

INTRODUCCIÓ

Introducció (1)

El sistema nerviós central

El sistema nerviós central (SNC) està format per estructures altament organitzades que en alguns casos es poden discernir a través de tècniques histològiques simples com el marcatge dels nuclis cel·lulars. La tinció nuclear permet visualitzar diferents regions del SNC per les seves densitats cel·lulars variades i pel tamany de les cèl·lules que les formen. Una delimitació anatòmica, que sovint es correspon també amb una delimitació funcional, on cada regió desenvolupa tasques especialitzades, que contribueixen al funcionament global del SNC. L'elevada organització citoarquitectònica del SNC permet localitzar, amb coordenades físiques molt precises, estructures que els diversos individus d'una mateixa espècie tenen en un moment del desenvolupament; fins al punt que trobem atlas de les diferents regions i per a les diferents edats (Paxinos and Watson, 1998).

Per perfilar més acuradament els límits entre les diferents estructures del SNC es poden analitzar també particularitats pròpies d'aquestes, com per exemple el grau d'expressió de proteïnes concretes, característiques que deixen de ser morfològiques però que comporten igualment una diferenciació funcional entre les regions.

Sistemes d'organització citoarquitectònica: A grans trets, existeixen dos sistemes bàsics d'organització citoarquitectònica. D'una banda hi ha els *nuclis*, o grups de cèl·lules delimitats, i de l'altra hi ha les *estructures laminades*, formades per un nombre discret de capes cel·lulars. De nuclis, en trobem un nombre molt elevat i divers tant en estructura com en funció i es localitzen a tots els nivells anteroposteriors i dorsiventrals del SNC; el nucli accumbens, el caudat-putamen, els nuclis geniculats del tàlem, els nuclis profunds del cerebel o els nuclis motors de la medul·la espinal en són exemples paradigmàtics.

Les estructures laminades són evolutivament més modernes i permeten un major refinament de les connexions, amb un grau de complexitat també superior. Els exemples en aquest cas són l'hipocamp, l'escorça cerebral, el cerebel i el bulb olfactori.

Connectivitat: Cada una de les estructures del SNC conté un nombre divers de tipus cel·lulars neuronals, i cada tipus neuronal estableix contactes sinàptics precisos amb les seves cèl·lules diana. Algunes neurones participen en contactes neuronals dins una mateixa estructura nerviosa; d'altres en canvi formen connexions de més llarg abast, fent les seves sinapsis amb regions molt allunyades. En conjunt es teixeix una xarxa de connexions nervioses que integren estímuls, hi donen resposta, emmagatzemen informació i en conjunt aconsegueixen que el SNC realitzi les seves funcions d'una forma global.

1.1 L'estructuració funcional del SNC adult

A nivell macroscòpic, el SNC es pot dividir en sis parts principals de simetria bilateral, marcadament diferents entre elles (*Figura 1*). Cada una de les parts es desenvolupa a partir d'una regió específica del tub neural (apartat 2.1), i duu a terme funcions que li són pròpies (Kandel et al., 2000). La subdivisió citoarquitectònica interna que presenten es correspon també amb una subdivisió funcional.

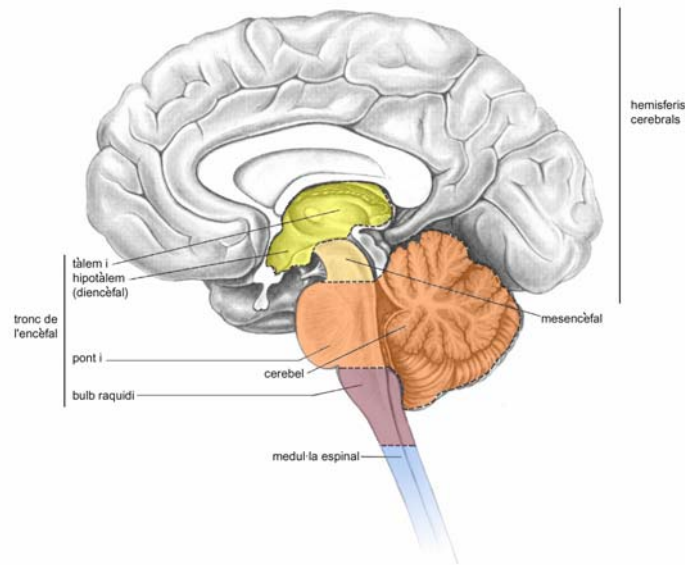


Figura 1 Subdivisions anatòmiques i funcionals del SNC adult humà. Les sis parts principals són: la medul·la espinal, el bulb raquidi, el pont i cerebel, el mesencèfal, el diencèfal i els hemisferis cerebrals. *Adaptat de Kandel et al., 2000.*

La medul·la espinal: És la part més caudal del SNC; rep i processa informació sensorial de la pell, les articulacions i la musculatura del tronc i les extremitats. La medul·la espinal conté totes les neurones motores responsables dels moviments reflexes i voluntaris. En conjunt és la part menys complexa de tot el SNC i presenta una aparença segmentada, on els segments es classifiquen en quatre grups principals: cervicals, toràcics, lumbar i sacres. La citoarquitectura dels segments és també relativament simple, i presenta una organització en nuclis, sense laminació en cap de les estructures. Els segments

estàn compostos per substància grisa (que conté els cossos cel·lulars i les dendrites neuronals) i per substància blanca (axons agrupats en fibres, formant columnes de projeccions ascendents o descendents) (Kandel et al., 2000).

El bulb raquidi: El bulb raquidi, conjuntament amb el pont i el diencèfal, configura el *tronc de l'encèfal*, que participa en el control motor dels músculs del cap, alhora que recull informació sensorial de la pell i la musculatura cranial. A més, el tronc de l'encèfal regula els estats de vigília i de consciència; i transmet informació bidireccionalment entre el cervell i la medul·la espinal (Kandel et al., 2000). El bulb raquidi conté els centres responsables del control de funcions vitals autònomes com la digestió, la respiració, la pressió sanguínia i el ritme cardíac. La seva estructura interna és homòloga a la de la medul·la espinal (Kandel et al., 2000).

El pont i cerebel: El pont transmet informació de moviment entre els hemisferis cerebrals i el cerebel. Aquest, malgrat no es considera integrant del tronc de l'encèfal està íntimament unit al pont a nivell funcional i a més hi comparteix un origen comú en el desenvolupament (Kandel et al., 2000). El cerebel coordina espaciotemporalment la força i la varietat dels moviments de la musculatura esquelètica; i a més està implicat en l'aprenentatge d'aptituds motores. Per fer-ho, integra la informació somatosensorial rebuda de la medul·la espinal, la informació motora de l'escorça cerebral, i la informació

d'equilibri de l'orella interna. La superfície del cerebel presenta foliacions i es subdivideix en lòbuls funcionalment independents. A nivell citoarquitectònic, el cerebel té una estructura laminada a la regió més externa i en forma de nuclis a la zona menys superficial (Kandel et al., 2000).

El mesencèfal: Aquesta part del SNC controla moltes funcions sensorials i motores, entre les quals destaquen el moviment ocular i la coordinació dels reflexes visuals i sonors; per fer-ho conté nuclis essencials per als sistemes visual i auditiu (Kandel et al., 2000).

El diencèfal: El tàlem i l'hipotàlem són les dues estructures principals amb què es subdivideix el diencèfal. Per un cantó, el tàlem processa gran part de la informació sensorial i motora que arriba a l'escorça cerebral des de diverses zones del SNC. També regula els nivells de consciència i aspectes emocionals d'experiències sensitives; mitjançant afectacions variades a l'escorça (Kandel et al., 2000). L'hipotàlem per la seva part, regula el sistema nerviós autònom i la secreció hormonal de la glàndula pituitària. Està connectat amb el tàlem, amb el mesencèfal i amb regions de l'escorça que reben informació del sistema nerviós autònom (Kandel et al., 2000).

Els Hemisferis Cerebrals: Coma part fonamental, els hemisferis contenen l'escorça cerebral a la seva regió més superficial. Just per sota s'hi troba la substància blanca i tres estructures internes: la *formació hipocàmica*, els ganglis basals i l'amígdala, que també formen part dels hemisferis cerebrals.

Moltes àrees de l'escorça cerebral processen informació sensorial o bé integren respostes corticals importants per al control del moviment; s'agrupen en àrees primàries (escorça sensorial primària, escorça motora primària) i en àrees secundàries i terciàries. Les àrees primàries de l'escorça intercanvien informació directament amb regions subcorticals del SNC (apartat 1.3.2); en canvi, les àrees secundàries o terciàries (sensorials i motores) transmeten o integren informació de l'escorça primària. D'altra banda, a l'escorça cerebral hi ha les àrees d'associació, que integren informació diversa i li donen resposta per controlar la percepció, el moviment i la motivació. Globalment es pot considerar que la informació sensorial arriba a les àrees primàries sensorials de l'escorça on és processada i transmesa a regions més especialitzades de l'escorça sensorial (àrees secundàries o terciàries), d'allà la informació passa a les àrees d'associació on s'integra i origina la resposta que es propaga per les àrees motores de l'escorça (terciàries, secundàries i finalment primàries) (Kandel et al., 2000).

L'escorça cerebral és una estructura complexa d'organització laminada. L'estructuració de les capes i el procés de desenvolupament de l'escorça estan analitzats més detalladament en els punts 1.2.2 i 2.2.1. En canvi, l'amígdala i els ganglis basals s'organitzen histològicament de forma més simple, formant nuclis (Kandel et al., 2000).

El terme *formació hipocàmica* comprèn quatre regions citoarquitectòniques diferenciades que són: el gir dentat (apartat 1.2.1), l'hipocamp (o hipocamp propi) (apartat 1.2.2), el complex subicular i l'escorça entorínica. Les diferents parts integrants de la *formació hipocàmica* formen connexions intrínseques topogràficament molt ben delimitades i àmpliament estudiades (apartat 1.3.1); alhora també connecten amb certes regions foranes corticals i subcorticals. Conjuntament, la *formació hipocàmica* participa en funcions cognitives i de memòria, formant part del sistema límbic (Kandel et al., 2000).

1.2 Les estructures laminades dels hemisferis cerebrals

Als hemisferis cerebrals es concentren la majoria de les estructures laminades del SNC. No obstant, també d'altres regions estan formades per estructures laminades; per exemple, en el cerebel la laminació es produeix a la regió superficial i assoleix una importància cabdal. Tant és així, que la desorganització citoarquitectònia del cerebel causa característiques fenotípiques típiques com l'atàxia i la descoordinació, observades en diversos models animals mutants, com per exemple en els *reeler* (Hamburgh, 1960).

Les estructures laminades més importants dels hemisferis cerebrals són: el gir dentat, l'hipocamp, l'escorça cerebral i el bulb olfatori.

1.2.1 El gir dentat:

El gir dentat (DG) està format per tres capes diferenciades (*Figura 2*). La *capa molecular* (ML) és la que es troba més pròxima a la fissura hipocàmpica i presenta una baixa densitat de cossos cel·lulars. La *capa de cèl·lules granulars* (GL) es troba just per sota de la *capa molecular* i conté, entre d'altres, les cèl·lules principals del gir dentat: les cèl·lules granulars. Conjuntament, aquestes dues capes mostren una morfologia en forma de U que engloba la tercera capa del gir dentat, la *capa de cèl·lules polimòrfiques* (també coneguda com a *hilus*) (Amaral and Witter, 2004).

A la *capa molecular* s'hi troben majoritàriament dendrites de cèl·lules residents a d'altres capes del gir dentat (cèl·lules granulars, cèl·lules de cistella i cèl·lules polimòrfiques) així com els axons que hi estableixen contactes. Les escasses cèl·lules neuronals d'aquesta capa pertanyen a dos tipus cel·lulars diferents i totes elles són GABAèrgiques. Molt a prop de la *capa de cèl·lules granulars* s'hi troba un subgrup de cèl·lules de cistella, que tenen una morfologia triangular o multipolar. D'altra banda hi ha les cèl·lules axoaxòniques, un tipus cel·lular que també és habitual a la neocorça, i que es caracteritza per establir sinapsis exclusivament amb la base de l'axó d'altres neurones (Amaral and Witter, 2004).

Les cèl·lules granulars són les cèl·lules principals del gir dentat i es troben densament empaquetades a la capa que porta el seu nom; tenen cossos cel·lulars el·líptics i les dendrites immerses dins la *capa molecular*. Es continuen generant cèl·lules granulars durant tota la vida, si bé amb una taxa de proliferació baixa, donant al gir dentat la característica de ser una de les zones neurogèniques més importants del cervell adult. Dins la *capa de cèl·lules granulars*, a la zona subgranular (entre la les cèl·lules granulars i la *capa de cèl·lules polimòrfiques*) és on es localitzen els progenitors neuronals (apartat 2.5.2); també a la zona subgranular hi són presents les cèl·lules de cistella, que amb els seus axons engloben els cossos cel·lulars de les cèl·lules granulars. Les cèl·lules de cistella són neurones GABAèrgiques i positives al marcatge amb Parvalbúmina. En aquesta mateixa zona subgranular hi ha també altres tipus cel·lulars, la majoria d'ells també corresponen a cèl·lules GABAèrgiques (Amaral and Witter, 2004).

Les cèl·lules més característiques de la *capa de cèl·lules polimòrfiques* són les cèl·lules molsoses, de morfologia triangular o multipolar i de tamany gran (25-35 μm). Sovint del cos cel·lular en surten tres o més dendrites, que són molt extenses i poden arribar a la capa molecular. Les espines de la regió dendrítica proximal de les cèl·lules molsoses són d'una gran complexitat i tamany, característica que no comparteixen els altres tipus neuronals d'aquesta regió (Amaral and Witter, 2004).

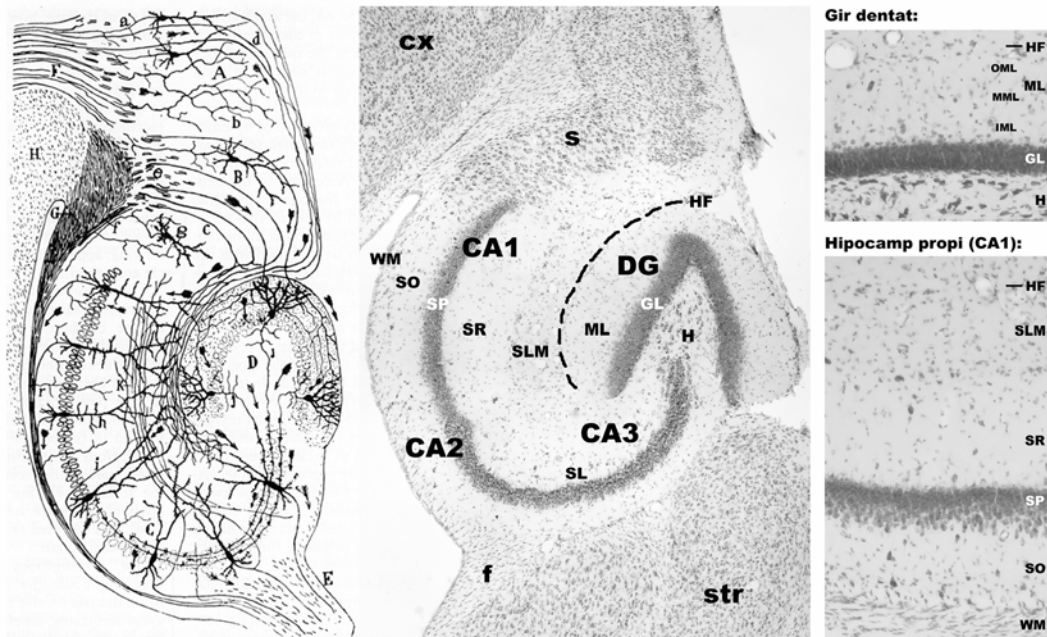


Figura 2 Estructures laminades: l'hipocamp i el gir dentat. Il·lustració de Ramón i Cajal de l'estructuració laminar de l'hipocamp i el gir dentat i de les seves connexions (esquerra). Tinció de Nissl de l'hipocamp i el gir dentat de ratolí adult (centre i dreta). SLM, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SP, stratum piramidale; 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); Cedit per S. Simó (centre).*

1.2.2 L'hipocamp propi:

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 2). 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).

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. 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 molsores* (apartat 1.3.1).

1.2.3 L'escorça:

L'escorça cerebral, i concretament la neocorça és l'estructura laminada més complexa del sistema nerviós central i és també la més moderna a nivell evolutiu. 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

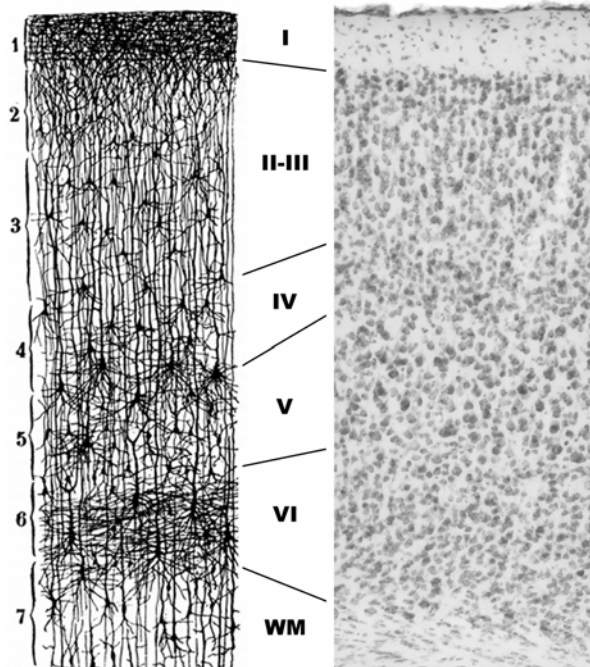


Figura 3 Estructures laminades: l'escorça cerebral. Il·lustració de Ramón y Cajal de l'estructuració laminar de l'escorça cerebral (esquerra). Tinció de Nissl de l'escorça cerebral de ratolí adult (dreta). I-VI, capes de l'escorça; WM, substància blanca; *Adaptat de Ramón y Cajal, 1905 (esquerra).*

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 (apartat 2.2.1) (Super and Uylings, 2001).

L'estructuració cortical interna compta amb 6 capes de cèl·lules que s'ordenen des de les més superficial (capa I) fins a les més profunda (capa VI), just per sobre de la regió de la substància blanca (o *white matter*, WM), que conté axons, i de la zona subventricular i ventricular, on s'han originat totes les neurones principals de l'escorça (*Figura 3*). El tamany relatiu 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 (apartat 2.2.1), 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 (apartats 3 i 4); 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 (apartat 2.2.2); algunes d'elles expressen la Reelina, en especial a la capa V, en edats postnatsals.

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 (apartat 1.3.2).

1.2.4 El bulb olfactori:

Al bulb olfactori hi trobem diversos tipus neuronals, i també neuroblasts no diferenciats que arriben al bulb olfactori procedents de la zona subventricular durant totes les etapes de la vida, integrant-se en els circuits establerts com a interneurons. El bulb olfactori és una estructura laminar formada per les següents capes: la *lamina medularis interna* (lmi) a la regió central del bulb olfactori 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 olfactori (*Figura 4*).

Els neuroblasts migrants arriben per migració tangencial per la via de migració rostral, i des de la *lamina medularis interna* migren radialment fins a col·locar-se a les capes adequades on es diferencien a interneurons granulars i periglomerulars (apartat 2.5.1). 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).

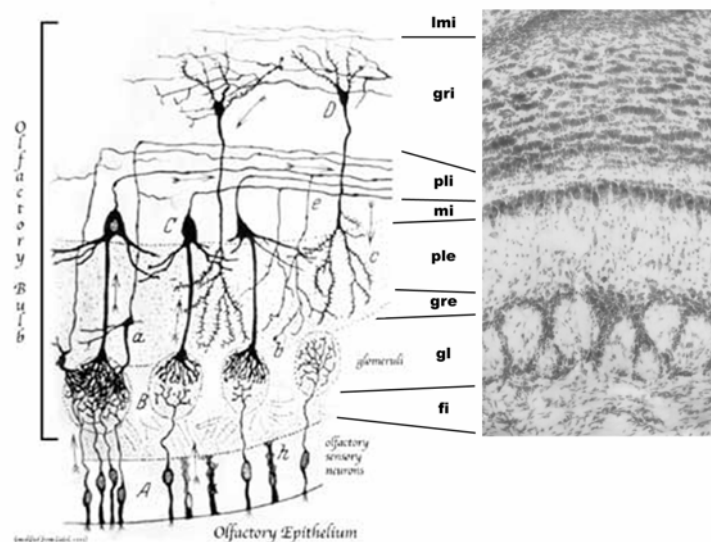


Figura 4 Estructures laminades: el bulb olfactori. Il·lustració de Ramón i Cajal de l'estructuració laminar del bulb olfactori (esquerra). Tinció de Nissl del bulb olfactori de ratolí adult (dreta). lmi, lamina medularis interna; gri, capa granular interna; pli, capa plexiforme interna; ml, capa de cèl·lules mitrals; ple, capa plexiforme externa; gre, capa granular externa; gl, capa glomerulosa; fi, lamina fibrorum. **Adaptat de Ramón y Cajal, 1905 (esquerra).**

1.3 Les connexions principals:

Les connexions neuronals existents en el SNC no són processos atzarosos sinó que estan perfectament delimitats en el temps i en l'espai. La descripció d'algunes de les connexions principals del SNC pot ajudar a entendre el funcionament del sistema i els processos de captació i integració d'informació que s'hi produeixen. Cal mencionar que per poder arribar a la plena funcionalitat del SNC s'han hagut de produir una sèrie de passos claus durant la seva formació: a l'apartat 2.2 s'analitza el desenvolupament de connexions de l'hipocamp i la participació de molècules de creixement i guiatge axonals en l'establiment del patró final de projeccions.

1.3.1 Les connexions de la formació hipocàmica

La *formació hipocàmica* es caracteritza per tenir un flux eminentment unidireccional, serial i seqüencial de la informació que processen les seves connexions intrínseques. Les connexions unidireccionals de la *formació hipocàmica* són tres (la *via perforant*, les *fibres molsoses* i les *fibres col·laterals de Schaffer*) i conjuntament formen el que es coneix com a *circuit trisinàptic* de la *formació hipocàmica* (Figura 5) (Andersen et al., 1971; Andersen et al., 1966).

La formació d'aquestes connexions es produeix durant el desenvolupament embrionari i els primers estadis postnats (apartat 2.3.1), fins a configurar-se la

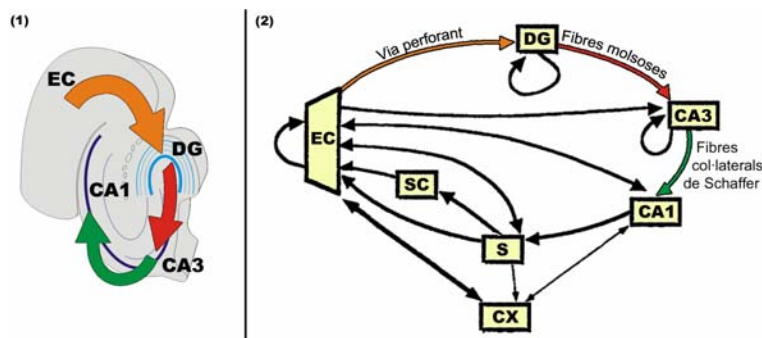


Figura 5 Les connexions de la formació hipocàmica. (1) Les connexions unidireccionals de la *via perforant*, les *fibres molsoses* i les *fibres col·laterals de Schaffer* configuren el circuit trisinàptic clàssic. (2) La connectivitat intrínseca i extrínseca de la formació hipocàmica és altament complexa. EC, escorça entorínica; DG, gir dentat; S, subiculum; SC, complex subicular; CX, escorça. (1) Cedit per R. Ojal. (2) Adaptat d'Amaral and Witter, 2004.

connectivitat completa entre les diferents estructures de la formació hipocàmica (Figura 5) i d'aquestes amb l'exterior. El funcionament connectiu de la *formació hipocàmica* no és tant senzill ni tant lineal com es podria deduir del concepte de *circuit trisinàptic*; de fet, la pròpia delimitació topogràfica de les connexions són un reflex d'aquesta complexitat (Amaral and Witter, 2004; Frotscher et al., 1988):

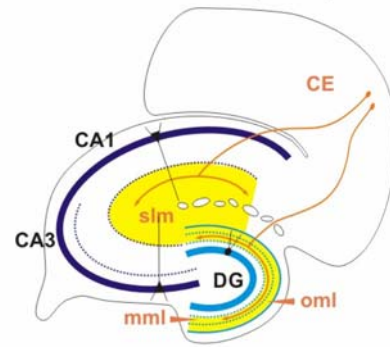
Connexions entorínico-hipocampals: Diverses regions de la neocorça projecten sobre l'escorça entorínica, que exerceix de via d'entrada de la informació cortical a la formació hipocàmica (Amaral and Witter, 2004). Els axons de l'escorça entorínica conformen el gruix principal dels aferents que innerven l'hipocamp i el gir dentat (Witter et al., 1989). La connexió entorínico-hipocampal rep el nom alternatiu de *via perforant* perquè travessa la substància blanca, el feix angular, la capa de cèl·lules piramidals del subiculum i la fissura hipocàmica (Amaral and Witter, 2004; van Groen et al., 2003). El recorregut d'alguns axons entorínico-hipocampals és diferent (creuant l'alveus), no obstant, el conjunt d'axons entorínics que innerven l'hipocamp reben el nom genèric de *via perforant* (Witter et al., 1989). La innervació del gir dentat per la *via*

perforant representa la primera etapa del *circuit trisinàptic* clàssic. Finalment, els axons de la via perforant també estableixen connexions amb les diverses regions del complex subicular (Amaral and Witter, 2004).

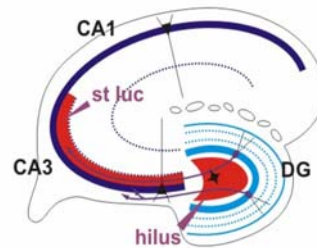
Les neurones piramidals de les capes II i III de l'escorça entorínica són l'origen majoritari de les fibres de la *via perforant*. La regió CA1 es troba innervada per axons de la capa III de l'escorça entorínica, mentre que la regió CA3 rep els axons de la capa II; en tots els casos es distribueixen per l'*stratum lacunosum moleculare* (Figura 6) seguint uns patrons topogràfics característics: l'escorça entorínica lateral (LEA, o *lateral entorhinal area*) innerva principalment les interfases CA1-subiculum i CA2-CA3; l'escorça entorínica medial (MEA, o *medial entorhinal area*), en canvi, innerva la resta de CA1 i la també part més baixa de l'SLM de CA3. Al gir dentat, els axons de la *via perforant* procedeixen de la capa II i finalitzen el seu recorregut a la *capa molecular* (ML) (Figura 6), on estableixen sinapsis amb les dendrites de les neurones granulars. Els axons de LEA innerven la part més externa de la ML (OML, o *outer molecular layer*), mentre els axons de MEA innerven la porció intermèdia de la ML (MML, o *medial molecular layer*) (Amaral and Witter, 2004; Hjorth-Simonsen, 1972; Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972; Segal and Landis, 1974; van Groen et al., 2003).

Les fibres molsoses: Malgrat el nom que rep aquesta projecció, el seu origen es troba a les cèl·lules granulars del gir dentat ipsolateral. És la connexió principal del gir dentat amb l'hipocamp propi, i connecta amb les neurones piramidals de la regió CA3; a més, pot contactar amb les cèl·lules de cistella d'aquesta mateixa regió (Figura 6) (Amaral and Witter, 2004). Les *fibres molsoses* estableixen contactes específics amb les dendrites de l'*stratum lucidum* de les neurones de CA3, i hi arriben seguint recorreguts diversos que reben els noms de: *feix suprapiramidal*, *feix infrapiramidal* i *feix intrapiramidal*; l'abundància relativa de cada un dels feixos depèn de l'espècie i de la soca, i es relaciona amb l'aprenentatge espacial i el comportament explorador en ratolins (Blackstad et al., 1970; Jamot et al., 1994; Schwegler et al., 1988; van Daal et

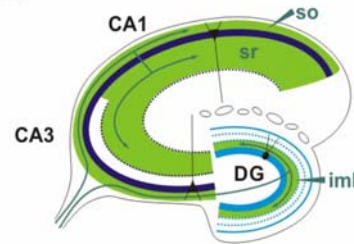
(1) Connexions entorínico-hipocàmpals:



(2) Fibres molsoses:



(3) Connexions associatives/comissurals:



Neurones piramidals Cèl·lules molsoses Neurones granulars

Figura 6 Les connexions de la formació hipocàmpica. (1) Les connexions entorínico-hipocàmpals innerven les porcions central i externa de la capa molecular del gir dentat i l'*stratum lacunosum moleculare* de l'hipocamp propi. (2) Les fibres molsoses innerven l'*stratum lucidum* de la regió CA3 de l'hipocamp propi. (3) Les connexions comissurals innerven la porció interna de la capa molecular del gir dentat i l'*stratum radiatum* i l'*stratum oriens* de l'hipocamp propi. EC, escorça entorínica; DG, gir dentat; slm, stratum lacunosum moleculare; oml, capa molecular externa; mml, capa molecular central; iml, capa molecular interna; st luc, stratum lucidum; so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. **Cedit per R. Otal.**

al., 1991). Complementàriament, al llarg del seu recorregut per l'*hilus*, els axons de les *fibres molsoses* estableixen sinapsis col·laterals amb les cèl·lules molsoses (Amaral and Witter, 2004). Els axons de les *fibres molsoses* no estan mielinitzats (Claiborne et al., 1986), i se'n formen de nous durant tota la vida de l'individu, procedents de les noves neurones granulars generades a la zona neurogènica subgranular (apartat 2.5.2).

Connexions associatives/comissurals: Les connexions associatives són les que s'estableixen entre nivells transversals de l'eix septotemporal de l'hipocamp. Les connexions comissurals són les que contacten amb l'hipocamp contralateral.

Al gir dentat, la part més interna de la ML (IML, o *inner molecular layer*) rep innervació excitadora procedent de les cèl·lules molsoses de l'*hilus* (*Figura 6*) (Amaral and Witter, 2004; Blackstad, 1956). Aquestes connexions són dels tipus ipsolateral i contralateral, motiu pel qual reben el nom de fibres associatives/comissurals. A més de contactar amb les dendrites de les cèl·lules granulars de la ML, aquestes fibres formen sinapsis amb cèl·lules de cistella del gir dentat (Amaral and Witter, 2004). Mitjançant aquest sistema, s'estableix una retroalimentació positiva de l'activació de cèl·lules granulars i alhora la possibilitat de regulació del procés mitjançant la intervenció de cèl·lules de cistella GABAèrgiques (Amaral and Witter, 2004).

Les *fibres col·laterals de Schaffer* configuren la projecció associativa de la regió CA3 amb les cèl·lules de la zona CA1 ipsolateral. N'innerven essencialment l'*stratum oriens* i l'*stratum radiatum*. Les connexions que s'estableixen a través de les *fibres col·laterals de Schaffer* estan topogràficament molt ben delimitades per raons funcionals (Amaral and Witter, 2004). Les connexions associatives entre neurones piramidals de CA3 també presenten uns patrons topogràficament molt organitzats. En conjunt innerven les capes SO i SR de l'hipocamp ipsolateral (Amaral and Witter, 2004). Simultàniament, les mateixes neurones de CA3 donen lloc a connexions comissurals, projectant també a les capes SO i SR de les regions CA1, CA2 i CA3 de l'hipocamp contralateral (*Figura 6*). Aquestes fibres travessen la línia mitja cerebral a través de comissura hipocàmpica (Amaral and Witter, 2004; Blackstad, 1956).

Les projeccions associativa i comissurals de la regió CA1 són molt escasses (Amaral et al., 1991; Tamamaki et al., 1987). Només algunes fibres de CA1 estableixen contacte amb l'SO de camí a la seva diana principal, el *subiculum*. D'altra banda, la connexió comissural és encara més escassa (van Groen and Wyss, 1990).

Altres connexions: Les projeccions de CA1 dins la formació hipocàmpica es dirigeixen majoritàriament al complex subicular i a la capa V de MEA. Aquesta darrera connexió representa la primera projecció de retorn des de la formació hipocàmpica a l'escorça entorínica. Per la seva banda, el complex subicular també estableix connexions de retorn amb l'escorça entorínica (Amaral and Witter, 2004). D'altra banda, la formació hipocàmpica rep i genera projeccions extrínseques amb regions subcorticals. L'entrada d'aferents externs prové de regions com l'amígdala, el nucli septal, el tàlem o el nucli del Rafe; les projeccions subcorticals de la formació hipocàmpica innerven regions com l'amígdala, el nucli septal, el tàlem o l'hipotàlem (Amaral and Witter, 2004).

1.3.2 Els circuits neuronals de l'escorça

L'establiment d'un model bàsic generalitzable d'organització dels circuits corticals va partir de l'estudi dels patrons de connexió de neurones individuals de l'escorça, que estan especialitzats i conservats (Gilbert, 1983; Gilbert and Wiesel, 1983). L'organització d'aquests circuits es basa en la laminació i en la distribució de les connexions per àrees (Douglas and Martin, 2004). Els circuits neuronals s'estableixen majoritàriament dins una mateixa àrea de la neocorça, però mantenint connexions entre diferents àrees; d'aquesta manera s'aconsegueix un major grau d'integració que si els circuits estiguessin distribuïts en una àrea única. Així, diferents àrees de l'escorça cooperen per processar la informació rebuda per un mateix estímul i donar-li una resposta coherent als diferents processaments paral·lels (Douglas and Martin, 2004).

Els circuits excitadors: El flux de connexions excitadors entre les neurones piramidals de diferents capes s'inicia en rebre un estímul subcortical (Douglas and Martin, 2004; Gilbert and Wiesel, 1983). Les connexions interlaminars es poden resumir en un esquema senzill: la capa IV rep innervació del tàlem i projecta sobre neurones piramidals de capes més superficials (capa III), les neurones de capa III innerven la capa V que alhora innerva la capa VI, i finalment tant les neurones de capa VI com les de capa V poden realimentar positivament el circuit mitjançant la innervació de les neurones de capa IV (Douglas and Martin, 2004). La integració de la resposta requereix també l'establiment de connexions laterals entre diferents neurones piramidals d'una mateixa capa, aquestes connexions laterals poden ser intraàrea o bé interàrea. Les connexions laterals dins una mateixa àrea tenen lloc a les capes altes, especialment a les capes II i III entre neurones d'una mateixa capa. Hi ha dos tipus de connexions laterals entre diferents àrees; les *connexions laterals activadores d'altres àrees* les formen les neurones de capa III de l'àrea activa i es projecten sobre neurones de capa IV d'una àrea d'activació secundària; les *connexions laterals de retroalimentació* tenen lloc entre la capa VI de l'àrea activada secundàriament i les capes altes (capes II i III) de l'àrea inicialment activa. Finalment la capa VI pot influenciar la senyal d'entrada inicial innervant al tàlem (Douglas and Martin, 2004).

La resposta integrada s'envia a regions subcorticals mitjançant la participació de les neurones piramidals de la capa V. Les neurones d'aquesta capa participen de manera clau en la regulació del circuit ja que controlen el flux de la retroalimentació i regulen les connexió amb estructures subcorticals (Douglas and Martin, 2004).

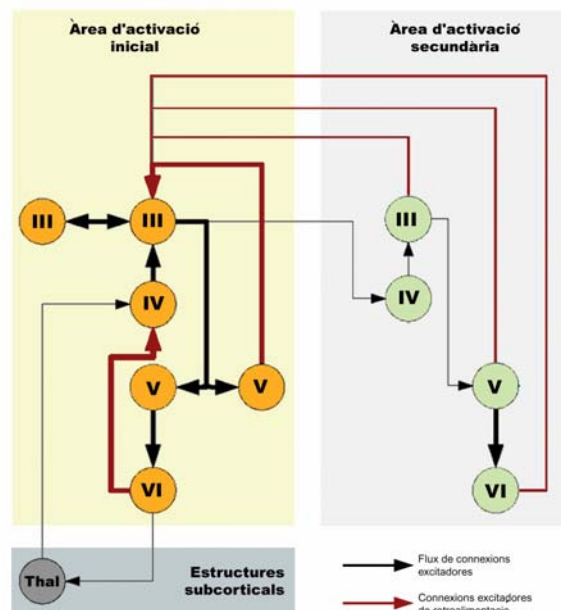


Figura 7 Els circuits excitatoris corticals. Les estructures subcorticals connecten amb la capa IV de l'escorça des d'on el flux de connexions excitadores transmeten seqüencialment la informació a les capes III, V i VI. La integració de la senyal requereix, a més, connexions laterals intraàrea i entre diferents àrees corticals; alhora, també existeixen connexions excitadores de retroalimentació. III-VI, neurones piramidals de les capes III-VI; Thal, tàlem. **Adaptat de Douglas and Martin, 2004.**

Els circuits inhibidors: Les neurones inhibidores permeten la regulació dels fluxes d'informació dels circuits de la neocorça. Hi ha diferents tipus morfològics de cèl·lules inhibidores amb implicacions funcionals també diferents. Per exemple, les *neurones inhibidores de classe horitzontal* (ex: cèl·lules de cistella) presenten una arborització axonal localitzada a la base de les dendrites i al soma, just en el punt d'integració dels estímuls rebuts. En canvi les *neurones inhibidores de classe vertical*, projecten sobre les parts distals dels arbres dendrítics. La proporció de diferents classes de neurones inhibidores en les diverses capes de l'escorça els confereix propietats diferents en la inhibició del circuit (Douglas and Martin, 2004).

Algunes de les neurones inhibidores de l'escorça, pertanyents als diferents subtipus, expressen la proteïna Reelina en edat adulta (apartat 3.1.3). Una de les zones on hi ha una major expressió de la Reelina és a la capa V (Alcantara et al., 1998). Les neurones piramidals d'aquesta capa són de vital importància en els circuits neuronals per la seva capacitat de control (Douglas and Martin, 2004), no obstant, es desconeix la funció exacta que la Reelina pot estar fent *in vivo* en aquesta regió.

1.3.3 El funcionament connectiu del sistema olfatori

Les neurones sensorials del sistema olfatori detecten substàncies oloroses i feromones a través de receptors específics (Buck and Axel, 1991; Reed, 2004; Zhang and Firestein, 2002). Les neurones sensorials que expressen un mateix receptor transmeten la informació a un mateix glomèrul del bulb olfatori (Strotmann et al., 2000). En els glomèruls, les projeccions sensorial estableixen sinapsis amb les dendrites apicals de les neurones glutamatèrgiques: les cèl·lules mitrals, les cèl·lules tufted i les cèl·lules SA (*short axon cells*) (Reed, 2004). Les cèl·lules mitrals, mantenen connexions amb l'escorça olfactiva a través del tàlem, i conformen el gruix de les connexions extrínseques del bulb olfatori (Kandel et al., 2000).

La regulació del sistema olfatori: Les cèl·lules SA d'un glomèrul contacten amb un tipus d'interneurones dels glomèruls de l'entorn: les cèl·lules periglomerulars. Les neurones periglomerulars inhibeixen les cèl·lules mitrals mitjançant sinapsis dendrodendrítiques; i en conjunt s'estableix una xarxa interglomerular d'inhibició de glomèruls pròxims (Aungst et al., 2003). D'altra banda, les cèl·lules tufted d'un glomèrul contacten amb les interneurones granulars del glomèrul simètric, que rep una mateixa informació olfactiva (Belluscio et al., 2002). Aquestes neurones inhibidores no tenen axons i formen sinapsis dendrodendrítiques recíproques amb les dendrites laterals de les cèl·lules mitrals. Així, en activar-se un glomèrul, el glomèrul simètric s'inhibeix (Lodovichi et al., 2003). Finalment, les cèl·lules granulars també reben estimulació directa de neurones mitrals i també projeccions des de l'escorça olfactiva; i les neurones periglomerulars reben estímulo directe de les neurones sensorials, incrementant encara més les possibilitats de regulació del sistema per l'acció inhibidora de les interneurones.

Una altra forma de regulació del sistema es basa en la incorporació de noves interneurones al bulb olfatori durant tota la vida. Les noves interneurones procedeixen de la regió neurogènica de la zona subventricular i s'integren als circuits sinàptics del bulb olfatori. La seva supervivència de les interneurones és depenent d'activitat i en conjunt s'aconsegueix que el sistema tingui una gran capacitat d'adaptació als ambients canviants (Doetsch and Hen, 2005). El procés de neurogènesi i integració de noves neurones al bulb olfatori es tracta amb més detall a l'apartat 2.5.2.

Introducció (2)

El desenvolupament del SNC

El SNC adult presenta un grau d'estructuració molt elevat (apartat 1.1). Durant el procés de desenvolupament, des de l'embriogènesi, s'han de crear un gran nombre d'estructures complexes, que, a més, estan connectades entre elles per tal de funcionar coordinadament. En conjunt, es requereixen processos altament regulats de posicionament de cèl·lules i un establiment precís de les connexions entre elles.

Per assolir el desenvolupament correcte del SNC, un gran nombre de molècules participen promovent-ne i regulant-ne els diferents passos, entre elles la proteïna Reelina. Totes les etapes del desenvolupament estan molt ben definides i cal que es produeixen amb un ordre preestablert. Bàsicament, el procés de desenvolupament del SNC requereix dos processos essencials: la migració neuronal i el creixement axonal.

Complementàriament, no és suficient que el SNC adquireixi la seva estructura de l'edat adulta. El funcionament del SNC sempre necessitarà un grau de plasticitat elevat. L'establiment i desaparició de sinapsis, i una certa reposició neuronal en determinades regions són imprescindibles també en el SNC adult.

2.1 Regionalització, especialització i proliferació:

A l'inici de l'embriogènesi, apareixen tres capes principals en els embrions dels mamífers: l'endoderm, el mesoderm i l'ectoderm. L'ectoderm, la capa més superficial, és l'origen de l'epidermis, del sistema nerviós perifèric i del SNC (Kandel et al., 2000). La placa neural és la regió especialitzada de l'ectoderm, formada per un tipus cel·lular d'aparença columnar característica, d'on s'originen totes les cèl·lules neurals i glials del SNC (Gilbert, 2000). La placa neural s'estén per tot l'eix rostrocaudal de l'embrió i en ella es produeix el procés d'inducció neural i neurulació primària, amb la participació de senyals produïts pels teixits circumdants, que n'indueixen proliferació, replegament de la placa neural sobre si mateixa fins a tancar-se per la vessant dorsal, i formació de l'estructura del tub neural (*Figura 8*) (Gilbert, 2000). Amb el tancament del tub neural es forma una cavitat interna (el canal central) que és l'origen del sistema ventricular del SNC; i es configuren tres grups de cel·lulars: l'epidermis, el tub neural i la cresta neural. Les cèl·lules de la cresta neural originen les neurones i la glia dels sistema nerviós perifèric. Les cèl·lules del tub neural contigües al canal central configuren el que es coneix amb el nom d'epiteli neural, zona de proliferació d'on es generen totes les neurones i cèl·lules glials del SNC. Les cèl·lules de l'epiteli neural es divideixen amb una gran rapidesa a totes les zones del tub neural però no de forma homogènia.

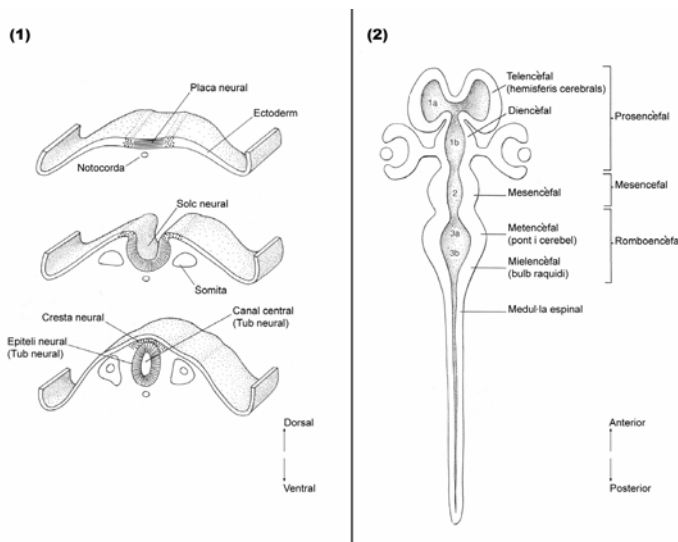


Figura 8 Regionalització i especialització en el SNC en formació. (1) Desenvolupament de l'ectoderm i formació del tub neural, definició de l'eix dorsiventral. (2) Desenvolupament del sistema ventricular del SNC, definició de l'eix anteroposterior. *Adaptat de Kandel et al., 2000.*

Definició de l'eix anteroposterior: Durant el desenvolupament primerenc del tub neural es produeix una especialització regional: la part caudal donarà lloc a la medul·la espinal i la part rostral a l'encèfal. A la part rostral es formen inicialment tres vesícules (prosencefal, mesencèfal i romboencèfal) que més endavant es divideixen en un total de cinc (telencèfal, diencèfal, mesencèfal, metencèfal i mielencèfal), que, sumades a la medul·la espinal, són l'origen de les sis parts principals del cervell (*Figura 8*) (Kandel et al., 2000).

Definició de l'eix dorsiventral: L'expressió de determinats factors per teixits circumdants ((Sonic hedgehog (notocorda), àcid retinoic (somites) o BMP4 i BMP7 (epidermis)) produeix l'especialització dorsal o ventral del tub neural (Gilbert, 2000).

La definició dels eixos anteroposterior i dorsiventral es correlaciona amb l'expressió de factors específics en diferents tipus cel·lulars de diferents àrees del SNC. Aquesta especialització regional en el cervell embrionari resultarà determinant per als processos de migració neuronal subsegüents; les regions dorsals esdevindran en alguns casos estructures laminades, mentre les regions ventrals s'estructuraran majoritàriament en nuclis (Hatten, 1999; Marin and Rubenstein, 2003; Wilson and Rubenstein, 2000).

2.2 La migració neuronal:

La migració cel·lular és essencial per a la formació de tots els teixits durant el desenvolupament. També és un procés bàsic en la formació del SNC, fins al punt que deficiències en la migració i el posicionament de les neurones causen problemes tan severos com el retard mental, l'epilèpsia o les deficiències en l'aprenentatge (Marin and Rubenstein, 2003).

2.2.1 Els processos de migració radial:

El primer tipus cel·lular que podem diferenciar a l'epiteli neural des de l'inici de la neurogènesi són les cèl·lules que conformen la glia radial. El seu soma es situa a la zona ventricular i estenen una prolongació cap a la superfície exterior del tub neural (Marin and Rubenstein, 2003; Schmechel and Rakic, 1979b). Aquesta glia radial presenta característiques pròpies de cèl·lules gials diferenciades com són l'expressió de GFAP o bé la formació de grànuls de glicògen. Tradicionalment se'ls ha atribuït una participació estructural en el desenvolupament del cervell per la seva funció de suport a la migració de neuroblasts i per esdevenir astròcits un cop finalitzat aquest procés (Rakic, 1972; Schmechel and Rakic, 1979b). Recentment però, s'ha evidenciat que la glia radial té un paper encara més rellevant en el desenvolupament. Lluny de tenir compromès el seu futur en la línia astroglial, cada cop hi ha més evidències que les cèl·lules de la glia radial són cèl·lules mare amb la capacitat de generar els neuroblasts de l'epiteli neural embrionari (Doetsch, 2003).

La participació de la glia radial és bàsica en la formació de les estructures laminades i trobem cèl·lules amb fenotip de glia radial al cerebel (glia de Bergmann), a la formació hipocàmpica, al bulb olfatori i a l'escorça cerebral. Les alteracions moleculars que afecten al desenvolupament de les cèl·lules de la glia radial produeixen una migració neuronal anòmala (Marin and Rubenstein, 2003). La morfologia de glia radial es manté únicament mentre perdura el procés de migració radial (Schmechel and Rakic, 1979a). El seu fenotip és induït per factors secretats pels propis neuroblasts migrants. D'aquesta manera, un cop finalitzada la migració radial, la glia radial es converteix en astroglia (Hatten, 1999; Schmechel and Rakic, 1979b).

La migració radial a l'escorça cerebral: Les noves neurones utilitzen la glia radial com a suport i guia per migrar fins al seu destí (*Figura 9*) (Rakic, 1972). Els detalls d'aquesta migració estan ben estudiats a l'escorça cerebral i s'utilitza com a model paradigmàtic de migració radial. En d'altres estructures, la migració radial es produeix per mecanismes semblants, si bé poden no ser idèntics.

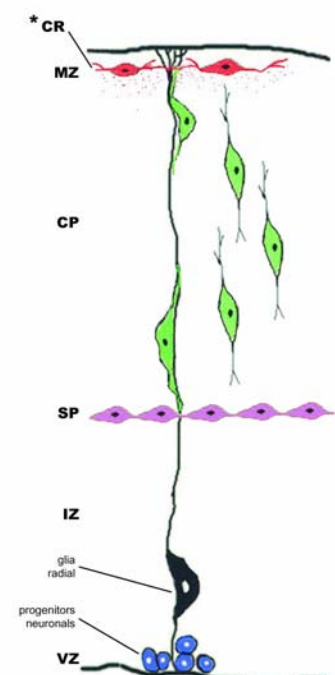


Figura 9 Migració radial a l'escorça cerebral. La proliferació dels progenitors de la zona ventricular origina cèl·lules postmitòtiques que s'adhereixen a la glia radial i inicien el procés de migració radial. Les neurones migren unides a la glia radial fins arribar a la zona marginal; allà es produeix l'aturada de la migració, la desadhesió de la glia i la diferenciació a neurones madures. E11, dia embrionari 11; CR, cèl·lules de Cajal-Retzius; MZ, zona marginal; CP, placa cortical; SP, subplaca; IZ, zona intermèdia; VZ, zona ventricular; *, secreció de la Reelina. *Adaptat de Dulabon et al., 2000.*

A l'inici de la formació de l'escorça cerebral, els neuroblasts que migren fora de la zona ventricular ho fan mitjançant el sistema de translocació somàtica. Els neuroblasts presenten una prolongació central en la direcció de migració que es coneix com a *leading process* i s'estén fins a la superfície del tub neural. La migració es produeix per un moviment continuat del soma cel·lular fora de la zona ventricular, seguint la direcció marcada pel *leading process*. El *leading process* s'escurça a mesura que va avançant el soma. Aquest tipus de migració radial inicial és eminentment independent de glia radial i conclou amb la formació de la preplaca (Allendoerfer and Shatz, 1994; Marin and Rubenstein, 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002). No obstant, no totes les cèl·lules que formen la preplaca hi arriben per migració radial. Recentment s'està posant de manifest la importància de la migració tangencial de les cèl·lules de Cajal-Retzius (CR), un tipus neuronal present a la preplaca. Les zones d'origen de les neurones de CR són diverses i localitzades en posicions molt específiques, fins i tot en àrees extracorticals (Soriano and Del Rio, 2005).

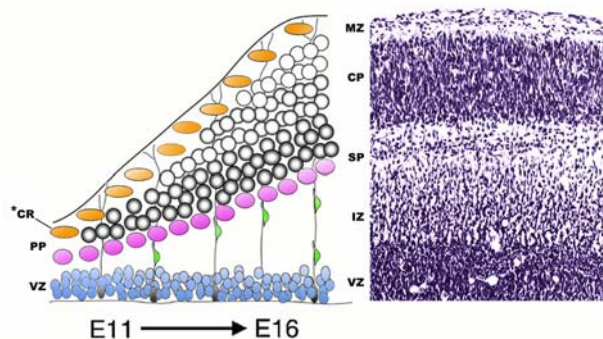


Figura 10 Desenvolupament embrionari de l'escorça cerebral. Els neuroblasts generats a la zona ventricular migren radialment per la zona intermèdia i s'internen a la preplaca, separant-la en subplaca i zona marginal. Les onades successives de neurones migrants formen la placa cortical amb un patró de distribució de dins cap a fora (esquerra). Tinció de Nissl de l'escorça cerebral de ratolí E16 (dreta). E11, dia embrionari 11; CR, cèl·lules de Cajal-Retzius; PP, preplaca; VZ, zona ventricular; MZ, zona marginal; CP, placa cortical; SP, subplaca; IZ, zona intermèdia; *, secreció de la Reelina. *Adaptat de Rice and Curran, 2001.*

En les següents onades migratòries de l'escorça cerebral, les neurones migren des de la zona ventricular, atravesant la zona intermèdia que conté axons, penetrant en la preplaca i separant-la en dues capes diferenciades: la subplaca i la zona marginal; capes que contenen les primeres neurones corticals que s'han generat durant l'embriogènesi (Luskin and Shatz, 1985). La subplaca es manté pròxima a la zona ventricular, mentre que la zona marginal queda a la regió més externa de l'escorça. La zona marginal correspon a la futura capa I de l'escorça i conté, durant el desenvolupament, les neurones de CR. Les cèl·lules de CR participen activament en la regulació de la migració i la modulació de la

maduració cortical (Soriano and Del Rio, 2005). Aquestes cèl·lules expressen la proteïna Reelina i la secreten a l'espai extracel·lular (Alcantara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1995). La Reelina és una proteïna de tamany gran (apartat 3.1.2) que influeix decisivament en la migració de les noves neurones corticals que avancen radialment des de la zona ventricular (Tissir and Goffinet, 2003). Actualment encara es manté la controvèrsia respecta a la funció concreta de la Reelina sobre les neurones que migren radialment, tot i que podria parar-ne la migració radial (Dulabon et al., 2000). En qualsevol cas, i malgrat les diferents hipòtesis, la Reelina participa decisivament en l'etapa final de la migració, moment en què la neurona migrant deixa d'avançar, es desuneix de la glia radial i inicia la seva diferenciació per tal de formar part de la corresponent capa de l'escorça (Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003).

Entre la preplaca i la zona marginal es forma la placa cortical (futures capes II-VI de l'escorça). Els neuroblasts de la placa cortical es mantenen adherits a la glia radial (Rakic, 1972) i migren mitjançant un mecanisme que es compon de dos passos claus: en

primer lloc l'extensió del *leading process* i llavors la translocació del nucli (Marin and Rubenstein, 2003). En aquestes cèl·lules, el *leading process* és curt i no arriba fins a la superfície, això fa que calgui repetir diverses vegades la seqüència dels dos moviments i que la locomoció cel·lular es produeixi a salts: períodes llargs d'extensió del *leading process* seguits del moviment ràpid de translocació nuclear. En última instància, quan el *leading process* contacta amb la superfície, el moviment adquireix connotacions de translocació somàtica i la cèl·lula es desuneix de la glia radial i es col·loca just per sota de les cèl·lules de la zona marginal (Nadarajah and Parnavelas, 2002). La reorganització dels microtúbuls durant el procés de migració radial està regulada per diverses proteïnes, entre les quals LIS1, DCX o Cdk5 (Feng and Walsh, 2001).

En conjunt, el procés de formació de la placa cortical es configura de dins cap a fora (*inside-out*) (Figura 10), amb les cèl·lules més joves col·locades a la regió més superficial de la placa cortical i les cèl·lules més velles a les capes més profundes (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1974). D'aquesta manera es forma la característica estructura laminada de l'escorça cerebral (apartat 1.2.3).

2.2.2 Els processos de migració tangencial:

La migració tangencial, o migració no radial, del SNC comprèn una gran diversitat de moviments cel·lulars amb característiques variades. Tots aquests processos de migració tangencial tenen en comú la no utilització de la glia radial com a suport per a la migració; no obstant això, no hi ha un mecanisme comú de migració compartit. En alguns casos, grups de neurones migren conjuntament amb interaccions homofíliques que promouen la pròpia migració. En d'altres casos les neurones que migren tangencialment ho fan seguint axons com a guia per trobar la seva regió diana. Finalment, en alguns tipus de migració tangencial, les neurones migrants no segueixen substrats cel·lulars com a guia; en aquests casos les neurones migren d'una forma individualitzada fins a la zona de destí (Marin and Rubenstein, 2003).

S'han caracteritzat amb precisió diversos exemples de migració tangencial com són la via de migració rostral (migració per interaccions homofíliques) (apartat 2.4.1), la migració de les neurones secretores de Gonadotropina (migració per interaccions axonofíliques), la migració d'interneurones de l'escorça (migració individualitzada) o la migració de les neurones granulars del cerebel (Marin and Rubenstein, 2003).

La migració tangencial d'interneurones a l'escorça cerebral: Un dels exemples més característics de migració tangencial individualitzada és la migració de les interneurones a l'escorça cerebral. A diferència de les neurones piramidals, generades a la zona ventricular de la pròpia escorça, les interneurones hi arriben des de regions allunyades com són l'eminència ganglionar lateral, l'eminència ganglionar medial i l'àrea entopeduncular anterior (totes elles regions del *subpallium*) (Marin and Rubenstein, 2001). Entre E11.5 i E16.5 es produeixen tres fases diferents, parcialment solapades, en la migració de les interneurones fins a l'escorça; en cada fase, les regions d'origen i la ruta de migració són diferents. Inicialment (E11.5), les interneurones que arriben a l'escorça s'integren a la zona marginal i a la subplaca. La segona onada de cèl·lules migratòries penetren a la subplaca i a la part inferior de la zona intermèdia, des d'on s'inseriran i integraran a la placa cortical. Finalment, les interneurones que arriben a la fase final del desenvolupament cortical (E14.5-E16.5) tendeixen a situar-se a les regions proliferatives de l'escorça (Marin and Rubenstein, 2001). En el procés de

migració tangencial, les interneurons interaccionen amb axons preexistents del sistema de fibres corticofugals, i aquests actuen de suport i guia per al recorregut tangencial de les interneurons (Denaxa et al., 2001; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

Les interneurons que arriben a l'escorça per migració tangencial configuren una gran varietat de tipus cel·lulars diferents, que es classifiquen segons els marcadors que expressen. Les interneurons s'agrupen segons continguin determinats neuropèptids (NPY, Somatostatina o VIP) o determinades proteïnes d'unió a calci (Calbindina, Calretinina o Parvalbúmina). Totes aquestes interneurons formen contactes sinàptics inhibitoris sobre les neurones principals de l'escorça, exercint-hi una funció moduladora (Marin and Rubenstein, 2003).

Algunes interneurons de l'escorça expressen la proteïna Reelina (Alcantara et al., 1998; Pesold et al., 1998). A banda de les cèl·lules de CR, les interneurons són l'únic tipus cel·lular que expressa la Reelina en escorça. De gairebé tots els subtipus d'interneurons hi ha un percentatge més o menys significatiu de cèl·lules que contenen Reelina, entorn a un 20%. La part més abundant d'interneurons positives per Reelina es troben situades a la capa V. Les altres capes corticals també contenen algunes interneurons que n'expressen però amb un nombre inferior. L'expressió de la Reelina s'inicia a E18 i perdura fins a l'edat adulta, motiu pel qual s'hipotetitzava una funcionalitat de la Reelina en processos de plasticitat neuronal en escorça (Alcantara et al., 1998).

2.2.3 Les molècules implicades en la migració neuronal:

La regulació de la migració neuronal és un procés complex on intervien un nombre molt elevat de molècules diverses. A més, el procés migratori de cada tipus neuronal és específic i per tant també ho són les molècules que el regulen. Alhora, en un únic procés migratori hi ha diferents aspectes susceptibles de ser regulats: la locomoció, el control de la direccionalitat, l'adhesió al substrat, la parada en la migració... Alguns factors implicats en processos de migració radial són: BDNF, NT4, GABA, TGF α (control extracel·lular de la locomoció); Pafah1b1, NUDEL, mNudE, Dcx (control del citoesquelet en locomoció i nucleoesquelet); Astn1, Integrines α 3, α 6, β 1, VDLR2, ApoER2, Reelina (control de l'adhesió)... (Hatten, 2002; Marin and Rubenstein, 2003).

Les molècules atractives i/o repulsives juguen un paper destacat en els processos migratoris. La resposta que dona cada tipus cel·lular a senyals específics és depenent de l'expressió de receptors que tingui a la superfície cel·lular. Així un mateix estímul pot originar resposta atractiva, o repulsiva o canviar les propietats d'adhesió al substrat segons els receptors que s'expressen en una determinada cèl·lula i en un moment concret. Un exemple paradigmàtic d'aquesta circumstància és la proteïna Netrina-1 i el seu sistema de receptors DCC/UNC-5 (Barallobre et al., 2005). L'activació o inactivació de vies de senyalització en resposta a les senyals extracel·lulars fan que la cèl·lula reaccionï de forma adequada als estímuls que està rebent. En molts dels casos, la transducció intracel·lular de la senyal desemboca en efectes directes sobre el citoesquelet, que es reorganitza en funció de l'estímul rebut. En el cas de la Netrina-1, algunes proteïnes intracel·lulars que participen en la transducció de la seva senyal són: Erk1/2, p38, MAP1B, PI3K... (Barallobre et al., 2005). Les vies de senyalització activades per estímuls extracel·lulars també poden induir canvis de més llarg abast sobre la cèl·lula migrant, per exemple a nivell d'expressió gènica. Així, per exemple, l'entorn extracel·lular que troba la cèl·lula a la seva zona de destí pot induir-la a l'expressió de gens nous que en produiran diferenciació.

2.3 El creixement i el guiatge axonals

Els axons en creixement es veuen influenciats per senyals locals que els guien fins a establir contacte amb les seves regions diana. A l'extrem d'aquests axons en creixement s'hi troba una estructura especialitzada en reconèixer i donar resposta a aquests senyals i que rep el nom de *con de creixement axonal*. Els processos de creixement i guiatge axonals mantenen grans similituds amb processos de migració neuronal i fins i tot algunes de les molècules que hi participen són les mateixes. També el con de creixement és una estructura equiparable al *leading process* de les neurones en migració (apartat 2.1), però se'n diferencia en el fet que no arrossega el cos cel·lular en la direcció de creixement sinó que s'elonga el propi axó (Barallobre et al., 2005; Dickson, 2002; Huber et al., 2003; Kalil and Dent, 2005; Mueller, 1999; Song and Poo, 1999).

Els axons en desenvolupament acostumen a avançar de forma fasciculada, interaccionant selectivament amb altres axons preexistents; d'aquesta manera poden travessar ambients hostils amb més facilitat (Raper et al., 1983). Més endavant es produeix la defasciculació i els diferents axons segueixen trajectòries específiques fins a establir els contactes sinàptics. Habitualment, durant el procés de creixement axonal els axons contacten provisionals amb regions diana intermèdies (Barallobre et al., 2005; Flanagan, 1999; Wang and Tessier-Lavigne, 1999).

El con de creixement axonal integra i respon a un gran nombre de senyals atractives i repulsives que l'afecten simultàniament. Les senyals atractives tenen un efecte sobre el con de creixement que l'atrau i en potencia el creixement. En canvi, l'entrada en contacte amb les senyals repulsives provoca el col·lapse del con de creixement i fins i tot la retracció axonal. Tan les senyals atractives com les repulsives poden tenir naturalesa soluble i difondre i actuar a distàncies llargues en gradients de concentració; d'altres en canvi actuen a distàncies curtes pel fet de ser transmembrana o d'estar ancorades a la matriu extracel·lular (Huber et al., 2003) (Figura 11). En qualsevol cas una mateixa molècula de guia pot provocar efectes divergents en diferents axons; és doncs l'axó qui interpreta la senyal i hi respon de la manera adequada.

El con de creixement axonal presenta una estructura central rica en microtúbuls, i una perifèria estructurada en filopodis on predominen els filaments d'actina. Els filopodis són essencials per a la detecció de senyals de guia; i mitjançant la transducció intracel·lular de la senyal s'afecta el citoesquelet i es produeix el guiatge axonal. Les senyals atractives augmenten el nombre de filopodis i l'elongació dels filaments d'actina en una regió del con de creixement, i també la seva estabilització amb microtúbuls. Les

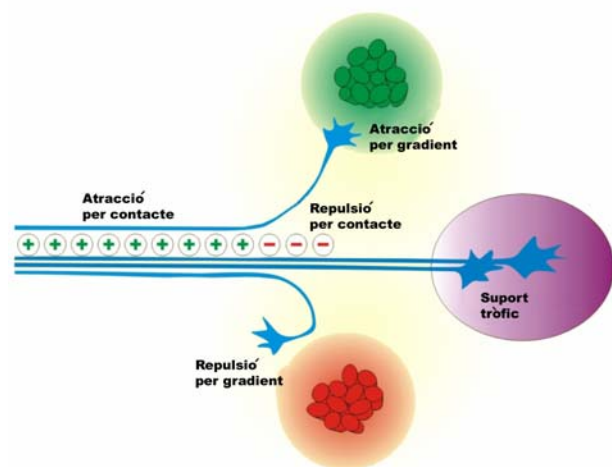


Figura 11 Molècules que afecten al guiatge axonal. El guiatge axonal es regula per l'acció de molècules extracel·lulars que atrauen o repel·len els axons per contacte directe o bé actuant com a senyals difusibles per gradient de concentracions. Per al manteniment de l'axó a la regió diana es requereixen factors tròfics. *Adaptat de Huber et al., 2003.*

senyals de repulsió desorganitzen els filaments d'actina de la zona del con de creixement afectada, provoquen la pèrdua de microtúbuls d'aquella regió i provoquen una aturada en el creixement axonal o bé el col·lapse (Kalil and Dent, 2005).

En arribar a la regió diana, l'extrem de l'axó es ramifica i forma contactes sinàptics. No obstant el procés de guiatge axonal és independent de la formació de les sinàpsis; la sinaptogènesi no marca la fi del procés de guiatge, sinó que en finalitzar el guiatge llavors els axons poden formar les sinapsis (Barallobre et al., 2005).

2.3.1 La formació de les connexions hipocampals:

Les connexions de l'hipocamp han estat àmpliament analitzades, i se'n coneixen amb detall tan el patró final de connexions (apartat 1.3.1) com els processos i els terminis en què s'estableixen (Super and Soriano, 1994). Malgrat tot, encara queden incògnites importants respecte a quines són les molècules de guia que participen en el procés, i sobretot a través de quins mecanismes de senyalització intracel·lular hi responen els axons en desenvolupament. En qualsevol cas, sembla clar l'efecte sinèrgic de les molècules de guia axonal i les neurotrofines en l'establiment de les connexions de la formació hipocàmpica (Skutella and Nitsch, 2001; Tuttle and O'Leary, 1998).

La connexió entorínico-hipocàmpica: Els primers axons que penetren a l'hipocamp procedents de l'escorça entorínica, ho fan a l'edat embrionària E15, i es limiten a innervar la regió de la zona intermèdia (futura substància blanca) i la fimbria. Els primers axons que arriben procedeixen principalment de l'escorça entorínica lateral. A partir d'E16-E17, els axons segueixen una trajectòria ascendent travessant la placa hipocàmpica i envaint les capes plexiformes a la futura regió de l'*stratum lacunosum moleculare*. A partir d'E19 els axons també s'observen a la zona externa de la *capa molecular* del gir dentat en la seva porció suprapiramidal; la porció infrapiramidal té una innervació una mica més retardada, i els primers axons hi arriben a partir de P2-P5 (*Figura 12*). La regió de terminació d'aquests axons coincideix durant tot el procés amb la zona que conté cèl·lules de CR, amb les quals aquests axons formen contactes sinàptics transitoris (Super et al., 1998; Super and Soriano, 1994). Durant la resta del desenvolupament, els axons entorínics incrementen la ramificació i la densitat d'innervació, i alhora estableixen els contactes amb les seves cèl·lules diana definitives, les neurones piramidals de les àrees CA i les neurones granular del gir dentat, formant d'aquesta manera la connexió coneguda com a via perforant (apartat 1.3.1).

La formació d'aquesta connexió està regulada per la Semaphorin 3A (Sema3A), que repel·leix els axons entorínics (Steup et al., 1999). Sema3A s'expressa en escorça entorínica, on actua repel·lint els propis axons entorínics que en conseqüència s'encaminen cap a l'hipocamp. Sema3A també s'expressa en les cèl·lules granulars del gir dentat i actua de barrera repel·lint els axons de la via perforant, que s'estenen per les capes OML, MML i SLM (apartat 1.3.1) (Skutella and Nitsch, 2001). D'altres molècules també participen en la regulació de la formació de la connexió entorínico-hipocàmpal, d'entre elles l'ephrin 3A o la Reelina (Borrell et al., 1999a; Stein et al., 1999).

La connexions comissurals: Les connexions comissurals arriben a l'hipocamp en formació amb un cert retard respecte a les entorínico-hipocàmpiques. Els primers axons penetren a l'hipocamp contralateral a E18 i es troben a la fimbria i a la zona que esdevindrà substància blanca. A partir de P0 els axons innerven les capes *stratum oriens*

i *stratum radiatum*, i també l'hilus. A partir de P2-P5 els axons comissurals ja innerven també la porció interna de la *capa molecular* del gir dentat (Figura 12) (Super and Soriano, 1994). Finalment, aquesta connexió també patirà modificacions durant el desenvolupament postnatal: increment de la ramificació, augment de densitat d'innervació i finalment processos de refinament.

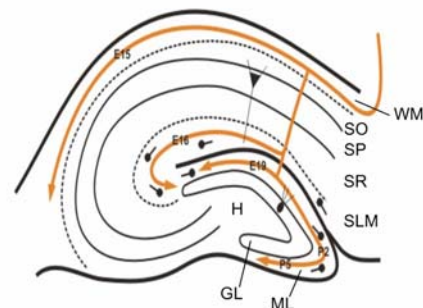
La Netrina-1 participa activament en la regulació d'aquesta connexió. La Netrina-1 s'expressa des d'estadis embrionaris inicials a la fimbria, des d'on atrau als axons comissurals de CA3 i de l'hilus, que n'expressen el receptor DCC (Skutella and Nitsch, 2001; Steup et al., 2000). A causa de la importància d'aquesta proteïna en l'establiment de les connexions hipocàmiques comissurals, els mutants deficientes en *netrina-1* mostren greus anormalitats la formació d'aquestes connexions (Barallobre et al., 2000; Serafini et al., 1996).

Sobre els axons de CA i de gir dentat també hi actuen altres molècules, que en conjunt, i sumat a l'efecte atraient de la Netrina-1 permeten l'establiment correcte de les connexions associatives/comissurals, per exemple la Sema3C, la Sema3F, l'Slit2 o l'ephrin 3A (Skutella and Nitsch, 2001).

Altres connexions de l'hipocamp: La connexió septo-hipocàmica es desenvolupa també entre E16 i P2 (Super and Soriano, 1994). La connexió recíproca entre el *septum* i l'hipocamp també es veu influenciada per molècules de guia com la Netrina-1 i les Sema3C (Pascual et al., 2004b; Skutella and Nitsch, 2001).

La formació les *fibres molsoses* està sempre en constant evolució. La zona neurogènica de l'hipocamp produeix noves neurones granulars durant tota la vida, de manera que sempre hi haurà axons en desenvolupament que innervaran l'*stratum lucidum* de la regió CA3 (apartat 2.5.2). En el guiatge d'aquesta connexió pot estar-hi participant l'Slit2, secretada pels axons entorínics i amb propietats repel·lents de les *fibres molsoses*. A més, Slit2 s'expressa a la línia mitja, factor que també pot influir en evitar les connexions comissurals per part dels axons d'aquesta connexió (Skutella and Nitsch, 2001).

(1) Fibres entoríniques



(2) Fibres comissurals

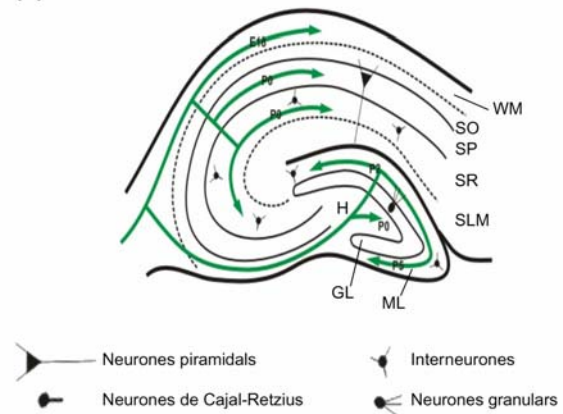


Figura 12 Desenvolupament de les fibres entoríniques i comissurals que innerven l'hipocamp. (1) Les fibres entoríniques inicien la innervació de l'hipocamp a l'edat E15 i completen la innervació de l'*stratum lacunosum moleculare* de l'hipocamp propi a partir de E16-E17; posteriorment es forma la via perforant, amb la innervació de la porció central i externa de la capa molecular per part de les fibres entoríniques (E19-P5) (panell superior). (2) Les fibres comissurals inicien la innervació de l'hipocamp contralateral a E18, a partir de P0 assoleixen l'*stratum radiatum*, l'*stratum oriens* i l'hilus; posteriorment, a P2-P5 s'innerva la porció interna de la capa molecular. E16, dia embrionari 16; P2, dia postnatal 2; WM, substància blanca; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*; SLM, *stratum lacunosum moleculare*; ML, capa molecular; GL, capa de cèl·lules granulars; H, hilus. **Adaptat de Super and Soriano, 1994; cedit per R. Ota.**

2.3.2 Les molècules implicades en el creixement i el guiatge axonals:

Les molècules de guia i els seus receptors: Algunes molècules que participen en el creixement i guiatge axonals són: la Netrina-1, les Semaphorines, les ephrines i les Slits (Barallobre et al., 2005; Dickson, 2002; Huber et al., 2003; Kruger et al., 2005; Martinez and Soriano, 2005). La *Netrina-1* indueix atracció axonal mitjançant el receptor DCC i repulsió axonal amb la participació del receptor UNC-5 en solitari o conjuntament amb el DCC. La Netrina-1 és una senyal de guia de llarg abast: difon i crea un gradient de concentracions. Per actuar a llargues distàncies requereix la participació del DCC, també en repulsió, de manera que la repulsió mitjançada per UNC-5 en solitari és de curt abast (Dickson, 2002). La família de les *Semaphorines* conté alguns membres secretables i d'altres d'units a membrana, i es divideixen en 8 classes diferents. Els seus receptors són multimèrics i tots ells inclouen una subunitat Plexina. Altres components dels receptors multimèrics són: les Neuropilines (per a Semaphorines de classe 3), l'L1 (per a Sema3A), el receptor tirosina quinasa Met (per a Sema4D) i l'OTK (per a Sema1a de *Drosophila*). Funcionen majoritàriament en processos de repulsió axonal (Dickson, 2002). La família de les *ephrines* inclou proteïnes secretables unides a membrana mitjançant grups GPI (ephrin-A) i proteïnes transmembrana (ephrin-B), que s'uneixen respectivament als receptors EphA i EphB. L'acció es produeix per contacte directe cèl·lula-cèl·lula, i en elles s'indueix la senyalització reversa: ambivalentment cap a la cèl·lula que expressa el lligand i cap a la que expressa el receptor. Sovint funcionen en sistemes en què s'estableixen mapes topogràfics i es regulen per l'expressió en gradient de les ephrines i els seus receptors (Dickson, 2002). Les *Slits* són proteïnes secretables de tamany gran que senyalitzen a través dels receptors Robo en sistemes de senyalització de curt abast. Són proteïnes multifuncionals que regulen repulsió, elongació i ramificació axonals (Dickson, 2002).

El paper que desenvolupen les Integrines en processos de guiatge axonal s'emmarca en tres paradigmes diferents: **1)** Les Integrines poden actuar de receptors de molècules de guia (ex: Netrina-1 i Sema7A); **2)** La unió de molècules de guia a receptors específics altera l'estat funcional de les Integrines (ex: Sema3 i ephrin/Eph); i **3)** La senyalització induïda per Integrines convergeix amb la senyalització induïda per molècules de guia a través de receptors específics (ex: Sema3, Slit i ephrin/Eph) (Nakamoto et al., 2004).

La senyalització al con de creixement axonal: Al con de creixement axonal té lloc la transducció de la senyal desencadenada per les molècules de guia, i compta amb la participació de factors diversos; com per exemple cAMP (i PKA) o cGMP (i PKG). Finalment, la regulació del citoesquelet d'actina té una importància molt destacada i les proteïnes Rho-GTPases hi desenvolupen un paper central (Guan and Rao, 2003). D'altra banda, també és important la regulació dels microtúbuls (Dickson, 2002).

Algunes de les molècules que habitualment participen en la regulació del citoesquelet del con de creixement axonal són: Arp2/3 (en la nucleació de nous filaments d'actina); Ena/VASP (promouent l'elongació de filopodis); molècules d'adhesió (mitjançant la interacció substrat-filaments d'actina); miosines (en la regulació del flux retrògrad del filament d'actina); i IQGAP1 i MAP1B (en la regulació de la dinàmica dels microtúbuls) (Dickson, 2002).

2.4 La sinaptogènesi i la plasticitat

El cervell és un òrgan complex format per neurones interconnectades en xarxes que es transmeten senyals elèctriques i químiques entre elles per crear idees, pensaments i emocions. Aquests senyals entre les neurones es transmeten en regions especialitzades que reben el nom de sinapsis. La majoria de neurones dels vertebrats es comuniquen a través de sinapsis químiques, que converteixen les senyals elèctriques dels potencials d'acció de la cèl·lula presinàptica en senyals químiques, que, al seu temps, indueixen noves senyals elèctriques a la neurona postsinàptica. Les sinapsis es formen majoritàriament durant el desenvolupament embrionari i postnatal primerenc; també en l'edat adulta continuen creant-se'n de noves, contribuint significativament als processos d'aprenentatge i de memòria (Waites et al., 2005).

2.4.1 La sinaptogènesi:

Un pas clau per a dur a terme la sinaptogènesi és el reconeixement de la diana. El creixement axònic aconsegueix, mitjançant complexos mecanismes de guiatge, que el terminal axònic d'una neurona presinàptica arribi a la regió on establir les connexions sinàptiques (apartat 2.3). En finalitzar el procés de guiatge, sovint passa un període de temps abans d'iniciar la sinaptogènesi, a vegades fins i tot retardant setmanes l'establiment d'aquestes connexions. L'especificitat espaciotemporal en la sinaptogènesi es regula per mecanismes que encara no han estat plenament caracteritzats. Alguns dels processos de regulació són de naturalesa intrínseca i segueixen un programa genètic predestinat, coincidint amb el rellotge cel·lular que marca la diferenciació neuronal. També hi influeixen factors secretats per la regió diana, que afecten a la maduració de la neurona presinàptica (*molècules preparatòries de sinaptogènesi*) o bé que indueixen directament la sinaptogènesi (*molècules inductores de sinaptogènesi*) (Figura 13) (Waites et al., 2005).

En el grup de *molècules preparatòries de la sinaptogènesi* s'hi poden incloure algunes molècules implicades en guiatge axonal, com Netrines o Semaphorines (apartat 2.3), malgrat que aquestes no tenen implicacions directes en sinaptogènesi. També s'hi inclouen aquelles molècules que indueixen la ramificació axònica (Wnts) o que promouen la maduració o diferenciació de la neurona presinàptica (BDNF). Aquestes molècules tenen una acció difusa i no es localitzen a la regió exacta de formació de la sinapsi, sinó que afavoreixen indirectament que aquesta es pugui arribar a formar. De *molècules inductores de sinaptogènesi* en trobem de diferents classes; les que afecten

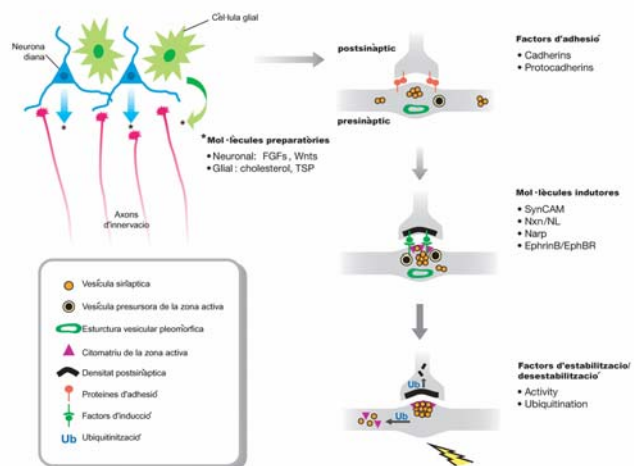


Figura 13 La sinaptogènesi. La complexitat del procés de formació de sinapsis es troba regulat a diferents nivells per molècules preparatòries, d'adhesió, inductores i d'estabilització/desestabilització. *Adaptat de Waites et al., 2005.*

als processos d'adhesió (CAMs) especifiquen la regió exacta de contacte; també hi ha molècules que indueixen directament la sinapsi (Narp, EphrinB, SynCAM); i finalment d'altres participen en els processos d'estabilització de la sinapsi formada. L'estabilització i maduració de la sinapsi és un procés que es veu influenciat per activitat (Waites et al., 2005).

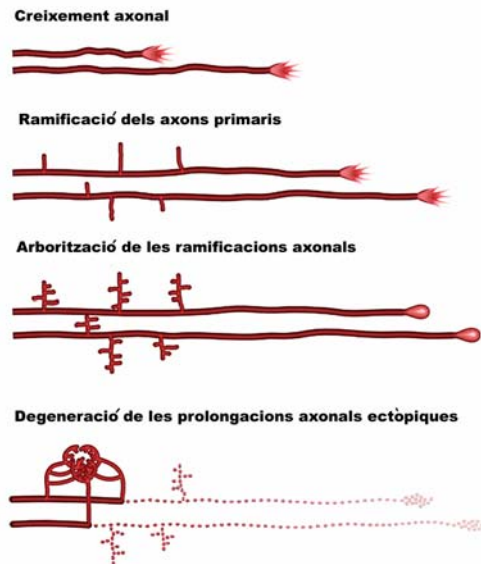


Figura 14 El procés de poda axonal per degeneració de les prolongacions axonals ectòpiques. Adaptat de Luo and O'Leary D., 2005.

Durant el desenvolupament, hi ha fases d'exuberància en la formació de sinapsis, llavors cal eliminar les connexions que no són necessàries mitjançant mecanismes de poda (o eliminació selectiva d'axons col·laterals) (Figura 14). Aquests processos de refinament sovint es veuen influenciats per l'activitat neuronal i poden produir-se a escala local o bé afectar porcions importants de l'axó. El mecanisme de poda a escala local és la retracció axonal; mentre que per produir l'eliminació selectiva d'axons a més gran escala es produeix la degeneració (Luo and O'Leary D, 2005). Els mecanismes per produir la sinaptogènesi i el refinament de les connexions són similars tan durant el desenvolupament com en els processos de l'edat adulta: aprenentatge, memòria i degeneració.

La sinapsi química: Les sinapsis químiques tenen una estructura asimètrica que conté diferents regions especialitzades. A la porció presinàptica hi apareix el botó terminal presinàptic, una protuberància d'aproximadament $1\mu\text{m}$ de tamany i que conté les vesícules sinàptiques plenes de neurotransmissor. L'arribada de potencials d'acció provoca la fusió de les vesícules amb la zona activa de la membrana del botó sinàptic i l'alliberament del neurotransmissor.

A la membrana postsinàptica trobem la regió de densitat postsinàptica (PSD, o *postsynaptic density*), on s'acumulen els receptors de neurotransmissor, molècules de senyalització i els canals dependents de voltatge.

Les espines dendrítiques: Les espines dendrítiques són una especialització de la membrana postsinàptica en forma de protuberància de $1-2\mu\text{m}$. Les espines dendrítiques poden formar-se *de novo* o bé desenvolupar-se a partir de sinapsis de base prèvies que no presentaven estructura en espines (Segal, 2005).

Aquestes dues formes d'originar espines dendrítiques tenen també mecanismes moleculars diferents. Així, les espines formades *de novo* apareixen en neurones immadures que en estendre filopodis busquen el contacte amb regions presinàptiques. En contactar-hi, el filopodi arrossega l'axó cap a la base de la dendrita i des d'allà es forma l'espina. En canvi, en neurones madures no s'observa la presència de filopodis i possiblement el mecanisme de formació d'espines és diferent (Segal, 2005).

La poda d'espines dendrítiques és un procés habitual en determinades situacions de l'edat adulta i comporta la desaparició de l'estructura típica de l'espina. La poda pot arribar a ser bastant generalitzada (fins al 30% n els animals en hibernació) i requereix un procés actiu amb la participació de receptors NMDA. La poda de l'espina no comporta la desunió de les porcions pre- i postsinàptiques, sinó que la sinapsis es manté a la base de la dendrita. Les espines reapareixen al mateix lloc quan l'estímul desapareix (Segal, 2005).

La dinàmica dels filaments d'actina és clau en el procés de plasticitat en què hi participen les espines dendrítiques (Matus, 2005).

2.4.2 La plasticitat sinàptica; la memòria i l'aprenentatge:

La plasticitat sinàptica és un fenomen fisiològic a través del qual els canvis en l'activitat neuronal provoquen modificacions de l'eficàcia sinàptica i de l'excitabilitat neural que perduren en el temps més enllà que la causa que els origina. És un fenomen vital per als processos de memòria. La hipòtesi de la plasticitat sinàptica i la memòria (hipòtesi SPM, o *synaptic plasticity and memory hypothesis*) és la següent: *la plasticitat sinàptica dependent d'activitat s'indueix en determinades sinapsis durant el procés de formació de la memòria, i és necessària i suficient per l'emmagatzematge d'informació* (Martin et al., 2000).

Hi ha diferents formes de plasticitat sinàptica d'entre les quals destaca la potenciació a llarg termini (LTP, o *long-term potentiation*). L'LTP consisteix en l'increment de l'amplitud dels potencials sinàptics evocats per estimulacions freqüents (Martin et al., 2000). L'LTP fou inicialment caracteritzat en hipocamp però es produeix també en moltes altres regions del cervell i acostuma a ser glutamatèrgic i induït per receptors NMDA. Una altra forma de plasticitat sinàptica és la depressió a llarg termini (LTD, o *long-term depression*), un procés de pèrdua d'eficàcia sinàptica de forma dependent d'activitat. Aquest procés s'ha observat, entre d'altres, a la regió CA1 de l'hipocamp i també pot ser mitjançat per receptors NMDA. Els processos d'LTP i LTD són regulacions específiques a l'alça o a la baixa de la força d'una sinapsis de com a mínim 1 hora de durada. LTP i LTD no tenen funcions diferents; no s'associen a l'aprenentatge i a l'oblit respectivament, sinó que juntes determinen el llindar de senyal a partir del qual s'emmagatzema informació (Martin et al., 2000).

Diverses propietats dels processos de plasticitat sinàptica corroboren la seva participació en processos de memòria i aprenentatge: la seva inducció és associativa; s'indueix de forma específica; persisteix en el temps; i és influenciada per la història prèvia d'activitat sinàptica (té metaplasticitat). A més, a les regions del cervell implicades en memòria s'hi produeixen processos de plasticitat sinàptica. És important remarcar que "plasticitat sinàptica" no és un sinònim de "memòria"; la memòria no s'explica únicament per la plasticitat sinàptica, però la plasticitat sinàptica permet que hi hagi memòria (Martin et al., 2000).

L' LTP: Els processos d'LTP és dependent d'activitat, alhora però, es veu influenciada per diferents molècules que n'afecten i en regulen les característiques. D'entre les molècules que hi participen, en destaquen, per la relació amb la temàtica d'aquesta tesi doctoral, la Reelina i els seus receptors (ApoER2/VLDLR). Així com els receptors d'NMDA, que alhora també es veuen regulats per la Reelina (Chen et al., 2005). La

Reelina induïx LTP en hipocamp de forma depenent dels receptors ApoER2/VLDLR (Weeber et al., 2002). Aquesta modulació de la plasticitat sinàptica ocasionada per Reelina requereix l'empalmament alternatiu (o *splicing* alternatiu) del propi receptor ApoER2 (Beffert et al., 2005).

Les espines dendrítiques en plasticitat: En el procés de plasticitat sinàptica i d'emmagatzematge de memòria, les espines dendrítiques pateixen canvis morfològics persistents. L'augment de tamany del cap de les espines s'observa en models d'LTP, alhora que es formen noves espines. *In vivo*, models d'aprenentatge comporten un augment del nombre d'espines en determinades regions cerebrals. El cas contrari succeeix en models d'LTD, on s'observa disminució del tamany de les espines. Tot i així no es pot considerar que la "memòria" resideixi a les espines dendrítiques. De fet, els canvis de plasticitat no afecten únicament al cap de l'espina, sinó que també afecten al terminal presinàptic i a la base de l'espina. La plasticitat sinàptica, i sobretot la memòria, són processos complexos que no es limiten a la formació/desaparició d'espines dendrítiques; en conseqüència el seu estudi és també complex i per ara el coneixement que se'n deriva és encara incomplet (Segal, 2005).

2.5 La neurogènesi a l'edat adulta

En el SNC adult dels mamífers, hi ha dues regions germinals on es troben les cèl·lules mare amb capacitat per produir noves neurones. La zona subventricular (SVZ) és la regió neurogènica situada a la paret lateral dels ventricles lateral i origina noves neurones GABAèrgiques que s'integren als circuits del bulb olfatori. La zona subgranular (SGZ) és la regió neurogènica de la formació hipocàmica i dona lloc a noves neurones granulars que s'integren al terç inferior de la *capa de cèl·lules granulars* del gir dentat (Doetsch and Hen, 2005).

Tant a la SVZ com a la SGZ, les cèl·lules mare que originen noves neurones corresponen a un subgrup de cèl·lules astrocitàries. Fugint del model tradicional segons el qual els progenitors glial i neuronal divergien en etapes inicials del desenvolupament, recentment s'ha postulat que diversos subtipus d'astròcits tenen la potencialitat d'originar neurones (Doetsch, 2003). Els factors que regulen *in vivo* la proliferació en aquestes regions són diversos, i conjuntament delimiten les regions on la neurogènesi en adult és possible. Entre d'altres, els factors de creixement FGF i EGF, Notch1, TGF α , APP, neurotransmissors (Dopamina, 5-HT, Noradrenalina) i hormones (estrogen, hormona tiroidea) (Hagg, 2005; Ming and Song, 2005). En d'altres regions del SNC com la substància negra o l'escorça també sembla haver-hi progenitors neuronals, tot i mantenir-s'hi en fase latent, sense que l'entorn n'indueixi la proliferació (Lie et al., 2002; Palmer et al., 1999).

Una vegada generats els neuroblasts en les SGZ i SVZ, aquests migren fins a establir-se a la seva zona de destí; allà, maduren i s'integren en els circuits ja establerts per esdevenir neurones funcionalment actives. En el cas de la SVZ el procés de migració és llarg, des de la zona de proliferació al ventricle lateral i fins al bulb olfatori. En canvi, la zona de destí dels neuroblasts de la SGZ és contigua a la seva zona de proliferació (Ming and Song, 2005).

En tots dos casos, la integració de les noves neurones en el sistema de destí és relativament simple. Els contactes sinàptics de nova formació s'estableixen amb un nombre reduït de cèl·lules diana. Són connexions de curt abast i no requereixen la formació d'axons mielinitzats.

2.5.1 La neurogènesi a la SVZ:

La SVZ es manté separada del ventricle lateral per una monocapa de cèl·lules endodermals i presenta una composició cel·lular que està molt ben caracteritzada. Els astròcits proliferants, també anomenats cèl·lules B, són les cèl·lules mare d'aquesta regió neurogènica i comparteixen algunes característiques morfològiques comuns amb les cèl·lules mare del neuroepiteli embrionari. Per exemple, ocasionalment estenen prolongacions amb un únic cili a través de la capa de cèl·lules endodermals i contacten directament amb el ventricle lateral. La taxa de divisió de les cèl·lules B és baixa i són les progenitores d'un altre tipus cel·lular: les cèl·lules C. Aquestes cèl·lules C formen grups de cèl·lules que es divideixen ràpidament per originar els neuroblasts (cèl·lules A) (Alvarez-Buylla and Lim, 2004).

Migració tangencial i migració radial: Les cèl·lules A generades a la SVZ estableixen interaccions homofiliques entre elles i formen cadenes de neuroblasts migrants que es troben envoltades per cèl·lules B astrocitàries. La migració es produeix

des de la SVZ fins a l'entrada del bulb olfatori; una ruta de migració anomenada *via de migració rostral* (RMS) i que és característicament tangencial. Aquestes cèl·lules migrants expressen marcadors propis de neurones immadures (per exemple Dlx2 i PSA-NCAM) (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Ming and Song, 2005).

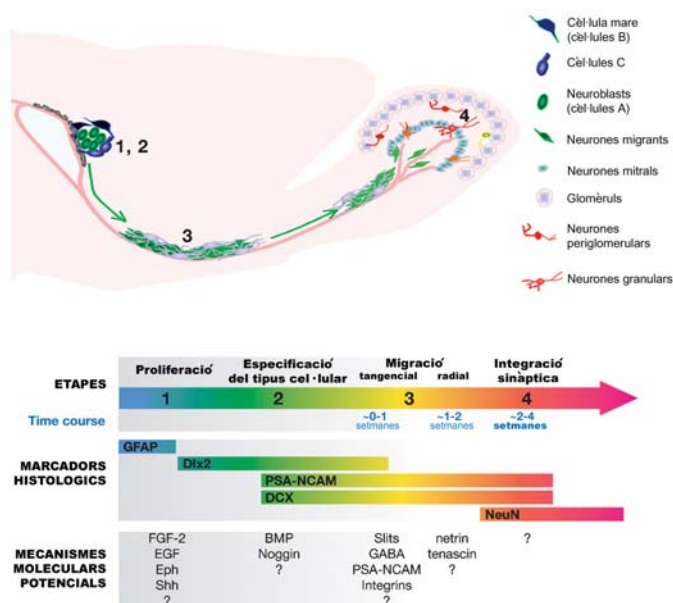


Figura 15 La neurogènesi a la SVZ. La proliferació de les cèl·lules mare de la SVZ (cèl·lules B) origina les cèl·lules C que proliferen ràpidament i generen els neuroblasts (cèl·lules A). La migració tangencial dels neuroblasts per la RMS fa que arribin al bulb olfatori, on inicien una migració radial fins a integrar-s'hi com a neurones granulars o periglomerulars. *Adaptat de Ming and Song, 2005.*

El final del procés migratori tangencial es produeix a l'entrada del bulb olfatori, on els neuroblasts abandonen la RMS i penetren de forma individual a les estructures laminades del bulb olfatori. El procés de migració deixa de ser tangencial (en cadenes) i es converteix en radial i individualitzat (Figura 15). Aquest és un pas clau en la migració de les neurones de la SVZ i està induït per la proteïna Reelina (Hack et al., 2002). La Reelina produeix *in vitro* el trencament de les interaccions homofíliques entre els neuroblasts migrants i en provoca la seva individualització. De fet, les cèl·lules migrants de la RMS expressen proteïnes de la via de senyalització de la Reelina, com el receptor de la Reelina

ApoER2 i la proteïna adaptadora mDab1; i per tant tenen la capacitat de respondre a l'estimulació provocada per Reelina (Hack et al., 2002). A nivell de bulb olfatori la Reelina és secretada per les cèl·lules mitrals (Alcantara et al., 1998), des d'on difon fins al punt d'entrada de la RMS al bulb olfatori induïnt la desunió de les cèl·lules en migració i provocant l'inici de la migració radial.

La participació de la Reelina en aquest procés es corrobora pel fenotip que presenten els ratolins *reeler* (ratolins deficients en *reelina*). En aquests animals, la RMS es veu alterada des del punt d'entrada al bulb olfatori, on es produeix una acumulació de neuroblasts, incapaços d'iniciar la migració radial. Per tant, en els animals *reeler* la migració tangencial dels progenitors neuronals es produeix amb total normalitat, però s'observa un bloqueig en el punt on les cèl·lules migrants han d'abandonar la RMS (Hack et al., 2002).

Integració de les noves neurones al sistema olfatiu: El percentatge més alt de noves neurones del bulb olfatori correspon a les neurones granulars, i representen fins a un 97% del total; també hi ha una part dels neuroblasts que arriben al bulb olfatori que es diferencia a cèl·lules periglomerulars (Ming and Song, 2005). Les neurones granulars tenen una connectivitat relativament simple: no estenen axons i estableixen únicament contactes dendrodendrítics amb les neurones glutamatèrgiques del seu entorn immediat (apartats 1.2.4 i 1.3.3).

Les noves cèl·lules granulars i periglomerulars s'integren plenament al sistema olfatori (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003); i mostren un índex de supervivència que depèn d'activitat. A diferència del que succeeix en processos de desenvolupament embrionaris i en les neurones periglomerulars, les neurones granulars necessiten rebre contactes sinàptics, a banda d'adquirir la capacitat de generar potencials d'acció (Doetsch and Hen, 2005; Ming and Song, 2005). Aquest procés d'incorporació de noves neurones és una forma d'adaptació del sistema olfatori als ambients canviants, així, per exemple, ambients enriquits en substàncies oloroses afavoreixen la supervivència de les neurones de nova generació. En conjunt, l'increment o la desaparició d'interneurones del bulb olfatori afecta a la discriminació d'olors i a la memòria olfactiva (Doetsch and Hen, 2005).

2.5.2 La neurogènesi a la SGZ:

La SGZ es troba situada entre la *capa de cèl·lules granulars* i l'*hilus*. Els neuroblasts que es generen en aquesta zona migren una distància molt curta, fins a integrar-se al terç inferior de la *capa de cèl·lules granulars*. Les cèl·lules mare de la SGZ reben el nom de cèl·lules B i presenten marcadors, morfologia i característiques ultraestructurals pròpies dels astròcits (Ming and Song, 2005).

De manera similar al que passa a la SVZ, les cèl·lules B de la SGZ generen uns precursors intermedis que reben el nom de cèl·lules D. Les cèl·lules D realitzen el curt procés de migració i donen origen a les cèl·lules G, les neurones granulars (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Les noves neurones granulars del gir dentat s'incorporen a la *capa de cèl·lules granulars* del gir, en el terç inferior de la capa (Doetsch and Hen, 2005; Wang et al., 2000). Durant el procés de diferenciació, les noves cèl·lules estenen les seves arboritzacions dendrítiques per la capa molecular i expressen marcadors característics de neurones immadures com per exemple Doublecortina, PSA-NCAM o Calretinina (Ming and Song, 2005). Durant el seu recorregut, les fibres molsoses contacten col·lateralment amb les cèl·lules molsoses de l'hilus. Potser això els ajuda a fer el guiatge d'aquests axons. Finalment, les cèl·lules G s'integren en els circuits establerts, esdevenint neurones funcionals (van Praag et al., 2002). Tot i així, les propietats electrofisiològiques de les noves neurones són sensiblement diferents de les neurones madures (Doetsch and Hen, 2005).

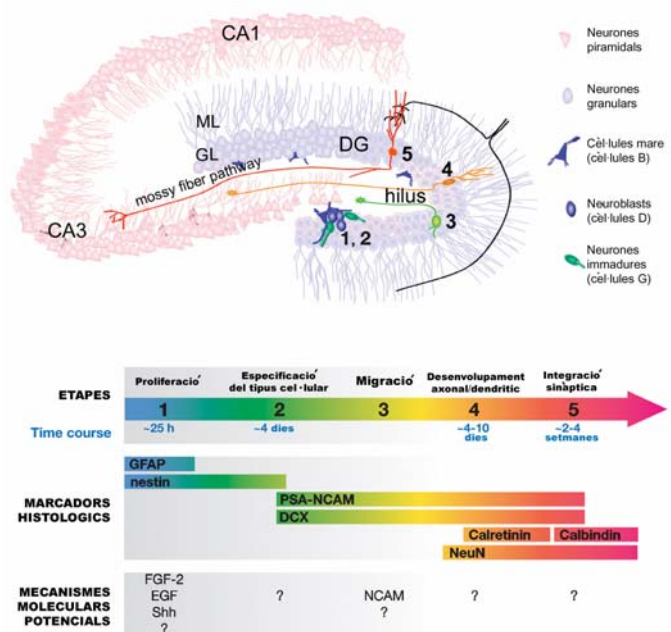


Figura 16 La neurogènesi a la SGZ. La proliferació de les cèl·lules mare de la SGZ (cèl·lules B) origina les cèl·lules D, els precursors intermedis que migren i s'integren al gir dentat com a neurones granulars (cèl·lules G). DG, gir dentat; ML, capa molecular; GL, capa de cèl·lules granulars. *Adaptat de Ming and Song, 2005.*

Les neurones granulars del gir dentat tenen una connectivitat poc complexa (apartat 1.3.1), com ja passava amb les noves neurones del bulb olfactori. En aquest cas, les neurones de nova formació sí que tenen axons, però no estan mielinitzats. Els seus axons formen part de la connexió de les *fibres molsoses* i per tant contacten a un mateix nivell septotemporal amb les cèl·lules de la seva regió diana (cèl·lules piramidals de CA3), situades molt a prop del gir dentat. Les sinapsis dels axons de les neurones granulars s'estableixen amb un nombre reduït de cèl·lules, fins a un màxim de 14-28 cèl·lules diana, un altre exemple de la simplicitat connectiva d'aquestes noves neurones. La capacitat de supervivència de les noves neurones a l'hipocamp adult està regulada (positivament i negativa) per factors externs com són l'enriquiment ambiental, l'estrès o l'aprenentatge (Deisseroth et al., 2004; Doetsch and Hen, 2005; Leuner et al., 2004).

Introducció (3)

El paper de la Reelina en el desenvolupament

El paper preponderant que juga la proteïna Reelina en el desenvolupament del SNC l'ha convertida en una peça clau en el seu estudi.

L'anàlisi del gen, de la proteïna, dels seus receptors i de la senyalització intracel·lular que desencadena, estan aportant noves dades que n'ajuden a entendre la funció i la manera com es duu a terme.

3.1 El gen i la proteïna:

Un dels primers passos en la caracterització del gen *reelina* fou el mapatge de la mutació espontània *reeler* en un locus del cromosoma 5 (Bar et al., 1995; Goffinet and Démoncourt, 1991; Miao et al., 1994). A partir d'aquí es va poder identificar i clonar aquest gen, i alhora descriure'n el seu producte proteic, la Reelina, com a integrant de la matriu extracel·lular; l'absència del gen *reelina* és la causa de les anormalitats del desenvolupament dels animals *reeler* (D'Arcangelo et al., 1995).

3.1.1 El gen *reelina*:

El gen *reelina* ocupa una extensió total de 450 kilobases (kb) del cromosoma 5 de ratolí (5 A3-B1; 5 8.0 cM; GeneID: 19699; Locus tag: MGI:103022) (gi:28503604) i està format per 65 exons de longitud diversa, d'entre 6 i 1104 parells de bases. La frontera exó-intró està sempre franquejada per seqüències consens de donant (GT) i acceptor (AG) d'empalmament, o *splicing*; excepte pel donant d'*splicing* de l'intró 30, que comença amb la seqüència GC. Els diversos introns del gen *reelina* tenen longituds encara més variades, que oscil·len entre els 100 parells de bases (bp) dels introns 35, 39 i 54 i les més de 50kb dels introns 1, 2 i 3. La meitat dels introns dels gen *reelina* es troben en fase 2 (interrupció del codó després de la segona base), una proporció tres vegades més alta que la de la majoria dels gens dels mamífer (Royaux et al., 1997; Tissir and Goffinet, 2003).

La forma completa, o *full-length*, de l'mRNA de *reelina* conté un total d'11673bp (gi:2702252 i gi:3755311), n'és la variant d'*splicing* més comú i és específicament neuronal. No obstant, existeixen dues altres variants d'*splicing*, totes amb diferències a la regió 3' de l'mRNA. Els *splicings* alternatius són una possible via de regulació de la funció gènica i són relativament comuns en gens que codifiquen per proteïnes grans de matriu extracel·lular. En el cas de la Reelina, els *splicings* alternatius es troben evolutivament conservats entre diferents espècies, indicant, a nivell putatiu, que tenen una importància rellevant. D'una banda, per *splicing* alternatiu es pot produir la pèrdua del microexó 64, l'únic que és específic de l'mRNA de la Reelina neuronal. En aquests casos es fa l'*splicing* de l'intró 63, l'exó 64 i l'intró 64 com a una única seqüència intrònica. D'altra banda, quan no s'utilitza el donant habitual d'*splicing* de l'exó 63, apareix un exó més llarg (exó 63a) que conté un lloc de poliadenilació i un codó STOP alternatiu, originant una proteïna més curta, sense l'extrem C-terminal (Lambert de Rouvroit et al., 1999a; Tissir and Goffinet, 2003).

La regulació de l'expressió: L'expressió de la Reelina es produeix en tipus cel·lulars molt definits (les cèl·lules de CR entre d'altres) i amb una delimitació temporal precisa, reflex d'un elevat grau de regulació del gen. Diversos estudis del promotor (ric en C i G) indiquen que la metil·lació pot participar activament com a mecanisme epigenètic de regulació de l'expressió de la Reelina. Així, una menor expressió de la Reelina i un augment de la metil·lació del promotor s'ha detectat en pacients d'esquizofrènia, una afectació associada amb la disminució de l'expressió de la Reelina. Estudis recents indiquen que la proteïna DNA metiltransferasa (Dnmt) 1 seria la responsable de la metil·lació del promotor de la Reelina (Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002b; Impagnatiello et al., 1998; Tremolizzo et al., 2002).

D'altra banda, el promotor de la Reelina conté una seqüència consens, la *T-element*, d'unió del factor de transcripció Tbr-1. La deficiència de *tbr-1* produeix anomalies del desenvolupament similars a les descrites en els animals *reeler* (apartat 4.1.3), motiu pel qual s'analitzà la seva participació en la transcripció del gen *reelina*. En disposar gens *reporter* sota el control del promotor de la Reelina, es va poder comprovar la participació de Tbr-1, i també de les proteïnes CASK i CINAP, en la inducció de l'expressió a partir del promotor de la Reelina (Bredt, 2000; Hevner et al., 2001; Hsueh et al., 2000; Wang et al., 2004). Finalment, també s'ha relacionat l'hormona tiroidea en la regulació de l'expressió del gen *reelina* si bé no se'n coneix el mecanisme d'acció; concretament les rates hipotiroidees tenen disminuïda l'expressió de *reelina*, que s'incrementa per administració d'hormona tant *in vivo* com *in vitro* (Alvarez-Dolado et al., 1999).

Malgrat aquestes evidències, encara es manté un elevat grau de controvèrsia respecte a la forma precisa de regulació d'aquest gen. El tamany gran dels introns 1, 2 i 3 de l'mRNA fa pensar que aquests també poden actuar com a regions reguladores. Això explicaria l'elevada activitat del promotor de la Reelina davant de gens *reporter* lliures d'elements reguladors intrònics (Tissir and Goffinet, 2003).

3.1.2 La proteïna Reelina:

La forma *full-length* de la proteïna Reelina té 3461 aminoàcids (aa), dels quals 27aa constitueixen el pèptid senyal que en dirigeix la secreció (D'Arcangelo et al., 1995). La resta de la proteïna, que es secreta a l'espai extracel·lular, conté en el seu extrem N-terminal un domini amb homologia a la F-spondina. La proteïna F-spondina forma part de matriu extracel·lular i dirigeix la migració cel·lular i el creixement axonal de les cèl·lules de la cresta neural. En la Reelina, el domini homòleg a F-spondina s'estén 163aa. A continuació, la

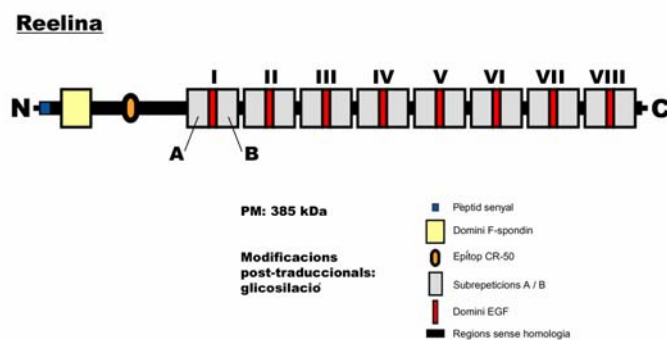


Figura 17 La seqüència de la proteïna Reelina. A l'extrem N-terminal (N) conté un pèptid senyal per a la seva secreció, seguit d'un domini amb homologia a la proteïna F-spondin. Cada un dels vuit dominis repetits de la Reelina (I-VIII) té dues subrepeticions homòlogues (A i B) separades per una seqüència 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.

seqüència de la Reelina presenta una regió de vital importància funcional que no té homologia a d'altres proteïnes; és en aquest domini on hi ha l'epítot CR-50. La presència, *in vitro* i *in vivo*, d'anticossos dirigits contra el domini CR-50 provoca el bloqueig de la funció de la Reelina (Nakajima et al., 1997). La resta de la proteïna està formada per la repetició de 8 dominis d'aproximadament 350aa i finalment d'un fragment C-terminal que conté càrregues positives i és imprescindible per a la secreció de la proteïna (Figura 17) (D'Arcangelo et al., 1997).

Les repeticions en la seqüència de la Reelina: La part central, i més extensa, de la seqüència aminoacídica de la Reelina està formada per la repetició de 8 fragments. Cada un d'ells conté dues subrepeticions homòlogues (anomenades A i B) separades per un domini amb homologia a EGF. Els dominis homòlegs a EGF són rics en cisteïnes, que hi tenen la seva posició conservada. També es troba conservada la seqüència aminoacídica i la posició dels introns les 8 repeticions, especialment en els segments B; indicant que les 8 repeticions de la Reelina s'han generat evolutivament per duplicació (Rice and Curran, 2001; Royaux et al., 1997; Tissir and Goffinet, 2003).

Modificacions posttraduccional: El pes molecular aparent de la forma *full-length* de la Reelina en gels d'electroforesi SDS-PAGE és d'aproximadament 420 kDa, uns 40 kDa superior al seu pes teòric de 387.5 kDa (Tissir and Goffinet, 2003). La incorporació d'elements posttraduccional es va estudiar digerint la Reelina amb diverses glicosidases i estudiant-ne la disminució de pes molecular aparent. D'aquesta manera es va poder determinar que la Reelina està sotmesa a processos d'N-glicosilació i en menor mesura d'O-glicosilació; en canvi no s'han detectat unió a cadenes laterals d'àcid siàlic, condroitina sulfat o dermatan sulfat (D'Arcangelo et al., 1997).

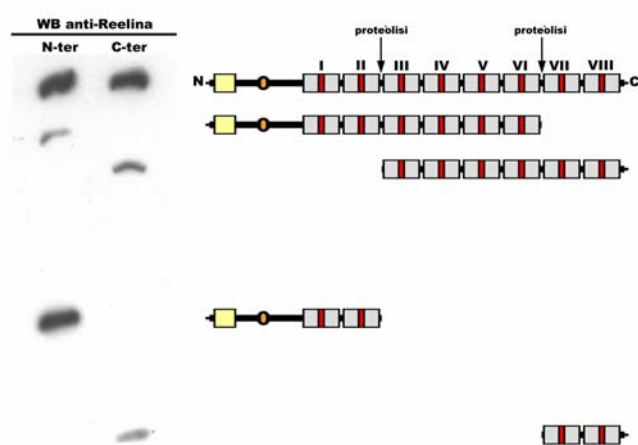


Figura 18 Proteòlisi de la Reelina. La forma *full-length* (dalt) presenta dos llocs de proteòlisi situats en les zones d'unió entre els dominis repetits II-III i VI-VII. S'originen diferents fragments proteolítics que poden ser reconeguts per western blot amb anticossos dirigits contra diferents regions de la proteïna (esquerra; a la dreta l'esquematització dels fragments detectats). Anticossos anti-N-ter (G10); anticossos anti-C-ter (14 i 12). *Adaptat de Jossin et al., 2003a.*

Proteòlisi: Quan s'analitza per Western Blot (WB) la proteïna Reelina procedent d'extractes de cervell, de plasma o l'expressada en sistemes heteròlegs (com per transfecció en 293T del cDNA de *reelin*), crida l'atenció l'aparició de bandes específiques que no es corresponen a la forma *full-length* (Figura 18). La detecció d'aquestes bandes amb anticossos contra l'extrem N-terminal els atribueix un pes molecular estimat de 300, 250 i 180 kDa. La proteòlisi de la Reelina es duu a terme per una metal·loproteïnasa (Lambert de Rouvroit et al., 1999b). Fins i tot s'ha arribat a suggerir que podria ser la pròpia Reelina qui realitza aquesta activitat proteolítica

sobre si mateixa (Quattrocchi et al., 2002). En qualsevol cas, un anàlisi detallat dels punts de proteòlisi de la seqüència de la Reelina ha permès situar-ne dos amb precisió. Un d'aquests llocs de tall es troba entre els dominis repetits II i III, mentre que l'altre tall es localitza just entre els dominis repetits VI i VII (Tissir and Goffinet, 2003). La regió central de la Reelina, de pes molecular 100kDa, i que en conté els dominis repetits III-VI, és imprescindible per la seva funció, i suficient per induir-ne la senyalització en sistemes *in vitro* (Jossin et al., 2004); alhora, tant *in vivo* com *in vitro*, el domini N-terminal CR-50 també és de vital importància (Nakajima et al., 1997).

En conjunt però, encara es manté la incertesa respecte a la importància funcional de la proteòlisi de la Reelina, i respecte a quin, o quins, dels fragments generats són responsables de la seva funció *in vivo*.

Dimerització: A nivell d'interaccions proteïna-proteïna, cal remarcar que la Reelina és capaç d'interaccionar amb altres molècules de Reelina. *In vivo* i *in vitro*, en aquestes interaccions homofíliques hi participa el domini CR-50 de l'extrem N-terminal de la seqüència proteica (Utsunomiya-Tate et al., 2000). Les interaccions entre diferents molècules de Reelina es limiten, en condicions fisiològiques, a la formació d'homodímers; la multimerització o polimerització dels dominis CR-50 només es produeix si es sintetitzen pèptids de longitud curta, no pas en el context de la Reelina *full-length* (Kubo et al., 2002). El domini N-terminal CR-50 podria ser clau per a la funcionalitat de la Reelina en tant que domini de dimerització, aconseguint que la concentració efectiva de la Reelina augmenti en la zona d'interacció amb els receptors (Utsunomiya-Tate et al., 2000) o bé facilitant-ne la multimerització.

Anticossos anti-Reelina: El reconeixement específic de la proteïna Reelina mitjançant anticossos es va fer per primer cop amb l'anticòs monoclonal CR-50, que reconeix un epítóp situat a la regió N-terminal de la proteïna (residus 251-407) (D'Arcangelo et al., 1997). L'anticòs CR-50, a més, és capaç de bloquejar la funció de la Reelina tant *in vitro* com *in vivo* (Nakajima et al., 1997). La causa del bloqueig de funció per part del CR-50 s'explicaria per la inhibició de la dimerització de la Reelina; en canvi, no s'alteraria de manera directa la unió Reelina-receptors ja que aquesta es produeix per la regió central de la Reelina (Jossin et al., 2004). Així doncs, la presència de CR-50 impossibilita la funció de la Reelina per mecanismes encara no del tot caracteritzats.

L'anticòs CR-50 únicament reconeix l'extrem N-terminal de la forma nativa de la Reelina i no es pot utilitzar en WB. Complementàriament, s'han produït diversos anticossos que també reconeixen la seqüència peptídica de la Reelina però en regions diverses. D'anticossos policlonals n'hi ha contra l'extrem N-terminal (rp4; residus 381-399) i contra l'extrem C-terminal (rp5; residus 3443-3461) (de Bergeyck et al., 1997); i d'anticossos monoclonals se n'han també contra els dos extrems de la proteïna: el G10 (residus 164-496), el 142 (residus 40-189; reconeix també la Reelina humana) o el 12 (residus 3052-3428) (de Bergeyck et al., 1998). Finalment cal mencionar que en realitzar el clonatge del cDNA de la Reelina, s'hi incorporà un epítóp *c-myc* entre els residus 1836-1837, i que pot ésser detectat en la Reelina recombinant produïda a partir d'aquell vector (D'Arcangelo et al., 1995).

La secreció de la Reelina: La Reelina és una proteïna que es secreta a l'espai extracel·lular. Mitjançant estudis de microscopia s'ha pogut determinar que la secreció es pot produir a través dels axons, mitjançant la participació d'un reticle endoplasmàtic especialitzat que transporta aquesta proteïna fins als terminals axònics de les cèl·lules que expressen la Reelina, com en les neurones de Cajal-Retzius (Derer et al., 2001).

3.1.3 El patró d'expressió de *reelina*:

El patró d'expressió de la Reelina en SNC ha estat analitzat i caracteritzat amb detall, no obstant, 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 del gen *reelina*) s'expressa la meitat de la proteïna que en els animals normals (Smalheiser et al., 2000). Els animals *reeler* heterozigots han estat hipnotitzats com a model d'esquizofrènia (apartat 4.1.1), i de fet, els pacients afectats per aquesta malaltia hi comparteixen diverses característiques, entre les quals la disminució de la Reelina en sang i en cervell (Fatemi et al., 2001; Tuetting et al., 1999).

En sang es detecten tant la forma *full-length* 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 pituitàries, com les glàndules adrenals, com el fetge n'expressen. Però l'extirpació quirúrgica de les citades glàndules no n'altera els nivells sanguinis, indicant que la part principal de la Reelina plasmàtica procedeix del fetge, on, a més, la Reelina expressada no s'acumula (Smalheiser et al., 2000).

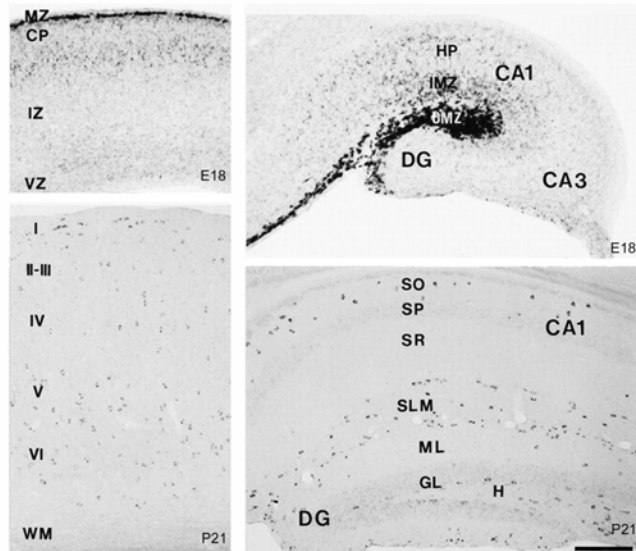


Figura 19 Hibridacions *in situ* de l'mRNA de la *reelina* en escorça i hipocamp. Durant el desenvolupament embrionari, l'expressió de la *reelina* es localitza en cèl·lules de Cajal-Retzius, situades a la zona marginal (MZ) de l'escorça (panell superior esquerre) i a la zona marginal externa (OMZ) de l'hipocamp (panell superior dret). A l'edat adulta l'expressió majoritària de la *reelina* es localitza en interneurons que es distribueixen per les diverses capes de l'escorça i l'hipocamp (panells inferiors). E18, dia embrionari 18; P21, dia postnatal 21; MZ, zona marginal; CP, placa cortical; IZ, zona intermèdia; VZ zona ventricular; HP, placa hipocàmpica; IMZ, zona marginal interna; OMZ, zona marginal externa; DG, gir dentat; (I-VI), capes de l'escorça; WM, substància blanca; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*; SLM, *stratum lacunosum moleculare*; ML, capa molecular; GL, capa de cèl·lules granulars; H, hilus. **Adaptat d'Alcantara et al., 1998.**

L'expressió de la Reelina en 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 (Figura 19). A partir de P5, les neurones de CR comencen a desaparèixer; coincidint amb això, l'expressió de la Reelina disminueix i es concentra en un tipus cel·lular diferent: 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 (*Figura 19*). 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 (apartat 2.1.2) (Alcantara et al., 1998).

Les altres regions del cervell anterior on s'expressa el gen *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).

D'altra banda, i fora de l'abast de la temàtica d'aquesta tesi doctoral la Reelina s'expressa també en cerebel i medul·la, on també participa de forma important en processos de desenvolupament i posicionament neuronal (Alcantara et al., 1998; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003).

3.2 Els receptors de la Reelina:

La unió de la Reelina als seus receptors específics desencadena una cascada de senyalització intracel·lular que possibilita l'efecte de la Reelina sobre les cèl·lules que hi responen. Hi ha diferents tipus de receptors que han estat hipotetitzats com a receptors de les molècules de la Reelina: el receptor de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDLR, o LRP8, o *very low-density lipoprotein receptor*); el receptor d'apolipoproteïna E 2 (ApoER2, o LRP7/8B, o *apolipoprotein E receptor 2*); les integrines $\alpha 3\beta 1$; i els receptors neuronals similars a Cadherina (CNR, o *Cadherin-related neuronal receptor*) (D'Arcangelo et al., 1999; Dulabon et al., 2000; Hiesberger et al., 1999; Senzaki et al., 1999).

D'entre els diversos receptors que uneixen Reelina, únicament els receptors VLDLR i ApoER2 tenen una funció essencial, contrastada i indiscutida en la senyalització de la Reelina i en la seva funció. Respecte a les Integrines i als CNRs, hi ha molta controvèrsia i poques dades que en confirmin una participació destacada en la transducció intracel·lular de la senyal desencadenada per la Reelina.

3.2.1 Els receptors VLDLR i ApoER2:

La família de receptors de lipoproteïnes conté diversos membres i se'n coneix una participació activa en la senyalització en el cervell en desenvolupament (Cooper and Howell, 1999; Herz and Bock, 2002). Més recentment, s'han relacionat també amb processos de regulació sinàptica i amb memòria (D'Arcangelo, 2005; Qiu et al., 2006). Dins d'aquesta família, els receptors VLDLR i ApoER2 es troben àmpliament expressats en el cervell i comparteixen una gran homologia que n'explica la redundància de funció.

El primer estudi que relaciona els receptors VLDLR i ApoER2 amb la Reelina es basa en l'anàlisi fenotípic dels mutants que hi són deficients (apartat 4.1.3) (Trommsdorff et al., 1999). La identitat fenotípica entre els ratolins deficients en *reelina* i els doblement deficients en *vldlr* i *apoer2* va incentivar els estudis de la interacció de la Reelina amb aquests receptors. El fet que la deficiència de només un dels dos receptors no impliqui anomalies fenotípiques s'explica pels efectes compensatoris deguts a la redundància de funció entre ells (Trommsdorff et al., 1999).

La interacció entre la Reelina i la regió extracel·lular de VLDLR/ApoER2 fôu caracteritzada com a interacció d'alta afinitat; i pot ser interrompuda per la presència de l'anticòs CR-50 o bé per lligands del receptor com són l'apolipoproteïna E (ApoE) o la proteïna d'associació al receptor (RAP, o *receptor associated protein*) (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999). Per aquest motiu, tant CR-50 com RAP han estat assajats amb èxit com a sistemes d'interrupció de la senyalització induïda per la Reelina (Beffert et al., 2002).

La interacció de la Reelina amb els receptors VLDLR/ApoER2 es produeix per la regió central de la proteïna; són necessàries les repeticions III-VI perquè aquesta interacció sigui funcional. *In vitro*, el tractament de cultius primaris amb aquests dominis III-VI és necessari i suficient per produir els successius passos en la senyalització (Jossin et al., 2004). Aquesta dada entra en contradicció amb el fet que l'anticòs CR-50 sigui capaç de bloquejar la senyalització de la Reelina (*in vivo* i *in vitro*), i la seva interacció amb els receptors. Es considera que l'efecte inhibitori del CR-50 es deu al bloqueig de la dimerització de la Reelina (apartat 3.1.2). La dimerització

causaria un augment local de la concentració efectiva de la Reelina en interaccionar amb els receptors (Jossin et al., 2004). La inducció de la senyalització pel fragment central de la Reelina, III-VI, requeriria doncs una concentració que, *in vivo*, només s'assoleix localment per efecte del CR-50. Una altra explicació alternativa és considerar que l'anticòs CR-50 impedeix la interacció de la Reelina amb els receptors per impediment estèric.

Inducció dels receptors independent de la Reelina: Una de les implicacions funcionals de la dimerització de la Reelina (apartat 3.1.2) és la possibilitat que indueixi també la dimerització o multimerització de receptors a la membrana neuronal. La inducció de la dimerització dels receptors VLDLR/ApoER2 de manera independent de la Reelina s'aconsegueix mitjançant la utilització de lligands bivalents que contenen RAP. Utilitzant aquest disseny experimental s'indueix de forma específica la via de senyalització de la Reelina sense requerir la presència de la Reelina, indicant que la multimerització de receptors és un punt clau i suficient per iniciar els processos de senyalització originats per la Reelina (Strasser et al., 2004).

3.2.2 $\alpha 3\beta 1$ Integrina i CNRs:

La interacció d'altres receptors diferents d'ApoER2/VLDLR amb la proteïna Reelina sempre ha estat d'interès en tant que podia clarificar els processos mitjançant els quals la Reelina indueix la senyalització intracel·lular i realitza la seva funció. Donat que la senyalització a través dels receptors de lipoproteïnes sembla essencial, i en conseqüència els mutants *vldlr* *-/-*; *apoer2* *-/-* són idèntics als *reeler* (apartat 4.1.2), s'ha tendit a hipotetitzar un paper de coreceptor a les interaccions de la Reelina amb d'altres receptors. Així foren descrites les interaccions de la Reelina amb els receptors CNR i amb la Integrina $\alpha 3\beta 1$ (Dulabon et al., 2000; Senzaki et al., 1999).

CNRs: La interacció directa de la Reelina amb els receptors CNR fou presentada com la via de connexió de la senyal induïda per la Reelina amb les proteïnes SFKs, quinases de l'mDab1 (apartat 3.4.1) (Senzaki et al., 1999). Els CNRs, segons aquest model, realitzarien la tasca de coreceptors; els CNRs podrien acoblar l'mDab1, unit a ApoER2/VLDLR, amb les seves quinases, unides als CNRs. No obstant, si bé no s'ha desmentit aquesta hipòtesi, tampoc s'han aportat noves evidències que l'avalin. La participació dels CNRs en la funcionalitat de la Reelina està encara pendent de corroboració.

Integrina $\alpha 3\beta 1$: S'ha descrit que la interacció de la Reelina amb aquest receptor es produeix mitjançant la interacció directa de l'extrem N-terminal de la Reelina amb $\alpha 3$, que s'expressa en cèl·lules migrants d'escorça, mentre que $\beta 1$ estaria interaccionant intracel·lularment amb l'efector de la Reelina, l'mDab1 (Dulabon et al., 2000; Schmid et al., 2005). Les dades actuals indiquen que aquesta interacció s'estaria produint, però no s'aporten resultats conclusius sobre la seva efectivitat en senyalització. S'hipotetitza que la senyalització $\alpha 3\beta 1$ podria funcionar com a sistema diferent del conformat pels receptors ApoER2/VLDLR i que funcionaria en tipus cel·lulars diferents (Schmid et al., 2005); no obstant tampoc se'n pot descartar la funció coreceptora inicialment proposada (Dulabon et al., 2000).

3.3 Transducció intracel·lular de la senyal (I); la proteïna mDab1:

Els processos de senyalització intracel·lular que desencadena la unió de la Reelina als seus receptors compten en primer lloc amb la participació de la proteïna adaptadora mDab1 (l'homòleg murí de la proteïna Disabled, o *mouse Disabled homologue 1*). L'associació entre l'mDab1 i la Reelina es va començar a estudiar en descobrir-se que els mutants deficients en *mdab1* i els deficients en *reelina* compartien un mateix fenotip (apartat 4.1.2) (Goldowitz et al., 1997).

3.3.1 El gen *mdab1*:

El locus que conté el gen *mdab1* està situat al cromosoma murí 4 (en humans a la regió 1p32-p31) i presenta una organització interna molt complexa. La zona codificant s'estén per més de 300kb, amb una pauta oberta de lectura, o *open reading frame* (ORF), de 1665bp; i la regió 5' UTR del genoma s'estén aproximadament 850kb. La raó de tanta complexitat cal buscar-la en l'elevat nombre d'*splicings* alternatius possibles en l'mRNA de l'mDab1.

Els splicings alternatius a la regió 5' UTR: En el cervell embrionari de ratolí es detecten quatre seqüències exòniques diferenciades que es poden combinar per *splicing* alternatiu (1A, 1B, 1C i 1D). 1A, 1B i 1C corresponen cada una a un únic exó, mentre que 1B en conté un total de 10. Depenent de com es combinin, s'aconsegueix generar ORFs perllongats per la regió 5' (*upstream* ORF, uORF) amb codons ATG d'inici de la traducció alternatius. Aquests uORF contribuirien a una regulació de l'expressió de l'mDab1 disminuint-ne els nivells de traducció correcta (Jossin et al., 2003a).

Els splicings alternatius a la regió codificant: S'han descrit 4 isoformes diferents de la proteïna mDab1 codificades per 4 mRNAs de l'*mdab1* també diferents (Howell et al., 1997b). El més abundant (*mdab1-555*) codifica per la proteïna *full-length* de l'mDab1. D'altra banda hi ha dos cDNAs que, per *splicing* alternatiu, originen productes proteics de menor longitud: *mdab1-271* conté una inserció que trunca l'ORF entre els exons 9 i 10 i dóna lloc a la proteïna p45-mDab1; i *mdab1-217* presenta un lloc de poliadenilació alternatiu en l'exó 7 que origina la proteïna p36-mDab1 (Howell et al., 1997a). Finalment, la forma *mdab1-555** inclou dos minixons de 48 i 51 parells de bases entre els exons 9 i 10. Aquesta isoforma més extensa només es troba en teixits no neuronals i en cèl·lules mare no diferenciades. De fet, la diferenciació neuronal implica l'exclusió d'aquests minixons del cDNA, tant *in vivo* com *in vitro* (Howell et al., 1997a). Així, les cèl·lules mare de la zona ventricular del cervell en desenvolupament expressen la forma *mdab1-555** però no els neuroblasts migrants que en surten, ni les neurones ja diferenciades (Howell et al., 1997a).

3.3.2 La proteïna mDab1:

La isoforma neuronal majoritària de la proteïna mDab1 és la que es tradueix a partir del cDNA *mdab1-555* i presenta un pes molecular d'aproximadament 80kDa. La caracterització d'aquesta proteïna partí d'un cribratge per doble híbrid de proteïnes d'unió a la quinasa Src procedents d'una llibreria embrionària (E15-E17) de cervell de

ratolí (Howell et al., 1997a). La forma *full-length*, o mDab1-555, presenta en el seu extrem N-terminal un domini consens d'interacció amb tirosines fosforilades (PI/PTB o PTB; o *protein interaccion/ phosphotyrosine binding domain*). A continuació presenta un domini ric en tirosines i finalment una regió C-terminal amb llocs consens de fosforilació en serines i treonines. Les formes curtes de l'mDab1: p45-mDab1, també presenten el domini PTB i les tirosines fosforilables, però no la regió C-terminal (Figura 20) (Howell et al., 1997a). En conjunt podem dir que mDab1 no realitza cap activitat enzimàtica, sinó que funciona com a proteïna adaptadora, reunint diferents proteïnes en un mateix punt a través dels seus dominis d'interacció proteïna-proteïna. Algunes de les proteïnes que interaccionen amb mDab1 són: VLDLR, ApoER2, Fyn, Src, p85-PI3K, Crk, APP, SHIP, LDLR, Megalin, APLP1, APLP2 i Dab2IP (apartat 3.4).

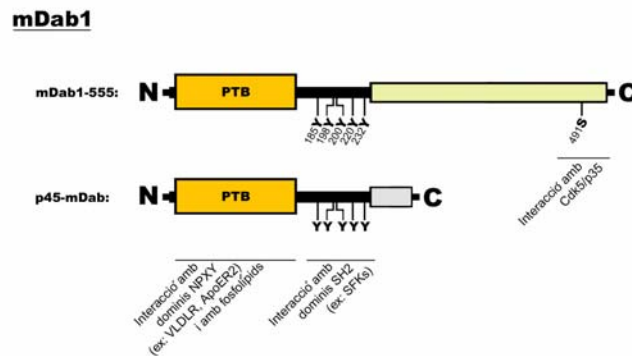


Figura 20 La seqüència de la proteïna mDab1. La forma *full-length* de la proteïna mDab1 conté 555 aminoàcids (mDab1-555). A l'extrem N-terminal (N) l'mDab1 conté el domini PTB, seguit del domini ric en tirosines (Y) i del domini C-terminal (C) que conté una Serina (S) fosforilable. La forma curta de 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.

El domini PTB de l'mDab1: Aquest domini PTB s'estén aproximadament 150 aminoàcids i interacciona amb seqüències NPXY d'altres proteïnes. Entre d'altres, el domini PTB de l'mDab1 uneix els dominis intracel·lulars dels receptors VLDLR i ApoER2 i inicia d'aquesta manera els processos de transducció intracel·lular de la senyal de la Reelina. Més proteïnes transmembrana a les quals pot unir-se l'mDab1 mitjançant el domini PTB són altres membres de la família de receptors de lipoproteïnes (LDLR, LRP i Megalin) i proteïnes de la família de precursors d'amiloide (APP, APLP1 i APLP2) (Rice and Curran, 2001). En general, la interacció amb dominis PTB és depenent de la fosforilació de la tirosina de la seqüències NPXY (Margolis, 1996). En el cas de l'mDab1 però, la interacció amb NPXY es produeix amb independència de l'estat de fosforilació que aquests presentin (Homayouni et al., 1999; Howell et al., 1999a; Trommsdorff et al., 1999).

El domini PTB pertany a la superfamília de dominis amb homologia a Pleckstrina (PH, o *Pleckstrin homology domain*), que inclou els dominis PTB, PH, EVH1 i els dominis d'unió a Ran; tots ells estan estructuralment relacionats però es diferencien pel tipus de lligand que uneixen. Els anàlisis estructurals del domini PTB de l'mDab1 indiquen que aquest pot mantenir interacció simultània i independent amb seqüències NPXY i alhora amb fosfatidilinositols (PI, o *phosphatidylinositol*) (PI 4-fostat (PI-4-P) i PI 4,5-bisfosfat (PI-4,5-P)) (Howell et al., 1999b; Stolt et al., 2003; Stolt et al., 2004; Yun et al., 2003). La interacció del domini PTB de l'mDab1 amb PIs dirigeix la localització d'aquesta proteïna a la membrana neuronal, i és necessària, conjuntament a la interacció amb VLDLR/ApoER2, per permetre la transducció intracel·lular de la senyal induïda per l'estímul de la Reelina (Huang et al., 2005; Stolt et al., 2005; Xu et al., 2005).

El domini de l'mDab1 ric en tirosines: La seqüència enriquida amb tirosines que es localitza immediatament després del domini PTB, conforma una regió d'interacció amb dominis amb homologia a Src (SH2, o *Src homology 2*) d'altres proteïnes. Així l'mDab1 fosforilat en tirosines s'uneix a proteïnes de la família de la quinasa Src (*Src family kinases*, SFKs) (Src, Fyn i Yes) i en menor mesura també al domini SH2 de la quinasa Abl (Howell et al., 1997a). *In vivo*, són les proteïnes SFK, bàsicament la Fyn i la Src, les que fosforilen l'mDab1; l'Abl en canvi, no hi contribueix.

El domini C-terminal de l'mDab1: A diferència dels domini ric en tirosines i del domini PTB, el domini C-terminal de l'mDab1 no sembla tenir relació amb la senyalització de la Reelina. La fosforilació de la serines de la posició 491, integrada en una seqüència consens, la pot realitzar la quinasa Cdk5/p35 amb independència de l'estimulació amb la Reelina, si bé no se'n coneixen ni els motius ni les implicacions finals (Keshvara et al., 2002).

3.3.3 El paper de l'mDab1 en la senyalització de la Reelina:

La fosforilació de l'mDab1 en tirosines és essencial per a la transducció de la senyal induïda per la Reelina (Howell et al., 1999a). Abans però de què aquesta fosforilació es produeixi, l'mDab1 ja es troba unit a VLDLR i ApoER2. Llavors, la interacció extracel·lular de la Reelina amb els seus receptors desencadena la fosforilació de l'mDab1 (Benhayon et al., 2003), sense requerir la internalització de la Reelina per endocitosis.

L'mDab1 es fosforila en tirosines, concretament en les situades a les posicions Y198/200 i Y220 (Keshvara et al., 2001); i qui ho fa és principalment la quinasa Fyn, si bé també hi poden contribuir, en part, les quinases Src i Yes. Abl en canvi, malgrat tenir la capacitat de fosforilar mDab1 *in vitro*, no participa de la senyalització *in vivo* que succeeix a l'estímul de la Reelina. El procés de fosforilació de l'mDab1 té lloc per l'activitat de les quinases de la família de Src (SFKs); però la Reelina no activa directament SFKs sinó que aquestes necessiten la presència de l'mDab1 per poder activar-se. Així l'mDab1 funciona amb ambivalència, actuant simultàniament com a substrat i com a activador de les quinases SFKs després de l'estimulació amb la Reelina (Arnaud et al., 2003b; Bock and Herz, 2003).

Aquesta fosforilació de l'mDab1 és imprescindible per a la transducció de la senyal de la Reelina. De fet, els mutants que tenen substituïdes les tirosines importants per fenilalanines (*mutants mdab1(5F)*), no poden respondre a Reelina (apartat 4.1.2); com tampoc és possible la senyalització si prèviament s'han inhibit les proteïnes de la família SFKs amb la droga PP2 (Tissir and Goffinet, 2003).

El procés de fosforilació en tirosines activa la degradació proteasomal de l'mDab1 prèvia ubiquitinització de la proteïna. La degradació no es produeix en absència de fosforilació, de manera que la deficiència en la proteïna Reelina o en els seus receptors (ApoER2/VLDLR), així com succeeix en els *mutants mdab1(5F)*, fa que s'acumuli l'mDab1 en la seva forma no fosforilada (Arnaud et al., 2003a; Howell et al., 2000).

3.4 Transducció intracel·lular de la senyal (II):

A la regió extracel·lular, les possibilitats d'inducció de la senyalització per part de la Reelina són hipotèticament diverses davant l'existència de múltiples receptors que s'hi uneixen. No obstant, la visió més àmpliament acceptada contempla una única via lineal de senyalització fins a la fosforilació de l'mDab1. Dins la cèl·lula en canvi, les possibilitats de senyalització es multipliquen, més si tenim en compte que qui primer rep l'estímul de la Reelina és una proteïna adaptadora (l'mDab1) amb capacitat d'interacció amb una gran diversitat de molècules.

3.4.1 L'activació de les SFKs:

Les proteïnes quinasa de la família Src de (SFKs) s'activen en resposta a la Reelina i fosforilen la proteïna mDab1 en tirosines. Aquest procés requereix la participació del propi substrat; en conseqüència, els mutants *mdab1* *-/-* i *mdab1* *5F/5F* no mostren activació de SFKs en resposta a l'estímul de la Reelina. La quinasa que majoritàriament produeix la fosforilació de l'mDab1 és Fyn, si bé també poden contribuir-hi Src i Yes; de fet, els diferents membres de la mateixa família tenen funcions solapades que faciliten la compensació de funció en cas de deficiència d'algun d'ells (Arnaud et al., 2003b; Bock and Herz, 2003). La inhibició de les SFKs en models *in vitro* de desenvolupament cortical produeix malformacions equivalents a les observades en cultius d'animals *reeler* (Jossin et al., 2003a), i la deficiència simultània en els gens *src* i *fyn* produeix alteracions també similars a les dels *reeler* (apartat 4.1.3) (Kuo et al., 2005).

3.4.2 L'activació de la via de senyalització de CrkL/C3G/Rap1:

En el procés d'identificació de lligands que s'uneixen específicament a la forma fosforilada de l'mDab1 es van trobar als integrants de la família Crk de proteïnes adaptadores. Les proteïnes de la família de Crk que s'uneixen a l'mDab1 són CrkL (producte del gen *crkl*), CrkII i CrkI (productes del gen *crk* per *splicings* alternatius). Totes elles tenen un domini SH2 d'interacció amb fosfotirosines i un o dos dominis SH3 d'interacció amb seqüències riques en prolines. La interacció amb l'mDab1 es produeix mitjançant els dominis SH2 d'aquestes proteïnes i requereix la fosforilació de les tirosines Tyr220 i Tyr232 de l'mDab1. La interacció mDab1-CrkL també es produeix *in vivo*, gràcies al fet que s'expressen en els mateixos tipus cel·lulars (Ballif et al., 2004; Huang et al., 2004).

És sorprenent la participació de la Tyr232 de l'mDab1 pel fet que la fosforilació en aquest punt no està induïda per la Reelina (apartat 3.3.3) En canvi, la interacció mDab1-Crk sí que és depenent de l'estímul Reelina i alhora de la fosforilació de Tyr232 (Ballif et al., 2004; Huang et al., 2004). La fosforilació de la Tyr220 de l'mDab1 és produïda per SFKs, i aquest procés és incentivat per la sobreexpressió de CrkI/II en línies cel·lulars que també tenen mDab1; CrkL no té cap efecte en aquest sentit (Huang et al., 2004). Això fa pensar que la fosforilació de Tyr232 de l'mDab1 actuaria com a facilitadora la fosforilació en Tyr220 mitjançada per CrkI/II i SFKs de forma depenent de la Reelina. Encara faran falta nous treballs per aclarir aquesta possibilitat, però una fosforilació inicial de l'mDab1 facilitadora de la fosforilació específica per Reelina ja

fou hipotetitzada en alguns esquemes de transducció intracel·lular de la senyal de la Reelina (Arnaud et al., 2003b; Bock and Herz, 2003). Aquesta fosforilació facilitadora permetria l'activació inicial de SFKs, un procés que és dependent de la Reelina i que requereix la participació del propi substrat mDab1; un cop iniciat el procés, aquest pot retroalimentar-se ja que SFKs s'uneixen més a l'mDab1 quan aquest ja es troba fosforilat.

A banda de facilitar la fosforilació de l'mDab1 en les posicions específiques de la Reelina (Crkl/II), els Crks també activen vies de senyalització (Feller, 2001). En algunes ocasions, les Crks es fosforilen en tirosina; però aquest procés no s'observa en resposta a l'estimulació amb Reelina. En canvi, sí que es produeix la fosforilació de la proteïna C3G de forma dependent de la Reelina. C3G interacciona amb els dominis SH3 de Crks i s'activa en ser fosforilada. L'activació de C3G li confereix la propietat d'eliminar el grup GDP de la Rap1; Rap1·GDP és una forma inactiva, per tant l'eliminació del grup GDP permet que Rap1 uneixi un grup GTP i passi a la forma activa de Rap1·GTP. Així doncs l'estimulació amb la Reelina de cultius primaris aconseguix que s'activi la via CrkL/C3G/Rap1 (Ballif et al., 2004).

3.4.3 L'activació de la via de senyalització de PI3K/Akt1:

La Reelina produeix l'activació de la via de senyalització clàssica de PI3K/Akt1 en cultius primaris neuronals (Beffert et al., 2002). La funció catalítica de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K, o *phosphatidylinositol 3-kinase*) consisteix en afegir un grup fosfat en posició 3 als seus substrats fosfolipídics, especialment PI(4,5)P₂; llavors PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) atrau a la membrana plasmàtica proteïnes amb dominis PH, entre les quals s'hi troben l'Akt1 (també coneguda com a proteïna quinasa B (PKB)) i la quinasa dependent de fosfatidilinositol 1 (PDK1). La proximitat amb l'Akt1, facilita que la PDK1 li afegixi un grup fosfat en posició Ser473 i que al seu temps l'Akt1 esdevingui funcionalment activa i actui també com a Ser/Thr-quinasa. La finalització de l'activació de la via de PI3K/Akt1 s'aconsegueix mitjançant la desfosforilació de PIP₃ per fosfatades específiques: PTEN, SHIP1 i SHIP2. PTEN desfosforila la posició 3, inhibint d'aquesta manera la senyalització per la via de PI3K. En canvi SHIP1/2 desfosforilen la posició 5, permetent encara la senyalització, tot i redirreccionar-la cap a d'altres substrats (Cantley, 2002).

L'activació de la via PI3K/Akt1 per part de la Reelina es va descriure analitzant els nivells de fosforilació en Ser473 i també analitzant l'activitat total de l'Akt1. L'activació de la via es manté màxima fins als 30 minuts després de l'estimulació amb Reelina; i és dependent de VLDLR/ApoER2, mDab1 i SFK. L'activació de la via PI3K/Akt1 és un dels passos seqüencials que es produeixen a la neurona en resposta a la Reelina i és necessari per a la laminació cortical (Ballif et al., 2003; Beffert et al., 2002; Bock et al., 2003). Cal remarcar que l'mDab1 és capaç d'interaccionar amb els fosfolípids de membrana que són substrats de PI3K (apartat 3.3.2), facilitant d'aquesta manera l'activació de la via de PI3K/Akt1 de forma ràpida i específica en resposta a l'estímul de la Reelina

D'altra banda, és interessant observar que una de les molècules amb les quals pot interaccionar l'mDab1 és la subunitat reguladora p85 de la PI3K de classe 1. PI3K de classe 1 està formada per un heterodímer entre la subunitat catalítica p110 i la subunitat reguladora p85. p85-PI3K s'uneix a p110-PI3K inhibint-la; el mecanisme d'activació de p110-PI3K requereix el desplaçament d'aquesta inhibició per algun substrat que s'uneixi

més eficientment a p85-PI3K i alliberi p110-PI3K. S'ha proposat la participació de l'mDab1 en el segrest de p85-PI3K com a sistema d'activació de p110-PI3K; ho avalen el fet que mDab1 interacciona amb p85-PI3K únicament en cultius tractats amb Reelina i que ho fa de manera dependent de SFKs (Bock et al., 2003); no obstant, hi ha contradicció entre aquests resultats i els trobats per altres autors, que consideren inexistent la interacció entre p85-PI3K i l'mDab1 (Ballif et al., 2003).

3.4.4 La participació de la GSK3 β en la senyalització induïda per la Reelina:

La Reelina afecta a la glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK3 β , o *glycogen synthase kinase-3 β*) induint-ne la seva fosforilació mitjançada per Akt1 (Beffert et al., 2002; Ohkubo et al., 2003). En molts models de cèl·lules no estimulades, la GSK3 β és una serina/treonina-quinasa constitutivament activa; la seva funció habitual està relacionada amb el manteniment de la fosforilació inhibidora en substrats inactius. L'estimulació de la via de senyalització de PI3K/Akt1 sol comportar una fosforilació inhibidora de GSK3 β en serines; permetent alhora que s'activin les proteïnes que ella inhibeix (Cantley, 2002). Diferents grups han demostrat que la Reelina indueix la fosforilació de la serina situada en posició 9 de GSK3 β , i les dades relacionades amb l'activitat també apunten a què els animals deficients en *reelina* o *mdab1* presenten una activitat basal de GSK3 β més elevada que els animals wild-type (Beffert et al., 2002; Ohkubo et al., 2003).

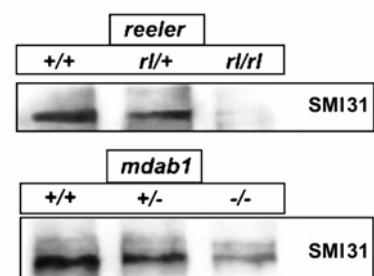
L'anàlisi directe de l'activitat catalítica de GSK3 β és important perquè no sempre és estrictament coincident amb l'estat de fosforilació de la Ser9. La fosforilació en Ser9 és clau en el procés d'inhibició de GSK3 β , però també ho és l'estat de fosforilació de la tirosina situada en posició 216. La fosforilació en Tyr216 funciona com a activadora de GSK3 β . L'activitat neta de GSK3 β no és doncs directament extrapolable de l'estat de fosforilació en Ser9 o Tyr216; són les proporcions relatives de les dues fosforilacions en la població cel·lular de GSK3 β les que marquen l'estat d'activació final de GSK3 β (Jope and Johnson, 2004). Així, a més de l'efecte de la Reelina sobre la fosforilació en serines s'ha descrit que la Reelina indueix també la fosforilació de GSK3 β en tirosines, i que l'efecte net n'és un increment d'activitat (Gonzalez-Billault et al., 2005).

3.4.5 La participació de la MAP1B en la migració neuronal dependent de la Reelina:

Estudis recents indiquen que la proteïna associada a microtúbuls 1B (MAP1B, o *Microtubule Associated Protein 1B*) participa en la via de senyalització activada per la Reelina (Gonzalez-Billault et al., 2005).

Una primera mostra de la relació existent entre la Reelina i la MAP1B és que els ratolins *reeler* i els deficients en *mdab1* presenten una disminució en els nivells basals de fosforilació en de la MAP1B en mode I (*Figura 21*) (Gonzalez-Billault et al., 2005).

Figura 21 La deficiència en els gens de la *reelina* i l'*mdab1* altera els nivells basals de fosforilació de la proteïna MAP1B. Els ratolins *reeler* (*rl/rl*), deficients en *reelina*, i els *mdab1* *-/-* presenten una disminució de la fosforilació en mode I de la MAP1B en comparació amb els animals control heterozigots (*rl/+*; *+/-*) o els *wild-type* (*+/+*). L'anticòs SMI31 reconeix la forma fosforilada en mode I de la MAP1B. *Adaptat de Gonzalez-Billault et al., 2005.*



La MAP1B és una proteïna associada a microtúbuls que s'expressa de forma específica en neurones. La MAP1B està involucrada en processos d'extensió neurítica, d'estabilitat dinàmica dels microtúbuls i d'interacció dels microtúbuls amb els filaments

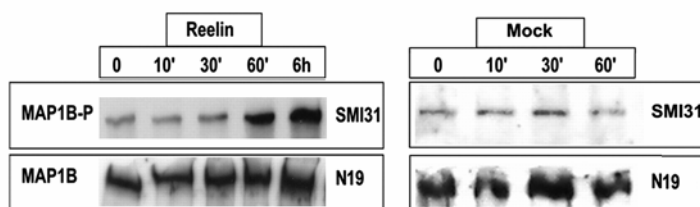


Figura 22 La Reelina induïx la fosforilació de la MAP1B. Cultius primaris neuronals de telencèfal tractats amb sobredants que contenen la Reelina (Reelin) o bé amb sobredants control (Mock). El tractament amb la Reelina induïx un increment de la fosforilació en mode I de la MAP1B (MAP1B-P) (reconegut per western blot amb l'anticòs SMI31) que s'observa a partir de 60 minuts de tractament (60'). Amb l'anticòs N19 es reconeix la MAP1B independentment de l'estat de fosforilació (control de càrrega). *Adaptat de Gonzalez-Billault et al., 2005.*

d'actina; sempre de manera dependent de la fosforilació en mode I (mitjançada per GSK3 β i Cdk5 (Goold et al., 1999; Lucas et al., 1998; Mack et al., 2000).

A més, la fosforilació en mode I de la proteïna MAP1B de neurones de cultius primaris telencefàlics es veu incrementada pel tractament d'aquests cultius amb la Reelina (Figura 22) (Gonzalez-Billault et al., 2005).

Una altra evidència de la implicació de MAP1B en la senyalització intracel·lular induïda per Reelina és l'alteració en migració neuronal, especialment en estructures laminades, observada en els ratolins *map1b*^{-/-}, fenotípicament comparable a les alteracions presents en els animals *mdab1*^{-/-} i en els *reeler* (Gonzalez-Billault et al., 2005).

3.4.6 L'afectació del citoesquelet:

L'afectació de la Reelina sobre les cèl·lules migrants, sobre els axons en desenvolupament o sobre les estructures que conformen les sinàpsis han de comportar forçosament afectacions al citoesquelet cel·lular, com a mínim a nivell local.

Els microtúbuls: Les primeres dades referents a les conseqüències de la senyalització de la Reelina sobre el citoesquelet, a banda de les ja descrites sobre la MAP1B, es focalitzen en la proteïna Tau. Els mutants *reeler*, i també els *mdab1*^{-/-} i els mutants dobles *vldlr*^{-/-}; *apoer2*^{-/-}, presenten una hiperfosforilació de la proteïna estabilitzadora de microtúbuls Tau (Hiesberger et al., 1999; Ohkubo et al., 2003). La proteïna Tau s'uneix a la Tubulina promovent la formació dels microtúbuls. Si la proteïna Tau es troba hiperfosforilada per acció de les quinases GSK3 β i Cdk5, s'acumula en filaments que desestabilitzen els microtúbuls. Això succeeix durant el procés de degeneració produït per la malaltia d'Alzheimer; la desestabilització de microtúbuls comporta la pèrdua d'espines dendrítiques, la desaparició de sinapsis, la degeneració del citoesquelet i finalment la mort cel·lular (Bhat et al., 2004). Actualment no es disposa d'evidències directes sobre l'efecte de la Reelina en la fosforilació de Tau. No obstant sí que es coneix que la Reelina activa la fosforilació inhibidora de GSK3 β sobre la Ser9; i també que l'activitat de GSK3 β en mutants *reeler* és superior al normal. Això fa pensar que l'absència de la Reelina activa GSK3 β i que aquesta produeix la hiperfosforilació de Tau (Ohkubo et al., 2003). No obstant també s'ha descrit l'activació

de GSK3 β produïda per la Reelina (Gonzalez-Billault et al., 2005); de manera que faran falta nous experiments que aclareixin l'efecte precís que té la Reelina sobre els microtúbuls.

El citoesquelet d'actina: Moltes de les molècules que regulen els processos de migració i creixement axonal afecten a l'organització del citoesquelet d'actina (apartat 3.5). Per aquesta raó també s'ha analitzat si la Reelina el regula i s'han cercat els mecanismes que ho fan possible.

La relació trobada entre la via de senyalització de la Reelina i el citoesquelet d'actina és la interacció entre les proteïnes mDab1 (a través del domini PTB) i N-WASP. L'mDab1 activa directament l'N-WASP que indueix la polimerització d'actina mitjançant la participació de les Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*). La fosforilació que la Reelina indueix sobre l'mDab1 faria que aquesta perdés l'activitat a nivell de polimerització d'actina; de fet, la sobreexpressió de l'mDab1 en COS7 no és capaç d'induir la formació de filopodis si alhora s'hi expressa la quinasa Fyn en la seva forma constitutivament activa (Suetsugu et al., 2004).

3.4.7 Altres vies de senyalització:

La importància que té l'mDab1 en la via de senyalització de la Reelina i el fet que funcioni com a proteïna adaptadora la converteixen en un candidat ideal des d'on iniciar la recerca de noves proteïnes implicades en la transducció de la senyal iniciada per la Reelina. En els apartats anteriors ja s'ha descrit que tant les SFK, com la PI3K-p85, com la CrkL interaccionen directament amb l'mDab1. A més, hi ha d'altres factors que també interaccionen directament amb l'mDab1:

Nck β : Les proteïnes de la família Nck són proteïnes adaptadores que participen activament en la regulació de la senyalització mitjançada per proteïnes tirosina quinases, actuant com a adaptadors SH2/SH3 i aproximant les tirosina quinases amb els seus substrats (Buday et al., 2002). Un dels membres d'aquesta família, la Nck β , interacciona directament amb l'mDab1 quan està fosforilada en posició Tyr220 o bé en Tyr232. L'Nck β , pateix una redistribució en la seva localització cel·lular quan les neurones estan tractades amb la Reelina; el tractament amb la Reelina produeix la localització de l'Nck β a les neurites, on actuaria en sinèrgia amb l'mDab1 produint la remodelació del citoesquelet d'actina (Pramatarova et al., 2003).

Cdk5: La Cdk5 interactua amb la via de senyalització de la Reelina a diferents nivells però sense que per ara s'hi hagi trobat una relació directa de causa-efecte. D'una banda, l'activitat Cdk5 és necessària per a la fosforilació de la MAP1B dependent de la Reelina, si bé no s'ha demostrat que la Reelina activi directament la Cdk5 (Gonzalez-Billault et al., 2005). D'altra banda, la Cdk5 fosforila l'mDab1 a la posició S491 de forma independent de la inducció per la Reelina, i sense que se'n conegui la importància i les implicacions funcionals (Keshvara et al., 2002). Finalment, s'han proposat models de senyalització segons els quals la senyalització per Cdk5 funciona de forma paral·lela i coordinada amb les vies de senyalització induïdes per la Reelina. Aquesta cooperació permetria regular la migració neuronal i la neurotransmissió en el cervell adult o bé en desenvolupament (Beffert et al., 2004).

APP: L'mDab1 interacciona amb la cua citoplasmàtica de la proteïna transmembrana APP (proteïna precursora d'amiloide, *oamiloide precursor protein*), i amb d'altres membres de la mateixa família (Howell et al., 1999b; Trommsdorff et al., 1998). La importància funcional a nivell de senyalització no s'ha aclarit per ara. No obstant, això, sumat amb altres dades, com són la presència de la Reelina en plaques amiloides, la participació del receptor ApoER2 i el seu lligand ApoE en susceptibilitat a la malaltia d'Alzheimer, etc... fan pensar que la Reelina i la seva senyalització poden ser importants en la patogènia d'aquesta malaltia (Bothwell and Giniger, 2000; Grilli et al., 2003; Saez-Valero et al., 2003; Wirths et al., 2001).

Dab2IP: La proteïna Dab2IP, una *Ras-GTPase activating protein*, interacciona amb l'mDab1. S'hipotetza que mitjançant la participació d'aquesta proteïna la Reelina podria afectar a la vies de senyalització mitjançades per Ras. No hi ha dades concloents que ho avalin en cap model experimental, però la interacció amb l'mDab1 ha estat demostrada (Homayouni et al., 2003).

Shp-1 i PLC γ : El mateix disseny experimental que va permetre trobar la unió de l'mDab1 amb la CrkL i descriure l'activació de la via CrkL/C3G/Rap1 també va servir per demostrar l'associació de les proteïnes PLC γ i Shp-1 amb l'mDab1 de forma dependent de fosforilació (Ballif et al., 2004). Fins a l'actualitat no s'han aportat noves dades referents a la participació d'aquestes proteïnes en la senyalització induïda per Reelina, però són noves possibilitats que amplien encara més el ventall de vies de senyalització que poden participar en la transducció de la senyalització intracel·lular activada per l'estimulació amb la Reelina.

3.4.9 La comprensió de la senyalització intracel·lular:

Les dades actualitzades sobre la senyalització que indueix la Reelina mantenen encara visions parcials de la realitat global, que és altament complexa. Els diferents investigadors que treballen en aquest camp ofereixen també models incomplets, on no s'incorporen totes les dades publicades (*Figura 23*). En diferents casos fins i tot s'observen contradiccions manifestes entre els diferents laboratoris que investiguen la senyalització induïda per la Reelina. Les divergències exposades poden ser degudes, i així es justifiquen, als diferents assajos *in vitro* realitzats, a les diferències entre la metodologia utilitzada, les variables en la producció de la Reelina utilitzada per als experiments, etc... A més, la Reelina podria participar en processos prou diferents entre ells com perquè en cada cas hi hagi particularitats pròpies en les vies de senyalització que s'hi activen.

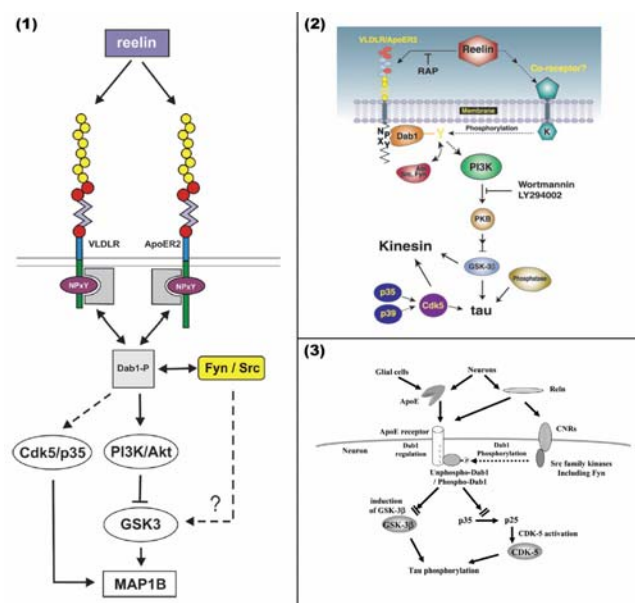


Figura 23 Models de la senyalització induïda per la Reelina. Adaptat de: (1) Gonzalez-Billault et al., 2005; (2) Beffert et al., 2002; (3) Ohkubo et al., 2003.

3.5 La senyalització en altres sistemes:

Diferents molècules influeixen a les neurones durant el seu procés de migració i posicionament; i sovint, les mateixes molècules poden també afectar al guiatge axonal, o bé als processos de regeneració, ramificació axonal o plasticitat sinàptica.

Un dels primers efectes que les molècules de guia tenen sobre el con de creixement axonal o sobre el *leading edge* de la neurona migrant és a nivell de citoesquelet d'actina. Les estructures que responen a molècules de guia tenen una gran motilitat i pateixen una remodelació constant del citoesquelet d'actina. La regulació de la dinàmica del citoesquelet s'efectua sovint per acció de les GTPases de la família Rho (Rho, Rac i Cdc42). L'activació de Rac o Cdc42 comporta l'increment en la polimerització d'actina i en canvi l'activació de Rho té un efecte invers. Les GTPases s'activen per acció de les proteïnes activadores de GTPases (GAP, o *GTPase activating protein*) i s'inhibeixen per acció dels factors d'intercanvi de nucleòtids de guanidina (GEFs, o *guanidine nucleotide exchange factor*) (Guan and Rao, 2003). Hi ha diferents maneres d'activar o inhibir aquestes GTPases per un mateix estímul. Així doncs, una mateixa molècula de guia pot provocar l'increment o la disminució de la polimerització d'actina segons els receptors i la senyalització intracel·lular que s'indueix. Una mateixa molècula de guia pot tenir efectes contraris depenent de la senyalització intracel·lular que s'activa a cada tipus cel·lular amb capacitat per respondre-hi.

La senyalització que les molècules de guia indueixen a la cèl·lula migrant o bé sobre els axons en desenvolupament no es limiten a de l'afectació del citoesquelet d'actina; sovint també s'afecten els microtúbuls. A més les molècules de guia poden alhora produir canvis més profunds que afectin a la transcripció gènica de la cèl·lula que hi respon.

3.5.1 La senyalització induïda per la Netrina-1

L'acció de la Netrina-1 en el desenvolupament del sistema nerviós recau tant sobre la migració neuronal com sobre el guiatge axonal. Tant és així, que els ratolins deficients en *netrin-1* moren just després del naixement a causa de les greus anormalitats que presenten a nivell de posicionament neuronal i també a nivell connectiu.

La senyalització induïda per Netrina-1 sobre les cèl·lules diana està mitjançada per la participació de les famílies de receptors DCC i UNC-5; l'expressió simultània dels diferents receptors, o bé l'expressió en exclusiva de només un d'ells, promou respostes intracel·lulars diferents sobre la cèl·lula diana. La senyalització mitjançada per DCC participa tant en processos d'atracció com en processos de repulsió, i també en creixement axonal. La senyalització mitjançada per UNC-5, en canvi només vehicula respostes de repulsió ja sigui de forma homodimèrica, com formant heterodímers amb DCC (Barallobre et al., 2005; Guan and Rao, 2003).

En el procés de transducció intracel·lular de la senyal induïda per la Netrina-1 és depenent del receptor/receptors que la mitjancin, creant una varietat de possibilitats en la senyalització que s'activa. En conjunt s'hi engloben: cAMP/PKA, PI3K, PLC γ , GEFs, Rho GTPases (RhoA, Cdc42, Rac1), MAPKs (Erk1/2, p38), cGMP/PKG... A més cal remarcar que Netrin-1 activa la transcripció gènica a través de la participació del factor de transcripció NFAT (*Figura 24*) (Barallobre et al., 2005; Guan and Rao, 2003).

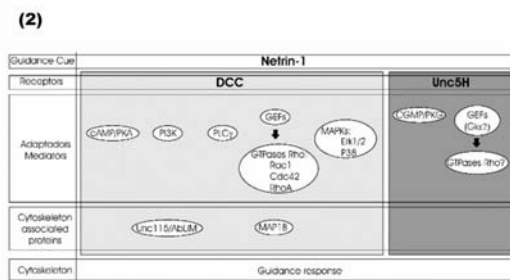
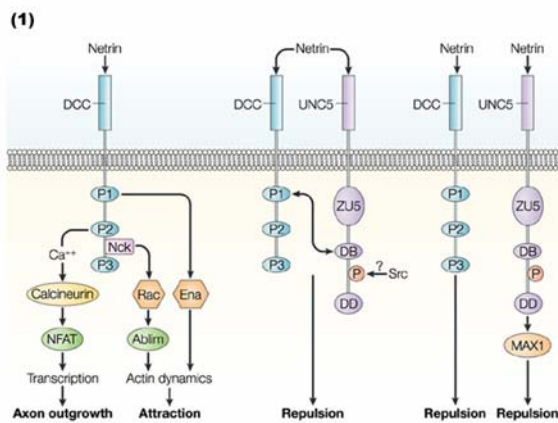


Figura 24 Esquematització de les vies activades per la Netrina-1 i efecte dependent dels receptors que hi participen. Adaptat de: (1) Guan and Rao, 2003; (2) Barallobre et al., 2005.

MAP1B és necessària per a la senyalització de Netrina-1 en migració neuronal i guiatge axonal: Els estudis sobre la participació de la MAP1B en la via de senyalització activada per Netrina-1 indiquen que la fosforilació en mode I de la proteïna MAP1B de neurones de cultius primaris hipocampals es veu incrementada pel tractament d'aquests cultius amb Netrina-1 (Figura 25) (Del Rio et al., 2004). A més, els ratolins deficientes en *netrin-1* presenten una disminució en els nivells basals de fosforilació de la MAP1B en mode I. Una altra evidència de la implicació de MAP1B en la senyalització intracel·lular induïda per Netrina-1 és l'alteració en tractes axonals i les anormalitats del nucli pontí observades en els ratolins *map1b*^{-/-}, fenotípicament homòlogues a les que presenten els animals *netrin-1*^{-/-} (Figura 25) (Del Rio et al., 2004).

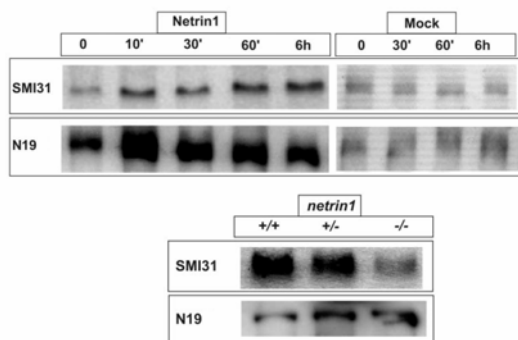


Figura 25 La Netrina-1 induïx la fosforilació de la MAP1B. Cultius primaris neuronals d'hipocamp tractats amb sobrededants que contenen la Netrina-1 (Netrin1) o bé amb sobrededants control (Mock). El tractament amb la Netrina-1 induïx un increment de la fosforilació en mode I de la MAP1B (MAP1B-P) (reconegut per western blot amb l'anticòs SMI31) que s'observa a partir de 60 minuts de tractament (60') (panell superior). La deficiència en el gen *netrin1* (-/-) provoca una disminució en els nivells basals de fosforilació en mode I de la MAP1B en comparació amb animals heterozigots (+/-) i wild-type (+/+) (panell inferior). Amb l'anticòs N19 es reconeix la MAP1B independentment de l'estat de fosforilació (control de càrrega). Adaptat de Del Rio et al., 2004.

3.5.2 La senyalització induïda per les Semaphorines, Ephrines i Slits

Les molècules de guia més conegudes i estudiades, a banda de la ja comentada Netrina-1 són les que formen part de la família de les Semaphorines, de la família de les ephrines i de la família de les Slits. Totes elles han estat analitzades àmpliament a nivell funcional, a nivell d'interacció amb receptors i a nivell de transducció de la senyalització que originen. En aquest últim apartat, totes elles tenen en comú que produeixen l'afectació del citoesquelet com a mecanisme per promoure la resposta neuronal (Barallobre et al., 2005; Dickson, 2002; Guan and Rao, 2003; Hatten, 1999; Hatten, 2002; Huber et al., 2003; Kruger et al., 2005; Marin and Rubenstein, 2003; Martinez and Soriano, 2005).

Les Semaphorines, les ephrines i les Slits participen en la regulació de processos de migració i guia axonal (apartats 2.2.3 i 2.3.2). La senyalització induïda per aquestes molècules de guia té una importància cabdal en el desenvolupament del SNC, però s'aparta de la temàtica central d'aquesta Tesi. A continuació es mostra de forma esquematitzada la participació d'algunes vies de senyalització en la transducció de la senyal iniciada per aquestes molècules. L'efecte final observat és dependent dels receptors que en vehiculen la senyalització i de les vies de senyalització intracel·lular que hi participen.

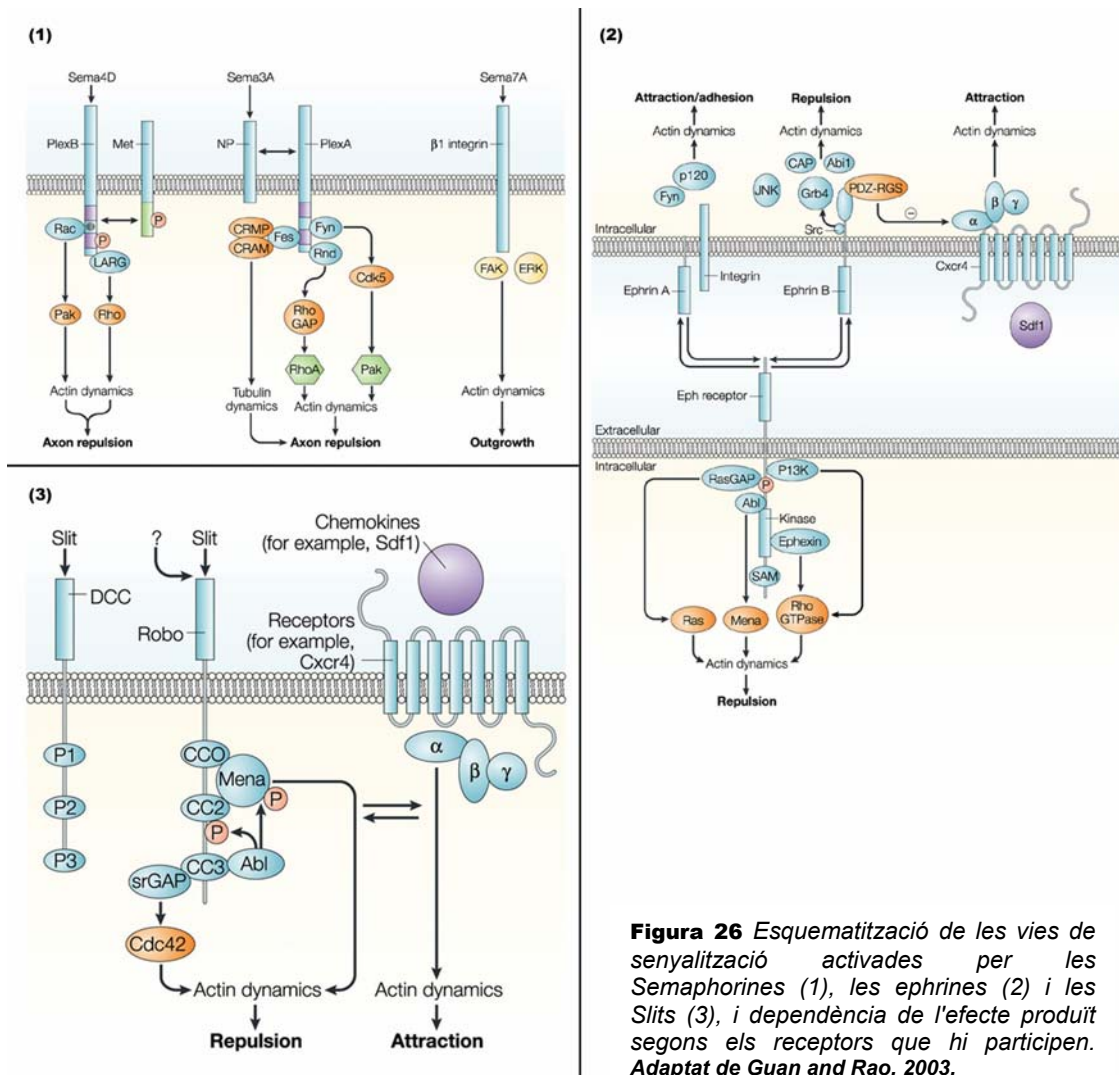


Figura 26 Esquematització de les vies de senyalització activades per les Semaphorines (1), les ephrines (2) i les Slits (3), i dependència de l'efecte produït segons els receptors que hi participen. Adaptat de Guan and Rao, 2003.

3.6 Les implicacions funcionals de la senyalització de la Reelina:

L'observació d'un efecte directe de Reelina sobre models funcionals reproduïbles *in vitro*, permet analitzar la importància real de diferents punts de les cascades de senyalització que s'activen com a resposta a Reelina. Quan es disposa d'un bon model funcional *in vitro* es poden introduir variables que permetin obtenir dades rellevants sobre la participació d'una determinada via de senyalització en la funció concreta que realitza la Reelina en aquell model. Algunes d'aquestes alteracions del model és la inhibició farmacològica d'una via de senyalització o la utilització de mutants deficients en alguna proteïna concreta. A continuació es detallen alguns dels models que han estat descrits a la bibliografia per demostrar una funció concreta de Reelina sobre processos diversos, tots ells aplicables per comprovar la importància funcional de diferents vies de senyalització:

La Reelina com a senyal inhibidora de la migració: Dos models *in vitro* permeten observar un efecte inhibidor produït per la Reelina sobre la migració neuronal.

Un primer model on es constata l'efecte inhibidor de la Reelina sobre la migració, es fixa en les neurones secretores de gonadotropina. Explants de bulb olfatori, secretors de Reelina indueixen la inhibició de la migració de neurones secretores de gonadotropina en confrontar-los amb agregats d'aquest tipus cel·lular procedents d'una línia immortalitzada. El bloqueig de la funció de la Reelina amb l'anticòs CR-50 reverteix l'efecte observat (Cariboni et al., 2005).

D'altra banda, la monitorització *in vitro* de neurones migrant sobre glia radial permeté observar que la Reelina atura el procés migratori i promou una desunió del neuroblast migrant respecte de la glia radial (Dulabon et al., 2000). En aquest segon model s'estaria solapant un efecte de la Reelina sobre les propietats d'adhesió dels neuroblasts migrants i les conseqüències a nivell de parada de la migració de tipus radial que estava duent a terme

La Reelina en processos de desadhesió: Un altre exemple de regulació de les propietats d'adhesió cel·lulars per acció de la Reelina el trobem en el model de migració de neuroblasts de la SVZ. Cultivant *in vitro* explants de SVZ es pot reproduir la migració de tipus tangencial que els neuroblasts efectuen *in vivo*. En aquest tipus de migració les neurones surten de l'explant formant cadenes amb interaccions homofílques entre elles. La reproducció d'aquest sistema en presència de Reelina al medi de cultiu permet observar que les neurones es desadhereixen, tot i no perdre la capacitat de migració (Hack et al., 2002).

La Reelina com a factor de desenvolupament neurític: Els cultius primaris de neurones hipocampals d'animals deficients en *reelina* presenten una disminució en la neuritogènesi que es reverteix en afegir Reelina recombinant al medi de cultiu (Niu et al., 2004).

La Reelina en plasticitat sinàptica: En efectuar registres fisiològics en rodanxes d'hipocamp de ratolí mantingudes *in vitro* es pot observar que en afegir Reelina recombinant al medi de cultiu s'indueix l'LTP a la regió CA1 (Weeber et al., 2002).

Introducció (4)

Models animals d'estudi del desenvolupament

Els primers estudis amb soques d'animals amb alteracions en el desenvolupament es van iniciar molt abans que les tècniques de biotecnologia animal permetessin dissenyar-los. Les mutacions espontànies van permetre estudiar processos de desenvolupament del SNC sense conèixer-ne els gens ni les proteïnes implicades. D'aquest grup en destaca la soca de ratolins *reeler*, coneguda des del 1951 i analitzada per les greus anormalitats que presenta en el posicionament neuronal (Falconer, 1951).

Des de llavors, les mutacions espontànies s'han mantingut importants com a models d'estudi de processos de desenvolupament. A més, la possibilitat de generar animals defectius per a un gen determinat, d'introduir modificacions en la seva seqüència o de controlar-ne espaciotemporalment l'expressió, han revolucionat les possibilitats de treballar amb animals model de desenvolupament.

4.1 Animals deficients en proteïnes discretes:

L'aparició de mutacions espontànies, fenotípicament detectables, produïdes en soques de ratolí consanguïnes han tingut una de gran importància per als estudis de desenvolupament del SNC.

Actualment, la creació d'animals mutants que tenen abolida l'expressió d'un gen concret s'aconsegueix de forma dirigida (animals *knock-out*). La utilització de tècniques de recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries permet crear línies de cèl·lules mare que tenen delecions o insercions gèniques en regions precises del genoma. La implantació d'aquestes cèl·lules en blastòcits en desenvolupament permet crear ratolins fundadors (en mosaïcisme), a partir dels quals es pot arribar a establir noves soques de ratolí que siguin *knock-out* per a un gen concret. Una variant d'aquest sistema permet substituir completament o parcial, una seqüència genòmica endògena concreta per una altra de forània (*knock-in*).

La comparació dels fenotips que presenten diferents soques d'animals mutants, que en alguns casos són homòlegs malgrat afectar a gens diferents, han estat el punt de partida sobre el qual s'han basat molts treballs de recerca d'interaccions moleculars. El descobriment de la pròpia via de senyalització de la Reelina (apartat 3) es basa en bona part a la comparació fenotípica entre soques de ratolins mutants. Els ratolins deficients en la proteïna Reelina, els que són deficients en els receptors VLDLR i ApoER2, i els ratolins deficients en la proteïna mDab1 presenten les mateixes anormalitats; fet que en va promoure els estudis d'interrelació a nivell molecular.

4.1.1 Els mutants *reeler*:

Fins a l'actualitat s'han descrit diverses soques de ratolins que tenen deficiències en l'expressió de la proteïna Reelina. En tots els casos, el resultat final és l'absència de Reelina funcional en el cervell i se'n deriven alteracions molt importants en el desenvolupament del SNC, causants de l'atàxia i del problema en la locomoció. Aquests animals reben el nom genèric de *reeler* i tots ells presenten idèntiques alteracions fenotípiques (D'Arcangelo and Curran, 1998).

Les soques de ratolins *reeler*: La primera descripció d'aquests animals correspon a la soca ***reeler Edinburgh (rl^{ed})/reeler Jackson (rl)***, descoberta a Edinburg i actualment mantinguda als laboratoris Jackson (Falconer, 1951). Es tracta d'un mutant espontani que presenta una delecio parcial del gen *reelina*; en aquests animals no s'expressa la proteïna Reelina i tampoc es detecta expressió del gen a nivell d'mRNA (D'Arcangelo et al., 1996). L'altra soca *reeler* espontània es coneix amb el nom de ***reeler orleans (rl^{orl})*** (Guenet, 1961). En aquests animals es pot detectar l'expressió del gen *reelina*, però tot i així el fenotip que presenten és *reeler* ja que la proteïna mai arriba a ser funcional. La causa es deu a un truncament a l'extrem C-terminal de la proteïna, essencial per a la seva secreció. Aquests animals contenen una forma no secretable de la proteïna Reelina que s'acumula en el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules que l'expressen (D'Arcangelo et al., 1997).

Finalment hi ha diferents soques de *reeler* produïdes per inserció de transgens enmig de la seqüència del gen *reelina*, la més destacable és la que fou generada per la inserció casual del transgen *supfos* en el locus de *reelina*: ***reeler transgene (rt^{ts})***, que va permetre la identificació del gen causant del fenotip *reeler* (Miao et al., 1994).

El fenotip dels animals reeler: En els animals *reeler*, les neurones es generen a les zones de proliferació de forma totalment normal (zona ventricular, zona subventricular i llavi ròmbic) i inicien la seva migració també amb normalitat. No obstant, en aproximar-se a la seva zona de destí, les neurones dels animals *reeler* no formen correctament les estructures citoarquitectòniques previstes (Tissir and Goffinet, 2003). Les primera descripció de la patologia dels animals *reeler* n'analitzava el cerebel, on les anormalitats són més manifestes fins i tot a nivell macroscòpic degut a la pèrdua de la foliació (Hamburger, 1960). Les estructures laminades d'aquests animals presenten una gran desorganització i hipoplàsia al cerebel (Caviness and Rakic, 1978; Goffinet, 1984).

En general, el programa de diferenciació de les neurones dels animals *reeler* no sempre es veu sistemàticament afectat pel seu posicionament ectòpic en les diferents estructures del SNC. Així doncs, es formen els tipus neuronals normals, la ramificació axonal i els arbres dendrítics són sovint correctes, i les neurones poden arribar a establir contactes sinàptics amb les seves regions diana; a més, la mielinització i la gliogènesi no pateixen alteracions (Tissir and Goffinet, 2003). De totes maneres, en diversos casos, les connexions es troben fortament alterades.

La migració neuronal a l'escorça en animals reeler: Analitzant el desenvolupament de l'escorça cerebral en els animals *reeler*, i comparant-la amb la dels animals *wild-type* (apartat 2.2.1), s'observa com la formació de la preplaca s'efectua correctament (E12.5-E13.5). És a partir d'aquell moment, en iniciar-se la migració radial de les neurones de la placa cortical, que comencen a produir-se importants anormalitats. La primera onada migratòria de cèl·lules de la placa cortical no s'insereixen a la preplaca (separant-la en zona marginal i subplaca) sinó que s'hi empaqueten per sota (E14.5). Això provoca que les cèl·lules de la subplaca es localitzin ectòpicament i es mantinguin unides a les cèl·lules de la zona marginal, formant el que es coneix com a superplaca (Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). La superplaca és una estructura atapeïda de cossos cel·lulars; allà s'hi localitzen les cèl·lules de Cajal-Retzius, les cèl·lules de la subplaca i algunes neurones de la placa cortical (Caviness, 1982; Derer, 1985).

El conjunt de neurones de la placa cortical en desenvolupament (E14.5-E18) dels animals *reeler* no reconeixen la posició i orientació correctes del final de la seva via de migració: s'empaqueten a la part més baixa de l'escorça en comptes d'avançar fins a la zona marginal. Així, mentre que en animals *wild-type* les últimes neurones generades de la placa cortical es col·loquen a la part més alta (immediatament per sota de la zona marginal), en els ratolins *reeler* les últimes neurones que es generen es col·loquen a la part més baixa de tota l'escorça (Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). A més, les neurones de la placa cortical dels animals *reeler* es veuen desplaçades per fibres obliqües que atravesen l'escorça; com a conseqüència, l'estructura histològica cortical conté solcs buits de cossos cel·lulars (Goffinet, 1979).

El patró habitual de formació de les plaques de l'escorça des de dins cap a fora (*inside-out*) (apartat 2.2.1) es converteix en un patró des de fora cap a dins (*outside-in*). El resultat final la inversió en la distribució de les capes de la placa cortical (*Figura 27*) (Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003).

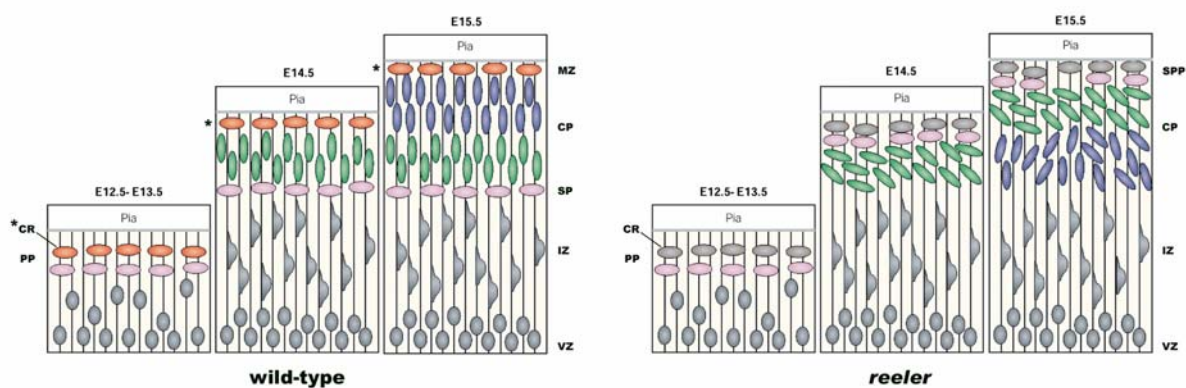


Figura 27 Esquematzació del desenvolupament embrionari cortical en animals *wild-type* i en *reeler*. En animals *wild-type* (panell esquerre), els neuroblasts generats a la zona ventricular migren radialment insertant-se a la preplaca per sota de les cèl·lules de Cajal-Retzius que secreten la Reelina; la distribució de les cèl·lules de la placa cortical segueix un patró de dins cap a fora. En els animals *reeler* (panell dret) 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.**

El fenotip dels animals *reeler* en les connexions de l'hipocamp: A grans trets, els animals *reeler* mantenen totes les connexions hipocampals; no obstant, mostren greus anormalitats en l'establiment d'aquestes connexions i en el patró final de les projeccions que formen. Durant el desenvolupament de l'hipocamp, les fibres de l'escorça entorínica innerven les regions de l'SLM i de la ML tant en animals *wild-type* com en animals *reeler*. En els animals *reeler* però la connexió entorínico-hipocampal no es desenvolupa amb normalitat. En els *reeler*, la porció de l'SLM de la regió CA3 no mostra innervació de fibres entoríniques, fet que coincideix amb l'absència de cèl·lules de Cajal-Retzius en aquesta regió (Borrell et al., 1999a; Borrell et al., 1999b). D'altra banda, les fibres entoríniques innerven ectòpicament porcions de l'SR i l'SO. Finalment, els patrons terminals característics de la connexió entorínico-hipocampal es veuen també alterats; l'escorça entorínica lateral innerva uniformement l'SLM de les regions CA1 i CA2, sense delimitar-se a les interfases CA1-subiculum i CA2-CA3, tal com succeeix en els animals *wild-type* (Borrell et al., 1999a). Les fibres entorínico-hipocampals que innerven el gir dentat (la *via perforant*) també estan alterades en els animals *reeler*. En part, fibres d'aquesta connexió es troben fortament empaquetades formant feixos aprop de la fissura hipocàmica, en especial les que s'originen a l'escorça entorínica lateral, que haurien d'innervar la totalitat de la OML. També s'observen fibres ectòpiques de la *via perforant* que s'insereixen a la regió de l'hilus (Borrell et al., 1999a). Les connexions comissurals de l'hipocamp també apareixen alterades en els animals *reeler*. Les fibres comissurals innerven l'SLM de la regió CA3, coincidint amb l'absència de cèl·lules de Cajal-Retzius en aquella zona. Al gir dentat, les fibres comissurals no es circumscriuen a la regió IML i envaeixen les capes MML i OML (Borrell et al., 1999b).

Els axons de la projecció entorínico-hipocàmpica mostren una disminució transitòria en el nombre de ramificacions i en la longitud dels axons col·laterals, clarament observables durant el desenvolupament (P2) en els animals *reeler*. Posteriorment, les diferències disminueixen fins a desaparèixer a l'edat adulta (Borrell et al., 1999a). En canvi, la disminució en el nombre de sinàpsis de les regions SLM i OML en els animals *reeler* respecte als *wild-type* es manté fins a l'edat adulta (Borrell et al., 1999a).

D'altra banda, la connexió septo-hipocàmpica també presenta una distribució anòmala en la innervació de l'hipocamp d'animals *reeler*. No obstant les cèl·lules diana i les característiques dels contactes sinàptics d'aquesta connexió són les mateixes que en els animals *wild-type*, indicant que la causa de les anormalitats observades en els *reeler* és el posicionament ectòpic de les neurones diana (Pascual et al., 2004).

El fenotip dels animals heterozigots reeler (+/rl): La disminució de la immunoreactivitat de la Reelina s'observa en mostres humanes de pacients afectats per esquizofrènia (Impagnatiello et al., 1998). Per aquest motiu es van iniciar els estudis de animals *reeler* heterozigots, que tenen una disminució de la presència de la Reelina en cervell degut a l'hemizigosi, pensant que podrien ser utilitzats com a model animal d'esquizofrènia. Les dades obtingudes indiquen que els animals *+/rl* tenen algunes lleugeres anormalitats en el posicionament cel·lular cortical que els fan diferents dels animals *wild-type* (Tueting et al., 1999). Els animals *+/rl* presenten disminució en l'expressió de *GAD₆₇*, com els pacients d'esquizofrènia, i a nivell de comportament mostren signes de neofòbia, característiques que els converteixen en candidats a ser un model útil per a l'estudi de l'esquizofrènia i el desenvolupament de teràpies antipsicòtiques (Costa et al., 2002a; Costa et al., 2002b; Tueting et al., 1999).

No obstant, les dades són altament controvertides, i recentment s'ha posat en qüestió que els animals *+/rl* tinguin realment alteracions en el comportament; segons aquests darrers estudis els animals *reeler* heterozigots no són un bon model animal d'esquizofrènia (Podhorna and Didriksen, 2004). En canvi, altres estudis també recents evidencien dèficits d'aprenentatge en els heterozigots *reeler*, una disminució important de la plasticitat sinàptica i un dèficit en la innervació inhib tòria funcional de l'hipocamp. Aquestes característiques els correlacionen novament amb un fenotip comparable al dels pacients d'esquizofrènia (Qiu et al., 2005).

Alteracions moleculars en els animals reeler: A més de les alteracions a nivell macroscòpic i estructural en el desenvolupament del SNC, els animals *reeler* també presenten algunes anormalitats detectables a nivell molecular. Les principals alteracions observades afecten a les proteïnes de la seva via de senyalització induïda per la Reelina:

1) La proteïna mDab1 s'acumula en la seva forma no fosforilada. La falta de senyalització induïda per Reelina evita que mDab1 es fosforili en tirosines i s'evita l'inici del procés d'ubiquitinització i degradació de la proteïna (Arnaud et al., 2003a; Howell et al., 2000).

2) Els nivells basals de fosforilació en mode I de la proteïna MAP1B es troben disminuïts (apartat 3.4.5) (Gonzalez-Billault et al., 2005).

3) L'activitat basal de GSK3 β és superior al normal i la proteïna Tau es troba hiperfosforilada (Ohkubo et al., 2003).

4.1.2 Altres mutants amb fenotip reeler:

La mutació del gen *reelina* no és l'única capaç de produir el fenotip *reeler*. Així, els animals deficientes en els receptors de la Reelina ApoER2 i VLDL (mutants dobles dels gens *apoer2* i *vldlr*) i els animals deficientes en la proteïna adaptadora mDab1 (mutants dels gen *mdab1*) presenten un fenotip indistingible del fenotip *reeler* (Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003).

Els mutants *mdab1*: L'aparició espontània d'una mutació en els laboratoris Jackson va permetre descriure la soca de ratolins *scrambler*, que es caracteritza per patir una ataxia molt severa (Sweet et al., 1996). Un anàlisi més detallat de la distribució neuronal en aquests animals va evidenciar greus deficiències en cerebel, escorça i hipocamp, que es corresponen amb les anormalitats observades en els ratolins *reeler* (Goldowitz et al., 1997). Independentment, es va descriure una altra soca amb una mutació espontània que presentava unes anormalitats en el posicionament neuronal idèntiques a les dels animals *reeler* i *scrambler*: la soca de ratolins *yotari* (Yoneshima et al., 1997). Finalment es va atribuir els problemes dels animals *scrambler* i *yotari* a

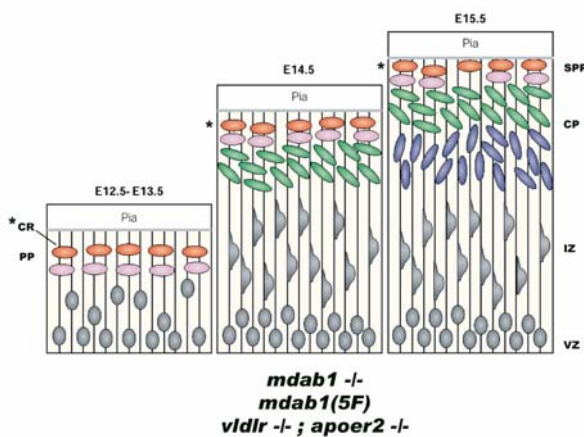


Figura 28 Esquemàtic del desenvolupament embrionari cortical en animals *mdab1 -/-*, en *mdab1(5F)* i en *vldlr -/-;apoer2 -/-*. Malgrat que les cèl·lules de Cajal-Retzius secreten la Reelina, les neurones migrants no hi responen. Les neurones de la placa cortical s'acumulen per sota de la preplaca seguint 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; SPP, superplaca; CP, placa cortical; IZ, zona intermèdia; VZ, zona ventricular; *, secreció de la Reelina (taronja).

Més recentment, una vegada demostrada la importància de la fosforilació de l'mDab1 en la senyalització induïda per la Reelina (Howell et al., 1999a), s'ha generat una soca de ratolins que contenen mutacions puntuals en determinades tirosines de l'mDab1. En aquests animals, les cinc tirosines pròximes al domini PTB de l'mDab1 es van substituir per cinc fenilalanines. Amb aquesta construcció es va generar la soca *mutant mdab1(5F)*, fenotípicament idèntica a les soques *reeler*, *scrambler*, *yotari* i *mdab1 -/-* (Figura 28). D'aquesta manera es posava de manifest la importància de la fosforilació de l'mDab1 *in vivo* durant el desenvolupament (Howell et al., 2000).

mutacions en el gen *mdab1*: l'expressió a nivell d'mRNA es manté, però no hi ha producció de la proteïna mDab1 (Sheldon et al., 1997). L'atribució dels fenotips *scrambler* i *yotari* a les mutacions en *mdab1* van permetre dissenyar una nova soca de ratolins **mutants *mdab1* (*mdab1 -/-*) (knock-out)** que contenen una inserció a la seqüència gènica de l'*mdab1*. Els animals *mdab1 -/-* foren dissenyats per interrompre de forma dirigida l'expressió del gen *mdab1*. Aquests animals tenen també un posicionament neuronal anormal, i són fenotípicament indistingibles dels *reeler* (Howell et al., 1997b) (Figura 28). Les dades obtingudes de l'estudi d'aquests animals mutants van permetre situar la proteïna adaptadora mDab1 en la via de senyalització de la Reelina i iniciar els estudis de transducció intracel·lular de la seva senyal (apartat 3).

Més recentment, una vegada demostrada la importància de la fosforilació de l'mDab1 en la senyalització induïda per la Reelina (Howell et al., 1999a), s'ha generat una soca de ratolins que contenen mutacions puntuals en determinades tirosines de l'mDab1. En aquests animals, les cinc tirosines pròximes al domini PTB de l'mDab1 es van substituir per cinc fenilalanines. Amb aquesta construcció es va generar la soca *mutant mdab1(5F)*, fenotípicament idèntica a les soques *reeler*, *scrambler*, *yotari* i *mdab1 -/-* (Figura 28). D'aquesta manera es posava de manifest la importància de la fosforilació de l'mDab1 *in vivo* durant el desenvolupament (Howell et al., 2000).

Una última soca de ratolins *mutants mdab1* expressa una forma truncada de la proteïna mDab1 (p45-mDab1): **mutant mdab1 p45**. Aquests animals expressen la regió N-terminal de la proteïna, que conté el domini PTB i els cinc llocs pròxims de fosforilació en tirosines. Aquesta forma curta de l'mDab1 es correspon amb una variant endògena originada per un empalmament alternatiu de l'mRNA de l'mDab1: *mdab1-271* (Howell et al., 1997a). Els mutants *mdab1 p45* n'expressen aquesta variant de forma exclusiva i només els provoca certes alteracions quan s'hi troba en hemizigosi; les alteracions descrites per aquest cas no són homòlogues a les dels *reeler* (Herrick and Cooper, 2002).

Els mutants *vldlr* i *apoer2*: Abans de conèixer-se que ApoER2 i VLDLR funcionen com a receptors de la Reelina, ja se'ls va atorgar un paper important en el desenvolupament del SNC gràcies a l'anàlisi dels **mutants dobles de *vldlr* i *apoer2* (*vldlr* -/-;*apoer2* -/-)**. L'absència simultània dels dos gens, confereix a aquests animals un fenotip idèntic al dels *reeler* i al dels *mutants mdab1*; per exemple a nivell de posicionament neuronal (Trommsdorff et al., 1999) (*Figura 28*). En canvi, les mutacions individuals de cada un dels receptors no té un efectes tant devastadors a causa de la redundància de funcions deguda a la seva homologia (Trommsdorff et al., 1999). La caracterització del fenotip del doble mutant va iniciar els estudis d'interacció d'aquest receptors amb la Reelina i amb l'mDab1 a través dels dominis extracel·lular i intracel·lular respectivament (apartat 3). A nivell molecular, tal i com succeeix en els *reeler*, la deficiència dels receptors provoca que s'acumuli mDab1 en la seva forma no fosforilada (Rice and Curran, 2001; Trommsdorff et al., 1999). També s'ha descrit que els animals *vldlr* -/-;*apoer2* -/- presenten una hiperfosforilació de Tau; cosa que també succeeix en els mutants *mdab1* (Ohkubo et al., 2003).

4.1.3 Altres mutants amb alteracions en el desenvolupament relacionades:

La diversitat d'animals mutants que presenten alteracions en el desenvolupament és molt elevada i mostren un ventall ampli de característiques fenotípiques. Alguns d'aquests fenotips són reminiscents al observats en els animals *reeler*:

Els mutants *cdk5*, *p35* i *p39*: La deficiència en la proteïna quinasa depenent de ciclina (Cdk) 5, o bé de les seves subunitats reguladores específicament neuronals p35 i p39, produeix alteracions en l'estratificació de l'escorça. Aquestes anormalitats mantenen certa similitud amb les observades en els animals *reeler*, si bé no hi són completament idèntiques. Analitzant el fenotip d'aquests animals es pot considerar que la Reelina actua a la fase final de migració de les neurones de la placa cortical per regular la seva disposició just per sota de la zona marginal sense envair-la; en canvi p35/Cdk5 i p39/Cdk5 actuarien principalment en la migració d'aquestes neurones sobre les seves predecessores durant la formació de la placa cortical (Chae et al., 1997; Gilmore et al., 1998; Ko et al., 2001; Kwon and Tsai, 1998; Ohshima et al., 1996).

Cdk5 és una serina/treonina-quinasa activa en neurones postmitòtiques i té la capacitat de fosforilar molècules com els Neurofilaments, la proteïna Tau o fins i tot mDab1, a més, també regula per fosforilació el citoesquelet d'actina. Per tal de dur a terme aquesta tasca, Cdk5 ha d'associar-se a les seves subunitats reguladores, p35 i p39, que s'expressen exclusivament en cervell (Lew et al., 1994; Tang et al., 1995; Tsai et al., 1994). Així, p35/Cdk5 és essencial per al creixement axonal, i p39/Cdk5 modula el

creixement neurític a través de la regulació del citoesquelet d'actina i podria participar en la regulació de la sinaptogènesi ja que p39 és present en sinapsis .

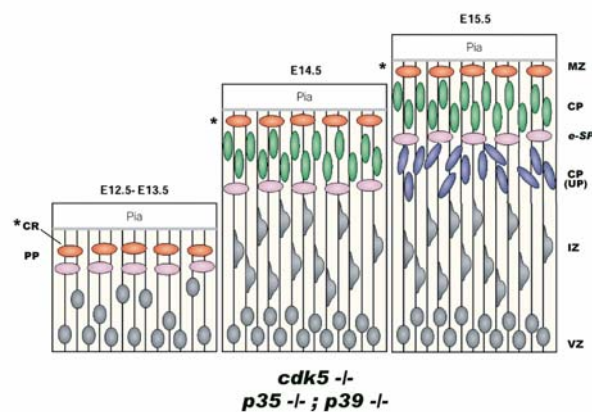


Figura 29 Esquematzació del desenvolupament embrionari cortical en animals *cdk5*^{-/-} i en *p35*^{-/-};*p39*^{-/-}. La primera onada de neuroblasts migrants generats a la zona ventricular s'insereix a la preplaca, separant-la en zona marginal i subplaca. Les següents onades de neurones de la placa 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).

Els *mutants cdk5* (*cdk5*^{-/-}) moren perinatalment i mostren deficiències en l'estratificació de l'escorça, absència de foliació en el cerebel i defectes de laminació en hipocamp. El desenvolupament inicial de l'escorça dels animals *mutants cdk5* és normal: la preplaca es forma correctament i la primera onada de cèl·lules migrants de la placa cortical (cèl·lules de la capa VI) s'hi insereixen, separant-la en zona marginal i subplaca. A partir d'aquest moment però, les onades subsegüents de cèl·lules de la placa cortical no poden atravesar les precedents i s'acumulen ectòpicament per sota de la subplaca, formant el que es coneix com a sotaplaca (o *underplate*). Les cèl·lules de la sotaplaca s'acumulen seguint un patró invertit *outside-in* (Figura 29) (Gilmore et al., 1998; Ohshima et al., 1996).

Els *mutants p35* mostren també alteracions en la laminació en escorça; en canvi no tenen malformacions en el cerebel ni en la formació hipocàmpica. L'escorça d'aquests animals es desenvolupa inicialment amb tota normalitat: com en els *mutants cdk5*, la preplaca es forma correctament i la primera onada de cèl·lules migrants de la capa cortical s'hi insereix separant-la en zona marginal i subplaca. En aquests animals les onades subsegüents de cèl·lules de la capa cortical sí són capaces d'atraspassar la subplaca, però no en canvi d'arribar a la zona marginal; en configura doncs una capa cortical invertida (*outside-in*) entre la zona marginal i la subplaca. Així, els *mutants p35* presenten un fenotip molt similar al dels *mutants cdk5*, però menys sever (són viables i fèrtils) ja que hi ha compensació de la funció de la proteïna p35 (Chae et al., 1997; Kwon and Tsai, 1998). L'altra proteïna activadora de Cdk5, la proteïna p39, seria la responsable d'aquesta compensació. També degut a aquesta redundància de funció entre p35 i p39, els *mutants p39* no presenten alteracions detectables de posicionament neuronal. Així, p35 i p39 tenen capacitats compensatòries diferencials, cada una d'elles atenua només en part la deficiència de l'altra. L'absència simultànea de les dues subunitats reguladores, en els *mutants dobles de p35 i p39* (*p35*^{-/-};*p39*^{-/-}), el fenotip que s'observa és idèntic al dels animals *cdk5*^{-/-} (Figura 29) (Ko et al., 2001).

Els mutants *tbr-1*: La proteïna Tbr-1 pertany a la família *T-element* de factors de transcripció i es considera reguladora, almenys en part, de l'expressió del gen *reelina* (Bredt, 2000). Els animals que n'expressen una forma defectiva incapaç d'unir-se al DNA, presenten alteracions severes del desenvolupament de l'escorça cerebral, i moren poc després del naixement. En escorça, *tbr-1* s'expressa en les primeres neurones postmitòtiques, essencialment en preplaca (més endavant zona marginal i subplaca) i en

capa VI; des d'edats embrionàries primerenques i fins a l'edat adulta (Bulfone et al., 1995). Tbr-1 també es troba en neurones mitrals del bulb olfatori durant el primer mes de vida i en neurones glutamatèrgiques de la capa III de la placa cortical en edat adulta (Hevner et al., 2001). Aquests *mutants tbr-1* mostren fenotips diferents segons la regió cerebral. Així, en la part rostral de la neoescorça tenen un fenotip típicament *reeler* (no es produeix la separació de la preplaca, la disposició de les plaques de la placa cortical és invertida i tenen un increment en la dispersió cel·lular). En aquestes regions es detecta una disminució important en l'expressió de la Reelina i en conseqüència, també un increment de la quantitat de proteïna mDab1. Contràriament, a la regió més caudal de la neoescorça i a l'hipocamp no hi ha una disminució general de l'expressió de la Reelina; s'intercalen regions on l'expressió es manté, amb d'altres on aquesta disminueix marcadament. En determinades regions, les cèl·lules de la placa cortical tenen tendència a formar grups, o *clústers*, perdent l'estructura laminar; fenotip induït, potser, per l'expressió clapejada de la Reelina en aquestes zones (Hevner et al., 2001).

És molt possible que la redundància de funció d'altres proteïnes de la mateixa família de Tbr-1, com són per exemple Tbr-2, Emx1 o Emx2 compensin en part la deficiència de Tbr-1 en els *mutants tbr-1* i en suavitzin el fenotip en algunes regions del cervell. El mateix passaria en els mutants d'aquests altres factors de transcripció; per exemple, els *mutants emx2* tenen també algunes semblances als *reeler*, però sense compartir-hi totes les característiques fenotípiques (Mallamaci et al., 2000).

Els mutants *ps1*: L'absència de la proteïna Presenilina (PS) 1 (γ -secretasa), responsable del processament proteolític d'APP i Notch, provoca unes alteracions en aquests animals que fenotípicament en corresponen amb la lisencefàlia de tipus 2 humana, una malaltia atribuïda a la deficiència de la Reelina (Hong et al., 2000). A nivell citoarquitectònic, els *mutants ps1* no mostren totes les anormalitats dels *reeler*, però per exemple hi comparteixen un gran atapeïment de les cèl·lules de la placa cortical. En els *reeler*, aquesta característica es deu a la deficiència en l'expressió de la Reelina per part de les cèl·lules de Cajal-Retzius; les neurones de la placa cortical es distribueixen seguint un patró invertit *outside-in* (apartat 4.1.1). En els *mutants ps1*, l'elevat grau d'empaquetament de les neurones de la placa cortical es deu a la pèrdua de les cèl·lules de Cajal-Retzius, que moren prematurament per deficiències tròfiques; en conseqüència, decau la quantitat de la Reelina que elles secreten. Per tant l'activitat γ -secretasa és bàsica per al posicionament correcte de les cèl·lules corticals, en tant que necessària per la supervivència de les cèl·lules de CR (Hartmann et al., 1999).

Els mutants *src i fyn*: Les proteïnes SFK: Src, Fyn, Yes i Lyn participen en moltes tasques de transducció intracel·lular de la senyal; per exemple, Src i Fyn fosforilen l'mDab1 en resposta a la Reelina (apartat 3.4.1). Totes les SFKs tenen el mateix mecanisme d'acció i sovint comparteixen substrats, afavorint la compensació de deficiències per redundància de funció. Únicament els *mutants triples src -/-;fyn -/-; yes -/-* tenen letalitat primerenca, en canvi tots els mutants simples són viables (Stein et al., 1994). Els *mutants dobles de src i fyn (src -/-;fyn -/-)* moren perinatalment, però mostren anormalitats en el desenvolupament de l'escorça cerebral i el cerebel que els fan, en part, homòlegs als *reeler* (Kuo et al., 2005). En els *mutants src -/-;fyn -/-* hi ha una certa desorganització de la laminació sense arribar a la severitat dels *reeler*: així s'aconsegueix formar una estructura residual de subplaca i l'organització de la placa cortical no està completament invertida. A nivell molecular, aquests animals tenen, com els *reeler*, acumulació de l'mDab1 en la seva forma no fosforilada (Kuo et al., 2005).

4.2 Transgènics d'expressió dirigida

Els animals transgènics són aquells que incorporen material genètic forani en les cèl·lules de la línia germinal. La incorporació del nou material genètic al genoma murí pot produir-se aleatoriament, per inserció a l'atzar del vector que conté la nova seqüència gènica, o bé de forma dirigida per recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries (Nagy et al., 2003). La generació d'animals transgènics, permet induir o aturar l'expressió d'un gen determinat en una regió, edat o tipus cel·lular concrets, i esdevé de gran utilitat per tal de conèixer-ne la funció que realitza *in vivo*. L'anàlisi dels animals transgènics a nivell fenotípic, morfològic o molecular permet l'obtenció de dades rellevants que difícilment s'aconsegueixen *in vitro*, on les condicions de treball sovint no reproduïxen amb exactitud les variables fisiològiques.

4.2.1 Els animals transgènics

La microinjecció de DNA directament al pronucli d'oocits de ratolí fertilitzats és el mètode més senzill i exitós per a la generació d'animals transgènics, i es basa en una tècnica de microinjecció d'oocits desenvolupada als anys 60 i que va permetre generar el primer ratolí transgènic l'any 1980 (Gordon et al., 1980; Lin, 1966; Nagy et al., 2003). Mitjançant aquesta metodologia, la incorporació del DNA forani al genoma murí és atzarosa i no se'n pot predir ni el lloc d'integració ni el número de còpies que s'integren, fent que cada animal fundador sigui únic en relació a aquests paràmetres (Nagy et al., 2003). D'altra banda, la inserció del transgen, si es produeix, acostuma a fer-ho de forma multimèrica en un mateix punt del genoma i abans de la primera divisió de l'oocit, fent que la probabilitat de tenir mosaïcisme sigui inferior al 30% (Nagy et al., 2003).

Els nivells d'expressió del transgen en els animals transgènics depenen de múltiples variables: del número de còpies insertades, del promotor que controla el transgen i especialment del lloc d'integració en el genoma. L'entorn d'integració té una influència cabdal en l'expressió del transgen, fins al punt que pot causar-ne el silenciament (Wilson et al., 1990). Per aquest motiu s'han dissenyat diverses alternatives que en milloren l'expressió; per exemple la incorporació de seqüències intròniques i reguladores en la construcció d'injecció (Giraldo and Montoliu, 2001). No obstant, l'expressió d'aquestes construccions continua sent impredecible. Com a alternativa, la incorporació de seqüències de DNA més llargues ha donat bons resultats en els nivells d'expressió, fent-los independents de la regió d'integració. Per aconseguir-ho, cal construir el transgen en cromosomes artificials (YACs, BACs i PACs) on es poden incorporar tots els elements reguladors necessaris (Giraldo and Montoliu, 2001).

La generació d'animals transgènics per microinjecció d'oocits és sensiblement més senzilla i directa que la generació d'animals *knock-out* o *knock-in*, on es fa necessari el treball amb cèl·lules mare. La incorporació de seqüències gèniques en regions precises del DNA es produeix per recombinació homòloga i s'ha utilitzat majoritàriament per produir animals deficients en proteïnes concretes (animals *knock-out*) (alguns exemples s'han descrit a l'apartat 4.1). La recombinació homòloga també permet introduir canvis totals o parcials en la seqüència que s'expressa a partir d'un promotor determinat (animals *knock-in*).

Transgènics de sobreexpressió regulada: La regulació a voluntat de l'expressió del transgen és un pas més en l'optimització de la utilització de models animals transgènics. Per assolir aquesta fita s'utilitzen sistemes transgènics binaris, amb animals doble-transgènics, on un transgen efector actua sobre un transgen diana, que és el transgen d'interès (Lewandoski, 2001). Existeixen dues categories de sistemes transgènics binaris. En un primer cas, el transgen efector codifica per un factor que regula l'expressió del transgen diana (ex: sistemes *Tet-Off*, *Tet-On* i *Gal4/UAS*). En l'altre cas, el transgen efector codifica per una recombinasa de DNA específica de seqüència que actua sobre el transgen diana (ex: sistema *Cre/loxP*) (Lewandoski, 2001). En tots els sistemes, únicament es produeix l'efecte desitjat sobre el transgen diana allà on s'expressa el transgen efector. Els **sistemes binaris d'activació transcripcional** són sistemes reversibles en els quals l'activació/inactivació del transgen diana es regula mitjançant un fàrmac de fàcil administració. El *sistema Tet-Off*, utilitza la proteïna transactivadora regulada per tetraciclina, o *tetracycline-controlled transactivator*) que és constitutivament activa i és inhibible amb el fàrmac deoxiciclina (Dox, o *deoxycycline*); tTA indueix la transcripció dels gens disposats sota el control del promotor *tetO* (*tetracycline operator*) (Figura 30) (Gossen and Bujard, 1992; Lewandoski, 2001). El *sistema Tet-On* és una versió modificada de l'anterior sistema que utilitza la proteïna transactivadora rtTA (*reverse tTA*); en aquest cas la transactivació a partir de *tetO* només es produeix en presència de Dox (Figura 30) (Gossen et al., 1995; Lewandoski, 2001). Un tercer sistema d'activació transcripcional regulable utilitza l'activador transcripcional Gal4, que s'activa en presència de la droga RU486, i que controla l'expressió del transgen diana a través de la seqüència reguladora UAS (*upstream activating sequence*) situada a 5' d'un promotor mínim (Figura 30) (Lewandoski, 2001; Ornitz et al., 1991). Els **sistemes binaris de recombinació del DNA** són sistemes irreversibles d'activació/inactivació de transgens on el transgen diana conté dues seqüències *loxP*, específiques per a l'acció de la recombinasa Cre. En les cèl·lules on s'expressi el transgen efector, que codifica per a la proteïna Cre, es produirà la recombinació i l'eliminació d'un fragment de DNA del transgen diana. Segons el disseny del transgen diana, la recombinació farà que que s'activi o bé que s'inactivi la seva expressió, depenent de si el fragment eliminat impedia l'expressió del transgen o bé era part de la regió codificant (Figura 30) (Lakso et al., 1992; Lewandoski, 2001).

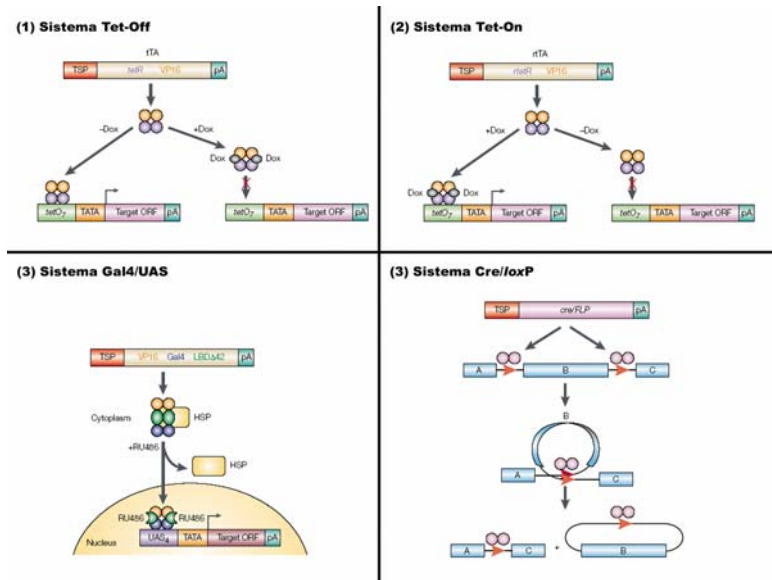


Figura 30 Sistemes transgènics de sobreexpressió regulada. Els sistemes binaris d'activació transcripcional actuen sobre el transgen diana (Target ORF) de manera dependent de la presència de fàrmacs (Dox; RU486): (1) *sistema Tet-Off*, (2) *sistema Tet-On* i (3) *sistema Gal4-UAS*. Els sistemes binaris de recombinació controlen l'expressió del transgen diana per recombinació homòloga i eliminació d'un fragment de DNA: (4) El *sistema Cre/loxP* produeix la recombinació en les seqüències *loxP* (caps de fletxa). TSP, promotor específic de teixit; TATA, promotor mínim; pA, lloc de poli-adenilació; HSP, heat shock proteins. **Adaptat de Lewandoski, 2001.**

deoxiciclina (Dox, o *deoxycycline*); tTA indueix la transcripció dels gens disposats sota el control del promotor *tetO* (*tetracycline operator*) (Figura 30) (Gossen and Bujard, 1992; Lewandoski, 2001). El *sistema Tet-On* és una versió modificada de l'anterior sistema que utilitza la proteïna transactivadora rtTA (*reverse tTA*); en aquest cas la transactivació a partir de *tetO* només es produeix en presència de Dox (Figura 30) (Gossen et al., 1995; Lewandoski, 2001). Un tercer sistema d'activació transcripcional regulable utilitza l'activador transcripcional Gal4, que s'activa en presència de la droga RU486, i que controla l'expressió del transgen diana a través de la seqüència reguladora UAS (*upstream activating sequence*) situada a 5' d'un promotor mínim (Figura 30) (Lewandoski, 2001; Ornitz et al., 1991). Els **sistemes binaris de recombinació del DNA** són sistemes irreversibles d'activació/inactivació de transgens on el transgen diana conté dues seqüències *loxP*, específiques per a l'acció de la recombinasa Cre. En les cèl·lules on s'expressi el transgen efector, que codifica per a la proteïna Cre, es produirà la recombinació i l'eliminació d'un fragment de DNA del transgen diana. Segons el disseny del transgen diana, la recombinació farà que que s'activi o bé que s'inactivi la seva expressió, depenent de si el fragment eliminat impedia l'expressió del transgen o bé era part de la regió codificant (Figura 30) (Lakso et al., 1992; Lewandoski, 2001).

