



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

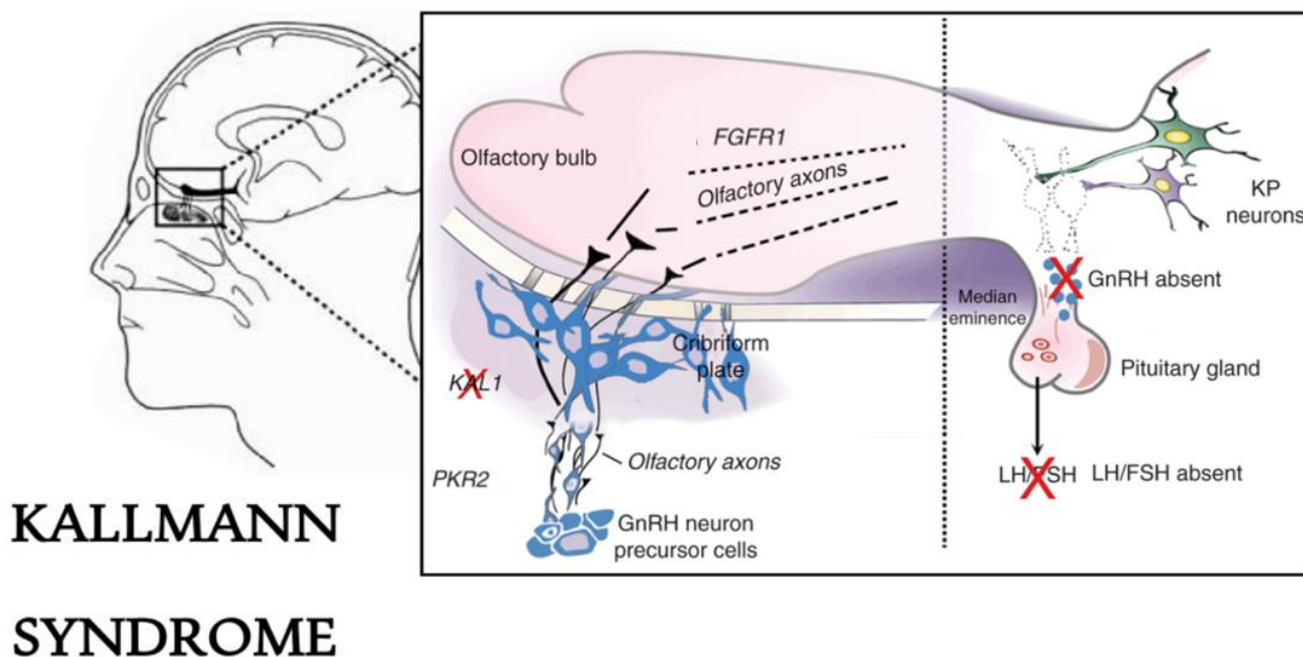


FUNDACIÓN del
HOSPITAL NACIONAL
de PARAPLÉJICOS

IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE ANOSMINA 1 IMPLICADOS EN LA MODULACIÓN DE PKR2

Marina Muñoz López

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Dr. Miquel Mulero Abellán, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, miquel.mulero@urv.cat

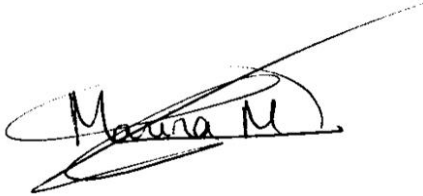
En cooperación con: Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo para la Investigación y la Integración.

Supervisor: Dr. Pedro Felipe Esteban Ruiz, Grupo de Investigación de Neuroinflamación, pfesteban@sescam.iccm.es

Junio 2020

Jo, Marina Muñoz López, amb DNI 03952853G, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 8 de Junio de 2020



Fdo. Marina Muñoz López. 4º Curso Biotecnología.

ÍNDICE

1.	Agradecimientos	3
2.	Datos del centro	4
3.	Resumen.....	5
4.	Abreviaturas.....	6
5.	Introducción	7
5.1	Síndrome de Kallmann.....	7
5.2	Migración de los precursores de las neuronas GnRH desde la placoda olfatoria hasta el hipotálamo.....	8
5.3	Gen <i>ANOS1</i> , caracterización de la proteína de matriz extracelular anosmina 1 y mutaciones reportadas en KS	10
5.4	Mecanismo de acción de anosmina 1 en el SNC.....	12
5.5	Procinetinas e interacción con anosmina 1.....	15
6.	Hipótesis y objetivos	20
7.	Metodología	21
7.1	Cultivo celular	21
7.2	Transfección celular	21
7.3	Señalización celular y Western-Blot	22
7.4	Cuantificación y análisis estadístico	24
7.5	Construcción de plásmidos.....	25
8.	Resultados	27
8.1	Efecto de la mutación A1C172R en la modulación de PKR2.....	27
8.2	Construcción del plásmido A1WAPFnIII.1	30
9.	Discusión.....	32
10.	Conclusiones.....	37
10.1	Breve resumen visual del trabajo realizado.....	38
11.	Experimentos planificados no realizados	40
12.	Bibliografía	41
13.	Autoevaluación.....	46

1. Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Dr. Pedro Felipe Esteban que me acogiera y haya tenido la enorme generosidad de asumir mi tutoría durante estos meses. Me integró en el grupo como una más y me siento en deuda, pues me ha permitido aprender de él la metodología, habilidad, destreza y conocimientos que requieren enfrentarse a esta línea de investigación. Si la paciencia y perseverancia son dos cualidades que no deberían faltar a la hora de trabajar en cualquier ámbito, ambas me han sido sin duda transmitidas por mi tutor.

Quisiera expresar también mi gratitud al Dr. Miquel Mulero quien me ha guiado en todo momento. Por su esfuerzo, dedicación, por su ayuda y consejos que sin duda han enriquecido mi trabajo. Definitivamente las múltiples reuniones de Skype que hemos mantenido me han llenado de motivación y servido de inspiración para seguir progresando en esta difícil tarea.

Especialmente quiero agradecer a mis dos tutores que, en estos tiempos tan difíciles de confinamiento, hayan puesto a mi disposición sus correos electrónicos para acusar en todo momento recibo de mi trabajo. Pero sobre todo valoro, el haber obtenido siempre de su parte puntual y cumplida respuesta. Esta extraordinaria disposición ha constituido para mí *“tónico moral de primer orden”*.

Finalmente quisiera dar las gracias a mi madre por su apoyo incondicional, pero también a mi padre, por sus continuos consejos, por creer en mí y compartir conmigo una certeza: la biología es un mundo apasionante, aún por descubrir...

2. Datos del centro

Este trabajo de Fin de Grado recoge mi estancia en el grupo de Investigación de “Neuroinflamación”, dirigido por el Dr. Eduardo Molina Holgado, perteneciente a la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, centro de referencia nacional especializado en la lesión medular espinal, reconocido por el Ministerio de Sanidad del Gobierno de España. El edificio se localiza en la Finca de la Peraleda, s/n, 45071 Toledo, España.

En el año 2003 se creó la Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo para la investigación y la integración, encargada de contribuir en el desarrollo de la investigación clínica y técnica en el campo de la biomedicina y ciencias de la salud. En el año 2016 se pusieron en marcha los laboratorios de investigación, centrados en cuatro áreas: Fisiología y función del sistema nervioso lesionado; Biología celular, molecular y bioquímica de la lesión nerviosa; Robótica de rehabilitación y biomateriales aplicados a la lesión nerviosa; Servicios de apoyo a la investigación. Con tres grupos consolidados en Investigación Clínica y trece grupos en Investigación Básica.

El grupo de Neuroinflamación trabaja en el campo de la neurobiología, con experiencia clínica en la lesión medular y trastornos asociados. El Dr. Molina, junto a su equipo multidisciplinar, del cual forma parte mi tutor el Dr. Pedro Felipe Esteban Ruiz, centran sus esfuerzos en encontrar nuevos candidatos como diana terapéutica en el tratamiento de los déficits y anomalías de la mielina en la lesión medular. Para ello, el papel del receptor CB1 y los ligandos endocannabinoides podrían ser la solución para la remielinización axonal y patologías desmielinizantes. Es importante destacar el trabajo liderado por el Dr. Esteban, en el cual me he visto involucrada estos meses y se describe a continuación. Se centra en la comprensión de los procesos moleculares que subyacen tras enfermedades neurológicas, como es el Síndrome de Kallmann.

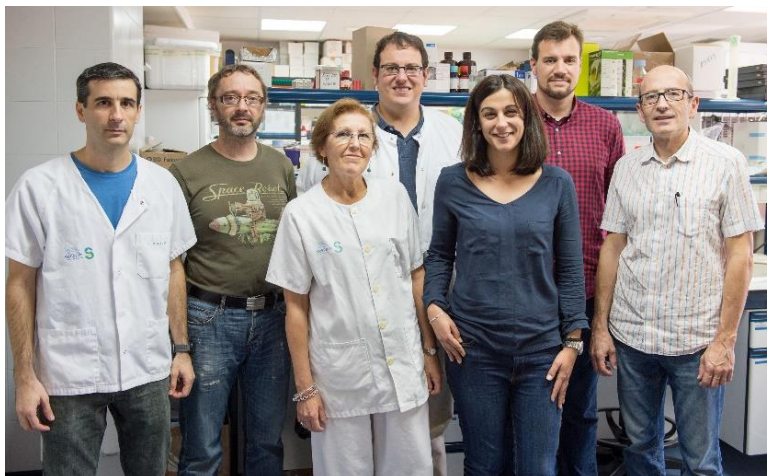


Figura 1. Miembros del grupo de Investigación de Neuroinflamación

3. Resumen

El síndrome de Kallmann (KS) es una enfermedad rara causada por la migración deficiente de los precursores de neuronas productoras de la GnRH desde la placoda olfatoria hasta el hipotálamo, repercutiendo en el funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-gonadal y en el desarrollo de los bulbos olfatorios. Los pacientes con KS se caracterizan por presentar hipogonadismo hipogonadotrópico y anosmia. Mutaciones descritas en los genes *ANOS1* (o *KAL1*), *FGFR1*, *PKR2* y *PK2*, han sido asociadas con esta patología. El gen *ANOS1* codifica para la glicoproteína de ECM anosmina 1 (A1). A1 presenta un papel clave en la migración y adhesión de varios tipos celulares en el SNC. El mecanismo de acción de A1 mejor conocido es su participación en la modulación de la activación de FGFR1. Se planteó la hipótesis de la interacción y modulación por parte de A1 de la actividad de PKR2. Ratones mutantes para *Pkr2* y ratones que sobreexpresan A1, muestran la implicación de ambas proteínas en los mismos procesos biológicos. Estudios recientes indican la interacción entre A1 y PKR2, y la participación de los dominios N-terminales de A1 en la modulación de PKR2. Este trabajo revela cómo afecta la mutación C172R en el dominio WAP de A1 en la modulación de la activación de las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2. Los resultados sugieren que WAP es esencial y la mutación C172R interfiere en la modulación de la activación de PKR2. Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el papel de los dominios CR y FnIII.1 de A1, cuya participación debe ser explicada mediante el estudio de mutaciones en FnIII.1 y la versión A1WAPFnIII.1 creada en este estudio.

Palabras clave: anosmina 1 (A1), síndrome de Kallmann (KS), receptor 2 de procinetina (PKR2), modulación, señalización.

4. Abreviaturas

KS	Síndrome de Kallmann
HH	Hipogonadismo hipogonadotrópico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
A1	anosmina 1
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico
FGF1	Factor de crecimiento fibroblástico 1
PKR2	Receptor 2 de procineticina
PK2	Procineticina 2
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
HPG	Eje hipotalámico-pituitario-gonadal
OEC	Células olfativas envainadas
OE	Epitelio olfatorio principal
VNO	Órgano vomeronasal
OAs	Axones sensoriales olfativos
CR	Dominio rico en cisteína
WAP	Proteína ácida de suero
FnIII	Fibronectina tipo III
SNC	Sistema nervioso central
OB	Bulbo olfatorio
RMS	Corriente migratoria rostral
Mit1	Toxina intestinal de mamba 1
Bv8	<i>Bombina variegata</i> 8
SVZ	Zona subventricular
TH	Tirosina hidroxilasa
HS	Heparán sulfato
GPCR	Receptor acoplado a la proteína G
GRK2	GPCR quinasa 2
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
ERK1/2	Proteína quinasa regulada por señal extracelular
KO	<i>Knockout</i>

5. Introducció

5.1 Síndrome de Kallmann

El Síndrome de Kallmann (KS, OMIM#308700) es un trastorno congénito del hipotálamo. Se caracteriza por hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) con pérdida de la capacidad olfativa parcial (hiposmia) o total (anosmia) (1).

Fue el médico español Dr. Aureliano Maestre de San Juan quien, en 1856, al practicar una autopsia, describió la existencia de hipogonadismo y ausencia de los bulbos olfatorios (OB). Tras ese hallazgo, y *“con objeto de utilizar para la ciencia este notabilísimo caso”*, contactó con la hermana del fallecido, quien le confirmó la realidad de la ausencia del sentido del olfato en el finado. Sin embargo, no fue hasta el año 1944, cuando el genetista y psiquiatra estadounidense nacido en Alemania, el Dr. Franz Josef Kallmann, le puso el nombre a esta enfermedad, describiendo así los aspectos genéticos subyacentes. Posteriormente, fue en 1954, cuando de Morsier informó de la ausencia parcial o total del OB en pacientes con KS. Es por ello, que este trastorno es también conocido como **Síndrome Maestre-Kallmann-Morsier**.

El KS presenta tanto modos de herencia ligados al cromosoma X, como autosómicos dominantes y recesivos (2). La mayoría de los casos se manifiestan en la edad pediátrica y en la adolescencia. Se estima que su prevalencia es de 1/8.000 en varones y de 1/40.000 en mujeres (3), con lo que tiene la consideración de enfermedad rara.

La anosmia o hiposmia en el KS es producida por una interrupción primaria de las fibras nerviosas olfativas, vomeronasales y terminales de la región frontonasal. Se ha descrito en pacientes con KS malformaciones de los OB, por un desarrollo incompleto (hipoplasia) o ausencia (aplasia) de los mismos (4). Estos defectos en el desarrollo de las vías olfativas son en parte responsables de una migración anormal durante el desarrollo embrionario de los precursores de las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), desde su origen en la placoda olfatoria hasta el prosencéfalo. En consecuencia, se produce un espectro de patrones secretores anormales de GnRH endógena (5) y concentraciones séricas muy bajas de la hormona luteinizante (LH), folículoestimulante (FSH) y testosterona. Estos patrones de secreción disminuidos dan lugar a una maduración sexual incompleta con ausencia de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios e infertilidad (6). Es lo que se conoce como hipogonadismo hipogonadotrópico. Con terapias hormonales sustitutivas se podría inducir la pubertad y la fertilidad. El tratamiento con testosterona para hombres y la combinación de estrógenos y progesterona para mujeres, estimula el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios; mientras que, para inducir la fertilidad, se usa la

liberación pulsátil de LH y FSH o de GnRH (7). Sin embargo, en la actualidad, no existe tratamiento alguno para la anosmia.

El KS es una enfermedad sin riesgo vital, no obstante, afecta en gran medida a la calidad de vida del individuo. Los pacientes con KS pueden llegar a presentar manifestaciones satélites (síntomas que no son propios de la base de la enfermedad), desde movimientos en espejo (sincinesia bimanual), agenesia renal unilateral, hasta defectos craneofaciales de la línea media (paladar muy arqueado y labio leporino), agenesia dental, pérdida auditiva (8), problemas oculares, anomalías de los huesos de las extremidades y dedos (4), entre otros.

Varios estudios han demostrado la aparición de una combinación de mutaciones en uno o más genes que constituirían la base de la enfermedad. Se han descrito mutaciones en los genes *ANOS1* (anteriormente denominado *KAL1*), ligado al cromosoma X, que codifica para la proteína de la matriz extracelular anosmina 1 (A1); en el gen *FGFR1* (o *KAL2*) que codifica para el receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico, en una forma autosómica dominante de la enfermedad; y en los genes *PKR2* (o *KAL3*) y *PK2* (o *KAL4*) que codifican así mismo para el receptor y ligando de procineticina 2, respectivamente. Dichos genes están involucrados en la herencia autosómica recesiva del KS (9,10); también se han asociado los genes *CDH7* (o *KAL5*); *FGF8* (o *KAL6*); *NELF*; *WDR11*; *SEM3A*; *HS6ST1*; *HESX1*, entre otros, con el KS (11).

5.2 Migración de los precursores de las neuronas GnRH desde la placoda olfatoria hasta el hipotálamo

La placoda olfatoria es una región en la que existe una estrecha relación entre el sistema olfativo y las neuronas GnRH. Como muestra la **figura 2**, durante los primeros estadios del desarrollo embrionario de los vertebrados, los precursores de las neuronas GnRH (azul) se originan en la placoda olfatoria, junto a neuronas sensoriales olfativas (encargadas de detectar olores) y a las células olfativas envainadas (OECs). Durante la invaginación de la placoda olfatoria para formar el epitelio olfatorio principal (OE) y el órgano vomeronasal (VNO), estos precursores de neuronas GnRH migran desde el VNO, a lo largo de los axones olfatorios (OAs; verde) y vomeronasales (líneas negras) cubiertos por OECs (rosa), expandiéndose de manera continua y recorriendo largas distancias pasando por el bulbo olfatorio (OB) hasta el hipotálamo (4).

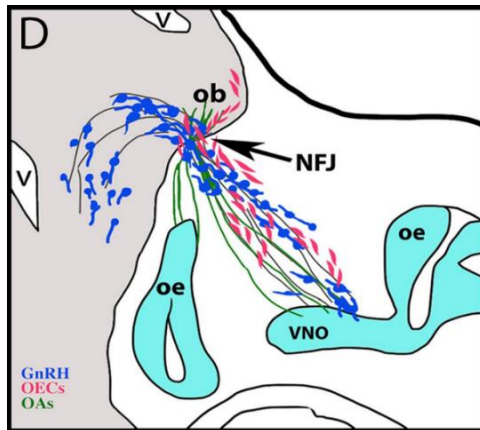


Figura 2. Componentes que forman el paquete migratorio de GnRH durante el desarrollo. Adaptado de (4).

Para que los precursores de las neuronas GnRH migren adecuadamente y lleguen al sitio correspondiente, se requiere de la coordinación de señales de guía extracelulares, sustancias quimiotácticas y elementos del citoesqueleto intracelulares. En este sentido, en la **figura 3** se ilustra un precursor neuronal GnRH (azul) a lo largo de los haces de OAs (verde) recubiertos por OEC (beige). Podemos observar los diferentes recuadros que indican las categorías de señales implicadas en esta migración. Desde señales de gradientes de atracción (recuadro rojo) que incluyen el factor de fibroblastos 8 (FGF8), el receptor 1 de FGF (FGFR1), factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), receptor 2 de procinetina (Prok2), GABA, entre otros; hasta señales de crecimiento de axón (recuadro verde) y moléculas de adhesión (recuadro azul), mecanismos donde la proteína anosmina 1 participa activamente. Los recuadros pequeños morados muestran las principales interacciones actina/microtúbulos, así como de actomiosina, que participan tanto en el proceso anterior como posterior a la migración neuronal de GnRH (4,12).

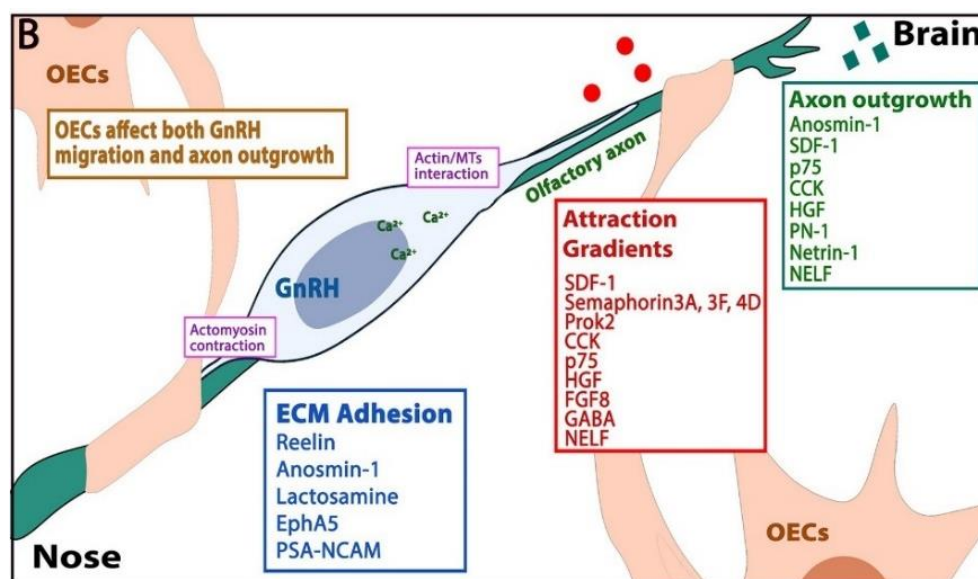


Figura 3. Ilustración de una neurona GnRH durante el proceso migratorio. Adaptado de (4).

Respecto a la señalización endocrina, como podemos ver en el esquema de la **figura 4**, una vez en el hipotálamo, durante la edad adulta, las células neuroendocrinas productoras de GnRH llevan a cabo la señalización hormonal a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG), estimulando la liberación de gonadotropinas (LH y FSH) desde la hipófisis, controlando la maduración gonadal y la fisiología reproductiva del adulto (8). Dado que las neuronas GnRH comparten eventos de desarrollo con las neuronas sensoriales olfativas, un defecto en su migración, debido a mutaciones en estos genes como se han descrito en pacientes con KS (indicados a la derecha de la **figura 4**), producen un retraso de la pubertad e infertilidad (hipogonadismo hipogonadotrópico) y alteraciones en el sentido del olfato (anosmia) (13).

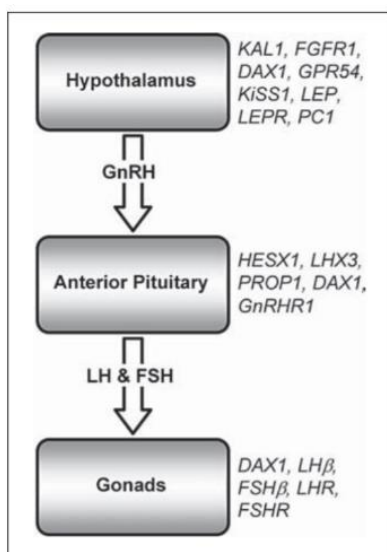


Figura 4. Diagrama esquematizado del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). Extraída de (13).

5.3 Gen *ANOS1*, caracterización de la proteína de matriz extracelular anosmina 1 y mutaciones reportadas en KS

El gen *ANOS1* (o *KAL1*), fue el primer gen descrito en la década de 1990 asociado con el KS. Tal como se puede observar en la **figura 5A**, se encuentra en la región Xp22.3, en el brazo corto del cromosoma X. El gen *ANOS1* escapa parcialmente de la inactivación del cromosoma X y presenta un homólogo no funcional en el cromosoma Y (*KALP*) en la región Yq11 (14). Como muestran los números representados en la estructura del ARNm, consta de 14 exones, que se correlacionan con la distribución de los dominios de la glicoproteína de la matriz extracelular de 680 aminoácidos anosmina 1 (como indica el área sombreada de la figura). A1 está formada por un dominio rico en cisteína N-terminal (CR), un dominio de proteína ácida de suero (WAP), cuatro dominios de fibronectina tipo III (FnIII.1, FnIII.2, FnIII.3 y FnIII.4) y una región C-terminal rica en histidina (H). En la región N-terminal también encontramos una región con un péptido señal para su posterior secreción. La **figura 5B** muestra el dominio WAP de A1 (en rojo)

que comprende desde el residuo 127 al 176, entre los cuales podemos destacar 8 residuos de cisteína conservados, involucrados en 4 enlaces disulfuro (flechas azules) encargados de estabilizar la estructura terciaria de anosmina 1 (15). Varios estudios han demostrado la presencia del dominio WAP en inhibidores de proteasas, así como los dominios FNIII en tirosina quinasas y fosfatasa, proteínas involucradas en la adhesión celular. A lo largo de su secuencia hay cinco sitios potenciales de unión a heparán sulfatos (HP) y seis sitios para una posible N-glicosilación. Las principales delecciones de exón se muestran en la figura con líneas negras, y las mutaciones puntuales se indican con flechas, el tamaño de las flechas indica la frecuencia de las mutaciones identificadas (3,5).

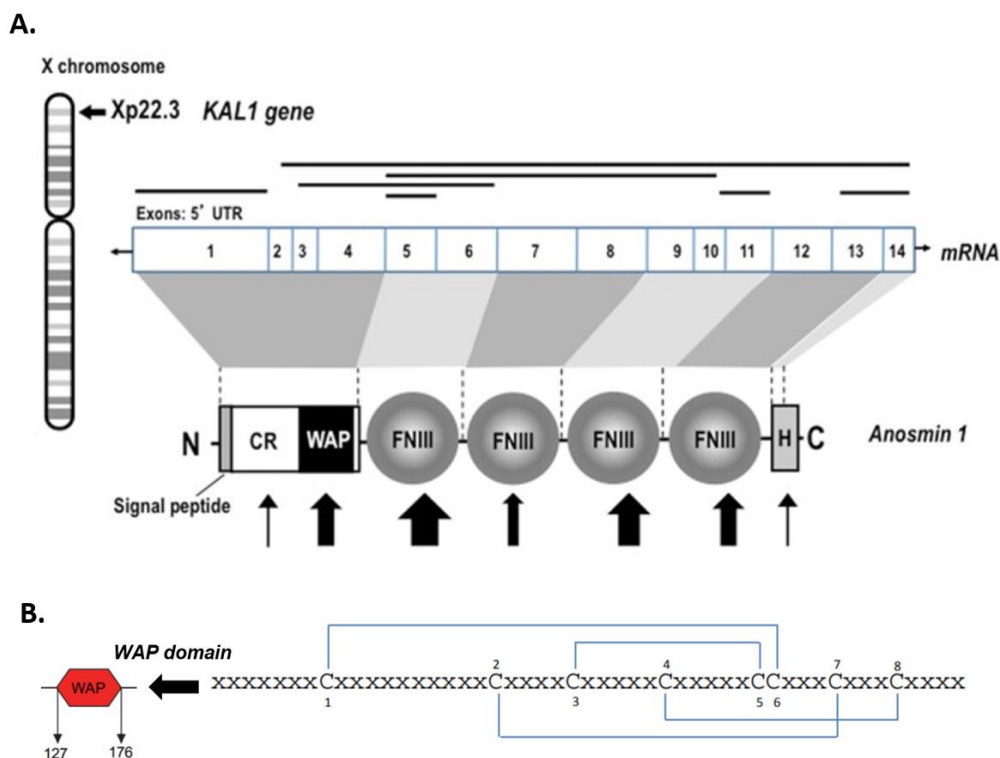


Figura 5. A. Estructura del gen *ANOS1* y de la proteína anosmina 1. Extraída de (3). **B.** Enlaces disulfuro intramoleculares altamente conservados en el dominio WAP de anosmina 1. Modificada de (15).

El gen *ANOS1* se conserva en gran medida tanto en especies de vertebrados como de invertebrados, desde *Caenorhabditis elegans* (con un 42% de homología con el ser humano) y *Drosophila melanogaster* (38%), hasta algunos roedores (74%) y primates como el chimpancé (97%). Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún ortólogo a *ANOS1* en ratones o ratas, a pesar que compartimos el 99% de los genes (3,16). Se ha descrito en mamíferos la existencia de una región pseudoautosómica 1 (PAR1) en la porción terminal del brazo corto del cromosoma X, adyacente a la región

donde se encuentra el gen *ANOS1*. Es un área homóloga a la secuencia de ADN del cromosoma Y. Durante la meiosis los cromosomas X e Y se aparean en esta región e intercambian el ADN. Muchos de los genes localizados en PAR1 y en la región proximal donde se encuentra el gen *ANOS1* (caracterizada por ser altamente variable e inestable), no han podido ser identificados en ratones ni ratas, lo que indica que en su ancestro común haya podido ocurrir una translocación o eliminación de los mismos o se hayan localizado en cromosomas autosómicos (17,18).

Se han identificado en pacientes con KS alrededor de 60 mutaciones en el gen *ANOS1*. De las cuales se atribuyen a deleciones o inserciones, introduciendo un codón de parada prematuro o cambios de marco de lectura. Casi el 50% de las mutaciones sin sentido se encuentran en los dominios WAP y FnIII.1 (19). Otras mutaciones provocan cambios en los aminoácidos que conforman A1, alterando el tamaño de dicha proteína, o interrumpiendo la producción/función normal de A1 durante el desarrollo (3). En la actualidad, aún sigue siendo difícil establecer una relación estrecha entre la aparición de una mutación en el gen *ANOS1* con la presencia de un fenotipo particular. Manifestaciones satélites asociadas a pacientes con KS, no sólo se originan a partir de mutaciones en regiones codificantes de este gen, sino también en promotores o regiones que no se traducen, como ocurriría con la sincinesia bimanual. Del mismo modo, estos síntomas no se asocian con un único tipo de mutación. Por ejemplo, la agenesia renal en el KS, es causada tanto por mutaciones sin sentido (como R191X y L250X en el dominio FnIII.1 o R613X en FnIII.3) como por deleciones (del exón 5 al 10, abarcando desde el dominio FnIII.1 al FnIII.3) (16).

5.4 Mecanismo de acción de anosmina 1 en el SNC

Las glicoproteínas de la ECM participan activamente en la organización general del SNC. Proporcionan soporte estructural, controlan la distribución y concentración de los factores de crecimiento, así como la diferenciación celular. Sin embargo, su papel principal es el de actuar como sustrato para la migración de células móviles (migración neuronal), para posteriormente posicionarlas en regiones específicas del cerebro en desarrollo, donde se diferenciarán terminalmente integrándose en los circuitos neuronales hasta la edad adulta (20).

A1 es una glicoproteína de la ECM de adhesión celular que promueve el crecimiento y ramificación neuronal, la orientación axonal y la migración de múltiples tipos de precursores neuronales (precursores de oligodendrocitos y de neuronas productoras de GnRH), controlando la señalización hormonal a través del eje HPG (5,21). Participa activamente en la migración en cadena de los precursores neuronales que se generan

en la zona subventricular (SVZ), a lo largo de la corriente migratoria rostral (RMS), donde entran en contacto cercano entre sí y con la superficie de otras neuronas, recubiertas por un tubo glial que proporciona a su vez, información de la orientación para estas neuronas hacia los OB. Una vez en el OB, los precursores neuronales acaban migrando radialmente, colonizando dicho OB (20). Lo que sugiere que además de los mecanismos propios celulares, la actuación de glicoproteínas de la ECM, como A1, puede ser determinante durante este proceso.

Aunque queda aún por desentrañar el mecanismo de acción completo de A1, se cree que interacciona con diferentes componentes de la ECM y receptores de membrana. La interacción de A1 con el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) y la modulación de su actividad mediada por el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), es el mecanismo mejor estudiado hasta la fecha (22). FGFR1 pertenece a la familia tirosina quinasa de los receptores FGFRs que consisten en un dominio transmembrana y un dominio de quinasa citoplasmática. La región extracelular está formada por tres dominios de tipo inmunoglobulina llamados D1, D2 y D3 (23). En 2009, Hu y colaboradores demostraron mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) que los dominios CR, WAP y FnIII.1 de A1 interaccionaban con los dominios extracelulares D₂-D₃ de FGFR1 (24). En 2010, Murcia-Belmonte y colaboradores continuaron con el estudio de la interacción entre FGFR1 y A1, determinando mediante GST pull-down, que los dominios WAP y FnIII.1 por sí solos no podían interaccionar con el receptor, sino que era necesaria su combinación, a diferencia de FnIII.3 que sí podía hacerlo sin la presencia del resto de dominios. Asimismo, observaron que a pesar que el dominio CR de A1 no se encontraba involucrado en esta unión, podía tener un papel regulador, ya que la presencia del mismo, reducía la interacción entre estas dos proteínas (22).

Es importante mencionar el papel de los heparán sulfato proteoglicanos (HS) en la interacción molecular entre A1, FGFR1 y FGF2. Como podemos observar en la **figura 6**, cuando la glicoproteína A1 se une a HS mediante los dominios FnIII, se localiza correctamente en la ECM para poder posteriormente formar un complejo estable con el receptor FGFR1 y FGF2 mediante los dominios D₂-D₃, activándolo y ejerciendo su actividad biológica: migración celular, crecimiento neuronal y reordenamiento del citoesqueleto. También es importante que no exista un exceso de A1, ya que de este modo ocupará todos los lugares de unión a HS evitando la formación de este complejo (23).

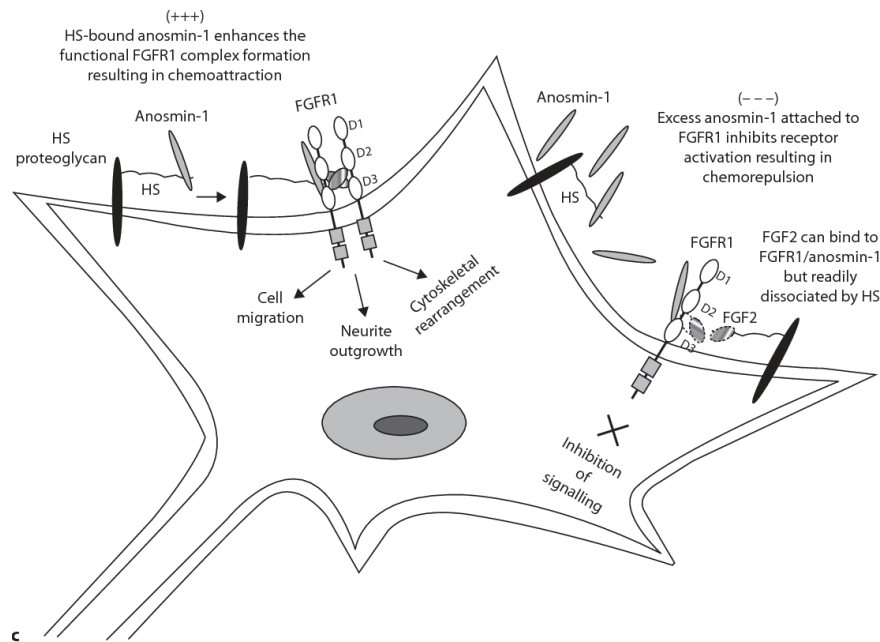


Figura 6. Mecanismo de la interacción molecular entre anosmina 1, FGFR1, FGF2 y HS en la superficie celular. Extraído de: (23).

Diversos estudios han demostrado la participación de anosmina 1 y FGFR1 durante la migración de los precursores neuronales de la SVZ. De hecho, se ha descrito en pacientes con KS la presencia de diferentes mutaciones en el gen *ANOS1* que podrían anular la unión a FGFR1 y la actividad biológica de A1. Esteban y colaboradores en 2013 demostraron que la mutación de cambio de aminoácido correspondiente al dominio WAP, C172R, no interfería en la interacción con FGFR1, por el contrario, la mutación N267K en el dominio FnIII.1, parecía impedir esta unión. A su vez, cualquiera de estas mutaciones (C172R o N267K) en anosmina 1, anulaba su efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de la SVZ. No obstante, el estudio de la región N-terminal de A1 formada por los dominios CR-WAP-FnIII.1 (A1Nt), demostró que esta proteína truncada mantenía su función biológica aun cuando estas mutaciones se encontraban presentes (16).

Existe una interacción clara y fuerte entre FGFR1 y FnIII.3. Mutaciones descritas en pacientes con KS ubicadas en el dominio FnIII.3, como las representadas con un asterisco rojo y otro rosa en la **figura 7** que marcan E514K y F517L, respectivamente, anulan o reducen la unión al receptor FGFR1, lo que sugiere un papel importante de estos residuos en la interacción (22).

Además, podemos observar los dominios FnIII.1 y FnIII.3 involucrados en la interacción con Fibronectina, sin embargo, FnIII.3 es el único dominio que participa en la unión con Laminina. Las moléculas de la ECM como fibronectina o laminina participan en la migración y diferenciación celular durante el desarrollo celular de la cresta neural. Estas

uniones moleculares pueden regular las interacciones entre célula-célula y célula-ECM, así como la quimioatracción inducida por A1 en precursores neuronales (22,25).

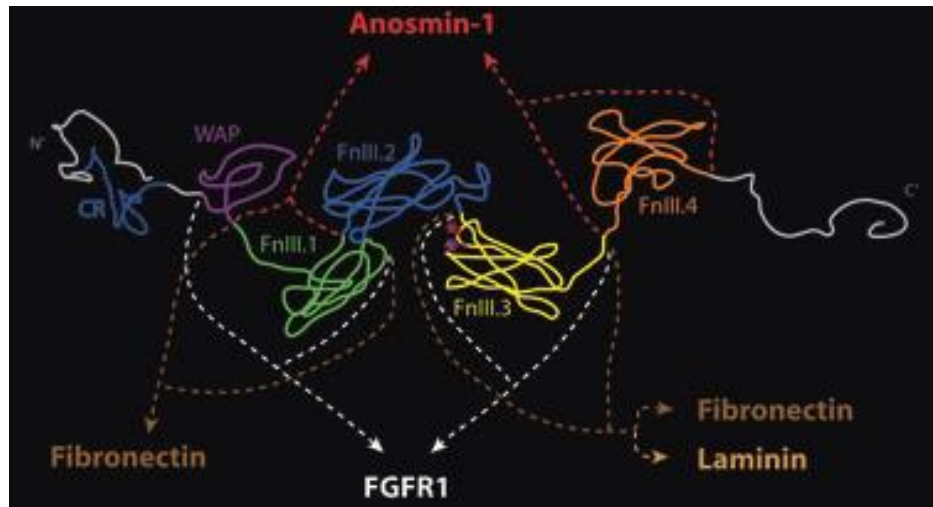


Figura 7. Representación esquemática del mapa de interacción anosmina 1 con FGFR1 a través de los dominios WAP, FnIII.1 y FnIII.3. Anosmina 1 también participa en la unión con Laminina y Fibronectina. Extraído de: (22).

Laminina y Fibronectina no son las únicas moléculas implicadas durante la formación de la cresta neural. Además, A1 modula factores de crecimiento locales, tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la proteína morfogenética ósea (BMP) y *wingless-Int* (WNT). A1 mejora la función de FGF8 mientras inhibe a BMP5 y WNT3a (25).

5.5 Procinetinas e interacción con anosmina 1

En 1980, Joubert y colaboradores aislaron una proteína en el veneno de la serpiente mamba negra (*Dendroaspis polylepis*), denominándola toxina intestinal de mamba 1 (MIT1), cuya secuencia aminoacídica se muestra en la **figura 8 (D)** (26). Posteriormente en 1999, Mollay y colaboradores aislaron de las secreciones de la piel en el anfibio *Bombina variegata* una proteína similar, con un 58% de identidad con MIT1, denominándola *Bombina variegata* 8 (Bv8) (**fig. 8 (C)**) (27). En 2001, Li y colaboradores identificaron unas proteínas de mamíferos homólogas con un 43% de identidad a Bv8 y MIT1, a las que llamaron procinetina 1 (**fig. 8 (A)**) y procinetina 2 (**fig. 8 (B)**) (28), capaces de estimular la motilidad gastrointestinal, lo que explica el nombre asignado a esta familia (29). Asimismo, la procinetina 1 y 2, presentan secuencias muy conservadas entre ellas con aproximadamente un 85% de identidad (30). Las PKs son proteínas ricas en cisteína (31) y secuencias N-terminales que preceden a la primera cisteína (AVITGA) están completamente conservadas entre todas las especies, lo que sugiere que esta región presenta un papel funcional (28).

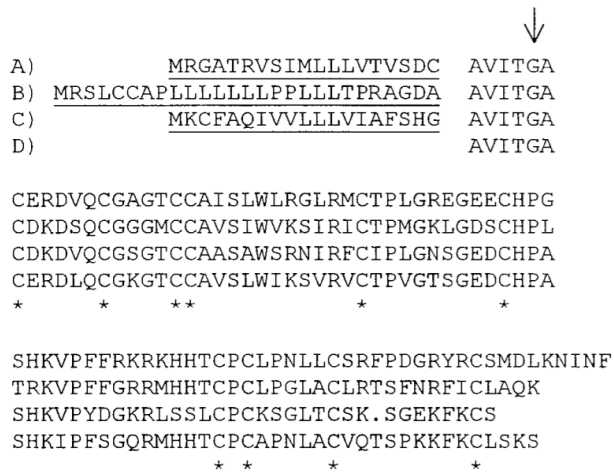


Figura 8. Secuencias aminoacídicas de procineticina 1 (A), procineticina 2 (B), Bv8 (C) y secuencia parcial de MIT1 (D). Los 10 residuos de cisteína conservados están marcados con (*). Los péptidos señal están subrayados. La flecha indica los sitios de empalme para intrones. Extraído de: (28).

Además de los efectos gastrointestinales que presentan las procinetinas, en concreto, el receptor 2 de procineticina (PKR2) y su ligando (PK2), tienen un papel clave en la neurogénesis y morfogénesis del OB, en la supervivencia neuronal y migración de los precursores de las neuronas GnRH. PKR2 se expresa predominantemente en el OB, dentro de éste, el ligando PK2 se produce y se secreta para atraer a los precursores neuronales, que expresan el receptor PKR2, desde la SVZ donde se originan, a través de la RMS hasta el OB. PKR2 no solo se expresa en el OB, sino también en regiones hipotalámicas con mayor densidad de neuronas GnRH, así como en las glándulas tiroides, pituitaria, salival y suprarrenal, en testículos y ovarios (32,33). Además, estas proteínas participan en distintos procesos biológicos entre los que podemos destacar la regulación de ritmos circadianos, angiogénesis, progresión del cáncer, hematopoyesis y nocicepción (30).

PKR2 pertenece a la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), son proteínas de membrana que transducen numerosas señales extracelulares al interior celular y desempeñan un papel fundamental en la regulación de las funciones celulares (34). Se han descrito en pacientes con KS, mutaciones en los genes *PKR2* y *PK2*, que dan como resultado una interrupción en la señalización de PKR2 en las células, provocando una orientación defectuosa de la superficie celular del receptor, en otros casos, un mal acoplamiento de las proteínas G, y, por último, hasta un deterioro en la unión entre el receptor y ligando (31).

Tal como se puede ver en la **figura 9**, PKR2 presenta una estructura típica de los GPCR. Consta de siete segmentos α -helicoidales que se extienden a lo largo de la membrana. La región extracelular está formada por una cola N-terminal (N-tail) y tres dominios extracelulares (ECL1, ECL2 y ECL3). La región intracelular presenta a su vez tres dominios intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3) y una cola C-terminal (C-tail) (35),

responsables de interaccionar y activar los distintos conjuntos de proteínas G heteroméricas (34).

Ratones a los que se les había interrumpido los genes *Pkr2* y *Pk2* mostraron hipoplasia del OB y atrofia severa del sistema reproductivo, así como ausencia de neuronas GnRH en el hipotálamo. Este fenotipo mostrado en ratones *Pkr2* evidencia una clara similitud con las características clínicas presentadas en pacientes con KS (36,37), lo que sugeriría la participación de estos genes en la etiología del KS. Posteriormente, esta participación fue confirmada al encontrar mutaciones en los genes *PKR2* y *PK2* en pacientes con KS (9,10). Tomando en consideración estos datos, se propuso el planteamiento de que anosmina 1 podría estar modulando la actividad de PKR2 en presencia de PK2, de manera similar a como lo hace con FGFR1 y FGF2 (38).

Ratones mutantes para *Pkr2* presentaron una migración y diferenciación interrumpida de los precursores neuronales desde la SVZ a interneuronas TH (tirosina hidroxilasa) en el OB, observándose una hipoplasia del OB y menor número de neuronas TH. En contraposición, ratones que sobreexpresaban anosmina 1, manifestaban un incremento en la proliferación y motilidad de los neuroblastos en la SVZ durante el desarrollo embrionario y postnatal, lo que origina un incremento de ciertas poblaciones de interneuronas en diferentes capas del OB, entre ellas las neuronas TH (39). Estos datos evidencian la estrecha relación existente entre estas dos proteínas.

Mediante la estrategia de GST pull-down, Murcia-Belmonte y colaboradores en 2016 demostraron que la proteína anosmina 1 interaccionaba con algunos de los dominios extracelulares de PKR2 (N-tail, ECL2, ECL3), como muestran las flechas de la **figura 9** (35). Crearon diferentes versiones de A1 para estudiar esta interacción. Tal y como se ver en la figura, A1Nt formada por la región N-terminal (CR-WAP-FnIII.1) solo interaccionaba con ECL2, que a su vez se encuentra involucrado en la unión con el ligando PK2 (40). Mientras que A1Ct formada por los dominios C-terminales (FnIII.2, FnIII.3 y FnIII.4) interaccionaba con PKR2 de la misma forma que A1 completa (35).

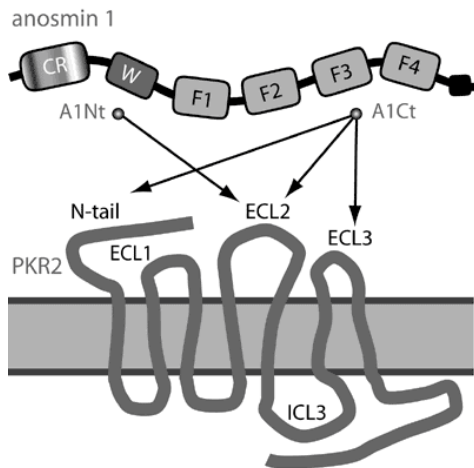


Figura 9. Representación esquemática de anosmina 1 y del receptor PKR2, así como su interacción. Extraído de: (35).

Se han descrito mutaciones en el dominio ECL2 de PKR2 en pacientes con KS, como S202G y Q210R (40), que anulan la interacción *in vitro* con anosmina 1, lo que sugiere que ECL2 presenta un papel clave en esta interacción (41,42).

La activación de los receptores PKR conduce a la activación de diferentes rutas de señalización intracelular, como la cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno regulada por señal extracelular (MAPKs ERK1/2), necesaria para promover el efecto quimiotrópico positivo en neuroblastos de SVZ y precursores de oligodendrocitos (16,43). En la **figura 10** se ilustra la estimulación del receptor PKR2 en presencia de su ligando PK2. El receptor acoplado a proteína G (GPCR) es fosforilado por GPCR quinasa 2 (GRK2), posteriormente, PKR2 fosforilada recluta una proteína desconocida, provocando que el receptor cubierto de clatrina se internalice y se endocite. Por otro lado, la activación de PKR2 resulta en la disociación de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. $G\beta\gamma$ activa $PLC\beta$, lo que conduce a la fosforilación de ERK1/2 a través de MEK1/2 (44).

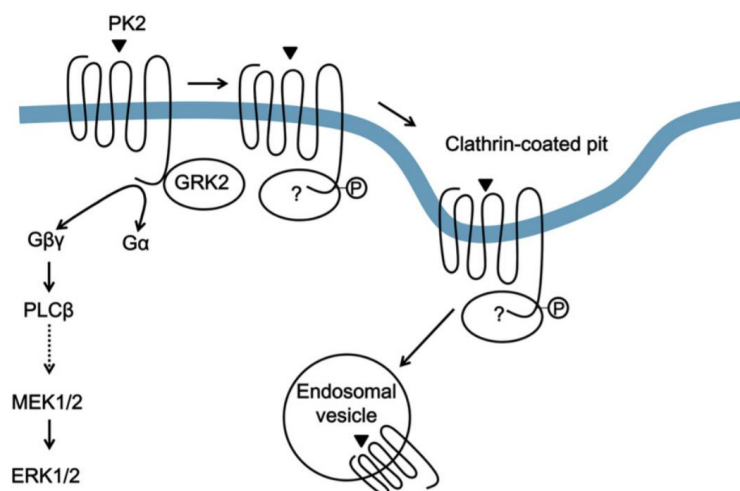


Figura 10. Diagrama esquemático que ilustra el mecanismo subyacente a la internalización y activación de ERK1/2 por el receptor PKR2. Extraído de: (44).

Ensayos realizados previamente en el laboratorio pusieron de manifiesto el efecto de anosmina 1 en la activación de las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2. Se estudiaron las versiones: anosmina 1 (A1); anosmina 1 formada por la región N-terminal, con los dominios CR, WAP y FnIII.1 (A1Nt); y anosmina 1 sin el dominio CR (A1 Δ CR). Los resultados mostraron una activación de PKR2 en presencia de PK2 (45). Posteriormente, se analizaron los plásmidos de expresión con anosmina 1 formada por los dominios CR y WAP (A1CRWAP); anosmina 1 con el dominio CR (A1CR); y anosmina 1 con el dominio WAP (A1WAP). La versión con la proteína truncada A1CRWAP mostró una modulación positiva de la activación de PKR2 en presencia de PK2, a diferencia de las proteínas A1CR y A1WAP, las cuales no pudieron inducir su activación. Finalmente se analizó la versión de anosmina 1 formada por la región N-terminal: CR-WAP-FnIII.1 con la mutación C172R en el dominio WAP (A1NtC172R), los resultados sugirieron que A1NtC172R es incapaz de activar el receptor PKR2 en presencia de su ligando PK2.

El conocimiento de las bases moleculares de la regulación de PKR2 y de cómo es modulada su actividad en la patología del Síndrome de Kallmann, puede ayudarnos a desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades de las que esta proteína es partícipe.

6. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de este proyecto es:

- El dominio WAP de anosmina 1 participa activamente en la modulación de la actividad de PKR2 en presencia de PK2.

El objetivo principal de este estudio es:

- Continuar con el estudio del papel del dominio WAP de anosmina 1 en la modulación de la actividad del receptor PKR2 en presencia de su ligando PK2. Para ello, comprobaremos el efecto en la activación de ERK1/2 a través de PKR2/PK2 de una mutación de cambio de aminoácido, C127R, presente en el dominio WAP de la región N-terminal de la glicoproteína de la matriz extracelular anosmina 1, descrita previamente en pacientes con KS.

Como objetivo secundario:

- Estudiar el papel de los dominios WAP-FnIII.1 en la modulación de la actividad de PKR2. Para ello, construiremos un plásmido de expresión con los dominios WAP y FnIII.1 de anosmina 1 (A1WAPFnIII.1).

7. Metodología

7.1 Cultivo celular

La línea celular de riñón humano embrionario primario HEK293T (utilizada previamente por distintos laboratorios al grupo de Neuroinflamación), que expresa de forma estable el receptor PKR2 (HEK293T_PKR2) (46), fue cultivada en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; GIBCO) suplementado con 8% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 1% (v/v) de penicilina (100 U/mL), 1% (v/v) de estreptomina (100 µg/mL) y puromicina (5 µg/mL) (GIBCO) en un incubador a 37 °C al 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

7.2 Transfección celular

Las células HEK293T_PKR2 se lavaron con tampón fosfato salino a pH 7,4 (PBS), se digirieron con TrypLE (GIBCO) y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Se centrifugaron a 400-500 x g durante 8 minutos, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en una nueva placa en medio DMEM completo con puromicina (5 µg/mL).

Pasadas 48 horas, cuando las células alcanzaron una densidad adecuada, se realizó el mismo procedimiento. Se digirieron con TrypLE, se centrifugaron y las células fueron cultivadas en una placa de 6 pocillos que contiene Poli-D-Lisina (Sigma) a una densidad de $0,75 \cdot 10^6$ células/pozo. Las células se transfectaron con ADN plasmídico para las diferentes versiones de anosmina 1 (A1; ppef134) (22) y con la mutación (A1C172R; ppef224) (0,5-1 µg de plásmido/pocillo) usando el reactivo de transfección *TurboFect Transfection Reagent* (2-3 µl/µg ADN) (Thermo Scientific), gota a gota de manera homogénea, siguiendo el protocolo del fabricante con pequeñas modificaciones. Transcurridas 36 horas, se retiró el medio de cultivo en el que se encontraban las células y se suplementaron con DMEM sin suero y con puromicina (1,2 mL) durante 8-12h. El proceso se muestra en la **figura 11**.

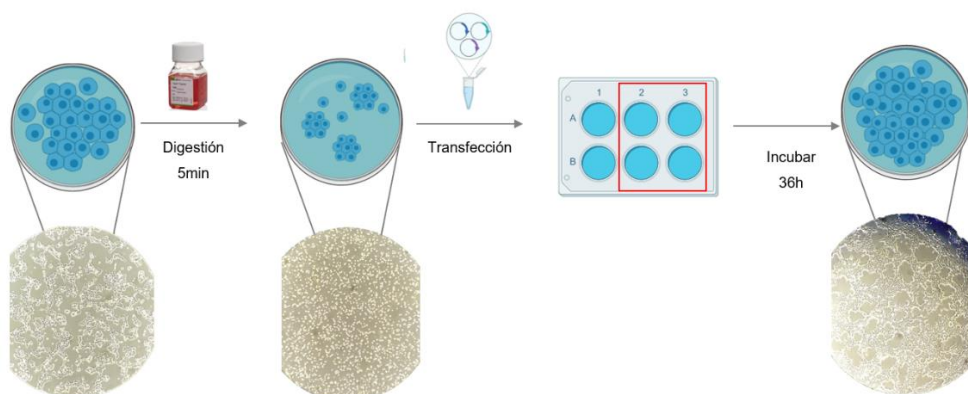


Figura 11. Esquema de transfección

7.3 Señalización celular y Western-Blot

Tras 8-12 horas en medio sin suero, las células se estimularon con el ligando PK2 (5 nM) (Preprotech) en tres de los seis pocillos y se incubaron durante 5 minutos. Después de exponer las células a este tratamiento, se lavaron con PBS y se lisaron con 200-250 µl de tampón de lisis que contiene 1:1 de PBS a pH 7,4 (1 mM de EDTA, 1% NP-40 e inhibidores de proteasas) (Roche) y tampón de carga 2X (2X Laemmli sample buffer Tris HCl 25 mM pH 6,8, 10% glicerol, 6% SDS, 0,1% azul de bromofenol, con 50 mM DTT y 0,5 M β-mercaptoetanol). Se recogieron los lisados celulares de la placa de 6-pocillos y se sonicaron para reducir la viscosidad de la muestra. Mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE), separamos los componentes de la mezcla de proteínas, se utilizó el marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el *Trans- Blot Turbo Transfer Kit* con el sistema *Trans-Blot Turbo* (Bio-Rad) con *Transfer 1X Buffer* durante 12 minutos.

Las membranas con la proteína anosmina 1 y el receptor PKR2 fueron bloqueadas durante 1 hora con leche en polvo desnatada al 5% (nfdm “nonfat-dried milk”) y TBS-T compuesto por 50 nM Tris-HCl, 150 nM NaCl (pH 7,5) y 0,1% Tween-20, y se les añadió el anticuerpo primario anti-anosmina 1 (1/100) y anti-HA (1/2000) (**Tabla 1**), respectivamente, toda la noche a 4 °C en agitación. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T y después se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario (**Tabla 1**) en leche desnatada al 5% en TBS-T diluido 1/10.000, durante 1,5 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T.

Mientras que la membrana con ERK y pERK fue bloqueada con *Odyssey blocking buffer* (OBB) (LI-COR) con 0,1% Tween-20 durante 1 hora tras lo que se añadieron los anticuerpos primarios anti-ERK (1/5000) y anti-pERK (1/1000) (**Tabla 1**) y se incubaron a 4 °C toda la noche en agitación. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS con 0,1% Tween-20 (PBS-T). Después se incubó la muestra con los anticuerpos secundarios correspondientes (1/10.000) (**Tabla 1**) en OBB con 0,1% Tween-20 y 0,02% SDS, durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T.

La membrana con anosmina 1 se incubó con un sustrato para la peroxidasa (SuperSignal Chemiluminescent West Pico Substrate) y se reveló con el sistema de captura de imágenes mediante quimioluminiscencia (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences). La membrana con ERK/pERK fue escaneada usando el

sistema *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR). La señal infrarroja fue posteriormente analizada con la ayuda del *Software* del sistema *Odyssey Infrared System*. El proceso se detalla en la **figura 12**.

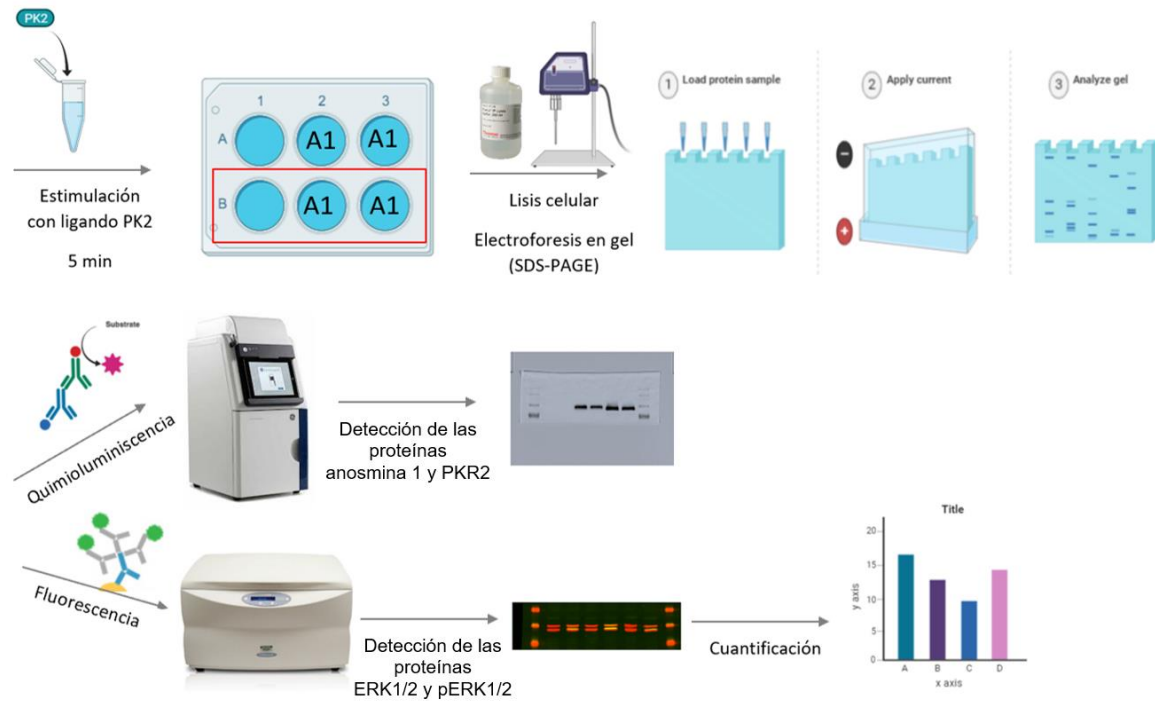


Figura 12. Proceso esquematizado de la detección de proteínas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Diana	Tipo de anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-Anosmina 1 (primario)	Anosmina 1	Anticuerpo monoclonal (IgG) de ratón	1/100	Propiedad del HNP
Anti-ratón (secundario)	IgG de ratón	Anticuerpo monoclonal de cabra conjugado con peroxidasa	1/10.000	Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.
Anti-HA (primario)	Epítipo HA	Anticuerpo monoclonal (IgG) de rata	1/2000	Roche
Anti-rata (secundario)	IgG de rata	Anticuerpo monoclonal de cabra conjugado con peroxidada	1/10.000	Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.
Anti-ERK (primario)	ERK	Anticuerpo policlonal de conejo	1/5000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-conejo (secundario)	IgG de conejo	Anticuerpo monoclonal de cabra marcado con fluoróforo IRDye 680CW	1/10.000	LI-COR
Anti-pERK (primario)	pERK	Anticuerpo monoclonal IgG _{2a} de ratón	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón (secundario)	IgG de ratón	Anticuerpo monoclonal de cabra marcado con fluoróforo IRDye 800RD	1/10.000	LI-COR

7.4 Cuantificación y análisis estadístico

Los datos de la fluorescencia emitida por ERK y pERK fueron recogidos por el *Software* del sistema *Odyssey Infrared System*. Se calcularon los valores relativos de pERK/ERK y se normalizaron frente a la cantidad de pERK/ERK obtenida a partir de las células HEK293T_PKR2 estimuladas con 5nM de PK2 y consideradas como 100% el control, usando la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{pERK/ERK}{(pERK/ERK)_{CT}} \times 100$$

Se calculó la media de los valores que se muestran en la fórmula (n=3 experimentos) y se representaron los valores medios $\pm$ SEM. Adicionalmente, se realizó un estudio estadístico t de Student con la finalidad de comparar las distintas condiciones establecidas, considerándose estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$. Para ello, se hizo uso de la herramienta *software GraphPad Prism v6*.

7.5 Construcción de plásmidos

Se construyó un plásmido de expresión que porta la versión de la proteína anosmina 1 formada por los dominios WAP y FnIII.1 y un epítipo HA, también presenta un péptido señal (sp) en la región N-terminal (A1WAPFnIII.1), **figura 13**.

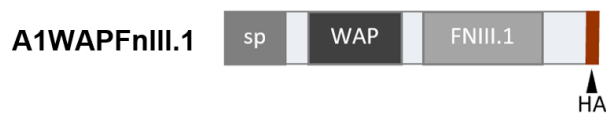


Figura 13. Representación de la versión creada de A1.

A1WAPFnIII.1 se creó a partir de la amplificación por PCR de la secuencia correspondiente al gen *ANOS1* modificado sin el dominio CR (A1 Δ CR; ppef249) ya disponible en el laboratorio (16). Se usaron *primers* específicos de secuencia: el *Primer forward* presenta un sitio de restricción único *Bam*HI (subrayado), una secuencia Kozak (negrita) y los primeros 27 nucleótidos (incluyendo un codón de inicio en rojo) correspondientes al gen *ANOS1* humano: 5' GCA GCG GGA TCC ACC **ATG** AAA GAT CCA TCT GCC CCA CCA GCA 3'. El *Primer reverse* presenta un sitio de restricción único *Xba*I (subrayado), un codón de stop (rojo), una secuencia que codifica para el epítipo HA (azul), y la secuencia correspondiente de anosmina 1 desde el residuo A289 (GGC) hasta el residuo R282 (ACG) para amplificar el dominio FnIII.1: 5' GCC TCT AGA **TTA GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA** GGC AGA TGG ATC TTT GGA AGA ACG 3'.

La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) usando un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos; seguido de 30 ciclos de amplificación con una etapa de desnaturalización de 15 segundos a 94 °C; el anillamiento de los primers a 60 °C durante 15 segundos; y la extensión de la polimerasa a 72 °C durante 1 minuto. Finalmente se realizó una última extensión con la polimerasa a 72 °C durante 5 minutos. La reacción se llevó a cabo usando dNTPs, Taq ADN polimerasa termoestable con capacidad correctora de errores (25 mU/ μ l) (Roche), DMSO, Buffer 10X y H₂O (HyClone).

La amplificación del fragmento de ADN esperado de 679 pb se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando el marcador de peso molecular 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), Loading Buffer 1X y TAE 1X (pH=8). El ADN se purificó usando el kit *Gene JET PCR Purification kit* (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo facilitado por del fabricante.

Los vectores pcDNA 3.1+p (47) y pcDNA 3.1+, modificados con los marcadores de resistencia a puomicina y neomicina, respectivamente, junto con el fragmento purificado de ADN amplificado por PCR, fueron digeridos con enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (Takara, Kyoto, Japan). Los productos de la digestión fueron purificados usando el kit *Gene JET PCR Purification kit* (Thermo Scientific) y se ligaron en una relación 5:1 (inserto:vector) usando T4 DNA ligasa (Takara, Kyoto, Japan), H₂O (Hyclone) y Buffer 10X. Se utilizaron dos tipos de ligación: una con el fragmento de ADN obtenido por PCR y otra sin él (control negativo), para transformar la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen) mediante choque térmico durante 1 minuto a 42 °C (48). Posteriormente, las células se recuperaron en medio rico en glucosa (Soc) durante 1 hora. Las bacterias con los dos tipos de ligación, se sembraron en 4 placas de LB-agar, con ampicilina (100 μ g/mL) (Panreac) y se incubaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, recogimos dos colonias con la punta de una pipeta que se transfirieron a un tubo Falcon con 2 ml de medio LB con ampicilina. El ADN plasmídico se purificó con el kit *Gene JET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo detallado por el fabricante, y se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, con Buffer 10X, BSA y H₂O (Hyclone). Los productos correspondientes de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la integridad de la secuencia se confirmará mediante secuenciación (Secugen SL). Los plásmidos serán utilizados en un futuro para transfectar la línea celular HEK293T_PKR2 y así comprobar si los dominios WAP y FnIII.1 de anosmina 1 se encuentran implicados en la modulación de la actividad del receptor PKR2 en presencia de su ligando PK2.

8. Resultados

8.1 Efecto de la mutación A1C172R en la modulación de PKR2

Uno de los objetivos de nuestro trabajo es estudiar la implicación del dominio WAP de anosmina 1 en la modulación de PKR2 en presencia de PK2. Para ello, se utilizaron las versiones de anosmina 1 (A1; ppef134) (22) y anosmina 1 con la mutación C172R en el dominio WAP (A1C172R; ppef224) construidas previamente en el laboratorio del grupo de Investigación de Neuroinflamación (16), tal y como se muestra en la **figura 14**.

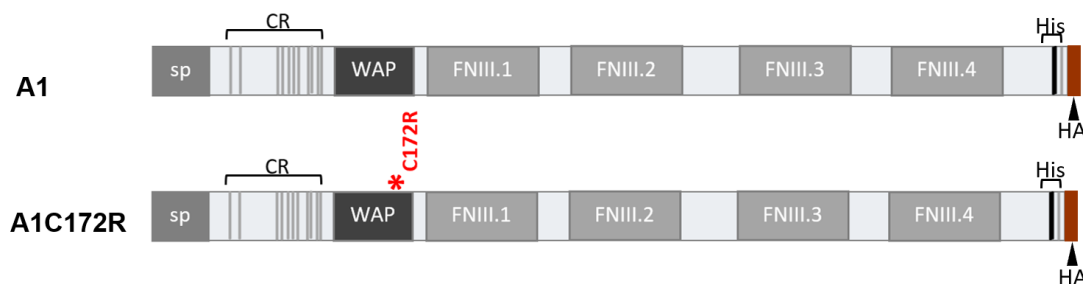


Figura 14. Representación esquemática de anosmina 1 (A1) y sus dominios. También se indica la posición de la mutación C172R (*) descrita en pacientes con KS.

El efecto de la mutación A1C172R en la modulación de PKR2/PKR2, en la línea celular HEK293T que expresa de forma estable PKR2 (HEK293T_PKR2), se midió utilizando los datos de la señalización ERK1/2.

Tal y como se puede observar en la **figura 15**, se plantearon diferentes condiciones para determinar la activación de PKR2 (**A-F**). Las células 293T_PKR2 en la condición **C** y **D** fueron transfectadas con el plásmido de expresión de A1; mientras que **E** y **F** con el plásmido de expresión A1C172R. La estimulación con el ligando PK2 5nM se muestra con (+). Los lisados celulares se cargaron en un gel de electroforesis de acrilamida al 10% (SDS-PAGE) y las proteínas se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las proteínas ERK1/2 y pERK1/2 se detectaron con anticuerpos primarios anti-ERK y anti-pERK, respectivamente. Y a su vez, con anticuerpos secundarios marcados con dos fluoróforos distintos, 680CW (rojo) y 800RD (amarillo), respectivamente. Del mismo modo, las proteínas A1 y A1C172R se detectaron con el anticuerpo primario anti-anosmina 1, mientras que PKR2 se detectó con el anticuerpo primario anti-HA. Posteriormente estas proteínas se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa.

Las membranas con ERK/pERK1/2 se revelaron haciendo uso de un escáner infrarrojo que posee dos láseres independientes, los cuales estimulan simultáneamente la

muestra en dos canales distintos. Posteriormente la señal emitida fue recogida y analizada.

La condición **A** nos sirvió de control negativo, donde PKR2 no ha sido estimulado por PK2 ni modulado por anosmina 1. La señal de ERK1/2 se observa en todas las condiciones (**A-F**), sin embargo, la señal pERK1/2 solo se encuentra en aquellas células que previamente han sido estimuladas con PK2 5 nM (+) (**B, D y F**). La intensidad de la señal depende de la presencia de la proteína anosmina 1 y del ligando PK2. Asimismo, ni A1 y A1C172R presentan ningún efecto si PK2 está ausente (**C y E**).

Las barras representan los valores medios $\pm$ SEM de la cantidad relativa de pERK/ERK (**A, C, D, E y F**) normalizados frente a la cantidad de pERK/ERK obtenida a partir de las células HEK293T_PKR2 estimuladas con 5nM de PK2 y consideradas como 100% (**B**). Tomando, por tanto, la condición **B** como nuestro control de activación (**CT**), podemos decir que en la condición **F** no se observa un aumento significativo de la intensidad respecto a **B** ($p=0,4392$), a diferencia de la condición **D**, donde este aumento sí es significativo ($p=0,0229$). Estos resultados indican que, cuando la mutación C172R en el dominio WAP en anosmina 1 está presente (**F**), anosmina 1 es incapaz de producir la modulación positiva de la activación del receptor PKR2 en presencia de su ligando PK2, lo que indica que el dominio WAP participa en dicha modulación.

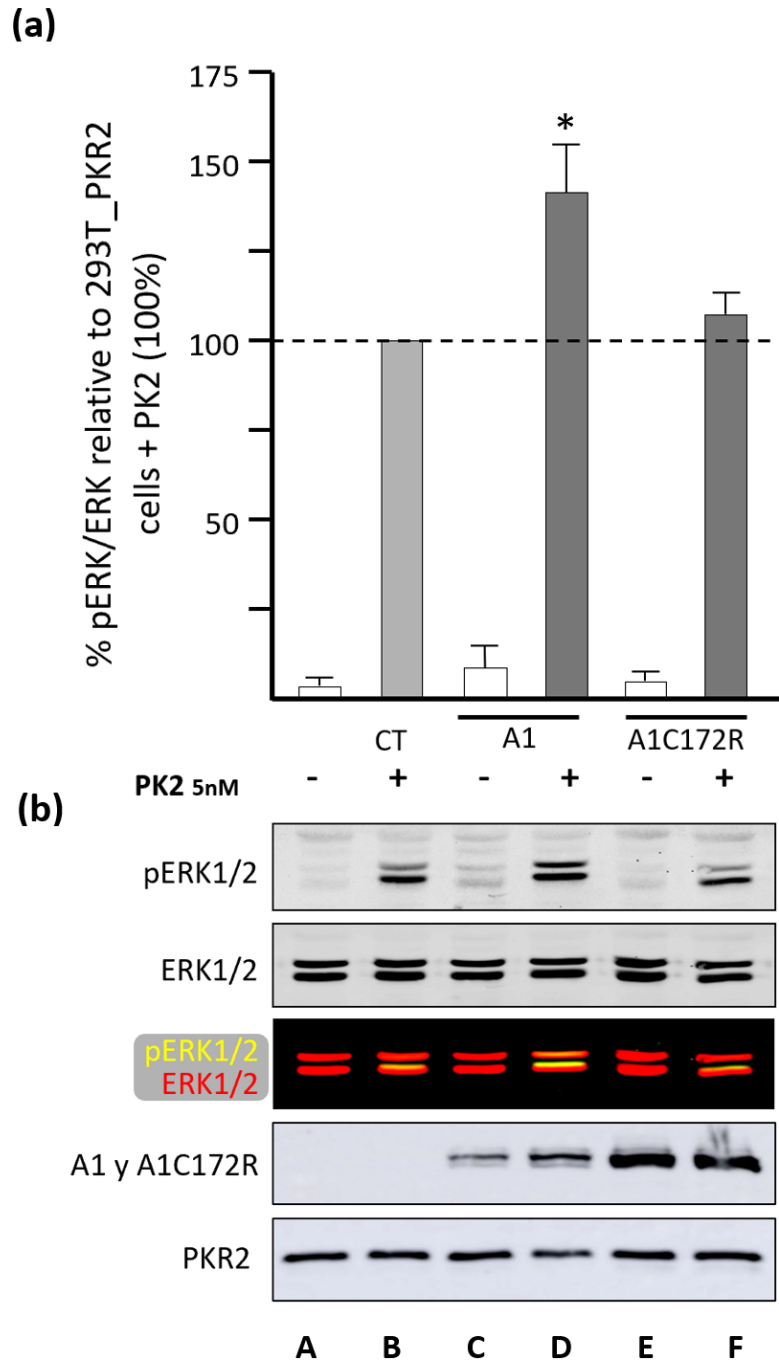


Figura 15. Análisis del efecto de la mutación C172R en el dominio WAP de la proteína anosmina 1 (A1C172R), en la línea celular HEK293T que expresa de forma estable el receptor PKR2 (HEK293T_PKR2) y estimulada con PK2 5 nM a través de la señalización MAPKs ERK1/2. **(a)** Los datos se expresan como los valores medios $\pm$ SEM relativos respecto a la condición control (células HEK293T_PKR2 estimuladas con PK2; CT), considerada como el 100% ($n=3$ experimentos; se realizó el estudio estadístico *t* de Student considerándose estadísticamente significativo cuando $*p < 0,05$). **(b)** Detección inmunológica de pERK1/2 (~43 kDa); ERK1/2 (~43 kDa); pERK/ERK1/2; anosmina 1 (A1) y la proteína mutante con la sustitución C172R (A1C172R) (~100 kDa); y PKR2 (~44 kDa), de los lisados celulares.

8.2 Construcción del plásmido A1WAPFnIII.1

A partir de los resultados obtenidos con la versión de A1C172R, para continuar con el estudio de los dominios de anosmina 1 implicados en la modulación de PKR2/PK2, construimos un nuevo plásmido de expresión de anosmina 1 formado por el dominio WAP y FnIII.1 (A1WAPFnIII.1), también presenta un péptido señal para facilitar su posterior secreción, y un epítipo HA que será reconocido por el anticuerpo anti-HA. Se creó a partir de la amplificación por PCR de la secuencia correspondiente al gen *ANOS1* modificado sin el dominio CR (A1 Δ CR; ppef249) disponible en el laboratorio del grupo de Investigación de Neuroinflamación (16), tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos.

El producto obtenido de la amplificación por PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó con un transiluminador UV, como se muestra en la **figura 16**. Los carriles 1 y 3 se cargaron con el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder*, mientras que el carril 2 muestra una banda de 679 pb correspondiente al fragmento esperado.

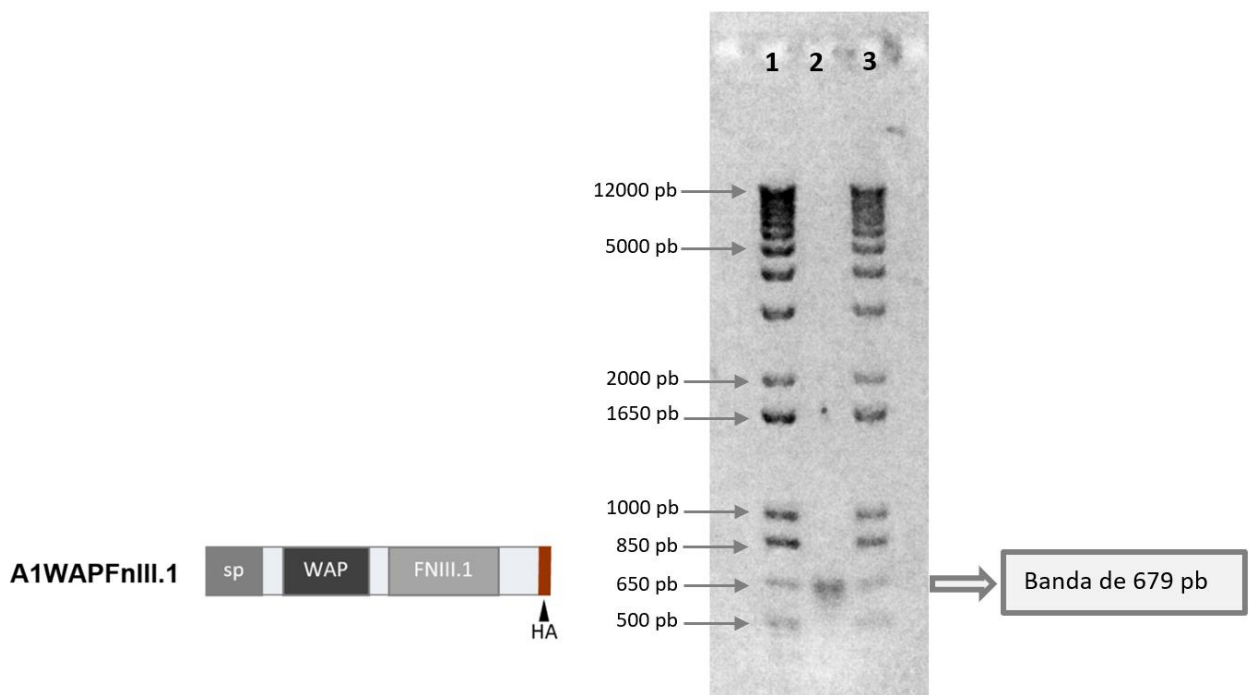


Figura 16. Productos de PCR obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa.

Posteriormente, los fragmentos se purificaron y fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I junto a los vectores pcDNA 3.1+p y pcDNA 3.1+. Los productos de la digestión se ligaron usando T4 DNA ligasa en una relación 5:1 inserto:vector, que se utilizaron para transformar la cepa DH5 α de *Escherichia coli* competente. El ADN se purificó y se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I. Los productos

correspondientes de la digestión se analizaron con electroforesis en gel de agarosa al 1%, que se revelaron con el transiluminador UV como muestra la **figura 17**. Los carriles **1** y **10** representan el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder*; los carriles **2-9** muestran los fragmentos de 5,4 kb y de 669 pb que se corresponden con el vector y el ADN amplificado por PCR, respectivamente.

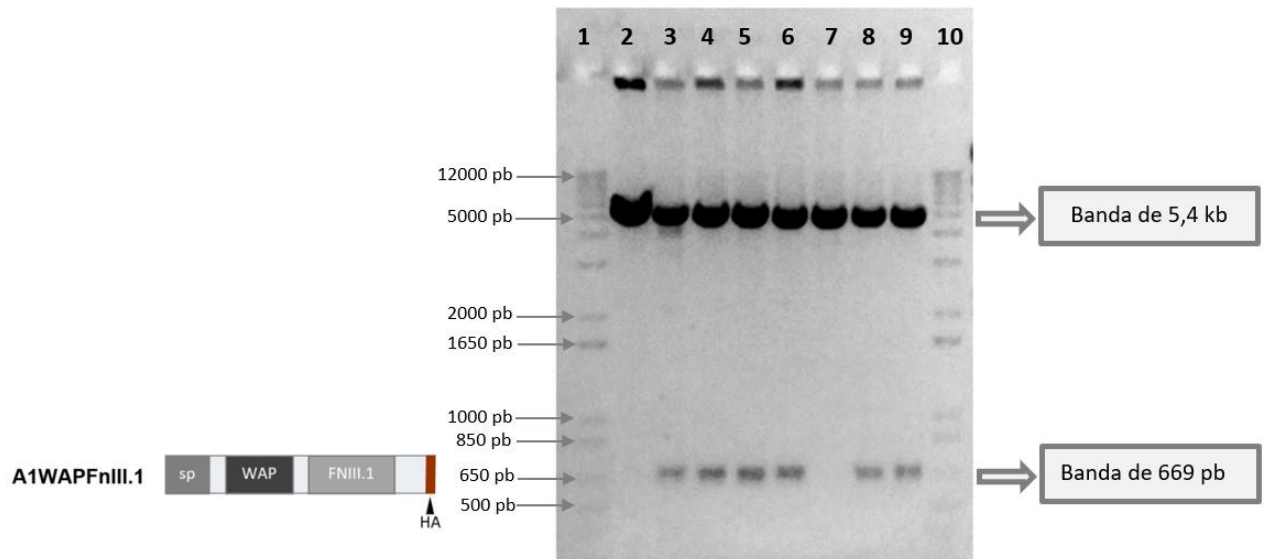


Figura 17. Fragmentos de ADN plasmídico obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa.

Posteriormente las muestras se enviarán para ser secuenciadas y confirmar así su integridad. Los plásmidos se usarán en un futuro para transfectar la línea celular HEK293T_PKR2, y comprobar así el efecto en la activación del receptor PKR2 tras la estimulación con PK2.

9. Discusión

Varios genes relacionados con la patología del Síndrome de Kallmann han sido identificados hasta la fecha, entre ellos *ANOS1*, *FGFR1*, *PKR2* y *PK2*. Se ha demostrado que mutaciones en estos genes provocan niveles reducidos o ausencia de hormona GnRH y aplasia de los OB, asociados con HH y anosmia, respectivamente. Un desarrollo incompleto de los axones olfativos y una interrupción en la migración de los precursores de las neuronas GnRH desde la placoda olfatoria hasta el hipotálamo, evidencian la estrecha relación existente entre el sistema olfativo, la maduración sexual cerebral y manifestaciones clínicas del KS.

Se reveló la presencia de un fenotipo característico del KS, con desarrollo anormal tanto del OB como del sistema reproductivo en ratones que carecen del receptor *PKR2* (36,37). Posteriormente se relacionó la presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen *PKR2* en pacientes con KS e HH (9,10). En 2004, González-Martínez y colaboradores determinaron la modulación de la actividad de *FGFR1* a través de los HS por anosmina 1, que a su vez, constituye el mecanismo de acción de A1 más estudiado hasta la fecha (49). A partir de estos estudios, se propuso que anosmina 1 podría modular la actividad de *PKR2* al igual que hacía con *FGFR1* (38).

Los datos obtenidos a partir de ratones transgénicos que sobreexpresan anosmina 1 y ratones *knockout* (KO) para *Pkr2* y *Pk2*, manifestaban efectos contrarios en la formación del OB, ya que ratones que sobreexpresan A1 presentaban un incremento en la proliferación y motilidad de los neuroblastos en la SVZ durante el desarrollo embrionario y postnatal, al contrario que los ratones KO para *Pkr2* y *Pk2* (21,39). En 2016, Murcia-Belmonte y colaboradores demostraron, mediante la técnica GST-pull down, que *PKR2* y A1 interactuaban físicamente *in vitro* (35), confirmando la hipótesis planteada por Hardelin y colaboradores en 2008. Mutaciones descritas en el dominio ECL2 de *PKR2*, S202G y Q210R (40), interrumpían la unión con anosmina 1, lo que sugiere que ECL2 presenta un papel clave en esta interacción (41,42).

Datos posteriores en el laboratorio indicaron que anosmina 1 modula la activación de *PKR2* en presencia de PK2 y, asimismo, que los dominios de la región N-terminal de A1 están implicados en esta modulación. Para ello, se estudiaron los plásmidos de expresión con anosmina 1 (A1); anosmina 1 formada por la región N-terminal, con los dominios CR, WAP y FnIII.1 (A1Nt); y anosmina 1 sin el dominio CR (A1ΔCR), tal como se muestra en la **figura 18A**. Los resultados indicaron que estas versiones de anosmina 1 activaban el receptor en presencia de PK2. Lo que quiere decir que los dominios CR, FnIII.2, FnIII.3 y FnIII.4 son prescindibles para esta modulación y, sin embargo, los

dominios WAP y FnIII.1 podrían ser los responsables de activar PKR2. Así mismo, se observó que anosmina 1 sólo ejercía su función si previamente el receptor PKR2 había sido estimulado con su ligando PK2 (45).

Estudios previos de la interacción molecular entre A1 y FGFR1/FGF2 a través de HS, destacaron la importancia de la cantidad de anosmina 1. Un exceso de A1 evitaría la formación de este complejo y por consiguiente, la interrupción de su actividad biológica (23). Del mismo modo, se observó que a mayor cantidad de anosmina 1 se inhibía la activación de PKR2 en presencia de PK2 (45).

En 2006, Andrenacci y colaboradores sugirieron que la región CR podría tener una función reguladora (50). En 2010, Murcia-Belmonte y colaboradores, mediante estudios GST pull-down demostraron que el dominio CR reducía la unión entre la región N-terminal de anosmina 1 (CR-WAP-FnIII.1) y el receptor FGFR1 en comparación con la región N-terminal con los dominios WAP-FnIII.1 (22). Posteriormente en 2013, Esteban y colaboradores demostraron que, aunque CR no era esencial para la unión a FGFR1, si era necesaria para desempeñar la función de anosmina 1. El estudio con el plásmido de expresión A1 Δ CR, mostró un fracaso en la inducción del quimiotropismo a través de FGFR1 en precursores neuronales de rata, confirmando de nuevo, que es esencial para que anosmina 1 pudiese ejercer su efecto (16).

A la vista de estos resultados, se llevaron a cabo experimentos posteriores con los plásmidos de expresión con anosmina 1 formada por los dominios CR y WAP (A1CRWAP); anosmina 1 con el dominio CR (A1CR); y anosmina 1 con el dominio WAP (A1WAP) (**Fig. 18B**). El resultado más llamativo obtenido fue que A1CRWAP mostraba una modulación positiva de PKR2 en presencia de PK2, lo que no ocurría con los otros dos plásmidos. Esto sugiere que los dominios CR y WAP no activan el receptor de manera individualizada, por lo que se puede pensar entonces que CR presenta un mero papel regulador o que podría ser importante para que el dominio WAP pueda ejercer su función. Sin embargo, los resultados obtenidos con la versión A1 Δ CR fueron contradictorios, por cuanto el dominio CR no era necesario para activar el receptor.

El dominio CR aparece como:

- No esencial cuando el resto de los dominios están presentes (A1 Δ CR)
- Esencial cuando anosmina 1 está formada solo por los dominios CR y WAP (A1CRWAP)

Por lo tanto, el papel del dominio CR sobre la modulación de la actividad de PKR2 debe ser todavía explicado.

Una posible justificación de estos datos sobre la proteína A1 Δ CR podría ser que el dominio FnIII.1 fuera suficiente para estabilizar y facilitar la unión del dominio WAP a PKR2 en la proteína completa. Mientras que en la proteína A1CRWAP, el dominio CR fuera suficiente para estabilizar la unión a PKR2 y para que WAP pueda actuar.

Nosotros continuamos estudiando el papel del dominio WAP, a fin de comprobar que la mutación C172R en este dominio de la proteína anosmina 1 de longitud completa, afectaba a la modulación de la activación de PKR2. Nuestros resultados indicaron que la mutación C172R interfería en la función del dominio WAP (**Fig. 18C**), del mismo modo que ocurría con A1NtC172R. Lo que apoya aún más la idea que el dominio WAP es fundamental para la modulación de A1 sobre la actividad de PKR2.

Estos resultados coinciden con los observados en estudios anteriores de Esteban y colaboradores en 2013 en relación a la señalización a través de FGFR1 en presencia de anosmina 1, ya que la mutación C172R en el dominio WAP, provoca que la proteína anosmina 1 pierda su capacidad quimioatrayente sobre los precursores neuronales de la SVZ. Asimismo, se observó que al contrario que ocurría en la activación vía PKR2/PK2, anosmina 1 no necesitaba del ligando FGF2 para activar FGFR1 (16,43). Del mismo modo, en un estudio posterior, se demostró la participación de anosmina 1 en procesos angiogénicos durante el desarrollo del OB, promoviendo así la migración de células endoteliales, la proliferación y formación de vasos sanguíneos. Los resultados de este estudio revelaron que anosmina 1 actuaba de ligando para activar el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR2) de manera similar que el ligando VEGF-A. Asimismo, observaron que mutaciones en el dominio WAP de A1 (Q131H, C134G y C163R), no interferían en la migración celular mediada por A1, en contraposición a nuestros resultados obtenidos con la mutación C172R. Esto podría indicar que el dominio WAP no es tan importante para el efecto que produce la proteína A1 sobre VEGFR2 (51).

Como se explicó en la introducción, el dominio WAP contiene 8 residuos de cisteína conservados que forman a su vez 4 enlaces disulfuro. Entre estos enlaces disulfuro involucrados en este dominio, Cys172 se encuentra presente en la unión con Cys157 (Cys157-Cys172) (15). Una posible explicación de los resultados obtenidos, por cuanto A1C172R es incapaz de modular la activación del receptor PKR2, podría ser que la presencia de la mutación de cambio de aminoácido Cys172Arg, estaría interrumpiendo la formación de la estructura terciaria de anosmina 1, acabando en plegamiento erróneo y, por consiguiente, desestabilizando la proteína (52).

A día de hoy, todavía no se comprende completamente el papel que juegan los dominios

N-terminales de anosmina 1 en la modulación de PKR2 en presencia de PK2. Sería conveniente llevar a cabo experimentos futuros para poder dar respuesta a todas estas cuestiones que se nos plantean. Para ello, podríamos transfectar HEK293T_PKR2 con las versiones de anosmina 1 mostradas en la **figura 18D**. Obtener resultados de la mutación N267K en anosmina 1 de longitud completa y de la proteína truncada A1NtN267K podría ser clave en este estudio. Cabría la posibilidad que la respuesta producida por la proteína completa mutada fuera diferente respecto a la llevada a cabo por la proteína A1Nt con la mutación. Ya se observó en estudios previos llevados a cabo por Esteban y colaboradores en 2013 sobre la modulación del receptor FGFR1, que cualquiera de las mutaciones C172R y N267K en A1 completa, anulaba su efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de la SVZ, sin embargo, A1Nt mantenía su función biológica aun cuando estas mutaciones se encontraban presentes.

Asimismo, para continuar estudiando la función de los dominios N-terminales de anosmina 1, y basándonos en los resultados obtenidos hasta la fecha, los datos del plásmido de expresión que hemos construido formado con los dominios WAP y FnIII.1 de anosmina 1 (A1WAPFnIII.1; **fig.18D**), podrían indicarnos si FnIII.1 participa en la modulación de A1, con la intención de poder dilucidar qué dominios son fundamentales para activar las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2.

En cualquier caso, para poder llegar a una conclusión correcta de los resultados obtenidos, sería importante tomar en consideración cómo las mutaciones C172R y N267K, en los dominios WAP y FnIII.1, respectivamente, afectan a la interacción con los dominios de PKR2. Para ello, la estrategia de GST-pull down nos ayudará a comprobar si se mantiene o no dicha interacción en presencia de estas mutaciones.

Como ya se mencionó en la revisión de los mecanismos de acción de anosmina 1 reflejada en la introducción, aún queda por desentrañar el mecanismo de acción completo de anosmina 1. Comprender cómo se comporta anosmina 1 cuando interacciona con PKR2/PK2 podría ser determinante para diseñar nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades donde estas proteínas se ven implicadas, como por ejemplo en procesos tumorales, dolor agudo, desordenes inflamatorios, entre otros (53,54).

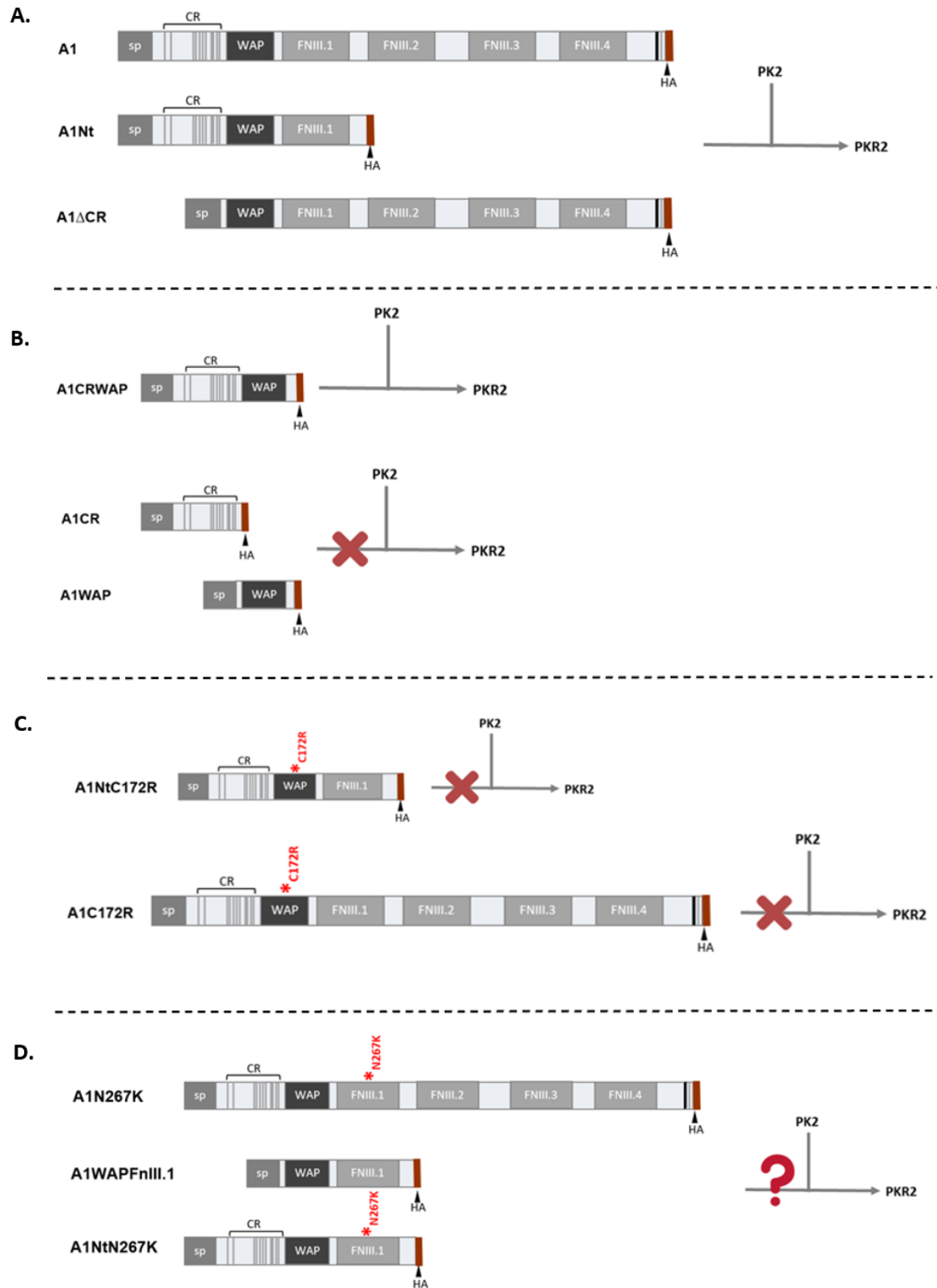


Figura 18. Representación esquemática de la activación de PKR2 por las distintas versiones de anosmina 1 en presencia de PK2.

10. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- El dominio WAP de anosmina 1 es esencial para la modulación de la activación de PKR2 por anosmina 1, y la mutación C172R en este dominio altera su capacidad para inducir la señalización de las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2.
- El estudio de la forma truncada de la proteína anosmina 1, A1WAPFnIII.1, es necesario para dilucidar si el dominio FnIII.1 estabiliza la unión entre el dominio WAP y el receptor PKR2 para que WAP pueda ejercer su función. Asimismo, demostrar que el dominio CR regula la interacción entre WAP y PKR2, o, por el contrario, no es esencial cuando FnIII.1 está presente.

10.1 Breve resumen visual del trabajo realizado

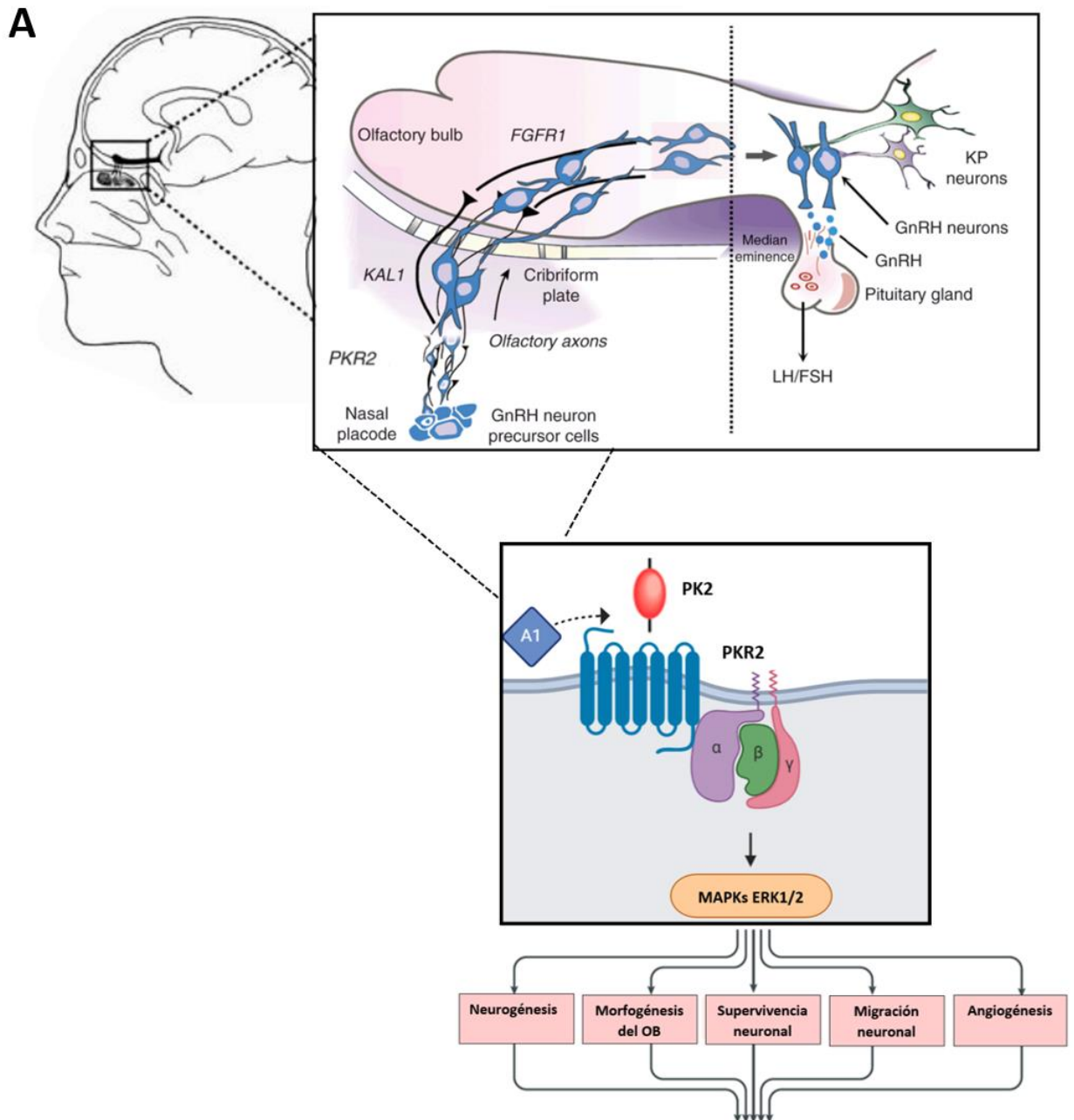


Figura 19. (A) Expresión de diferentes genes, ANOS1 (o KAL1), PKR2 y FGFR1, durante la migración de los precursores de las neuronas de GnRH a través de los axones olfatorios desde la SVZ a lo largo de la corriente migratoria rostral hasta el hipotálamo, donde las células neuroendocrinas productoras de GnRH llevan a cabo la señalización hormonal a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal, estimulando la liberación de gonadotropinas, LH y FSH. La señalización intracelular MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2 modulada a través de anosmina 1 (A1), desempeña un papel fundamental en los procesos de neurogénesis, morfogénesis del OB, supervivencia y migración neuronal y angiogénesis.

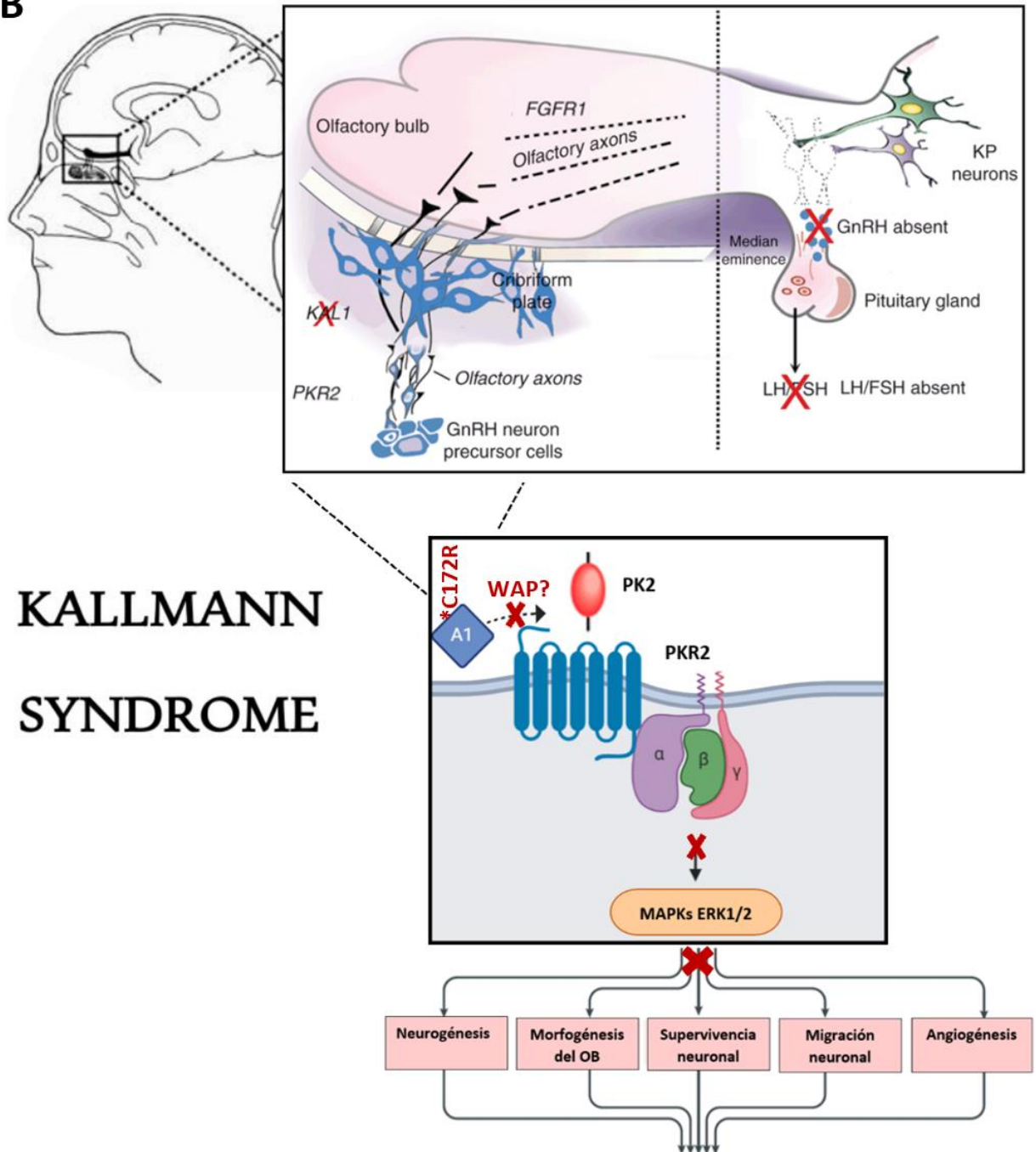
B

Figura 19. (B) Mutaciones en el gen ANOS1 (o KAL1) descritas en pacientes con síndrome de Kallmann (KS) producen un defecto en la migración de los precursores de las neuronas de GnRH así como de las neuronas olfativas desde la SVZ a lo largo de la corriente migratoria rostral hasta el hipotálamo, interrumpiendo así la señalización hormonal a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal y la liberación de gonadotropinas, LH y FSH. La mutación C172R en el dominio WAP de anosmina 1 (A1) interrumpe la modulación de la activación de las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2, repercutiendo en los procesos de neurogénesis, morfogénesis del OB, supervivencia y migración neuronal y angiogénesis.

11. Experimentos planificados no realizados

El día 11 de marzo del corriente año, la Organización Mundial de la Salud elevó a pandemia internacional la situación de emergencia de salud pública ocasionada por el COVID-19. La evolución de la crisis sanitaria, pronto precipitó que se tuvieran que adoptar un conjunto de medidas que culminaron con la declaración excepcional de nuestro país en estado de alarma, con la consiguiente adopción de extraordinarias medidas restrictivas de la movilidad. En lo que es relevante para este trabajo que me ocupa, toda la programación inicialmente prevista, se vio truncada en el preciso momento en que se ordenó por las autoridades, el obligatorio cierre de los laboratorios, con la consecuencia que se dispusiera desde la universidad, la suspensión *sine díe* de las prácticas presenciales de todo orden, incluida la que fundamenta mi trabajo.

La situación persiste aún hoy, a día de la fecha. De no haber sido así, el Dr. Esteban y yo hubiéramos continuado con el estudio de los dominios de anosmina 1 implicados en la modulación del receptor PKR2 en la patología del KS.

En primera instancia, hubiéramos llevado a cabo el análisis de la mutación N267K en el dominio FnIII.1 de anosmina 1, a fin de dilucidar si la mutación altera la capacidad de inducir la señalización de las MAPKs ERK1/2 vía PKR2/PK2. De este modo, habríamos constatado si el dominio FnIII.1 está implicado también en la modulación del receptor.

Para continuar, hubiéramos llevado a cabo el análisis por Western-Blot de los lisados celulares que expresan la versión A1WAPFnIII.1, creada previamente como se describe en materiales y métodos. Posteriormente, la detección de la proteína A1WAPFnIII.1 se hubiera llevado a cabo con el anticuerpo primario anti-HA y un anticuerpo secundario anti-rata conjugado con peroxidasa. Asimismo, hubiéramos detectado las proteínas ERK y pERK, con anticuerpos primarios anti-ERK y anti-pERK, y anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón marcados con dos fluróforos distintos, respectivamente. Posteriormente, habríamos estudiado su efecto en la modulación del receptor PKR2 utilizando el *Software* del sistema *Odyssey Infrared System*. Una vez hubiéramos obtenido el resultado, entonces habríamos llevado a cabo la cuantificación proteica y el posterior análisis estadístico t de Student mediante el *software GraphPad Prism v6*, para determinar finalmente, si el dominio FnIII.1 es capaz de estabilizar WAP en ausencia de CR.

12. Bibliografia

1. Benbassat CA. Kallmann Syndrome: Eugenics and the Man behind the Eponym. *Rambam Maimonides Med J*. 2016 Apr 20;7(2):e0015.
2. Boehm U, Bouloux P-M, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Sep 21;11(9):547–64.
3. de Castro F, Seal R, Maggi R. ANOS1: a unified nomenclature for Kallmann syndrome 1 gene (KAL1) and anosmin-1. *Brief Funct Genomics*. 2017 Jul 1;16(4):205–10.
4. Cho H-J, Shan Y, Whittington NC, Wray S. Nasal Placode Development, GnRH Neuronal Migration and Kallmann Syndrome. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Jul 11;7:121.
5. Jiang X, Li D, Gao Y, Zhang X, Wang X, Yang Y, et al. A novel splice site variant in ANOS1 gene leads to Kallmann syndrome in three siblings. *Gene*. 2020 Feb 5;726:144177.
6. Mokosch A, Bernecker C, Willenberg HS, Neumann NJ. Kallmann-Syndrom. *Der Hautarzt*. 2011 Oct 16;62(10):728–30.
7. Dodé C, Hardelin J-P. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009 Feb;17(2):139–46.
8. Gonçalves CI, Fonseca F, Borges T, Cunha F, Lemos MC. Expanding the genetic spectrum of ANOS1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Reprod*. 2017;32(3):704–11.
9. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler M-L, et al. Kallmann Syndrome: Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 and Prokineticin Receptor-2. Valle D, editor. *PLoS Genet*. 2006 Oct 20;2(10):e175.
10. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li J-D, Raivio T, Cole LW, et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Oct 30;104(44):17447–52.
11. Wen J, Pan L, Xu X, Wang J, Hu C. Clinical data and genetic mutation in Kallmann syndrome with CHARGE syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jul;97(27):e11284.

12. Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, et al. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Mol Brain*. 2011;4(1):34.
13. Cadman SM, Kim S-H, Hu Y, González-Martínez D, Bouloux P-M. Molecular Pathogenesis of Kallmann's Syndrome. *Horm Res Paediatr*. 2007;67(5):231–42.
14. del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet*. 1992 Dec;2(4):305–10.
15. Jayanthi S, Kachel B, Morris J, Prudovsky I, Suresh Kumar TK. Molecular Cloning and Overexpression of WAP Domain of Anosmin-1 (a-WAP) in *Escherichia coli*. In: *Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology*. InTech; 2011. p. 59–71.
16. Esteban PF, Murcia-Belmonte V, García-González D, de Castro F. The cysteine-rich region and the whey acidic protein domain are essential for anosmin-1 biological functions. *J Neurochem*. 2013 Mar;124(5):708–20.
17. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*. 2009 May 5;7(5):e1000112.
18. Ross MT, Grafham D V, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):325–37.
19. Hu Y, Bouloux P-M. X-linked GnRH deficiency: Role of KAL-1 mutations in GnRH deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Oct;346(1–2):13–20.
20. Franco SJ, Müller U. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Dev Neurobiol*. 2011 Nov;71(11):889–900.
21. García-González D, Clemente D, Coelho M, Esteban PF, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development. *Exp Neurol*. 2010 Apr;222(2):285–95.
22. Murcia-Belmonte V, Esteban PF, García-González D, De Castro F. Biochemical dissection of Anosmin-1 interaction with FGFR1 and components of the extracellular matrix. *J Neurochem*. 2010 Dec;115(5):1256–65.
23. Choy C, Kim S-H. Biological actions and interactions of anosmin-1. *Front Horm*

Res. 2010;39:78–93.

24. Hu Y, Guimond SE, Travers P, Cadman S, Hohenester E, Turnbull JE, et al. Novel Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulation by Extracellular Matrix Protein Anosmin-1. *J Biol Chem*. 2009 Oct 23;284(43):29905–20.
25. Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada KM. Extracellular matrix protein anosmin promotes neural crest formation and regulates FGF, BMP, and WNT activities. *Dev Cell*. 2012 Aug 14;23(2):305–16.
26. JOUBERT FJ, STRYDOM DJ. Snake Venom. The Amino Acid Sequence of Protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (Black mamba) Venom. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol Chemie*. 1980 Jan;361(2):1787–94.
27. Mollay C, Wechselberger C, Mignogna G, Negri L, Melchiorri P, Barra D, et al. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 18;374(2):189–96.
28. Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY. Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle. *Mol Pharmacol*. 2001 Apr 1;59(4):692–8.
29. Balasubramanian R, Plummer L, Sidis Y, Pitteloud N, Martin C, Zhou Q-Y, et al. The puzzles of the prokineticin 2 pathway in human reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Oct;346(1–2):44–50.
30. Negri L, Ferrara N. The Prokineticins: Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):1055–82.
31. Dodé C, Rondard P. PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:19.
32. Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, et al. The Role of the Prokineticin 2 Pathway in Human Reproduction: Evidence from the Study of Human and Murine Gene Mutations. *Endocr Rev*. 2011 Apr 1;32(2):225–46.
33. Zhao Y, Wu J, Wang X, Jia H, Chen D-N, Li J-D. Prokineticins and their G protein-coupled receptors in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;161:149–79.
34. Peng Z, Tang Y, Luo H, Jiang F, Yang J, Sun L, et al. Disease-causing Mutation in PKR2 Receptor Reveals a Critical Role of Positive Charges in the Second

- Intracellular Loop for G-protein Coupling and Receptor Trafficking. *J Biol Chem.* 2011 May 13;286(19):16615–22.
35. Murcia-Belmonte V, Astillero-López V, Esteban PF. Anosmin 1 Interacts with the Prokineticin Receptor 2 In Vitro Indicating a Molecular Link Between Both Proteins in the Pathogenesis of Kallmann Syndrome. *Protein Pept Lett.* 2016;23(7):650–5.
 36. Matsumoto S -i., Yamazaki C, Masumoto K -h., Nagano M, Naito M, Soga T, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Mar 14;103(11):4140–5.
 37. Ng KL, Li J-D, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou Q-Y. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* 2005 Jun 24;308(5730):1923–7.
 38. Hardelin J-P, Dodé C. The Complex Genetics of Kallmann Syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sex Dev.* 2008;2(4–5):181–93.
 39. García-González D, Murcia-Belmonte V, Esteban PF, Ortega F, Díaz D, Sánchez-Vera I, et al. Anosmin-1 over-expression increases adult neurogenesis in the subventricular zone and neuroblast migration to the olfactory bulb. *Brain Struct Funct.* 2016 Jan 10;221(1):239–60.
 40. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin J-P, et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet.* 2009 Jan 1;18(1):75–81.
 41. Tercero-Díaz M. Efecto de la interacción anosmina 1/PROKR2 de 2 mutaciones descritas en PROKR2 que causan síndrome de Kallmann. Universidad de Castilla-La Mancha; 2017.
 42. Murcia-Belmonte, V., Astillero-López, V., Tercero, M. & Esteban PF. Anosmin 1/prokineticin receptor 2 interaction in vitro; a molecular link in Kallmann syndrome pathogenesis. In: XVII SENC Congress. Alicante, Spain; 2017.
 43. Murcia-Belmonte V, Medina-Rodríguez EM, Bribián A, de Castro F, Esteban PF. ERK1/2 signaling is essential for the chemoattraction exerted by human FGF2 and human anosmin-1 on newborn rat and mouse OPCs via FGFR1. *Glia.* 2014 Mar;62(3):374–86.
 44. Yin W, Liu H, Peng Z, Chen D, Li J, Li J-D. Mechanisms that underlie the internalization and extracellular signal regulated kinase 1/2 activation by PKR2

- receptor. *Cell Signal*. 2014 May;26(5):1118–24.
45. López de la Vieja S. Identificación de los dominios de anosmina 1 implicados en la inhibición de PKR2. Universidad de Castilla-La Mancha; 2019.
 46. Barrasa D. Modulación de la activación del receptor PKR2 por la proteína anosmina 1. Universidad de Castilla-La Mancha; 2018.
 47. Esteban PF, Yoon H-Y, Becker J, Dorsey SG, Caprari P, Palko ME, et al. A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6–Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J Cell Biol*. 2006 Apr 24;173(2):291–9.
 48. Kushner S. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *colE1* derived plasmids. In: Boyer HW and Nicosia S, editor. *Genetic engineering*. Amsterdam: Elsevier; 1978. p. 17–23.
 49. Gonzalez-Martinez D. Anosmin-1 Modulates Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Signaling in Human Gonadotropin-Releasing Hormone Olfactory Neuroblasts through a Heparan Sulfate-Dependent Mechanism. *J Neurosci*. 2004 Nov 17;24(46):10384–92.
 50. Andrenacci D, Grimaldi MR, Panetta V, Riano E, Rugarli EI, Graziani F. Functional dissection of the *Drosophila* Kallmann's syndrome protein DmKal-1. *BMC Genet*. 2006 Dec 11;7(1):47.
 51. Matsushima S, Shimizu A, Kondo M, Asano H, Ueno N, Nakayama H, et al. Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis. *Sci Rep*. 2020 Dec 13;10(1):188.
 52. Bianco SDC, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Oct 25;5(10):569–76.
 53. Jian B, Nagineni CN, Meleth S, Grizzle W, Bland K, Chaudry I, et al. Anosmin-1 involved in neuronal cell migration is hypoxia inducible and cancer regulated. *Cell Cycle*. 2009 Nov 15;8(22):3770–6.
 54. Levit A, Yarnitzky T, Wiener A, Meidan R, Niv MY. Modeling of Human Prokineticin Receptors: Interactions with Novel Small-Molecule Binders and Potential Off-Target Drugs. Anna, editor. *PLoS One*. 2011 Nov 21;6(11):e27990.

13. Autoevaluación

Un sentimiento es lo primero que querría resaltar en este apartado: probablemente por primera vez en mis años de formación académica, me he sentido la principal protagonista de la planificación, elaboración y ejecución de un verdadero proyecto de investigación, que ha de llevarse a cabo, además, con un enorme grado de autonomía. Elegí libremente un tema complejo, que se ha convertido en mi principal ocupación durante estos últimos meses. Me ha obligado también a contextualizar todo mi aprendizaje anterior, y a tener que aplicar conocimientos teóricos previos junto a otros nuevos. Sólo puedo decir que este trabajo no me ha dejado indiferente, pues ha generado por una parte confianza en mí misma, pero al tiempo, me ha ayudado a identificar y detectar algunas de mis carencias y necesidades formativas.

El sentimiento descrito es mío, pero no el resultado del material obtenido, que sin duda es compartido con el Dr. Esteban, pues sin su ayuda, apoyo, didáctica y aliento, no se habría podido conseguir.

Se han cumplido muchas de mis expectativas. He formado parte de un grupo de Investigación que ha compartido conmigo sus conocimientos y que me ha permitido el acceso a muy diversas técnicas de laboratorio, que sin duda me han facilitado la adquisición de una mayor habilidad y destreza. Me llena de orgullo y satisfacción.

Elegí para mi trabajo, el síndrome de Kallmann, enfermedad descrita por primera vez en el año 1856, y que aún a día de hoy sigue constituyendo todo un enigma que es necesario seguir estudiando. La aportación del conocimiento adquirido por mi tutor durante todos estos años, así como por otros investigadores cuyos trabajos he tenido que tomar en consideración, ha sido un reto para mí. Compilarlo todo en no más de cincuenta páginas con mis propias y modestas aportaciones, me ha servido para darme cuenta y valorar aún más el gran esfuerzo que hacen personas que dedican gran parte de su vida a estudiar todos los aspectos moleculares que subyacen en esta patología, que sirven al tiempo para entender otras.

Por último, no puedo dejar de hacer mención a las herramientas fundamentales que me han sido mostradas y transmitidas por mis dos tutores en este trabajo, y a las aportadas por mis profesores durante estos cuatro años. Me he apoyado en ellas para llevar a cabo este trabajo: orden, organización, resolución, capacidad de análisis, deducción y aplicación de los conocimientos teóricos a esta práctica. Lo que me ha permitido en conjunto, mejorar mi formación experimental, así como reafirmar y reforzar mi vocación por la neurobiología.