluorescencia frente a GFP en ratones infectados en el estriado en secciones coronales de tejido. Con esta técnica se infectan muchas células presentes en el nicho. Las células endoteliales se sitúan en el límite con el ventrículo y pueden reconocerse por su morfología cúbica. (e) Inmunofluorescencia frente a GFP y un marcador de neuroblastos, PSA-NCAM. Dos semanas tras la infección, se encuentran células doblemente positivas, indicando la capacidad neurogénica de las células infectadas. Las puntas de flecha blancas indican los neuroblastos. Se muestran aumentos del recuadro de la imagen para visualizar mejor el doble marcaje. (f) Esquema de un corte coronal de un hemisferio de ratón infectado, indicando la zona de la inyección y la posición de la aguja Hamilton en el ventrículo. (g) Cortes coronales de animales infectados con Lent-GFP intraventricularmente y sacrificados 15 días después. Inmunofluorescencia frente a GFP. (h) Magnificación de una inmunofluorescencia frente a GFP en tejido coronal de la SEZ de ratones infectados intraventricularmente. Con la infección intraventricular sólo se marcan las células endoteliales. (i-j) Inmunofluorescencia para la detección del reportero GFP y para el marcador de células endoteliales S100β. Esta técnica permite infectar un gran número de células endoteliales, tanto a nivel dorsal (i) como ventral (j) en la SEZ. Las puntas de flecha indican astrocitos del parénquima estriatal, que también se marcan con S100β. (k) Sección coronal del OB de ratones infectados en el estriado próximo al nicho y sacrificados 60 días después. Inmunodetección frente a DAPI (izquierda) y GFP (derecha) en la región indicada en el recuadro. Se detectan un gran número de neuroblastos. (l) Sección coronal del OB de ratones infectados en el ventrículo lateral y sacrificados 45 días después. Inmunodetección frente a DAPI (izquierda) y GFP (derecha) en la región indicada en el recuadro. No se detectan neuroblastos marcados. El DAPI se usó para marcar el núcleo de todas las células presentes en los cortes. En c y g: Las líneas blancas punteadas indican los límites del cuerpo caloso. En d, h, i y j: Las líneas blancas punteadas indican el límite del nicho con el ventrículo y el estriado. cx, córtex cerebral; lv, ventrículo lateral; str, estriado; GL, capa glomerular; GCL, capa granular; MCL, capa células mitrales. Barras de escala: c, g = 500 μm; d, e, h-j = 10 μm; k-l = 250 μm; 100 μm.

La puesta a punto de este modelo usando las partículas lentivirales obtenidas con el vector para la expresión de la construcción dominante-negativa para N-cadherina nos permitió estudiar la implicación de estas uniones celulares en la proliferación de las células madre B-GFAP⁺, sin modificar los niveles de N-cadherina en las propias células B-GFAP⁺, ni en ningún otro tipo celular aparte de las células endimarias. El análisis de la población de células B-GFAP⁺ reveló que, a pesar de no sobre-expresar la construcción Lent-GFP-DN-CDH, se interrumpen las uniones de N-cadherina y se incrementa el número y la proliferación de células B-GFAP⁺ en el nicho (**Figura 23 a-d**).

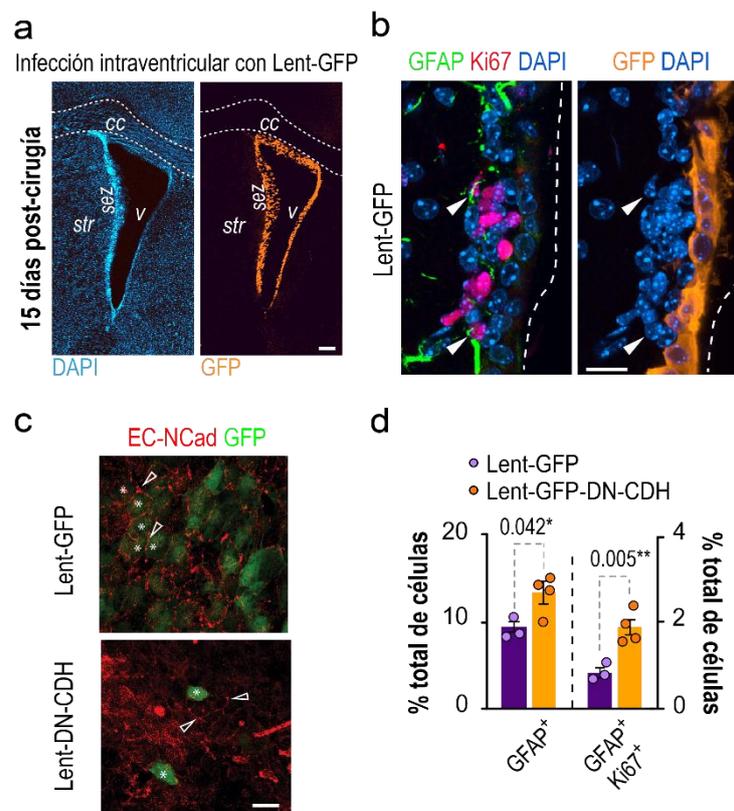


Figura 23. La interferencia de las uniones N-cadherina promueve la activación de las células madre B-GFAP⁺ residentes en la SEZ. (a) Reconstrucción del ventrículo infectado a partir de imágenes de confocal, correspondientes a la inmunohistoquímica frente a la GFP, pseudocoloreada en naranja. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. La línea blanca punteada indica los límites del cuerpo caloso. La escala superpuesta en la imagen indica 100 μ m. cc: cuerpo caloso; sez: SEZ; v: ventrículo; str: estriado. (b) Inmunohistoquímica frente a GFAP (verde), Ki67 (rojo) y GFP (pseudocoloreado en naranja) en cortes coronales de ratones infectados con Lent-GFP. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en los cortes. La línea blanca punteada indica el límite con el lumen del ventrículo y las puntas de flecha blancas indican células GFAP-Ki67⁺ de la SEZ que no han sido infectadas con el Lent-GFP liberado en el ventrículo. La barra de la escala corresponde a 10 μ m. (c) Tinción *in toto* frente a EC-NCad (rojo) y GFP (verde) en tejido de SEZ de ratones infectados con la construcción Lent-GFP y Lent-GFP-DN-NCad. Los asteriscos indican células infectadas GFP⁺ y las puntas de flecha las uniones de EC-NCad que mantienen. La barra de la escala corresponde a 10 μ m. (d) Cuantificación de las células GFAP⁺ y GFAP-Ki67⁺ presentes en la SEZ de cortes coronales de ratones infectados con el Lent-GFP y el Lent-GFP-DN-CDH. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

1.3. La neurogénesis y oligodendrogénesis adulta dependen de la integridad de las uniones mediadas por N-cadherina en el nicho neurogénico

Para determinar si el incremento de células B-GFAP⁺ proliferativamente activas conlleva un incremento en la progenie generada a partir de estas células, los ratones infectados recibieron 7 inyecciones de BrdU, una inyección cada 2 horas durante un período total de 12 horas, 10 días después de la operación e infección ventricular. Los ratones fueron sacrificados tras otros 21 días, tiempo suficiente para favorecer la retención de la BrdU en las células B-GFAP⁺ (LRC-BrdU) por su ciclo celular lento, y permitiendo que otros tipos celulares, con un ciclo celular más corto, diluyan la marca (**Figura 24 a**). Como se puede ver en la **Figura 24 b**, la infección intraventricular con el vector Lent-GFP-DN-CDH incrementó el número de células LRC-BrdU⁺ presentes en la SEZ y, consiguientemente, promovió la neurogénesis y oligodendrogénesis, viéndose incrementado el número de células BrdU en el cuerpo caloso y en el OB.

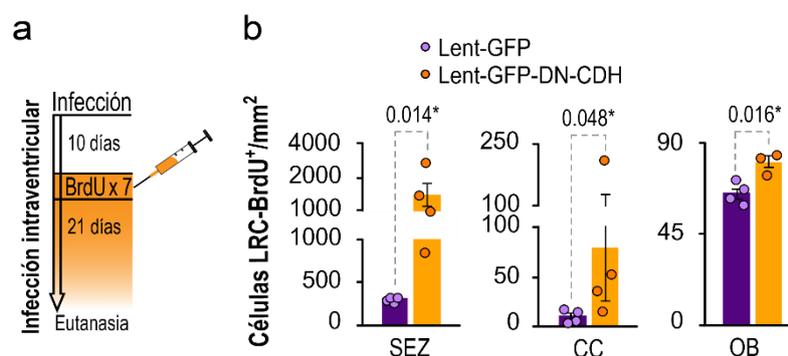


Figura 24. La activación de las células B-GFAP⁺, provocada por la pérdida de uniones adherentes por N-cadherina, promueve la generación de precursores neuronales y oligodendrogliales. (a) Esquema del diseño experimental llevado a cabo en las infecciones intraventriculares para el estudio de la descendencia generada por las células B-GFAP⁺. (b) Cuantificación del número de células BrdU⁺ encontradas por cada mm² de SEZ, cuerpo caloso (CC) o capa glomerular del OB (OB) rastreada. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m; cada punto representa el valor para cada ratón analizado.

1.4. Las uniones mediadas por N-cadherina son esenciales para el mantenimiento de la citoarquitectura del nicho neurogénico

Mediante el análisis inmunohistoquímico de cortes coronales o de la SEZ *in toto* de ratones infectados intraventricularmente con los lentivirus Lent-GFP o Lent-GFP-DN-CDH, observamos que la citoarquitectura del nicho está alterada, cuando se pierden las uniones adherentes en la superficie del ventrículo. La estructura en forma de roseta no se mantiene en estas condiciones (**Figura 25 a, b**), y las células endimarias, al igual que sucede en el

caso de los ratones GFAP(Cre);Cdh2^Δ, se han desprendido o están entremezcladas con el resto de células y no forman una capa organizada (**Figura 25 c**).

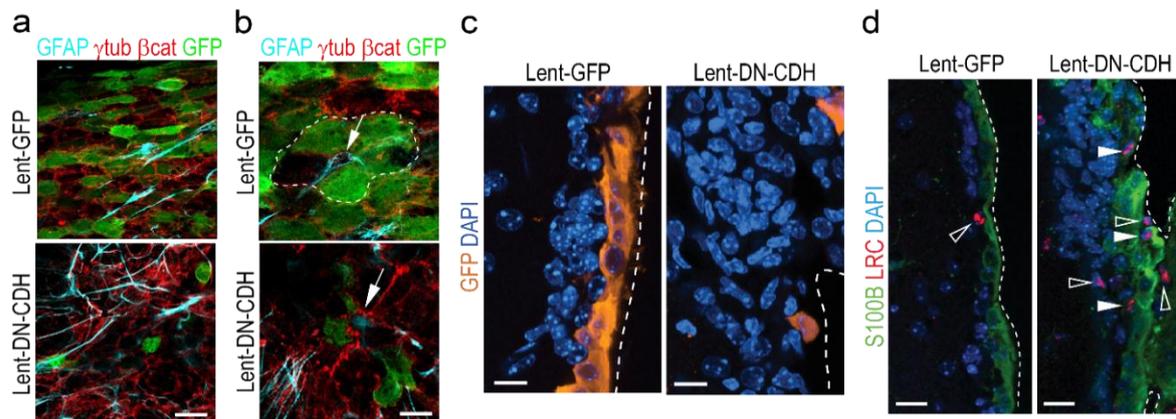


Figura 25. La organización en forma de rosetas se ve alterada tras la pérdida de las uniones por N-cadherina. (a) Imagen confocal de las rosetas presentes en la superficie del ventrículo de ratones infectados con el vector Lent-GFP y Lent-GFP-DN-CDH, identificados mediante tinción *in toto* frente a GFAP (cian), GFP (verde), β -catenina y γ -tubulina (rojo). La barra de escala superpuesta en la imagen indica 5 μ m. (b) Imagen de la estructura de una única roseta, identificado mediante GFAP (cian), GFP (verde), β -catenina y γ -tubulina (rojo), presente en la superficie del ventrículo de ratones infectados con el vector Lent-GFP y Lent-GFP-DN-CDH. La línea blanca punteada bordea el contorno de una roseta, indicándose con una flecha la posición de la célula B-GFAP+. La barra de la escala corresponde a 5 μ m. (c) Cortes coronales de ratones infectados intraventricularmente con Lent-GFP y Lent-GFP-DN-CDH, donde se observa la pérdida de la citoarquitectura del nicho y el desprendimiento de las células endimarias infectadas. (d) Detección fluorescente frente a S100B y BrdU en cortes coronales de ratones infectados intraventricularmente con las construcciones Lent-GFP y Lent-GFP-DN-CDH. Las puntas de flecha blancas indican células endimarias S100 β + que se han generado *de novo* en la SEZ. Las puntas de flecha huecas indican células BrdU+ que no son células endimarias. El DAPI de las imágenes marca el núcleo de todas las células presentes en el corte coronal y la línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el lumen del ventrículo. La barra de la escala corresponde a 10 μ m.

Curiosamente, en los ratones infectados intraventricularmente con la construcción Lent-GFP-DN-CDH, observamos la formación de nuevas células endimarias S100 β + en la SEZ (**Figura 25 d**). Las células endimarias únicamente son capaces de proliferar tras un daño o lesión (Carlen et al., 2009), por lo que estos datos sugieren que la ruptura de la citoarquitectura del nicho inicia mecanismos de reparación por parte de las células endimarias.

2. La proteólisis regulada de N-cadherina modula la activación de las células B-GFAP+: papel de la metaloproteasa MT5

Los datos obtenidos hasta el momento indicaban que, la correcta posición y localización de las células B-GFAP+, así como la integridad del nicho neurogénico, dependen de uniones adherentes mediadas por N-cadherina. Además, estas uniones modulan la activación y proliferación de estas células, y tienen una implicación en producción de su

progenie. En condiciones fisiológicas, las proteasas intervienen en la modulación local de las uniones por N-cadherina de la membrana celular, mediante la hidrólisis regulada de los ectodominios. Proteasas como ADAM10 y MT5-MMP (nombrada en este trabajo como MT5) se expresan abundantemente en el cerebro adulto (Jaworski, 2000; Karkkainen et al., 2000; Guo et al., 2016), donde se les ha atribuido funciones biológicas relevantes en morfogénesis (Luo, 2005; Jorissen et al., 2010), plasticidad sináptica (Monea et al., 2006; Warren et al., 2012), proliferación (Bulstrode et al., 2012) y migración (Siney et al., 2016). Además, se ha descrito la implicación de ambas en el procesamiento del dominio extracelular de la proteína transmembrana APP (*Amyloid precursor protein*) (Postina et al., 2004; Ahmad et al., 2006; Jorissen et al., 2010; Willem et al., 2015), relevante en la liberación del péptido soluble β -amiloide y en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, y del fragmento extracelular de la N-cadherina (Monea et al., 2006; Uemura et al., 2006; Folgueras et al., 2009; Lo Sardo et al., 2012; Warren et al., 2012). Por ello, ambas proteasas se convierten en buenas candidatas para participar en la modulación dinámica de las uniones por N-cadherina y tener un papel en la regulación de la proliferación de células de la SEZ.

Estudios previos, demostraban que la actividad enzimática de MT5 es capaz de regular los niveles de N-cadherina presentes en la membrana plasmática de neuronas periféricas y mastocitos, generando fragmentos intracelulares como consecuencia de su proteólisis. Dicha regulación conllevaba implicaciones biológicas tanto en la reorganización sináptica de las neuronas como en las interacciones celulares establecidas entre mastocitos y fibras sensoriales. Debido a que nuestros resultados previos ponían de manifiesto la relación entre la modulación de las uniones de N-cadherina que establecen las células B-GFAP+ con su entorno y el estado proliferativo de las mismas, nos planteamos estudiar el rol que podía estar ejerciendo MT5 en este proceso.

2.1. La metaloproteasa MT5 regula la activación de células B-GFAP+ y la neurogénesis adulta

Preparaciones *in toto* de la SEZ y tinciones frente a β -catenina, GFAP, N-cadherina y MT5, nos revelaron que MT5 y N-cadherina colocalizan abundantemente en la membrana de las células endimarias y células B-GFAP+ (**Figura 26**). Por lo tanto, MT5 podría ser una metaloproteasa candidata a modular las interacciones adherentes tipo N-cadherina que establecen las células madre con el nicho subventricular adulto.

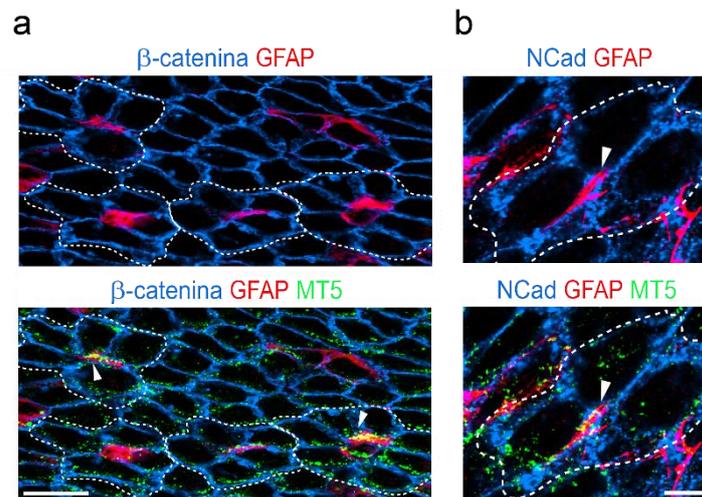


Figura 26. MT5 colocaliza con N-cadherina en las uniones adherentes situadas entre las células ependimarias y las células madre adultas B-GFAP+. (a) Imagen confocal de la superficie del ventrículo, marcada con anticuerpos específicos frente a β -catenina, GFAP y MT5. Las líneas blancas punteadas indican cuatro rosetas adyacentes. En los puntos de interacción entre las células B-GFAP+ y los ependimocitos, se expresa MT5 de forma abundante (puntas de flecha blancas). La barra de escala superpuesta en la imagen corresponde a 10 μ m. (b) Tinción *in toto* del ventrículo, para la detección de las células B-GFAP+, las uniones adherentes tipo N-cadherina (NCad) y la metaloproteasa MT5. Las células madre B-GFAP+ presentes en las rosetas del ventrículo (línea blanca punteada), establecen uniones de N-cadherina con las células ependimarias, donde MT5 se expresa de forma abundante (punta de flecha blanca). La barra de escala de la imagen indica 5 μ m.

Con el objetivo de estudiar la implicación de MT5 en la regulación de las uniones adherentes del nicho, se infectaron las células residentes de la SEZ con partículas lentivirales para sobre-expresar MT5. Para ello, se clonó la secuencia de expresión de MT5 en el plásmido pcDNA3, con anterioridad a la secuencia de la proteína Flag. La secuencia codificante para MT5-Flag fue subclonada en el vector lentiviral Lent-GFP usado anteriormente, generando un vector lentiviral de sobreexpresión de MT5 (Lent-GFP-MT5). Ratones C57BL/6J infectados con el Lent-GFP o el Lent-GFP-MT5 se sacrificaron 2 meses después de la operación para evitar efectos derivados del daño post-operatorio o de la gliosis generada en la zona. El análisis inmunohistoquímico de la SEZ infectada, reveló un incremento en la expresión de la metaloproteasa en el nicho y los niveles de N-cadherina extracelular disminuyeron en las células GFAP+ infectadas (**Figura 27 a, b**). Los análisis inmunohistoquímicos revelaron que, la sobreexpresión de MT5 en la SEZ, aumenta el porcentaje de células B-GFAP+ del nicho y su activación (**Figura 27 c**). Por lo tanto, estos datos indican que la actividad proteolítica de MT5 es capaz de regular las uniones N-cadherina del nicho, promoviendo la activación del ciclo celular de las células madre B-GFAP+.

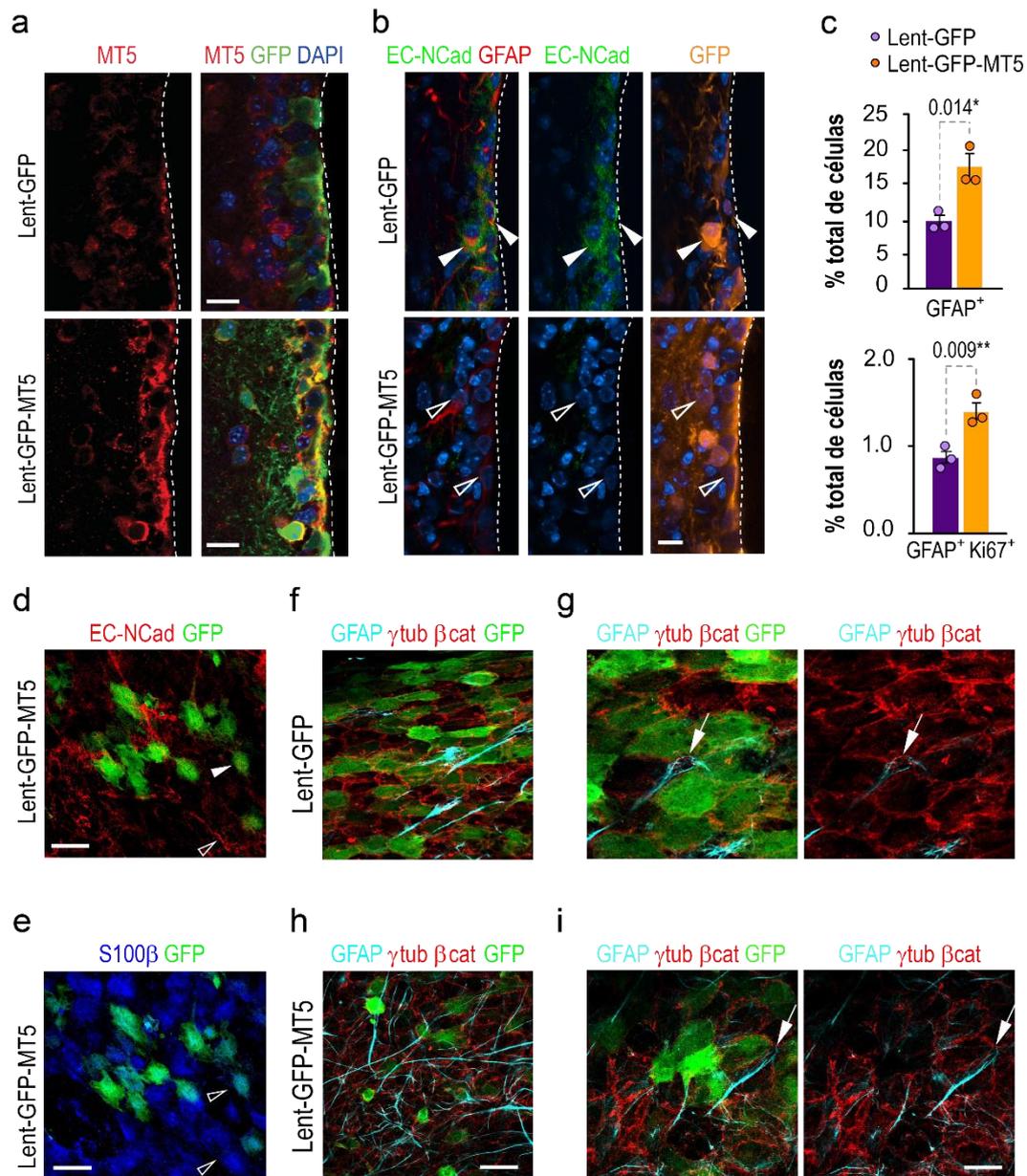


Figura 27. MT5 es capaz de escindir las uniones de N-cadherina que anclan las células B-GFAP+ al nicho. (a) Inmunohistoquímica frente a MT5 y GFP, en cortes coronales de ratones infectados intraestriatalmente con los vectores Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. (b) Cortes coronales de ratones infectados en el estriado con el vector Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Inmunohistoquímica frente a EC-NCad, GFAP y GFP (pseudocoloreado). El DAPI marca el núcleo de todas las células. La línea blanca punteada marca el límite de la SEZ con el ventrículo. Las puntas de flecha blancas indican la presencia del fragmento extracelular de la N-cadherina y las puntas de flecha huecas muestran su falta en células madre GFAP+ infectadas. (c) Cuantificación del porcentaje de células madre GFAP+ y GFAP+Ki67+ presentes en la SEZ de ratones infectados intraestriatalmente con los vectores Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón. (d) Detección de GFP y EC-NCad, (e) o S100 β en la superficie del ventrículo de ratones infectados intraventricularmente. Las puntas de flecha indican células infectadas con MT5, las cuales han perdido la expresión de EC-NCad. Las puntas de flecha vacías indican la expresión de N-cadherina en la membrana de células que no han sido infectadas. La superficie del ventrículo está alterada y las células endoteliales están entremezcladas. (f-i) Tinción *in toto* de la superficie del ventrículo de ratones infectados intraventricularmente con Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Las imágenes f y h son vistas generales de la superficie del ventrículo, mientras que las imágenes g e i, son imágenes ampliadas de una roseta. Las líneas punteadas blancas indican el contorno de la roseta y las flechas blancas indican la posición de la célula B-GFAP+ en el centro de la estructura. Barras de escala: en a-b, d-e, f y h; 10 μ m; en g e i; 5 μ m.

El análisis inmunohistoquímico de la superficie ventricular frente a S100 β , GFAP, β -catenina, γ -tubulina y GFP, reveló que la citoarquitectura del nicho se ve alterada tras la infección con el Lent-GFP-MT5, probablemente debido a que las uniones de N-cadherina se ven mermadas (**Figura 27 d-i**).

Para determinar si el incremento de la proporción de células B-GFAP+ conllevaba un incremento de la descendencia que alcanza el OB, los ratones infectados fueron inyectados con CldU 10 días después de la operación e infección ventricular y, tras 21 días, fueron sacrificados (**Figura 28 a**). Cabe comentar que, al igual que sucede con los ratones infectados con el Lent-GFP-DN-CDH, observamos alteraciones en la citoarquitectura de la SEZ de ratones infectados con el Lent-GFP-MT5, y un incremento en la proliferación de células endimarias infectadas CldU+/S100 β + /GFP+, probablemente debido a un intento por regenerar el nicho lesionado (**Figura 28 b**).

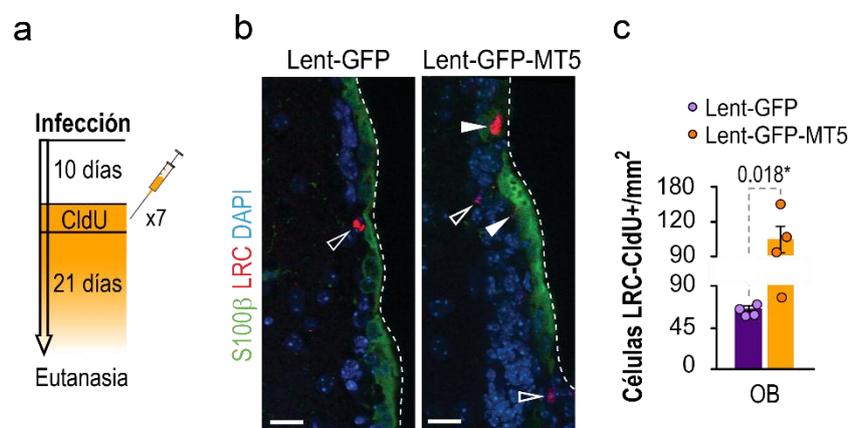


Figura 28. La sobreexpresión de MT5 promueve la neurogénesis adulta. (a) Esquema del diseño experimental llevado a cabo en las infecciones intraventriculares para el estudio de la descendencia generada por las células B-GFAP+. (b) Detección fluorescente frente a S100 β y CldU+ en cortes coronales de ratones infectados intraventricularmente con las construcciones Lent-GFP y Lent-GFP-MT5. Las puntas de flecha blancas indican células endimarias S100 β + que se han generado *de novo* en la SEZ. Las puntas de flecha huecas indican células CldU+ que no son células endimarias. El DAPI de las imágenes marca el núcleo de todas las células presentes y la línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el lumen del ventrículo. La barra de la escala corresponde a 10 μ m. (c) Cuantificación del número de células CldU+ encontradas por cada mm² de capa glomerular del OB, en ratones infectados intraventricularmente con Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

El recuento de células CldU+ en la capa glomerular del OB, indica que la sobreexpresión de MT5 promueve la neurogénesis adulta, respecto al control (**Figura 28 c**). Por lo tanto, los datos obtenidos parecen indicar que la metaloproteasa MT5 participa en la regulación dinámica de los niveles de N-cadherina, provoca la activación de las células madre presentes en el nicho y promueve el input neurogénico que llega al OB.

2.2. La actividad de MT5 regula la adhesión celular mediada por N-cadherina

A continuación se analizó el procesamiento de la N-cadherina en ratones modificados genéticamente con una mutación en el gen *Mmp24*, que les impide producir una metaloproteasa MT5 activa (*Mmp24 KO*; Folgueras et al., 2009). En los ratones *Mmp24 KO*, no se observaron cambios en los niveles de ARN mensajero de *Cdh2* (**Figura 29**). Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo EC-NCad revelaba una marca de EC-NCad mucho más intensa en la SEZ de ratones *Mmp24-KO* que en la de ratones *Mmp24-WT*. Además, en las prolongaciones de las células B-GFAP⁺ era más evidente el aumento de la intensidad de la marca (**Figura 30 a**). Estudios bioquímicos permitieron corroborar las observaciones realizadas con el análisis inmunohistoquímico, al detectarse un incremento de los niveles de la N-cadherina total (FL-NCad) mediante *immunoblot* con anticuerpos NCad y EC-NCad en homogenados de SEZ y de neuroesferas de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* (**Figura 30 b-c**). Las uniones adherentes están conectadas con el citoesqueleto de actina a través de la α -catenina, β -catenina y plakoglobulinas (Heuberger y Birchmeier, 2010). La β -catenina citosólica puede participar en la vía de señalización de Wnt (Heuberger y Birchmeier, 2010); sin embargo, los niveles de β -catenina en la membrana aumentan en las neuroesferas *Mmp24 KO*, por lo que parece indicar que la falta de actividad de MT5 aumenta los niveles de N-cadherina en la membrana, y así, retiene también a la β -catenina (Reiss et al., 2005) (**Figura 30 d**).

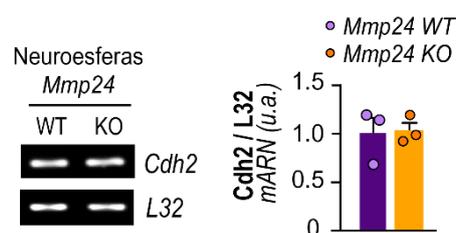


Figura 29. MT5 no altera los niveles de ARNm del gen *Cdh2*. Izquierda: Imagen representativa de las bandas de ARNm del gen *Cdh2* y *L32*, de una PCR semicuantitativa con ARN extraído de neuroesferas de *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* cultivadas 3 días. Derecha: Cuantificación de las bandas mostradas en la imagen anterior. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada muestra biológica independiente analizada.

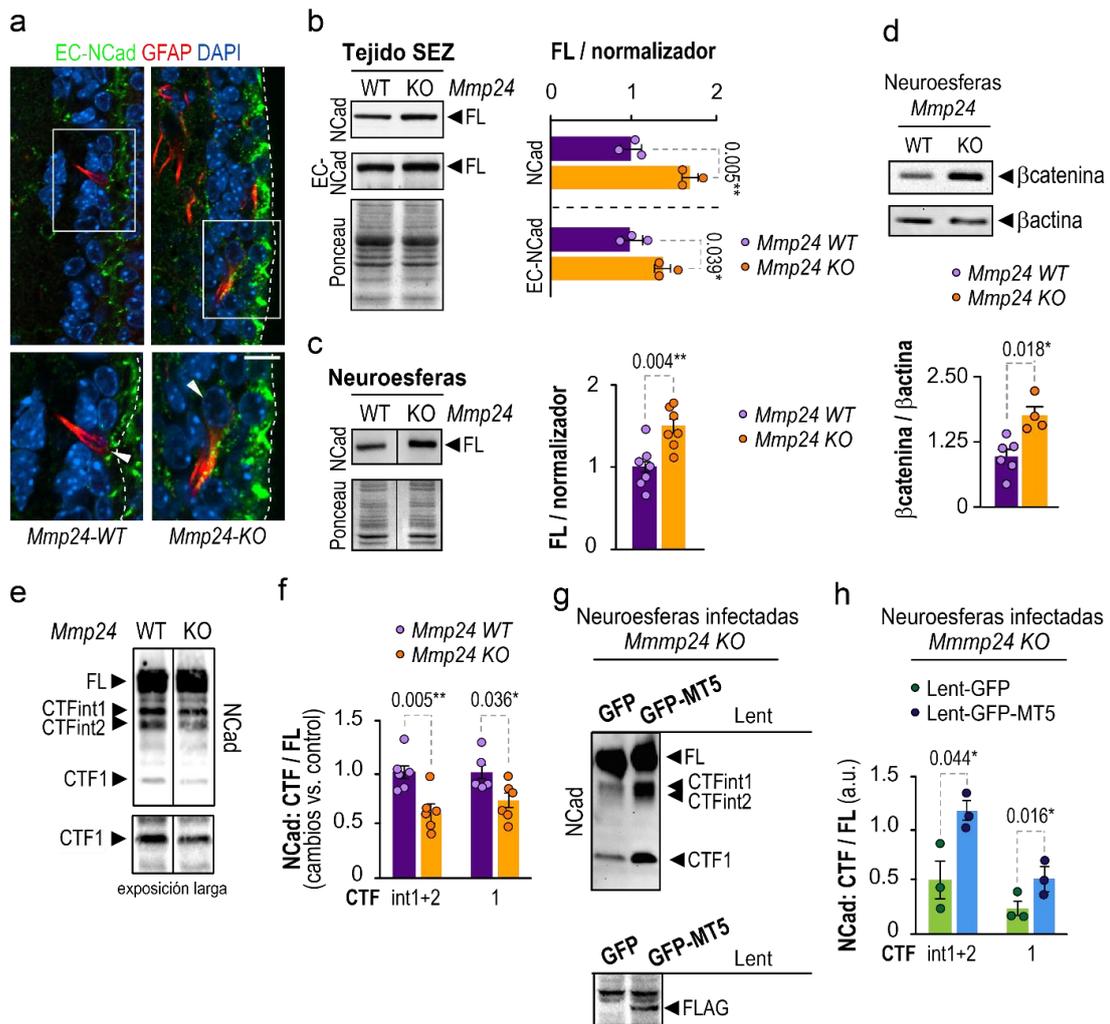


Figura 30. La proteína N-cadherina es un sustrato de MT5 en las células de la SEZ. (a) Imágenes de confocal de una inmunohistoquímica frente a EC-NCad y GFAP en cortes coronales de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en la SEZ del corte coronal muestreado. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el ventrículo. Las puntas de flecha indican células GFAP+ que se marcan con anticuerpos EC-NCad. La barra de escala indica 10 μ m. (b) Izquierda: *Immunoblot* representativo de la N-cadherina con anticuerpos EC-NCad y NCad, en muestras de SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO. El control de carga usado es la tinción de las proteínas unidas a la membrana mediante la tinción de Ponceau S. Derecha: Cuantificación por densitometría de los niveles de N-cadherina (FL-NCad), en relación a la cantidad de carga de proteína total (Ponceau S), detectados mediante los anticuerpos EC-NCad y NCad. (c) Izquierda: *Immunoblot* representativo de la señal de la N-cadherina (FL-NCad), detectada mediante el anticuerpo NCad, en muestras de neuroesferas de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO cultivadas durante 3 días. El control de carga usado es la tinción de las proteínas unidas a la membrana mediante la tinción de Ponceau S. Derecha: Cuantificación densitométrica de los niveles de N-cadherina (FL-NCad), en relación a la cantidad de carga de proteína total (Ponceau S), detectada mediante el anticuerpo NCad. (d) Arriba: Cuantificación por densitometría de las bandas de β -catenina obtenidas en el *immunoblot* de extractos de proteína total obtenidos a partir de neuroesferas *Mmp24* WT y *Mmp24* KO cultivadas 3DIV. Los niveles de β -catenina se han normalizado a los de la β -actina. Abajo: Imagen representativa de las bandas del *immunoblot* cuantificadas. (e) *Immunoblot* representativo de los fragmentos de N-cadherina generados en neuroesferas *Mmp24* WT y *Mmp24* KO cultivadas durante 3 días. Detección mediante el anticuerpo NCad y usando tiempos de exposición distintos. (f) Cuantificación por densitometría de los niveles de los fragmentos CTF1, CTFint1 y CTFint2 de N-cadherina, en relación a los niveles de FL-NCad de la muestra *Mmp24* WT. (g) Arriba: *Immunoblot* de células *Mmp24* KO cultivadas durante 3 días e infectadas con las construcciones Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Abajo: *Immunoblot* de las mismas muestras frente a FLAG, para demostrar la sobreexpresión de MT5 e infección de las neuroesferas. (h) Cuantificación densitométrica de los niveles de los fragmentos CTF1, CTFint1 y CTFint2, en relación a sus niveles de FL-NCad, en muestras de neuroesferas *Mmp24* KO infectadas con Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

El procesamiento proteolítico del dominio extracelular de la N-cadherina libera un fragmento extracelular soluble de unos 90 KDa y un fragmento transmembrana de 45 KDa (CTF1), el cual será procesado posteriormente por la γ -secretasa, liberando un fragmento citosólico de 35 KDa (CTF2) (Monea et al., 2006; Folgueras et al., 2009). Lisados proteicos, generados a partir de neuroesferas de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* cultivadas *in vitro*, indicaron niveles reducidos del fragmento CTF1 y de otros dos fragmentos de mayor peso molecular (que en este trabajo se han llamado CTFint1 y CTFint2) en los extractos proteicos de tejido *Mmp24 KO* (**Figura 30 e, f**). Para comprobar la especificidad del corte por MT5 y la aparición de los fragmentos, se infectaron neuroesferas *Mmp24 KO* con el virus Lent-GFP-MT5 o su control Lent-GFP. En las neuroesferas infectadas con la construcción Lent-GFP-MT5 se promueve el procesamiento proteolítico de la N-cadherina, aumentando significativamente los fragmentos intracelulares identificados como CTF1 y CTFint1+2 (**Figura 30 g, h**).

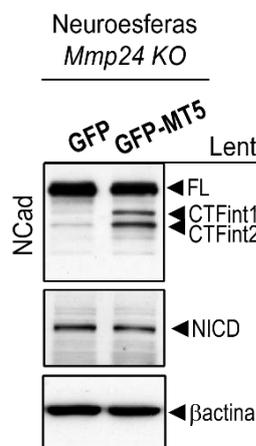


Figura 31. Los niveles de MT5 no afectan al corte proteolítico de Notch. (a) Imagen representativa de un *immunoblot* frente a los fragmentos intracelulares de N-cadherina y Notch y frente a la β -actina, en muestras de proteína total procedente de neuroesferas *Mmp24 KO* cultivadas 3 días e infectadas con los lentivirus Lent-GFP y Lent-GFP-MT5. Las células *Mmp24 KO* infectadas con el Lent-GFP-MT5 recuperan los niveles basales de la FL-NCad y de los fragmentos, sin afectar al corte proteolítico de Notch. Las cuantificaciones se han representado como la media \pm s.e.m. y los puntos de las gráficas corresponden a cada muestra biológica analizada.

Se ha descrito que proteasas como ADAM10 actúan sobre otros sustratos distintos de la N-cadherina, como es el caso de Notch (Muraguchi et al., 2007; Zhuang et al., 2015). Debido a que se ha demostrado la implicación de Notch en la autorrenovación y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células B-GFAP+ de la SEZ adulta (Andreu-Agullo et al., 2009; Aguirre et al., 2010), y que nosotros habíamos observado un aumento significativo de la proliferación de las células B-GFAP+ tras la modulación de la expresión de MT5 en el nicho, decidimos comprobar si Notch podía ser otro potencial sustrato de la actividad de MT5. Los datos moleculares obtenidos a partir de neuroesferas de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* cultivadas durante 3 días, demostraron que Notch no es un sustrato de MT5 y por ello, los niveles de los fragmentos intracelulares (NICD), generados únicamente como consecuencia de la proteólisis de Notch, no cambian (**Figura 31**).

Una vez establecido que MT5 es capaz de regular la proteólisis de N-cadherina en la SEZ, quisimos investigar si esta regulación proteolítica tiene consecuencias funcionales en la adhesión. Para esto, neuroesferas procedentes de la SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO fueron disgregadas y sembradas sobre una monocapa de células NCad-L929. Tras una hora de adhesión, se encontró un mayor número de células adheridas positivas para nestina procedentes de *Mmp24* KO que de individuos control (**Figura 32 a**). Modificando los niveles de expresión de MT5 se consiguió restablecer los niveles basales de adhesión hasta los valores encontrados en células *Mmp24* WT (**Figura 32 b**). Por lo tanto, los datos moleculares obtenidos mediante la técnica de *Western blot* y mediante el ensayo de adhesión celular, indicaban que MT5 está implicada en la regulación de las uniones por N-cadherina presentes en el nicho neurogénico.

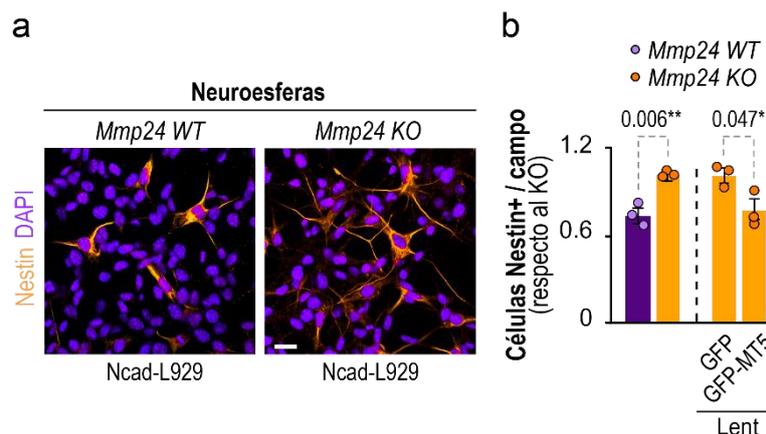


Figura 32. La actividad de MT5 regula la adhesión celular mediada por N-cadherina. (a) Inmunocitoquímica frente a nestina (naranja), en ensayos de adhesión de células *Mmp24* WT y *Mmp24* KO sobre una monocapa de células NCad-L929. El DAPI marca el núcleo de todas las células presentes en la preparación. La escala de la imagen indica 10 μ m. (b) Cuantificación del número de células *Mmp24* WT o *Mmp24* KO nestina-positivas e infectadas con la construcción Lent-GFP o Lent-GFP-MT5, adheridas a la monocapa de células NCad-L929 en relación al número de campos rastreados de la preparación. En la gráfica se muestran los resultados en comparación a los valores obtenidos con las células *Mmp24* KO. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

2.3. La generación y mantenimiento de las células B-GFAP+ es independiente de la actividad de MT5

Es interesante resaltar que el déficit de MT5 no provoca alteraciones significativas en el tamaño o la citoarquitectura del nicho, manteniéndose la distribución de las rosetas aparentemente inalterada (**Figura 33 a**) y conservándose el mismo número de células B-GFAP+ que en los ratones *Mmp24* WT ($7.94 \pm 1.01\%$ en los ratones *Mmp24* KO y $8.17 \pm 0.85\%$ en los *Mmp24* WT, respecto al número total de células; $n=10$ y $n=13$, respectivamente; la SEZ de los dos genotipos presenta el mismo tamaño). El cultivo *in vitro* de homogenados de SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO, generaba el mismo número de neuroesferas

primarias, lo que indicaba que el reservorio de células B-GFAP⁺ en los *Mmp24 KO* se mantenía y era capaz de proliferar con normalidad tras la disgregación y extracción del nicho (**Figura 33 b**).

Considerando que las uniones N-cadherina están implicadas en la regulación de la proliferación de las células B-GFAP⁺, y dado que MT5 es una metaloproteasa presente en el nicho capaz de romper las uniones de NCad, nos propusimos investigar los efectos de la falta de actividad de MT5 en la regulación de la quiescencia de las células B-GFAP⁺.

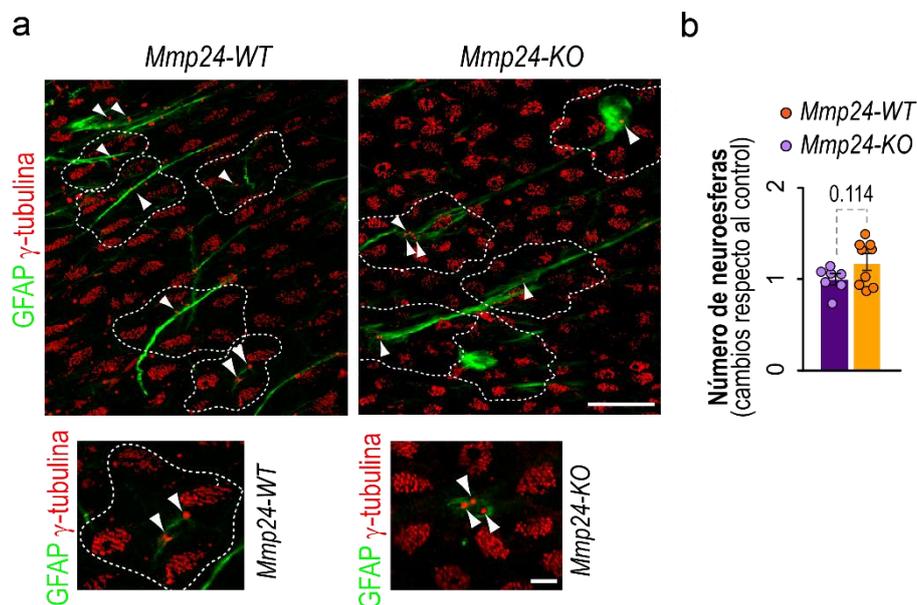


Figura 33. El déficit de MT5 no altera la citoarquitectura del nicho neurogénico. (a) Imágenes de confocal de la GFAP y la γ -tubulina en preparaciones *in toto* de SEZ de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO*. Arriba: Visión general de la superficie ventricular de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO*. Las flechas blancas y la línea blanca punteada indican las rosetas presentes en la imagen. Abajo: Imagen aumentada de una roseta, indicando con una flecha blanca el cilio corto de las células B-GFAP⁺ que conforman cada roseta. Las barras de escala de las figuras de arriba corresponden a 15 μ m y las barras de escala de las imágenes ampliadas corresponden a 5 μ m. (b) Cuantificación del número de neuroesferas primarias generadas a partir de homogenados de SEZ de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO*. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

2.4. MT5 regula la activación de las células B-GFAP⁺ en condiciones fisiológicas y de regeneración

Con el propósito de averiguar si la quiescencia de las células B-GFAP⁺ se ve afectada por los niveles de MT5, ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* se inyectaron con CldU, una inyección cada 2 horas durante un período total de 12 horas hasta un total de 7 inyecciones y fueron sacrificados tras 28 días de la inyección. Una hora antes del sacrificio, los ratones recibieron una única inyección de IdU para identificar las células en fase S (Maslov et al., 2004) (**Figura 34 a**). Esta doble inyección de análogos de timidina, nos permite estimar el

número de CldU-LRCs, el número de células proliferativas IdU+ y el número de LRCs que han entrado en ciclo tras 28 días CldU+/IdU+ LRC.

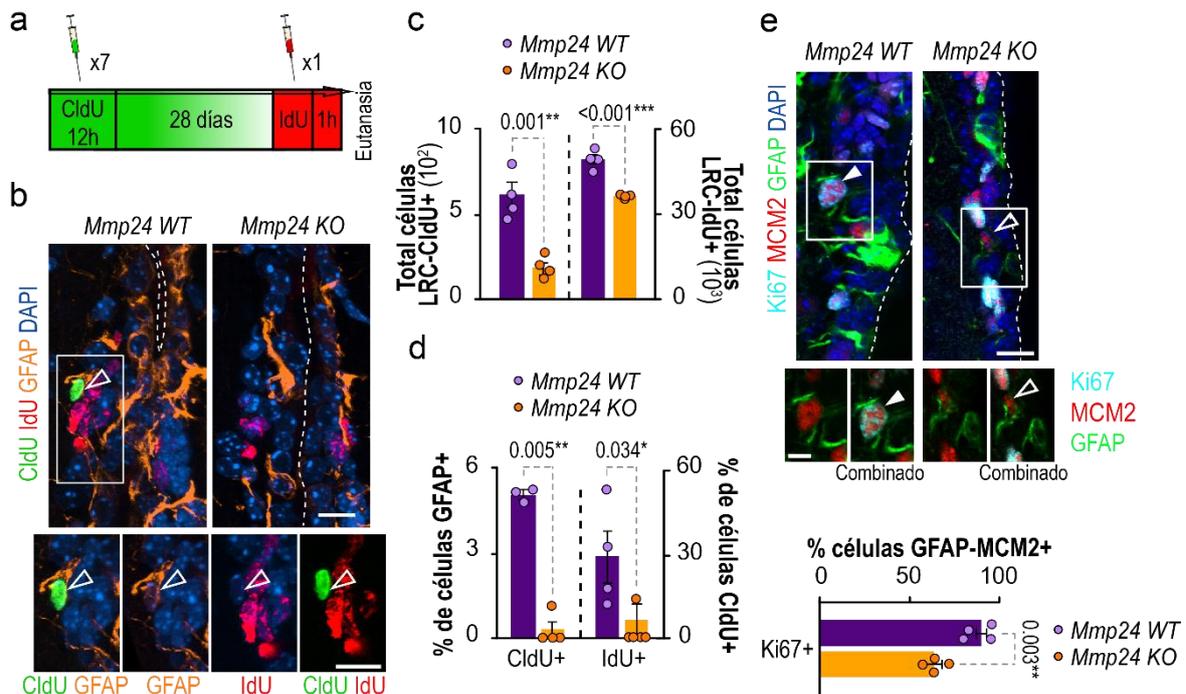


Figura 34. La actividad de MT5 promueve la activación de las células B-GFAP+. (a) Esquema de la inyección de análogos de timidina, CldU e IdU, realizada en ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO para el análisis de la proliferación celular de la SEZ. (b) Imágenes de una inmunohistoquímica frente a CldU, IdU y GFAP, realizada en la SEZ de cortes coronales de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el ventrículo. La punta de flecha muestra una célula GFAP+CldU+ pero negativa para IdU. El DAPI marca el núcleo celular de todas las células presentes en la SEZ del corte coronal muestreado. La barra de escala superpuesta en la imagen indica 10 μ m. (c) Cuantificación del número total de células CldU+ LRC e IdU+ presentes en la SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO, siguiendo la fórmula de Cavalieri. (d) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+ capaces de retener la marca de CldU (GFAP-CldU+) y también de las células LRC capaces de volver a entrar en ciclo (CldU+IdU+), respecto al número total de células muestreadas, en ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO. (e) Arriba: Inmunohistoquímica frente a GFAP, Ki67 y MCM2, en cortes coronales de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO. La línea blanca punteada indica el límite entre la SEZ y el ventrículo. La punta de flecha rellena de color blanco, indica una célula triple positiva, mientras que la punta de flecha blanca vacía, muestra una célula GFAP+MCM2+ pero negativa para Ki67. El DAPI marca el núcleo celular de todas las células presentes en la SEZ del corte coronal muestreado. La barra de escala indica 10 μ m. Centro: Amplificación de la imagen que aparece en el recuadro. Abajo: Cuantificación del porcentaje de células GFAP+MCM2+ que expresan Ki67. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado. **p<0,01.

Los ratones *Mmp24* KO presentaron menos proliferación en la SEZ, dado que el número total de células CldU+-LRC o IdU+ de la SEZ disminuye un 50% y un 20%, respectivamente, en comparación a los ratones *Mmp24* WT (Figura 34 b, c). Además, la proporción de células CldU+-LRC que entran de nuevo en ciclo también se veía alterada, reduciéndose un 75% en los ratones *Mmp24* KO (Figura 34 d). Por lo tanto, estos datos parecían indicar que la falta de MT5, promueve la quiescencia celular del nicho. A continuación, quisimos estudiar si esta quiescencia afectaba a la población de células B-

GFAP+. La proporción de estas células respecto al número total de células de la SEZ, no se veía afectada en los ratones *Mmp24 KO* ($7.94\% \pm 1.01$ en ratones *Mmp24 KO*, $n=10$, respecto a un $8.17\% \pm 0.85$ en los *Mmp24 WT*, $n=13$); sin embargo, disminuía la proporción de células B-GFAP+ capaces de retener la marca de CldU (**Figura 34 d**), indicando de nuevo que podrían tener el ciclo celular más lento o retenido. Para estudiar con más detalle los efectos sobre el ciclo celular de las células B-GFAP+, se realizaron análisis inmunohistoquímicos frente a MCM2 (del inglés *minichromosome maintenance*), Ki67 y GFAP. El MCM2 está presente durante todas las fases del ciclo celular (Maslov et al., 2004); sin embargo, Ki67 se expresa durante la fase G1 tardía, la fase S y G2-M, pero no la G1 temprana/G0. Los recuentos realizados indican que las células GFAP+ de los ratones *Mmp24 KO* tienen el ciclo celular retenido en G0-G1 temprano (**Figura 34 e**).

Para comprobar el efecto de los niveles de MT5 sobre el ciclo celular, se infectaron neuroesferas de ratones *Mmp24 KO* con partículas lentivirales Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. La sobreexpresión de MT5 promovía la salida de la fase G0/G1 y la entrada en la fase S (**Figura 35**). Por tanto, estos datos corroboraban que el déficit de MT5 promueve la retención de las células B-GFAP+ en la fase G0/G1 del ciclo celular.

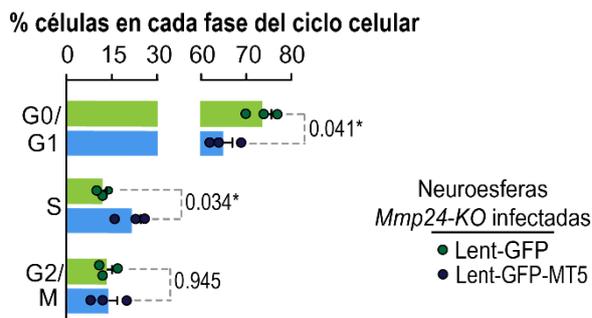


Figura 35. El déficit de MT5 promueve la quiescencia de las células *in vitro*. (a) Porcentajes de las fases del ciclo celular en la que se encuentran células *Mmp24 KO* tras la infección con el lentivirus Lent-GFP o Lent-GFP-MT5. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

Con el fin de averiguar si el fenotipo de los ratones *Mmp24 KO* estaba relacionado funcionalmente con el aumento observado en los niveles de la N-cadherina se llevaron a cabo infusiones intraventriculares con mini-bombas osmóticas del anticuerpo bloqueante EC-NCad o de una inmunoglobulina control, en ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* (**Figura 36 a**). La población de células GFAP+ presentes en la SEZ de ratones *Mmp24 KO*, tienen su ciclo alterado, presentando una aparente retención en G0-G1 temprana y la proporción de células GFAP+Ki67+ está reducida. Sin embargo, tras la infusión intraventricular de EC-NCad, el estado proliferativo de las células GFAP+ se activa, alcanzando los niveles de activación encontrados en los ratones *Mmp24 WT* (**Figura 36 b**). Estos experimentos

indicaban que MT5 participa en la regulación de la quiescencia de las células B-GFAP+, a través de la modulación de las uniones por N-cadherina del nicho.

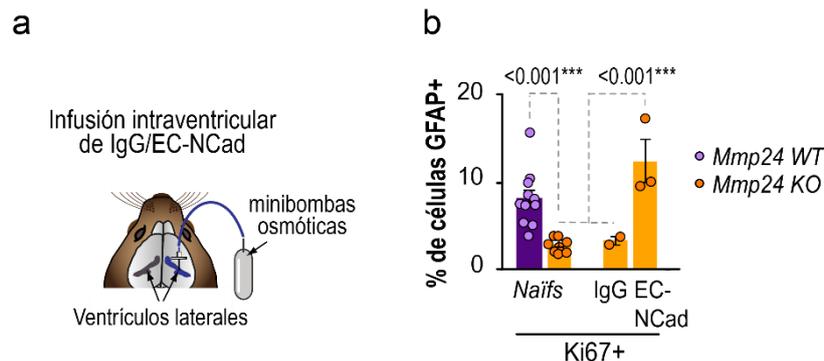


Figura 36. MT5 regula la N-cadherina *in vivo*. (a) Esquema representativo de la infusión de IgG o EC-NCad, mediante mini-bombas osmóticas, en el ventrículo de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO*. (b) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+ que expresan Ki67 tras la infusión de IgG o EC-NCad. Las barras corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

Para corroborar la hipótesis de que MT5 participa en la regulación de la activación de las células B-GFAP+ a través de la modulación de las uniones por N-cadherina, estudiamos el papel de MT5 en un modelo de regeneración, basado en la infusión del antimitótico AraC en la superficie cerebral de ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* durante 6 días. La acción del AraC durante este período de tiempo permite eliminar de la SEZ a todas las células proliferativamente activas, como los TAPs Mash1+ o los neuroblastos DCX+, permaneciendo en el nicho únicamente los endimocitos y las células B quiescentes. Tras 12-24 h de la retirada de la bomba y por tanto, del cese de la liberación de la droga, la población de células B-GFAP+ remanentes se activa y hasta alcanzar la regeneración completa de la zona (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Nam y Benezra, 2009; Pastrana et al., 2009).

En primer lugar, comprobamos la eficacia del antimitótico mediante un análisis inmunohistoquímico frente a Ki67 y DCX, en cortes coronales de todos los ratones *Mmp24 WT* y *Mmp24 KO* infundidos con salino o AraC. Tras la retirada de las bombas, todos los ratones empleados en el ensayo mostraron una caída de la población Ki67+ y la población de neuroblastos DCX+ estaba completamente ausente (datos no incluidos). A continuación, evaluamos los niveles de N-cadherina presentes en las células madre B-GFAP+ remanentes en el nicho. Tras la retirada de la bomba (t=0 h), las células madre B-GFAP+ mostraban una marca de N-cadherina muy intensa y homogénea; sin embargo, esta señal disminuye tras las 12 y 24 h de la retirada de la droga (**Figura 37 a, b**). Estos resultados vuelven a poner de

manifiesto la correlación inversa entre los niveles de N-cadherina y la activación mitogénica de las células B-GFAP+.

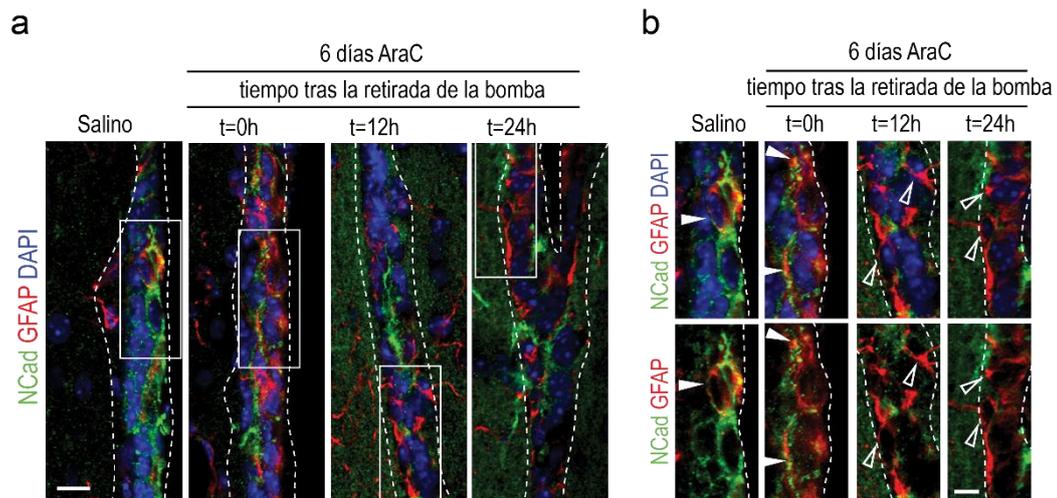


Figura 37. Expresión de N-cadherina en células B-GFAP+, a diferentes tiempos tras una infusión intracerebral con AraC. (a) Inmunohistoquímica frente a GFAP y NCad en cortes coronales de ratones infundidos con AraC o salino en la superficie del cerebro, y sacrificados a diferentes tiempos tras la retirada de la droga. **(b)** Ampliación de los recuadros que aparecen en **(a)**. Las líneas blancas punteadas indican los límites de la SEZ. Las puntas de flecha blancas indican células B-GFAP+ enriquecidas en N-cadherina justo en el momento de la retirada de la droga (t=0 h). El DAPI marca el núcleo celular de todas las células. Las puntas de flecha huecas indican células B-GFAP+ que han perdido la expresión de la N-cadherina tras 12-24 h de la retirada de la droga. La barra de escala en **a** es de 10 μm , y en **b** corresponde a 5 μm .

Las células proliferantes (Ki67+) residentes en la SEZ, se ven drásticamente disminuidas con la infusión del antimitótico, pasando de un 29.86 % \pm 3.08 a un 9.27 % \pm 1.02 en los *Mmp24 WT* y de un 22.88 % \pm 2.49 a un 8.82 % \pm 0.23 en los *Mmp24 KO*, en salino y t=0 h respectivamente. El tratamiento de AraC no afecta a las células madre que se mantienen en un estado más quiescente, pero las células madre proliferativamente más activas (GFAP-Ki67+) son eliminadas con la droga (**Figura 38 a, b**). Sin embargo, en los ratones *Mmp24 KO*, la población GFAP+Ki67+ no se veía afectada, posiblemente debido a que su ciclo celular está retenido en G1 y por tanto, hay menos células GFAP+ que atraviesan la fase S durante el periodo de tratamiento con la droga.

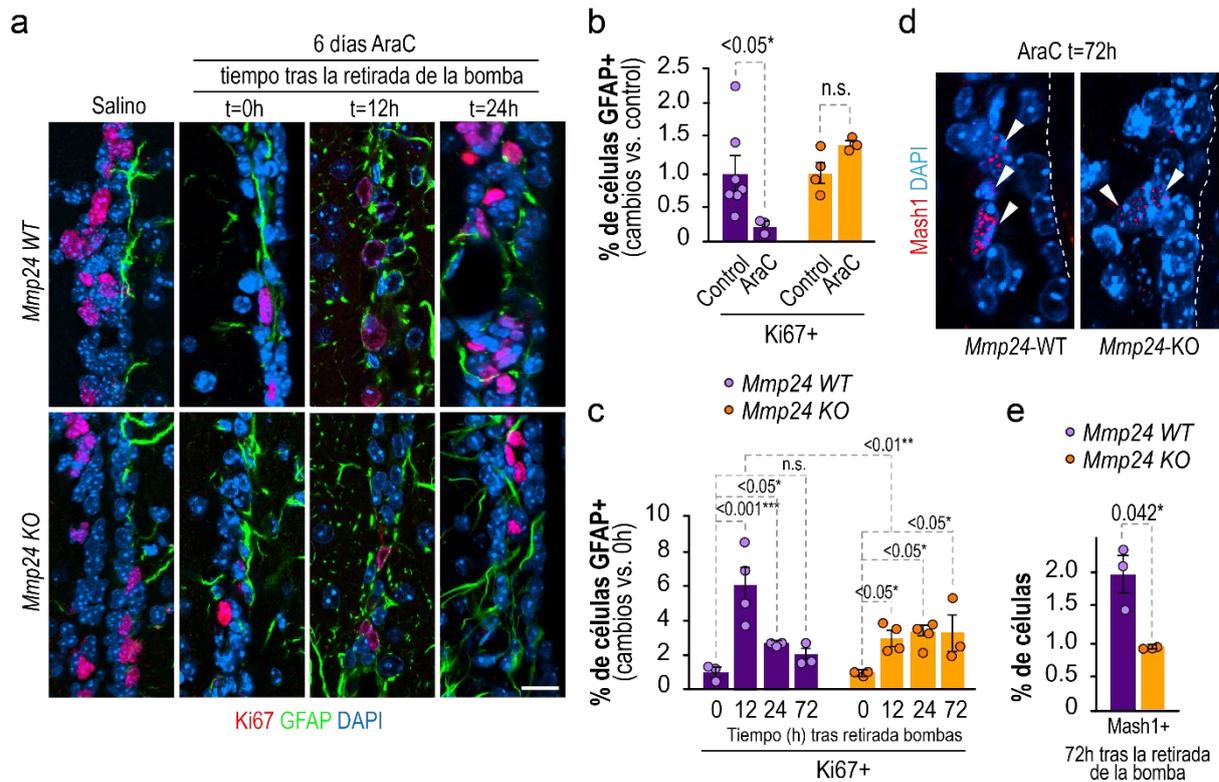


Figura 38. MT5 regula la activación de las células B-GFAP+ en regeneración. (a) Inmunohistoquímica frente a Ki67 y GFAP en cortes coronales de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO, infundidos durante 6 días con bombas miniosmóticas cargadas con AraC o salino, y sacrificados a distintos tiempos tras la retirada de las bombas. La barra de escala corresponde a 10 μ m. (b) Cuantificación de la población GFAP+Ki67+ presente en ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO, infundidos durante 6 días con AraC o salino, y sacrificados tras la retirada de las bombas (t=0 h). Datos normalizados a la condición control (salino) de cada genotipo. (c) Cuantificación de la población GFAP+Ki67+ presente en la SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO a distintos tiempos tras el tratamiento antimitótico. Datos normalizados respecto al t=0 h de cada genotipo. (d) Inmunohistoquímica frente a Mash1 en cortes coronales de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO tras 72 h de la infusión con AraC. El DAPI marca el núcleo celular de todas las células presentes. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el ventrículo. Las puntas de flecha blancas apuntan a células Mash1 positivas. La barra de escala corresponde a 10 μ m. (e) Cuantificación del porcentaje de células Mash1+ presentes en la SEZ de ratones *Mmp24* WT y *Mmp24* KO tras 72 h de la infusión con AraC. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

Poco tiempo después de la retirada de las bombas y el cese del tratamiento con AraC (12 h), las células madre B-GFAP+ de los ratones *Mmp24* WT sufren un aumento en su activación de casi 7 veces. Luego, y a medida que aumenta el tiempo tras la retirada de la bomba, los niveles de activación van disminuyendo gradualmente, pasando una activación casi 3 veces mayor a las 24 h y a una normalización a las 72 horas, probablemente debido a que la mayoría de células TAP ya se han regenerado (Doetsch et al., 1999b). Sin embargo, la activación que sufren las células B-GFAP+ presentes en la SEZ de los ratones *Mmp24* KO, es más leve, no llega a ser 3 veces superior a las 12 h respecto al momento de la retirada de las bombas. Lo curioso, es que en el caso de los ratones *Mmp24* KO, la activación de las células B-GFAP+ sigue aumentando moderadamente, alcanzando a las 72 h niveles 3-4

veces superiores a los encontrados tras la retirada de las bombas, pero sin llegar a alcanzar los niveles encontrados en los *Mmp24* WT (**Figura 38 c**). Así mismo, los ratones *Mmp24* KO no generaban tantos TAPs Mash1+ como los *Mmp24* WT; un 50% menos tras 72 h de la retirada de la droga (**Figura 38 d, e**). Todos estos datos indican que los niveles de N-cadherina disminuyen tras la retirada de la bomba, momento en el que se produce más activación en la zona, y que el déficit de MT5, promueve la retención en fase G0-G1 del ciclo celular de las células B-GFAP+, lo cual implica una restringida capacidad para generar nueva descendencia y poder hacer frente a un proceso regenerativo. Por lo tanto, MT5 forma parte del mecanismo que regula el estado proliferativo de las NSCs, cuando las células se activan endógenamente para iniciar procesos regenerativos.

3. Regulación de la proteólisis de N-cadherina por elementos del nicho neurogénico: papel de ADAM10 y la molécula secretada sFRP-1

3.1. ADAM10 regula la adhesión de las células B-GFAP+ mediada por N-cadherina

La disintegrina y metaloproteasa ADAM10, es una de las proteasas más estudiadas y abundantes del cerebro adulto. En el SNC se ha relacionado con importantes eventos biológicos como la plasticidad sináptica, la neuroprotección, la migración o la proliferación celular (Vincent y Checler, 2012; Kuhn et al., 2016; Endres y Deller, 2017) y su expresión se ha descrito en algunas regiones neurogénicas como el cerebelo, el hipocampo, el córtex, la SEZ o el OB (Karkkainen et al., 2000; Guo et al., 2016). Al igual que hemos demostrado con la metaloproteasa MT5, la expresión de ADAM10 se ha descrito en células de la SEZ de ratones adultos y se ha demostrado que la N-cadherina es diana de su actividad enzimática en neuronas (Uemura et al., 2006; Demars et al., 2011; Lo Sardo et al., 2012), dos hechos que la convierten en una excelente candidata para formar parte del mecanismo de regulación de la proliferación de las células B-GFAP+ de la SEZ. Análisis por RT-PCR semicuantitativa a partir de ARN extraído de neuroesferas de ratones C57BL/6J, confirmaron que las células residentes en el nicho expresan ADAM10 (**Figura 39 a**). A continuación, quisimos corroborar la modulación de las uniones N-cadherina de las células B-GFAP+ por ADAM10 y comprobar si dicha regulación podría tener implicaciones biológicas en su adhesión al nicho. Con este objetivo, modulamos la actividad enzimática de ADAM10 con el fármaco GI254023X (GIX) en cultivos de neuroesferas. El inhibidor farmacológico GIX se ha usado sobre neuronas, progenitores neurales de corteza y células ganglionares de la retina, con el

fin de inhibir el procesamiento proteolítico del dominio extracelular de proteínas como L1, N-cadherina o Notch1, reconocidos sustratos de ADAM10 (Muraguchi et al., 2007; Lo Sardo et al., 2012; Marcos et al., 2015). Debido a que es un fármaco ampliamente usado en la bibliografía y que posee elevada especificidad de inhibición, hasta 100 veces más potente inhibiendo la actividad de ADAM10 respecto a otras proteínas de la familia de las disintegrinas (Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005), lo usamos para bloquear la actividad enzimática de ADAM10 en células procedentes de la SEZ de ratones C57BL/6J. Los tratamientos se realizaron durante 2 días con GIX a 50 μ M o con el vehículo DMSO como condición control. El análisis densitométrico reveló que los niveles de la proteína N-cadherina completa (FL-NCad) aumentaban tras el tratamiento con GIX, lo que indicaba que ADAM10 está participando en la proteólisis de N-cadherina presente células madre procedentes de la SEZ (**Figura 39 b**). A continuación se realizaron ensayos *in vitro* de adhesión celular, para analizar los efectos de la regulación del corte de la N-cadherina y su relevancia funcional en las células B-GFAP+. Células obtenidas de ratones C57BL/6J tratadas con GIX a 50 μ M o con DMSO durante 2 días fueron tratadas durante 1 h con el anticuerpo bloqueante EC-NCad a 50 μ g/ml o bien con IgGs no relevantes, como control del ensayo. Tras el tratamiento, las células se sembraron sobre una monocapa de células NCad-L929 previamente establecidas. Para poder identificar a las células procedentes de la SEZ y no confundirlas con las células NCad-L929, se marcaron con un trazador celular, el DDAO-SE que emite fluorescencia en la franja del rojo lejano. Al igual que hemos visto anteriormente, cuando se bloquean las uniones N-cadherina, las células madre GFAP+ son las principales afectadas (**Figura 17 b**), y la adhesión sobre las células NCad-L929 se vio disminuida. En este caso, y reproduciendo datos previos, pudimos observar menos células DDAO-SE+ adheridas sobre la monocapa de NCad-L929 tras el tratamiento con el anticuerpo bloqueante EC-NCad. Cuando tratamos las células DDAO-SE+ con el fármaco GIX, se promovía la adhesión celular específicamente mediada por uniones N-cadherina, ya que el tratamiento posterior con EC-NCad bloqueaba los niveles de adhesión en ambos casos (**Figura 39 c**).

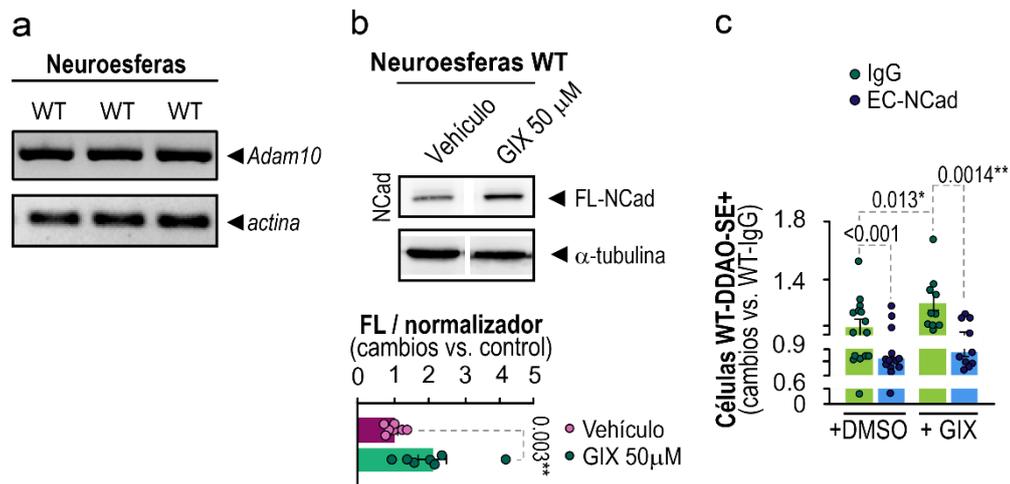


Figura 39. La N-cadherina es un sustrato de la proteasa ADAM10 en las células de la SEZ. (a) Imagen representativa de los niveles relativos de ARNm del gen *Adam10*, normalizados a los niveles del gen endógeno β -actina, de una PCR semicuantitativa con ARN extraído de neuroesferas cultivadas 3 días. (b) Arriba: Inmunoblot representativo frente a NCad en neuroesferas tratadas durante 2 días con el fármaco GIX o DMSO como control del ensayo (vehículo). El control de carga usado es la α -tubulina. Abajo: Cuantificación por densitometría de los niveles de N-cadherina (FL-NCad), en relación a la cantidad de carga de proteína total (α -tubulina). (c) Cuantificación del número de células marcadas con el trazador celular DDAO-SE, adheridas a la monocapa de células NCad-L929 respecto al área rastreada de la preparación. En la gráfica se muestran los resultados respecto a los valores obtenidos con las células tratadas con IgGs no relevantes. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

3.2. La proteína sFRP-1 es un factor de nicho y regula la actividad de ADAM10

Recientemente, se ha postulado que la proteína sFRP-1 es capaz de interactuar directamente con el dominio catalítico de ADAM10, ejerciendo una inhibición por competición directa con los sustratos diana de ADAM10 (Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015). La regulación negativa que ejercen las proteínas sFRP sobre la vía de Wnt, a través del dominio CRD (*Cysteine-rich domain*), ha sido ampliamente estudiada y consolidada. La proteína sFRP-1 posee un dominio NTR (*Netrin-related domain*), similar al que presentan proteínas como los TIMPs (inhibidores de metaloproteasas; del inglés *Transmembrane Inhibitor MetalloProteinase*), reconocidos inhibidores de ADAM10 (Amour et al., 2000; Hoe et al., 2007). Por otro lado, cerca del dominio catalítico de ADAM10 se localiza un dominio rico en cisteínas, mediante el cual, ADAM10 interactúa con sus sustratos. El hecho de que este dominio se sitúe cerca del dominio catalítico, posibilita la proteólisis de los sustratos con los que contacta (Edwards et al., 2008). Por lo tanto, se ha propuesto un modelo en el que el dominio NTR de sFRP-1 interactúa con el dominio rico en cisteínas de ADAM10, aproximándolo al dominio catalítico de ADAM10 y permitiendo su acción inhibitoria (Esteve et al., 2011). Durante el desarrollo neurogénico de la retina, se produce una interacción directa entre sFRP-1 y la proteasa ADAM10, ocasionando su inhibición y la

regulación indirecta de las uniones adherentes por N-cadherina y L1 (Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015).

Desde el punto de vista de la regulación dinámica de las uniones de N-cadherina en la SEZ, la posibilidad de que un factor soluble pudiera comportarse como un regulador de la actividad de las NSCs, nos planteó una serie de preguntas biológicas que quisimos abordar experimentalmente. En primer lugar, analizar si sFRP-1 podría ser y actuar como un factor de nicho; en segundo lugar, comprobar si sFRP-1 inhibe la actividad enzimática de ADAM10 en las NSCs adultas como lo hace en la retina en desarrollo y tiene efectos sobre la modulación de las uniones por N-cadherina; y, por último, si está implicada en el mecanismo de regulación de la quiescencia de las células B-GFAP+ y en los procesos de neurogénesis adulta.

La expresión de sFRP-1 durante el desarrollo embrionario es muy abundante en todo el cerebro, localizándose en regiones neurogénicas como las eminencias ganglionares, el hipocampo o el epitelio olfativo (Leimeister et al., 1998; Kim et al., 2001; Trevant et al., 2008). Durante la etapa adulta, la expresión de sFRP-1 se mantiene en la corteza, el hipocampo, el OB, los plexos coroideos y la SEZ principalmente, siendo mucho más abundante en los tres últimos (*ISH Data: Allen Brain Atlas; <http://mouse.brain-map.org/gene/show/20140>*). Mediante RT-qPCR, nuestro análisis de expresión del ARNm del gen *Sfrp1* reveló que la mayor fuente de producción de sFRP-1 son los plexos coroideos y el propio nicho subependimario. Dado que los niveles de expresión en neuroesferas, respecto a los obtenidos en el nicho neurogénico, casi se triplican, indican que sFRP-1 podría expresarse también en NSCs (**Figura 40 a**). Mediante análisis inmunohistoquímicos pudimos determinar que la población de células GFAP+ residentes en la SEZ, de hecho, expresaban sFRP-1 de forma abundante, por lo que sFRP-1 podría desempeñar un papel relevante como factor de nicho y autocrino en la SEZ adulta (**Figura 40 b**).

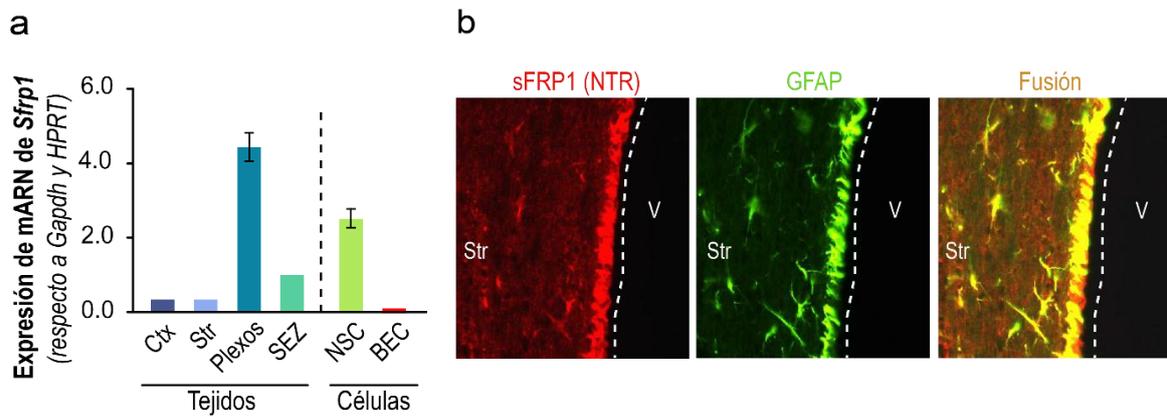


Figura 40. sFRP-1 se expresa abundantemente en la SEZ y plexos coroideos. (a) Cuantificación por RT-qPCR del ARNm del gen *Sfrp1* en muestras de tejido. Datos normalizados en relación a los genes endógenos *Gapdh* y *HPRT* y representados en relación a la expresión en la SEZ. Ctx: córtex; Str: estriado; SEZ: zona subependimaria; NSC: células aisladas de la SEZ de ratones *C57BL/6J* y cultivadas durante 3 días en medio de neuroesferas; BEC: células endoteliales obtenidas de cerebro de ratones adultos (del inglés *Brain Endothelial Cells*). (b) Inmunofluorescencia frente al dominio NTR de sFRP-1 y GFAP en cortes coronales de SEZ de ratones control. La línea blanca punteada indica el límite del nicho subependimario con el lumen del ventrículo. Str: estriado; V: ventrículo lateral. (b) Imágenes cedidas por las Dras. Paola Bovolenta y Pilar Esteve (CBM-CSIC, Madrid).

Se ha descrito ampliamente la actuación de las sFRP como antagonistas de la ruta de señalización Wnt, mediante el secuestro de las proteínas Wnt por interacción directa, impidiendo que éstas interaccionen con los receptores de membrana Frizzled y/o LRP5/6 e inicien la ruta de señalización mediada por la β -catenina (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Xu et al., 1998). Sin embargo, recientemente se ha postulado una nueva función para la sFRP-1, la inhibición de la proteasa ADAM10 por contacto directo con su extremo NTR (Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015). Para poder corroborar y testar la potencia de inhibición de una proteína recombinante de sFRP-1 (rsFRP-1) de origen murino sobre la actividad enzimática de ADAM10, utilizamos un ensayo fluorimétrico comercial que incorpora un sustrato diseñado con la técnica FRET (Förster Resonance Energy Transference), capaz de emitir fluorescencia únicamente tras el corte por una ADAM10 recombinante de origen humano (rhADAM10). Para estudiar el potencial de sFRP-1 como inhibidor de ADAM10, utilizamos un sFRP-1 recombinante de origen murino (rsFRP-1; Yu et al., 2014) y, como control positivo del ensayo fluorimétrico, usamos el inhibidor farmacológico GIX, ampliamente documentado y específico de ADAM10. En la **Figura 41**, podemos observar que la acción inhibitoria del fármaco GIX es dosis dependiente. Conseguimos inhibir un 100% la actividad enzimática del rhADAM10 con concentraciones iguales o superiores de GIX a 5 μ M. La proteína recombinante rsFRP-1 añadida al ensayo a 10 μ g/ μ l (Rodríguez et al., 2005; Kele et al., 2012; Schwartz et al., 2012) fue capaz de inhibir

un 10% de la actividad de ADAM10. Por lo tanto, sFRP-1 es un factor de nicho capaz de inhibir la actividad enzimática del ADAM10.

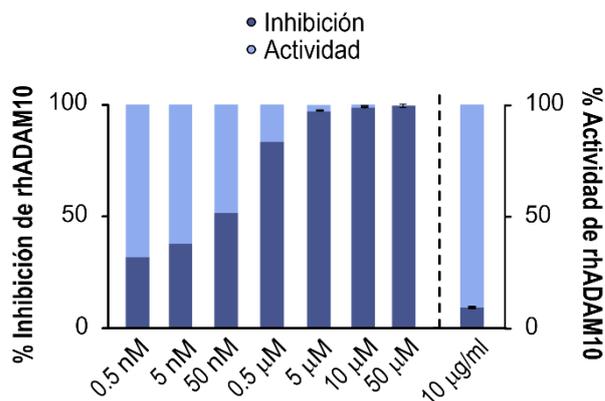


Figura 41. La proteína sFRP-1 inhibe la actividad enzimática del rhADAM10. El porcentaje de inhibición generado sobre la actividad enzimática del rhADAM10 se indica mediante las barras azul oscuro, y la actividad enzimática remanente del rhADAM10, con barras azul claro. Izquierda: La inhibición de ADAM10 es dependiente de la dosis de fármaco GIX administrada (azul oscuro). El efecto inhibitorio de GIX es total a partir de concentraciones iguales o superiores a 5 μM. Derecha: La proteína recombinante rsFRP-1 a 10 μg/μl, es capaz de inhibir un 10% la actividad de rhADAM10.

3.3. La proteína sFRP-1 regula las uniones adherentes por N-cadherina en el nicho neurogénico

Para averiguar si la inhibición de sFRP-1 sobre el ADAM10 endógeno tiene relevancia biológica sobre las uniones adherentes de N-cadherina, se realizaron ensayos de pérdida de función. Los experimentos se llevaron a cabo mediante el uso de ratones con una deleción de la metionina que inicia la pauta de lectura y del exón 1 del gen *Sfrp1*, impidiendo así su expresión (*Sfrp1 KO*; Satoh et al., 2006). Dado que nuestro objetivo era estudiar la implicación de sFRP-1 en la regulación de las uniones de N-cadherina, a través de la modulación de la actividad proteolítica de ADAM10, en primer lugar quisimos comprobar si la modulación de los niveles de sFRP-1 inducía cambios de expresión en los genes que codifican para las proteínas N-cadherina y ADAM10. Mediante análisis de qRT-PCR, a partir de muestras de ARN extraídas de células *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO* cultivadas *in vitro*, vimos que el déficit de sFRP-1 (**Figura 42 a**) no cambia los niveles de expresión del ARNm de los genes *Cdh2* o *Adam10* (**Figura 42 b, c**). Por otro lado, sFRP-1 se ha descrito en la bibliografía principalmente como un inhibidor de la vía de Wnt, capaz de secuestrar los ligandos Wnt del medio extracelular, evitando así que puedan interactuar con los receptores Frizzled y LRP5/6. De este modo, se promueve la formación de un complejo multiproteico citoplásmico, formado por Axin2 y GSK3β, encargado de degradar la β-catenina citosólica e inhibir la activación transcripcional de los genes diana de la vía de Wnt (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Xu et al., 1998). Para comprobar si la vía de Wnt está alterada en células *Sfrp1 KO* cultivadas *in vitro*, analizamos la expresión del ARNm del gen *Ccnd1*, que codifica para la ciclinaD1, uno de los genes diana de la activación de la vía de

Wnt. Los datos de la qRT-PCR, a partir de muestras de ARN extraídas de células *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO cultivadas *in vitro*, indicaban que la vía de Wnt no está afectada en las NSCs de ratones *Sfrp1* KO (**Figura 42 d**). El déficit de sFRP-1 no estaba alterando los niveles de expresión del ARNm del gen que codifica para la proteína ADAM10 (**Figura 42 d**); sin embargo, los análisis enzimáticos realizados con la proteína recombinante rsFRP-1 indicaban que sFRP-1 es un inhibidor de la actividad de ADAM10 (**Figura 41**). Se ha descrito la actividad proteolítica de ADAM10 sobre Notch, cuya proteólisis genera fragmentos intracelulares (NICD) que promueven la expresión de los genes *Hes5* o *Hes1*, implicados en la autorrenovación y el mantenimiento del estado indiferenciado de las NSCs (Andreu-Agullo et al., 2009; Aguirre et al., 2010). Para comprobar si el déficit de sFRP-1 inducía la activación de la vía de Notch, analizamos el ARNm de células *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO cultivadas durante 3 días mediante RT-qPCR. Nuestros datos indicaron que los niveles de sFRP-1 no alteran la vía de Notch en las NSCs.

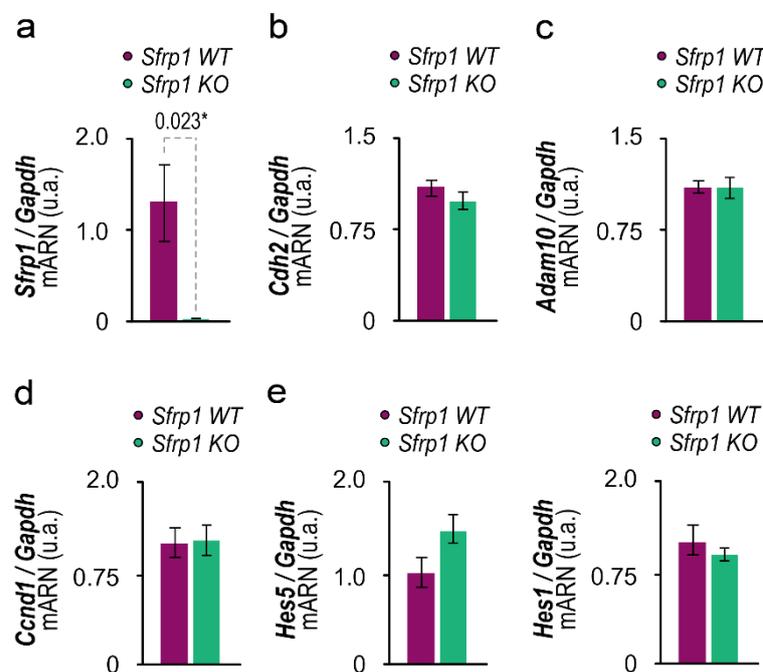


Figura 42. El déficit de sFRP-1 no altera la expresión del ARNm del gen *Cdh2* ni induce la activación de las vías de señalización Wnt y Notch. (a) Cuantificación de los niveles de ARNm del gen *sfrp1*. (b) Cuantificación de los niveles de ARNm del gen *Cdh2*, que codifica para la N-cadherina. (c) Cuantificación de los niveles de ARNm del gen *Adam10*. (d) Cuantificación de los niveles de ARNm del gen *Ccnd1*, que codifica para la ciclinaD1, gen diana de la activación de la vía de señalización Wnt. (e) Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes *Hes5* y *Hes1*, genes diana de la activación de la vía de Notch. Todos los datos mostrados han sido normalizados a los niveles del gen endógeno *Gapdh*, de una RT-qPCR con ARN extraído de neuroesferas *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO cultivadas durante 3 días. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m. (N=4)

Curiosamente, en extractos de proteína total de homogenados de tejido de SEZ no se observaron diferencias en los niveles de FL-NCad o en los niveles de los fragmentos generados (CTFint o CTF1; **Figura 43**).

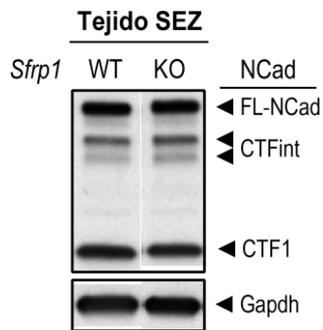


Figura 43. Niveles de N-cadherina en homogenados de SEZ. Inmunoblot representativo de los niveles de la FL-NCad y de los fragmentos intracelulares generados en muestras de homogenados de SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. El control de carga usado es la Gapdh. (N=3)

Sin embargo, en muestras de neuroesferas cultivadas durante 3 días, los ratones *Sfrp1* KO presentaban aumentados los niveles de los fragmentos CTFint1+2 y CTF1, un 98% y un 55%, respectivamente, en detrimento de los niveles de la FL-NCad, que disminuían un 44% (**Figura 44 a, b**). Estos datos nos vuelven a sugerir que sFRP-1 se expresa, probablemente, en una población pequeña de la SEZ, como es el caso de las células B-GFAP+ presentes en el nicho, y por eso no vemos cambios en los niveles de N-cadherina en extractos proteicos de homogenados de SEZ. El déficit de sFRP-1 promueve la proteólisis de N-cadherina, sin que ello implique cambios en los niveles de ARNm de *Cdh2* o *Adam10*. Por lo tanto, el descenso de los niveles de la FL-NCad y el aumento de los fragmentos intracelulares generados como consecuencia de la proteólisis, indica que la falta de sFRP-1 promueve la escisión de la N-cadherina, probablemente debido a un incremento en la actividad proteolítica de ADAM10.

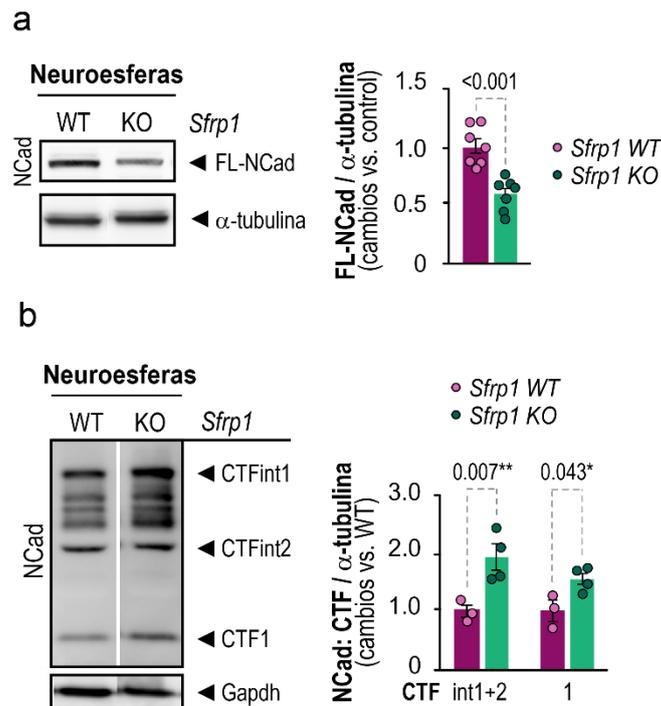


Figura 44. sFRP-1 modula los niveles de N-cadherina. (a) Izquierda: *Immunoblot* representativo de los niveles de la FL-NCad en muestras de neuroesferas procedentes de SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO y cultivadas durante 3 días. El control de carga usado es la α -tubulina. Derecha: Cuantificación por densitometría de los niveles de FL-NCad y normalizada a la cantidad de carga de proteína total (α -tubulina). Los datos se han representado respecto a los niveles encontrados en los ratones *Sfrp1* WT. (b) Izquierda: Imagen representativa de un *immunoblot* frente a NCad, donde se observan con claridad los fragmentos CTFint1, CTFint2 y CTF1. Las muestras de proteína total se obtuvieron a partir de neuroesferas de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO cultivadas durante 3 días. El control de carga usado es el *Gapdh*. Derecha: Cuantificación por densitometría de los niveles de los fragmentos CTFint1+2 y CTF1 y normalizados a la cantidad de carga de proteína total (α -tubulina). Los datos se han representado respecto a los niveles encontrados en los ratones *Sfrp1* WT. Las barras de datos de todas las gráficas mostradas, corresponden a la media \pm s.e.m y cada y cada punto corresponde a cada muestra biológica independiente analizada.

En las uniones adherentes, la N-cadherina está conectada con el citoesqueleto de actina a través de la interacción directa con la α -catenina, la β -catenina y las plakoglobulinas (Heuberger y Birchmeier, 2010). La β -catenina citosólica participa en la vía de señalización de Wnt (Heuberger y Birchmeier, 2010), al igual que la proteína sFRP-1, que interacciona con el ligando Wnt, causando la inhibición de la vía (Rodríguez et al., 2005; Kim et al., 2007; Trevant et al., 2008). El tratamiento de las células *Sfrp1* KO con rsFRP-1 a 10 μ g/ μ l durante 1 día, consiguió rescatar y recuperar los niveles basales de FL-NCad y de β -catenina (Figura 45). Por lo tanto, sFRP-1 está implicado la regulación de la escisión de las uniones de N-cadherina y promueve la retención de la β -catenina en la membrana plasmática.

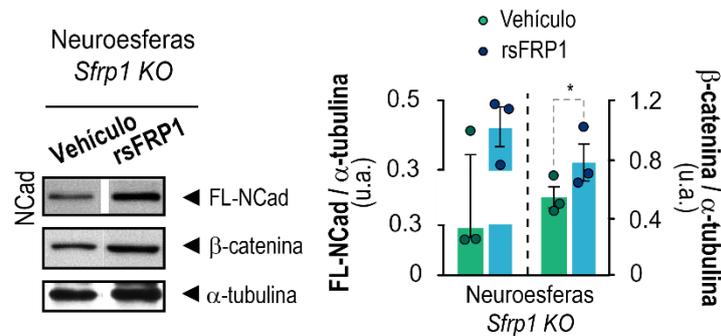


Figura 45. SFRP-1 incrementa los niveles de N-cadherina y β -catenina presentes en la membrana plasmática. Izquierda: *Inmunoblot* representativo de los niveles de la FL-NCad y de la β -catenina total en muestras de neuroesferas de ratones *Sfrp1 KO*. Las neuroesferas fueron tratadas con una proteína recombinante de sFRP-1 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o con PBS (vehículo), como control del ensayo, durante 24 h *in vitro*. Derecha: Cuantificación por densitometría de los niveles de FL-NCad o β -catenina y normalizados a la cantidad de carga de proteína total (α -tubulina). Las barras de datos de todas las gráficas mostradas, corresponden a la media \pm s.e.m y cada punto corresponde a muestras biológicas independientes para cada tratamiento. * $p < 0.05$.

Mediante estudios de adhesión celular, quisimos evaluar los efectos funcionales de los niveles de sFRP-1 sobre el corte de la N-cadherina. Neuroesferas procedentes de la SEZ de ratones *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO* se disgregaron mecánicamente, para preservar la N-cadherina intacta, se marcaron con el trazador celular DDAO-SE y se sembraron sobre una monocapa de células NCad-L929. Tras una hora de adhesión, se lavaron las preparaciones, para eliminar todas las células que no quedaron retenidas y se fotografiaron en el INCell Analyzer 2000 (**Figura 46 a**). El recuento y análisis de las muestras se llevó a cabo teniendo en cuenta el número de células DDAO-SE positivas y el área de monocapa de NCad-L929 rastreada. Para determinar la especificidad de la unión adherente mediada por N-cadherina, se trataron células *Sfrp1 WT*-DDAO-SE+ con el anticuerpo bloqueante EC-NCad o con la inmunoglobulina IgG, como control del ensayo, durante la hora previa a la adhesión sobre la monocapa de células NCad-L929. El tratamiento con el anticuerpo bloqueante EC-NCad disminuyó la adhesión celular, sugiriendo que las células se adhieren de forma específica mediante uniones tipo N-cadherina, igual que habíamos observado anteriormente. Por otro lado, las células *Sfrp1 WT*-DDAO-SE+, mostraron más capacidad, respecto a las células *Sfrp1 KO*-DDAO-SE+, para adherirse a la monocapa de células NCad-L929 (**Figura 46 b**). Cuando pre-tratamos células *Sfrp1 KO* con la proteína recombinante rsFRP-1 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 h *in vitro*, la adhesión se incrementó un 38%, consiguiendo rescatar el fenotipo observado en las células *Sfrp1 KO*. Para comprobar la especificidad del efecto observado sobre las uniones N-cadherina, células *Sfrp1 KO* tratadas con la proteína recombinante rsFRP-1 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 día, se trataron con EC-NCad una hora antes de la adhesión. El bloqueo de la N-cadherina disminuyó la adhesión celular provocada por el tratamiento

con sFRP-1, alcanzando de nuevo los niveles basales de adhesión observados en las células *Sfrp1 KO* sin tratar con el factor. Por lo tanto, nuestros datos revelan que sFRP-1 promueve la adhesión celular mediada por uniones homofílicas N-cadherina (**Figura 46 c**).

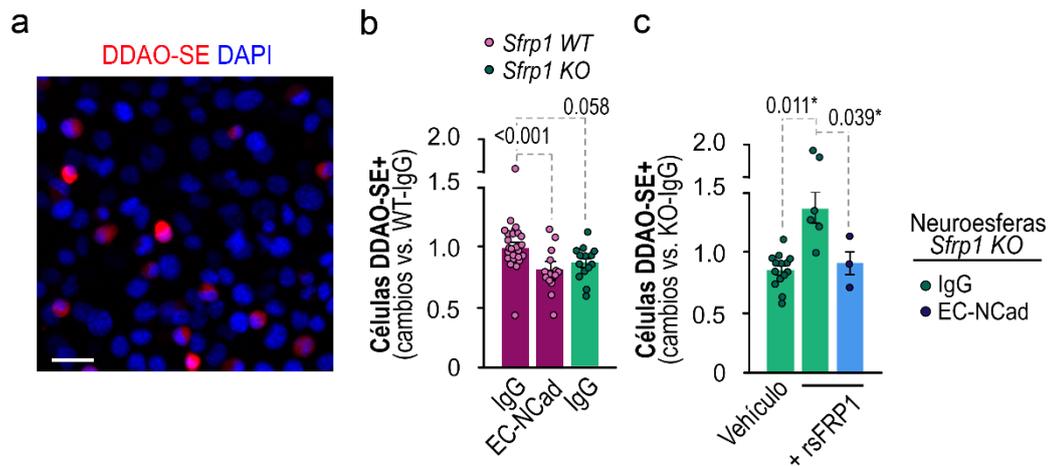


Figura 46. sFRP-1 regula las uniones adherentes tipo N-cadherina. (a) Imagen obtenida en el INCell Analyzer 2000 representativa de los ensayos de adhesión, en la que se observan células DDAO-SE+ adheridas sobre una monocapa de células NCad-L929 (DAPI). (b) Cuantificación del número de células *Sfrp1* WT o *Sfrp1* KO, marcadas con DDAO-SE, adheridas a la monocapa de células NCad-L929, normalizadas al área de monocapa rastreada. Los datos se representan respecto a los valores obtenidos con las células *Sfrp1* WT. (c) Cuantificación del número de células *Sfrp1* KO-DDAO-SE+ adheridas a la monocapa de células NCad-L929, tras un tratamiento con rsFRP-1 y un pretratamiento con IgG o EC-NCad. Los resultados han sido normalizados respecto al área de monocapa rastreada y representados respecto a los valores obtenidos con las células *Sfrp1* KO-DDAO-SE+ tratadas con IgG. Las barras de datos de las gráficas mostradas, corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto corresponde a cada muestra biológica independiente analizada.

Como hemos comprobado con anterioridad, que el bloqueo de las uniones de N-cadherina mediante las construcciones Lent-GFP-DN-CDH o Lent-GFP-MT5, puede generar alteraciones en la organización celular del nicho (**Figura 25 y 27**). Dado que sFRP-1 está implicado en la proteólisis de la N-cadherina, nos planteamos estudiar los efectos del déficit de sFRP-1 sobre los niveles de la N-cadherina y la citoarquitectura de la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. Dado que las células B-GFAP+, respecto a toda la superficie del ventrículo, ocupan una porción muy pequeña, y que no vimos diferencias en los niveles de N-cadherina en los extractos de proteína de la SEZ (**Figura 43**), no es de extrañar que no hayamos sido capaces de observar diferencias significativas en los niveles de N-cadherina de la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO en una tinción *in toto* (**Figura 47 a**). Por otro lado, los análisis de la citoarquitectura de la SEZ, se llevaron a cabo mediante una tinción *in toto* frente a N-cadherina, para detectar las membranas celulares y frente a GFAP, para localizar las rosetas que forman las células B-GFAP+ en el ventrículo.

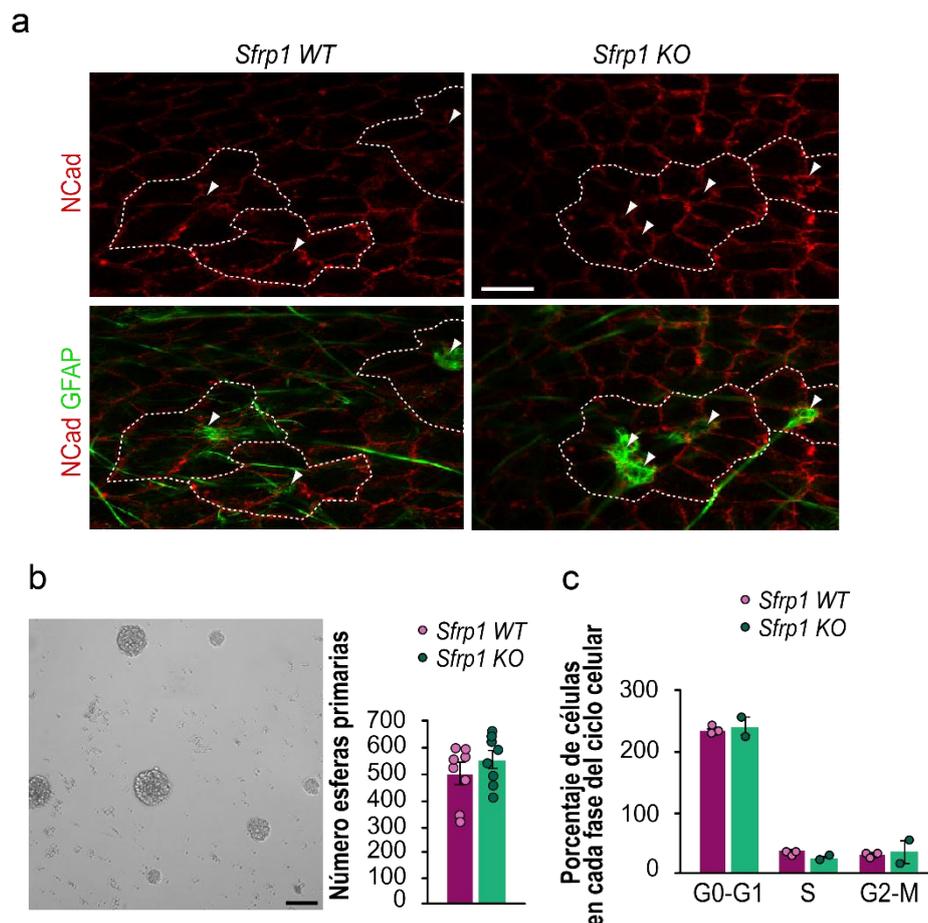


Figura 47. Los cambios en la expresión de sFRP-1 no comprometen la arquitectura tisular. (a) Imágenes de confocal de una tinción *in toto* frente a GFAP y NCad en preparaciones de SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. Las flechas y la línea blanca punteada indican las rosetas presentes en la imagen. La barra de escala corresponden a 30 μ m. (b) Izquierda: Imagen representativa de un cultivo primario de neuroesferas. La barra de escala equivale a 100 μ m. Derecha: Recuento del número de neuroesferas primarias generadas a partir de la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. (c) Porcentajes de las fases del ciclo celular en la que se encuentran células *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. Las barras de datos mostradas en las gráficas, corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto corresponde a cada ratón/cultivo analizado.

El déficit de la proteína sFRP-1 no alteraba tampoco la citoarquitectura del nicho subependimario y se mantiene la distribución de las rosetas en los ratones *Sfrp1* KO (Figura 47 a). Además, teniendo en cuenta que la densidad celular presente en la SEZ de ambos genotipos se mantiene inalterada (17.450 ± 52 células por mm^2 de SEZ en los *Sfrp1* WT respecto a las 16.660 ± 492 células por mm^2 de SEZ en los ratones *Sfrp1* KO, $n=2$ y $n=4$, respectivamente), el reservorio de células B-GFAP+ no variaba, encontrándose un $10.5 \pm 2.5\%$ de células B-GFAP+ en los ratones *Sfrp1* WT respecto al $10.0 \pm 1.8\%$ encontrado en los ratones *Sfrp1* KO (porcentajes respecto al número total de células muestreadas, $n=2$ y $n=4$, respectivamente). El cultivo *in vitro* de las células residentes en la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO, generó el mismo número de neuroesferas primarias, en parte debido a que se conserva la dinámica del ciclo celular, lo que indica que el reservorio de NSCs en los

Sfrp1 KO se mantiene inalterado y es capaz de proliferar con normalidad tras la disgregación y extracción del nicho (**Figura 47 b, c**).

3.4. La proteína sFRP-1 actúa como un factor de quiescencia *in vivo*

A lo largo de este trabajo, hemos demostrado que la modulación de las uniones N-cadherina implica a su vez, la regulación de la proliferación de las células B-GFAP+. Debido a que nuestros datos indicaban que sFRP-1 inhibe la actividad enzimática de ADAM10 y confirmaban que interviene en la regulación del corte proteolítico de la N-cadherina, y en base a nuestros datos previos sobre la regulación proteolítica de MT5 sobre las uniones de N-cadherina, hipotetizamos que la falta de sFRP-1 podía tener relevantes implicaciones biológicas en la regulación de la proliferación de las células madre subependimarias.

Para llevar a cabo un estudio *in vivo* de la proliferación, ratones *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO* recibieron 7 inyecciones de CldU, una inyección cada 2 horas durante un período total de 12 horas, y tras 28 días, se realizó una única inyección con IdU una hora antes del sacrificio de los ratones (Maslov et al., 2004). Teniendo en cuenta que la densidad celular presente en la SEZ de ambos genotipos se mantiene inalterada y que el reservorio de células B-GFAP+ no varía, los ratones *Sfrp1 KO* presentaron más proliferación, dado que el número total de células CldU+ LRC se incrementó un 32% (462 ± 14 células en los ratones *Sfrp1 WT* respecto a las 610 ± 53 células en los *Sfrp1 KO*, $n=5$ y $n=7$, respectivamente). Además, el número total de células LRC que volvieron a entrar en ciclo después de 28 días (CldU+IdU+) también aumentó considerablemente, más de dos veces respecto a los valores encontrados en los *Sfrp1 WT* (**Figura 48 a-d**).

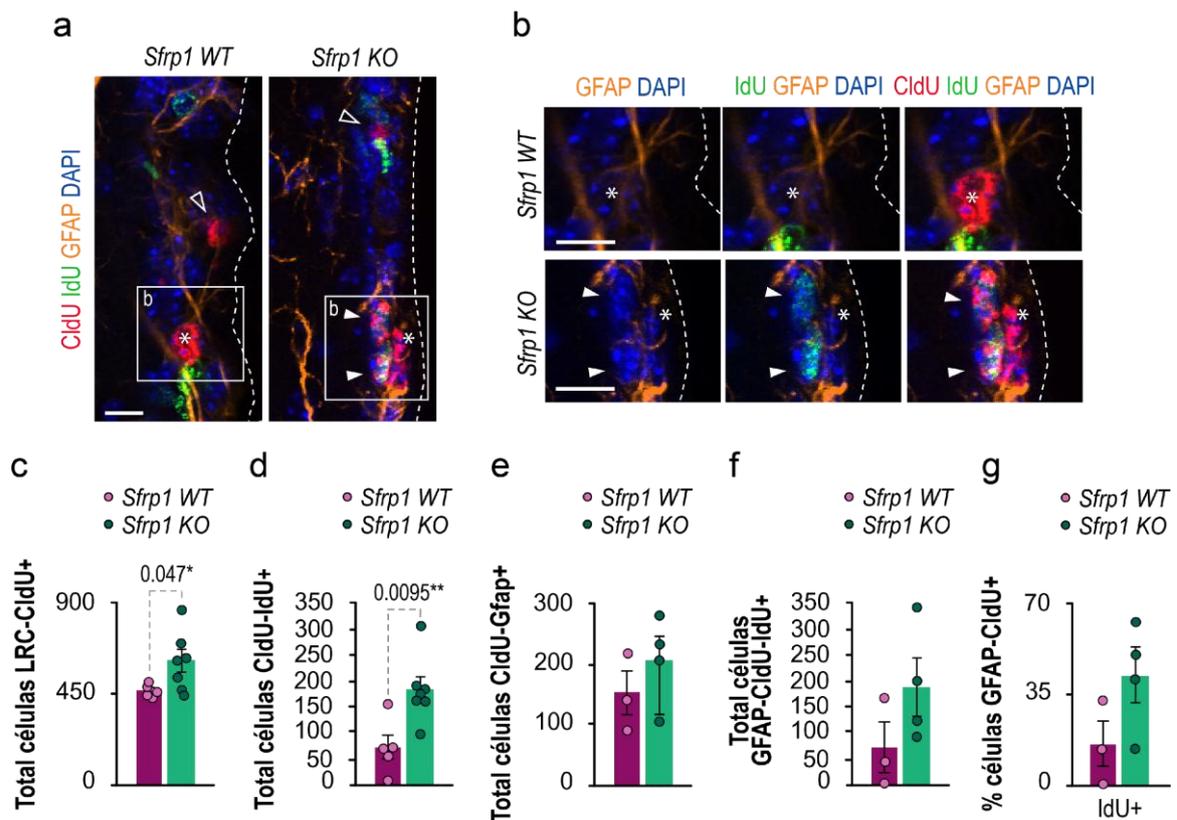


Figura 48. El déficit de sFRP-1 promueve la entrada en ciclo de las células B-GFAP+. (a) Imágenes de una inmunohistoquímica frente a CldU, IdU y GFAP, realizada en la SEZ de cortes coronales de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ con el ventrículo. La punta de flecha hueca muestra una célula GFAP+CldU+ pero negativa para IdU. En los recuadros se indica con un asterisco las células GFAP+CldU+ y con una punta de flecha blanca células GFAP-CldU-IdU+. (b) Imagen aumentada del recuadro mostrado en la imagen a. Se muestran por separado los distintos marcajes para identificar mejor las células GFAP+CldU+ de las triple positivas. El DAPI marca el núcleo celular de todas las células presentes. La barra de escala superpuesta en las imágenes indica 10 μ m. (c) Cuantificación del número total de células LRC presentes en la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. (d) Cuantificación del número total de células CldU+IdU+ presentes en la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. (e) Cuantificación del número total de células GFAP+CldU+ presentes en la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. (f) Cuantificación del número total de células activas GFAP+, capaces de volver a entrar en ciclo tras 28 días (GFAP+CldU+) en la SEZ de ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. (g) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+CldU+ que también son IdU+, respecto al total de células GFAP+CldU+ muestreadas. Las barras de datos corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto corresponde a cada ratón analizado.

La población de células madre B-GFAP+ residentes en la SEZ de ratones *Sfrp1* KO, también parecía estar afectada por el incremento general de los niveles de proliferación de la SEZ. El déficit de sFRP-1 parece estar afectando tanto al número total de células B-GFAP+ activas (CldU+GFAP+), como al número de estas células capaces de volver a entrar en ciclo (CldU+GFAP+IdU+) (Figura 48 a, b, e, f). El muestreo realizado hasta el momento sobre la población de células madre GFAP+CldU+ es pequeño y estadísticamente no tenemos diferencias entre los ratones *Sfrp1* WT y *Sfrp1* KO. Sin embargo, los datos apuntan a que la proporción de células activas y con capacidad proliferativa también se ve

incrementada en los ratones *Sfrp1 KO* (**Figura 48 a, b, g**). Estos datos nos indican que, sFRP-1 promueve la quiescencia de las células B-GFAP+ de la SEZ.

Con el objeto de averiguar el efecto de la activación de las células madre LRC-CldU-GFAP+ sobre el número de su descendencia celular, se llevó a cabo el análisis de la producción neurogénica y oligodendrogénica en los dos genotipos. Mediante una tinción *in toto* de la SEZ de ratones *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO*, para la detección de las cadenas de neuroblastos DCX+, pudimos observar que en los ratones *Sfrp1 KO* los neuroblastos son mucho más abundantes que en los ratones *Sfrp1 WT* (**Figura 49 a**). El análisis inmunohistoquímico llevado a cabo en ratones inyectados con CldU y sacrificados 28 días después (**Figura 49 b**), mostraba que en los ratones *Sfrp1 KO* la neurogénesis a la capa glomerular del OB aumenta un 32% en los ratones *Sfrp1 KO*, pasando de 73.0 ± 1.0 células CldU+/mm² en los ratones *Sfrp1 WT* respecto a 97.0 ± 5.0 CldU+/mm² en los ratones *Sfrp1 KO* (**Figura 49 c**). Curiosamente, no se detectó una mayor producción de oligodendrocitos (**Figura 49 d**).

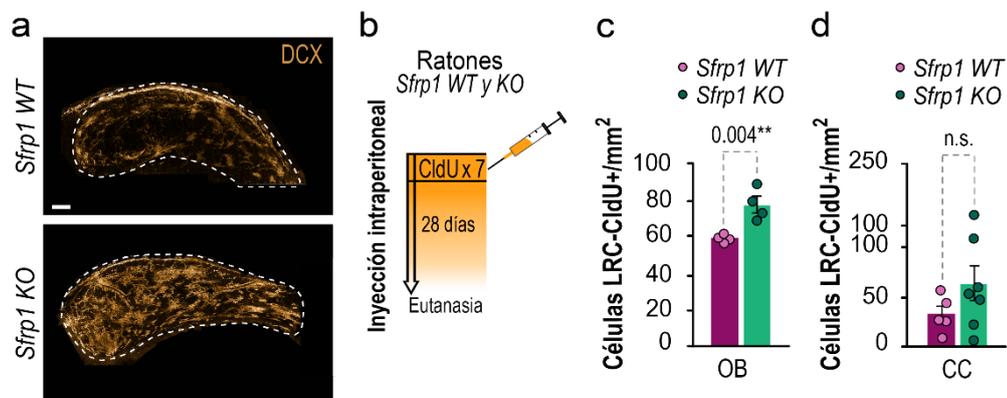


Figura 49. El déficit de sFRP-1 promueve la neurogénesis adulta. (a) Reconstrucción de la SEZ a partir de imágenes de confocal, correspondientes a la tinción *in toto* frente al marcador de neuroblastos DCX, en ratones *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO*. Marcaje de DCX pseudocoloreado en naranja. La línea blanca punteada indica el límite de la SEZ. La barra de escala corresponde a 200 μm. (b) Esquema del diseño experimental llevado a cabo para el análisis de células CldU+. (c) Cuantificación del número total de células CldU+ presentes en la capa glomerular del OB de ratones *Sfrp1 WT* y *Sfrp1 KO*. Los valores obtenidos se normalizan al área muestreada. (d) Cuantificación del número de células CldU+ encontradas por cada mm² de cuerpo caloso rastreado. Las barras de datos de las gráficas, corresponden a la media \pm s.e.m. y cada punto corresponde a cada ratón analizado. n.s.: no significativo.

Discusión

Las conclusiones más relevantes del presente trabajo son que (1) en la activación de las NSCs subependimarias participa la proteólisis regulada del ectodominio de la N-cadherina por metaloproteinasas específicas, como la MT5-MMP identificada en este estudio, que permite la des-adhesión de estas células de los endotelios y su entrada en ciclo celular y (2) la proteólisis regulada de la N-cadherina está modulada por factores secretados por el nicho, como el sFRP-1, un antagonista natural de las proteínas Wnt que es capaz de inhibir también la actividad de la metaloproteinasa-disintegrina ADAM10.

La conclusión general que se deduce de los datos presentados en esta tesis es que la regulación post-traducciona de los complejos de adhesión juega un papel muy relevante en el ciclo de quiescencia-activación de las NSCs adultas y que los mecanismos implicados, al igual que otros de regulación del comportamiento de las NSCs subependimarias y la neurogénesis olfativa adulta, dependen de la biología del nicho. Por otro lado, nuestros resultados están de acuerdo con la idea de que la disposición física de las células B-GFAP+ subependimarias y las relaciones directas de las mismas con otros elementos celulares del nicho es crítica para su comportamiento.

La morfología polarizada que presentan las células B-GFAP+ favorece tanto la señalización mediada por diferentes factores como su anclaje físico al nicho. Esta acentuada polarización se refleja en que presentan en su extremo apical un cilio corto que se extiende a través de las células endotelios hasta alcanzar el lumen del ventrículo, donde tienen acceso a factores transportados o liberados al CSF por el plexo coroideo. En su extremo basal, las NSCs emiten otra ramificación hasta contactar con la lámina basal de las células endotelios de los vasos sanguíneos, otra importante fuente secretora de factores denominados “angiocrinos” (Merkle et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Delgado et al., 2014; Rafii et al., 2016). Estudios en los últimos años han demostrado la importancia de ciertas interacciones celulares en el mantenimiento de la citoarquitectura celular y en la adhesión y anclaje de las células B-GFAP+ al nicho (Doetsch et al., 1997; Mirzadeh et al., 2008; Kokovay et al., 2012), además de influir en la regulación de su actividad proliferativa. Las integrinas son receptores transmembrana de unión a moléculas de la ECM y median entre las señales extracelulares que las células reciben del entorno y el citoesqueleto, activando vías de señalización reguladas por ILK (*Integrin-linked Kinase*), FAK (*Focal Adhesion Kinase*) o PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*). Recientemente se ha demostrado que la señalización mediada por integrinas participa en la regulación de la quiescencia o proliferación de las SC (Gattazzo et al., 2014). Las integrinas tipo $\beta 1$,

participan en el mantenimiento del reservorio de NSCs, regulando la autorrenovación, el modo de división (simétrica o asimétricamente) y el destino celular o linaje durante la diferenciación de las NSCs (Raymond et al., 2009; Marthiens et al., 2010; Chen et al., 2013). En concreto, la integrina $\alpha 6\beta 1$ interacciona con la laminina presente en la lámina basal de los vasos sanguíneos, favoreciendo el anclaje de las NSCs subependimarias y regulando su quiescencia (Shen et al., 2008). El anclaje de NSCs a moléculas de matriz extracelular parece necesario para el mantenimiento de las NSCs subependimarias en su microambiente de nicho vascular; pero, curiosamente, la interrupción de esta interacción estimula la proliferación celular (Shen et al., 2008). Los reguladores transcripcionales de la familia Id que regulan la expresión génica asociada con la troncalidad o *stemness* de las NSCs también modulan la residencia en el nicho de la matriz extracelular vascular mediante la represión del gen *Rap1GAP*, sirviendo así para mantener la actividad GTPasa del mediador de adhesión celular *RAP1* (Niola et al., 2012). Por lo tanto, es probable que los programas moleculares implicados en la regulación de las propiedades de las NSCs controlen tanto las capacidades intrínsecas de las SC como el posicionamiento restringido.

Las uniones adherentes célula-célula mediadas por cadherinas están presentes en diversas poblaciones de SC adultas, como las SC de la epidermis de mamíferos o las células satélite del músculo, dónde se han descrito ya sus implicaciones en la determinación del modo de división, en la resolución del destino celular o en el anclaje al nicho (Lechler y Fuchs, 2005; Kuang et al., 2007; Kuang et al., 2008). El otro sistema en el que se había estudiado intensamente la posible implicación de las cadherinas en la regulación de SC adultas, al inicio de esta tesis, había sido el hematopoyético. Sin embargo, los resultados en este campo, procedentes de distintos laboratorios, han sido muy controvertidos y confusos, no permitiendo conclusiones definitivas acerca de la posible participación de las uniones mediadas por N-cadherina de las HSC al nicho vascular de la médula ósea en su quiescencia (Kiel et al., 2007; Li y Zon, 2010). En cuanto a los nichos neurogénicos adultos, la E-cadherina y N-cadherina se habían localizado en el hipocampo y SEZ. En el hipocampo, y más concretamente en la región CA3, ambas participan en la estabilización de LTP, formación del cono de crecimiento, la sinaptogénesis y el tráfico de vesículas sinápticas (Fannon y Colman, 1996; Tang et al., 1998; Stan et al., 2010; Bodrikov et al., 2011). En las células endimarias de la SEZ, se había descrito la expresión de la E-cadherina y se le había atribuido un papel en la regulación de la proliferación de los TAPs (Karpowicz et al., 2009). Estudios previos, habían detectado la N-cadherina mayoritariamente en los neuroblastos

(Karpowicz et al., 2009; Yagita et al., 2009), atribuyéndole principalmente funciones relacionadas con la migración neuronal (Yagita et al., 2009). Sin embargo, las verdaderas implicaciones de la N-cadherina en la biología de las NSCs permanecían aún inexploradas, ya que no se habían realizado estudios sistemáticos de expresión y/o estudios funcionales de adhesión celular utilizando NSCs y ensayando experimentalmente las implicaciones de la alteración funcional de la adhesión mediada por N-cadherina específicamente en el nicho de la SEZ. Los resultados presentados en esta memoria demuestran que las células B-GFAP+ establecen uniones adherentes mediadas por N-cadherina con las células endimarias del nicho, y que la regulación de estas uniones adherentes, es uno de los mecanismos que regulan su quiescencia y activación (Porlan et al., 2014). Recientemente se ha descrito que la presencia de la proteína de adhesión VCAM-1 en la extensión apical que emiten las NSCs B-GFAP+ hacia el lumen del ventrículo es necesaria también para la quiescencia de las NSCs (Kokovay et al., 2012). Todos estos datos demuestran que las uniones adherentes regulan el grado de activación de las NSCs adultas.

Con el objeto de estudiar en detalle los tipos celulares de la SEZ que expresan N-cadherina usamos dos tipos anticuerpos diferentes contra distintos epítomos: uno para el dominio extracelular (EC-NCad) y otro que reconoce el dominio intracelular (NCad) (Karpowicz et al., 2009; Yagita et al., 2009). Curiosamente, encontramos una observación muy interesante que explica porque se había atribuido mayoritariamente la expresión de N-cadherina a los neuroblastos de la SEZ. Los neuroblastos que expresan DCX son reconocidos muy intensamente con el anticuerpo NCad y, en menor medida pero de forma muy específica e inequívoca, las células endimarias S100 β + y los astrocitos GFAP+; sin embargo, el anticuerpo EC-NCad detecta los endimocitos y los astrocitos GFAP+ mayoritariamente. Los resultados obtenidos en la población de células endimarias y neuroblastos corroboran las observaciones previas (Karpowicz et al., 2009). Para poder confirmar de manera definitiva que las NSCs expresaban N-cadherina realizamos inmunofluorescencias en muestras *in toto*, a fin de identificarlas por su localización y la presencia del cilio primario, y observamos la N-cadherina en el extremo apical de las células B-GFAP+. Estos experimentos junto con los ensayos de adhesión pusieron de manifiesto la relevancia de los contactos adherentes de las células B-GFAP+ con el nicho.

Todos nuestros datos indicaban una correlación inversa entre niveles elevados de N-cadherina y progresión en ciclo celular. Los modelos genéticos basados en la inactivación de N-cadherina en edades fetales no resultó muy efectivo ya que, aunque se observaba la

activación de un mayor número de células B-GFAP+ el cerebro aparecía altamente desorganizado por la mutación condicional en células de glía radial que dan lugar al resto de células del SNC (van den Bout et al., 2002). El uso de una construcción dominante-negativa de cadherinas, gentilmente cedida por la Dra. Anjen Chenn (Northwestern University, USA) (Noles y Chenn, 2007), vehiculizada al cerebro mediante la inyección estereotáxica de lentivirus, nos permitió disponer de un modelo experimental más controlado. La infección restringida al ventrículo lateral nos ofreció una situación incluso más favorable. La exquisita organización citoarquitectónica de la SEZ puede ser aprovechada para infectar de manera selectiva a los endimocitos controlando el título viral y la administración (Consiglio et al., 2004; Porlan et al., 2014; Porlan et al., 2016). Se ha demostrado que las uniones adherentes y estrechas en los epitelios polarizados dificultan la entrada de virus extraños en los tejidos, a veces debido a la ubicación restringida de los receptores de entrada viral (receptores CAR) en los complejos de unión. Por ello, la alteración de la adhesión intercelular favorece la infección por diferentes tipos de virus, incluido el lentivirus. Curiosamente, los propios virus pueden desestabilizar complejos de unión cuando se utilizan a altas concentraciones en ciertos epitelios (Bomsel y Alfsen, 2003; Castellani et al., 2010; Bonazzi y Cossart, 2011; Padmashali et al., 2013). Esto podría explicar algunas descripciones de infecciones de células B-GFAP+ desde el ventrículo lateral (Yamashita et al., 2006). Por este motivo, la infección intraventricular controlada nos pareció el modelo más adecuado para determinar la relevancia de las uniones de N-cadherina en la regulación de la proliferación de las células B-GFAP+ y en la arquitectura del nicho neurogénico (Porlan et al., 2016). El análisis de la población de células B-GFAP+ reveló que las uniones de N-cadherina se interrumpen y se incrementa el número y la proliferación de células B-GFAP+ en el nicho cuando se interfiere con la expresión de cadherinas en los endimocitos. Por otro lado, la ruptura de las uniones N-cadherina entre las células B-GFAP+ y las células endimarias, en los tres modelos estudiados, conlleva alteraciones en la citoarquitectura del nicho. La desorganización celular observada en la capa endimaria provoca el incremento en la formación de nuevos endimocitos, que podría indicar que el nicho inicia mecanismos de reparación. Se ha demostrado que las células endimarias no proliferan en homeostasis pero que, tras un daño o lesión, son capaces de dividirse y diferenciarse a neuronas o astrocitos (Carlen et al., 2009). Consideramos que, en nuestros experimentos, existe la posibilidad de que los endimocitos de nueva generación se hayan diferenciado a partir de células B-GFAP+ activadas, como en el desarrollo fetal, pero para resolver la disyuntiva entre esta posibilidad y la de que se produzcan por división de los propios endimocitos, sería necesario llevar a cabo

experimentos específicos, por ejemplo, mediante trazado de linaje a partir de células B-GFAP+ y endimarias.

Dado que la construcción dominante-negativa era una forma truncada del dominio extracelular de la E-cadherina (Noles y Chenn, 2007), se podría pensar que los efectos observados sobre la población de las células B-GFAP+, se podrían atribuir al bloqueo adicional de la E-cadherina. Sin embargo, se ha descrito que el déficit de E-cadherina en la SEZ promueve la proliferación de los TAPs, sin que la proliferación de las LRC se vea alterada (Karpowicz et al., 2009). Como ya hemos demostrado, parece que la cadherina mayoritaria entre células endimarias y células B-GFAP+ es la N-cadherina y que los niveles de E-cadherina permanecen inalterados. De todos modos, para descartar esta posibilidad, los ensayos funcionales de adhesión *in vitro* y de infusión *in vivo* con el anticuerpo bloqueante de N-cadherina demuestran el papel relevante y casi exclusivo de la N-cadherina. Todos estos datos indican en su conjunto que es la N-cadherina la que está implicada en el mantenimiento de la quiescencia de las células madre-GFAP+.

El nicho subependimario es una región plástica y dinámica, en constante cambio y renovación, donde las interacciones célula-célula juegan un papel decisivo para responder a las señales del entorno. En esta tesis se demuestra que el remodelado extracelular es necesario para la activación de células B en condiciones homeostáticas y regenerativas. MT5 es una proteína transmembrana con una región extracelular N-terminal que contiene el dominio catalítico, un único dominio transmembrana y una cola C-terminal citosólica corta requerida para su localización (Llano et al., 1999; Pei, 1999; Sekine-Aizawa et al., 2001). Las MMP unidas a membrana están ancladas a ésta adyacentes a sus sustratos, permitiendo la interacción local de MMP/sustrato en sitios específicos y pueden desestabilizar las uniones adherentes a través de la escisión de cadherinas (Lochter et al., 1997; Marambaud et al., 2002). Nuestros datos indican que la liberación de este enlace se produce normalmente en la SEZ bajo circunstancias fisiológicas, como parte de un mecanismo que regula el ciclo de células B-GFAP+. El patrón de distribución y la actividad de MT5-MMP descrito aquí, sugieren que esta metaloproteinasa desempeña un papel específico en la neurogénesis adulta. La expresión de MT5 está altamente regulada durante el desarrollo cerebral y permanece elevada en el hipocampo, OB y cerebelo de animales adultos (Jaworski, 2000). Cabe destacar que aunque estas regiones exhiben una plasticidad sináptica continua, y MT5 parece estar implicada en el remodelado sináptico y la estabilización a través del procesamiento regulado de N-cadherina, estas áreas también exhiben neurogénesis postnatal. Los datos que hemos

obtenido con el modelo genético indican que MT5 es necesaria, pero no suficiente para que se produzca la proteólisis completa del ectodominio de la N-cadherina en la SEZ. Aunque la falta de esta metaloproteinasa tiene como consecuencia el procesamiento defectuoso de la N-cadherina y una reducción drástica de la actividad proliferativa en la población de células B, la neurogénesis aún progresa en los ratones mutantes *Mmp24*, con la llegada de nuevas neuronas al OB. Además, en esta misma línea cabe destacar que la regeneración después del tratamiento con AraC se retrasa, pero no se previene completamente por la falta de actividad de MT5. N-cadherina puede ser escindida por otras enzimas, tales como ADAM10. Sin embargo, ADAM10 también se ha asociado con la activación proteolítica de la neuregulina y Notch (Fortini, 2002; Reiss et al., 2005; Esteve et al., 2011). En relación a esto, no vimos ningún efecto apreciable específico de la sobreexpresión de MT5-MMP en la generación del fragmento intracelular de Notch en las NSC, lo que sugiere que estas dos metaloproteinasas difieren en su selectividad de acción y pueden regular diferentes procesos.

La molécula completa de N-cadherina, de 135 kDa de tamaño, experimenta una escisión regulada de su ectodominio por las metaloproteasas ADAM10 y MT5-MMP, generando un fragmento C-ter intracelular de 40 kDa (CTF1) que puede procesarse adicionalmente en un fragmento soluble de 35 kDa (CTF2), en la interfase entre la membrana y el citosol, por el complejo presenilina-1/ γ -secretasa (Nakazora et al., 2010). En nuestros resultados, observamos una disminución significativa de los fragmentos C-ter de N-cadherina, acompañada de un aumento correlativo de la forma completa de 135 kDa de esta molécula de adhesión expuesta en la superficie celular, en NSC mutantes para *Mmp24* (Porlan et al., 2014) o cuando las neuroesferas eran tratadas con un inhibidor farmacológico de ADAM10. Sin embargo, no se ha comprobado en este estudio la posible participación cooperativa de ambas metaloproteinasas. Sí está claro que la regulación temporal de la escisión del ectodominio de la N-cadherina en la SEZ parece relevante para la movilización de las NSCs durante la remielinización, tras la exposición de los ratones a través de la dieta a la droga desmielinizante cuprizona y, tal y como hemos demostrado en esta tesis, para la activación de las NSC durante la regeneración de la SEZ en ratones tratados con el fármaco antimitótico AraC (Klingener et al., 2014; Porlan et al., 2014).

Al igual que hemos demostrado en esta tesis para MT5, la expresión de ADAM10 se ha descrito previamente en células de la SEZ de ratones adultos y la N-cadherina es diana de su actividad enzimática en diversos sistemas (Uemura et al., 2006; Demars et al., 2011; Lo Sardo et al., 2012; Klingener et al., 2014). Es por esto que ADAM10 era un excelente

candidato a formar también parte del mecanismo de regulación de las uniones adherentes que mantienen a las células B-GFAP+ ancladas al nicho. El fármaco GI254023X, se ha descrito ampliamente en el campo como un inhibidor específico de la actividad enzimática de ADAM10 (Muraguchi et al., 2007; Lo Sardo et al., 2012; Marcos et al., 2015), siendo hasta 100 veces más potente inhibiendo su actividad respecto a otras proteasas de la familia de las disintegrinas (Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005). En nuestro sistema, el bloqueo farmacológico de la acción proteolítica de ADAM10 promueve la acumulación de la forma completa de 135 kDa de N-cadherina, indicando que participa también en la escisión del ectodominio de N-cadherina en NSC. Además, en ensayos funcionales con células de la SEZ resultó ser un potente promotor de la adhesión celular mediada por N-cadherina: las NSC tratadas con el inhibidor de ADAM10 en presencia del anticuerpo bloqueante del dominio extracelular de la N-cadherina que, como hemos demostrado, modula principalmente la capacidad de adhesión de las células B-GFAP+ (Porlan et al., 2014), recuperan los niveles de adhesión de las NSCs que no han sido tratadas con el inhibidor. Esto sugiere que ADAM10 participa en el mecanismo de anclaje de las NSC B-GFAP al nicho para regular la transición entre quiescencia y activación. Además, nuestra hipótesis queda fuertemente reforzada por la descripción reciente de que, tras una lesión demielinizante, la señalización mediada por el EGFR en la SEZ, promueve la activación y proteólisis de la N-cadherina por parte de la proteasa ADAM10, promoviendo la proliferación de los progenitores y su migración hasta la región lesionada como mecanismo de reparación (Klingener et al., 2014). En nuestro caso, el estudio de la implicación que la falta total de ADAM10 podría tener para la biología de las NSC *in vivo*, bien utilizando inyecciones sistémicas del inhibidor GI254023X o bien utilizando modelos genéticos de pérdida de función, complementaría muy bien los hallazgos presentados en esta tesis y será objeto de experimentación futura en el laboratorio.

Las proteínas sFRP son conocidas por actuar como inhibidores de la vía de Wnt, debido a su interacción directa con los ligandos Wnt a través de su dominio terminal CRD. Sin embargo, recientemente se ha postulado que la proteína sFRP-1 interacciona con ADAM10 con su otro extremo, el NTR, un dominio similar al que presentan los TIMPs, reconocidos inhibidores de proteasas, para inhibir la actividad catalítica de la metaloproteasa en retina (Esteve et al., 2011). El mecanismo de acción propuesto implica la interacción de la sFRP-1 con el dominio rico en cisteínas de ADAM10, próximo a su dominio catalítico, induciendo la inhibición de ADAM10 a través de la competición directa con sus sustratos

(Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015). Durante el desarrollo neurogénico de la retina, se produce una interacción directa entre sFRP-1 y la proteasa ADAM10, provocando su inhibición y la regulación indirecta de las uniones adherentes por N-cadherina y L1 (Esteve et al., 2011; Marcos et al., 2015). Nuestros datos enzimológicos corroboran que el sFRP-1 recombinante que hemos utilizado en este trabajo, funciona efectivamente como inhibidor de ADAM10, y que las NSC derivadas de animales con delección de *Sfrp1* presentan niveles inferiores de la forma completa de 135 KDa y mayor procesamiento proteolítico de N-cadherina y una menor capacidad de adhesión mediada por ésta.

Durante el desarrollo embrionario, sFRP-1 se expresa abundantemente en regiones neurogénicas como las eminencias ganglionares, el hipocampo o el epitelio olfativo (Leimeister et al., 1998; Kim et al., 2001; Trevant et al., 2008) y en la etapa adulta, la expresión se mantiene en la corteza, el hipocampo, los OB, los plexos coroideos y la SEZ principalmente (nuestros datos y datos de *Allen Brain Atlas*). El patrón de expresión sugería la posibilidad de que sFRP-1 pudiera comportarse como un factor soluble implicado en la modulación de las uniones adherentes de las B-GFAP+ a través de su habilidad para inhibir a ADAM10 y formar parte del mecanismo de activación de estas células. Nuestros datos han demostrado que, tanto las propias NSCs como los plexos coroideos expresan abundantes niveles del factor, sugiriendo un papel similar al que tiene en retina, en la regulación de la actividad de ADAM10 en NSC.

Los ensayos de pérdida de función, llevados a cabo con NSC de ratones con delección del gen *Sfrp1*, indican que, efectivamente, el déficit de sFRP-1 promueve la proteólisis del ectodominio de N-cadherina, sin que ello implique cambios en los niveles de ARNm de *Cdh2* o *Adam10*. Por lo tanto, el aumento de los fragmentos intracelulares generados y la bajada correlativa de los niveles de la forma completa de 135 kDa como consecuencia de la proteólisis, indican que sFRP-1 es efectivamente un inhibidor de la actividad catalítica de ADAM10 en NSC. En estos ensayos comprobamos además que el tratamiento con el factor recombinante era capaz de revertir el defecto en adhesión mediada por N-cadherina observado en las NSC nulas para sFRP-1, a la vez que se recuperan los niveles de la forma completa de 135 kDa de N-cadherina.

En un modelo de regulación fisiológica de la proliferación de las NSC por des-adhesión, tal y como planteamos en esta tesis, la producción local del factor por las NSCs y/o cambios en el gradiente de concentración en el CSF podría ser un mecanismo adicional

de modulación de la activación o mantenimiento de la quiescencia mediante la inhibición local de ADAM10. En este sentido, la modificación genética de sFRP-1 se traduce *in vivo* en un fenotipo de activación dependiente de dosis, ya que los mutantes nulos presentan un mayor número de células B-GFAP+ activadas y los heterocigotos (datos no mostrados), con un único alelo silvestre, muestran un fenotipo intermedio entre los ratones de genotipo mutante nulo y silvestre. Los estudios *in vivo* realizados con los ratones nulos para sFRP-1 mostraron otro resultado interesante; la mayor actividad de las células B-GFAP+ encontrada en los mutantes nulos conduce a una mayor neurogénesis pero no a una oligodendrogénesis aumentada. Esto podría indicar que la adhesión no sólo está implicada en el paso de quiescencia a activación, sino que además modifica el destino de la división. Sin embargo, dado que en los estudios realizados en esta tesis modificando directamente los niveles de N-cadherina, encontramos un incremento en la oligodendrogénesis similar al encontrado en la neurogénesis (Porlan et al., 2014), nuestra interpretación de este resultado es que es posible que no tengamos potencia estadística con el tamaño muestral empleado para detectar un cambio significativo en la oligodendrogénesis en los animales nulos para sFRP-1.

Se ha descrito ampliamente la actuación de las sFRP como antagonistas de la ruta de señalización Wnt, mediante el secuestro de las proteínas Wnt por interacción directa, impidiendo que éstas interaccionen con los receptores de membrana Frizzled y/o LRP5/6 e inicien la ruta de señalización mediada por β -catenina/TCF/LEF (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Xu et al., 1998). Además, la actividad catalítica de ADAM10 también actúa sobre los receptores Eph, EGFR y el receptor Notch (Edwards et al., 2008; Esteve et al., 2011), cuya proteólisis genera un fragmento intracelular con actividad transcripcional (NICD) que una vez generado en la membrana plasmática, se transloca al núcleo celular donde forma un complejo con el factor de transcripción RBP-J y activa la transcripción para promover la expresión de genes implicados en la autorrenovación y el mantenimiento del estado indiferenciado de las NSCs (Andreu-Agullo et al., 2009; Aguirre et al., 2010). Sin embargo parece que el mecanismo principal por el que sFRP-1 modula el estado de activación y quiescencia de las NSC es a principalmente través de la regulación de la adhesión mediada por N-cadherina, ya que en ensayos de expresión génica en NSC nulas para sFRP-1 no observamos diferencias significativas en los niveles de los mensajeros de las dianas de NICD, *Hes1* y *Hes5*. En cuanto a la posibilidad de que el incremento en la activación de las NSC que encontramos en los ratones nulos para sFRP-1 pudiera estar mediado por una sobre-activación generalizada de la vía de señalización de Wnt en el nicho,

también quedó descartada al no encontrar diferencias en los niveles del ARNm de la ciclina D1, diana directa de la vía canónica de Wnt mediada por la β -catenina/TCF/LEF. La activación de la vía de Wnt en la SEZ se ha asociado aquellas situaciones en las que sucede un cambio en el modo de división de las células, para expandir el reservorio mediante divisiones simétricas, estando silente en las SC en condiciones en las que éstas se están dividiendo asimétricamente (homeostasis). La vía se activaría *in vivo* principalmente durante la regeneración subependimaria o la respuesta al accidente cerebrovascular (Piccin y Morshead, 2011).

No está claro cómo el procesamiento proteolítico y la des-adhesión celular podrían regular el ciclo celular de las células B-GFAP+. Es posible que una perturbación general de la integridad del tejido conduzca a la hiperproliferación. Sin embargo, la falta de MT5, que no da lugar a la desorganización del tejido, produce el resultado opuesto y disminuye la proliferación, lo que sugiere que la adhesión mediada por N-cadherina podría regular dinámicamente el estado de activación de estas células. Este efecto podría ser el resultado de una contribución permisiva de la escisión de N-cadherina al ciclo celular, es decir, las células son impulsadas a proliferar, pero la des-adhesión es un requisito previo para la progresión. Alternativamente, la des-adhesión podría tener un efecto señalizador. La proteólisis regulada sitúa a la N-cadherina dentro de una clase de receptores de superficie en la que un fragmento intracelular es liberado por la actividad γ -secretasa tras la acción de otra proteasa, es decir, ADAM10 o MT5. Notch, la proteína precursora amiloide y Erb-B4 pertenecen a esta categoría de moléculas y se ha demostrado la actividad directa de los fragmentos intracelulares de estas moléculas (Fortini, 2002). En el caso de la N-cadherina, cuando se sobre-expresa el fragmento CTF2, éste transloca al núcleo y estimula la transcripción de los genes de la ciclina D1 y β -catenina en las células de cresta neural pre-delaminación (Shoval et al., 2007). Además, el fragmento intracelular de N-cadherina puede inducir aparentemente la degradación del co-activador transcripcional, proteína de unión a CREB (CBP) (Marambaud et al., 2003; Andreyeva et al., 2012). Alternativamente, la escisión de la N-cadherina podría contribuir a la señalización a través de la liberación de β -catenina de localizaciones de membrana al citosol, para funcionar fuera de las uniones adhesivas en una vía de señalización que transmite información desde receptores de Wnts al núcleo celular en muchos tipos celulares diferentes (Heuberger y Birchmeier, 2010). Se sabe que la β -catenina citoplasmática influye en el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de células precursoras neurales en diferentes partes del sistema nervioso

adulto y en desarrollo, probablemente en respuesta a la señalización de Wnt (Chenn y Walsh, 2003; Zechner et al., 2003; Zhang et al., 2011). Los ratones transgénicos adultos que expresan una forma estabilizada de β -catenina exhiben una SEZ agrandada, debido a la proliferación de TAPs e inhibición de su diferenciación en neuroblastos (Chenn y Walsh, 2003; Adachi et al., 2007; Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015). La actividad potencial de la β -catenina en las células B-GFAP+ es menos clara, ya que el análisis genético del reportero en la SEZ ha indicado que la señalización de Wnt está ausente en la mayoría de las NSC adultas en condiciones homeostáticas (Piccin y Morshead, 2011) a pesar de que se han referido efectos sobre esta zona de la manipulación de la vía de Wnt. Es por ello que la elucidación de estas cuestiones requerirá más experimentación.

Las NSCs, como otras SC adultas, están sujetas a regulación por la integración de mecanismos intrínsecos con señales que se derivan de elementos de los nichos en los que estas células residen. Nuestro conocimiento sobre la biología del nicho se ha incrementado notablemente en los últimos años. Esta comprensión puede ser decisiva a la hora de intentar activar a nuestras SC para mejorar su potencial reparador o rejuvenecer nuestros tejidos. También será importante para el desarrollo de terapias dirigidas a tratar la desregulación tumorigénica de estas células en el ámbito oncológico. Consideramos que los datos aportados por el trabajo realizado en esta tesis doctoral contribuyen significativamente a este campo. Nuestros datos indican que la adhesión celular es un elemento que debe ser también tenido en cuenta y, dada su implicación en la regulación de la quiescencia-activación, podría ser interesante considerarlo como una diana para actuaciones terapéuticas en diversos frentes.

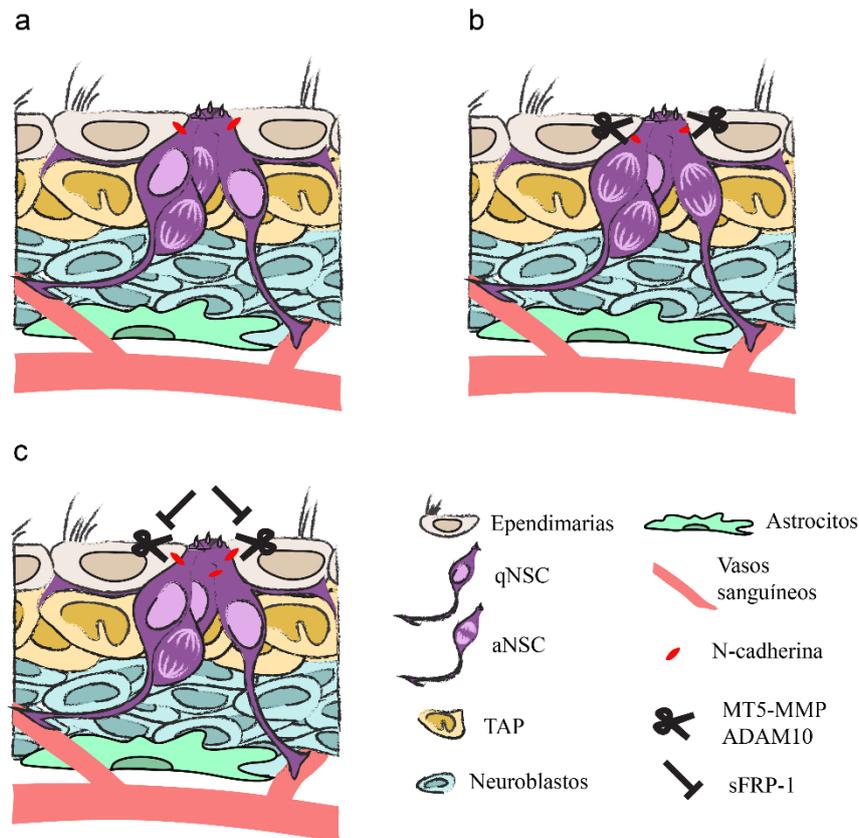


Figura 50. Esquema representativo del comportamiento de las NSC ante la ruptura de las uniones adherentes mediadas por N-cadherina. (a) Estado proliferativo de las NSC en el nicho en condiciones fisiológicas. Se observan algunas NSC quiescentes ancladas al nicho mediante uniones N-cadherina con las células endoteliales y las NSC activas han perdido las uniones adherentes para permitir su entrada en ciclo. (b) El incremento en la actividad enzimática de las metaloproteasas MT5-MMP o ADAM10 favorece la ruptura de las uniones adherentes mediadas por N-cadherina, lo que permite el desanclaje de las NSC y su entrada en ciclo. (c) El bloqueo de la acción de las metaloproteasas, por disrupción o inhibición por factores de nicho como sFRP-1, promueve el establecimiento de las uniones adherentes de N-cadherina y la quiescencia de las NSC.

Conclusiones

1. Las células B-GFAP⁺ interactúan con otras células del nicho neurogénico subependimario mediante uniones adherentes dependientes de N-cadherina.
2. Las uniones adherentes mediadas por N-cadherina de las células B-GFAP⁺ y con las células endimarias participan en el mantenimiento de su quiescencia.
3. El mantenimiento de la integridad de las uniones adherentes mediadas por N-cadherina en el nicho subependimario tiene consecuencias funcionales en neurogénesis y oligodendrogénesis adultas.
4. La metaloproteinasa MT5-MMP modula la adhesión dinámica de las células B-GFAP⁺ al nicho a través de la proteólisis regulada de la N-cadherina, participando en su activación en condiciones fisiológicas y de regeneración.
5. La generación y mantenimiento de las células B-GFAP⁺ subependimarias es independiente de la actividad de la metaloproteinasa MT5-MMP.
6. La proteína secretada sFRP-1 es un factor del nicho que actúa como regulador negativo de la actividad enzimática de ADAM10, modulando la adhesión de las células B-GFAP⁺ mediada por N-cadherina.
7. La proteína sFRP-1 actúa como un factor de quiescencia *in vivo*, pero la integridad y el mantenimiento de las células B-GFAP⁺ en el nicho son independientes de éste.
8. La modulación dinámica de la proteólisis de la N-cadherina es un mecanismo de regulación fina del estado de activación de las células B-GFAP⁺ subependimarias con consecuencias en la actividad fisiológica de producción de progenie diferenciada.

Bibliografía

1. Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A., *et al.* (2007). *Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone*. *Stem cells* 25, (2827-2836).
2. Aguirre, A., Rubio, M.E., and Gallo, V. (2010). *Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal*. *Nature* 467, (323-327).
3. Ahmad, M., Takino, T., Miyamori, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2006). *Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases*. *Journal of biochemistry* 139, (517-526).
4. Alberdi, F., García, I., Atutxa, L., and Zabarte, M. (2014). *Epidemiología del trauma grave*. *Medicina Intensiva*.
5. Altman, J. (1969). *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb*. *The Journal of comparative neurology* 137, (433-457).
6. Altman, J., and Das, G.D. (1965). *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. *The Journal of comparative neurology* 124, (319-335).
7. Altman, J., and Das, G.D. (1966). *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions*. *The Journal of comparative neurology* 126, (337-389).
8. Alvarez-Buylla, A., and Nottebohm, F. (1988). *Migration of young neurons in adult avian brain*. *Nature* 335, (353-354).
9. Alvarez, C.V., Garcia-Lavandeira, M., Garcia-Rendueles, M.E., Diaz-Rodriguez, E., Garcia-Rendueles, A.R., Perez-Romero, S., Vila, T.V., Rodrigues, J.S., Lear, P.V., and Bravo, S.B. (2012). *Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells*. *Journal of molecular endocrinology* 49, (R89-111).
10. Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knauper, V., Docherty, A.J., and Murphy, G. (2000). *The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3*. *FEBS letters* 473, (275-279).
11. Andreu-Agullo, C., Morante-Redolat, J.M., Delgado, A.C., and Farinas, I. (2009). *Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone*. *Nat Neurosci* 12, (1514-1523).
12. Andreyeva, A., Nieweg, K., Horstmann, K., Klapper, S., Muller-Schiffmann, A., Korth, C., and Gottmann, K. (2012). *C-terminal fragment of N-cadherin accelerates synapse destabilization by amyloid-beta*. *Brain : a journal of neurology* 135, (2140-2154).
13. Avizienyte, E., Wyke, A.W., Jones, R.J., McLean, G.W., Westhoff, M.A., Brunton, V.G., and Frame, M.C. (2002). *Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling*. *Nature cell biology* 4, (632-638).
14. Barnabe-Heider, F., Meletis, K., Eriksson, M., Bergmann, O., Sabelstrom, H., Harvey, M.A., Mikkers, H., and Frisen, J. (2008). *Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation*. *Nature methods* 5, (189-196).
15. Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. *Nature cell biology* 2, (84-89).
16. Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferron, S.R., Morante-Redolat, J.M., and Farinas, I. (2016). *Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells*. *Differentiation* 91, (28-41).

17. Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., and LoTurco, J.J. (2003). *Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23, (10411-10418).
18. Bengoa-Vergniory, N., and Kypta, R.M. (2015). *Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 72, (4157-4172).
19. Berg, D.A., Belnoue, L., Song, H., and Simon, A. (2013). *Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain*. Development 140, (2548-2561).
20. Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisé, J. (2015). *Adult Neurogenesis in Humans*. Cold Spring Harbor perspectives in biology.
21. Beste, C., Ocklenburg, S., von der Hagen, M., and Di Donato, N. (2016). *Mammalian cadherins DCHS1-FAT4 affect functional cerebral architecture*. Brain structure & function 221, (2487-2491).
22. Bjornsson, C.S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., and Temple, S. (2015). *It takes a village: constructing the neurogenic niche*. Developmental cell 32, (435-446).
23. Bodrikov, V., Solis, G.P., and Stuermer, C.A. (2011). *Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31, (18013-18025).
24. Bomsel, M., and Alfsen, A. (2003). *Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery*. Nature reviews Molecular cell biology 4, (57-68).
25. Bonazzi, M., and Cossart, P. (2011). *Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection*. The Journal of cell biology 195, (349-358).
26. Bond, A.M., Bhalala, O.G., and Kessler, J.A. (2012). *The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation*. Developmental neurobiology 72, (1068-1084).
27. Boyle, M., Wong, C., Rocha, M., and Jones, D.L. (2007). *Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the Drosophila testis*. Cell stem cell 1, (470-478).
28. Bryant, D.M., and Stow, J.L. (2004). *The ins and outs of E-cadherin trafficking*. Trends in cell biology 14, (427-434).
29. Bryant, D.M., Wylie, F.G., and Stow, J.L. (2005). *Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin*. Molecular biology of the cell 16, (14-23).
30. Bulstrode, H., Jones, L.M., Siney, E.J., Sampson, J.M., Ludwig, A., Gray, W.P., and Willaime-Morawek, S. (2012). *A-Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 10 and 17 promote self-renewal of brain tumor sphere forming cells*. Cancer letters 326, (79-87).
31. Cadwell, C.M., Su, W., and Kowalczyk, A.P. (2016). *Cadherin tales: Regulation of cadherin function by endocytic membrane trafficking*. Traffic 17, (1262-1271).
32. Cameron, H.A., and McKay, R.D. (2001). *Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus*. The Journal of comparative neurology 435, (406-417).
33. Cano, A., Gamallo, C., Kemp, C.J., Benito, N., Palacios, J., Quintanilla, M., and Balmain, A. (1996). *Expression pattern of the cell adhesion molecules. E-cadherin, P-cadherin and alpha 6 beta 4 intergrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice*. International journal of cancer 65, (254-262).
34. Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., and During, M.J. (2004). *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nature genetics 36, (827-835).

35. Capela, A., and Temple, S. (2002). *LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal*. *Neuron* 35, (865-875).
36. Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., et al. (2009). *Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke*. *Nat Neurosci* 12, (259-267).
37. Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., and Lledo, P.M. (2003). *Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb*. *Nat Neurosci* 6, (507-518).
38. Casper, K.B., Jones, K., and McCarthy, K.D. (2007). *Characterization of astrocyte-specific conditional knockouts*. *Genesis* 45, (292-299).
39. Castellani, S., Di Gioia, S., Trotta, T., Maffione, A.B., and Conese, M. (2010). *Impact of lentiviral vector-mediated transduction on the tightness of a polarized model of airway epithelium and effect of cationic polymer polyethylenimine*. *Journal of biomedicine & biotechnology 2010*, (103976).
40. Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. *Nature* 372, (190-193).
41. Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). *Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche*. *Neuron* 82, (545-559).
42. Colman, D.R. (1997). *Neurites, synapses, and cadherins reconciled*. *Molecular and cellular neurosciences* 10, (1-6).
43. Combes, A.N., Davies, J.A., and Little, M.H. (2015). *Cell-cell interactions driving kidney morphogenesis*. *Current topics in developmental biology* 112, (467-508).
44. Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. *Molecular cell* 7, (1267-1278).
45. Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). *Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK*. *The Journal of cell biology* 163, (847-857).
46. Consiglio, A., Gritti, A., Dolcetta, D., Follenzi, A., Bordignon, C., Gage, F.H., Vescovi, A.L., and Naldini, L. (2004). *Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, (14835-14840).
47. Curtis, M.A., Faull, R.L., and Eriksson, P.S. (2007). *The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone*. *Nature reviews Neuroscience* 8, (712-723).
48. Curtis, M.A., Low, V.F., and Faull, R.L. (2012). *Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation*. *Developmental neurobiology* 72, (990-1005).
49. Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). *A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity*. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 5, (640-658).
50. Chang, C., and Werb, Z. (2001). *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis*. *Trends in cell biology* 11, (S37-43).
51. Chen, J., Zacharek, A., Li, Y., Li, A., Wang, L., Katakowski, M., Roberts, C., Lu, M., and Chopp, M. (2006). *N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres*. *Neuroscience* 140, (377-388).

52. Chen, S., Lewallen, M., and Xie, T. (2013). *Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation*. *Development* 140, (255-265).
53. Chen, X., Kojima, S., Borisy, G.G., and Green, K.J. (2003). *p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions*. *The Journal of cell biology* 163, (547-557).
54. Chen, Y.T., Stewart, D.B., and Nelson, W.J. (1999). *Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells*. *The Journal of cell biology* 144, (687-699).
55. Chenn, A., and Walsh, C.A. (2003). *Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice*. *Cerebral cortex* 13, (599-606).
56. Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1999). *Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, (4462-4471).
57. Christophorou, N.A., Mende, M., Lleras-Forero, L., Grocott, T., and Streit, A. (2010). *Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear*. *Developmental biology* 345, (180-190).
58. Dady, A., Blavet, C., and Duband, J.L. (2012). *Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 241, (1333-1349).
59. Damsky, C.H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K., and Buck, C.A. (1983). *Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue*. *Cell* 34, (455-466).
60. Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). *A core function for p120-catenin in cadherin turnover*. *The Journal of cell biology* 163, (525-534).
61. del Rio, J.A., and Soriano, E. (1989). *Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse*. *Brain research Developmental brain research* 49, (311-317).
62. Delgado, A.C., Ferron, S.R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C.M., D'Ocon, P., and Farinas, I. (2014). *Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction*. *Neuron* 83, (572-585).
63. Demars, M.P., Bartholomew, A., Strakova, Z., and Lazarov, O. (2011). *Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin*. *Stem cell research & therapy* 2, (36).
64. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. *Cell* 97, (703-716).
65. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, (5046-5061).
66. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). *Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, (11619-11624).
67. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells*. *Neuron* 36, (1021-1034).

68. Dvorak, P., Hampl, A., Jirmanova, L., Pacholikova, J., and Kusakabe, M. (1998). *Embryoglycan ectodomains regulate biological activity of FGF-2 to embryonic stem cells*. *Journal of cell science* 111 (Pt 19), (2945-2952).
69. Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). *The ADAM metalloproteinases*. *Molecular aspects of medicine* 29, (258-289).
70. Endres, K., and Deller, T. (2017). *Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms*. *Frontiers in molecular neuroscience* 10, (56).
71. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. *Nature medicine* 4, (1313-1317).
72. Ernst, A., and Frisen, J. (2015). *Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals*. *PLoS biology* 13, (e1002045).
73. Esteve, P., Sandonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibanez, C., Crespo, I., Marcos, S., Gonzalez-Garcia, S., Toribio, M.L., Arribas, J., et al. (2011). *SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis*. *Nat Neurosci* 14, (562-569).
74. Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C.J., and Palmer, T.D. (2003). *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. *The European journal of neuroscience* 18, (2803-2812).
75. Fagotto, F. (2013). *Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of beta-catenin*. *EMBO reports* 14, (422-433).
76. Fannon, A.M., and Colman, D.R. (1996). *A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins*. *Neuron* 17, (423-434).
77. Feng, Z., and Gao, F. (2012). *Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease*. *CNS neuroscience & therapeutics* 18, (142-148).
78. Ferron, S.R., Andreu-Agullo, C., Mira, H., Sanchez, P., Marques-Torrejon, M.A., and Farinas, I. (2007). *A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells*. *Nature protocols* 2, (849-859).
79. Ferron, S.R., Charalambous, M., Radford, E., McEwen, K., Wildner, H., Hind, E., Morante-Redolat, J.M., Laborda, J., Guillemot, F., Bauer, S.R., et al. (2011). *Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis*. *Nature* 475, (381-385).
80. Ferron, S.R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sanchez, P., Arbones, M.L., et al. (2010). *Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling*. *Cell stem cell* 7, (367-379).
81. Folgueras, A.R., Valdes-Sanchez, T., Llano, E., Menendez, L., Baamonde, A., Denlinger, B.L., Belmonte, C., Juarez, L., Lastra, A., Garcia-Suarez, O., et al. (2009). *Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, (16451-16456).
82. Fortini, M.E. (2002). *Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling*. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, (673-684).
83. Franz, C.M., and Ridley, A.J. (2004). *p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation*. *The Journal of biological chemistry* 279, (6588-6594).
84. Frisén, J. (2016). *Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair*. *Repair Annu Rev Cell Dev Biol*.

85. Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). *Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex*. *Nature cell biology* 4, (222-231).
86. Garcion, E., Faissner, A., and Ffrench-Constant, C. (2001). *Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration*. *Development* 128, (2485-2496).
87. Gattazzo, F., Urciuolo, A., and Bonaldo, P. (2014). *Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche*. *Biochimica et biophysica acta* 1840, (2506-2519).
88. Gengatharan, A., Bammann, R.R., and Saghatelian, A. (2016). *The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb*. *Frontiers in neuroscience* 10, (149).
89. Geraerts, M., Eggermont, K., Hernandez-Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Baekelandt, V., and Debyser, Z. (2006). *Lentiviral vectors mediate efficient and stable gene transfer in adult neural stem cells in vivo*. *Human gene therapy* 17, (635-650).
90. Goldman, S.A., and Nottebohm, F. (1983). *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, (2390-2394).
91. Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2009). *Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes*. *Stem cells* 27, (2032-2043).
92. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. *Nature cell biology* 10, (593-601).
93. Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Vescovi, A.L. (2002). *Multipotent neural stem cells reside in the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, (437-445).
94. Gross, R.E., Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., and Kessler, J.A. (1996). *Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells*. *Neuron* 17, (595-606).
95. Gumbiner, B.M. (2000). *Regulation of cadherin adhesive activity*. *The Journal of cell biology* 148, (399-404).
96. Guo, Z.B., Su, Y.Y., Wang, Y.H., Wang, W., and Guo, D.Z. (2016). *The expression pattern of Adam10 in the central nervous system of adult mice: Detection by in situ hybridization combined with immunohistochemistry staining*. *Molecular medicine reports* 14, (2038-2044).
97. Hadjantonakis, A.K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Nagy, A. (1998). *Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells*. *Mechanisms of development* 76, (79-90).
98. Hall, P.E., Lathia, J.D., Caldwell, M.A., and Ffrench-Constant, C. (2008). *Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media*. *BMC neuroscience* 9, (71).
99. Happe, C.L., and Engler, A.J. (2016). *Mechanical Forces Reshape Differentiation Cues That Guide Cardiomyogenesis*. *Circulation research* 118, (296-310).
100. Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). *Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family*. *The Journal of cell biology* 106, (873-881).

101. Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H., and Takeichi, M. (1987). *Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos*. *Developmental biology* 120, (215-227).
102. Haug, J.S., He, X.C., Grindley, J.C., Wunderlich, J.P., Gaudenz, K., Ross, J.T., Paulson, A., Wagner, K.P., Xie, Y., Zhu, R., et al. (2008). *N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells*. *Cell stem cell* 2, (367-379).
103. Hayashita-Kinoh, H., Kinoh, H., Okada, A., Komori, K., Itoh, Y., Chiba, T., Kajita, M., Yana, I., and Seiki, M. (2001). *Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth*. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12, (573-580).
104. Hemberger, M., Dean, W., and Reik, W. (2009). *Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal*. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, (526-537).
105. Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, (a002915).
106. Hindle, J.V. (2010). *Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease*. *Age and ageing* 39, (156-161).
107. Hirano, S., and Takeichi, M. (2012). *Cadherins in brain morphogenesis and wiring*. *Physiological reviews* 92, (597-634).
108. Hoe, H.S., Cooper, M.J., Burns, M.P., Lewis, P.A., van der Brug, M., Chakraborty, G., Cartagena, C.M., Pak, D.T., Cookson, M.R., and Rebeck, G.W. (2007). *The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, (10895-10905).
109. Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. *Cell* 105, (391-402).
110. Huguenin, M., Muller, E.J., Trachsel-Rosmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E.E., and Lottaz, D. (2008). *The metalloprotease meprinbeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion*. *PLoS one* 3, (e2153).
111. Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., et al. (2003). *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. *Blood* 102, (1186-1195).
112. Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C., and Jacob, F. (1980). *A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos*. *Cell* 21, (927-934).
113. Ihrie, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Cells in the astroglial lineage are neural stem cells*. *Cell and tissue research* 331, (179-191).
114. Jackson, E.L., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors*. *Cells, tissues, organs* 188, (212-224).
115. Jackson, H.W., Defamie, V., Waterhouse, P., and Khokha, R. (2017). *TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer*. *Nature reviews Cancer* 17, (38-53).
116. Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., and Fuchs, E. (2003). *Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development*. *Nature* 422, (317-322).
117. Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). *Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton*. *Nature cell biology* 4, (E101-108).

118. Jaworski, D.M. (2000). *Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system*. Brain research 860, (174-177).
119. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, (11946-11950).
120. Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell 96, (25-34).
121. Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., et al. (2010). *The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30, (4833-4844).
122. Kaczmarek, L., Lapinska-Dzwonek, J., and Szymczak, S. (2002). *Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections?* The EMBO journal 21, (6643-6648).
123. Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G.L., and Takeichi, M. (2007). *N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain*. Developmental biology 304, (22-33).
124. Kaplan, M.S., and Hinds, J.W. (1977). *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science 197, (1092-1094).
125. Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., and Huovila, A.P. (2000). *Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS*. Molecular and cellular neurosciences 15, (547-560).
126. Karpowicz, P., Willaime-Morawek, S., Balenci, L., DeVeale, B., Inoue, T., and van der Kooy, D. (2009). *E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29, (3885-3896).
127. Kazanis, I. (2009). *The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: how plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed*. Brain : a journal of neurology 132, (2909-2921).
128. Kele, J., Andersson, E.R., Villaescusa, J.C., Cajanek, L., Parish, C.L., Bonilla, S., Toledo, E.M., Bryja, V., Rubin, J.S., Shimono, A., et al. (2012). *SFRP1 and SFRP2 dose-dependently regulate midbrain dopamine neuron development in vivo and in embryonic stem cells*. Stem cells 30, (865-875).
129. Kiel, M.J., Acar, M., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2009). *Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance*. Cell stem cell 4, (170-179).
130. Kiel, M.J., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2007). *Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance*. Cell stem cell 1, (204-217).
131. Kim, A.S., Lowenstein, D.H., and Pleasure, S.J. (2001). *Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon*. Mechanisms of development 103, (167-172).
132. Kim, E.J., Ables, J.L., Dickel, L.K., Eisch, A.J., and Johnson, J.E. (2011). *Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain*. PloS one 6, (e18472).
133. Kim, H.S., Shin, J., Kim, S.H., Chun, H.S., Kim, J.D., Kim, Y.S., Kim, M.J., Rhee, M., Yeo, S.Y., and Huh, T.L. (2007). *Eye field requires the function of Sfrp1 as a Wnt antagonist*. Neuroscience letters 414, (26-29).
134. Kimbrel, E.A., and Lanza, R. (2015). *Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic*. Nature reviews Drug discovery 14, (681-692).

135. Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., Barami, K., Fraser, R.A., and Goldman, S.A. (1994). *In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. Cerebral cortex 4*, (576-589).
136. Klein, C., Butt, S.J., Machold, R.P., Johnson, J.E., and Fishell, G. (2005). *Cerebellum- and forebrain-derived stem cells possess intrinsic regional character. Development 132*, (4497-4508).
137. Klingener, M., Chavali, M., Singh, J., McMillan, N., Coomes, A., Dempsey, P.J., Chen, E.I., and Aguirre, A. (2014). *N-cadherin promotes recruitment and migration of neural progenitor cells from the SVZ neural stem cell niche into demyelinated lesions. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34*, (9590-9606).
138. Klucky, B., Mueller, R., Vogt, I., Teurich, S., Hartenstein, B., Breuhahn, K., Flechtenmacher, C., Angel, P., and Hess, J. (2007). *Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. Cancer research 67*, (8198-8206).
139. Koch, A.W., Farooq, A., Shan, W., Zeng, L., Colman, D.R., and Zhou, M.M. (2004). *Structure of the neural (N-) cadherin prodomain reveals a cadherin extracellular domain-like fold without adhesive characteristics. Structure 12*, (793-805).
140. Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., and Temple, S. (2012). *VCAM1 Is Essential to Maintain the Structure of the SVZ Niche and Acts as an Environmental Sensor to Regulate SVZ Lineage Progression. Cell stem cell*.
141. Komori, K., Nonaka, T., Okada, A., Kinoh, H., Hayashita-Kinoh, H., Yoshida, N., Yana, I., and Seiki, M. (2004). *Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. FEBS letters 557*, (125-128).
142. Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkentin, J.D., and Radice, G.L. (2005). *Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. Circulation research 96*, (346-354).
143. Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annual review of neuroscience 32*, (149-184).
144. Kuang, S., Gillespie, M.A., and Rudnicki, M.A. (2008). *Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. Cell stem cell 2*, (22-31).
145. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. Cell 129*, (999-1010).
146. Kuhn, P.H., Colombo, A.V., Schusser, B., Dreymueller, D., Wetzell, S., Schepers, U., Herber, J., Ludwig, A., Kremmer, E., Montag, D., et al. (2016). *Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. eLife 5*.
147. Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A. (1999). *Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. Experimental neurology 156*, (333-344).
148. Latefi, N.S., Pedraza, L., Schohl, A., Li, Z., and Ruthazer, E.S. (2009). *N-cadherin prodomain cleavage regulates synapse formation in vivo. Developmental neurobiology 69*, (518-529).
149. Le, T.L., Yap, A.S., and Stow, J.L. (1999). *Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. The Journal of cell biology 146*, (219-232).
150. Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). *Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. Nature 437*, (275-280).
151. Leeper, N.J., Hunter, A.L., and Cooke, J.P. (2010). *Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. Circulation 122*, (517-526).

152. Leimeister, C., Bach, A., and Gessler, M. (1998). *Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family*. *Mechanisms of development* 75, (29-42).
153. Levison, S.W., and Goldman, J.E. (1997). *Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone*. *Journal of neuroscience research* 48, (83-94).
154. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (1997). *Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer*. *Cell* 88, (747-756).
155. Li, P., and Zon, L.I. (2010). *Resolving the controversy about N-cadherin and hematopoietic stem cells*. *Cell stem cell* 6, (199-202).
156. Lie, D.C., Dzieczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., and Gage, F.H. (2002). *The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, (6639-6649).
157. Lilien, J., and Balsamo, J. (2005). *The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin*. *Current opinion in cell biology* 17, (459-465).
158. Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). *Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis*. *Neuron* 28, (713-726).
159. Lin, R., and Iacovitti, L. (2015). *Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair*. *Brain research* 1628, (327-342).
160. Lin, Y., Dong, C., and Zhou, B.P. (2014). *Epigenetic regulation of EMT: the Snail story*. *Current pharmaceutical design* 20, (1698-1705).
161. Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2010). *Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation?* *The Journal of clinical investigation* 120, (29-40).
162. Linford, A., Yoshimura, S., Nunes Bastos, R., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, D.J., and Barr, F.A. (2012). *Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells*. *Developmental cell* 22, (952-966).
163. Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., Myre, M.A., Walker, J.A., Pistocchi, A., Conti, L., *et al.* (2012). *An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin*. *Nat Neurosci* 15, (713-721).
164. Lock, J.G., and Stow, J.L. (2005). *Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin*. *Molecular biology of the cell* 16, (1744-1755).
165. Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). *Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells*. *The Journal of cell biology* 139, (1861-1872).
166. Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annual review of cell and developmental biology* 20, (781-810).
167. Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. *Science* 264, (1145-1148).
168. Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). *Chain migration of neuronal precursors*. *Science* 271, (978-981).

-
169. Ludwig, A., Schulte, A., Schnack, C., Hundhausen, C., Reiss, K., Brodway, N., Held-Feindt, J., and Mentlein, R. (2005). *Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells*. *Journal of neurochemistry* 93, (1293-1303).
170. Luo, J. (2005). *The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex*. *Cerebellum* 4, (239-245).
171. Luskin, M.B., and McDermott, K. (1994). *Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone*. *Glia* 11, (211-226).
172. Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G., and Lopez-Otin, C. (1999). *Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors*. *Cancer research* 59, (2570-2576).
173. Lledo, P.M., Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity*. *Trends in neurosciences* 31, (392-400).
174. Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). *Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury*. *Cell stem cell* 17, (329-340).
175. Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Gotz, M. (2003). *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. *Neuron* 37, (751-764).
176. Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., et al. (2002). *A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. *The EMBO journal* 21, (1948-1956).
177. Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., and Robakis, N.K. (2003). *A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations*. *Cell* 114, (635-645).
178. Marcos, S., Nieto-Lopez, F., Sandonis, A., Cardozo, M.J., Di Marco, F., Esteve, P., and Bovolenta, P. (2015). *Secreted frizzled related proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, (4729-4740).
179. Maret, D., Gruzglin, E., Sadr, M.S., Siu, V., Shan, W., Koch, A.W., Seidah, N.G., Del Maestro, R.F., and Colman, D.R. (2010). *Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion*. *Neoplasia* 12, (1066-1080).
180. Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). *ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, (9182-9187).
181. Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K., and Ffrench-Constant, C. (2010). *Adhesion molecules in the stem cell niche--more than just staying in shape?* *Journal of cell science* 123, (1613-1622).
182. Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., and Pruitt, S.C. (2004). *Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, (1726-1733).
183. Matsumata, M., Uchikawa, M., Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2005). *Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development*. *Developmental biology* 286, (601-617).
184. McFarlane, S. (2003). *Metalloproteases: carving out a role in axon guidance*. *Neuron* 37, (559-562).

185. McGuire, J.K., Li, Q., and Parks, W.C. (2003). *Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium*. The American journal of pathology 162, (1831-1843).
186. Mellman, I., and Warren, G. (2000). *The road taken: past and future foundations of membrane traffic*. Cell 100, (99-112).
187. Menezes, J.R., Smith, C.M., Nelson, K.C., and Luskin, M.B. (1995). *The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain*. Molecular and cellular neurosciences 6, (496-508).
188. Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, (7907-7918).
189. Merkle, F.T., Fuentealba, L.C., Sanders, T.A., Magno, L., Kessaris, N., and Alvarez-Buylla, A. (2014). *Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types*. Nat Neurosci 17, (207-214).
190. Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). *Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone*. Proc Natl Acad Sci U S A 101, (17528-17532).
191. Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). *Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain*. eLife 3, (e02669).
192. Ming, G.L., and Song, H. (2011). *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron 70, (687-702).
193. Miranda, K.C., Khromykh, T., Christy, P., Le, T.L., Gottardi, C.J., Yap, A.S., Stow, J.L., and Teasdale, R.D. (2001). *A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells*. The Journal of biological chemistry 276, (22565-22572).
194. Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain*. Cell stem cell 3, (265-278).
195. Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K., and Takeichi, M. (1989). *Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion*. Science 245, (631-635).
196. Monea, S., Jordan, B.A., Srivastava, S., DeSouza, S., and Ziff, E.B. (2006). *Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, (2300-2312).
197. Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., and Larue, L. (2001). *IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition*. Oncogene 20, (4942-4950).
198. Morshead, C.M., Craig, C.G., and van der Kooy, D. (1998). *In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain*. Development 125, (2251-2261).
199. Muraguchi, T., Takegami, Y., Ohtsuka, T., Kitajima, S., Chandana, E.P., Omura, A., Miki, T., Takahashi, R., Matsumoto, N., Ludwig, A., et al. (2007). *RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity*. Nat Neurosci 10, (838-845).
200. Nadig, R.R. (2009). *Stem cell therapy - Hype or hope? A review*. Journal of conservative dentistry : JCD 12, (131-138).

201. Nakazora, S., Matsumine, A., Iino, T., Hasegawa, M., Kinoshita, A., Uemura, K., Niimi, R., Uchida, A., and Sudo, A. (2010). *The cleavage of N-cadherin is essential for chondrocyte differentiation*. Biochemical and biophysical research communications 400, (493-499).
202. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996a). *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A 93, (11382-11388).
203. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996b). *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science 272, (263-267).
204. Nam, H.S., and Benezra, R. (2009). *High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells*. Cell stem cell 5, (515-526).
205. Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways*. Science 303, (1483-1487).
206. Niehrs, C. (2012). *The complex world of WNT receptor signalling*. Nature reviews Molecular cell biology 13, (767-779).
207. Nieman, M.T., Kim, J.B., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1999). *Mechanism of extracellular domain-deleted dominant negative cadherins*. Journal of cell science 112 (Pt 10), (1621-1632).
208. Niessen, C.M., Leckband, D., and Yap, A.S. (2011). *Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation*. Physiological reviews 91, (691-731).
209. Nieto, M.A. (2002). *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nature reviews Molecular cell biology 3, (155-166).
210. Nieto, M.A. (2013). *Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells*. Science 342, (1234850).
211. Niola, F., Zhao, X., Singh, D., Castano, A., Sullivan, R., Lauria, M., Nam, H.S., Zhuang, Y., Benezra, R., Di Bernardo, D., et al. (2012). *Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells*. Nature cell biology 14, (477-487).
212. Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M., and Mareel, M. (2001). *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. Journal of cell science 114, (111-118).
213. Noles, S.R., and Chenn, A. (2007). *Cadherin inhibition of beta-catenin signaling regulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells*. Molecular and cellular neurosciences 35, (549-558).
214. Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). *Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems*. Cell 54, (993-1001).
215. Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003). *Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease*. N Engl J Med
216. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature 448, (313-317).
217. Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., and Parrinello, S. (2014). *Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells*. Nature cell biology 16, (1045-1056).

218. Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. (1995). *Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion*. *Science* 267, (386-389).
219. Oyarce, K., Bongarzone, E.R., and Nualart, F. (2014). *Unconventional Neurogenic Niches and Neurogenesis Modulation by Vitamins*. *Journal of stem cell research & therapy* 4, (184).
220. Padmashali, R., You, H., Karnik, N., Lei, P., and Andreadis, S.T. (2013). *Adherens junction formation inhibits lentivirus entry and gene transfer*. *PloS one* 8, (e79265).
221. Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. *Nature reviews Molecular cell biology*.
222. Pan, L., Chen, S., Weng, C., Call, G., Zhu, D., Tang, H., Zhang, N., and Xie, T. (2007). *Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the Drosophila ovary*. *Cell stem cell* 1, (458-469).
223. Paradies, N.E., and Grunwald, G.B. (1993). *Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function*. *Journal of neuroscience research* 36, (33-45).
224. Parisini, E., Higgins, J.M., Liu, J.H., Brenner, M.B., and Wang, J.H. (2007). *The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism*. *Journal of molecular biology* 373, (401-411).
225. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2*. *Genes & development* 22, (894-907).
226. Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J.E., Nakafuku, M., Vescovi, A., and Guillemot, F. (2004). *Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain*. *The EMBO journal* 23, (4495-4505).
227. Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). *Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, (6387-6392).
228. Paton, J.A., and Nottebohm, F.N. (1984). *Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits*. *Science* 225, (1046-1048).
229. Paulson, A.F., Prasad, M.S., Thuringer, A.H., and Manzerra, P. (2014). *Regulation of cadherin expression in nervous system development*. *Cell adhesion & migration* 8, (19-28).
230. Pei, D. (1999). *Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP*. *The Journal of biological chemistry* 274, (8925-8932).
231. Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A., and Margolis, F.L. (2004). *Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain*. *Neuroscience* 128, (685-696).
232. Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., and Bonfanti, L. (2005). *Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain*. *The Journal of comparative neurology* 487, (407-427).
233. Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Grondona, J.M., Lopez-Avalos, M.D., Gomez-Pinedo, U., Garcia-Verdugo, J.M., and Fernandez-Llebrez, P. (2010). *IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats*. *The European journal of neuroscience* 31, (1533-1548).
234. Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., Fauser, C., Brancaccio, A., and Engel, J. (1999). *A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation*. *The EMBO journal* 18, (1738-1747).

235. Petreanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). *Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22, (6106-6113).
236. Piccin, D., and Morshead, C.M. (2011). *Wnt signaling regulates symmetry of division of neural stem cells in the adult brain and in response to injury*. Stem cells 29, (528-538).
237. Pincus, D.W., Harrison-Restelli, C., Barry, J., Goodman, R.R., Fraser, R.A., Nedergaard, M., and Goldman, S.A. (1997). *In vitro neurogenesis by adult human epileptic temporal neocortex*. Clinical neurosurgery 44, (17-25).
238. Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F., and Macaulay, V.M. (2000). *Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin*. Proc Natl Acad Sci U S A 97, (12103-12108).
239. Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). *Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 110, (E1045-1054).
240. Porlan, E., Marti-Prado, B., Consiglio, A., and Farinas, I. (2016). *Stable and Efficient Genetic Modification of Cells in the Adult Mouse V-SVZ for the Analysis of Neural Stem Cell Autonomous and Non-autonomous Effects*. J Vis Exp, (53282).
241. Porlan, E., Marti-Prado, B., Morante-Redolat, J.M., Consiglio, A., Delgado, A.C., Kypta, R., Lopez-Otin, C., Kirstein, M., and Farinas, I. (2014). *MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin*. Nature cell biology 16, (629-638).
242. Porlan, E., Morante-Redolat, J.M., Marques-Torrejón, M.A., Andreu-Agullo, C., Carneiro, C., Gomez-Ibarlucea, E., Soto, A., Vidal, A., Ferron, S.R., and Farinas, I. (2013). *Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance*. Nat Neurosci 16, (1567-1575).
243. Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., et al. (2004). *A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model*. The Journal of clinical investigation 113, (1456-1464).
244. Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Gonzalez-Perez, O., and Garcia-Verdugo, J.M. (2007). *The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization*. Neurosurgery clinics of North America 18, (15-20, vii).
245. Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). *Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells*. The Journal of comparative neurology 494, (415-434).
246. Radice, G.L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K.A., Takeichi, M., and Hynes, R.O. (1997). *Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin*. Developmental biology 181, (64-78).
247. Rafii, S., Butler, J.M., and Ding, B.S. (2016). *Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells*. Nature 529, (316-325).
248. Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Farinas, I. (2006). *Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal*. Nat Neurosci 9, (331-339).
249. Ramón y Cajal, S. (1913). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. London: Oxford Univ Press.
250. Raymond, K., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., and Glukhova, M.A. (2009). *Adhesion within the stem cell niches*. Current opinion in cell biology 21, (623-629).

251. Redies, C., Neudert, F., and Lin, J. (2011). *Cadherins in cerebellar development: translation of embryonic patterning into mature functional compartmentalization*. *Cerebellum* 10, (393-408).
252. Redies, C., and Takeichi, M. (1993). *Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 197, (26-39).
253. Reines, A., Bernier, L.P., McAdam, R., Belkaid, W., Shan, W., Koch, A.W., Seguela, P., Colman, D.R., and Dhaunchak, A.S. (2012). *N-cadherin prodomain processing regulates synaptogenesis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, (6323-6334).
254. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). *ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling*. *The EMBO journal* 24, (742-752).
255. Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. *Science* 255, (1707-1710).
256. Riquelme, P.A., Drapeau, E., and Doetsch, F. (2008). *Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 363, (123-137).
257. Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C., and Bovolenta, P. (2005). *SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor*. *Nat Neurosci* 8, (1301-1309).
258. Rose-John, S. (2013). *ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets*. *Pharmacological research* 71, (19-22).
259. Rouso, D.L., Pearson, C.A., Gaber, Z.B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., Morrisey, E.E., and Novitsch, B.G. (2012). *Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS*. *Neuron* 74, (314-330).
260. Rungger-Brandle, E., Ripperger, J.A., Steiner, K., Conti, A., Stieger, A., Soltanieh, S., and Rungger, D. (2010). *Retinal patterning by Pax6-dependent cell adhesion molecules*. *Developmental neurobiology* 70, (764-780).
261. Rutishauser, U., and Landmesser, L. (1991). *Polysialic acid on the surface of axons regulates patterns of normal and activity-dependent innervation*. *Trends in neurosciences* 14, (528-532).
262. Saftig, P., and Bovolenta, P. (2015). *Proteases at work: cues for understanding neural development and degeneration*. *Frontiers in molecular neuroscience* 8, (13).
263. Saftig, P., and Lichtenthaler, S.F. (2015). *The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain*. *Progress in neurobiology* 135, (1-20).
264. Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., et al. (2011). *Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy*. *Nature* 478, (382-386).
265. Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., et al. (2004). *Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration*. *Nature* 427, (740-744).
266. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. (2010). *Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2*. *The EMBO journal* 29, (41-54).
267. Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., and Shimono, A. (2006). *Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis*. *Development* 133, (989-999).

268. Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). *New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain.* *Science* 311, (629-632).
269. Schwartz, C.M., Tavakoli, T., Jamias, C., Park, S.S., Maudsley, S., Martin, B., Phillips, T.M., Yao, P.J., Itoh, K., Ma, W., *et al.* (2012). *Stromal factors SDF1alpha, sFRP1, and VEGFD induce dopaminergic neuron differentiation of human pluripotent stem cells.* *Journal of neuroscience research* 90, (1367-1381).
270. Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2002). *Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors.* *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, (1784-1793).
271. Sekine-Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Arai, H., Aizawa, H., Iwata, N., and Saido, T.C. (2001). *Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum.* *The European journal of neuroscience* 13, (935-948).
272. Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Al-Nielsen, J., Colman, D.R., and Hendrickson, W.A. (1995). *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.* *Nature* 374, (327-337).
273. Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). *Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions.* *Cell stem cell* 3, (289-300).
274. Shimamura, K., and Takeichi, M. (1992). *Local and transient expression of E-cadherin involved in mouse embryonic brain morphogenesis.* *Development* 116, (1011-1019).
275. Shirayoshi, Y., Okada, T.S., and Takeichi, M. (1983). *The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development.* *Cell* 35, (631-638).
276. Shoulson, I. (1998). *Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs.* *Science* 282, (1072-1074).
277. Shoval, I., Ludwig, A., and Kalcheim, C. (2007). *Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination.* *Development* 134, (491-501).
278. Silva-Vargas, V., Crouch, E.E., and Doetsch, F. (2013). *Adult neural stem cells and their niche a dynamic duo during homeostasis regeneration and aging.*
279. Siney, E.J., Holden, A., Casselden, E., Bulstrode, H., Thomas, G.J., and Willaime-Morawek, S. (2016). *Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 Mediate Migration and Differentiation in Glioblastoma Sphere-Forming Cells.* *Molecular neurobiology.*
280. Singh, V.K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., and Chandra, R. (2015). *Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery.* *Frontiers in cell and developmental biology* 3, (2).
281. Smith, A.N., Miller, L.A., Radice, G., Ashery-Padan, R., and Lang, R.A. (2009). *Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis.* *Development* 136, (2977-2985).
282. Sohn, J., Orosco, L., Guo, F., Chung, S.H., Bannerman, P., Mills Ko, E., Zarbalis, K., Deng, W., and Pleasure, D. (2015). *The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice.* *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, (3756-3763).

283. Song, X., Zhu, C.H., Doan, C., and Xie, T. (2002). *Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches*. *Science* 296, (1855-1857).
284. Sottile, J. (2004). *Regulation of angiogenesis by extracellular matrix*. *Biochimica et biophysica acta* 1654, (13-22).
285. Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2003). *Spatial control of exocytosis*. *Current opinion in cell biology* 15, (430-437).
286. Stan, A., Pielarski, K.N., Brigadski, T., Wittenmayer, N., Fedorchenko, O., Gohla, A., Lessmann, V., Dresbach, T., and Gottmann, K. (2010). *Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, (11116-11121).
287. Strathdee, G. (2002). *Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin*. *Seminars in cancer biology* 12, (373-379).
288. Stumm, R.K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M., Kriegelstein, J., Holtt, V., and Schulz, S. (2002). *A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, (5865-5878).
289. Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., Johnson, J.J., Ghosh, S., Fishman, D.A., Hudson, L.G., and Stack, M.S. (2007). *Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells*. *Cancer research* 67, (2030-2039).
290. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell* 126, (663-676).
291. Takeichi, M. (1977). *Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins*. *The Journal of cell biology* 75, (464-474).
292. Takeichi, M. (1988). *The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis*. *Development* 102, (639-655).
293. Takeichi, M. (1995). *Morphogenetic roles of classic cadherins*. *Current opinion in cell biology* 7, (619-627).
294. Takeichi, M., Atsumi, T., Yoshida, C., Uno, K., and Okada, T.S. (1981). *Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca²⁺-dependent sites*. *Developmental biology* 87, (340-350).
295. Tamura, K., Shan, W.S., Hendrickson, W.A., Colman, D.R., and Shapiro, L. (1998). *Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin*. *Neuron* 20, (1153-1163).
296. Tang, L., Hung, C.P., and Schuman, E.M. (1998). *A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation*. *Neuron* 20, (1165-1175).
297. Tanihara, H., Sano, K., Heimark, R.L., St John, T., and Suzuki, S. (1994). *Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin*. *Cell adhesion and communication* 2, (15-26).
298. Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). *A specialized vascular niche for adult neural stem cells*. *Cell stem cell* 3, (279-288).
299. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell* 139, (871-890).

300. Tong, C.K., Han, Y.G., Shah, J.K., Obernier, K., Guinto, C.D., and Alvarez-Buylla, A. (2014). *Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 111, (12438-12443).
301. Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B.S., Bodine, P.V., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2008). *Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development*. Journal of cellular physiology 217, (113-126).
302. Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A., and Shimohama, S. (2006). *Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1*. Neuroscience letters 402, (278-283).
303. van den Bout, C.J., Machon, O., Rosok, O., Backman, M., and Krauss, S. (2002). *The mouse enhancer element D6 directs Cre recombinase activity in the neocortex and the hippocampus*. Mechanisms of development 110, (179-182).
304. van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature 415, (1030-1034).
305. Vincent, B., and Checler, F. (2012). *alpha-Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins*. Current Alzheimer research 9, (140-156).
306. Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). *Plasticity of adult stem cells*. Cell 116, (639-648).
307. Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., and Moos, M., Jr. (1997). *Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8*. Cell 88, (757-766).
308. Wang, X., Yi, J., Lei, J., and Pei, D. (1999). *Expression, purification and characterization of recombinant mouse MT5-MMP protein products*. FEBS letters 462, (261-266).
309. Warren, K.M., Reeves, T.M., and Phillips, L.L. (2012). *MT5-MMP, ADAM-10, and N-cadherin act in concert to facilitate synapse reorganization after traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma 29, (1922-1940).
310. Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S.V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D., Moore, S., Daria, A., et al. (2015). *eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus*. Nature 526, (443-447).
311. Xiao, K., Allison, D.F., Buckley, K.M., Kottke, M.D., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2003). *Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells*. The Journal of cell biology 163, (535-545).
312. Xu, Q., D'Amore, P.A., and Sokol, S.Y. (1998). *Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist*. Development 125, (4767-4776).
313. Yagita, Y., Sakurai, T., Tanaka, H., Kitagawa, K., Colman, D.R., and Shan, W. (2009). *N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation*. Journal of neuroscience research 87, (3331-3342).
314. Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., et al. (2006). *Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, (6627-6636).
315. Yamashita, Y.M., and Fuller, M.T. (2008). *Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division*. The Journal of cell biology 180, (261-266).

-
316. Yanagisawa, M., Kaverina, I.N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A.B., and Anastasiadis, P.Z. (2004). *A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function*. The Journal of biological chemistry 279, (9512-9521).
317. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell 117, (927-939).
318. Yap, A.S., Brieher, W.M., Pruschy, M., and Gumbiner, B.M. (1997). *Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function*. Current biology : CB 7, (308-315).
319. Yong, V.W. (2005). *Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS*. Nature reviews Neuroscience 6, (931-944).
320. Yoon, S.O., Lois, C., Alvarez, M., Alvarez-Buylla, A., Falck-Pedersen, E., and Chao, M.V. (1996). *Adenovirus-mediated gene delivery into neuronal precursors of the adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A 93, (11974-11979).
321. Yu, C.H., Nguyen, T.T., Irvine, K.M., Sweet, M.J., Frazer, I.H., and Blumenthal, A. (2014). *Recombinant Wnt3a and Wnt5a elicit macrophage cytokine production and tolerization to microbial stimulation via Toll-like receptor 4*. European journal of immunology 44, (1480-1490).
322. Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Birchmeier, W., and Birchmeier, C. (2003). *beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system*. Developmental biology 258, (406-418).
323. Zhang, L., Yang, X., Yang, S., and Zhang, J. (2011). *The Wnt /beta-catenin signaling pathway in the adult neurogenesis*. The European journal of neuroscience 33, (1-8).
324. Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell 132, (645-660).
325. Zhuang, J., Wei, Q., Lin, Z., and Zhou, C. (2015). *Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain*. Gene 555, (150-158).
326. Zhuo, L., Theis, M., Alvarez-Maya, I., Brenner, M., Willecke, K., and Messing, A. (2001). *hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo*. Genesis 31, (85-94).
327. Zucker, S., Pei, D., Cao, J., and Lopez-Otin, C. (2003). *Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP)*. Current topics in developmental biology 54, (1-74).