

UNIVERSITAT DE BARCELONA
PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

**Paper de la senyalització de la Reelina en la
migració neuronal
al Sistema Nerviós Central**

SERGI SIMÓ OLIVAR

Barcelona, març 2006

Programa de Doctorat de Neurociències
Bienni 2000-2002

Objectius

Introducció

Introducció

Capítol 1. Histogènesi del Sistema Nerviós Central

Introducció:

1. Histogènesi del Sistema Nervios Central

El procés de desenvolupament del Sistema Nervios Central (SNC) comença en un estadi relativament tardà de l'embriogènesi. Prèviament a la seva formació, a l'embrió s'han generat 3 capes principals de cèl·lules. L'endoderm, és la capa més interna que serà l'origen dels intestins, dels pulmons i del fetge; el mesoderm, o capa mitja, de la qual s'obtidran els teixits connectius, els músculs i el sistema vascular i finalment l'**ectoderm** d'on s'originaran el sistema nervios, tant el central com el perifèric, i l'epidermis.

1.1 Inducció neural

L'ectoderm neural és aquella porció dorsal de l'ectoderm que, a causa de molècules secretades pel

mesoderm, esdevindrà distingible per la seva aparença en forma de columna. Aquesta regió de l'ectoderm és anomenada **placa neural**. Els esdeveniments en que la placa neural es transforma en **tub neural**, el primordi del SNC, s'anomenen **neurulació** (Figura 1). La neurulació, és el

procés mitjançant el qual la placa neural desenvolupa un procés d'invaginació permetent l'apropament de les crestes

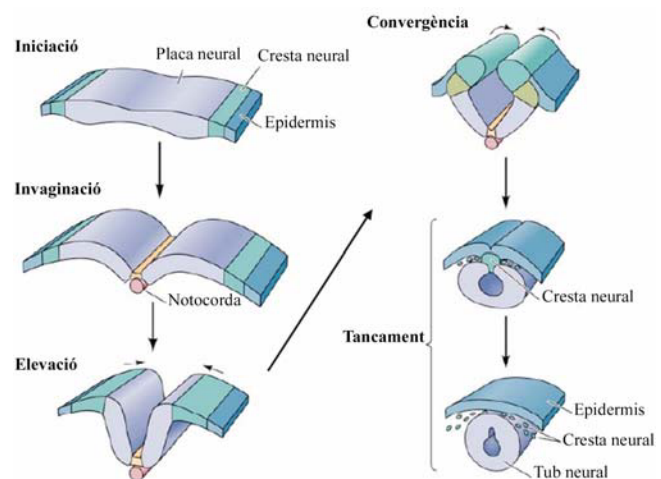


Figura 1 Esquema del procés de neurulació. En el desenvolupament l'ectoderm pateix un procés d'invaginació que internalitza la placa neural apropant les crestes neurals (verd). Aquestes es fusionaran, permetent la formació del tub neural i de l'epidermis que el recobrirà.
Adaptat de Gilbert, 2000.

neurals, que delimitaran un canal neural. En el següent pas, les crestes neurals es fusionaran tancant el canal neural i internalitzant el tub neural. Aquest procés és similar tant en amfibis, rèptils, ocells o en mamífers (Gallera, 1971). En mamífers, a diferència d'altres espècies, aquest procés s'inicia en diversos punts de l'eix antero-posterior (Gilbert, 2000), encara que no és un procés que es doni de forma simultània. Per aquest fet les parts més anteriors i posteriors del canal restaran

obertes formant els neuroporus anterior i posterior (De Robertis *et al.*, 1990; Delgado JM, 1998; Gilbert, 2000; Gould, 1977).

Com ja hem comentat, la de formació del tub neural no és un procés que és doni de forma simultània, com tampoc no ho és el seu posterior desenvolupament. Tant és així que fins i tot abans que la zona caudal del tub neural s'acabi de tancar, la zona rostral, que donarà lloc al cervell, ja reflecteix grans canvis. Fruit d'aquest canvis, al tub neural es poden observar tres bombaments, que esdevindran les tres vesícules primàries, anomenades: **prosencefal** (cervell anterior), **mesencefal** (cervell mig) i **romboencefal** (cervell posterior) (Figura 2).

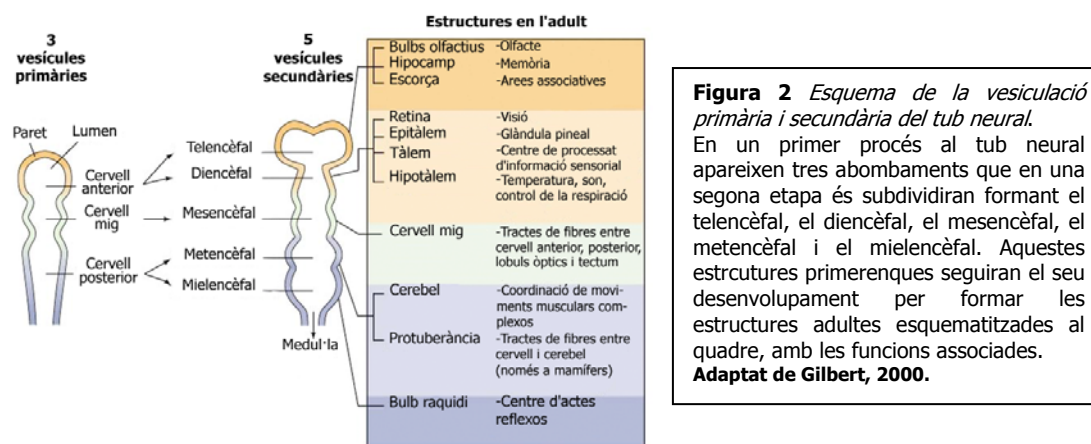


Figura 2 Esquema de la vesiculació primària i secundària del tub neural. En un primer procés al tub neural apareixen tres abombaments que en una segona etapa es subdividiran formant el telencefal, el diencèfal, el mesencefal, el metencefal i el mielencefal. Aquestes estructures primerenques seguiran el seu desenvolupament per formar les estructures adultes esquematitzades al quadre, amb les funcions associades. **Adaptat de Gilbert, 2000.**

Els processos de creixement i d'especificació genètica de les diferents parts del tub neural estan controlats per gens de segmentació i per interaccions morfogenètiques entre les diferents vesícules. En aquest pas del desenvolupament, les vesícules primàries es veuen sotmeses a diverses divisions secundàries (Figura 2). El prosencefal es subdividirà en dos parts, una part més rostral, o **telencefal**, que finalment donarà lloc als dos hemisferis telecefàlics, i a una altre més caudal, o **diencèfal**, que donarà lloc a les zones talàmiques i hipotalàmiques. El mesencefal, en canvi, no presentarà cap divisió i el seu lumen esdevindrà l'aqüeducte Silvi. El romboencefal presenta una segmentació característica, formada per l'istme del tronc encefàlic i per 8 segments més, els quals es denominen **rombòmers**. Clàssicament s'ha denominat el mielencefal i el metencefal com al resultat de la divisió del romboencefal. Malgrat que no són unitats morfològicament distingibles, si se'n podrien definir com funcionalment diferenciades. El metencefal inclou des de l'istme del tronc encefàlic (considerat rombòmer 0, o r0) fins al r5, que donarà lloc principalment al cerebel; i el mielencefal inclouria la resta formant la *medulla oblongata*. Una característica interessant dels rombòmers és que es podrien definir

com “territoris” de desenvolupament independents ja que les cèl·lules de cada rombòmer es poden moure lliurement per dins del mateix, però de cap manera cèl·lules d’un rombòmer poden saltar a un rombòmer veí (Guthrie and Lumsden, 1991).

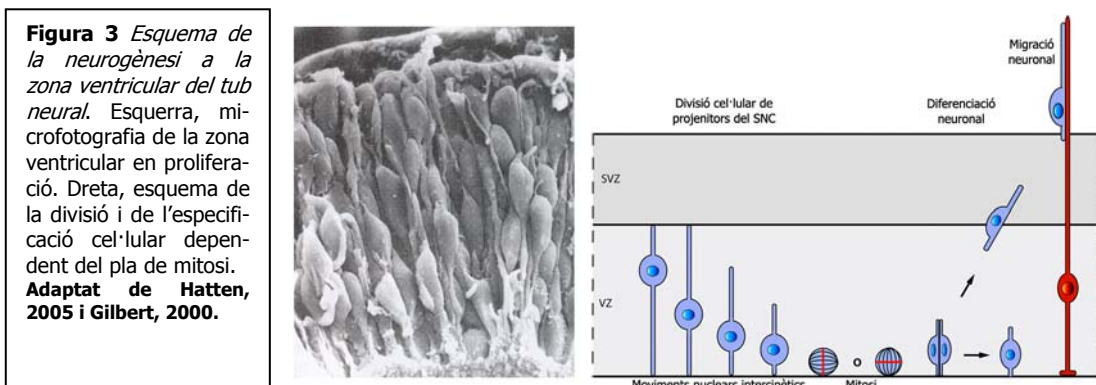
1.2 Morfogènesis secundària

Determinats processos de desenvolupament desigual en les diferents zones del SNC acabaran de definir la morfologia del SNC adult. D’una banda, la capacitat proliferativa és mantindrà durant un període més llarg de temps en les zones dorsal (telencèfal, tàlem i cerebel) i això provocarà un creixement desproporcionat d’aquests respecte dels ventrals. D’altra banda, la migració tangencial de grans poblacions neurals des del llavi ròmbic (la vora més dorsal del romboencèfal) cap a diverses posicions secundàries de la regió ventral del tub neural generarà els relleus corresponents als nuclis pontins i l’oliva bulbar.

La forma final del cervell també es veurà afectada pels feixos de fibres que creixeran a prop de la superfície (cos callós, tracte òptic, peduncles cerebrals, pons o piràmides bulbars).

1.3 Proliferació i migració neuronal

El sistema nerviós té més varietat de tipus cel·lulars que qualsevol òrgan del cos. Totes aquestes cèl·lules esdevindran a partir d’aquelles originals presents al tub neural. El tub neural original està format per un neuroepiteli d’una cèl·lula de gruix. Aquest epiteli està constituït per cèl·lules mare neuronals que es divideixen ràpidament. Per a la seva divisió, Sauer i d’altres van veure que aquestes cèl·lules mouen el seu nucli contínuament des del lumen del tub neural fins a la superfície de la zona de proliferació per tal de dividir-se (Figura 3) (Gilbert, 2000). La síntesi



d'ADN (o fase S) es produeix quan el nucli es troba a la part superior del neuroepiteli, després retorna cap el lumen a la vegada que segueix amb el cicle cel·lular. A la zona del lumen s'observa la mitosi. Depenent del pla pel qual es produiria la divisió la mitosi podrà ser vertical, horitzontal o intermitja. Les cèl·lules del neuroepiteli es poden dividir contínuament, en un patró de divisió horitzontal, on les cèl·lules filles romanen unides al lumen i conserven les propietats de la cèl·lula mare, o en un patró vertical. Una mitosi vertical produeix que un cop la cèl·lula mare s'ha dividit, només una de les dos cèl·lules filles segueixi unida al lumen, conservant la capacitat pluri-potent, mentre que l'altra cèl·lula migra i es diferencia fora del tub neural (Figura 3) (Chenn and McConnell, 1995; Jacobson, 1968; Sauer, 1935; Takahashi *et al.*, 1995).

1.4 Axogènesi

El SNC adult és l'encarregat de rebre la informació que ens envolta, processar-la i generar una resposta adient. Per assolir aquest tres passos, generalment, multitud de neurones participen activament gràcies a una intrincada xarxa de connexions neuronals. Per la formació i el correcte funcionament d'aquesta xarxa, no només necessitem la presència i l'exquisit posicionament de les cèl·lules que formen el SNC, sinó que és del tot necessari que aquestes cèl·lules formin una xarxa de connexions molt precisa, on el patró de les quals és crucial perquè el sistema funcioni correctament.

Com hem comentat anteriorment, les cèl·lules del SNC es generen en regions especialitzades i migren fins al seu posicionament final seguint patrons específics que comentarem en el següent capítol (Capítol 2. Migració). Quan les neurones arriben al seu destí final, o en alguns casos fins i tot durant el procés de migració, desenvolupen un grup de dendrites característiques del fenotip cel·lular i d'altra banda també generen un axó que creixerà i localitzarà el seu contacte sinàptic final.

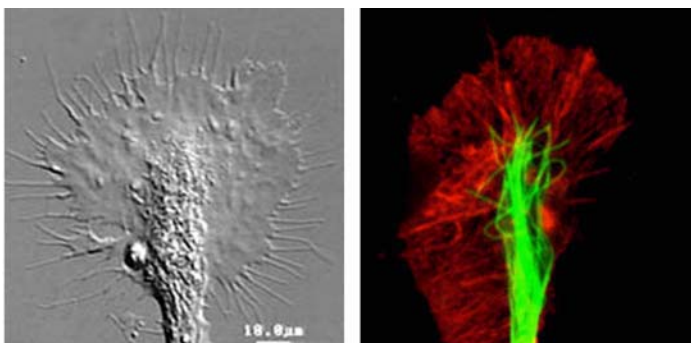


Figura 4 Morfologia del con de creixement per microscopia òptica i estructura del citoesquelet per immunofluorescència. Esquerra, es pot observar la morfologia del con de creixement, amb els filopodis i lamelipodis extesos al límit del con de creixement. Dreta, detecció per immunifluorescència dels microtúbuls (verd) i de l'actina (vermell) dins d'un con. **Adaptat del Dr. Zheng.**

Per tal d'assolir aquest objectiu de forma precisa existeixen dos tipus de processos: **Processos independents d'activitat neuronal**, que són els primers que utilitza l'axó per localitzar la seva diana sinàptica, i **Processos de refinament**, que es donen més endavant en el desenvolupament i que són dependents d'activitat sinàptica (Barallobre *et al.*, 2005; Goodman and Shatz, 1993; Song and Poo, 2001; Song and Poo, 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

1.4.1 Sinaptogènesi independent d'activitat

Quan ens referim a processos independents d'activitat neuronal ens referim bàsicament a una estructura altament especialitzada, ja identificada el 1890 per Ramón y Cajal, anomenada **con de creixement** (Figura 4). Amb una forma que recorda a una mà temptejant l'espai que la rodeja i present a l'àpex dels axons, el con de creixement conté tota la maquinària necessària per detectar i respondre a les senyals extracel·lulars, a més de generar l'energia motora necessària pel creixement axonal (Cajal, 1890; Mueller, 1999).

Existeixen 4 forces bàsiques de guia: atracció per contacte, quimioatracció, quimiorepulsió i repulsió per contacte (Figura 5) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). El procés pel qual l'axó decideix un camí requereix d'integracions de diverses senyals, com són la de factors locals de curt abast, normalment presents a la matriu extracel·lular, i factors difusibles de llarg abast. Generalitzant, podríem dir que els receptors d'adhesió, o de curt abast, transdueixen les senyals de la matriu extracel·lular fins al citoesquelet, induint la tracció necessària per moure el con de creixement i les senyals difusibles s'encarreguen d'atraure o

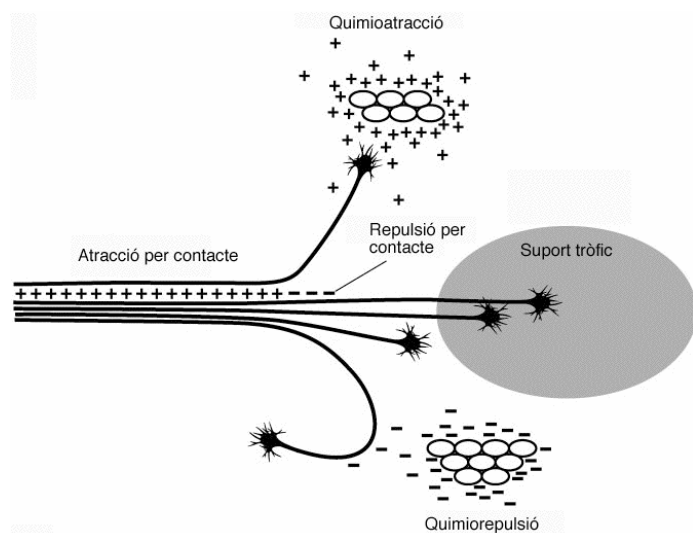


Figura 5 Els axons en creixement responen als factors guia presents a l'ECM. Un axó en creixement pot rebre informació de dos formes diferents: de curt abast, o per contacte, i de llarg abast, o difusibles. Els de curt abast inclouen molècules d'adhesió que permeten (+) o inhibeixen (-) el pas de l'axó al llarg de la zona on es troben expressats. Els de llarg abast atrauen (quimioatracció) o repeleixen (quimiorepulsió) l'axó sense contactar-hi. **Adaptat de Huber i col·laboradors, 2003.**

o repel·lir (Chiba and Keshishian, 1996; Long and Lemmon, 2000; Song and Poo,

2001; Yu and Bargmann, 2001). Malgrat tot, la integració de les diferents senyals i la resposta, que implicarà una reorganització del citoesquelet, dependrà principalment de l'estat funcional del con de creixement en un moment determinat més que les senyals extracel·lulars *per se*.

Gran quantitat de molècules participen en el guiatge axonal i la sinaptogènesi, entre les qual es poden incloure molècules com la Reelina, neurotrofines, factors de creixement, protocadherines, receptors olfactivs, Ig-CAMs (immunoglobulines associades a molècules d'adhesió cel·lular) o neurexines (Barbacid, 1995; Basilico and Moscatelli, 1992; Chiba and Keshishian, 1996; Del Rio *et al.*, 1997; Fields and Itoh, 1996; Mueller, 1999; Walsh and Doherty, 1997; Yu and Bargmann, 2001).

Entre totes aquestes destaquen 4 grans famílies altament conservades per a aquesta fi com són: Netrines, Slits, Semaforines i Efrines. Un o més receptors s'han identificat per cada una d'aquestes famílies, a destacar, el receptor eliminat en càncer colorectal (o DCC, de l'anglès *deleted in colorectal cancer*) per Netrina-1, Robo per Slits, Neuropilines i Plexines per Semaforines, i finalment Ephs per Efrines (Barallobre *et al.*, 2005).

Tenint en compte que el con de creixement no només pot respondre individualment a una sola senyal sinó que té el potencial de respondre a múltiples senyals al mateix temps, i modificar la resposta a noves senyals dependent de les anteriorment rebudes, ens posem davant d'una estructura que ens permetrà la formació de connexions altament especialitzades amb un grau mínim d'errors.

1.4.2 Processos de refinament, o dependents d'activitat

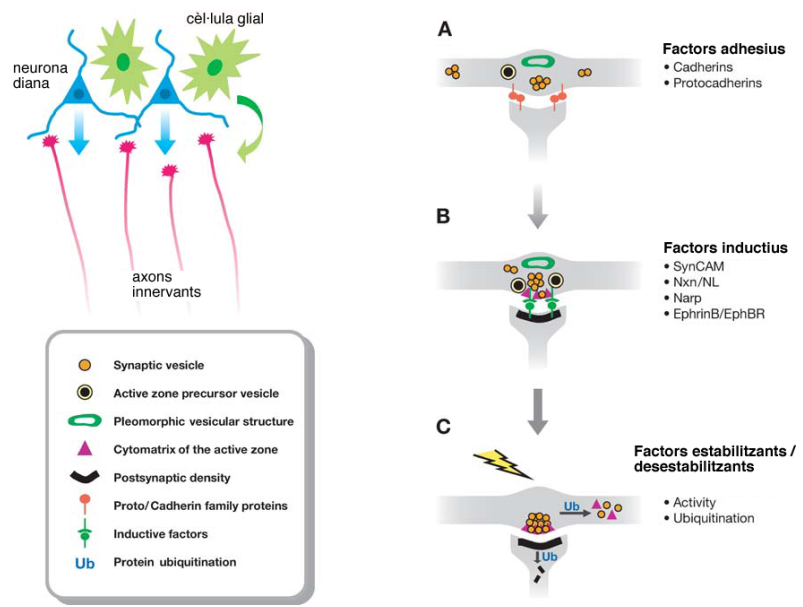
Hem observat fins ara la multiplicitat de factors que poden intervenir en el guiatge axonal i la formació d'un contacte sinàptic immadur, independent d'activitat. El següent pas és la maduració/estabilització d'aquest contacte sinàptic o la seva eliminació, això esdevé amb un procés de refinament, dependent d'activitat sinàptica (Figura 6).

En un primer moment les sinàpsis es formen en filopodis, o en abonyegaments dendrítics que amb el temps esdevindran espines dendrítiques. Per estudis de captació d'imatges *in vivo* s'ha suggerit que les sinàpsis es formen als filopodis dendrítics i després es transformen en estructures més estables com són les espines dendrítiques (Okabe *et al.*, 2001; Ziv and Smith, 1996). Ambdós tipus són estructures basades en actina, els filopodis són $> 2 \mu\text{m}$ i les espines $< 2 \mu\text{m}$, encara

que els segons tenen una vida mitja de dies o més i els primers només de minuts (Fischer *et al.*, 1998; Grutzendler *et al.*, 2002). La morfogènesi de les espines dendrítiques està regulada per diversos factors com poden ser la via de les cadherines, els sindecans o el sistema d'efrines, que senyalitzen a la seva vegada per proteïnes com Rho (o d'altres GTPases de la família Ras), proteïnes d'unió a actina o mecanismes que regulin els nivells calci (Hering and Sheng, 2001; Tashiro and Yuste, 2003; Waites *et al.*, 2005).

Un cop formada la sinàpsi immadura, la maduració/estabilització o eliminació d'aquesta és dependent d'activitat i es basa en els neurotransmisors, sobretot aquells que activen el receptors N-metil-D-aspartat (o NMDA). En primer lloc l'activació del receptor de NMDA produeix una reorganització del citoesquelet postsinàptic, augmentant el número de filaments d'actina i disminuint la velocitat de recanvi dels mateixos dins de l'espina activada (Fukazawa *et al.*, 2003; Star *et al.*, 2002). En segon lloc, l'activació dels receptors de NMDA genera la reclutació de receptors de l'àcid 2-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazol propiònic (o AMPA) a l'espina dendrítica estabilitzant-la. I en tercer lloc, l'activació dels receptors de NMDA indueix la síntesi i la secreció de neurotrofines, especialment el factor neurotròfic

Figura 6 *Processos involucrats en la regulació de la sinaptogènesi.* Esquerra, abans de la formació de la sinapsi els axons localitzen les cèl·lules diana mitjançant factors guia. El primer pas és el reconeixement per part de l'axó que es troba en la zona correcta per establir la sinapsi via proteïnes d'adhesió comunes (A). Un cop validat positivament la localització de la sinapsi, la maquinària pre- i post-sinàptica es prepara per establir el contacte (B). Finalment l'activitat regularà l'estabilitat sinàptica o desencadenarà la seva eliminació (C). **Adaptat de Waites i col·laboradors, 2005.**



derivat de cervell (o BDNF, de l'anglès *brain derived neurotrophic factor*). Recentment, s'ha descobert que l'alliberament de BDNF és el responsable de la maduració dels terminals presinàptics en cultius dissociats d'hipocamp, i també és el responsable de l'augment del número de sinapsis axòniques *in vivo* (Collin *et al.*, 2001; McAllister *et al.*, 1999; Poo, 2001; Tyler and

Pozzo-Miller, 2001). Això permet postular que les neurotrofines, alliberades gràcies a l'activitat sinàptica, participen en la estabilització sinàptica (Hua and Smith, 2004).

Com ja va veure Cajal en els seus estudis del SNC, la densitat d'espines en les cèl·lules piramidals d'un individu perinatal era molt més elevada que la d'un individu adult. Això juntament amb altres estudis anatòmics van portar a l'evidència que el SNC eliminava contactes sinàptics estructurals (Figura 7) (Cajal, 1899; Huttenlocher, 1979; Huttenlocher *et al.*, 1982; Rakic *et al.*, 1986). Més endavant s'ha pogut demostrar que el sistema

nerviós en els seu desenvolupament genera una quantitat molt superior de contactes sinàptics dels estrictament necessaris pel seu funcionament, cosa que suggereix que l'eliminació d'aquests contactes és un pas crucial pel desenvolupament cerebral (Figura 7) (Hashimoto and Kano, 2003; Huttenlocher *et*

al., 1982; Lichtman and Colman, 2000; Rakic *et al.*, 1986). De la mateixa manera aquest procés permet l'eliminació de contactes sinàptics inapropiats o erronis, obtenint finalment una xarxa exquisidament interconnectada. Exemples plenament documentats d'aquest procés es poden trobar al sistema visual, on els axons talàmico-corticals es desconnecten de les cèl·lules de la capa cortical IV (Hubel *et al.*, 1977) o a les fibres trepadores del cerebel, que es desconnecten de les cèl·lules de Purkinje (Crepel *et al.*, 1976; Lohof *et al.*, 1996). Aquest fenomen és altament necessari en el Sistema Nerviós Perifèric (SNP), i s'utilitza per la maduració de les unions neuromusculars, on els axons de les moto-neurons es desconnecten de les fibres musculars (Sanes and Lichtman, 1999).

1.5 Estructures laminades del Sistema Nerviós Central adult

El SNC ha anat evolucionant des dels protosistemes nerviosos més simples, com poden ser el dels amfioxos fins al magníficament dissenyat sistema nerviós humà. Aquesta evolució entre moltes d'altres coses ha desenvolupat noves

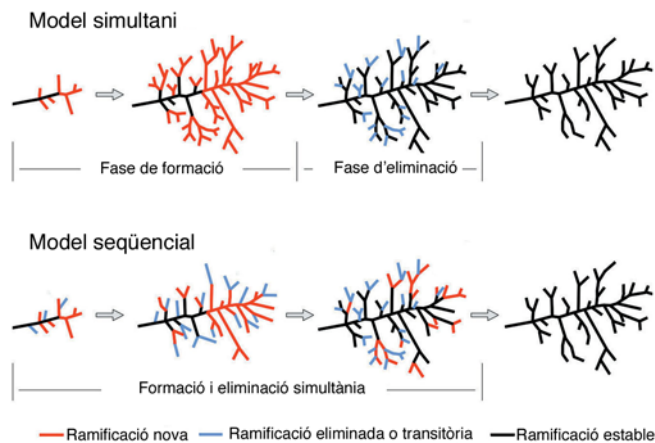


Figura 7 Dos models de desenvolupament neuronal. El model simultani: permet la creació il·limitada de ramificacions i contactes sinàptics, amb la posterior eliminació dels sobrants (Esquema superior). El model seqüencial: crea i elimina activament ramificacions i contactes sinàptics durant el desenvolupament (Esquema inferior). Adaptat de Hua i Smith, 2004.

estructures cada vegada més complexes. Les estructures més simples poden ser sistemes nerviosos en forma de tub on no s'hi pot distingir cap tipus de partició antero-posterior, com és el cas dels amfioxos. Més endavant podem trobar estructures laminades més o menys simple com és l'hipocamp, en amfibis i rèptils, i com a grau d'evolució màxima, fins al moment, trobem les estructures laminades complexes humanes com poden ser el cerebel i sobretot l'escorça (Murakami *et al.*, 2005). Les estructures laminades més importants al SNC en mamífers (des d'un punt de vista antero-posterior) són: el bulb olfatori, l'escorça cerebral, l'hipocamp i el cerebel.

1.5.1 El bulb olfatori:

El bulb olfatori (o OB, de l'anglès *olfactory bulb*) és una estructura laminada formada per les següents capes (Figura 8): la *lamina medularis interna* (Imi) a la regió central del bulb olfatori per on arriben els neuroblasts migrants; la capa granular interna (gri) que conté interneurons (cèl·lules granulars); la capa plexiforme interna (pli); la capa de cèl·lules mitrals (ml) que conté les neurones principals (cèl·lules mitrals, cèl·lules tufted i cèl·lules SA); la capa plexiforme externa (ple); la capa granular externa (gre) que conté interneurons (cèl·lules periglomerulars); la capa glomerulosa (gl) on es troben la majoria de

dendrites de les cèl·lules principals; i la *lamina fibrorum* (fi) per on arriben els axons de l'epiteli olfatori.

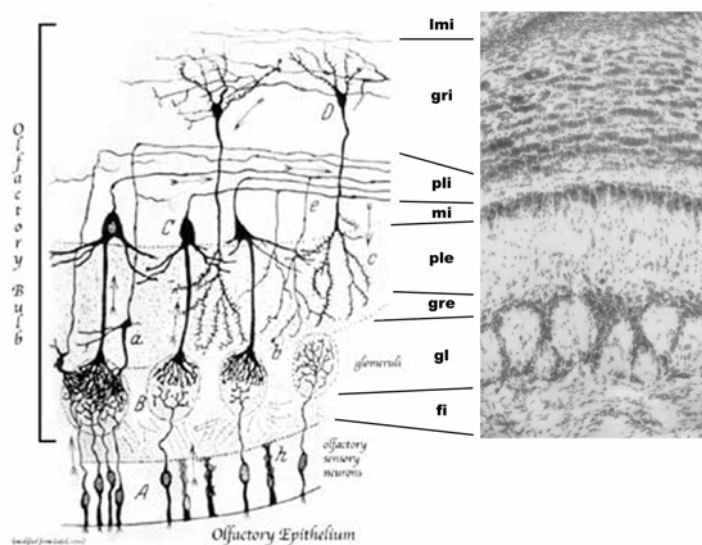


Figura 8 Estructures laminades: el bulb olfatori. Il·lustració de Ramón y Cajal de l'estructuració laminar del bulb olfatori (esquerra). Tinció de Nissl del bulb olfatori de ratolí adult (dreta). **Imi**, *lamina medularis interna*; **gri**, capa granular interna; **pli**, capa plexiforme interna; **ml**, capa de cèl·lules mitrals; **ple**, capa plexiforme externa; **gre**, capa granular externa; **gl**, capa glomerulosa; **fi**, *lamina fibrorum*.

Adaptat de Ramón y Cajal, 1905 (esquerra).

Al bulb olfatori hi trobem diversos tipus neuronals, i també neuroblasts no diferenciats que arriben al bulb olfatori procedents de la zona subventricular durant totes les etapes de la vida, integrant-se en els circuits establerts com a interneurons

(Figura 14). Els neuroblasts migrants arriben per migració tangencial per la via de la migració rostral (RMS, de l'anglès *rostral migratori stream*), i des de la lamina medularis interna migren radialment fins a col·locar-se a les capes adequades on es diferencien a interneurons. És important citar que tant les neurones mitrals com les periglomerulars expressen Reelina (Alcantara *et al.*, 1998); i que és la Reelina que indueix el canvi de migració tangencial a migració radial (Hack *et al.*, 2002).

1.5.2 L'escorça cerebral:

L'escorça cerebral, i concretament la neocorça és l'estructura laminada més complexa del Sistema Nervios Central i és també la més moderna a nivell evolutiu (Figura 9). L'evolució de la neocorça dels mamífers ha comptat amb un procés d'expansió lateral que provoca la subdivisió cortical en àrees segregades i també amb

un procés d'expansió laminar. L'expansió laminar i la creació de diverses capes ha consistit en la incorporació de noves neurones durant l'evolució i ha estat possible per la organització interna de l'escorça i pel seu patró de formació de dins cap a fora (Super and Uylings, 2001).

L'estructuració cortical interna compta amb 6 capes de cèl·lules que s'ordenen des de la més superficial (capa I) fins a la més profunda (capa VI), just per sobre de la regió de la substància blanca (o WM, de l'anglès *white matter*), que conté axons, i de la zona subventricular i ventricular (o

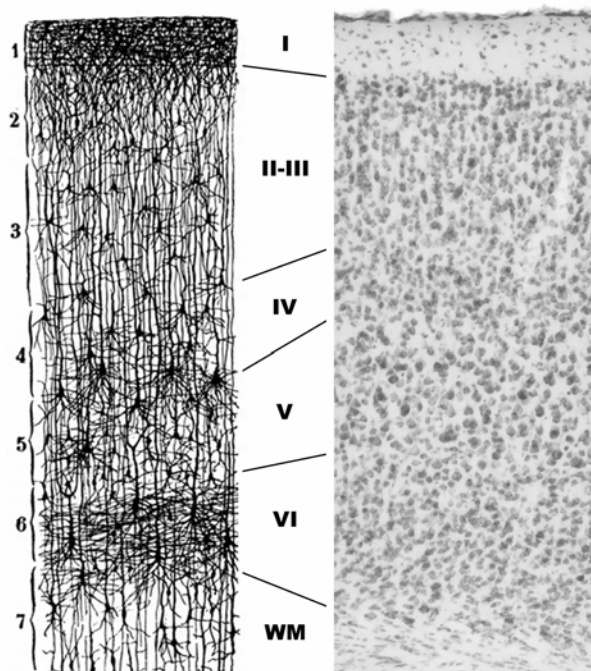


Figura 9 Estructures laminades: l'escorça cerebral. Il·lustració de Ramón y Cajal de l'estructuració laminar de l'escorça cerebral (esquerra). Tinció de Nissl de l'escorça cerebral de ratolí adult (dreta). **I-VI**, capes de l'escorça; **WM**, substància blanca. **Adaptat de Ramón y Cajal, 1905 (esquerra).**

SVZ i VZ, de l'anglès *subventricular zone* i *ventricular zone*), on s'han originat totes les neurones principals de l'escorça. El grandària relativa de les diferents capes depèn de la regió cortical concreta que s'analitza.

Les neurones excitadores representen un 70-80% del total de cèl·lules corticals, i es classifiquen en dos grups: les neurones piramidals (distribuïdes entre les capes II i VI) i les cèl·lules estrellades. Les cèl·lules estrellades es localitzen a la capa IV i no presenten dendrita apical, característica important per a la seva connectivitat en els circuits corticals (Bannister, 2005). Les neurones piramidals estenen la dendrita apical cap a les capes superiors i presenten una gran variabilitat; per exemple, no totes les dendrites apicals assoleixen les capes més altes (Bannister, 2005). La capa I està formada majoritàriament per dendrites de les neurones piramidals, i presenta una densitat de cossos cel·lulars baixa. Finalment, les interneurons GABAèrgiques es distribueixen per les diferents capes corticals i es classifiquen en subtipus segons l'expressió de determinats marcadors (Calbindina, Parvoalbúmina, etc...)

La formació de l'escorça durant el desenvolupament és un procés complex i altament regulat, on la proteïna Reelina secretada per les cèl·lules de Cajal-Retzius participa de forma destacada en el procés de migració radial de les neurones principals; durant el desenvolupament, aquestes cèl·lules ocupen la zona marginal, la capa I incipient. D'altra banda, les interneurons de l'escorça, arriben majoritàriament per processos de migració tangencial i s'integren en l'estructura laminada; algunes d'elles expressen la Reelina, en especial a la capa V, en edats postnatales.

La connectivitat interna de les neurones que formen l'escorça, i la d'aquestes amb estructures subcorticals, assoleix també una gran complexitat que es correspon amb la complexitat de funcions que aquesta estructura realitza.

1.5.3 L'Hipocamp i el gir dentat:

L'hipocamp (o hipocamp propi) és una estructura complexa que es subdivideix en tres parts principals, totes elles confeccionades per una organització laminar homòloga (Figura 10). Aquestes tres parts reben el nom de regions CA1, CA2 i CA3, i es diferencien bàsicament pel patró de connexions que formen. Les principals dissemblances es troben entre les regions CA1 i CA3; mentre que la regió CA2, malgrat presentar-hi lleugeres diferències, sovint es considera una part integrant de CA3. En algunes ocasions les dues zones s'agrupen sota el nom de regió CA2/CA3 (Amaral and Witter, 2004).

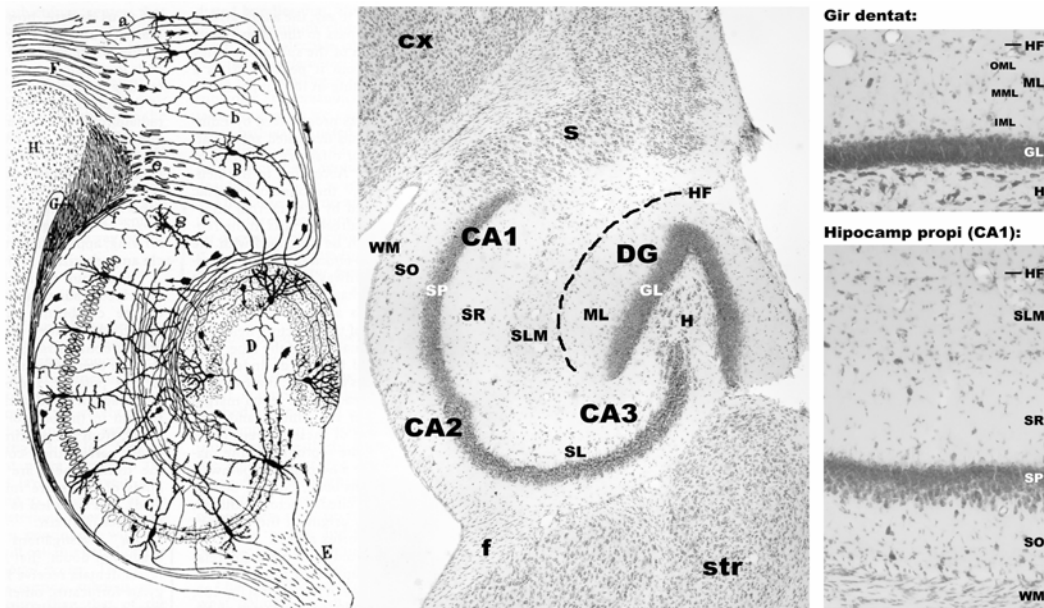


Figura 10 Estructures laminades: l'hipocamp i el gir dentat. Il·lustració de Ramón i Cajal de l'estructuració laminar de l'hipocamp i el gir dentat i de les seves connexions (esquerra). Tinció de Nissl de l'hipocamp i el gir dentat de ratolí adult (centre i dreta). **SLM**, stratum lacunosum moleculare; **SR**, stratum radiatum; **SP**, stratum pyramidale; **SO**, stratum oriens; **WM**, substància blanca; **SL**, stratum lucidum; **DG**, gir dentat; **ML**, capa molecular; **OML**, capa molecular externa; **MML**, capa molecular central; **IML**, capa molecular interna; **GL**, capa de cèl·lules granulars; **H**, hilus; **f**, fimbria; **CX**, escorça; **s**, subiculum; **str**, estriat.
Adaptat de Ramón y Cajal, 1905 (esquerra).

Les cèl·lules principals de l'hipocamp es distribueixen a la *capa de cèl·lules piramidals* (SP), localitzada entre la fissura hipocàmpica i la zona ventricular (Figura 10). Les dendrites apicals de les cèl·lules piramidals s'estenen per tota la zona suprapiramidal fins a la fissura hipocàmpica, ocupant l'*stratum lucidum* (SL), l'*stratum radiatum* (SR) i l'*stratum lacunosum moleculare* (SLM). Independentment, algunes dendrites basals descendeixen cap a la regió infrapiramidal (*stratum oriens*, SO). Les neurones piramidals de la regió CA3 desenvolupen uns arbres dendrítics sensiblement més extensos que la resta. A banda de les cèl·lules principals, la *capa de cèl·lules piramidals* també conté altres tipus cel·lulars. En destaquen les cèl·lules de cistella, que configuren un tipus de neurones GABAèrgiques de circuit local, que innerven el cossos cel·lulars de les neurones piramidals (Amaral and Witter, 2004).

L'SLM, l'SR i l'SO tenen una densitat cel·lular baixa, majoritàriament integrada per cèl·lules GABAèrgiques que es reparteixen en subpoblacions neuronals diverses. Per la seva banda, l'SL és característic de la regió CA3, situat just a la regió suprapiramidal, i per sota de l'SR, correspon a una franja estreta que conté els axons procedents de les *fibres molsoses*.

Dins de l'estructura de l'hipocamp cal destacar el gir dentat (DG, Figura 10). El gir dentat és també una estructura tri-laminada, formada per la capa molecular (o

ML, de l'anglès *molecular layer*), per la capa de cèl·lules granular (o GL, de l'anglès *granular cell layer*), i per l'hilus, o capa de cèl·lules polimòrfiques.

La ML està situada just per sota de la fisura hipocàmpica i és una zona principalment de connexió sinàptica. S'hi troben presents les dendrites de les cèl·lules polimòrfiques, les granulars i les estrellades així com els axons que hi estableixen contacte. Només dos tipus cel·lulars GABAèrgics hi son presents i en un número escàs.

Per sota de la ML hi trobem la GL, que és una capa densament poblada per cèl·lules granulars molt organitzades i compactes, les dendrites de les quals, com ja hem comentat, es troben presents a la ML. En la part inferior de la capa granular hi trobem la zona subgranular, on hi trobem presents precursors neuronals encarregats de generar noves cèl·lules granulars al llarg de tota la vida de l'organisme. De la mateixa manera també s'hi poden trobar diferents tipus de cèl·lules GABAèrgiques (Amaral and Witter, 2004).

Les dos estructures comentades amb anterioritat estan organitzades en forma de U envoltant l'última capa del DG, la capa de cèl·lules polimòrfiques. La capa de cèl·lules polimòrfiques conté característicament cèl·lules molsoses. Aquestes cèl·lules són de soma relativament gran amb dendrites molt llargues i desenvolupades que poden arribar a la ML, cal d'estacar el seu complex patró d'espines dendrítiques proximals únic dins d'aquesta regió (Amaral and Witter, 2004).

1.5.4 El Cerebel:

Com ja hem comentat amb anterioritat el cerebel sorgeix del tradicionalment anomenat metencèfal encara que s'ha demostrat que d'altres zones participen en la seva formació (Alvarez Otero *et al.*, 1993; Hatten and Heintz, 1995; Kandel *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Malgrat que el seu desenvolupament comença de forma primerenca al voltant del dia embrionari 10 en ratolins (o E10), o la vuitena setmana d'embaràs en humans, finalitza més enllà de la segona setmana postnatal en ratolins (dia postnatal 15, o P15), o de l'any de vida en éssers humans (Wang and Zoghbi, 2001). El cerebel, a diferència de les altres estructures comentades amb anterioritat, conté dos zones germinatives separades: la zona germinal primària, anomenada zona ventricular (o VZ, de l'anglès *ventricular zone*) que es troba present a la paret del tub neural, i una matriu germinal secundària, anomenada capa granular externa (o EGL,

de l'anglès *external granular layer*) que apareixerà al voltant d'E15 i proliferarà fins donar totes les cèl·lules granulars del cerebel desapareixent als voltants de P15 quan totes les cèl·lules de l'EGL hagin migrat cap a la capa granular interna (o IGL, de l'anglès *internal granular layer*). Els progenitors que sorgiran en cada una de les matrius germinals migraran en direccions oposades cap a l'àrea que queda entre les dues; aquest procés de migració serà tractat més extensament en el Capítol 2.

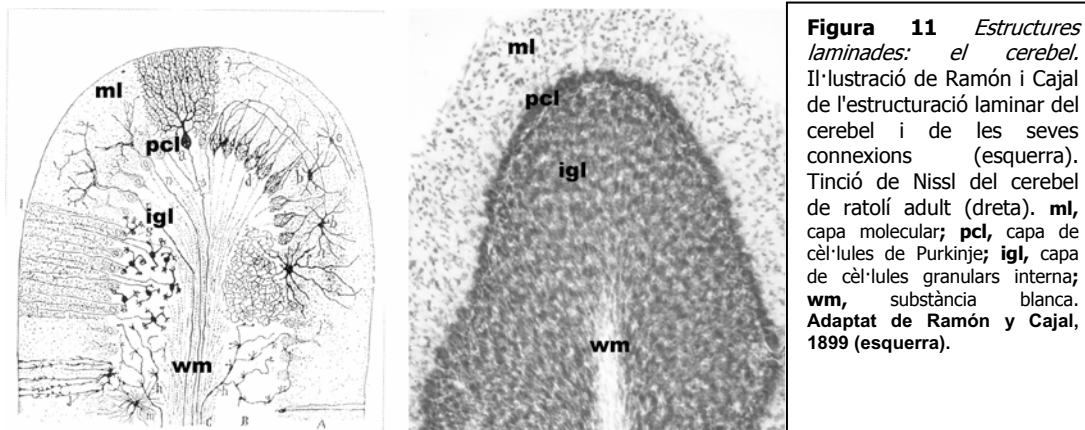


Figura 11 Estructures laminades: el cerebel. Il·lustració de Ramón y Cajal de l'estructuració laminar del cerebel i de les seves connexions (esquerra). Tinció de Nissl del cerebel de ratolí adult (dreta). ml, capa molecular; pcl, capa de cèl·lules de Purkinje; igl, capa de cèl·lules granulars interna; wm, substància blanca. Adaptat de Ramón y Cajal, 1899 (esquerra).

El cerebel adult està format per tres regions: l'escorça cerebelar, situada a la zona més superficial del cerebel i en contacte amb la superfície pial; la substància blanca, localitzada per sota de l'escorça i formada principalment per aferències d'entrada i de sortida; i finalment pels nuclis cerebelosos profunds, situats dins de la substància blanca cerebelosa per sobre de la paret del quart ventricle (Figura 11).

L'escorça cerebelar a la seva vegada està formada per tres capes concèntriques: la capa molecular (o ML, de l'anglès *molecular layer*), la capa de cèl·lules de Purkinje (o PCL, de l'anglès *Purkinje cell layer*) i la capa granular interna (o IGL, de l'anglès *internal granular layer*).

La ML conté tres tipus cel·lulars GABAèrgics. Dos d'aquest són: les interneurons estrellades i les interneurons en cistella, les primeres estan situades en la zona més superficial i les segones en la zona més profunda de la ML. Ambdós tipus participen en la senyalització del cerebel contactant tant amb l'arbre dendrític com amb l'axó de les cèl·lules de Purkinje, i també contacten amb les fibres paral·leles de les cèl·lules granulars. El tercer tipus cel·lular són les cèl·lules de Golgi, que contenen GABA i glicina, i entre les seves funcions proporciona una retroalimentació negativa sobre les cèl·lules granulars. Això es degut al fet que les dendrites de les cèl·lules de Golgi contacten les fibres trepadores de les cèl·lules granulars i per la seva banda l'axó de les cèl·lules de Golgi innerven la capa granular (Figura 12) (Wang and Zoghbi, 2001).

Les cèl·lules de Purkinje són unes cèl·lules grosses que es troben presents al cerebel formant una monocapa per sota de la ML i per sobre de la IGL (Figura 11). Una de les seves característiques morfològiques més clàssiques és el dens arbre dendrític orientat parasagitalment en tots els membres de la PCL. La formació de la PCL és altament dependent de la proteïna Reelina, com s'ha pogut observar en l'animal *reeler*, deficient per aquesta proteïna. Les cèl·lules de Purkinje són

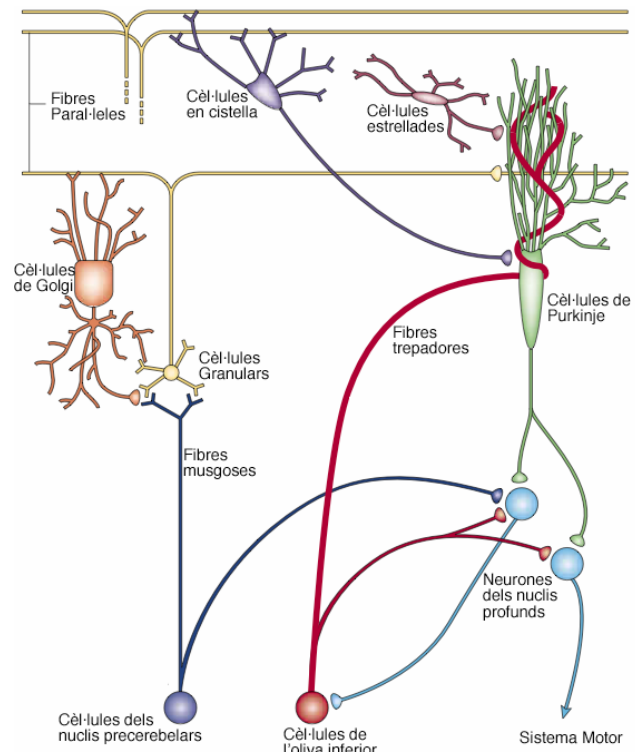


Figura 12 Esquema de les cèl·lules i les connexions que formen el cerebel.
Adaptat de Wang i Zoghbi, 2001.

imprescindibles pel funcionament cerebelar perquè, entre d'altres coses, són les úniques cèl·lules que transmeten la informació fora de l'escorça gràcies al seu axó que innerva els nuclis cerebelars. Les cèl·lules de Purkinje reben aferències excitadores de dos tipus cel·lulars, per una banda de les fibres paral·leles de les cèl·lules granulars i per una altra banda de les fibres trepadores que provenen de l'oliva inferior (Figura 12).

Cal destacar l'important paper d'un subtipus glial del cerebel en la formació de la PCL i el funcionament de les cèl·lules de Purkinje, anomenat glia de Bergmann. D'origen similar a les cèl·lules de Purkinje, són les encarregades de guiar aquestes neurones en el seu període de migració embrionària, com veurem més endavant en el Capítol 2 de la introducció. En l'edat adulta participen de l'homeostasi de l'arbre dendrític de les cèl·lules de Purkinje, augmentant la concentració de calci extracel·lular ($[Ca^{2+}]_e$) de forma local, controlant metabòlits presents al medi, com pot ser el neurotransmissor glutamat, o secretant factors que promoguin la supervivència o estimulin el creixement dendrític.

La IGL és una capa de cèl·lules granulars madures amb un origen extracerebelar. Són cèl·lules relativament petites, però estan presents en gran quantitat; alguns estudis afirmen que la relació amb les cèl·lules de Purkinje és de

fins a 250 : 1. En la seva posició final dins la IGL, les cèl·lules granulars desenvolupen entre 3 i 5 dendrites que estenen de forma local i no surten en cap dels casos fora de la seva capa. Aquestes dendrites són innervades per les fibres musgoses, que provenen de certs nuclis de la medul·la espinal i del tronc de l'encèfal (Figura 12). Una característica que diferencia les neurones granulars de la majoria de les neurones del SNC és que típicament les neurones del SNC just sortir del cicle cel·lular migren cap a la seva posició final i d'una forma tardana en el desenvolupament formen les seves connexions, en canvi les cèl·lules granulars del cerebel just sortir del cicle cel·lular desenvolupen l'axó i *a posteriori* migren fins a la seva posició final dins la IGL. L'axó de les cèl·lules granulars s'anomena fibra paral·lela i es troba a la situat a la ML, on contactarà amb les cèl·lules de Purkinje i amb les interneurons d'aquesta capa (Sotelo, 2004).

Comentar breument que el sistema precerebelar, o nuclis profunds, consta d'una col·lecció de nuclis medul·lars i pontins les projeccions dels quals arriben al cerebel, un exemple d'aquestes projeccions són les fibres musgoses que innerven les cèl·lules granulars o les fibres trepadores amb origen a l'oliva inferior que innerva l'arbre dendrític de les cèl·lules de Purkinje (Figura 12). L'origen dels precursors d'aquests nuclis es situa a la regió caudal del llavi ròmbic, encara que cada nucli té una localització concreta dins del llavi. Tot i que existeix un solapament temporal i espacial en la generació i migració de les neurones de cada nucli, en general presenten patrons temporals de naixement i rutes de migració clarament diferenciades (Sotelo, 2004).

Introducció

Capítol 2: Migració neuronal

2. Migració neuronal

Com s'ha comentat amb anterioritat, "...una de les cèl·lules filles generades al tub neural, per divisió vertical, abandona l'epiteli proliferatiu i *migra* per formar les estructures que donaran el cervell..."; *a priori* un axioma tant senzill com aquest esdevé infinitament més complicat quan pensem en la quantitat ingent de cèl·lules que formen el sistema nerviós adult de qualsevol mamífer. A més, si tenim en compte que errors en el posicionament final d'aquestes cèl·lules, a causa de defectes en la seva migració, poden generar malalties tant severes com són el retard mental, l'epilèpsia o alteracions greus de l'aprenentatge, és normal que la migració cel·lular sigui un procés altament regulat i controlat. Per entendre tots els mecanismes que controlen la migració primer hem d'abordar quins tipus de migracions regeixen el posicionament cel·lular al nostre cervell. En general, al SNC s'han indentificat dos tipus de migracions basades en la seva orientació: per una banda la **migració radial**, en la qual les cèl·lules migren perpendicularment des de la seva zona de generació fins a la seva destinació, en el cas de les cèl·lules de l'escorça des del tub neural fins a la superfície del cervell, i en el cas de les cèl·lules granulars del cerebel des de la capa granular externa fins la capa granular interna (ambdós es comentaran amb profunditat en els següents apartats). I per una altra banda, la **migració tangencial**, on les cèl·lules migren ortogonalment a la direcció de les radials, que en general significa que aquestes cèl·lules migren paral·leles a la superfície del cervell (Marin and Rubenstein, 2003).

2.1 Migració al cervell anterior

2.1.1 Migració radial al cervell anterior

2.1.1.1 Escorça cerebral

Els primers estudis realitzats sobre el desenvolupament del cervell i la medul·la espinal suggerien que la migració radial era un procés generalitzat en les cèl·lules de recent gènesi (Ramón y Cajal, 1891). Ràpidament es va entendre que havia d'existir algun tipus de mecanisme que relacionés la VZ del tub neural, origen de les cèl·lules que formaran l'escorça, i la superfície pial, destí d'aquestes cèl·lules. Aquest mecanisme va ser elucidat per Rakic l'any 1972, quan va descobrir que cèl·lules glials, anomenades **glia radial**, feien de suport físic entre les dues zones esmentades anteriorment i que actuaven com a guies dels neuroblast de recent generació (Rakic, 1972). Aquest tipus de migració radial on una neurona migra per

sobre d'una cèl·lula glial, es va anomenar **migració radial gliofílica** (Figura 13a), i malgrat que la seva participació és crucial en el desenvolupament de la CP, no és l'únic tipus de migració radial que participa en la formació de l'escorça. L'altre tipus de migració radial cortical s'anomena **translocació somal** (Figura 13b), i la diferència bàsica entre ambdós tipus és que la translocació somal és pràcticament independent de glia (Nadarajah and Parnavelas et al 2002). És interessant comentar que cadascun d'aquests mecanismes de migració participen en la formació d'estructures corticals diferents. Per ordre cronològic el primer en aparèixer és la translocació somal, que és utilitzada per les primeres cèl·lules que migren de la VZ per formar la preplaca; i en segon lloc tenim la migració gliofílica que es utilitzada per aquelles cèl·lules que formen les diferents capes de la placa cortical.

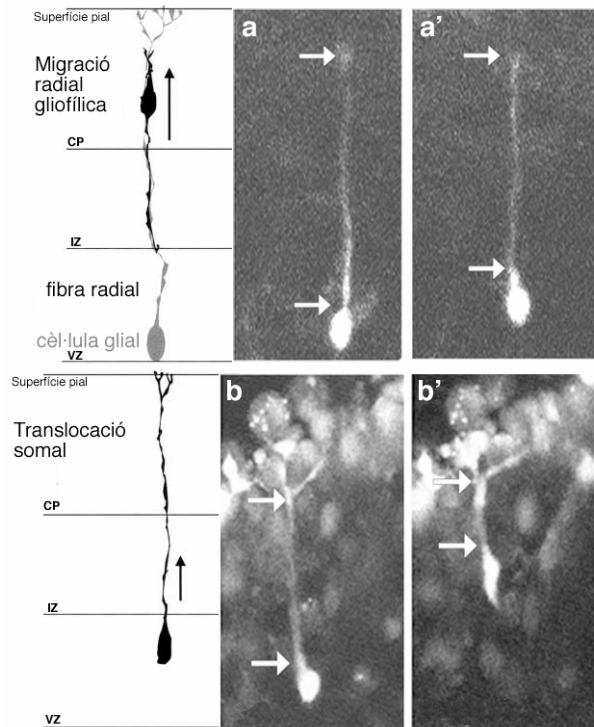


Figura 13 Esquema dels dos tipus de migració radial que es donen a l'escorça. Migració radial gliofílica: esquerra, esquema on s'observa la glia radial amb el soma a la VZ i la prolongació a la superfície pial, i la neurona migrant per sobre; dreta microfotografies on s'observa una neurona migrant gliofílicament a diferents temps (a,a'). Translocació somal: esquerra, esquema on s'observa la neurona migrant independent de glia amb la prolongació en ganxada a la superfície pial, dreta microfotografies on s'observa una neurona migrant per translocació somal a diferents temps (b,b'). Esquema adaptat de Kubo i Nakajima, 2002; microfotografies de Nadarajah i col·laboradors, 2003.

La glia radial és la base de la migració gliofílica. Aquesta es genera al llarg del tub neural en els primers estadis de desenvolupament de la VZ. Cada cèl·lula glial té el soma a la VZ i desenvolupa dos extensions que cobreixen des de la paret del tub neural fins a la superfície pial. Aleshores les cèl·lules postmitòtiques produïdes a la VZ s'adhereixen a l'extensió glial i migren fins al seu destí. Tot aquest procés està controlat per diversos factors que descriurem més endavant. Quan la producció de neurones s'atura i la glia radial ja no és necessària, aquestes cèl·lules retrauen les seves extensions i maduren a astròcits (Gaiano *et al.*, 2000; Pixley and de Vellis, 1984; Schmechel and Rakic, 1979; Voigt, 1989). A diferència del que es creia fa uns anys, la glia radial no només és un suport físic per on les neurones migren fins a arribar al seu destí sinó que són components dinàmics pel

desenvolupament de l'escorça fins i tot implicats en la neurogènesi cortical (Heins *et al.*, 2002; Malatesta *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002).

La funció de la glia com a suport físic ha estat altament estudiada en el desenvolupament ja sigui *in vitro*, o *in vivo*, i tant en l'escorça cerebral com en la cerebelar (Anton *et al.*, 1996; de Carlos *et al.*, 1996; Edmondson and Hatten, 1987; Gadisseux *et al.*, 1990; Gregory *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1988; Misson *et al.*, 1991; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002; O'Rourke *et al.*, 1992; Rakic, 1971, 1971, 1972). La seva funció va ser confirmada gràcies als estudis fets en algunes malformacions del desenvolupament del SNC. En aquests estudis es va apuntar molt clarament que algunes de les malformacions eren degudes a deficiències en molècules que afecten el desenvolupament de la glia radial, com poden ser, Pax6, Notch1, Nrg1, Reelina o mDab1, entre d'altres (Anton *et al.*, 1997; Caric *et al.*, 1997; Del Rio *et al.*, 1997; Forster *et al.*, 2002; Gaiano *et al.*, 2000; Halfter *et al.*, 2002; Hunter-Schaedle, 1997).

La CP es genera a partir de les neurones que utilitzen les extensions de la glia radial fins a arribar al seu destí. Aquestes cèl·lules tenen un *leading process* molt curt que no està unit a la superfície pial i mostra un patró de locomoció saltatori, amb moviments cap endavant curts i ràpids, seguit d'una fase estacionaria relativament llarga (Edmondson and Hatten, 1987; Nadarajah *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2001; Rakic, 1972).

La translocació somal, com hem comentat, és aquella involucrada en la migració de les primeres cèl·lules que participen en la corticogènesi. I la seva principal característica és la curta distància que recorren les cèl·lules que l'utilitzen. Quan les neurones que migren amb aquest mecanisme es disposen a sortir de la VZ, projecten una extensió fins contactar amb la superfície pial. Aleshores abandonen la VZ mentre segueixen físicament unides a la superfície pial, deixant enrera un *trailing process* molt curt (Miyata *et al.*, 2001; Nadarajah *et al.*, 2001). El patró de locomoció, a diferència de les neurones guiades per glia, és d'un moviment relativament continu i el *leading process* s'engruixeix i s'escurça a mesura que la neurona migra en direcció la superfície pial. També val a dir que les neurones guiades per glia sembla que utilitzen la migració per translocació somal quan després de migrar per sobre de la glia, el *leading process* contacta amb la superfície pial de l'escorça (Nadarajah *et al.*, 2001).

L'existència d'aquest dos sistemes de migració fa pensar que s'han conservat en el desenvolupament de forma independent i com a tals, és possible que cadascun tingui el seu mecanisme moleculars propis i independents. Això s'ha pogut demostrar en aquells casos on una mutació afecta a la migració mitjançada per glia sense afectar de forma considerable la formació de la preplaca, que com hem comentat sembla ser formada per translocació somal (Gilmore and Herrup, 2001; Nadarajah *et al.*, 2001). Per una altra banda mutacions que alterin la superfície pial provoca errors en migració tant d'aquelles cèl·lules guiades per glia com d'aquelles que utilitzen la translocació somal (a causa que el dos tipus de migracions necessiten la superfície pial com a suport) (Graus-Porta *et al.*, 2001; Halfter *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Migració radial al bulb olfatiu

L'OB rep precursors d'interneurons constantment des d'edats perinatals i durant tota la vida, precursors que es transformaran en interneurons granulars i periglomerulars que poblaran les capes de l'OB (Figura 14). Aquestes neurones migren tangencialment, com veurem més endavant, des del seu lloc d'origen situat a la paret lateral del ventricle lateral seguint la ruta de migració rostral (o RMS, de l'anglès *rostral migratory stream*) fins al OB on canvien aquesta migració i migren radialment per poblar les capes que formen el OB.

La migració radial a bulb és de llarg la migració radial menys estudiada del SNC, encara que recentment ha adquirit certa rellevància a causa dels primers descobriments de proteïnes que participen en el canvi de migració tangencial a radial (Hack *et al.*, 2002; Saghatelian *et al.*, 2004). Fins a l'actualitat no se saben quins mecanismes de migració utilitzen el

precursors neuronals per migrar radialment, encara que sembla pràcticament descartat el fet que utilitzin la glia radial com a suport de migració; cosa que fa

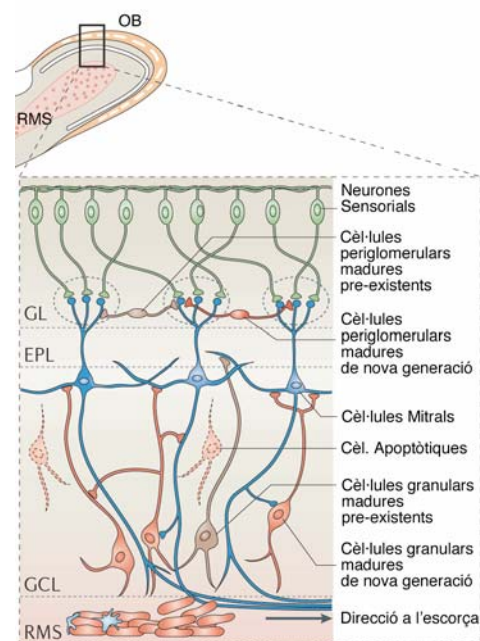


Figura 14 Esquema de la migració radial i del posicionament final dels neuroblast provinents de la RMS. Les cèl·lules amb origen a la SVZ migren per la RMS fins arribar al bulb olfatiu on es desenganxen i migren radialment fins a convertir-se en noves interneurons periglomerulars i granulars. **OB**, bulb olfatori; **RMS**, ruta de migració rostral, **GL**, capa glomerular; **EPL**, capa plexiforme externa; **GCL**, capa de cèl·lules granulars. **Adaptat de Lledo i col·laboradors, 2006.**

hipotetitzar que el mecanisme que utilitzi sigui similar a la translocació somal, que hem vist amb anterioritat.

La Reelina va ser la primera proteïna implicada en el canvi de migració de tangencial a radial per part dels precursors neuronals quan aquests entren dins de l'OB (Hack *et al.*, 2002). L'altra proteïna implicada en aquest canvi de migració és la Tenascina-R, aquesta proteïna s'expressa exclusivament a la lamina plexiforme i a la capa granular interna i la seva concentració més alta es troba justament envoltant el camí d'entrada dels precursors neuronals. Sembla que participa de forma similar a la Reelina en el pas de la migració col·lectiva a la individual dels neuroblast. A diferència de la Reelina, a la Tenascina-R se li han implicat altres propietats com són la d'atracció dels neuroblast migrants de la RMS o el possible control de la migració radial dels precursors. Es creu que la Tenascina-R podria controlar la migració radial mitjançant el receptor de NMDA, que per la seva banda se sap que participa activament en la motogènesi dels neuroblast migrants (Carleton *et al.*, 2003; Saghatelyan *et al.*, 2004).

2.1.1.3 Mecanismes moleculars de la migració radial

Per l'estudi de la migració cel·lular a l'escorça, el model més utilitzat i del que s'ha pogut descriure més parts és el de la migració guiada per glia. La migració dels precursors neuronals des de la VZ fins a la CP inclou quatre passos consecutius i parcialment solapats: el primer, la iniciació del moviment; el segon, la unió de la neurona a la glia radial; el tercer, la locomoció, on s'ha d'incloure la nucleocinesi; i finalment el quart, on la neurona es separa de la glia radial i adquireix la seva posició a la capa correcta (resum esquemàtic d'aquest punt a la Figura 15).

2.1.1.3.1 Factors motogènics

Existeixen diverses molècules amb la propietat de controlar tant l'inici com el moviment de les neurones a l'escorça: en primer lloc destacar el BDNF i la Neurotrofina-4 (o NT-4), un altre membre de la família de les neurotrofines. Aquestes dues proteïnes juntament amb el seu receptor d'alta afinitat TrkB, que s'expressen en les neurones migratòries, participen estimulants el moviment dels precursors neuronals d'una forma dependent de Ca^{2+} (Behar *et al.*, 1997).

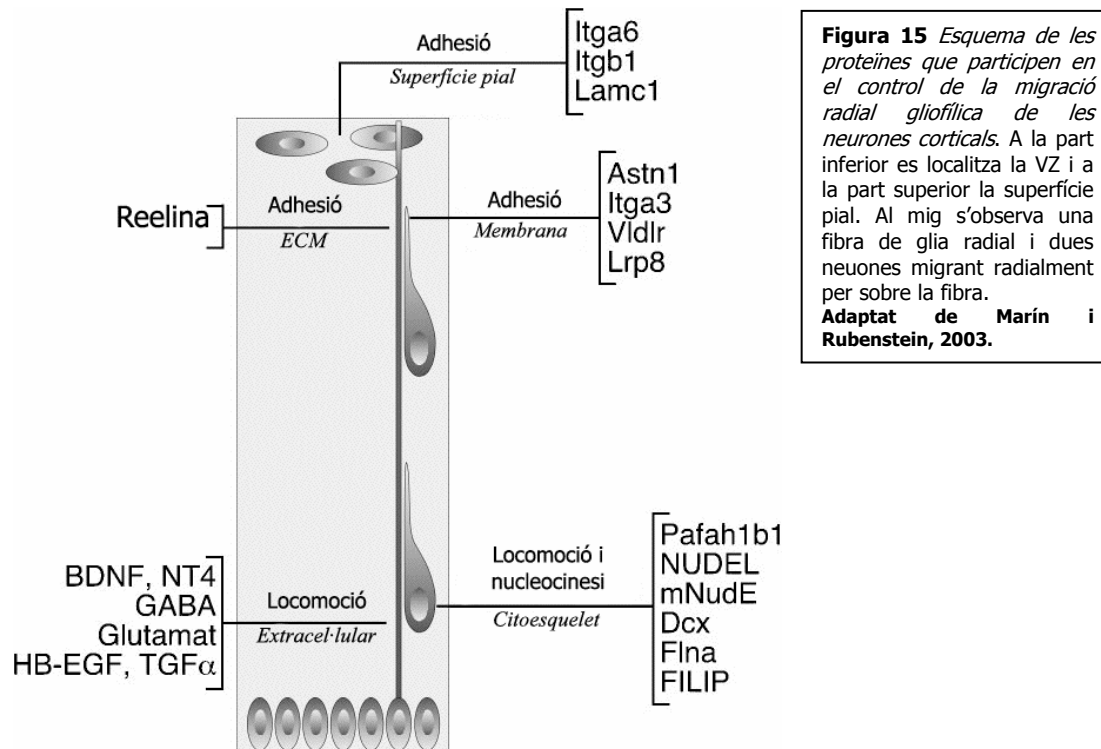


Figura 15 Esquema de les proteïnes que participen en el control de la migració radial gliofílica de les neurones corticals. A la part inferior es localitza la VZ i a la part superior la superfície pial. Al mig s'observa una fibra de glia radial i dues neurones migrant radialment per sobre la fibra. Adaptat de Marín i Rubenstein, 2003.

En segon lloc destaquem dos neurotransmissors i els seus receptors. L'àcid γ -aminobutíric (o GABA, de l'anglès γ -aminobutíric acid) s'expressa a l'escorça en desenvolupament, i el seu patró d'expressió permet considerar-lo com a un possible candidat dins aquest grup (Cobas *et al.*, 1991). Experiments *in vitro* han demostrat la participació de GABA en el control del moviment de les neurones migrants i que aquest control pot estar mediat pels diferents receptors GABA (Behar *et al.*, 1996; Behar *et al.*, 2001). Estudis *in vivo*, suggereixen que els receptors GABA_{A/C} participen en la migració de les neurones entre la VZ i la zona intermèdia (o IZ, de l'anglès *intermediate zone*), i per contra el receptor GABA_B participa des de la IZ fins la CP (Behar *et al.*, 2000). L'altre receptor que participa en el control de la migració és el receptor d'NMDA on el seu bloqueig específic o l'eliminació de la recaptació del glutamat extracel·lular indueixen una inhibició o un increment de la migració cel·lular, respectivament (Behar *et al.*, 1999; Komuro and Rakic, 1993). De la mateixa manera que succeeix amb les neurotrofines, el control de la migració per part d'aquest dos receptors es degut al control de la concentració de calci intracel·lular ($[Ca^{2+}]_i$) (Behar *et al.*, 2000; Behar *et al.*, 1999; Horgan and Copenhagen, 1998; Komuro and Rakic, 1993).

Per últim comentar el paper del receptor del factor de creixement epidèrmic (o EGFR, de l'anglès *epidermal grow factor receptor*) que juntament amb els seus

lligands HB-EGF i TGF ζ també estan presents en l'escorça en desenvolupament (Kornblum *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 1998). Threadgill i col·laboradors, van demostrar que l'absència d'EGFR segrestava els precursors a la zona proliferativa del telencèfal i per contra Burrows i col·laboradors, van demostrar que nivells elevats del receptor incrementava la migració de les cèl·lules postmitòtiques (Burrows *et al.*, 1997; Threadgill *et al.*, 1995). Aquest control, a més, és dependent de la quantitat de proteïna present a la cèl·lula, ja que només aquelles amb una expressió llindar mínima d'EGFR responen als seus lligands, provocant un augment dels nivells de migració radial (Caric *et al.*, 2001).

2.1.1.3.2 Interaccions neurona-glia

Existeixen diverses molècules que participen en la interacció glia radial-neurona. La primera va ser descoberta durant l'estudi de la migració radial gliofilica en cèl·lules granulars de cerebel i es va anomenar Astrotactina 1 (o Astn1) (Edmondson *et al.*, 1988). Estudis posteriors van demostrar que participava en la unió glia-neurona, i que el seu bloqueig amb anticossos bloquejants de funció o la seva absència en animals deficients per aquesta proteïna reduïen la velocitat de migració (Adams *et al.*, 2002; Fishell and Hatten, 1991; Stitt and Hatten, 1990). Més endavant s'ha identificat l'Astrotactina 2 amb una expressió força similar a la seva predecessora i amb unes hipotètiques funcions similars i complementaries a l'Astrotactina 1.

Existeix una família de proteïnes que participen en la unió cèl·lula-cèl·lula, o en la unió cèl·lula-matriu extracel·lular (o ECM, de l'anglès *extracellular matrix*) altament implicades en migració anomenades integrines (Schmid and Anton, 2003). L'element més important d'aquesta família respecte al control de la migració radial és la Integrina ζ 3 (o Itga3). Experiments de bloqueig *in vitro* d'aquesta integrina causen una disminució de la migració i la desunió prematura de la neurona respecte la glia (Anton *et al.*, 1999; Dulabon *et al.*, 2000). Estudis realitzats amb el ratolí deficient per la Integrina ζ 3, apunten en la mateixa direcció, i s'observa que malgrat un gran número de cèl·lules es posicionen al lloc on els correspon, algunes queden arrestades prematurament i no aconsegueixen arribar a la capa correcta; obtenint un animal mutant on les capes de l'escorça no estan finament delimitades (Anton *et al.*, 1999).

Les integrines són complexos heterodimèrics formats per una subunitat ζ i una de η . No totes les parelles ζ/η són possibles, en el cas de l'Integrina $\zeta 3$ només existeix una parella coneguda que és la $\eta 1$ (Schmid and Anton, 2003). Experiments similars als fet amb la $\zeta 3$ s'han reproduït amb la $\eta 1$, com els experiments de bloqueig de funció amb anticossos contra $\eta 1$ on s'ha observat que també alteren la interacció neurona-glia (Anton *et al.*, 1999). La generació del ratolí deficient per $\eta 1$ va permetre observar que aquesta proteïna era necessària pel desenvolupament cortical, però aquests efectes no eren directament aplicables a l'alteració de la relació neurona-glia sinó a la desorganització de la membrana basal i de la zona marginal; per la seva banda la migració cortical no es veu tant afectada en aquests animals en comparació als animals deficients en $\zeta 3$ (Graus-Porta *et al.*, 2001).

2.1.1.3.3 Locomoció durant la migració radial

Un pas crític en el procés de migració radial es produeix quan es necessita la reorganització de la xarxa de microtúbuls per generar el moviment. Gràcies a estudis de captació d'imatges *in vivo* s'han identificat 2 passos essencials on els microtúbuls participen activament. Aquest passos són: l'extensió del *leading process* i la translocació del nucli cel·lular, o nucleocinesi (Edmondson and Hatten, 1987; Nadarajah *et al.*, 2001; Rakic *et al.*, 1996; Rivas and Hatten, 1995). Aquest estudis han demostrat que les proteïnes implicades en el control d'aquest dos processos també són essencials en el control de la migració cel·lular.

S'han identificat diversos gens implicats en aquests processos, el primer que comentarem és *Lis1*. El nom de *Lis1* prové dels estudis d'en Bielschowsky l'any 1923 on va definir la citoarquitectura d'un cervell anormalment desenvolupat com lissencefàlic de tipus 1 (del grec "lissos" per llis i "enkefalos" per cervell), a causa de la seva forma llisa i sense circumvolucions (Figura 16). En humans l'absència de la proteïna *Lis1* genera greus malformacions com la pèrdua de dos capes a l'escorça, l'acumulació de cèl·lules a la capa més profunda de forma ectòpica, i la inversió del patró de posicionament cel·lular "dins-fora" per part de les cèl·lules que formen l'escorça

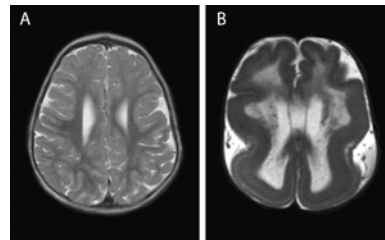


Figura 16 Comparativa per imatges MRI d'un cervell humà normal amb el cervell d'un individu deficient per *Lis1*. S'observa clarament que el cervell *Lis1*^{-/-} té menys circumvolucions i una escorça més gruixuda que el cervell normal. Adaptat de Hatten, 2005.

(Hatten, 2005). A més a més, es creu que la reducció en dues capes de l'escorça es deguda a l'absència de neurogènesi en els períodes més tardans del desenvolupament. Les cèl·lules de glia radial són les responsables de la neurogènesi en aquest període tardà, i en aquest estudi es demostra que no només serveixen com a substrat i guia dels precursors neuronals originaris de la VZ sinó que també participa activament en la neurogènesi durant el desenvolupament (Noctor *et al.*, 2001).

Lis1, és un proteïna d'uns 45 kDa amb set repeticions WD40 (repeticions que participen en la unió a microtúbuls), que s'expressa a la VZ i en neurones postmitòtiques, cosa que suggereix que participa al llarg del desenvolupament neuronal. Els primers experiments en cultiu van demostrar la seva unió a microtúbuls suggerint també la seva participació en el control de la dinàmica del citoesquelet (Sasaki *et al.*, 2000).

El primer gen relacionat amb *Lis1* descobert en d'altres organismes, concretament en *Aspergillum nidulans*, va ser un gen de distribució nuclear anomenat *nudF* (de l'anglès *nuclear distribution gene*). Durant l'estudi del *nudF* *-/-* es va poder observar com l'absència de *nudF* inhibia el creixement fibrilar d'*A. nidulans* degut a la impossibilitat de translocar els nous nuclis a l'extrem de creixement. Això va suggerir que Lis1 podria participar en la nucleocinesi en el SNC. Curiosament els estudi dels mutants *nud*, en *A. nidulans*, van desfer el model preestablert, durant 30 anys, pel qual durant la migració gliofílica el nucli cel·lular es mantenia "segrestat" per una caixa perinuclear de microtúbuls a la part posterior de la cèl·lula; i substituït pel model actualment acceptat on el nucli es pot moure lliurement pel *leading process* (Hatten, 2005).

Més endavant es va poder observar la relació de Lis1 amb la dineïna i la dinactina i a més a més, es va poder observar que la seva localització era present en cèl·lules de l'escorça i als cinetocors de cèl·lules mitòtiques (Faulkner *et al.*, 2000). La dineïna es un proteïna amb funció motora encarregada del transport d'òrgans per sobre dels microtúbuls i també participa en el transport axonal retrògrad (Smith *et al.*, 2000). La dinactina per la seva banda participa en el transport de fragments de microtúbuls cap a la perifèria cel·lular, i en experiments utilitzant fibroblast deficients en Lis1 es pot observar una acumulació de microtúbuls al voltant del nucli (Sasaki *et al.*, 2000). Recolzant-se amb una feina recent de Feng i Walsh, Vallee i col·laboradors han hipotetitzat que la funció de Lis1 no estaria principalment

relacionada en el control de la migració de les neurones a l'escorça, sinó que això seria un efecte secundari de seu efecte principal que seria el control de la divisió cel·lular dels progenitors neuronals de les zones germinatives del SNC (Feng and Walsh, 2004; Tsai *et al.*, 2005). En aquest darrer treball Tsai i col·laboradors electroporen siRNA (ARN d'interferència, que bloqueja l'expressió de la proteïna en qüestió ja que promou la degradació del ARN missatger que codifica per aquella proteïna) i dominants negatius de Lis1, els efectes del bloqueig o de la degradació d'aquesta proteïna a nivell específicament cortical són l'alteració dels passos més primerencs en la histogènesi – com és l'alteració del cicle cel·lular en els progenitors neuronals residents a la VZ. Això genera una deficiència en cèl·lules progenitores. A més a més, l'absència de Lis1 bloqueja la formació de les prolongacions per part de les cèl·lules postmitòtiques i aquest fet les priva de creuar la SVZ i adherir-se a la glia radial, deixant acúmuls de neurones a la SVZ. Aquest fet coincideix tant en animals deficient per Lis1 com els deficient per dinactina. Finalment Lis1 es creu que participa, juntament amb dineïna i dinactina, en el control precís dels moviments nuclears durant la mitosi, i el desenvolupament de la polaritat neuronal mitjançant el control del posicionament i de la funció de centrosoma i del citoesquelet (Tsai *et al.*, 2005).

Una altra proteïna molt relacionada en el control de la migració cel·lular és la proteïna Doublecortina, o Dcx, on la seva mutació pot desencadenar la lissencefàlia lligada al cromosoma X (Gleeson *et al.*, 1998). La mutació del gen que codifica per aquesta proteïna desencadena lissencefàlia en mascles, mentre que en femelles desencadena el síndrome de la doble-escorça. Aquest darrer es creu que es produeix per l'efecte mosaic en les neurones que aleatòriament inactiven el gen normal o el mutant del cromosoma X. Diversos estudis apunten que la Dcx és un proteïna que s'associa als microtúbuls (o MAP, de l'anglès *microtubule associated protein*) i que la seva funció és l'estabilització de la xarxa de microtúbuls. (Gleeson *et al.*, 1999; Horesh *et al.*, 1999). Dcx es troba present tant en cèl·lules migrants com en diferenciades, i es detecta unida als microtúbuls polimeritzats (Gleeson *et al.*, 1999).

Lis1 i Dcx semblen coexpressar-se, interaccionar i participar en el mateix complex proteic en el cervell en desenvolupament (Caspi *et al.*, 2000). I malgrat que les seves funcions són aparentment diferents, podrien coordinar processos similars durant la migració neuronal, com pot ser la translocació del nucli o altres moviments

somàtics durant la migració. Un esquema model del possible paper de Lis1, DCX i una de les proteïnes *nud* (mNudE) es pot veure en la figura 17.

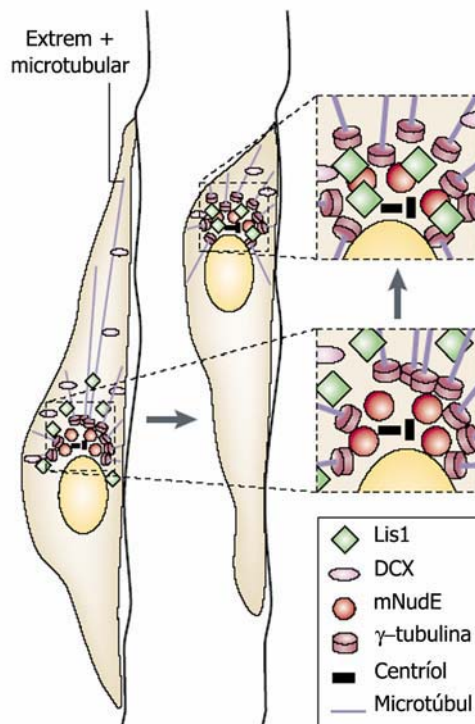


Figura 17 Model de translocació nuclear en la migració neuronal. La migració s'inicia per l'extensió dels microtubuls al *leading process*, procés possiblement regulat per DCK i d'altres MAPs. Després vindria un pas de control on participaria la unió de Lis1 amb la proteïna mNudE a les rodalies del centrosoma, centre de control dels microtúbuls a la cèl·lula. Això permetria una reordenació del complex microtubular empenyent el nucli cap al *leading process*. En aquest esquema la glia està representada com una ratlla negra on està recolzada la cèl·lula. **Adaptat de Feng i Walsh, 2004.**

Fins ara hem estat parlant de proteïnes que controlen la dinàmica dels microtúbuls i com aquestes controlaven la migració cel·lular, però encara no havíem parlat de la importància que té un altre membre del citoesquelet en la migració de neurones a l'escorça, aquest membre del citoesquelet és l'actina. Com en d'altres casos la importància de l'actina

va sortir a la llum a causa d'una mutació en humans que creava greus defectes en la migració neuronal. Aquesta mutació en humans afectava el gen que codifica per la proteïna Filamina- ζ , o FLNA o Filamina 1 (Fox *et al.*, 1998). Aquesta mutació causa heterotòpies periventriculars, un defecte migratori en el qual les cèl·lules postmitòtiques no poden migrar fora de la seva zona de generació i es queden al voltant dels seus progenitors (Eksioglu *et al.*, 1996). La funció de la Filamina 1 és unir els filaments d'actina, o F-actina, de forma ortogonal, augmentant d'aquesta manera la viscositat de la xarxa de F-actina i augmentant la motilitat cel·lular (Stossel *et al.*, 2001). La Filamina 1 és expressada per les neurones en migració quan surten de la VZ (Fox *et al.*, 1998), cosa que suggereix que participa en el començament de la migració. De la mateixa manera que existeixen proteïnes, com la Filamina-1, que indueixen el començament de la migració de les cèl·lules postmitòtiques, també existeixen altres conjunts de molècules que participen en inhibint un inici prematur de la migració. Un clar exemple el trobem en la proteïna d'interacció amb la Filamina-1 (o FILIP, de l'anglès *Filamin A-interacting protein*) que regula negativament Filamina-1 (Nagano *et al.*, 2002). FILIP s'expressa en les

cèl·lules de la VZ i indueix la degradació de la Filamina-1, evitant un inici de migració neuronal prematur. Per tant l'acció conjunta de la Filamina-1 i de FILIP regularà l'inici de la migració radial de les neurones postmitòtiques a l'escorça.

2.1.1.3.4 Formació de les capes de l'escorça

Quan finalment les neurones arriben a la seva destinació pelen la migració i es desenganxen de la glia radial. La CP d'un individu adult conté 6 capes que es troben distribuïdes en un patró “dins-fora” (Figura 18A), on les capes més profundes, respecte la superfície pial, estan formades per aquelles cèl·lules que han esdevingut postmitòtiques més d'hora i les capes més superficials estan formades per aquelles cèl·lules postmitòtiques de generació més tardana (Tissir and Goffinet, 2003).

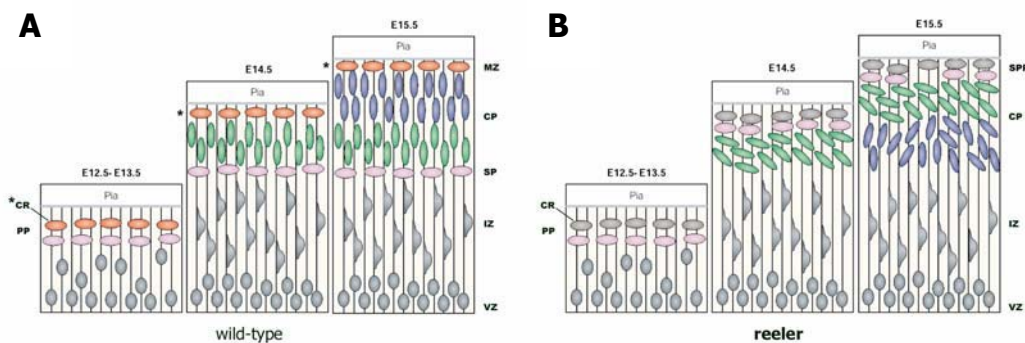


Figura 18 Esquematzació del desenvolupament embrionari cortical en animals *wild-type* i en *reelers*. En animals *wild-type* (A), els neuroblasts generats a la zona ventricular migren radialment insertant-se a la preplaca per sota de les cèl·lules de Cajal-Retzius que secreten la Reelina; la distribució de les cèl·lules de la placa cortical segueix un patró de dins cap a fora. En els animals *reeler* (B) les neurones de la placa cortical s'acumulen per sota de la preplaca seguint un patró invertit, de fora cap a dins, la preplaca esdevé la superplaca, sense separar-se en zona marginal i subplaca. **CR**, cèl·lules de Cajal-Retzius; **PP**, preplaca; **MZ**, zona marginal; **CP**, placa cortical; **SP**, subplaca; **IZ**, zona intermèdia; **VZ**, zona ventricular; **SPP**, superplaca; *, secreció de la Reelina (taronja).
Adaptat de Tissir and Goffinet, 2003.

Les cèl·lules que formen una mateixa capa són cèl·lules que han estat generades, han migrat i han parat la seva migració aproximadament en els mateixos períodes de temps (Takahashi *et al.*, 1999). I malgrat que la identitat laminar per part de les cèl·lules s'adquireix d'una forma primerenca dins del cicle cel·lular, la natura dels factors que controlen el correcte posicionament de les neurones en migració dins de cada capa de la CP encara és desconeguda (Frantz and McConnell, 1996; McConnell and Kaznowski, 1991).

El primer abordatge per descobrir quins són els factors que controlen el destí finals de les cèl·lules va ser l'estudi de les mutacions espontànies tant en models murins com humans. Aquest estudi van concloure que les cèl·lules de Cajal-Retzius

(o CR) eren essencials pel correcte posicionament de les neurones en les seves capes respectives de la CP. Les cèl·lules de CR són un dels primers tipus cel·lulars diferenciats que apareixen en la formació de l'escorça formant part de la preplaca (o PP, de l'anglès *preplate*). Aquestes cèl·lules es localitzen en la zona marginal (o MZ, de l'anglès *marginal zone*) en el moment en que la primera onada migratòria de cèl·lules corticals separa la PP en MZ i subplaca (o SP, de l'anglès *subplate*). Des d'aquest moment onades de cèl·lules migraran radialment des de la VZ, creuant les neurones preexistents fins arribar a les proximitats de la MZ on es desenganxaran de la glia i aturaran la seva migració. Aquest model suggereix un paper important de la MZ i de les cèl·lules que hi pertanyen, com són les cèl·lules de CR, en el control de la migració (Tissir and Goffinet, 2003). Un dels primers casos on aquesta estructura cortical es va veure dràsticament alterada, va ser en un ratolí, que contenia una mutació espontània, al qual se'l va anomenar *reeler* (a causa dels tremolors i la descoordinació motora que presentava). Aquests animals presentaven un desenvolupament cortical aberrant. La primera onada migratòria de cèl·lules no podia penetrar la PP, i separar-la en MZ i SP, de la mateixa manera les següents onades cel·lulars no creuaven les capes de cèl·lules preexistents acumulant-se per sota de les primeres, obtenint finalment una pseudo-CP amb un patró invertit "fora-dins" (Figura 18B) (Caviness, 1982; Rice and Curran, 2001; Sheppard and Pearlman, 1997). Més endavant, D'Arcangelo i col·laboradors van afirmar que aquests animals eren deficientes per la proteïna Reelina, una proteïna d'ECM, que mutada causava els mateixos efectes vistos en els animals *reeler*; demostrant que era Reelina la molècula responsable d'aquesta malformació (D'Arcangelo *et al.*, 1995).

El paper de la Reelina en el desenvolupament del SNC és la base de la present tesi i per tant tots els processos en que participa i en que ha estat implicada s'introduiran en un capítol propi (Capítol 3).

2.1.2 Migració tangencial al cervell anterior

La migració radial esdevé el principal sistema de guia per les neurones dels SNC. Malgrat tot també cal reconèixer que hi ha diverses poblacions de neurones disperses al cervell que no coincideixen amb el sistema de migració radial (Marin and Rubenstein, 2003). La **migració tangencial**, entenent que és qualsevol altre que no és radial, inclou diferents tipus de moviments cel·lulars que varien sobretot en el substrat que utilitzen per migrar. En alguns casos les neurones s'utilitzen les unes a

les altres per promoure la seva migració, com és el cas dels progenitors d'interneurons del bulb olfatori. En altres casos el substrat pot ser un axó en creixement, o un altre cas són cèl·lules individuals que no utilitzen cap suport concret (o conegut). La migració tangencial permet que les cèl·lules no estiguin restringides a cap frontera, fins i tot aquestes cèl·lules poden migrar creuant subdivisions del cervell anterior, com poden ser algunes neurones humanes originàries de l'eminència ganglionar del telencèfal i que el seu destí final es localitza al nucli dorsal talàmic del diencèfal (Heffron and Golden, 2000; Letinic and Rakic, 2001).

2.1.2.1 Ruta de Migració Rostral

L'OB és una de les poques regions del SNC adult que té un constant renovament de part de la seva població neuronal al llarg de tota la vida de l'individu, més concretament parlem de les interneurons GABAèrgiques de circuit local que pertanyen a les cèl·lules periglomerulars i granulars (Figura 14) (Altman, 1969; Luskin, 1993; Ming and Song, 2005). L'origen embrionari d'aquestes cèl·lules genera controvèrsia, malgrat que forces investigadors proposen que els precursors d'aquestes interneurons s'originen a la part dorsal de l'eminència ganglionar lateral (o LGE, de l'anglès *lateral ganglionic eminence*) (Marin and Rubenstein, 2001; Sussel *et al.*, 1999; Wichterle *et al.*, 2001; Yun *et al.*, 2001). Des de la seva zona d'origen migren tangencialment fins al OB (Figura 19). Aquesta migració ja no s'aturarà mai al llarg de la vida de l'individu malgrat que el seu origen canviarà i s'establirà a la zona subventricular (SVZ) (Lois and Alvarez-Buylla,

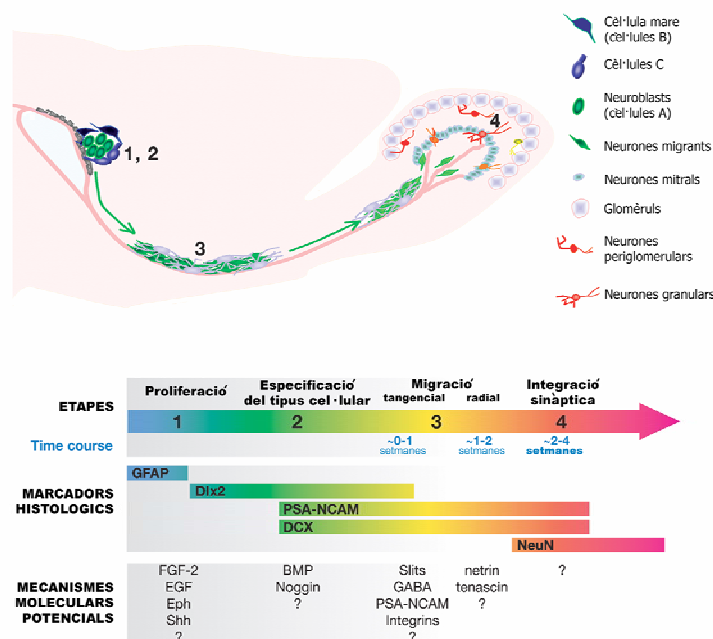


Figura 19 Ruta de migració rostral (RMS) on participen les cèl·lules originàries de la zona subventricular (SVZ) amb destí al bulb olfatori (OB). Els precursors de les interneurons necessàries a l'OB es generen al llarg de tota la vida del individu a la paret lateral del ventricle lateral (1), aquestes cèl·lules, envoltades principalment per astròcits, migren homofilicament per la denominada RMS fins a arribar a l'OB (2,3) on finalment es desenganxen de la RMS i migren radialment per adquirir les seves posicions finals (4). **Adaptat de Ming i Song, 2005.**

1994). La SVZ és una zona mitòticament activa, que des d'estadis postnatais i cap endavant es troba envoltant la paret endodimensional del ventricle lateral, aquesta zona es genera a partir de precursors originaris de l'LGE (Wichterle *et al.*, 1999). Les neurones immadures migren tangencialment des de la SVZ fins a la *lamina medularis interna* de l'OB seguint la RMS. Aquesta via que s'origina des de les edats postnatal primerenques és altament restrictiva i difereix en gran mesura de la migració feta dels precursors embrionaris des de l'LGE quan es desenvolupa l'OB (Kornack and Rakic, 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Pencea *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 1996). En el primer cas els precursors postnatais migren formant una xarxa de cadenes cel·lulars altament organitzada i compactada que dona lloc a la RMS (Figura 19) (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1996; Rousselot *et al.*, 1995), en canvi la migració des de l'LGE és menys organitzada i les cèl·lules es mouen per un feix molt ample de matriu extracel·lular (Kishi *et al.*, 1990). Aquestes diferències fan pensar que possiblement el mecanisme molecular de migració no és igual entre ambdues.

Tant en estadis embrionaris com en adults la migració dels precursors d'interneurones es basen en interaccions homofíliques, això vol dir que les neurones utilitzen com a substrat de la seva migració les seves neurones veïnes i viceversa, aquest tipus de migració s'ha anomenat **migració en cadena** (Figura 20). *In vivo* un

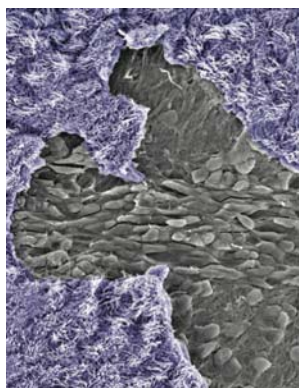


Figura 20 Imatge de microscopia de rastreig de la paret ventricular, on es veuen els neuroblasts migrant homofilicament en direcció a l'OB.
Adaptat del Dr. Álvarez-Buylla.

altre tipus cel·lular que participa en aquesta migració són els astròcits, malgrat que *in vitro* s'ha observat que la presència d'aquests no és necessària (Wichterle *et al.*, 1997). Els astròcits, *in vivo*, estan presents al llarg de tot el RMS envoltant els precursors neuronals, creant un tub de permissivitat pel pas de les cèl·lules (Jankovski and Sotelo, 1996; Lois *et al.*, 1996; Peretto *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1996). Com hem comentat existeix una diferència entre la migració dels precursors neuronals embrionaris i els adults, aquest canvi s'ha postulat que es produeix en edats perinatales i que és dependent de modificacions en la composició de l'ECM del RMS o en les propietats adhesives de les cèl·lules migrants (Kleinman *et al.*, 1982; Wichterle *et al.*, 1997).

A nivell molecular un dels components més destacats és la molècula d'adhesió cel·lular neuronal, o N-CAM, que normalment es troba polisialitzada

(PSA), obtenint la forma biològicament activa d'aquesta proteïna, la PSA-NCAM (Ono *et al.*, 1994). La PSA-NCAM és un membre de la superfamília de les immunoglobulines que intervé en les interaccions cèl·lula-cèl·lula ja siguin homofiliques o heterofiliques. Pel que fa referència al RMS es creu que la seva funció facilita que els precursors neuronals utilitzin les cèl·lules del seu voltant com a substrat de migració permetent velocitats més altes de moviment en les condicions altament restrictives, que trobem presents al RMS (Chazal *et al.*, 2000). En el desenvolupament, l'expressió de PSA-NCAM és baixa durant l'edat embrionària quan el progenitors de les interneurons provenen de l'LGE, en canvi comença a expressar-se de forma significativa a partir de les primeres edats postnatsals quan els precursors neuronals s'originen a la SVZ (Hu, 2000; Pencea *et al.*, 2001; Rousselot *et al.*, 1995). L'expressió de PSA-NCAM també es correlaciona amb el fenotip de migració. Quan la seva expressió és important, les cèl·lules migren en cadenes molt compactes i organitzades (migració postnatal) a diferència de quan la seva expressió és menor i les cèl·lules migren formant cadenes menys organitzades, utilitzant unes rutes de migració més difuses (migració embrionària).

Altres molècules, també, participen en la generació, el manteniment i el guiatge de la RMS, entre les quals val la pena destacar la Tenascina-C, i els seus receptors les Integrines $\zeta\Upsilon\eta3$ i $\zeta\Upsilon\eta6$; la Tenascina-C és present al precursors d'interneurons migrants i les integrines presents als astròcits que envolten el RMS de l'animal adult (Jankovski and Sotelo, 1996). Una altra família de proteïnes destacades són les efrines, proteïnes d'interacció cèl·lula-cèl·lula, que entre els seus efectes dins la RMS i la SVZ participen en l'estabilitat de les cadenes de migració cel·lular a la RMS (una funció similar a la PSA-NCAM) i modulen la proliferació dels neuroblast a la SVZ (Conover *et al.*, 2000). Sempre s'ha cregut que l'OB havia de secretar algu tipus de factor quimioatràient que servís de guia pels neuroblast en migració. En un principi es va pensar que Netrina-1 era aquest factor, però ràpidament es va descartar per dos estudis on es demostrava que la Netrina-1 no afectava la migració d'explants de SVZ i que en animals als quals se'ls havia extret l'OB la migració seguia produint-se normalment (Jankovski *et al.*, 1998; Kirschenbaum *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 2001; Murase and Horwitz, 2002). Recentment, s'ha suggerit que el factor quimioatràient responsable és el factor neurotròfic derivat de cèl·lules glials (o GDNF, de l'angès glial derived neurotrophic

factor), que s'ha demostrat que atrau els neuroblast de la RMS en condicions *in vitro*, amb l'activació de la proteïna Cdk5 (Paratcha *et al.*, 2005).

Finalment, destacar la família de proteïnes Slit/Robo, que juntament amb els astròcits que envolten la RMS, es creu que són els principals responsables del guiatge dels precursors neuronals, tant en edats embrionàries com adultes. Pel que fa al direccionament dels neuroblasts se sap que les proteïnes secretables Slit1 i Slit2, que interaccionen amb el receptor Robo, s'expressen al sèptum durant tota la vida de l'individu, i que aquestes proteïnes repel·leixen els neuroblasts de la RMS (Hu, 1999; Wu *et al.*, 1999). Una article molt recent aprofundeix en la relació entre els progenitors neuronals que participen en la RMS i les proteïnes Slit (Sawamoto *et al.*, 2006). Aquest article suggereix que el guiatge dels neuroblast es relaciona amb la direcció del fluxe del líquid cefaloraquidi (o LCR) present al ventricle lateral. El LCR es genera al plexe coroideu juntament amb d'altres factors quimiorrepulsius, com és el cas dels Slits. Aquest autors han demostrat que el flux del LCR es genera mitjançant els moviments coordinats dels cilis de les cèl·lules ependimals presents a la paret del ventricle (Figura 20). Gràcies a aquest flux es genera un gradient quimiorrepulsiu de Slits al llarg de tota la SVZ, amb les concentracions més altes a la regió caudal i les més baixes a la regió rostral, el qual es seguit per les cèl·lules de la RMS; suggerint que el guiatge d'aquestes cèl·lules depèn més de la direcció del flux de l'LCR que no pas de l'orientació relativa de l'OB (Sawamoto *et al.*, 2006). Conjuntament, amb la repulsió, els astròcits que envolten la RMS (Jankovski and Sotelo, 1996; Lois *et al.*, 1996; Peretto *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1996), secreten la proteïna d'inducció d'activitat migratòria, MIA, fent de motor per aquestes cèl·lules, que direccionades gràcies al parell Slit/Robo, migren fins al OB (Mason *et al.*, 2001).

2.1.2.2 Migració tangencial de cèl·lules extracorticals. Destí l'escorça

Entre les desenes de tipus cel·lulars diferents, l'escorça adulta està formada principalment per dos tipus de neurones, les cèl·lules piramidals, o excitadores, i les interneurons, o inhibidores. L'origen de les cèl·lules piramidals ha estat comentat amb anterioritat quan parlàvem de migració radial a telencèfal; l'origen i la posició final d'aquestes cèl·lules està molt localitzat, entre d'altres coses, a causa del seu mecanisme de migració. En resum, les cèl·lules originades per un progenitor concret de la VZ, migren radialment i donen el conjunt de cèl·lules immediatament per sobre d'ell. En canvi, per estudis de llinatge és va comprovar que les interneurons sorgien

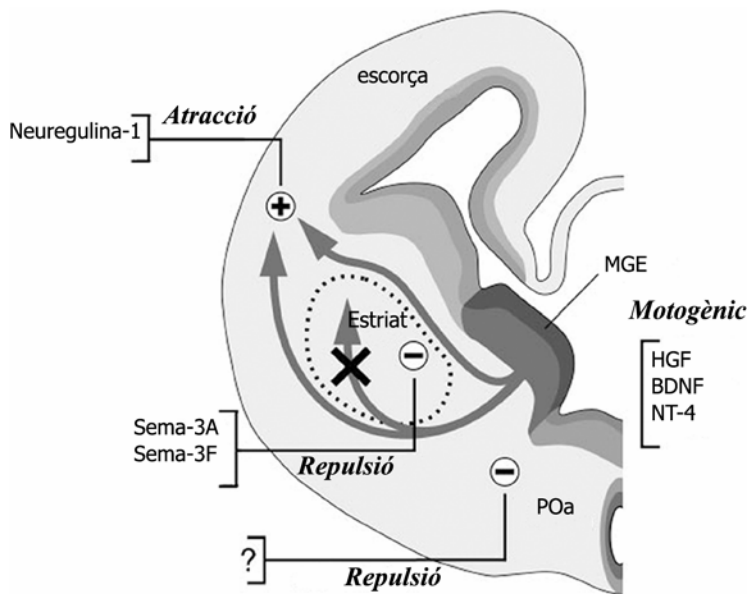


Figura 21 Mecanismes de regulació de la migració tangencial d'interneurons des del seu lloc d'origen fins a l'escorça. Les interneurons que es a la MGE migren tangencialment cap a l'escorça guiades per dos mecanismes. El primer és un mecanisme de repulsió (-) present a l'àrea pre-òptica de natura desconeguda, que empeny les cèl·lules lluny de l'àrea medial i el segon és un factor d'atracció (+) anomenat Neuregulina-1 secretat per l'escorça, que atrau les cèl·lules a la seva destinació. L'expressió de les Semaforines 3A i 3F a l'estriat evita la penetració de les interneurons, que expressen el receptor Neuropilina, en aquesta estructura. **POa**, àrea pre-òptica; **MGE**, eminència ganglionar medial; **Sema**, semaforina. **Adaptat de Marín i Rubenstein, 2003.**

de progenitors diferents dels

presentes a la VZ (Luskin, 1993; Mione *et al.*, 1994; Parnavelas *et al.*, 1991). A principis d'aquest segle, es van realitzar els experiments necessaris per afirmar que l'origen d'aquestes cèl·lules eren els progenitors localitzats al *subpallium* telencefàlic embrionari, més concretament a les eminències ganglionars medials (MGE), i que eren la font principal de cèl·lules que migraven tangencialment cap a l'escorça i l'hipocamp en desenvolupament (Figura 21) (Lavdas *et al.*, 1999; Sussel *et al.*, 1999; Wichterle *et al.*, 1999; Wichterle *et al.*, 2001).

Aquestes interneurons migren per rutes de migració molt estrictes. Inicialment les cèl·lules que esdevindran interneurons no arribaran a creuar mai l'estriat, sinó que envairan l'escorça per la MZ, a través de la SP o per rutes específiques dins de la CP (Figura 21) (Flames *et al.*, 2004; Lavdas *et al.*, 1999; Marin and Rubenstein, 2001). És interessant l'observació que les interneurons que utilitzen la MZ com a via de migració mostren característiques de les cèl·lules Cajal-Retzius (CR), com per exemple que expressen el gen de la Reelina (Meyer and Goffinet, 1998; Super *et al.*, 1998).

Els factors que controlen la migració d'aquestes neurones cap a l'escorça es poden classificar en tres grups: el primer, són factors que estimulen el moviment de les interneurons. Els factors fins ara descrits implicats en aquest procés són el factor de creixement hepàtic (o HGF), BDNF i NT-4, juntament amb el principal receptor dels dos darrers TrkB (Polleux *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2001).

El segon grup és l'existència d'un substrat permisible per la migració d'aquestes cèl·lules. Si existeix un substrat preferent per la migració de les interneurons actualment és desconegut, encara que s'ha observat que poden utilitzar els axons corticofugals com a un possible substrat de migració (Denaxa *et al.*, 2001; Metin *et al.*, 2000; Metin and Godement, 1996; O'Rourke *et al.*, 1995).

Finalment el tercer grup, serien factors atractius/repulsius que guessin les neurones cap a l'escorça per les vies adequades (Marin and Rubenstein, 2003; Wichterle *et al.*, 2003). S'ha hipotetitzat que els factors repulsius estiguin presents a l'àrea preòptica (POa), i fins i tot històricament s'havia pensat que les molècules responsables podien ser Slits (Slit1/2) o Netrina-1 (Hamasaki *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999); però a partir dels estudis del triple mutant d'aquestes proteïnes s'ha descartat aquesta idea (Marin and Rubenstein, 2003). Les coses que si se saben és que la parella Neuropilina/Semaforina (receptor/l·ligand) (Raper, 2000), és l'encarregada de direccionar les interneurons, que generades a l'MGE, migren cap a l'estriat o cap a l'escorça (Marin and Rubenstein, 2001). Les interneurons que van a l'escorça expressen el receptor Neuropilina, i el resultat és que aquestes cèl·lules se senten repel·lides de les zones on s'expressen semaforines (l'estriat expressa Sema3A i Sema3F); de la mateixa manera les interneurons amb destí a l'estriat no expressen els receptors d'aquestes Semaforines (Figura 21) (Marin and Rubenstein, 2001). Dins del grup de factors atractius només es pot anomenar fins al moment la proteïna Neuregulina-1 (Flames *et al.*, 2004). Aquesta proteïna i el seu receptor ErbB4 són els encarregats de facilitar i atraure la migració de com a mínim un grup de cèl·lules GABAèrgiques generades a l'MGE. Les interneurons que migren tangencialment fins a l'escorça expressen el receptor ErbB4 i per la seva ruta de migració s'observa la presència d'una forma de Neuregulina-1 unida a membrana que facilita la migració de les interneurons. Per una altra banda existeix una forma soluble de Neuregulina-1 expressada per l'escorça en desenvolupament que actua com un potent quimioattractor d'aquestes cèl·lules (Flames *et al.*, 2004).

Quan aquestes cèl·lules GABAèrgiques arriben a l'escorça primerenca s'ubiquen segun un patró "dins-fora" similar al de les cèl·lules piramidals. Curiosament, interneurons i cèl·lules piramidals de la mateixa edat s'ubiquen a la mateixa capa, malgrat els seus orígens diferents (Fairen *et al.*, 1986; Hevner *et al.*, 2004; Peduzzi, 1988). Clarament, aquest posicionament no és a l'atzar sinó que ve regulat per factors fins ara desconeguts. Els primers estudis al respecte l·liguen la

proteïna Reelina, coneguda per la seva funció en desenvolupament d'estructures laminades del cervell, en el posicionament d'una subpoblació d'interneurons GABAèrgiques secretores de Somatostatina. Un altre possible factor es probable que es trobi present en les cèl·lules piramidals de la mateixa edat, però fins ara no hi ha cap evidència experimental. A més a més, s'ha observat que les cèl·lules GABAèrgiques que migren per la subplaca utilitzen la VZ per localitzar la capa diana (Nadarajah and Parnavelas, 2002).

2.1.2.3 Migració de les neurones GnRH

Les cèl·lules secretores de l'hormona Gonadotropina (cèl·lules GnRH, de l'anglès *Gonadotropin-releasing hormone cells*), són una família de cèl·lules d'origen extracortical, més concretament de la placa nasal, i són l'exemple més clar i més ben estudiat de cèl·lules que migren axonofilicament a l'escorça (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Wray *et al.*, 1989). El destí final d'aquestes cèl·lules són l'àrea preòptica i l'hipotàlem, on la seva funció és controlar la secreció de les hormones gonadotòpiques per part de la glàndula pituïtària (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989).

Aquestes cèl·lules migren des de la zona medial de la placa olfactiva, dins del compartiment nasal, creuant la placa cribosa seguint els axons vomeronasals (VMN), que utilitzen com a substrat de migració (Gao *et al.*, 2000). Quan els axons VMN entren al cervell es divideixen en dos feixos, el principal en direcció a l'OB i l'altre feix, o axons VMNc, segueix una direcció caudal i ventral fins a la *lamina terminalis*. Les neurones GnRH majoritàriament segueixen la segona via i no penetren en direcció a l'OB.

Es coneixen diverses proteïnes implicades en el control d'aquesta via, com per exemple PSA-NCAM, Periferina, TAG-1, NELF, GABA, Netrin-1, el factor de transcripció Ebf2 o Anosmina-1, producte gènic responsable de el Síndrome de Kallmann (KS) (Cariboni *et al.*, 2004; Corradi *et al.*, 2003; Wierman *et al.*, 2004; Wray, 2001). Malgrat tot la majoria d'aquests factors afecten la migració de les neurones GnRH de forma indirecta, i sobretot a una època molt primerenca quan aquestes cèl·lules encara estan al compartiment nasal. En canvi, els factors que guien aquestes cèl·lules evitant la seva entrada a l'OB i dirigint la migració en l'orientació més caudal són majoritàriament desconeguts. Es creia que una de les possibles causes d'aquest fet és que el axons VMN que es dirigien cap al bulb deixaven

d'expressar proteïnes de membrana com la TAG-1 o receptors com el DCC (Schwartz *et al.*, 2001; Wray *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1995). Més endavant s'ha confirmat el paper quimioattractiu de DCC, i del seu lligant Netrina-1, en el direccionament de les cèl·lules GnRH cap a l'hipotàlem gràcies als estudis comparatius que s'han dut a terme entre el ratolí deficient per Netrina-1 i el deficient per Unc5c (Schwartz *et al.*, 2004). A més a més, recentment, s'ha postulat que la proteïna Reelina també pot participar activament en aquest control. Cariboni i col·laboradors, suggereixen que la Reelina pot actuar com una senyal repel·lent per l'entrada d'aquestes neurones cap a l'OB. Experiments en animals *reeler* (o deficients en Reelina) demostren que en absència de Reelina les neurones GnRH migren de forma ectòpica cap a l'OB i l'escorça, i el seu número es redueix a l'hipotàlem (Cariboni *et al.*, 2005).

2.2 Migració al cerebel

El cerebel s'ha pres tradicionalment com a model d'estudi de la migració neuronal perquè té una citoarquitectura ben definida i l'escàs número de tipus cel·lulars diferents permet determinar els mecanismes moleculars i cel·lulars que intervenen en aquesta migració. A més a més, els resultats obtinguts en cerebel són extrapolables a d'altres tipus de neurones migrants (Komuro and Yacubova, 2003). Malgrat l'estudi profund que s'ha fet del cerebel, segueixen apareixent estudis que permeten modificar les idees sobre migració preestablertes durant força temps (Liesi *et al.*, 2003).

2.2.1 Cèl·lules de Purkinje i glia de Bergmann

El primer procés de migració radial que es dona al cerebel apareix al voltant d'E12, on les cèl·lules de Purkinje abandonen el neuroepiteli i seguint un sistema de fibres glials radials migren cap a la superfície pial. Les prolongacions radials que utilitzen aquestes cèl·lules provenen del que en adult s'anomenarà glia de Bergmann, i en edats embrionàries i perinatals faran funció de glia radial. La glia de Bergmann s'origina a la VZ en el mateix període que les cèl·lules de Purkinje i emet prolongacions radials per tot el primordi cerebelar fins a la superfície pial, i de forma similar a la glia radial de l'escorça manté el soma a la VZ de cerebel. Les cèl·lules de Purkinje utilitzen com a guia les prolongacions glials per migrar radialment fora de la VZ. Diversos estudis han corroborat el contacte directe entre cèl·lules de Purkinje i

la glia radial per la formació d'estructures especialitzades que permeten la unió entre ambdós tipus cel·lulars (Yamada and Watanabe, 2002; Yuasa *et al.*, 1996). Les cèl·lules de Purkinje migren en direcció a la superfície pial on trobaran la incipient capa de cèl·lules granulars externa, o EGL, però no assoliran la seva posició definitiva fins edats perinatals amb la participació de la proteïna Reelina, formant la PCL (Miyata *et al.*, 1996). Per la seva banda la glia de Bergmann no és independent a la migració de les cèl·lules de Purkinje per les seves prolongacions. Per tal d'assolir la seva posició final, per darrere de la capa de cèl·lules de Purkinje, les cèl·lules gials migren radialment, per translocació somal, conjuntament amb les cèl·lules de Purkinje, però sempre per darrera del front de migració de les primeres; això suggereix que la migració de la glia està, en part, influenciada per la migració de les cèl·lules de Purkinje (Yamada and Watanabe, 2002; Yuasa *et al.*, 1996)

2.2.2 Cèl·lules granulars de cerebel: EGL i IGL

L'altre gran focus de migració al cerebel ve donat per les cèl·lules granulars del cerebel, encara que per descriure la seva migració serà necessari sortir dels

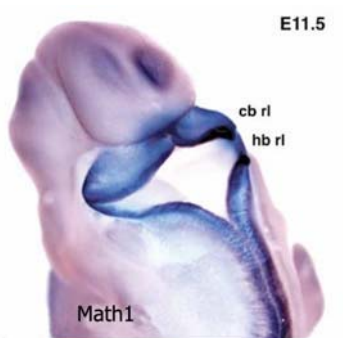


Figura 22 Visualització de l'expressió *Math1* al llavi ròmbic en embrions de ratolí a E11. **cb rl**, llavi ròmbic cerebelar; **hb rl**, llavi ròmbic del cervell posterior.
Adaptat de Machold i Fishell, 2005.

contorns del cerebel i buscar l'origen de les mateixes al llavi ròmbic. El llavi ròmbic, present entre els rombòmers I i VIII del metencèfal, actualment està genèticament subdividit en dos parts, aquella que expressa *Math1* (de l'anglès Mouse ATonal Homolog-1) (Figura 22) i aquella que expressa *Ptf-1* (de l'anglès Pancreatic Transcription Factor-1).

Aquesta definició genètica, difereix de la clàssicament acceptada morfològica, i té a veure amb criteris d'activitat on les cèl·lules que expressen *Math-1* són generalment cèl·lules excitadores, i les que expressen *Ptf-1* són generalment inhibidores (Wang *et al.*, 2005). Les cèl·lules granulars, tenen l'origen a la regió *Math-1*, al voltant d'E12, i migren tangencialment per la superfície del primordi cerebelar fins envair la superfície del cerebel, just per sobre de la incipient capa de cèl·lules de Purkinje donant lloc a l'EGL (Sotelo, 2004). Durant força temps s'ha pensat que aquesta migració tangencial superficial només era utilitzada pels precursors de les cèl·lules granulars, però recentment s'ha observat que són

precursors postmitòtics dels nuclis profunds qui obren aquesta via a E10, i que després són els precursors de les cèl·lules granulars que l'utilitzen per poblar el cerebel (Wang *et al.*, 2005; Wingate, 2005). La migració de les cèl·lules granulars cap a cerebel comença, com ja hem comentat, al voltant d'E12 i es produeix en dos onades migratòries. La primera és l'encarregada de poblar el que seran els lòbuls més anteriors en adult i, una mica més tard, la segona s'encarregarà de poblar els futurs lòbuls més caudals, fins que finalment tota la migració dels precursors granulars s'haurà acabat al voltant d'E17 (Machold and Fishell, 2005). Quan aquestes cèl·lules comencen a migrar expressen Nestina que és un filament intermedi específic de precursors neuronals (Wang and Zoghbi, 2001).

L'EGL primerenca és un lloc de gènesis secundària, on els precursors granulars es divideixen augmentant la població de cèl·lules granulars considerablement (Fujita, 1967). La dinàmica de migració de les cèl·lules granulars

postmitòtiques ha estat força estudiada durant aquest anys, i actualment gràcies a la millora dels sistemes de captació d'imatges existents s'ha pogut descriure dins l'entorn cel·lular propi amb gran detall (Komuro *et al.*, 2001; Solecki *et al.*, 2004). Quan apareixen les

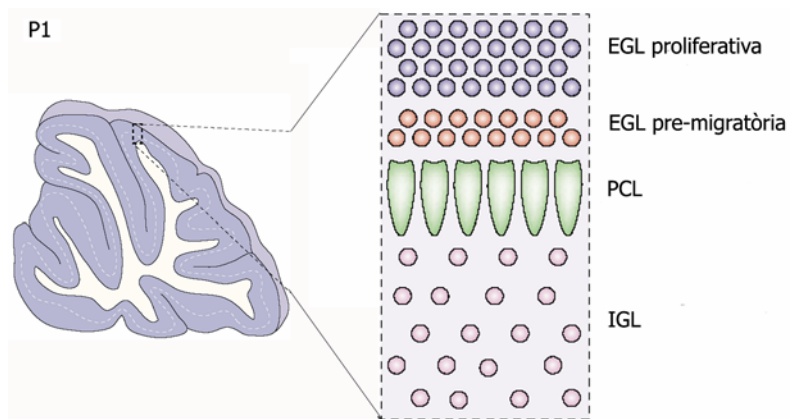


Figura 23 Esquema de les capes de l'escorça cerebelar d'un animal perinatal. En aquest esquema es poden observar les tres capes cel·lulars que es formen en el desenvolupament del cerebel. La incipient EGL que prové de la migració tangencial del llavi ròmbic, incrementa el seu tamany estimulada per les cèl·lules de Purkinje generant una subdivisió entre la EGL proliferativa, lloc de neurogènesi, i EGL pre-migratòria, on les cèl·lules granulars es preparen per migrar radialment. La IGL es genera per l'aportació de cèl·lules granulars provinents de la EGL. **EGL**, capa granular externa; **PCL**, cap de cèl·lules de Purkinje; **IGL**, capa granular interna. **Adaptat de Wang i Zoghbi, 2001.**

primeres cèl·lules granulars postmitòtiques, ocupen la zona inferior de la EGL, que s'anomena EGL premigratòria, i les mitòticament actives resten a la part superior de l'EGL, que s'anomena EGL proliferativa (Figura 23). En el procés previ a la migració radial, les cèl·lules granulars postmitòtiques generen 2 extensions irregulars paral·leles a superfície cerebelar i comencen a migrar tangencialment en la direcció de l'extensió més gran (Figura 24, 2) (Komuro *et al.*, 2001). S'ha descrit que possiblement aquesta migració tangencial participi en el correcte posicionament de la cèl·lula, dins d'una unitat radial concreta, abans de migrar radialment cap a l'interior

del cerebel, i això implicaria un control per part de factors externs a la cèl·lula ja siguin solubles o dependents de l'ECM. En aquest punt val a dir que mentre la cèl·lula migra tangencialment, el soma també es mou en direcció a la capa molecular (o ML, de l'anglès *molecular layer*) (Figura 24, 1-4). Aquest apropament per part del soma a la ML genera un alentiment de la velocitat de migració tangencial permetent en aquest punt que les cèl·lules granulars amb el soma a la barrera EGL/ML comencin a estendre una prolongació vertical dirigida a la ML (Figura 24, 3-4). Arribats a aquest instant premigratori les cèl·lules pateixen un procés de latència que dura d'unes 20 a 48 hores i que és un estadi cel·lular previ abans d'emetre una única extensió vertical que s'uneix a la glia radial de Bergmann, i que inicia el canvi de migració tangencial a radial (Figura 24, 5), (Komuro *et al.*, 2001).

Les cèl·lules granulars que penetren a la ML migren al llarg de la glia de Bergmann amb una morfologia típicament de migració radial, amb un soma fusiforme, un *trailing process* prim i un *leading process* més voluminós, com ja va

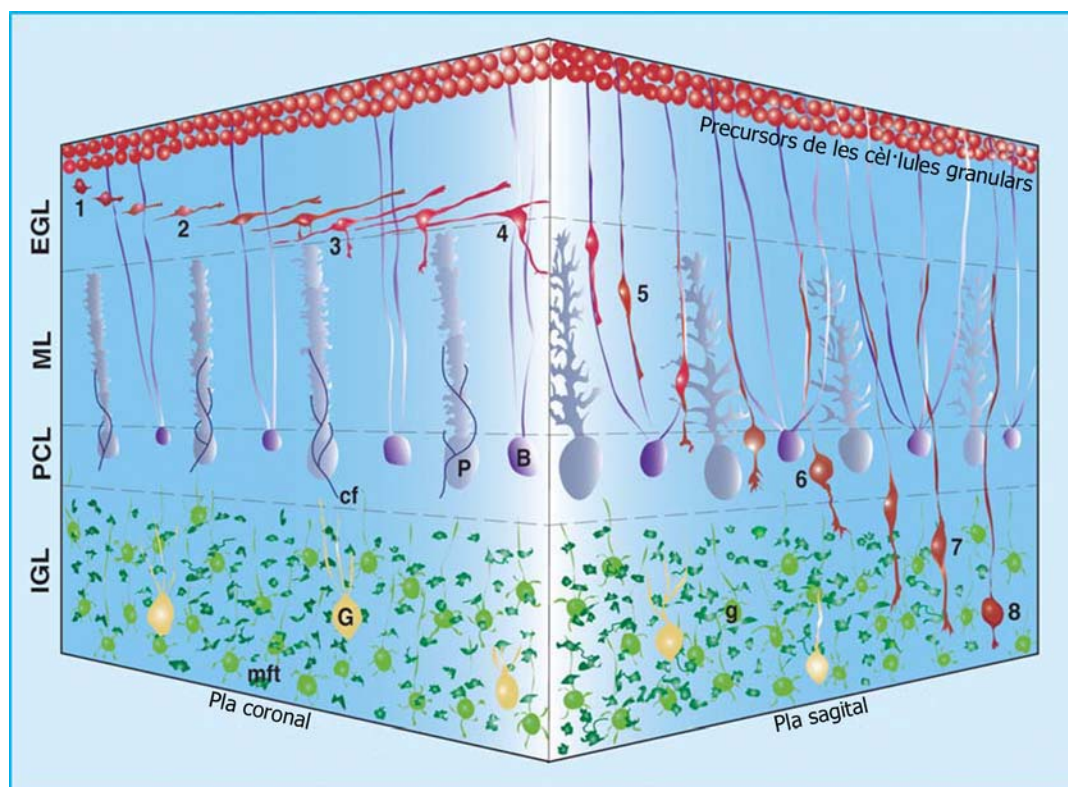


Figura 24 Representació tri-dimensional de la migració granular des de l'EGL a fins la IGL en un cerebel perinatal de ratolí. La cèl·lula granular madura es desprèn de l'EGL proliferativa i penetra en la EGL premigratòria (1). Extén dos prolongacions no simètriques (2) i migra tangencialment fins a la superfície de l'EGL on s'atura (3). Després extén un prolongació radial que contacta amb la glia de Bergmann (4), per on migra radialment (5) fins arribar a la PCL on es desenganxa de la glia i s'atura novament (6). Després torna a migrar radialment però aquest cop independentment de glia (7) fins que arriba als límits més profunds de la IGL on s'atura i pren la seva morfologia final arrodonida (8). P, cèl·lula de Purkinje; B, glia de Bergmann; G, cèl·lula de Golgi; g, cèl·lula granular post-migratòria; cf, fibra trepadora; mft, fibra molsosa; ML, capa molecular. Adaptat de Komuro i Yacubova, 2003.

descriure per primera vegada Cajal (Figura 24, 5) (Komuro and Rakic, 1995, 1998; Ramón y Cajal, 1911). És interessant comentar que el temps que necessiten les cèl·lules per creuar la ML és constant al llarg de la formació del cerebel. Aquesta afirmació no és tant òbvia si tenim en compte que al llarg de la segona setmana postnatal la ML duplica el seu gruix. Aquest augment de la distància a recórrer es veu compensat per l'augment de la velocitat de les cèl·lules (de 9,6 σ m/h a 7 dies postnatsals -P7- fins els 18,0 σ m/h a P13), deixant un valor constant al temps de pas de les cèl·lules per la ML (Komuro and Rakic, 1995).

El primer d'arribar a la PCL és el *leading process* d'aproximadament unes 50 σ m que resta aturat, i es va fent més curt a mesura que el soma va avançant (Komuro and Rakic, 1998). Quan finalment el soma arriba a la PCL la migració s'atura durant un període d'aproximadament 2 hores, i a diferència dels processos de migració radials clàssics l'apex del *leading process* de la cèl·lula granular emet filopodis i lamel·lipodis, amb un moviment que suggereix que el *leading process* busca activament molècules guia per seguir la seva migració (Figura 24, 6).

Després del període estacionari a la PCL, la neurona reprèn el seu contorn fusiforme i segueix la migració, a partir d'aquest moment independent de glia, penetrant en la capa granular interna (IGL) amb un velocitat constant d'aproximadament 12 σ m/h (Figura 24, 7). Malgrat la carència de glia, les cèl·lules granulars segueixen migrant radialment cap a la WM, cosa que suggereix que han d'existir factors encarregats del control de la migració d'aquestes cèl·lules. Finalment quan el *leading process* contacta amb la WM el soma de les cèl·lules granulars s'arrodona i la migració s'atura, deixant una nova cèl·lula granular a la part més profunda de la IGL (Figura 24, 8).

En resum, en el cerebel d'un animal P10, les cèl·lules granulars primer recorren unes 220 σ m tangencialment i després recorren per migració radial unes 250 σ m més, invertint un temps total de quasi 2 dies des del seu lloc origen a l'EGL fins a arribar al seu destí a la IGL (Komuro and Yacubova, 2003).

2.2.3 Mecanismes moleculars implicats en la migració de les cèl·lules granulars de cerebel

Quan les cèl·lules granulars postmitòtiques surten de l'EGL proliferativa i entren en la premigratòria, es creu que s'activa un programa genètic intrínsec de

migració, que guiarà la cèl·lula en els següents passos fins arribar a la IGL. Aquesta afirmació ha madurat a partir d'estudis on es compara el comportament de les neurones granulars *in vivo* i *in vitro* (Komuro *et al.*, 2001; Yacubova and Komuro, 2002). En aquest estudi s'han observat característiques cel·lulars com: la velocitat de migració de les cèl·lules *in vivo* envers de les *in vitro* cultivades amb diferents substrats (Yacubova and Komuro, 2002); el temps durant el qual les cèl·lules en els dos models estant migrant, que es troba en ambdós casos al voltant de 50-60 hores; o la regulació gènica de diferents gens *in vivo* i *in vitro* al llarg del temps de migració (Mellor *et al.*, 1998; Yacubova and Komuro, 2002).

Entre els factors que s'han implicat en

el control de la migració de les cèl·lules granulars existeixen diversos tipus de receptors i canals entre els quals destaquem el receptor de glutamat N-metil-D-aspartat, o NMDA, acoblat a canal i el canal de Ca^{2+} dependent de voltatge tipus-N (resum esquemàtic d'aquest punt a la Figura 25). El rol del receptor de NMDA en el control de la migració granular a cerebel es va començar a elucidar quan fa una dècada es van fer dos experiments independents on es va comprovar, per tècniques de pinçament de membrana (en anglès *patch-clamp*), que el receptor de NMDA té activitat espontània a cerebel, i que aquesta augmenta quan les cèl·lules migraven radialment per la ML (Rossi and Slater, 1993). Per una altra banda també es va veure que experiments on es bloquejava específicament aquest canal generaven una disminució en la migració de les neurones granulars, suggerint clarament que el receptor de NMDA estava implicat en el control de la migració d'aquestes cèl·lules (Komuro and Rakic, 1993, 1998). El que no se sabia era com aquest receptor es podia activar si les cèl·lules granulars no formen contactes sinàptics fins que no es transloquen a la IGL. Més endavant es va observar que aquesta activació venia donada pel glutamat extracel·lular, que activava el receptor de NMDA independentment de sinapsi (Komuro and Rakic, 1993; Rossi and Slater, 1993). Per

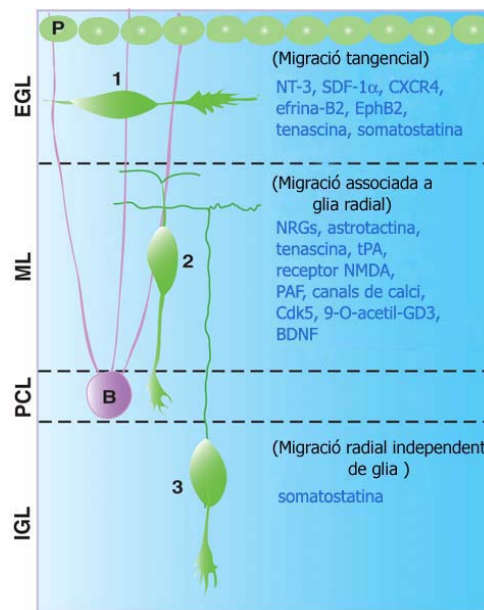


Figura 25 Senyals transmembrana, molècules d'adhesió i factors de guia solubles que participen en el control de la migració granular al cerebel. (1) Migració tangencial de la cèl·lula granular; (2) migració radial gliofílica; (3) migració radial de la cèl·lula granular en la IGL. P, cèl·lula precursora granular, B, glia de Bergmann. Adaptat de Komuro i Yacubova, 2003.

una altra banda, s'ha demostrat que el canal de Ca^{2+} dependent de voltatge també pot controlar la migració de les cèl·lules granulars (Komuro and Rakic, 1992). Aquesta afirmació es recolza en experiments similars als anteriors on es bloqueja específicament aquest canal amb ω -conotoxina GVIA o en estudis de migració de proteïnes homòlogues a aquest canal de Ca^{2+} en diferents organismes (Komuro and Rakic, 1992; Tam *et al.*, 2000). El control d'aquestes dos proteïnes sobre la migració de les cèl·lules granulars de cerebel molt probablement és deu al control de la concentració intracel·lular de l'ió Ca^{2+} (Komuro and Rakic, 1996). Prèviament ja s'havia demostrat en molts tipus cel·lulars, per exemple en fibroblast o en cèl·lules de glia immadura, que augments transitoris de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eren necessaris per l'inici i el manteniment de la migració cel·lular (Komuro and Yacubova, 2003). A més a més, si la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es tamponada, o inhibeix el seu augment per la disminució de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, la migració es veu disminuïda o, fins i tot, bloquejada. En estudis més pormenoritzats en cèl·lules granulars s'ha observat que aquestes neurones durant la seva migració tenen de mitjana uns 13 augments espontanis de calci per hora, amb un augment mig del 14% de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en comparació amb la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (Komuro and Rakic, 1996). El recull d'aquest estudis conclouen que la combinació de l'amplitud i la freqüència de les fluctuacions de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ genera una senyal intracel·lular que controla la migració granular. El següent punt seria entendre quina senyal intracel·lular desencadena aquest augment de calci. Entre les diferents hipòtesis existeix la possibilitat que les fluctuacions de calci regulin la dinàmica d'assemblatge de components del citoesquelet que participen en la generació de la força del moviment cel·lular (Rakic *et al.*, 1996). Per una altra banda, la fluctuació de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pot alterar l'equilibri de formació i eliminació de llocs d'unió entre les neurones migrants i el seu substrat, modificant la conformació de proteïnes d'adhesió, com les integrines, que s'expressen a la membrana plasmàtica de les neurones migrants (Komuro and Yacubova, 2003).

Altres factors que s'han demostrat importants en la regulació de la migració granular són: la Neurotrofina-3 (o NT-3) que juntament amb el seu receptor més afí TrkC, presents tant a la IGL com a l'EGL, es creu que són responsables de promoure la maduració de les cèl·lules postmitòtiques i per tant accelerant la seva sortida de l'EGL (Doughty *et al.*, 1998); la Neuregulina (o NRG) i el seu receptor ErbB4, expressats en les cèl·lules granulars i de la glia radial respectivament, participen en el control de la migració radial guiada per glia a la ML (Rio *et al.*, 1997). Un punt de

control molt interessant és el que es dona per part del factor derivat de cèl·lula estromal 1 ζ (o SADF-1 ζ , de l'anglès *stromal cell-derived factor 1 ζ*) i l'Efrina B2. La SADF-1 ζ s'expressa únicament a la membrana pial, i per la seva banda el seu receptor CXCR4 s'expressa en els precursors granulars que migren tangencialment des del llavi ròmbic (Zou *et al.*, 1998). La funció d'aquesta parella de proteïnes és retenir els precursors i les cèl·lules granulars postmitòtiques a la EGL, i per una altra banda generar un factor de quimioatracció dels precursors granulars del llavi ròmbic (Klein *et al.*, 2001). Contradictòriament, les cèl·lules granulars comencen a migrar en direcció a la IGL quan encara hi ha expressió de CXCR4 a l'EGL. Això s'explica perquè a partir de P3 s'expressa l'Efrina-B2 i el seu receptor EphB2, que en la seva forma soluble, induïda per la senyal d'Efrina-B2, inhibeix l'efecte quimioatractiu del SADF-1 ζ (Lu *et al.*, 2001). Altres factors interessants a anomenar són l'Astrotactina 1 (Adams *et al.*, 2002; Fishell and Hatten, 1991), la Tenascina (Joester and Faissner, 1999) i el gangliòcid 9-O-acetil GD3 (Santiago *et al.*, 2004), que participen en el contacte entre la glia radial i les cèl·lules granulars; també és interessant la quinasa dependent de ciclina 5, o Cdk5, que s'ha demostrat que participa en el canvi de migració de la ML a la IGL. L'absència d'aquesta proteïna al cerebel reté les cèl·lules granulars a la ML, privant-les de seguir endavant en la seva migració (Ohshima *et al.*, 1999).

Per últim comentar l'efecte de la Somatostatina sobre la migració granular. Aquest neuropèptid, amb dos formes actives al cerebel: somatostatina-14 i -18 (SST-14 i SST-18), s'uneixen als cinc tipus de receptors fins ara clonats, SSTR1-5, desencadenant l'activació de missatgers secundaris, canals de Ca²⁺ i de K⁺, fosfolipasa C i A2, i MAP quinases, entre d'altres (Komuro and Yacubova, 2003). Els 5 tipus de receptors s'expressen en les cèl·lules granulars del cerebel i per la seva banda la Somatostatina s'expressa al llarg de la ruta de migració granular; les cèl·lules de Purkinje, les cèl·lules de Golgi i les fibres trepadores expressen la SST-14, en canvi la SST-28 es expressada per les cèl·lules de Golgi i per les terminals de les fibres molsoses (Naus, 1990; Villar *et al.*, 1989). L'acció de Somatostatina sobre les cèl·lules granulars és dependent de capa; quan aquestes es troben a l'EGL la Somatostatina indueix increment en el moviment de les neurones, quan aquestes es troben a la ML indueix un lleuger desaccelerament de les cèl·lules i finalment a la IGL indueix una forta desacceleració (Yacubova and Komuro, 2002). L'efecte de la

Somatostatina es creu que es deu al control per part del seu receptor dels nivells de la $[Ca^{2+}]_i$.

Introducció

Capítol 3: La Reelina i la seva funció al Sistema Nerviós Central

3. La Reelina i la seva funció al SNC

Els estudis d'animals amb comportament o característiques fenotípiques no normals van ser una de les primeres aproximacions en l'estudi del SNC. Amb el temps es va veure que aquests animals podrien servir per l'estudi del desenvolupament normal, i a partir del descobriment de les Lleis d'Hereditat de Mendel es van poder seguir trets característics dels animals en la seva descendència. El primer resultat d'aquests tipus d'estudis es va produir l'any 1924 on es va reportar la descendència del fenotip *rodless*, que només anys endavant, l'any 1993, es va poder associar a la mutació del gen que codificava per la subunitat η de la fosfodiesterasa cGMP.

En aquest marc, l'any 1951 al *Institute of Animals Genetics* d'Escòcia, Falconer va descriure una soca de ratolins, amb una mutació espontània que va anomenar *reeler*. Juntament amb la soca *trembler*, va descriure que aquestes dues soques presentaven alteracions en els processos de locomoció (Falconer, 1951). Els primers estudis de l'animal *reeler* van demostrar que aquell era l'únic animal conegut fins a la data que presentava malformacions al SNC. Això li va reportar gran interès a la comunitat científica, i aquest augmentà quan el 1995 es va aconseguir clonar el gen afectat que es va anomenar *reelina* (o *ReIn*, en anglès *reelin*) (D'Arcangelo *et al.*, 1995).

A partir del descobriment del gen de la Reelina, s'han trobat nous al·lels *reeler* amb les mateixes característiques fenotípiques que l'original, a més s'ha relacionat les mutacions en la *reelina* com la causant, en humans, de la lissencefàlia autosòmica recessiva, o de tipus Norman-Roberts (D'Arcangelo and Curran, 1998; Hong *et al.*, 2000). Al llarg de l'estudi de la Reelina s'han trobat, o s'han dissenyat, en models murins, una sèrie d'animals mutants amb característiques fenotípiques indistingibles de l'animal *reeler* o en d'altres en casos amb característiques similars, cosa que ha permès avançar en el coneixement de la Reelina i de la seva cascada de senyalització, que comentarem amb detall a continuació.

3.1 Reelina: gen i proteïna:

3.1.1 *reelina*

El gen *reelina* té una mida d'aproximadament 450 kilobases (kb) i es localitza al cromosoma 5 de ratolí i en humans al 7q22 (Bar *et al.*, 1995; DeSilva *et al.*, 1997; Royaux *et al.*, 1997). El gen *reelina* està format per 65 exons, 51 dels quals

codifiquen per vuit dominis repetits, que analitzarem més endavant quan definim les característiques de la proteïna. Una característica del gen present tant en ratolins com en humans, i probablement en totes les espècies, és que la *reelina* conté introns molt grans, entre els quals destaquen el primer, el segon i el tercer de 57, 59 i 54 kb respectivament, i d'altres compresos entre 10-20 kb (Tissir and Goffinet, 2003). S'hipotetitza que els introns contenen elements regulador, tals com *enhancers* o elements silenciadors que controlen la regulació de l'expressió gènica. Aquesta afirmació s'enforteix si tenim en compte que d'altres estudis no han trobat cap seqüència reguladora coneguda en posicions 5' del gen. El promotor de la *reelina* es caracteritza per ser una seqüència rica en CGs (citosina-guanina) i per no presentar cap caixa TATA (seqüència consens present en diferents promotors gènics eucariotes que serveixen per indicar l'inici de la transcripció). Per la seva banda el promotor del gen *reelina* té una activitat força gran dins de sistemes *reporter*, encara que no explica completament la fina regulació que es veu *in vivo* (Royaux *et al.*, 1997).

La mida de l'ARN missatger (o mRNA) de la Reelina és d'aproximadament 12 kb, i s'ha trobat almenys 2 *splicings* alternatius: un micro-exó de 6 nucleòtids (exó 64) que codifica pels aminoàcids Val-Ser i que es troba present en cèl·lules productores de la Reelina d'origen neuronal, en canvi es troba absent en cèl·lules productores de la Reelina d'origen no neuronal; el segon es troba present en l'exó 63 que conté una senyal de poliadenilació alternatiu juntament amb diversos codons d'stop, cosa que permet generar un mRNA que només conté els exons del 1 al 63, eliminant el 64 i el 65 (Royaux *et al.*, 1997).

Com hem comentat els animals *reeler* són aquells que presenten alteracions en el gen *reelina* i aquestes alteracions poden ser diverses. Per exemple en les soques *reeler*, *rl* i *rl^{tg}*, no s'ha trobat mRNA (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Miao *et al.*, 1994). El defecte en la soca *rl* es troba en una delecció de 150 kb del gen *reelina* i en la soca *rl^{tg}* trobem insertat un transgen que altera l'expressió gènica (Bar *et al.*, 1995; D'Arcangelo *et al.*, 1995). En canvi en la soca *rl^{orl}* només existeix una petita delecció d'uns 220 parells de bases (o pb), produït per la transposició de l'element L1, afectant la seqüència codificant del motiu similar a EGF del vuitè domini repetit de la Reelina (Takahara *et al.*, 1996). Aquesta delecció permet que es pugui transcriure el gen i detectar l'mRNA, però per contra queda afectada la via de secreció de la proteïna acumulant-se intracel·lularment i produint les mateixes malformacions que

en els altres dos casos (Curran *et al.*, 1995; de Bergeyck *et al.*, 1997; Hirotsune *et al.*, 1995).

3.1.2 Reelina

El producte gènic de la *reelina* és una proteïna secretable molt gran formada per 3461aa (aminoàcids) i d'un pes teòric de 387 kDa (kiloDaltons) (Figura 26).

L'estructura de la proteïna començant per la regió amino-terminal (N-term), està formada per un pèptid senyal seguit d'una regió amb homologia a F-espondina, una regió sense homologia coneguda i després 8 dominis repetits d'uns 350 aa cadascun. Aquests dominis

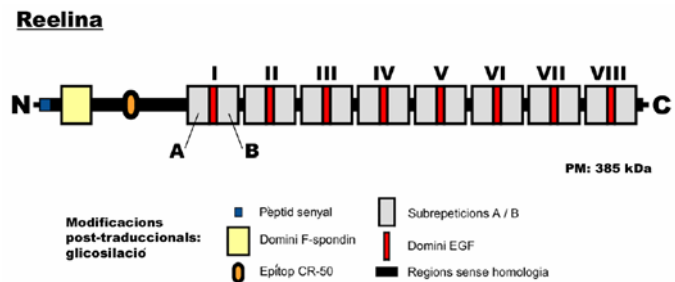


Figura 26 L'estructura de la proteïna Reelina. A l'extrem N-terminal (N) conté un pèptid senyal per a la seva secreció, seguit d'un domini amb homologia a la proteïna F-espondina. Cada un dels vuit dominis repetits de la Reelina (I-VIII) té dues subrepeticions homòlogues (A i B) separades per una seqüència amb homologia a EGF. Un domini sense homologia a d'altres proteïnes precedeix les repeticions de la Reelina i conté l'epítot CR-50; els anticossos anti-CR-50 bloquegen la funció de la Reelina.

estran formats per 2 subrepeticions, anomenades A i B, amb poca homologia entre elles, que flanquegen un motiu amb homologia a EGF present al centre del domini. Finalment la proteïna acaba amb una seqüència de 33 aa, formada per aa de càrrega positiva, amb un paper important en la seva secreció (D'Arcangelo *et al.*, 1995; D'Arcangelo *et al.*, 1997).

Com acabem de comentar el pes teòric de la Reelina és d'uns 387 kDa, però s'ha observat per experiments d'electroforesi en gels d'acrilamida, que el pes real es troba al voltant de 420 kDa . Aquesta diferència es creu que es deguda a les possibles glicosilacions en la seva part més N-terminal (D'Arcangelo *et al.*, 1997).

Per l'estudi de la Reelina s'han desenvolupat diversos anticossos, tant policlonals com monoclonals, dirigits a diverses parts de la Reelina (de Bergeyck *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1995). Els primers estudis en aquesta direcció es van desenvolupar, prèviament al clonatge de la *reelina*, immunitzant animals *reeler* amb lisats de cervell d'animals normals (o wt, de l'anglès *wild-type*), amb aquesta aproximació es va aconseguir desenvolupar un anticòs anomenat CR-50 (Figura 26) (Ogawa *et al.*, 1995). El primer estudi amb aquest anticòs va permetre localitzar l'expressió de la Reelina en el cervell murí, però sobretot va permetre demostrar que el CR-50 bloquejava l'activitat del seu epítot (Ogawa *et al.*, 1995). A partir d'aquell

moment l'anticòs CR-50 va ser, i ha estat, utilitzat àmpliament per diversos investigadors per tal de bloquejar l'activitat de la proteïna Reelina (Kubo *et al.*, 2002; Miyata *et al.*, 1997; Tissir and Goffinet, 2003; Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000).

El següent pas en l'estudi de la relació Reelina/CR-50 va ser descobrir els mecanismes mitjançant els quals l'anticòs bloquejava els efectes de la proteïna. La primera cosa que es va localitzar va ser l'epítot del CR-50, que es va situar entre els aa 251 i 407, just aquella seqüència proteica que no presentava homologia coneguda amb cap altre proteïna (D'Arcangelo *et al.*, 1997). Més endavant es va demostrar que la proteïna Reelina completa podia homodimeritzar, i fragments petits de la zona N-terminal de Reelina que continguessin la regió epítot del CR-50 podien formar complexos de fins a 40 membres (Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000). Singularment, el tractament amb l'anticòs CR-50 inhibia la formació d'aquest complexos (Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000). Un altre estudi van suggerir que la Reelina completa homodimeritzava mitjançant ponts di-sulfur en la zona N-term que podien ser inhibits amb el tractament de CR-50, i que només aquesta estructura dimèrica era l'única funcionalment activa de la proteïna Reelina (Kubo *et al.*, 2002).

Altres anticossos es van produir per l'estudi de la Reelina (de Bergeyck *et al.*, 1997), aquests van servir per descobrir que la proteïna Reelina es proteolitzava *in vivo* per dos punts, el primer situat entre els dominis repetits 2 i 3, i el segon entre els dominis repetits 6 i 7 (Figura 27) (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). La Reelina completa (no proteolitzada, o *full-length*, de 420 kDa) gairebé no es detecta *in vivo*, el que si es detecta són els fragments N-terminal de 180 kDa i C-terminal de 100 (de Bergeyck *et al.*, 1997).

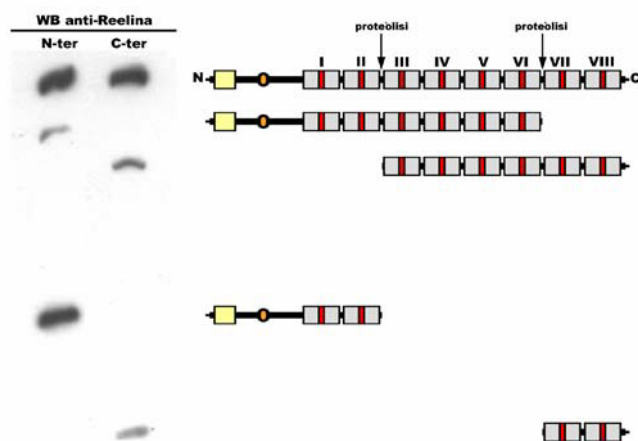


Figura 27 *Proteòlisi de la Reelina.*

La forma *full-length* (dalt) presenta dos llocs de proteòlisi situats en les zones d'unió entre els dominis repetits II-III i VI-VII. S'originen diferents fragments proteolítics que poden ser reconeguts per western-blot amb anticossos dirigits contra diferents regions de la proteïna (esquerra; a la dreta l'esquematzació dels fragments detectats). Anticossos anti-N-ter (G10); anticossos anti-C-ter (14 i 12).

Adaptat de Jossin i col·laboradors, 2003.

Qui proteolitza la Reelina? aquesta ha estat una pregunta difícil de resoldre i malgrat que fins al moment existeixen dues hipòtesis, cap de les dues està plenament demostrada. En primer lloc, es va apuntar la possibilitat que la proteòlisi es donés de forma posterior al pas de la proteïna pel reticle endoplasmàtic o en una localització extracel·lular, i produïda per una metaloproteasa, ja que inhibidors d'aquests enzims eren els únics que mantenien la Reelina intacta (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). La segona hipòtesi suggeria que fos la mateixa Reelina que per un procés d'auto-proteòlisi es tallés a si mateixa, amb la característica que ella mateixa actués com una serina-proteasa (Quattrocchi *et al.*, 2002). Aquestes dues hipòtesis, però, han quedat pendents de confirmació

La Reelina és una proteïna que es secreta a l'espai extracel·lular i mitjançant estudis de microscopia s'ha pogut determinar que la secreció es pot produir a través dels axons, amb la participació d'una part del reticle endoplasmàtic rugós especialitzat en el transport d'aquesta proteïna fins als terminals axònics de les cèl·lules productores, com succeeix en el cas de les neurones de Cajal-Retzius o en altres sistemes de llarg recorregut com podrien ser el tracte olfatiu lateral o la connexió entorinohipocampal (o via perforant) (Derer *et al.*, 2001; Martinez-Cerdeno *et al.*, 2003).

3.1.3 El patró d'expressió de la *reelina*:

El patró d'expressió de la *reelina* en el SNC ha estat analitzat i caracteritzat amb detall, encara que no és l'únic teixit on aquest gen s'expressa (Alcantara *et al.*, 1998; Schiffmann *et al.*, 1997). S'han descrit nivells d'expressió baixos en diversos òrgans, arribant a generar certa controvèrsia ja que no sempre ha estat possible detectar-hi la presència efectiva de la proteïna corresponent (Ikeda and Terashima, 1997). Únicament en sang, fetge, glàndules adrenals i glàndules pituitàries s'ha detectat la proteïna Reelina en quantitats considerables. Els nivells de proteïna en aquests teixits concorden amb la dosi gènica; així, en els animals *reeler* heterozigots (que només tenen una còpia funcional de *reelina*) s'expressa menys proteïna que en els animals normals (Smalheiser *et al.*, 2000). Els animals *reeler* heterozigots, amb la consegüent reducció d'expressió de proteïna, s'han utilitzat com possibles models d'esquizofrènia, i de fet, els pacients afectats per aquesta malaltia hi comparteixen diverses característiques, entre les quals cal destacar la disminució de la quantitat de

Reelina en sang i en cervell (D'Arcangelo, 2006; Fatemi *et al.*, 2001; Impagnatiello *et al.*, 1998; Tuetting *et al.*, 1999).

En sang es detecten tant la forma completa de la proteïna Reelina com els seus productes de proteòlisi. La secreció de la Reelina en sang podria tenir diversos orígens ja que tant les glàndules pituïtàries, com les glàndules adrenals, com el fetge n'expressen. Però l'extirpació quirúrgica de les citades glàndules no altera els nivells sanguinis de la proteïna, indicant que la part principal de la Reelina plasmàtica possiblement procedeix del fetge, on, a més, la Reelina expressada no s'acumula (Ikeda and Terashima, 1997; Smalheiser *et al.*, 2000).

3.1.3.1 Expressió a cervell anterior

En aquesta regió, l'expressió de la Reelina s'inicia a E10 i és especialment intensa en les cèl·lules de CR, que també expressen Calretinina i p73 (Abraham and Meyer, 2003; Alcantara *et al.*, 1998). Aquestes neurones estan situades a la part més externa de la preplaca, regió que posteriorment esdevindrà la zona marginal. L'expressió en les cèl·lules de CR es manté intensa fins que el desenvolupament de l'escorça cerebral i de l'hipocamp s'ha completat. A partir de P5, les neurones de CR comencen a desaparèixer, i coincidint amb aquest fet, l'expressió de la Reelina disminueix i es concentra en un tipus cel·lular diferent: les neurones GABAèrgiques Calretinina negatives (Alcantara *et al.*, 1998).

A l'escorça, a partir de P21 ja no trobem cap cèl·lula doblement marcada per Calretinina i Reelina. En canvi a l'hipocamp sobreviuen algunes neurones de CR fins a l'edat adulta, mantenint l'expressió de la Reelina (Alcantara *et al.*, 1998).

En adult, a banda de les neurones GABAèrgiques de la zona marginal, també s'ha descrit expressió de la Reelina a les altres capes de l'escorça i en hipocamp. La regió amb un major nombre de cèl·lules marcades és la capa V de l'escorça; amb l'expressió sempre limitada a neurones GABAèrgiques arribades per processos de migració tangencial (Alcantara *et al.*, 1998).

Les altres regions del cervell anterior on s'expressa la *reelina* són l'hipotàlem, el caudat-putàmen, el sèptum medial o el bulb olfatori. En el bulb olfatori, l'expressió de la Reelina és prominent a les neurones mitrals a partir d'E12 i fins a l'edat adulta, si bé els nivells decauen una mica a partir de la primera setmana postnatal. La Reelina també es detecta en cèl·lules tufted i en un subtipus de neurones periglomerulars de la *lamina granularis externa* del bulb olfatori

(Alcantara *et al.*, 1998). Estudis recents indiquen que l'expressió en el bulb olfatori podria estar controlada per l'entrada d'informació olfactiva. Així, una lesió de l'epiteli olfatori comporta simultàniament una pèrdua de l'expressió de la Reelina en tots els tipus cel·lulars del bulb; coincidint amb la regeneració del nervi olfatori a partir de 25 dies després de la lesió, es recupera l'expressió de la Reelina en cèl·lules mitrals (Okuyama-Yamamoto *et al.*, 2005).

3.1.3.2 Expressió en cerebel

En cerebel l'expressió de la *reelina* durant el desenvolupament es produeix en dos localitzacions independents i es produeix per tipus cel·lulars diferents (Miyata *et al.*, 1996). L'expressió de la proteïna en ratolins s'intueix al voltant d'E12-13 amb nivells clarament distingibles a partir d'E13-14. L'expressió es troba localitzada en la zona nuclear transitòria (o NTZ, de l'anglès nuclear transitory zone), que es troba al llarg de la superfície dorsal del cerebel, i les cèl·lules que la formen són les cèl·lules que acabaran formant els nuclis profunds. L'expressió d'aquestes cèl·lules és elevada i es mantindrà així fins a la primera setmana post-natal. El segon punt de producció de la Reelina seran les cèl·lules granulars del cerebel, i ho faran des de la seva aparició al cerebel, E14, fins la tercera setmana postnatal. Aquestes, com ja hem comentat, migren del llavi rombic i comencen a formar la EGL a partir de E14, en aquest moment ja expressen Reelina. Aquesta expressió continuarà fins a la formació més o menys completa de la EGL, als voltants de E18, amb la característica que a mesura que la EGL creix i les cèl·lules granulars comencen a migrar l'expressió s'anirà concretant a la zona de la EGL premigratòria, just per sobre de la PCL i la ML. L'expressió a la EGL seguirà produint-se fins a la segona setmana postnatal on la EGL haurà desaparegut per la migració de les cèl·lules granulars cap a la IGL. Les cèl·lules granulars de la IGL també expressaran Reelina just des de l'inici de la seva formació, E18, i seguiran amb nivells moderats fins a la tercera setmana postnatal, quan l'estructura completa del cerebel està perfectament acabada i no es produeix cap més procés de migració (Miyata *et al.*, 1996).

3.2 Senyalització de la Reelina

L'estudi de la senyalització de Reelina es pot, pràcticament, explicar a partir dels animals mutants que presenten fenotips del SNC indistingibles als *reeler* o d'aquells amb característiques que recorden al *reeler* (o *reeler-like* en anglès). Els

primers que van aparèixer en aquest sentit van ser els animals *scrambler* i *yotari*, els quals eren fenotípicament indistingibles dels *reeler*. Tots dos presentaven mutacions en el gen *mdab1*, un gen murí relacionat b el gen disabled (o *dab*) de *D. Melanogaster* (Howell, Hawkes *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 1997). El segon en aparèixer va ser l'animal doble-mutant pels receptors de lipoproteïnes: el receptor de lipoproteïnes de molt baixa densitat (o VLDLR, de l'anglès very low density lipoprotein receptor) i el receptor tipus 2 de la lipoproteïna ApoE (o ApoER2, de l'anglès *apolipoprotein E receptor 2*) que anomenarem com VLDLR^{-/-} ; ApoER2^{-/-} (Trommsdorff *et al.*, 1999). Dins dels del grup d'animals fenotípicament indistingibles hem d'incloure els animals doble-deficients pels gens de la família de les Src quinases (o SFKs, de l'anglès Src family kinases) Src i Fyn (Kuo *et al.*, 2005).

Als següents apartats comentarem detalladament el paper de cadascuna d'aquestes proteïnes, i d'altres, que participen en la cascada de senyalització de la Reelina, però en aquest moment voldríem comentar breument les ja esmentades com a fil conductor de la resta de la via de senyalització activada per la Reelina. Els dos receptors VLDLR i ApoER2, són els principals encarregats d'unir la proteïna Reelina a nivell extracel·lular i també són els desencadenants de la seva senyalització principal. Aquesta senyalització inclou la unió per part dels receptors de la proteïna adaptadora mDab1 i de la seva fosforilació mitjançant els dos membres de les SFKs, Fyn i Src (Tissir and Goffinet, 2003). La demostració d'aquest passos per diferents laboratoris ha permès concloure que la via d'activació de la Reelina és un procés que es dona de forma lineal i seqüencial en com a mínim els seu primers passos (Arnaud, Ballif, Forster *et al.*, 2003; Bock and Herz, 2003; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Hiesberger *et al.*, 1999; Trommsdorff *et al.*, 1999).

Aquesta cascada de senyalització és la base en que es fonamenten els estudis fets en la present tesi, i els seus resultats i les aportacions al model preestablert seran discutits més endavant.

3.2.1 Els receptors de Reelina

El gen *Vldlr* es localitza al cromosoma murí 19 i en l'humà al 9p24, per la seva banda l'*apoER2*, o també anomenat *Lrp8*, es localitza cromosoma murí 4 i en humans al cromosoma 1q34. Tant els gens com les proteïnes del VLDLR i del ApoER2 són molt similars al receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (o LPLR, de

l'anglès low density lipoprotein receptor), encara que l'homologia entre els dos primers és més gran. L'extensa presència tant d'ApoER2 com de VLDLR en el SNC van fer pensar que la seva funció primària no consistia en regular l'homeostasi del metabolisme lipoproteic. A més tampoc es van veuen alteracions en aquest sistema quan un dels dos gens que codifiquen per aquestes proteïnes es veia alterat. En canvi si que es van veure defectes greus, similars als descrits en els animals *reeler* i *reeler-like*, quan van ser alterats els dos gens a la vegada (Frykman *et al.*, 1995; Trommsdorff *et al.*, 1999). La mancança individual de qualsevol dels dos receptors no afectava severament el fenotip dels animals, si més no subtils deficiències en migració, segurament a causa d'efectes compensadors entre ells, per tant ens referirem als dos receptors com a ApoER2 (Trommsdorff *et al.*, 1999). Una característica de tots els membres de la família de receptors LDL (on estan inclosos VLDLR i ApoER2) és el motiu NPXY (codi pels aa Arginina-Prolina-aa-Tyrosina). Aquest motiu interacciona amb un gran número de proteïnes citoplasmàtiques diferents (Schneider and Nimpf, 2003). Moltes d'aquestes proteïnes interaccionen amb els receptors per un domini d'unió a fosfotirosines (o PTB, de l'anglès phosphotyrosine binding domain) situat en una posició N-term dins de la proteïna, que reconeix específicament les seqüències aminoacídiques que contenen el motiu NPXY (Uhlik *et al.*, 2005).

Un d'aquest adaptadors intracel·lulars és l'mDab1. Com hem comentat, aquesta proteïna es fosforila per la unió de la Reelina al receptor, a la vegada que ella mateixa s'uneix als receptors pel motiu citoplasmàtic. La unió d'mDab1 al receptor és independent de fosforilació (Howell *et al.*, 1999).

El lloc d'unió de la Reelina a l'ApoER2 es situa entre els dominis "complement-type repeat" 1 i 3 del receptor que se superposa al lloc d'unió d'una xaperona universal de la família dels receptors LDL, anomenada proteïna associada a receptor (o RAP, de l'anglès receptor-associated protein) (Andersen *et al.*, 2003). La proteïna RAP s'ha utilitzat freqüentment com a bloquejant de la senyal de la Reelina, produïda com a proteïna recombinant (Hiesberger *et al.*, 1999). S'ha pogut observar l'oligomerització de receptors en resposta a l'acció de la Reelina, i més endavant s'ha demostrat que és necessari que aquests dimeritzin o oligomeritzin per iniciar la cascada de senyalització (Strasser *et al.*, 2004).

Ja hem comentat que la Reelina pateix un procés de proteòlisi, i també hem comentat que necessita del seu domini N-term per desenvolupar la seva funció

(D'Arcangelo *et al.*, 1997; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999). Un dels possibles resultats de la proteolització, després de ser tallada pels dos llocs de tall possible, de la Reelina és l'obtenció d'un fragment central format pels dominis repetits 3-6 (Jossin *et al.*, 2004). Contradictòriament a allò que es pensava, s'ha demostrat que el fragment mínim necessari de la Reelina per unir-se als receptors d'ApoER2 i desencadenar fosforilació d'mDab1, és el fragment central amb independència de la presència del fragment N-terminal que recull l'epítot de CR-50. A més a més, s'ha demostrat que afegint aquest fragment central en experiments en cultiu es pot rescatar parcialment les malformacions corticals dels animals *reeler*. En canvi experiments on s'utilitzen anticossos monoclonals divalents amb la propietat de fer dimeritzar els receptors d'ApoER2 no rescaten el fenotip *reeler* malgrat que indueixen la fosforilació en mDab1 (Jossin *et al.*, 2004). Aquest resultat fan sospitar que han d'existir cascades de senyalització activades per Reelina paral·leles a les dirigides per ApoER2/mDab1.

En aquest sentit és important comentar el paper del complex $\zeta 3\eta 1$ Integrina com a possible receptor de la Reelina (Dulabon *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2005). L'absència d' $\zeta 3$ causa una baixada dels nivells d'mDab1, encara que la fosforilació en resposta a la Reelina no queda afectada. Tampoc s'observen en animals deficientes per la Integrina $\zeta 3$ les alteracions característiques dels *reeler* (Schmid *et al.*, 2004). El lloc d'unió de la Reelina per la Integrina $\zeta 3\eta 1$ està localitzat a la part N-terminal de la Reelina (Schmid *et al.*, 2004). Fins al moment existeixen pocs articles que relacionin funcionalment el complex $\zeta 3\eta 1$ i la via de senyalització de la Reelina (Dulabon *et al.*, 2000; Sanada *et al.*, 2004). En aquest article es rescata l'anòmala interacció entre les cèl·lules de glia radial i les neurones migrants de l'escorça que es produeix en animals *scrambler*, mitjançant la utilització d'un anticòs bloquejant de funció dirigit contra la Integrina $\zeta 3$ (Sanada *et al.*, 2004).

Un resultat aparegut recentment en la bibliografia ha permès confirmar l'existència de mecanismes activats per Reelina independent dels receptors ApoER2 i VLDLR (Cariboni *et al.*, 2005). Aquest resultat comentats amb anterioritat quan fèiem referència a les cèl·lules GnRH, obre la porta a la cerca de nous receptors que participin en cascades de senyalització activades per la Reelina.

3.2.2 La proteïna adaptadora mDab1

La proteïna mDab1 va ser descoberta l'any 1997, com a una proteïna adaptadora del SNC i de les cèl·lules hematopoiètiques. Es va demostrar que durant el desenvolupament es fosforilava i que aquesta fosforilació disminuïa en edats adultes. Inicialment, va ser bioquímicament caracteritzada demostrant que podia unir-se al domini SH2 de les proteïnes Src, Fyn i Abl, que pertanyen a les SFKs; i també es va veure que es podia unir gràcies a un domini PTB a proteïnes tirosina fosforilades de 200, 120 i 40 kDa (Howell, Gertler *et al.*, 1997). Per la seva banda el mutant *scrambler* va ser descobert un any abans pels Laboratoris Jackson (Sweet *et al.*, 1996), però no va ser fins que es van relacionar els fenotips dels animals *reeler* i *scrambler*, i les proteïnes Reelina i mDab1 que va adquirir gran rellevància (Goldowitz *et al.*, 1997; Howell, Hawkes *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 1997).

3.2.2.1 mDab1: gen i proteïna

El gen *mdab1* es localitza al cromosoma murí 4 i al cromosoma humà 1p32-p31 (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998) i té una organització força complexa en tots dos organismes (Bar *et al.*, 2003). La seqüència codificant es troba repartida en més de 300 kb d'ADN, que codifica per una proteïna de 555 aa, repartida en 15 exons. La proteïna comença (zona N-terminal) amb un domini PTB d'uns 180 aa, seguit d'una regió que conté diversos residus Tirosina (o Tyr o Y, de l'anglès *tyrosine*) dels quals el Y198 i

el Y220 es fosforilen en resposta a Reelina (Figura 28) (Keshvara *et al.*, 2001). Finalment la proteïna acaba amb una regió C-terminal de 310 aa amb funcions desconegudes, encara que s'han trobat seqüències consens Serina/Treonina que poden ser fosforilables per la quinasa dependent de ciclina 5/p35 (o Cdk5, de l'anglès

cyclin-dependent kinase 5) (Figura 28, esquema superior) (Keshvara *et al.*, 2002).

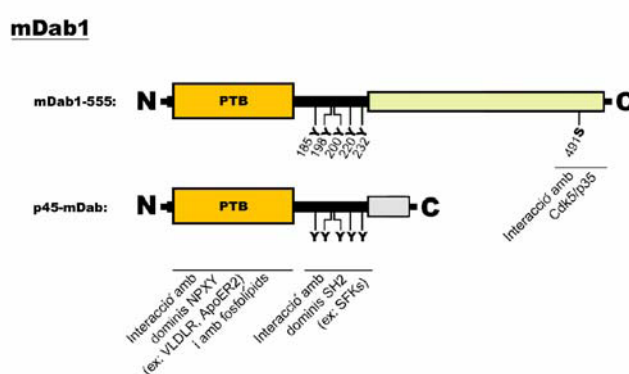


Figura 28 L'estructura de la proteïna mDab1. La forma *full-length* de la proteïna mDab1 conté 555 aminoàcids (mDab1-555). A l'extrem N-terminal (N) l'mDab1 conté el domini PTB, seguit del domini ric en tirosines (Y) i del domini C-terminal (C) que conté Serines (S) fosforilables. La forma curta de l'mDab1 (p45-mDab1) està truncada després del domini ric en tirosines i presenta un domini C-terminal (C) alternatiu. La interacció de cada un dels dominis amb diversos factors es troba indicat a la figura.

Es coneix l'existència dins del gen *mdab1* de promotors, llocs de poliadenilació i splicings alternatius capaços de generar diverses isoformes de la proteïna (Bar *et al.*, 2003). Una complexa regió no traduïda (o UTR, de l'anglès *untranslated region*) formada per combinacions de 10 exons, és característica d'expressió neuronal i a més es regula de forma dependent del desenvolupament (Bar *et al.*, 2003). Dins de les possibles isoformes d'*mdab1* existeix una expressada únicament en teixits no-neuronals i en les cèl·lules mare de la zona ventricular que conté dos exons que codifiquen per parts internes de la proteïna anomenats 555* (Howell, Gertler *et al.*, 1997). Malgrat el coneixement del sistema de regulació del gen *mdab1* la funció de tota aquesta regulació encara està per descobrir.

Com hem comentat amb anterioritat la fosforilació de la proteïna mDab1 és essencial per la senyalització de la Reelina. Això es va comprovar amb la generació d'un animal knock-in, on s'havien substituït les cinc tirosines de la regió central d'mDab1 per fenilalanines (Howell *et al.*, 2000). Aquest animal presentava un fenotip *reeler*-like amb les mateixes malformacions que patien els animals *reeler* o els *scrambler*. En un estudi similar es va voler veure si es podia rescatar el fenotip wt en un animal *scrambler*, introduint al locus de l'*mdab1* d'un animal mutant un forma truncada de la proteïna mDab1 que només contenia el domini PTB i la regió amb les Tyr fosforilables, i que per tant no expressaria la regió C-terminal de funció desconeguda (Figura 28, esquema inferior). En aquests animals es va poder veure un rescat important del fenotip, encara que es van observar haploinsuficiències que afectaven a l'escorça i a l'hipocamp, indicant que la fosforilació dels residus Tyr de l'mDab1 és un procés necessari però no suficient per la correcta funció de la proteïna (Herrick and Cooper, 2002).

3.2.2.2 Localització intracel·lular d'mDab1

Com hem comentat quan ens referíem al receptors ApoER2, la proteïna mDab1 es pot unir a les seqüències NPXY mitjançant el seu domini PTB (Howell *et al.*, 1999), i malgrat que els dominis PTB s'uneixen preferencialment a les seqüències fosforilades en tirosina, en el cas del domini PTB d'mDab1 no és necessària la fosforilació del receptor. A la vegada altres estudis van demostrar que l'mDab1 es localitzava a nivell membranós independentment de la senyal de Reelina i que això ho feia per la unió del domini PTB a fosfolípids de membrana com el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (o PI-4,5P2) (Howell *et al.*, 1999). També es va

comprovar que el domini PTB podia unir simultàniament i no cooperativament el receptor ApoER2 i el PI-4,5P2 gràcies a que el lloc d'unió a l'ApoER2 i al PI-4,5P2 es troben en llocs oposats del PTB (Stolt *et al.*, 2003).

Estudis per comprovar la importància funcional d'aquesta unió a fosfolípids de membrana van demostrar que l'mDab1 necessitava estar unida tant al receptor com al fosfolípid per fosforilar-se dependentment de Reelina (Stolt *et al.*, 2005). A favor d'aquest model van aparèixer resultats que demostraven que animals amb mutacions puntuals dins del PTB que inhibissin o disminuïssin de forma elevada la interacció mDab1/ApoER2 no generaven fenotip *reeler* (Herrick and Cooper, 2004). Juntament amb aquest resultat es va demostrar la localització d'ApoER2 en illes membranoses riques en colesterol i en fosfolípids, i com agents químics que alteraven la formació d'aquest illes inhibien la senyalització produïda per Reelina (Bock *et al.*, 2003). Amb tot aquests resultats s'ha proposat un model on mDab1 es concentra en dominis de la membrana plasmàtica rics en PI-4,5P2, que faciliten la subsegüent utilització per part dels receptors ApoER2 i de les quinases SFKs activades per la Reelina (Stolt *et al.*, 2005; Stolt *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2003).

3.2.2.3 mDab1: activació i degradació

Els receptors d'ApoER2 no tenen una activitat quinasa intrínseca i si tenim en compte que aquesta proteïna, mDab1, va ser originàriament relacionada amb les SFKs és lògic pensar que podrien ser aquestes les encarregades de fosforilar l'mDab1. Utilitzant abordatges tant genètics com farmacològics es va poder demostrar que l'encarregada de fosforilar l'mDab1 era la quinasa Fyn (Arnaud, Ballif, Forster *et al.*, 2003; Bock and Herz, 2003). Malgrat tot, l'animal deficient per Fyn només presentava subtils defectes en el posicionament de les neurones corticals de naixement més tardà i petits defectes en l'hipocamp, i en cap moment presentava les alteracions vistes en els animals *reeler* o en d'altres membres de la seva cascada de senyalització. Això podia ser explicat en part pels possibles processos de compensació desenvolupats per la proteïna Src (May *et al.*, 2005; Yuasa *et al.*, 2004). No ha estat fins un estudi recent on s'ha pogut generar un animal doble knock-out per les proteïnes Fyn i Src, on s'ha demostrat que la mutació d'ambdues proteïnes generaven una animal amb fenotip *reeler-like*, demostrant finalment sense cap dubte que aquestes proteïnes participen en la via de senyalització de la Reelina (Kuo *et al.*, 2005).

Una relació especial uneix la proteïna mDab1 amb les SFKs. Aquestes quinases no només fosforilen l'mDab1 sinó que l'mDab1 funciona com activador d'aquestes, i tot això amb la presència imprescindible d'un dels dos receptors de Reelina, ApoER2 o VLDLR (Bock and Herz, 2003).

L'observació que estímuls prolongats amb la Reelina indueixen una ubiquïtinització, endocitosi i la conseqüent degradació proteosomal de la proteïna mDab1 fosforilada, ofereix un mecanisme de regulació simple que limita la mútua activació d'mDab1 i de les SFKs. Aquest sistema de regulació evita la insensibilització de la via evitant la coactivació permanent de les dues proteïnes (Arnaud, Ballif and Cooper, 2003; Bock *et al.*, 2004). A més a més, si tractem un model de desenvolupament cortical *in vitro* amb dosis lleus de fàrmacs que inhibeixen el proteosoma, s'observa que el desenvolupament cortical normal no es produeix, implicant el proteosoma en el correcte desenvolupament cortical (Bock *et al.*, 2004). El proto-oncogen c-Cbl, que es troba fortament expressat en neurones postmitòtiques i que regula les cascades de senyalització cel·lular induint la degradació de les proteïnes tirosina quinases adequades, s'ha demostrat que ubiquïtinitza mDab1 per co-transfecció en la línia cel·lular HEK-293T (Suetsugu *et al.*, 2004), però encara no s'ha demostrat si aquesta E3 lligasa es la responsable del processament proteosomal de mDab1 *in vivo*.

3.2.2.4 Efectors de la cascada de senyalització Reelina/mDab1

Com hem comentat la fosforilació de la proteïna mDab1 és essencial en el mecanisme de transmissió de senyal generat per la Reelina (Howell *et al.*, 2000). Aquestes fosforilacions permeten la creació de nous llocs d'anclatge de proteïnes amb els dominis adequats. Un d'aquests dominis és el SH2, que justament és el domini que utilitzen les SFKs per interaccionar amb l'mDab1. En resposta a la Reelina, l'mDab1 es fosforila en tirosines en les posicions 198, 220 i 232 creant la seqüència consens perquè els dominis SH2 s'hi puguin unir (Howell *et al.*, 2000). Experiments de mutagènesi dirigida a la posició Y198 aboleix l'activació de les SFKs en cultius de retina transfectats (Katyal and Godbout, 2004).

3.2.2.4.1 PI3K/Akt1

De totes les possibles vies de senyalització activades per Reelina i en les que participa l'mDab1, la que fins al moment ha estat més estudiada és la que relaciona

l'mDab1 amb la proteïna quinasa fosfoinositol-3 quinasa (o PI3K, de l'anglès *phosphoinositol 3 kinase*) i més concretament amb el seu coactivador p85. Inicialment, es va observar que la Reelina estimulava la fosforilació de la proteïna quinasa B (o Akt1/PKB, de l'anglès *protein kinase B*), i que aquesta fosforilació es produïa per l'activació prèvia de PI3K (Beffert *et al.*, 2002). En aquests estudis també es va relacionar l'activació de Akt1 amb la inhibició de la proteïna glicogen sintasa quinasa beta (o Gsk3 η , de l'anglès *glycogen sintase kinase 3 beta*) i com a conseqüència d'aquesta inhibició es va observar que els nivells de fosforilació de la proteïna Tau, proteïna hiperfosforilada en la patologia d'Alzheimer, es veien reduïts (Beffert *et al.*, 2002). Quedava encara per solucionar de quina manera la Reelina podia activar la PI3K. Això va ser respost pel mateix laboratori demostrant que sota el tractament amb Reelina, la subunitat reguladora, p85 ζ , de la PI3K era segrestada per la proteïna mDab1; deixant lliure la part catalíticament activa de PI3K, la p110 ζ , que podia aleshores fosforilar Akt1 desencadenant la cascada de senyalització posterior. Més concretament els autors suggereixen que la unió entre l'mDab1 i la subunitat reguladora de PI3K es dona a nivell membranós, relocalitzant p85 ζ a la membrana, gràcies a la propietat que l'mDab1 es troba unit a fosfoinositols de manera constitutiva (Bock *et al.*, 2003). Aquesta unió es pot produir per part d'algun dels dominis SH2 de p85 ζ sobre la zona de tirosines fosforilades de l'mDab1. Encara podria existir una altra possibilitat d'interacció entre mDab1 i p85 ζ que demanaria la fosforilació del residu Y300 de mDab1. La fosforilació de Y300 habilitaria una seqüència consens per la unió de p85 ζ , però aquest mecanisme és menys probable pel fet que fins al moment no s'ha observat la fosforilació d'aquest residu (Beffert *et al.*, 2002; Keshvara *et al.*, 2001). Finalment comentar que la unió directa mDab1/p85 ζ no és una unió forta, cosa que suggereix la possibilitat d'un pont proteic entre totes dues o que les dues participin d'un complex multiproteic juntament amb SFKs i la resta de possibles efectors de mDab1 per a la senyalització induïda per Reelina (Ballif *et al.*, 2003).

3.2.2.4.2 Cdk5/p35/p39

Una proteïna que llargament s'ha relacionat amb la via de senyalització de la Reelina, és la proteïna Cdk5. Aquesta proteïna és una serina/treonina quinasa que està regulada específicament per dos coactivadors, el p35 i el p39, expressats

únicament al cervell (Tsai *et al.*, 1994). La primera relació d'aquesta proteïna amb la Reelina i la seva via de senyalització prové de l'estudi dels animals deficientes en *Cdk5* (Ohshima *et al.*, 1996). Aquest animals presentaven una migració neuronal errònia generant un fenotip que incloïa una CP invertida i el posicionament anòmal de neurones a l'hipocamp i al cerebel. Però a diferència del que succeïa en el cas dels

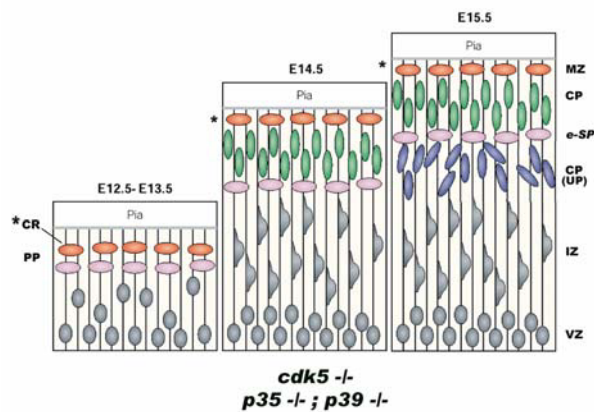


Figura 29 Esquematzació del desenvolupament embrionari cortical en animals *cdk5*^{-/-} i en *p35*^{-/-};*p39*^{-/-}. La primera onada de neuroblasts migrants generats a la zona ventricular s'inserta a la preplaca, separant-la en zona marginal i subplaca. Les següents onades de neurones de la placa cortical s'acumulen per sota de la subplaca seguint un patró invertit de fora cap a dins; la subplaca es localitza ectòpicament enmig de la placa cortical. **CR**, cèl·lules de Cajal-Retzius; **PP**, preplaca; **MZ**, zona marginal; **CP**, placa cortical; **e-SP**, subplaca ectòpica; **UP**, sotaplaca; **IZ**, zona intermèdia; **VZ**, zona ventricular; *, secreció de la Reelina (taronja).

animals *reeler* o *scrambler* els animals *Cdk5*^{-/-} presentaven un MZ normal (Figura 29). Com hem comentat en d'altres casos, la pèrdua d'un dels dos coactivadors de la Cdk5 no produïa deficiències similars a la pèrdua de la quinasa, molt probablement a causa de la funció compensatòria de l'altre membre, però l'eliminació tant de *p35* com de *p39* en el mateix animal produïa el mateix fenotip que la deficiència de *Cdk5*; confirmant que *p35* i *p39* eren els

únics activadors funcionals de Cdk5 al cervell (Figura 29) (Ko *et al.*, 2001). A més a més s'ha demostrat un efecte sinèrgic entre la via de la Reelina i la de Cdk5 en el control de la migració cel·lular mitjançant l'estudi d'animals obtinguts a partir del creuament de diferents soques existents deficientes per membres d'ambdues vies (Beffert *et al.*, 2004; Ohshima *et al.*, 2001).

Malgrat la possible relació entre Cdk5/*p35*/*p39* i Reelina/*mDab1* que es desprèn d'aquests estudis, la relació directe a nivell de proteïna que expliqui aquest efectes no s'ha trobat fins al moment. Fins fa molt poc se sabia que Cdk5 podia fosforilar tant *in vivo* com *in vitro* la proteïna *mDab1* a nivell de la serina 491, es creia també que aquesta fosforilació era independent de la Reelina i que la presència del fosfat, o la seva absència, no afectava ni a les propietats ni a l'activitat de *mDab1* sota la via desencadenada per l'acció de la Reelina (Beffert *et al.*, 2002; Beffert *et al.*, 2004; Keshvara *et al.*, 2002). Aquestes idees han quedat en entredit a partir d'uns resultats de recent aparició que demostren que la quinasa Cdk5 pot fosforilar l'*mDab1* en diverses posicions, no només en la S491, i que aquestes fosforilacions

poden d'alguna manera modular a la baixa els nivells de fosforilació en tirosines induïts per la Reelina (Ohshima *et al.*, 2006). Malgrat aquest estudi es pot seguir afirmant la Reelina no afecta l'activitat de la proteïna Cdk5 (Beffert *et al.*, 2004). Per tant la hipòtesi que suggeria que les dues vies participaven d'una forma paral·lela i sinèrgica en el desenvolupament del SNC, es veu reforçada amb aquest darrer resultat.

Recentment, s'ha trobat en Lis1 una nova proteïna que interacciona amb la forma fosforilada en tirosines d'mDab1 (Assadi *et al.*, 2003). El paper de Lis1 en la relació mDab1/Cdk5 pot ser de gran importància gràcies al fet que tant Lis1 com Cdk5 interaccionen amb la proteïna Nudel. Aquesta nova interacció per part de mDab1 permetria un punt de connexió més entre les vies de Reelina i Cdk5 (Beffert *et al.*, 2004).

3.2.2.4.3 Família de proteïnes APP

Per tal de buscar possibles proteïnes efectores d'mDab1 o proteïnes que simplement puguin interaccionar amb el seu domini PTB, diferents grups han fet aproximacions doble-híbrid a la caça d'aquestes proteïnes. Una de les famílies de proteïnes que s'han "caçat" en aquests casos ha estat la família de proteïnes precursors amiloidees (o APP, de l'anglès *amyloid precursor protein*), ara bé, que diferents membres en cada experiment (Homayouni *et al.*, 1999; Howell *et al.*, 1999; Trommsdorff *et al.*, 1998). La família de proteïnes APP és bàsicament coneguda per la participació d'un derivat dels seus components, el η -APP, en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer (o AD, de l'anglès *Alzheimer disease*). Els membres d'aquesta família de proteïnes de paper desconegut han estat implicats en diferenciació, adhesió, supervivència i en el control del desenvolupament neuronal (Howell *et al.*, 1999). Els primers experiments que van relacionar la proteïna APP i l'mDab1, buscaven possibles proteïnes que interaccionessin amb APP per la seva part citoplasmàtica, i l'mDab1 juntament amb la proteïna adaptadora FE65 van ser localitzades (Trommsdorff *et al.*, 1998). Per una altra banda, es va caracteritzar la ja comentada afinitat del domini PTB de mDab1 cap a seqüències NPXY no fosforilades com són les que presenten tots els membres de la família de les APP (Howell *et al.*, 1999). Dins de l'estudi de la interacció de les APP amb l'mDab1, s'ha descobert que l'mDab1 interacciona *in vivo* i *in vitro* amb totes les proteïnes de la família, però ho fa preferencialment amb un dels membres, la APLP-1 (o proteïna

similar a la precursora amiloidea). També s'ha demostrat que aquesta interacció produeix un augment de la fosforilació de l'mDab1 en serines en línies cel·lulars transfectades, encara que no se sap si això succeeix in vivo, ni la possible funció d'aquesta fosforilació (Homayouni *et al.*, 1999). Finalment, el treball més recent que relaciona Dab1 i la família de les APP està presentat per Pramatarova i col·laboradors (Pramatarova *et al.*, 2006). En aquest treball s'observa el rescat per sobreexpressió de Dab1 de deficiències migratòries en un model mutant de *D. Melanogaster* i com aquesta sobreexpressió de Dab1 intenta ser compensada per via de les APLP cel·lulars. Malgrat que aquest treball no demostra un interacció directe entre Dab1 i APP/APLP, si que demostra que la sobreexpressió de la proteïna APP humana en un model murí disminueix en un 30% els nivells de fosforilació en tirosines de Dab1 en resposta a la Reelina, suggerint que la relació entre Dab1 i les APP/APLP no és de crucial importància en la via de senyalització generada per la Reelina, però si que serviria com un pas de modulació fina de la mateixa (Pramatarova *et al.*, 2006).

3.2.2.4.4 Família d'adaptadors Crk/CrkL

Un altre grup de proteïnes que s'uneixen a l'mDab1 quan aquest està fosforilat són la família d'adaptadors Crk/CrkL. Aquesta família participa en la relocalització i activació de les proteïnes amb activitat GTPasa i dels factors intercanviadors de nucleòtids de guanina (o GEFs, de l'anglès *guanine nucleotid exchange factors*), modulant l'adhesió cel·lular i la migració (Feller, 2001). La unió de les proteïnes Crk a mDab1 necessita de la fosforilació de les Tyr220 i Tyr232, aquesta unió per la seva banda indueix la fosforilació de la proteïna GEF C3G i com a conseqüència l'activació de la GTPasa Rap1 (Ballif *et al.*, 2004). De forma sorprenent, s'ha observat que són les Tyr220 i Tyr232, i no la Tyr198, les necessàries pel rescat del fenotip *scrambler*.

En el mateix experiment on es va trobar la interacció d'mDab1 i les proteïnes de la família Crk/CrkL, també es van trobar altres proteïnes que interaccionaven específicament amb la forma fosforilada d'mDab1 entre les quals cal destacar Shp-1 i PKCv. Encara que la seva funció en relació a la via de Reelina no ha estat estudiada fins a l'actualitat podrien obrir un gran ventall de possibilitats per l'acció de la Reelina (Ballif *et al.*, 2004).

3.2.2.4.5 Nck η

Una altra proteïna que s'uneix a l'mDab dependent del seu estat de fosforilació és la proteïna Nck η , una altra proteïna adaptadora que participa en el remodelament del citoesquelet d'actina (Pramatarova *et al.*, 2003). Cultius neuronals estimulats amb la Reelina indueixen la relocalització de la proteïna Nck η des del soma fins a les extensions neuronals (Pramatarova *et al.*, 2003), que són les principals dianes d'actuació de la Reelina (Beffert *et al.*, 2002; Bock *et al.*, 2004).

3.2.2.4.6 Dab2IP

Finalment comentar breument el paper de Dab2IP un altre candidat a interaccionar amb l'mDab1 descrit per estudis de doble-híbrid ha estat (Homayouni *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002). Dab2IP s'ha descrit com una proteïna homòloga a les proteïnes activadores de les proteïnes GTPases (o GAP, de l'anglès *GTPases activating protein*), amb expressió en cervell des d'edats embrionàries fins a l'adult on assoleix els seus nivells més elevats. La importància d'aquesta proteïna recau en la possibilitat que genera de poder relacionar la via de Reelina/mDab1 i la via de les MAPK mitjançant l'activació de Ras, que com s'ha demostrat en altres papers pot participar en la regulació de l'estructura o la plasticitat sinàptica; funcions on també s'ha hipotetitzat la participació de la Reelina (Homayouni *et al.*, 2003).

3.3 Reelina i la seva participació en el SNC

Des del clonatge de la Reelina, passant per la seva relació amb el mutant *reeler* i el descobriment de la proteïna adaptadora mDab1, s'ha pogut elucidar una part significativa de la cascada de senyalització activada per la Reelina (May *et al.*, 2005). Malgrat tots els estudis al respecte la funció exacte de la proteïna Reelina és encara controvertida, a continuació descriurem els principals processos on ha estat relacionada.

3.3.1 Reelina: migració neuronal

La funció més suggerida per la Reelina és que actuï com a senyal d'stop de les neurones migrants (Dulabon *et al.*, 2000). Aquesta hipòtesi concordaria amb la morfogènesi de la CP d'un animal wt. En aquest cas la Reelina aturaria la migració de totes aquelles neurones que arribessin a la capa I, capa on trobem present les

cèl·lules secretores de Reelina CR, evitant que hi penetrin i formant el patró “dins-fora” que ja hem comentat. A nivell molecular s’ha postulat que l’efecte de senyal d’stop sobre les cèl·lules en migració és conseqüència del control de la nucleocinesi, per sobre del control d’altres paràmetres importants en la migració com són el *leading process* o la progressió del con de creixement (Jossin and Goffinet, 2001; Teillon *et al.*, 2003). Encara que la idea de la Reelina com a senyal d’stop és plausible amb l’observació que en animals on les cèl·lules de CR són eliminades les neurones corticals envaeixen la capa I, no explica perquè els animals *reeler* malgrat la seva deficiència migratòria no presenten ectòpies neuronals en aquesta capa (Caviness, 1982; Gressens *et al.*, 2000). Aquesta hipòtesi tampoc no explicaria com les cèl·lules migrants poden travessar regions cel·lulars que contenen Reelina, com succeeix en el cas de les neurones, d’origen tardà, que formaran la capa II-III i que creuen la capa V-VI on trobem expressió de Reelina en interneurons a partir d’E18 o en el cas de l’hipocamp on les neurones han de creuar el SO, que està poblat amb interneurons que expressen Reelina (Alcantara *et al.*, 1998; Borrell *et al.*, 1999).

S’ha defensat també que la funció de la Reelina, enlloc de senyal d’stop, faciliti o atragui la migració de les neurones. Aquesta hipòtesi explicaria en part el fenotip *reeler*, ja que les cèl·lules al no ser atretes per la Reelina de la capa I no podrien creuar la capa de cèl·lules preexistents (Caviness, 1982). També explicaria la normalitat en l’inici i continuïtat de la migració de les neurones de la CP en un animal mutant que sobreexpressa Reelina de forma ectòpica a la VZ, sota el control del promotor de Nestina (Magdaleno *et al.*, 2002). Aquesta model en canvi no explicaria l’aturada de les cèl·lules migrants per la injecció a l’escorça de micropartícules carregades amb Reelina (Dulabon *et al.*, 2000).

Una altre possibilitat que s’ha postulat és que la Reelina afecti d’alguna manera les capacitats d’adhesió de les cèl·lules a la glia radial o al substrat de migració. Dos exemples clars els tenim en l’estudi dels mutants *mdab1* *-/-* i en l’estudi dels neuroblasts en migració en la RMS (Hack *et al.*, 2002; Sanada *et al.*, 2004). En el primer cas s’observa que les neurones migrants d’un animal deficient per *mDab1* no només no arriben a les proximitats de la capa I sinó que migren més lentament i no tenen l’habilitat de desunir-se de la glia radial de forma correcte. A més a més, s’observa una deficiència en el patró d’expressió de la Integrina $\zeta 3$, de forma dependent de l’acció de la Reelina, que podria estar influenciant la relació neurona/glia radial (Sanada *et al.*, 2004). El segon exemple fa referència a l’efecte de

la Reelina sobre els precursors neuronals que participen en la RMS. Com hem comentat la Reelina afecta la seva capacitat d'adhesió, generant que les cèl·lules organitzades en estructures homofíliques es desenganxin de l'estructura principal iniciant després la migració radial individual a l'OB (Hack *et al.*, 2002).

3.3.2 Reelina: cèl·lules precursoros neuronals

En primer lloc comentar que tots els membre presents en la via de senyalització "clàssica" de la Reelina (ApoER2/VLDLR i mDab1) es troben expressats en la VZ (Meyer *et al.*, 2003). I que, per hibridacions *in situ*, la seva expressió en la VZ varia al llarg del desenvolupament i de la secció del cervell observada. Aquesta distribució concorda amb els efectes proposats de la Reelina sobre la migració i la maduració de les cèl·lules mare neuronals (Kim *et al.*, 2002).

En contra d'aquesta afirmació existeix l'observació que a les rodalies de la VZ no es detecten cèl·lules que expressin Reelina (Alcantara *et al.*, 1998). Això pot ser explicat per dos motius, el primer suggereix que la Reelina difongui des del seu lloc d'origen fins a la VZ, cosa que no s'ha pogut confirmar per la manca d'anticossos que permetin aquest abordatge de forma eficaç. El segon motiu implica la participació de la glia radial, que està en contacte amb les zones d'expressió de la Reelina. L'extensió de glia radial en contacte amb la superfície pial és la zona on trobem els receptors ApoER2/VLDLR i la proteïna mDab1 (Hartfuss *et al.*, 2003; Luque *et al.*, 2003). Des d'aquest punt la senyal de Reelina podria viatjar per la glia radial influenciant la neurogènesi de les cèl·lules de la VZ o fins i tot de la pròpia glia que, com ja hem comentat, s'ha implicat com a membre actiu de la neurogènesi del SNC.

3.3.3 Reelina: glia radial

Com acabem de comentar la Reelina podria participar activament en la funció i la maduració de la glia radial. Per exemple, en diversos models on les cèl·lules de CR són eliminades s'observa una disminució del número de cèl·lules glijals radials i aquestes es transformen prematurament en astròcits (Meyer *et al.*, 2004; Super *et al.*, 2000). Un altre exemple prové del "rejuveniment" i l'adquisició de fenotip radial per part de la glia de Bergmann quan aquesta es posa en contacte de forma ectòpica amb cèl·lules de CR (Soriano *et al.*, 1997).

A partir d'aquest resultat i d'altres es suggereix que la Reelina participa madurant la glia radial i transformant-la en astròcits. Això no exclou la possibilitat que existeixin altres mecanismes implicats en aquest procés ja que en animals *reeler* la glia radial també es transforma en astròcits (Forster *et al.*, 2002; Hartfuss *et al.*, 2003).

3.3.4 Reelina: participació en processos no migratoris

El patró d'expressió de la Reelina al SNC, tant en la seva distribució morfològica com en la temporal, fa pensar que no només participa en els processos de migració sinó que pot tenir altres funcions en el desenvolupament i en l'animal adult.

En l'hipocamp s'ha comprovat que la Reelina afecta la sinaptogènesi de la via perforant d'origen entorínic. Comparant animals wt i *reeler* s'observa que aquest últims presenten deficiències en la sinaptogènesi en diferents punts de la via. Significativament amb el temps la majoria de les connexions s'acaben formant correctament i en un número adequat, excepte aquelles que es produeixen al *stratum lacunosum moleculare* de l'hipocamp que no s'arriben a recuperar mai (Borrell *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001).

Per la seva banda, Niu i col·laboradors demostren que la Reelina promou el creixement i complexitat de l'arbre dendrític en les cèl·lules hipocampals. A més demostren que els nivells de Reelina són importants per aquest procés ja que animals heterozigots, amb morfologia normal, presenten nivells inferiors de complexitat dendrítica en comparació amb els wt (Niu *et al.*, 2004).

Finalment, un article aparegut recentment implica la Reelina en el control de la neurogènesi adulta tant en la SVZ com en la SGZ. Aquest article demostra que els animals *reeler* presenten una menor producció de cèl·lules en les zones neurogèniques adultes (Won *et al.*, 2006). Aquest resultat es veuen confirmats per l'estudi d'un animal de sobreexpressió de Reelina condicionada sota el promotor de la calmodulina quinasa 2 on s'observa un augment de la neurogènesi en els animals que sobreexpressen Reelina en comparació amb els animals control de la mateixa camada (comunicació personal de L. Pujadas).

1. Estudi de les cascades de senyalització estimulades per la Reelina al cervell anterior i efecte de les mateixes en models funcionals.

- Estudi de l'efecte de la Reelina sobre proteïnes associades al citoesquelet i la seva participació en els processos de migració cel·lular.
- Anàlisi de l'estimulació de la cascada de senyalització MAPK/ERK induïda per la Reelina.
- Anàlisi de la inducció de l'expressió gènica activada per la Reelina.
- Anàlisi funcional de l'activació, estimulada per Reelina, de la cascada de senyalització MAPK/ERK en el model de migració de cèl·lules de la zona subventricular.

2. Estudi de la participació de la Reelina en el procés de migració radial de les cèl·lules granulars de cerebel.

- Anàlisi de l'efecte de la Reelina en tractaments crònics sobre la migració de les cèl·lules granulars cerebelars.
- Estudi de la inducció de la cascada de senyalització MAPK/ERK desencadena per la Reelina en cèl·lules granulars de cerebel.
- Anàlisi del paper de la inhibició de la cascada MAPK/ERK en la migració de les cèl·lules granulars de cerebel tractades amb Reelina.

