

RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats presentats en els diferents capítols que componen aquesta Tesi Doctoral s'internen en l'estudi de processos diversos, fins i tot distanciats entre ells a nivell tècnic, però que es troben fortament lligats per un mateix eix vertebrador: l'estudi de la proteïna Reelina i de la seva via de senyalització en el desenvolupament del SNC.

El descobriment, clonatge i caracterització de la Reelina es publicà l'any 1995 i fou l'inici d'un llarg camí, encara per completar, d'estudi dels processos moleculars que hi estan relacionats (D'Arcangelo et al., 1995). Prèviament, s'havia descobert i analitzat el mutant espontani *reeler* (deficient en el gen *reelina*, malgrat llavors no es conegués aquesta dada) i se n'havien obtingut coneixements fonamentals relacionats amb els processos cel·lulars de migració neuronal (Falconer, 1951; Hamburg, 1960).

Ha estat doncs recentment, i enllaçant les vessants cel·lular i molecular dels treballs de recerca relacionats amb Reelina, que s'ha avançat decididament en clarificar la participació d'aquesta proteïna en el desenvolupament del SNC.

El coneixement de noves vies de transducció de la senyal de la Reelina

Fins a l'actualitat s'han descrit diverses proteïnes com a integrants d'un sistema de senyalització intracel·lular induït per la Reelina. D'entre elles en destaquen els receptors VLDLR i ApoER2, l'mDab1, les SFKs (Src i Fyn), la PI3K, l'Akt1, la GSK3 β i la MAP1B (apartat 3) (Arnaud et al., 2003b; Beffert et al., 2002; Bock and Herz, 2003; D'Arcangelo et al., 1999; Gonzalez-Billault et al., 2005; Hiesberger et al., 1999; Rice et al., 1998).

Aquesta llista es pot fer encara més extensa si hi afegim altres molècules que d'alguna manera també s'han relacionat amb la senyalització lligada a la Reelina tot i no haver-hi consens sobre la implicació funcional d'aquesta relació. D'aquest grup en formen part: $\alpha 3\beta 1$ Integrina, CNRs, APP, Cdk5/p35, Dab2IP, Nck β , CrkI, CrkII, CrkL, Rap1, C3G, PLC- γ 1 i Shp2 (Dulabon et al., 2000; Homayouni et al., 2003; Homayouni et al., 1999; Pramatarova et al., 2003; Senzaki et al., 1999).

En conjunt, totes aquestes proteïnes conformen un sistema complex de transducció de la senyal, indicatiu de la pròpia complexitat dels processos en els que participa la Reelina. En el Capítol 2 d'aquesta tesi doctoral s'aporten noves dades complementàries a les ja descrites, caracteritzant la participació de les molècules Erk1, Erk2 i Egr-1 en el sistema de senyalització induït per la Reelina.

La Reelina activa la via de senyalització d'ERK:

En el Capítol 2 es descriu l'activació de la via de senyalització d'ERK a nivell molecular. S'observa un increment de la fosforilació i de l'activitat de les quinases regulades extracel·lularment 1 i 2 (Erk1 i Erk2), pertanyents a la família de proteïnes quinasa activades per mitògens (MAPK). La fosforilació de les MAPKs Erk1/2 es duu a terme per l'acció de la MAPK quinasa (MAPKK, MKK) MEK; i és eminentment independent de la proteïna Ras. L'activació de la via d'ERK requereix la fosforilació prèvia de l'mDab1 i l'activació de la PI3K.

La seqüència de passos que clàssicament condueixen a l'activació de les proteïnes Erk1/2 compten amb la participació de les proteïnes Ras, Raf i MEK (Seger and Krebs, 1995). Aquesta via de senyalització es troba evolutivament conservada i participa en la regulació de múltiples processos cel·lulars fonamentals com per exemple la proliferació cel·lular, la supervivència o la diferenciació (Kolch, 2005). La proteïna Ras pertany a la família de proteïnes petites d'unió a GTP (Colicelli, 2004). En estat actiu, la Ras es troba unida a GTP (Ras·GTP), i és en aquestes condicions que atrau la proteïna Raf a la membrana cel·lular i l'activa (Chong et al., 2003; Wellbrock et al., 2004). L'activació de qualsevol de les isoformes de la Raf (A-Raf, B-Raf, o Raf-1) produeix l'activació de la proteïna MEK mitjançant la fosforilació de dues serines del seu *loop* d'activació; i finalment la MEK en estat actiu produeix l'activació de les proteïnes Erk1/2 per fosforilació (Kolch, 2005).

L'activació de la Ras és causada habitualment pel complex format per Shc-Grb2-Sos. Shc uneix tirosines fosforilades, per acció d'algun estímul, a través del seu domini SH2 i llavors uneix Grb2 i Sos per tal d'activar Ras. Diversos models de senyalització activen la via d'ERK seguint aquest esquema clàssic; per exemple en la senyalització induïda per BDNF a través dels receptors TrkB (Huang and Reichardt, 2003; Segal, 2003).

La linealitat de la via que porta a l'activació de les Erk1/2 (Ras-Raf-MEK-Erk) és només una visió simplificada d'una realitat més complexa. L'activació de les Erk1/2 no sempre ve precedida d'una activació de la proteïna Ras. Diversos processos de senyalització i transducció intracel·lular de la senyal condueixen a una fosforilació de les Erk1/2 independent de la Ras. Per exemple, s'han descrit diversos casos d'activació de les Erk1/2 que depenen de la PI3K, un procés que pot ser mitjançat per la proteïna quinasa C (PKC) (Takeda et al., 1999; Wandzioch et al., 2004; Yart et al., 2002). Un altre exemple de procés d'activació de les Erk1/2 independent de la Ras utilitza la via de la Rap1. La participació de Rap1·GTP en l'activació de la via d'ERK (Raf-MEK-Erk1/2) està molt ben caracteritzada en neurones, i generalment condueix a una activació sostinguda de la via d'ERK (Stork, 2005; York et al., 1998).

Activació de la via d'ERK independent de la Ras:

En el cas concret d'activació de la via d'ERK en cultius primaris neuronals per estimulació amb la Reelina, podem dir que la proteïna Ras no hi intervé d'una forma determinant. Les dades obtingudes en el desenvolupament d'aquesta Tesi, i mostrades al Capítol 2, indiquen que els nivells d'activació de la Ras a 5 minuts després de l'estimulació amb la Reelina no s'alteren de forma significativa. Tampoc s'observa activació de la Ras a temps més perllongats, de 15 minuts, quan la fosforilació de les Erk1/2 causada per l'estimulació amb la Reelina és màxima (*Figura 32*). Per aquest motiu es va avaluar l'activació de la via d'ERK per mecanismes independents de la Ras.



Figura 32 La Reelina no induïx l'activació de Ras. Detecció de l'activitat de la proteïna Ras a 15min de tractament amb control Mock (C) i amb sobrenedants que contenen la Reelina (R). Pull-down de Ras actiu amb RBD (Ras Binding Domain de la Raf) (esquerra), i quantificació dels nivells d'activació de la Ras (dreta). Els controls de càrrega no van mostrar diferències significatives.

El perfil temporal de l'activació de les Erk1/2 que segueix a una estimulació amb la Reelina reflexa la improbabilitat que la Rap1 hi estigui implicada. L'activació de la via d'ERK mitjançada per la Rap1 s'associa a activacions sostingudes de les Erk1/2 (Stork, 2005; York et al., 1998). En els tractaments amb la Reelina dels cultius primaris neuronals no s'observen perfils d'activació

perllongats, sinó una activació ràpida de les Erk1/2 a 5-15 minuts, seguida d'una recuperació també ràpida dels nivells basals, que s'assoleixen a partir de 30 minuts. Tot i així, la proteïna Rap1 s'activa en resposta a l'estimulació amb la Reelina, i ho fa a través de la via de senyalització de CrkL/C3G (Ballif et al., 2004). Conjuntament, aquestes dades suggereixen que la Rap1 activada per la Reelina podria participar en processos diferents als d'inducció de la via d'ERK. Els efectors de la proteïna Rap1 són abundants, i inclouen proteïnes tant diverses com: Raf, PI3K, Ral, PLC, Afadin o Arap3. La proteïna Rap1 s'ha associat sovint a la regulació de les propietats d'adhesió cel·lulars i en la regulació de la dinàmica dels filaments d'actina (Bos, 2005; Bos et al., 2001; Caron, 2003); i també pot contribuir al creixement neurític regulat per cAMP (York et al., 1998).

La recerca d'altres candidats que estimulin l'activació de la via d'ERK de forma independent de la Ras ha permès revelar la participació de la PI3K en aquest procés. La inhibició de la PI3K amb el fàrmac LY 294002 impedeix la fosforilació de les Erk1/2; i ho fa de forma específica en la senyalització de la Reelina. En altres sistemes de senyalització, com per exemple quan l'estímul és el BDNF, l'LY 294002 no afecta a la fosforilació de les Erk1/2. Així doncs, en el cas concret de la transducció intracel·lular de la senyal originada per la Reelina, l'activació de la via d'ERK és dependent de l'activació prèvia de la via de PI3K.

Tenint en compte que l'activació de la PI3K dependent de la Reelina requereix la fosforilació prèvia de l'mDab1, i també la participació de les SFKs, en conjunt, podem dir que les vies de senyalització descrites fins al moment que s'activen en resposta a la Reelina ho fan de forma interconnectada. L'activació d'ERK no és una conseqüència única i independent de la resta de processos de transducció de la senyal activats per la Reelina. L'activació de la via d'ERK requereix una sèrie de passos previs, amb un sistema de senyalització coordinat, que dona una resposta global a l'estímul de la Reelina. En conjunt, es produeix l'activació seqüencial de les SFKs, de l'mDab1, de la PI3K i finalment de la via d'ERK.

Altres MAPKs:

En el Capítol 2 també s'analitza la participació d'altres MAPKs en la senyalització induïda per la Reelina. Concretament, es va avaluar una hipotètica activació per fosforilació de les proteïnes MAPKs conegudes com p38 i JNK1/2/3 (Johnson and Lapadat, 2002; Zarubin and Han, 2005). Els resultats obtinguts indiquen que no hi ha participació de la p38 en la senyalització de la Reelina, ni tampoc de les proteïnes JNKs; descartant-se una acció inespecífica de la Reelina sobre totes les MAPKs. Aquesta és una dada rellevant, ja que les MAPKs p38 i JNKs sovint s'han relacionat, amb processos de mort programada o apoptosi (Wada and Penninger, 2004; Xia et al., 1995; Zarubin and Han, 2005). No obstant, cal remarcar que no sempre hi ha una relació directa entre activació de les p38 i JNKs i la inducció d'apoptosi ja que el paper que juguen aquestes proteïnes en els processos de mort programada és molts divers i depèn del tipus cel·lular (Wada and Penninger, 2004).

En el cas de la Reelina, aquesta no està vinculada en la regulació de la supervivència neuronal. De fet, fins a l'actualitat no s'ha descrit cap alteració ni en el nombre de cèl·lules ni en els processos apoptòtics dels animals *reeler* o *mdab1*^{-/-}. La no activació de les vies de p38 i JNKs concorda amb el supòsit que la Reelina no participa en processos d'apoptosi.

La importància funcional de l'activació de la via d'ERK:

El manteniment breu de l'activació de les Erk1/2 en resposta a la Reelina indica una afectació puntual de la via d'ERK. No obstant, això no implica transitorietat de l'afectació de factors subjacents a aquesta via. És conegut que les Erk1/2, en activar-se, es transloquen al nucli i fosforilen factors de transcripció com per exemple l'Elk-1 i indueixen l'expressió gènica (Treisman, 1996; Zhang and Liu, 2002). En el Capítol 2 s'ha demostrat que la translocació nuclear de les Erk1/2 es produeix en resposta a l'estímul de la Reelina i que es produeix l'activació ràpida la transcripció gènica d'almenys el gen *egr-1*. Així, tot i que la via d'ERK es manté activa durant un període breu, els seus efectes sobre les cèl·lules estimulades amb la Reelina es perllonguen en el temps gràcies a la modulació de l'expressió gènica.

D'altra banda, tal com queda reflectit en el Capítol 2, l'activació de la via d'ERK dependent de la Reelina és necessària per a, com a mínim, un procés fisiològic: el trencament de les interaccions homofíliques entre neuroblasts en migració tangencial a la RMS. La dependència de la via d'ERK per al procés de desadhesió de les neurones de la SVZ, fa que aquest procés també sigui dependent de l'activació de la PI3K i de les SFKs i l'mDab1.

Perspectives de futur en la senyalització de la Reelina:

Encara es mantenen obertes moltes incògnites en relació als mecanismes concrets d'activació de les vies de senyalització estimulades per la Reelina. D'entrada, es coneixen moltes molècules d'unió a l'mDab1 que no estan ubicades en un esquema clar de transducció de la senyal de la Reelina. A més, cal suposar que hi ha altres molècules encara no identificades que també interaccionen amb l'mDab1 o bé amb altres punts de les vies activades per la Reelina.

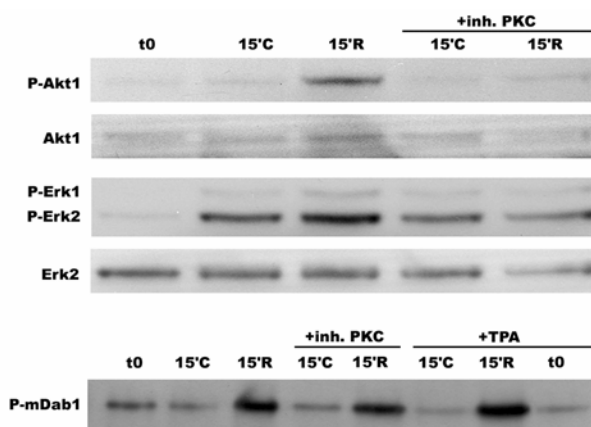
El propi mecanisme d'activació de la via d'ERK descrit en el Capítol 2 manté un nombre elevat d'incògnites sobre les molècules que realitzen els diferents passos. Entre d'altres, cal aclarir el mecanisme exacte d'activació de la via d'ERK per part de la PI3K; i concretament, cal aclarir quines molècules el vehiculen. També es desconeix en quin punt exacte s'inicia l'activació de la via d'ERK. Els resultats actuals mostren que la proteïna MEK i les Erk1/2 s'activen, sense que s'hagi pogut escatir si la Raf hi col·labora o no. Tampoc es coneix quins són els factors substrats de les proteïnes Erk1/2 quan aquestes transloquen al nucli. I finalment, es desconeix l'existència de possibles interconnexions entre la via d'ERK i altres vies de senyalització, possibilitat que incrementaria encara més la visió d'una xarxa interconnectada en els processos de senyalització de la Reelina.

La participació de la PKC:

Dades recents obtingudes a nivell preliminar durant el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral contribueixen a completar la discussió sobre aquests aspectes. Per comparació amb d'altres sistemes de senyalització, una de les hipòtesis de treball contempla que l'activació de la via d'ERK per acció de la PI3K estigui mitjançada per la PKC (Takeda et al., 1999; Wandzioch et al., 2004; Yart et al., 2002). Amb l'objectiu d'aclarir aquesta possibilitat es van estimular cultius primaris neuronals amb la Reelina, seguint el mateix protocol detallat en el Capítol 2, i en presència d'inhibidors de la PKC. Els resultats obtinguts permeten concloure que la inhibició de la PKC bloqueja la fosforilació de les Erk1/2 promoguda per la Reelina (*Figura 33*). En analitzar l'estat de la fosforilació de l'Akt1 (com a marcador de l'activitat de la PI3K) s'observa que l'inhibidor de la PKC també en bloqueja l'activació induïda per la Reelina (*Figura 33*). Així doncs, les dades experimentals no corroboren la hipòtesi formulada segons la qual s'activaria la via d'ERK en la seqüència mDab1-PI3K-PKC-ERK; sinó que localitzen la participació de la PKC en un estadi superior al de les vies de PI3K i d'ERK.

Per aquest motiu es va analitzar si la PKC afectava a la fosforilació de l'mDab1. Es van incubar cultius primaris telencefàlics amb l'inhibidor, i també amb el seu activador; i es va mirar l'efecte de la Reelina sobre la fosforilació de l'mDab1 en aquestes condicions. La inhibició de la PKC no afecta a la fosforilació de l'mDab1, per tant, aquesta dada situa la PKC en un punt per sota, o bé en paral·lel, a la fosforilació de l'mDab1 (*Figura 33*). D'altra banda, l'activació de la PKC en si mateixa no induïx la fosforilació de l'mDab1, però podria facilitar-la si tenim en compte els nivells de fosforilació assolits en estimular amb la Reelina cultius preincubats amb l'activador TPA són lleugerament superiors. En canvi, l'efecte de TPA sobre la fosforilació de l'Akt1 encara està molt poc aclarit; de fet, si bé caldria esperar que en fosforilar-se més l'mDab1 també s'activessin més fortament l'Akt1 i les Erk1/2, el resultat observat indiquen que les Erk1/2 mantenen els nivells típics d'activació que segueixen a una estimulació amb la Reelina, i que l'Akt1 fins i tot mostra una disminució en la potència de la seva activació (*dades no mostrades*).

Figura 33 La inhibició de la PKC bloqueja l'activació de les vies d'ERK i de PI3K/Akt1. Anàlisi per WB de lisats de cultius primaris telencefàlics. Les mostres són no tractades (t0) o bé tractades amb sobrenedants control (C) i amb sobrenedants que contenen Reelina (R). La incubació amb l'inhibidor de PKC abans del tractament, bloqueja la fosforilació induïda per la Reelina de les proteïnes Erk1, Erk2 i Akt1, però no la de l'mDab1. La incubació amb l'activador de PKC (TPA) facilita la fosforilació de la mDab1 induïda per la Reelina. **inh.PKC**, myristoylated EGF-R fragment (651-658); **TPA**, phorbol-1-Myristate-13-acetate.



En conjunt, les dades referides a la participació de la PKC en la via de la Reelina no mostren resultats concloents que n'aclareixin la seva contribució exacta. En la valoració de les dades obtingudes cal tenir en compte diverses qüestions; d'una banda que l'inhibidor i activador de la PKC que s'han emprat són d'espectre ampli: s'afecten subtipus de PKC i a més alteren col·lateralment a d'altres sistemes de senyalització (Larsson, 2006). Les diferents isoformes de la PKC constitueixen una família de proteïnes que s'agrupen en tres categories: les PKC clàssiques (α , β , γ), les PKC noves (δ , ϵ , η , θ) i les PKC atípiques (λ , ζ) (Larsson, 2006; Mellor and Parker, 1998). Les PKC formen part de les xarxes de senyalització intracel·lulars que regulen un gran nombre de processos cel·lulars, sovint a nivell de citoesquelet d'actina. Per exemple, algunes PKC promouen la migració d'alguns tipus cel·lulars i també el creixement neurític en cèl·lules PC12; d'altra banda alguns subtipus de PKC també participen en el col·lapse axonal i en la retracció. Les funcions aparentment contradictòries que poden arribar a realitzar les PKC dificulten la interpretació de les dades; i en bona part es deuen a l'existència de diferents isoformes que desencadenen efectes també diferents; a més, una mateixa PKC pot promoure efectes divergents segons afectin a processos cel·lulars de curt o llarg abast (Larsson, 2006). També en la senyalització induïda per la Reelina hem de tenir en compte que diferents subtipus de PKC poden participar en diferents nivells de la senyalització, i que amb els resultats obtinguts amb fàrmacs d'ampli espectre estaríem observant una superposició de tots ells, i l'emascament d'efectes puntuals i dirigits.

L'activació directa de les diferents isoformes de la PKC cal que sigui analitzada en detall en nous experiments. Algunes dades indiquen que la PKC podria contribuir a la funció de la Reelina en la migració neuronal, ja que la seva inhibició en cultius organotípics d'escorça cerebral provoca un fenotip similar al dels animals *reeler* en migració radial (Jossin et al., 2003b). D'altra banda, la PKC està molt lligada a la senyalització mitjançada per Integrines, i es dona la circumstància que la Reelina uneix la Integrina $\alpha 3$ i que l'mDab1 interacciona intracel·lularment amb la cua citoplasmàtica de la Integrina $\beta 1$ (Dulabon et al., 2000; Schmid et al., 2005). Alhora, la Integrina $\alpha 3 \beta 1$ s'ha considerat un receptor de la Reelina que participa en la seva hipotètica funció d'aturada de la migració radial a l'entrada de la zona marginal (Dulabon et al., 2000).

La FAK no forma part del sistema de senyalització de la Reelina:

Amb la intenció de buscar noves vies no caracteritzades que també participin en la senyalització de la Reelina, es va analitzar la implicació de la quinasa de les adhesions focals (FAK). La FAK és una proteïna tirosina quinasa que regula les propietats d'adhesió i motilitat cel·lulars mitjançant la regulació de la formació de contactes focals (Mitra et al., 2005). La FAK pot autofosforilar-se, facilitant d'aquesta manera la interacció amb algun dels seus substrats; d'altra banda la FAK és activada per acció de les SFKs (Mitra et al., 2005).

Es va analitzar la hipotètica participació de FAK en la senyalització intracel·lular induïda per la Reelina a causa de la seva implicació en processos d'adhesió, pel requeriment de la participació de les SFKs i perquè FAK s'activa per estimulació amb algunes proteïnes de guia com la Netrina-1 (Liu et al., 2004; Ren et al., 2004). Com a dada d'interès s'ha obtingut un resultat completament negatiu; que indica que la FAK no estaria jugant cap paper directe en la senyalització de la Reelina (*dades no mostrades*).

La Reelina activa transcripció gènica

Una de les dades més rellevants que es presenta en el Capítol 2 és la descripció de la transcripció gènica de l'*egr-1*, a nivell d'mRNA i a nivell proteic, com a resultat de l'estimulació de cultius primaris de telencèfal amb la Reelina. És habitual que les conseqüències finals d'un estímul extracel·lular comportin canvis determinants en l'esdevenir de la cèl·lula, canvis que sovint es vehiculen a través de l'expressió gènica. Així, la Reelina, a més d'induir canvis ràpids d'afectació del citoesquelet (Gonzalez-Billault et al., 2005), també estaria intervenint en processos igualment importants, i de més llarg abast, que podrien determinar el destí de les cèl·lules que hi responen.

L'*egr-1* és un gen d'expressió ràpida, o *early gene*, que s'activa fortament i transitoriament sense requerir síntesi proteica *de novo* (Knapska and Kaczmarek, 2004; Tsai-Morris et al., 1988). Els *early genes* tenen la capacitat d'incrementar la seva transcripció, i també la traducció, d'una forma sobtada com a conseqüència d'un estímul extracel·lular mitjançant la participació de cascades de senyalització intracel·lulars (Sng et al., 2004). L'*egr-1* respon a l'estímul de la Reelina incrementant la quantitat de proteïna des de temps tan curts com 30 minuts. La vida mitjana de les proteïnes transcrits dels *early genes* és també curta (Knapska and Kaczmarek, 2004), permetent que la regulació per canvis d'expressió gènica tingui una durada limitada. En alguns casos excepcionals, l'expressió de l'*egr-1* té una durada més llarga, per exemple, de més de tres hores després de la inducció d'LTP en gir dentat de rata (Richter-Levin et al., 1998). En el cas de l'estimulació amb la Reelina de cultius primaris neuronals embrionaris de telencèfal, es recuperen els nivells basals d'Egr-1 a les 3 hores de tractament.

Habitualment, els *early genes* són factors de transcripció (c-fos, Egr-1 o c-jun) a través dels quals s'indueix l'expressió d'altres gens, aconseguint que un estímul extracel·lular controli un ampli ventall de gens de forma ràpida i dirigida (Sng et al., 2004). Un altre *early gene* que també respon de forma ràpida a estímuls extracel·lulars és el gen *c-fos*; com a marcador d'activitat neuronal (Martinez et al., 2002); a més, c-fos és també un substrat de la via d'ERK (Zhang and Liu, 2002). L'anàlisi dels nivells proteics de la c-fos en resposta a la Reelina no mostra cap increment significatiu a 1 hora de tractament en les condicions emprades (Figura 34). Queda doncs descartada la participació de c-fos en senyalització de la Reelina, però no necessàriament la d'altres gens d'expressió ràpida que puguin actuar paral·lelament a l'*egr-1*.

El mecanisme d'activació de la transcripció de l'*egr-1*:

L'increment de l'expressió de l'*egr-1* en resposta a l'activació de la via d'ERK es pot induir a través de les cinc seqüències SRE (element de resposta a sèrum, o *serum response element*) del seu promotor (Knapska and Kaczmarek, 2004; Tsai-Morris et al., 1988). Quan les Erk1/2 transloquen a nucli, fosforilen la proteïna Elk-1, part integrant del complex ternari de transcripció gènica, responsable de la transcripció ràpida de gens que contenen la seqüència SRE (Bozon et al., 2002; Treisman, 1995). L'Elk-1 és un membre de la família de factors del complex ternari (TCF, o *ternary complexe factor*) i

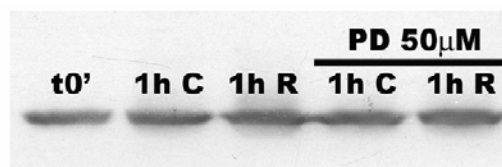


Figura 34 La Reelina no induïx l'expressió de c-fos. Anàlisi dels nivells proteics de c-fos per WB després de l'estimulació amb sobrenedants que contenen la Reelina (R) o bé amb control Mock (C). La Reelina no incrementa els nivells de c-fos i per tant la inhibició de la via d'ERK amb el tractament amb PD 98059 no té cap efecte.

conjuntament amb un dímer format per factors de resposta a sèrum (SRF, o *serum response factor*) configura el complex ternari (Buchwalter et al., 2004; Shaw and Saxton, 2003). L'activació de l'Elk-1 en resposta a la Reelina no ha estat analitzada específicament, però sembla provable, especialment si tenim en compte que tant el seu activador més característic (Erk1/2) com el seu substrat habitual (*egr-1*) s'hi veuen implicats. No obstant, no es pot descartar taxativament que la senyal es transdueixi a partir d'altres TCFs diferents de l'Elk-1. De fet, tant la Sap-1 com la Net també poden activar-se per la via d'ERK i passar a ser factors de transcripció actius (Buchwalter et al., 2004). Així, pensant que altres factors TCF puguin activar-se, la llista de candidats a respondre a l'estímul de la Reelina a nivell transcripcional és llarga.

L'increment de la transcripció de l'*egr-1* promogut per l'activació prèvia de la via d'ERK no sempre depèn de la formació de complexos ternaris. La regió promotora de l'*egr-1* conté altres seqüències consens per a la seva regulació, tot i que en un nombre de repeticions menor que les de SRE. Una d'aquestes seqüències reguladores és l'element de resposta a calci i AMP cíclic (CRE, o *calcium/cAMP response element*) (Knapska and Kaczmarek, 2004; Tsai-Morris et al., 1988). La via d'ERK és capaç d'activar el factor de transcripció CREB mitjançant la participació de la kinasa Rsk2. En estat actiu, la proteïna CREB s'uneix a les seqüències CRE i s'inicia la transcripció gènica, per exemple de l'*early gene egr-1* (Bozon et al., 2002). En cultius primaris neuronals tractats amb la Reelina, els nivells de fosforilació de la proteïna CREB no pateixen alteracions perceptibles (*dades no mostrades*). Aquesta dada, i la previsió que les seqüències SRE siguin més fortes que les CRE en el promotor de l'*egr-1* (Bozon et al., 2002), fan preveure que la inducció de l'expressió de l'*egr-1* en resposta a l'estímul de la Reelina, està eminentment gestionada per l'Elk-1.

Els substrats de l'Egr-1:

L'Egr-1 s'uneix a les seqüències ERE (*Egr-1 response element*) per a regular la transcripció gènica (Knapska and Kaczmarek, 2004). El nombre de gens capaços de veure's activats per l'Egr-1 és abundant i divers: el gen *pten*, el gen *p35*, el gen *p53* i el propi gen *egr-1* en són alguns exemples (Harada et al., 2001; Nair et al., 1997; Sakamoto et al., 1991; Schwachtgen et al., 2000; Virolle et al., 2001). La llista completa és bastant més extensa, i inclou gens que codifiquen per factors de transcripció (*pax2*, *areb6*, *atf3*, *gata2*), per proteïnes de senyalització (*notch3*, *rad*, *bcl-1*), per factors de creixement (*tgfb*, *igf-2*, *vegf*) o per proteïnes de matriu extracel·lular (*fibronectina*, *collagen III a1*), entre d'altres (*apoe*, *apod*) (Fu et al., 2003).

Els llistats anteriors inclouen diverses proteïnes relacionades amb les vies de senyalització de la Reelina. La PTEN promou la desfosforilació de la posició 3 dels fosfatidilinositols, l'efecte contrari del de la PI3K (Cantley, 2002). La p35 és la coactivadora de la Cdk5, que interacciona amb l'mDab1 i participa en els processos de migració radial (Beffert et al., 2004; Keshvara et al., 2002; Ohshima and Mikoshiba, 2002). I finalment, el propi gen *egr-1*, induïble per la Reelina, pot arribar a autoregular-se ja que conté una seqüència ERE al seu propi promotor (Sakamoto et al., 1991; Schwachtgen et al., 2000).

Retroalimentació en la via d'ERK/Egr-1:

L'anàlisi d'una possible inducció d'aquests gens mitjançada per l'Egr-1 i en resposta a l'estimulació amb la Reelina haurà de ser analitzada en el futur. Si PTEN s'activés, es demostraria l'existència d'un sistema de regulació per retroalimentació negativa creuada entre les vies d'ERK i de PI3K. Si fós la p35 que incrementés els

nivells, es trobaria el punt d'interconnexió directa entre la senyalització induïda per la Reelina i el sistema p35/Cdk5. No obstant, per ara, només podem fer suposicions per comparació amb altres sistemes ja descrits. Les potencialitat de l'Egr-1 en la inducció de l'expressió gènica és alta i en el sistema induït per la Reelina desconexim encara quins efectors hi estan implicats.

La retroalimentació negativa, o *feed-back* negatiu, és comú en la via de senyalització d'ERK. No obstant, no necessàriament implica la transcripció de gens d'expressió tardana. L'activació de la via d'ERK comporta, en determinades circumstàncies, la inducció ràpida de l'expressió de fosfatases de les MAPKs. Quan això succeeix, la via d'ERK s'autoregula, evitant una prolongació innecessària de la durada de la seva activació (Bhalla and Iyengar, 1999; Davis et al., 2000). Les proteïnes fosfatases de les MAPKs (MKPs, o *MAPK phosphatases*) eliminen els grups fosfat d'activació de les diverses MAPKs (Farooq and Zhou, 2004). Les MKPs, com per exemple l'MKP-1, són proteïnes codificades per *early genes*. L'expressió de l'MKP-1, la fosfatasa de les Erk1/2, s'activa mitjançant les seqüències CRE, en resposta a l'activació de la via d'ERK (Charles et al., 1993; Davis et al., 2000; Sgambato et al., 1998; Sun et al., 1993). Per tant, no hi participen els complexos ternaris. Sembla doncs improbable que l'MKP-1 s'indueixi de forma directa en resposta a la inducció amb la Reelina; i és que la Reelina no sembla que indueixi la fosforilació de la CREB de forma ràpida.

Tot i l'absència de la demostració molecular de la retroalimentació negativa de la via d'ERK en resposta a la Reelina, disposem de dades experimentals que concorden amb l'existència d'algun sistema d'autoregulació, tot i que el desconexim. En les neurones d'animals *mdab1* ^{-/-} s'activa de forma més vigorosa del normal la via d'ERK en resposta a tot tipus d'estímuls. L'estimulació de neurones telencefàliques amb un estimul independent de la Reelina (el BDNF) produeix en *mdab1* ^{-/-} conseqüències més importants a nivell d'activació d'ERK que no pas en els animals wild type. Una possible explicació d'aquest fenomen caldria buscar-la en el fet que les neurones de l'*mdab1* ^{-/-} no han senyalitzat mai eficaçment l'estimul de la Reelina. Aquesta circumstància indica que, potser, la Reelina estaria produint una dessensibilització de la via d'ERK. Això seria una conseqüència permanent en les neurones que han entrat en contacte amb la Reelina i una circumstància impossible de produir en les cèl·lules d'animals *mdab1* ^{-/-}, i presumiblement amb les dels *reeler*.

En canvi, la dessensibilització es delimita a la via d'ERK i no és un efecte generalitzat en tota la senyalització induïda per la Reelina, en la via de PI3K/Akt1 no s'ha observat. Així doncs, caldrà delimitar la recerca dels factors responsables del *feed-back* negatiu en aquells que afecten a la via d'ERK de forma directa.

A nivell de les MKPs, cal enfocar la recerca en dues direccions. D'una banda, com s'ha comentat, les MKPs poden actuar com a *early genes* i transcriure's de forma ràpida en resposta a l'activació de la via d'ERK, mitjançant la participació de la CREB. D'altra banda, altres factors de transcripció poden regular les MKPs, com és el cas de la proteïna p53, que és un factor de transcripció de la MKP-1 i que alhora és un efector del factor de transcripció Egr-1 (Nair et al., 1997; Yang and Wu, 2004). També el complex p35/Cdk5, en part induïble per Egr-1, té la capacitat d'inhibir la via d'ERK mitjançant la fosforilació inhibidora de la MEK (Sharma et al., 2002).

Seràn necessaris nous experiments per confirmar la retroalimentació negativa de la via d'ERK en el cas de la senyalització induïda per la Reelina, que fins ara és únicament una hipòtesi de treball. La forma d'abordar aquests treballs de recerca ha de contemplar l'anàlisi detallat dels perfils temporals d'activació de la via d'ERK, també en els *reeler*, per tal de trobar indicadors que avalin, o desmenteixin, la hipòtesi formulada.

La participació de la via d'ERK/Egr-1 en processos de desenvolupament i plasticitat del SNC:

Les diferents famílies de proteïnes MAPKs participen en senyalització intracel·lular de processos molt diversos, en tots els teixits i en les diferents etapes del desenvolupament (Johnson and Lapadat, 2002). Proliferació, apoptosi, diferenciació, migració, creixement neurític, LTP i memòria en són alguns exemples (Davis et al., 2000; Huang et al., 2004a; Kale, 2005; Qui and Green, 1992; Wada and Penninger, 2004; Zhang and Liu, 2002).

Les MAPKs en migració:

Tot i que la migració no ha estat associada tradicionalment amb la senyalització per MAPKs, actualment està agafant certa rellevància a causa de la multitud de processos migratoris que es veuen regulats per les vies de JNK, de p38 o d'ERK (Huang et al., 2004a). Així, l'activació de les JNKs es correlaciona amb l'increment de la migració de diversos tipus cel·lulars en resposta, per exemple, dels estímuls EGF o ephrin-B1 (Hauck et al., 2001; Huynh-Do et al., 2002). També la p38 és necessària en processos migratoris de diferents tipus cel·lulars (Huang et al., 2004a).

Finalment, la via d'ERK s'ha relacionat amb la migració induïda per proteïnes de la matriu extracel·lular com el col·lagen o la fibronectina, entre d'altres (Anand-Apte et al., 1997; Huang et al., 2004a; Klemke et al., 1997; Webb et al., 2000). Les dades descrites en el Capítol 2 sobre la contribució de la via d'ERK en la desadhesió de les neurones de la RMS fan pensar que aquesta via de senyalització també és important per als processos migratoris que es produeixen en el SNC.

El creixement neurític mitjançat per la via d'ERK:

El creixement neurític depèn de la via d'ERK en models de línies cel·lulars de fenotip neuronal com són la PC12 i la SH-SY5Y. Així, l'estimulació de les cèl·lules SH-SY5Y amb el BDNF requereix l'activació de la via d'ERK per promoure la neuritogènesi (Encinas et al., 1999). També les cèl·lules PC12 veuen activada la via d'ERK per acció d'estímuls diversos que n'indueixen el creixement neurític com són FAIM, ginepin o PBN (Soler et al., 1999; Tsuji et al., 2001; Yamazaki et al., 2001). En alguns sistemes de cultiu primari neuronal s'ha demostrat la implicació d'ERK en el creixement neurític induït per factors extracel·lulars (Aletsee et al., 2001; Desbarats et al., 2003; Perron and Bixby, 1999). I finalment, la retracció neurítica (induída per EphB2) es vehicula per una senyalització intracel·lular que bloqueja la via d'ERK (Elowe et al., 2001). En conjunt, totes aquestes dades indiquen que la via d'ERK està intimament lligada a la inducció del creixement neurític en molts sistemes i, en conseqüència, juga un paper clau en el desenvolupament del SNC.

Independentment, coneixem que la Reelina indueix el creixement neurític de les neurones hipocàmiques a través dels receptors VLDLR i ApoER2, i amb la participació de la proteïna mDab1 (Niu et al., 2004). Com que la via d'ERK s'activa en resposta a la Reelina en cultius primaris neuronals de telencèfal (Capítol 2), i possiblement també en neurones hipocàmiques, caldrà analitzar en el futur la hipotètica participació de la via d'ERK en el creixement neurític induït per la Reelina.

La via d'ERK/Egr-1 en processos d'LTP i memòria:

El procés d'LTP és una forma ben caracteritzada de plasticitat sinàptica que participa en els processos de memòria i aprenentatge (Martin et al., 2000). La inducció de l'LTP comporta la transcripció gènica de determinats *early genes*, prèvia activació de vies de senyalització que inclouen proteïnes quinasa com PKC, PKA o α CaMKII (Cole et al., 1989; Soderling and Derkach, 2000). La via de senyalització d'ERK també es veu activada en processos d'LTP i és essencial per a determinats tipus d'aprenentatge (Atkins et al., 1998; Blum et al., 1999; English and Sweatt, 1996; English and Sweatt, 1997). L'activació de la via d'ERK i la subsegüent inducció de l'expressió de l'*egr-1* són claus per al procés d'LTP també en models *in vivo* (Davis et al., 2000). A més de la correlació entre la inducció de l'LTP i la transcripció de l'*egr-1*, s'ha pogut corroborar que l'Egr-1 és bàsic per als processos de plasticitat i memòria a llarg terme (Jones et al., 2001). L'activació de la via d'ERK/Egr-1 té una gran importància en diversos processos de plasticitat: LTP i memòria a llarg terme, i en aprenentatge (Knapska and Kaczmarek, 2004).

Els animals deficients en *egr-1* mantenen intacta la memòria curta però en canvi mostren deficiències importants de memòria a llarg terme (Bozon et al., 2002; Jones et al., 2001). D'altra banda, els animals knock-out per *erk1*, una de les dues MAPKs de la via d'ERK no disminueix la plasticitat sinàptica sinó que la incrementen (Mazzucchelli et al., 2002). S'evidencia un efecte diferenciat de les quinases Erk1 i Erk2 en determinades funcions i processos de senyalització en determinades regions del cervell. La deficiència d'*erk1* fa incrementar el contingut de la proteïna Erk2, i aquesta facilita la plasticitat (Mazzucchelli et al., 2002).

La Reelina és un dels estímuls capaç d'induir l'LTP en hipocamp (Weeber et al., 2002), i alhora, segons els resultats d'aquesta Tesi, la Reelina indueix l'activació de la via d'ERK/Egr-1 en cultius primaris neuronals (Capítol 2). Així doncs, tot i que no podem afirmar que la Reelina indueixi l'LTP mitjançant l'expressió de l'Egr-1, les dades apunten fortament cap a aquesta possibilitat encara no confirmada.

La importància funcional de la senyalització de la Reelina

La distribució de l'expressió de la Reelina dóna idea de la complexitat del paper que duu a terme aquesta proteïna en el SNC (Alcantara et al., 1998). Això fa difícil que puguem parlar de "la funció" de la Reelina; més aviat cal considerar diverses contribucions d'aquesta proteïna en diversos processos que es produiran en diverses zones del SNC i en diferents etapes del desenvolupament.

Sabem que la Reelina juga un paper clau en la migració de les neurones de l'escorça i l'hipocamp durant la laminació d'aquestes estructures, en la migració radial de cerebel i en el bulb olfatori. Sabem que d'alguna manera contribueix a la sinaptogènesi i establiment de connexions en hipocamp. Desconeixem però la naturalesa exacta de la participació de la Reelina en gairebé tots aquests processos.

Fins ara s'han desenvolupat alguns models *in vitro* per avaluar la funció de la Reelina: desunió de neurones corticals de la glia radial (Dulabon et al., 2000); increment de la ramificació de neurones hipocàmiques (Niu et al., 2004); i desunió de cèl·lules migrants de la RMS (Hack et al., 2002). Són models complexos i difícils de reproduir. No obstant, són un sistema model per avaluar la participació de vies de senyalització concretes en funcions concretes de la Reelina.

Per tal de desenvolupar el treball descrit en el Capítol 2 s'ha escollit el model publicat per Hack i col·laboradors en el qual la Reelina indueix la individualització dels neuroblasts migrants de la RMS fent que es desadhereixin de les cadenes (Hack et al., 2002). Amb aquest model s'han provat diferents drogues: LY 294002, PD 98059 i PP2, inhibidors de la PI3K, de la MEK i de les SFKs respectivament, obtenint com a resultat la prova funcional de la implicació de la via d'ERK en processos desencadenats per la Reelina. Així doncs, són importants tant la PI3K, com la MEK com les SFKs en el procés de desunió de les neurones de la RMS induït per la Reelina.

La reproducció *in vitro* de processos fisiològics permet controlar en major mesura l'administració de droga, els paràmetres a analitzar, la variabilitat, etc... Així ha estat assajat per al cas de la PKC, utilitzant inhibidors de la PKC s'han pogut reproduir fenotips *reeler* en cultius organotípics d'escorça d'animals *wild type* sota tractament amb droga; donant la prova de la implicació directa de la PKC en processos de senyalització de la Reelina (Jossin et al., 2003b).

Cal remarcar que diferents processos poden tenir diferent senyalització, i llavors la importància de diferents vies de senyalització pot ser diferent per a les diferents funcions que desencadena la Reelina, i per tant, també diferent en cada un dels models *in vitro* que es desenvolupin.

L'mDab1, un punt clau en la senyalització de la Reelina

La proteïna mDab1 actua de forma directa en tots els processos coneguts fins ara de senyalització i funció de la Reelina. La Reelina n'indueix la fosforilació i aquest pas és essencial per desencadenar les successives cascades de senyalització (Jossin et al., 2003a; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003).

Per poder concloure que l'mDab1 és essencial perquè la Reelina realitzi les seves funcions ha estat bàsica la utilització de mutants *mdab1* *-/-* en les diverses aproximacions experimentals. D'entrada, l'anàlisi dels propis mutants *mdab1* *-/-*, fenotípicament idèntics als *reeler* (Howell et al., 1997b), posa de manifest el fort lligam existent entre aquestes dues proteïnes; lligam que, ja des d'un primer moment, les va situar com a integrants d'una única via lineal de senyalització (Howell et al., 1999a).

Els mutants mdab1 -/- en senyalització:

La descripció dels diferents passos de senyalització que indueix la Reelina sobre les cèl·lules que hi responen s'ha basat en l'obtenció de cultius primaris neuronals i en el tractament d'aquests cultius amb la Reelina recombinant produïda en cèl·lules heteròlogues. Mitjançant dissenys experimentals basats en aquest principi, diferents grups han descrit diferents passos de la senyalització de la Reelina: que la Reelina indueix la fosforilació de l'mDab1 (Howell et al., 1999a), que la Reelina activa les SFKs (Bock and Herz, 2003), que la Reelina indueix la fosforilació de l'Akt1 (Beffert et al., 2002), o bé que la Reelina indueix la fosforilació de la MAP1B (Gonzalez-Billault et al., 2005). També els resultats mostrats en el Capítol 2 s'han basat en el mateix model experimental per a poder detectar l'estimulació de les Erk1/2 en resposta a la Reelina.

L'obtenció de cultius primaris similars, però utilitzant com a teixit de partida els mutants *mdab1* *-/-*, ha permès comprovar la participació de l'mDab1 en aquests diferents processos. Així, s'observa que sense l'mDab1 la Reelina és incapaç d'induir l'activació de les SFKs; fet que permet concloure que l'mDab1 és alhora substrat i activador de les SFKs (Bock and Herz, 2003).

Tampoc es detecta fosforilació de l'Akt1 per tractaments amb Reelina de cultius primaris de mutants *mdab1* *-/-*; indicatiu que l'mDab1 també intervé en el procés d'activació de la PI3K (Beffert et al., 2002). La forma exacta d'aquesta participació encara no està del tot clarificada, però ja disposem de pistes prou importants com per hipnotitzar-ne un mecanisme. D'entrada cal esmentar que la detecció per WB de la fosforilació de l'Akt1 és una manera indirecta de detectar activació de la PI3K. La PI3K, en activar-se, fosforila el 4,5-fosfatidilinositol en posició 3, circumstància que provoca l'atracció a la regió perimembrana de proteïnes amb dominis PH d'interacció amb 3,4,5-fosfatidilinositol (Cantley, 2002). D'entre les proteïnes que contenen PHs hi trobem les quinases Akt1 i PDK1. En disposar-se a la membrana, es permet que interaccionin entre elles fent que la PDK1 fosforili l'Akt1 a la serina 473, i l'Akt1 s'activi i es continuï la cascada de senyalització. Per aconseguir l'activació de la PI3K és necessari que la subunitat catalítica de la PI3K, coneguda com p110, es desprengui de la subunitat reguladora inhibidora p85 (Cantley, 2002). Recentment s'ha vist que la p85 interacciona directament amb l'mDab1 quan aquest últim es troba fosforilat (Bock et al., 2003). Així doncs, el model proposat considera que la fosforilació de l'mDab1 induïda per la Reelina provoca la interacció d'aquesta amb la p85; com a conseqüència s'activa la p110 i tota la via de senyalització de la PI3K, inclosa l'Akt1.

En el Capítol 2 d'aquesta Tesi es descriu la implicació de l'mDab1 en l'activació de la via d'ERK mitjançant la utilització de cultius primaris de mutants *mdab1* *-/-*. Les neurones *mdab1* *-/-* no mostren activació de la via d'ERK depenent de la Reelina. Aquestes dades permeten concloure que l'mDab1 és necessari per a l'activació de la via d'ERK depenent de la Reelina. Com que l'activació d'ERK és depenent de l'activació prèvia de la PI3K, el mecanisme mitjançant el qual l'mDab1 hi participa seria el mateix que el ja descrit anteriorment. Finalment, com que la via PI3K-ERK depèn de l'mDab1, el seu efector Egr-1 també en depèn.

Els mutants mdab1 -/- en assajos funcionals:

Els mateixos mutants *mdab1* *-/-* també han estat utilitzats per avaluar un model *in vitro* de funció de la Reelina. El fet que aquests animals presentin el fenotip idèntic al *reeler* implica que no responen a Reelina, i que per tant, *in vitro*, tampoc han de respondre al tractament amb aquesta proteïna. Així, en models funcionals *in vitro*, són útils de dues maneres, validant el propi model *in vitro* i alhora demostrant el requeriment de l'mDab1 per a aquella funció de la Reelina que s'està caracteritzat.

Fins al moment present, cap model de funció de la Reelina ha resultat independent de l'mDab1. De fet, la quantitat d'assajos de funció de la Reelina que s'han pogut reproduir *in vitro* és limitada. Amb animals *mdab1* *-/-* s'han provat el model de creixement dendrític (Niu et al., 2004) i el de desunió de cèl·lules de la SVZ (Capítol 2). En tots dos casos s'ha pogut comprovar que l'efecte de la Reelina requereix la participació de la proteïna mDab1; la fosforilació de l'mDab1 és necessària per a la funció de la Reelina en tots dos models *in vitro*.

Alteracions connectives dels mutants *mdab1* -/-

En el Capítol 1 d'aquesta Tesi Doctoral es fa una descripció fenotípica de les connexions dels animals mutants *mdab1* -/-, centrant l'anàlisi en la regió de la formació hipocàmpica. La conclusió global que s'extreu d'aquest treball és que les alteracions observades en els animals mutants *mdab1* -/- a nivell de connexions són també idèntiques a les dels animals *reeler*. Aquest resultat, malgrat ser previsible, no deixa d'aportar noves proves de la importància de l'mDab1 en la senyalització de la Reelina.

Prèviament havien estat caracteritzats els animals mutants *mdab1* -/- com a idèntics als *reeler* per la disposició desorganitzada de les estructures laminades (Howell et al., 1997b). Les dades havien estat referides a anàlisis de processos migratoris. En el treball presentat en el Capítol 1 s'han abordat les vessants de creixement i guiatge axonals i la participació que pugui tenir-hi la proteïna Reelina directament i indirecta a través del control del posicionament neuronal.

El fenotip dels mutants *mdab1* -/- en les connexions:

Les dues connexions analitzades en els ratolins *mdab1* -/- són la *via perforant* i les connexions comissurals. La *via perforant* presenta alteracions importants: compactació de fibres a prop de la fissura hipocàmpica (HF) en la OML, i ectòpies a l'SR, l'SP i l'SO de CA1 i CA3, i innervació ectòpica de l'hilus. Les connexions comissurals innerven ectòpicament l'SLM de la porció CA3, i també en la GL del gir dentat.

L'anàlisi fenotípic dels animals *mdab1* -/- presenta nombrosos avantatges i diversos inconvenients a l'hora de treure conclusions de les dades obtingudes. D'entrada cal valorar positivament que les condicions en les que es desenvolupen les connexions en un animal viu són les fisiològiques. No obstant, aquests animals presenten una característica que interfereix en l'anàlisi de les connexions: el posicionament ectòpic de les neurones projectores i diana de les connexions analitzades. L'mDab1 participa en els processos de migració i posicionament neuronals de les cèl·lules de la formació hipocàmpica, i aquest fet emmascara sens dubte un possible efecte net de l'mDab1 en l'establiment de les connexions.

La utilització de cultius organotípics:

Per tal d'avaluar per separat la contribució al fenotip final de les ectòpies de posicionament cel·lular, i distingir-lo de l'efecte directe de l'mDab1 en els axons, es van fer cultius organotípics mixtes, reproduint *in vitro* l'establiment de la connexió entorínco-hipocàmpica. Es va analitzar com es comporten els axons deficients en la proteïna mDab1 en arribar a la seva regió de destí quan aquesta manté el posicionament correcte de les cèl·lules. La conclusió que se'n pot extreure és que, efectivament, una part important del fenotip observat es deu a la posició ectòpica de les cèl·lules diana; però també hi ha una contribució neta de la deficiència de l'mDab1 en els axons que innerven l'hipocamp.

Bàsicament, l'absència de l'mDab1 en els axons fa que aquests presentin una compactació superior en entrar a la regió diana, independentment del genotip de la regió diana (*wild-type* o *mdab1* -/-) cosa que indica que l'mDab1 podria estar contribuint a regular les propietats d'adhesió dels axons entorínics. La compactació d'axons a la fissura hipocàmpica és una característica observada en els animals *reeler*, i que pot ser reproduïda *in vitro* establint cultius organotípics entorínco-hipocàmpics d'aquests animals (Borrell et al., 1999b). Si els co-cultius són mixtes entre una escorça entorínica

wild-type i un hipocamp *reeler*, s'observa també la compactació d'axons a la fissura (Borrell et al., 1999a). En conjunt totes aquestes dades permeten perfilar una hipòtesi de treball segons la qual la Reelina contribueix en la regulació de les propietats d'adhesió dels axons entorínics que arriben a l'hipocamp, fent que s'eviti la formació de feixos compactats, o bé induint-ne la desunió. Això faria que aquests axons, en arribar a la zona de l'SLM de l'hipocamp de manera més individualitzada i lliure, tinguessin una major facilitat per l'establiment de sinapsis i, en conseqüència, maduressis més ràpidament.

L'absència de la Reelina a la regió diana, o bé l'absència de senyalització del seu efecte en els axons (per deficiència de la proteïna mDab1) faria que els axons es mantinguin formant feixos, circumstància que possiblement ve acompanyada d'un baix grau de maduració d'aquest i hipotèticament d'una reducció de la ramificació. Els axons compactats formant feixos dificultarien que s'establissin sinapsis (cal recordar que els animals *reeler* tenen una disminució de la sinaptogènesi en hipocamp (Borrell et al., 1999a)). Segons aquesta teoria, l'absència de maduració dels axons seria la causa de disminució del nombre de sinapsis. Els axons compactats en feixos no estableixen el nombre adequat de connexions, i a més, les poques que es formen ho fan amb cèl·lules mal posicionades, innervant ectòpicament les regions CA1, CA3 i hilus.

Aquesta hipòtesi es veu reforçada en observar què succeeix quan axons *wild-type* o bé *mdab1* *-/-* penetren en un hipocamp *mdab1* *-/-*, que té mal posicionament neuronal però que alhora conté cèl·lules de CR que secreten la Reelina. Quan els axons que hi penetren són *mdab1* *-/-*, apareix el fenotip *reeler*, amb compactació de feixos d'axons a la fissura i ectòpies severes a les zones CA1, CA3 i hilus; possiblement amb una disminució de la sinaptogènesi. En canvi, si els axons que hi penetren són *wild-type*, i per tant poden respondre a la senyalització de la Reelina, les ectòpies observades són encara més severes. En aquests co-cultius mixtes s'estarien sumant dos efectes: el mal posicionament de les cèl·lules diana (causa en si mateixa d'ectòpies en les connexions que es formen) i l'efecte de la Reelina sobre els axons (que en fer-los madurar, estarien més preparats per l'establiment de sinapsis, innervant les regions que contenen les cèl·lules diana mal posicionades; és possible que s'innerven amb més força regions ectòpiques per l'efecte de la Reelina sobre els axons).

Així doncs, s'obren noves vies d'estudi de l'efecte de la Reelina sobre la maduració dels axons en la seva fase final de creixement i establiment de connexions. Les dades obtingudes indiquen que la Reelina actua facilitant aquest fase final la Reelina fent que en deixar de formar feixos puguin establir connexió amb les seves cèl·lules diana amb més facilitat.

No es pot descartar que l'efecte de la Reelina no es limiti a regular les propietats d'adhesió dels axons, sinó que influeixi també en l'establiment i manteniment de les sinapsis. Que la Reelina no guiï els axons al seu destí (Jossin and Goffinet, 2001) no vol dir que no pugui afectar als processos de formació i manteniment de les interaccions sinàptiques; de fet, aquesta és una de les funcions hipotetitzades per a la Reelina, i s'ha arribat a considerar que la Reelina secretada per interneurons en el cervell adult podria participar en processos de plasticitat sinàptica i memòria (Beffert et al., 2005; Borrell et al., 1999a; Weeber et al., 2002). Per tal d'avançar en la clarificació d'aquestes hipòtesis serà necessari desenvolupar nous models animals, que permetin estudiar la funció de la Reelina a l'edat adulta.

El paper de la Reelina en axogènesi i ramificació axonal en les neurones de l'hipocamp

En el Capítol 1, es descriu la reducció de l'axogènesi en explants de CA1/CA3 cultivats sobre substrats que contenen la Reelina. A més, la Reelina indueix col·lapse axonal sobre aquests explants quan s'afegeix al medi de cultiu. Complementàriament, establint cultius dissociats de neurones hipocàmpals, es pot determinar que la Reelina incrementa l'índex de ramificació lateral dels axons d'aquestes neurones.

En conjunt, es pot establir un model segons el qual la Reelina senyalitza sobre el con de creixement axonal principal de les neurones hipocàmpiques i n'indueix el col·lapse. Paral·lelament, les cèl·lules incrementen els punts de ramificació de l'axó, fet que comporta també un increment en la longitud total de l'arbre axònic. D'altra banda, la Reelina també incrementa les interaccions homofiliques entre les neurones hipocàmpiques.

Les dades obtingudes suggereixen que la reducció de l'axogènesi és la conseqüència sumada de la inducció del col·lapse axonal, de l'increment de la ramificació axonal i de l'increment de les interaccions homofiliques. Una hipòtesi de treball per explicar la reducció de l'axogènesi és la següent: quan el substrat conté la Reelina, es bloqueja el creixement de la branca principal de l'axó de les neurones de CA, i s'incrementa la seva ramificació; els axons laterals interaccionen més entre si i menys amb el substrat, de manera que el creixement final de l'axó és inferior. Els tres processos que participarien en l'efecte final són: col·lapse, ramificació i interacció homofilica, i han estat avaluats per separat.

La Reelina indueix col·lapse axonal:

L'observació del col·lapse axonal promogut per la Reelina en explants de CA ha estat analitzat mitjançant l'estimulació aguda amb sobrenedants que contenen la Reelina. Així, el col·lapse axonal ha pogut ser observat a temps curts, d'una hora de tractament; evitant el tractament crònic amb la Reelina, que podria emascarar l'efecte del col·lapse.

La Reelina facilita la ramificació:

Per tal de quantificar la ramificació axonal en neurones hipocàmpiques, s'ha dissenyat un sistema de cultiu que en permeti el creixement individualitzat, evitant-se les interaccions entre neurones, i facilitant el comptatge. Les neurones hipocàmpiques dissociades s'han cultivat en matrius de col·lagen i s'han tractat de forma crònica amb sobrenedants que contenen la Reelina.

La Reelina incrementa l'índex de ramificació axonal i l'extensió total de l'arbre axonal d'aquestes neurones. A diferència del que s'esperava, la longitud de la branca principal de l'axó no és inferior en les neurones tractades amb la Reelina. Així, en cultius dissociats de baixa densitat, l'efecte de la Reelina no és tan marcat en la reducció de l'axogènesi, i en conseqüència aquesta només pot observar-se en dissenys experimentals que alhora tinguin els tractaments amb la Reelina i la possibilitat d'interacció homofilica entre les neurones.

Les dades presentades concorden amb el fet que l'absència de la Reelina en els animals *reeler* també redueix la complexitat de les dendrites de les neurones hipocàmpiques (Niu et al., 2004). Amb les dades aportades en el Capítol 1 s'evidencia que la Reelina no només afecta a les dendrites, sinó també als axons d'aquestes neurones.

La Reelina afecta a les propietats d'adhesió:

Les dades obtingudes revelen que tant els cultius dissociats hipocàmpics com els cultius d'explants de CA3 presenten una tendència incrementada a les interaccions homofíliques en créixer sobre substrats que contenen Reelina.

Si es té en compte que les cèl·lules diana dels axons en creixement de CA1/CA3 són precisament altres cèl·lules piramidals, homòlogues, (situades a l'hipocamp ipsilateral o bé del contralateral) no seria d'extranyar que hi hagués algun factor que n'afavorís la interacció quan els axons assoleixen la regió diana. Amb les dades de què disposem actualment no es pot assegurar que sigui la Reelina qui vehicula aquest procés; no obstant, les dades indiquen que els substrats que contenen la Reelina propicien una interacció homofílica cèl·lula-cèl·lula, afavorida respecte a la interacció cèl·lula-substrat.

No es pot descartar que l'efecte observat d'increment de les interaccions homofíliques tingui una causa indirecta, per exemple de repulsió en relació al substrat. Tot i això, estudis anteriors indiquen que la Reelina no atrau ni repel·leix axons que surten dels explants cultivats *in vitro* (Jossin and Goffinet, 2001). Així, doncs, la nostra hipòtesi de treball contempla que la Reelina facilita la interacció

Seràn necessaris més experiments per tal d'aclarir la funció de la Reelina sobre les propietats d'adhesió de les neurones hipocàmpiques i els seus axons, i les conseqüències finals que això pot tenir en l'establiment del patró final de projeccions.

La participació de la Reelina en les connexions associatives/comissurals i en les connexions entorínico-hipocàmpiques

Les dades presentades en el Capítol 1 indiquen que la Reelina té un efecte bastant generalitzable de reducció del creixement axonal. El cultiu d'explants de les regions CA1/CA3, EC o DRG sobre substrats que contenen la Reelina en provoca una reducció de l'axogènesi comparada amb els respectius controls.

La regió CA3 és l'origen de la connexió associativa-comissural que innerva els estrats SO i SR ipsi/contralaterals i es detecta la proteïna mDab1 en els seus axons. D'altra banda, la regió EC és l'origen de les fibres de la *via perforant*, que també contenen mDab1 i que innerven l'SLM i la OML/MML, regions que contenen les cèl·lules de CR i la Reelina (Amaral and Witter, 2004). Totes dues connexions (associatives/comissurals i entorínico-hipocàmpiques) es troben fortament alterades en els mutants *mdab1* *-/-*, tal i com succeeix en els mutants *reeler* (Borrell et al., 1999a; Borrell et al., 1999b).

Així doncs, els tractaments *in vitro* amb la Reelina indueixen un mateix efecte de reducció de l'axogènesi en regions molt diferents; un resultat que conté un cert grau de contradicció. Els axons entorínics innerven una regió que conté Reelina (SLM i OML), mentre que els axons de CA3 eviten específicament aquesta regió (Amaral and Witter, 2004; Super and Soriano, 1994). D'entrada cal remarcar que els resultats presentats han estat obtingut *in vitro*, amb l'estimulació única dels axons amb la Reelina. *In vivo*, l'efecte sumat d'altres senyals podrien modular les conseqüències finals de l'estimulació amb la Reelina.

La connexió entorínico-hipocàmpica:

L'absència de la Reelina o bé de l'mDab1 promouen una compactació de les fibres de la *via perforant*, especialment a la OML. A més, els animals *reeler* tenen disminució de la sinaptogènesi en l'SLM. Per tant, s'esperaria que la Reelina facilités el creixement axonal. Però els resultats obtinguts *in vitro* indiquen precisament el contrari. Per tant, preses conjuntament, les dades suggereixen que *in vivo*, la Reelina podria tenir un comportament diferent al reproduït *in vitro*. D'altra banda, la compactació de fibres és focalitzada sobretot en els axons que innerven la OML, més que no pas els de l'SLM; de manera que els axons de les dues regions podrien reaccionar de manera diferents a l'estímul de la Reelina.

Caldrà doncs realitzar nous experiments per aclarir de quina manera exacta participen la Reelina i l'mDab1 en l'establiment de les connexions de la *via perforant*. També cal pensar que, tal i com succeeix en les neurones hipocàmpiques, la Reelina podria promoure la ramificació dels axons de les neurones de l'escorça entorínica; si això es produís es podria atribuir la pèrdua de la compactació de les fibres a un increment de la ramificació dels axons.

La connexió associativa/comissural:

La contribució de la Reelina i de l'mDab1 a nivell de formació de la connexió associativa/comissural és menys controvertida. Aquests axons no innerven la regió que conté les cèl·lules de CR; a més mostren col·lapse axonal en resposta a la Reelina; i la Reelina n'indueix la ramificació axonal. D'altra banda, la Reelina promou les interaccions homofíliques en neurones hipocàmpiques, fet que podria facilitar la interacció dels axons d'aquesta connexió amb les seves neurones diana, que són les pròpies cèl·lules piramidals de l'hipocamp ipsi/contralateral.

Model d'estudi de les funcions de la Reelina en processos de desenvolupament i plasticitat a l'edat adulta

La generació d'un nou model animal ofereix noves perspectives des d'on continuar estudis ja iniciats de múltiples processos en els quals el transgen participa; ahora, obre les portes a emprendre l'estudi de la implicació del transgen en processos on la seva participació no ha estat descrita.

Els motius que impulsen la generació d'un nou model animal són en primer lloc la possibilitat d'obtenir la confirmació experimental de la participació d'una determinada proteïna en processos concrets on, aquesta, presumiblement, realitzava una funció important.

En el Capítol 3 es descriu el disseny i el procés de generació de línies de ratolí transgèniques que expressen la proteïna Reelina de forma ectòpica en neurones principals del cervell anterior d'animals adults. Indubtablement, aquest model pot ajudar a aclarir dubtes importants que s'han plantejat sobre la participació de la Reelina en processos tan importants com la migració de les neurones generades a l'edat adulta i els processos de plasticitat neuronal.

A més, aquests animals transgènics tenen l'expressió del transgen regulada per un sistema de transcripció inhibible per administració de la droga Dox (Lewandoski, 2001). D'aquesta manera, durant el procés de caracterització del fenotip d'aquests animals, es podrà corroborar que les hipotètiques alteracions són causades per l'expressió del transgen, i no en canvi per altres motius com podria ser el punt d'inserció en el genoma.

Els animals descrits en el Capítol 3 expressen la Reelina en neurones piramidals de l'hipocamp (CA1), en neurones granulars de l'hipocamp, i en neurones de l'estriat. Aquesta distribució, que coincideix amb l'esperada (Burgin et al., 1990; Mayford et al., 1996), porta a hipotetitzar que els animals seran d'utilitat per a l'estudi dels processos de migració neuronal de l'edat adulta i de plasticitat.

Caracterització dels ratolins transgènics; alteracions macroscòpiques:

Una de les primeres característiques que cal analitzar d'una soca de ratolins transgènics és la presència d'anormalitats macroscòpiques, com poden ser malformacions o anormalitats en la distribució i el posicionament cel·lulars. En els animals transgènics analitzats, no s'esperava observar alteracions macroscòpicament

observables. Si bé és cert que la Reelina participa activament en el desenvolupament de nombroses regions del SNC, ho fa eminentment durant el desenvolupament embrionari, quan es produeix la formació de la major part del cervell. Així, sumant el fet que l'expressió de la Reelina endògena no està alterada en els transgènics, i que el transgen es comença a expressar en edats postnatales, no semblava probable que la

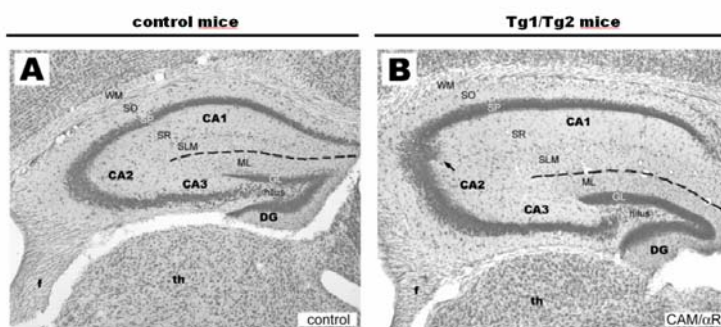


Figura 35 Alteracions macroscòpiques dels ratolins *Tg1/Tg2* (*CAM/αR*). A la regió CA2 de l'hipocamp dels ratolins dobles transgènics de la línia *αR* (*αR*) apareix una desorganització puntual i pronunciada en la capa de cèl·lules piramidals (Tinció de Nissl, P25). SLM, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens; WM, substància blanca; DG, gir dentat; ML, capa molecular; GL, capa de cèl·lules granulars; f, fimbria; th, tàlem.

Reelina ectòpica afectés de forma important l'estructura i la distribució neuronals del cervell.

No obstant, en analitzar els cervells dels transgènics s'observa que, almenys en una de les soques (*alphaR*), la distribució de les neurones piramidals hipocampals de la regió CA2 està lleugerament alterada. De forma específica per als ratolins *Tg1/Tg2*, la definició de la *capa piramidal* de la regió CA2 és més laxa i apareix una petita protuberància formada per neurones piramidals, que s'insereix a la regió de la *l'stratum radiatum* (Figura 35).

Caracterització dels ratolins transgènics; migració neuronal a l'edat adulta:

Les dues regions neurogèniques més importants del cervell adulta són la SVZ i la SGZ (Ming and Song, 2005). Les noves neurones generades migren fins a establir-se a la zona de destí, i almenys per al cas de les neurones de la SVZ el procés es veu clarament influenciat per la Reelina (Hack et al., 2002).

Així doncs, és important observar si la Reelina ectòpica produïda en els transgènics *Tg1/Tg2* pot afectar a la migració de les neurones de la SVZ. En els animals control, la Reelina influeix sobre aquestes cèl·lules a la part final de la ruta de migració rostral, just a l'entrada del bulb olfactori (Hack et al., 2002). En els ratolins transgènics hi ha expressió ectòpica de la Reelina en estriat (Figura 36). L'estriat es localitza just al costat de la zona neurogènica.

Per tant, els ratolins transgènics descrits en el Capítol 3 poden ser de gran utilitat per observar l'efecte de la Reelina sobre les neurones migrants en els primers estadis de la migració.

La participació de la Reelina en l'altre procés de migració de l'edat adulta, el de les cèl·lules de la SGZ, no ha estat mai analitzat. Aprofitant el fet que els ratolins transgènics *Tg1/Tg2* expressen la Reelina transgènica en cèl·lules granulars del gir dentat, es va procedir a utilitzar-los com a model per analitzar la migració de les neurones de la regió SGZ. En experiments preliminars, s'observa una tendència a l'increment de la proliferació en aquesta regió, mitjançant el marcatge de les cèl·lules proliferants amb BrdU (Figura 37). També hi ha una tendència a la distribució aberrant de les neurones generades. Si la distribució final normal de les neurones de la SGZ és la capa granular en el seu terç més interior (Ming and Song, 2005), en els *Tg1/Tg2* la distribució és menys uniforme i les cèl·lules es localitzen per tota la capa granular i fins i tot per fora (Figura 37). Aquestes anormalitats no han estat corroborades estadísticament, i caldrà comprovar-les en el futur.

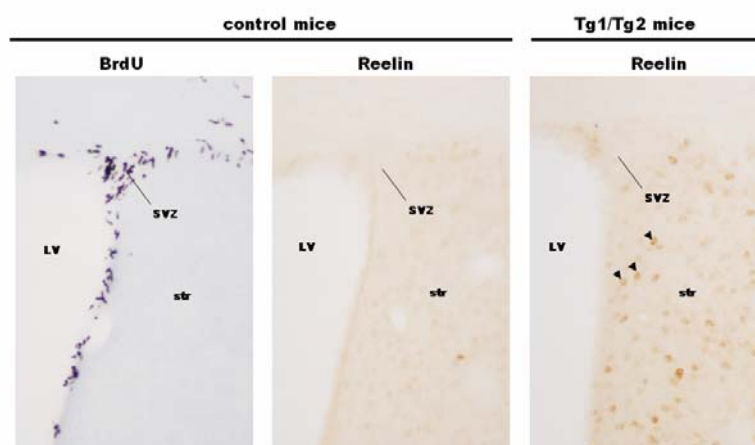


Figura 36 Expressió de la Reelina en estriat de ratolins *Tg1/Tg2* (*CAM/αR*) adults. Immunocitoquímica anti-BrdU en teixit d'animals perfosos 4 hores després de la injecció de BrdU, per determinar-ne la incorporació en les neurones proliferants de la SVZ (esquerra). Immunocitoquímica anti-Reelina (G10) (centre i dreta). Els ratolins dobles transgènics de la línia *alphaR* (*αR*) expressen Reelina en neurones de l'estriat (punts de fletxa), una regió pròxima a la zona neurogènica subventricular. **SVZ**, zona subventricular; **LV**, ventricle lateral; **str**, estriat; **BrdU**, 5-Bromo-2'-deoxyuridine.

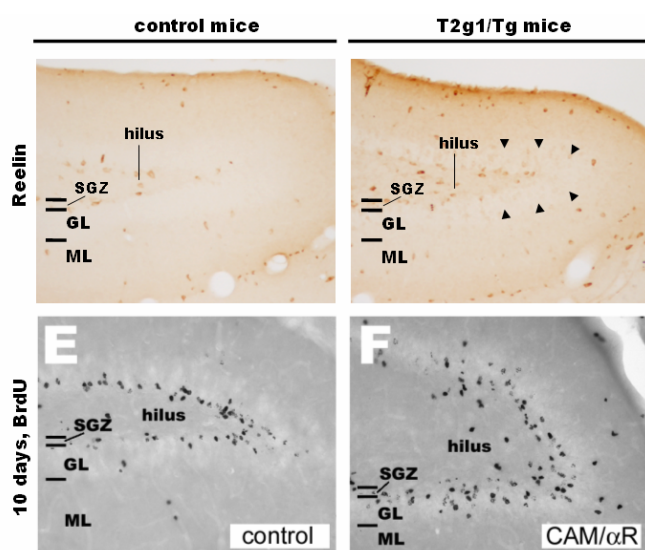


Figura 37 Expressió de la Reelina en DG de ratolins *Tg1/Tg2* (*CAM/αR*) adults. Immunocitoquímica anti-Reelina (G10) (panells superiors). Immuno-citoquímica anti-BrdU en teixit d'animals perfosos 10 dies després de la injecció de BrdU, per determinar-ne la incorporació en les neurones proliferants de la SGZ (panells inferiors). Els ratolins dobles transgènics de la línia *αR* (*αR*) expressen la Reelina en neurones granulars del DG (punts de fletxa), una regió pròxima a la SGZ. En els animals control, les neurones marcades amb BrdU, es distribueixen en el terç inferior de la capa granular; en els *Tg1/Tg2*, el número de cèl·lules és superior i la distribució més aleatòria. ML, capa molecular; GL, capa de cèl·lules granulars; SGZ, zona subgranular; BrdU, 5-Bromo-2'-deoxyuridine.

Caracterització dels ratolins transgènics; plasticitat neuronal:

La sobreexpressió de la Reelina en cervell adult és un model ideal per a l'estudi de la participació de la Reelina en plasticitat. Especialment si tenim en compte que les neurones que expressen la Reelina són les neurones principals, per exemple de l'hipocamp, implicades en processos tan importants com la memòria.

És important analitzar en primer lloc la quantitat de sinapsis dels ratolins *Tg1/Tg2*. A tall d'exemple: es coneix que els animals *reeler* tenen una disminució de sinapsis a l'SLM i l'OML de l'hipocamp (Borrell et al., 1999a). Com que els ratolins transgènics expressen la Reelina en les cèl·lules piramidals, que estenen les seves dendrites a la regió de l'SLM, és una hipòtesi raonable trobar-hi un increment del nombre de sinapsis (Figura 38). D'altra banda, la Reelina indueix *in vitro* l'LTP a la regió CA1 (Beffert et al., 2005; Weeber et al., 2002); també és doncs interessant realitzar registres electrofisiològics del comportament d'aquestes neurones.

Finalment, el fet que la Reelina pugui afectar a la sinàptogènesi, a l'LTP, (Beffert et al., 2005; Borrell et al., 1999b; Chen et al., 2005; Weeber et al., 2002) i que en els animals hemizigots pel gen *reelina* tinguin algunes característiques pròpies de models d'esquizofrènia (Costa et al., 2002a; Qiu et al., 2005; Tuetting et al., 1999), és també d'interès realitzar una determinació del comportament dels animals *Tg1/Tg2*.

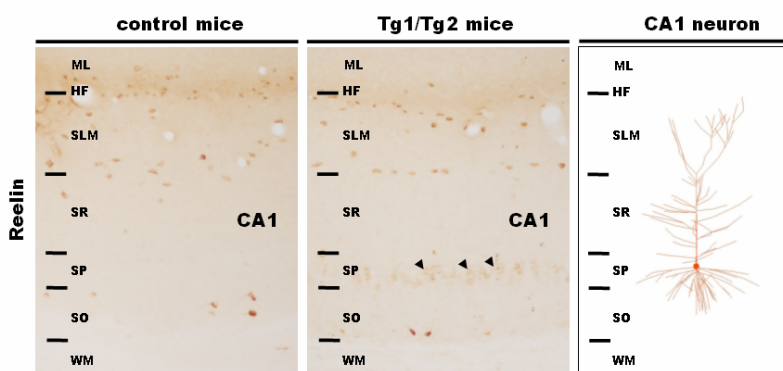


Figura 38 Expressió de la Reelina en CA1 de ratolins *Tg1/Tg2* (*CAM/αR*) adults. Immunocitoquímica anti-Reelina (G10) (centre i esquerra), i esquema d'una neurona piramidal de CA1 (dreta). En els *Tg1/Tg2*, les piramidals de CA1 expressen la Reelina (punts de fletxa) i extenen les seves dendrites per tots els estrats de l'hipocamp. ML, capa molecular; HF, fissura hipocàmpica; SLM, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens; WM, substància blanca.