

UNIVERSITAT DE BARCELONA
PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

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

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

SERGI SIMÓ OLIVAR

Barcelona, març 2006

Programa de Doctorat de Neurociències
Bienni 2000-2002

Resum de resultats i discussió

Resum de resultats i discussió

La Reelina, una proteïna de matriu extracel·lular, és l'eix vertebrador de tot el treball realitzat, i l'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat incrementar el coneixement que tenim tant d'ella com dels seu paper en el desenvolupament del SNC. Aquesta proteïna que vas ser inicialment "descoberta" per Falconer l'any 1951, encara que no ser "redescoberta" fins més endavant quan el grup del Dr. Curran la va clonar i la va identificar com aquella proteïna que era reconeguda per l'anticòs CR-50 (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Falconer, 1951). Durant els seus 10 anys de vida, la Reelina ha despertat gran interès en la comunitat científica, com demostra el gran número de publicacions aparegudes relacionades amb aquesta proteïna (més de 500 articles en la base de dades PubMed).

La Reelina s'ha relacionat en molts i diversos processos, des de la seva participació en el control de la migració cel·lular en les regions amb estructura laminar del SNC, passant pel possible control en la sinaptogènesi en el desenvolupament fins al més recent paper en el control de la neurogènesi adulta en les zones de proliferació, com són la SVZ i la SGZ (Soriano and Del Rio, 2005; Tissir and Goffinet, 2003; Won *et al.*, 2006).

En aquesta tesi hem abordat l'estudi de la Reelina des de dos àmbits diferents, però relacionats. El primer ha estat la caracterització de la cascada de senyalització induïda per Reelina i el segon l'estudi de la participació d'aquestes vies en models animals *in vitro*. Els resultats que aporta aquesta tesi a la senyalització desencadenada per Reelina poden ser de gran importància pel futur coneixement global de l'acció de la Reelina. En el Capítol 1 de resultats relacionem l'activitat de la Reelina amb l'activació de la proteïna MAP1B, proteïna implicada en el control tant de la polimerització com de la dinàmica de l'actina i dels microtúbuls. A més a més, es corrobora aquesta relació amb l'estudi d'una soca de l'animal deficient *MAP1B* on s'observen similituds morfològiques amb l'animal deficient per Reelina, *reeler*.

Els resultats del Capítol 2 són, al nostre entendre, aquells que obren més portes en l'estudi de la senyalització per Reelina, ja que no només relacionem la Reelina amb la via de les MAPK/ERK, via que participa en processos essencials com són la proliferació, la diferenciació o la supervivència (Kolch, 2005), sinó que també obren la porta a que la Reelina participi, mitjançant la proteïna Egr-1, en processos

de regulació gènica que desencadenin a nivell cel·lular canvis profunds i de llarga durada. A més a més, per reafirmar la importància biològica de l'activació de la cascada d'ERK desencadenada per Reelina, més enllà de la seva activació en cultius primaris telencefàlics, utilitzem el model de deshadésio, induïda per Reelina, de les cèl·lules en migració de la RMS. Aquest model ens ha ajudat a demostrar que la cascada de senyalització Reelina/mDab1/...../ERK és essencial, com a mínim, en el process de deshadésio de les cèl·lules de la RMS i suggereix que podria ser de gran importància en altres processos on la Reelina estigui implicada.

En el Capítol 3 trobem una nova prova de que en el camp de la Reelina, com en molts d'altres, existeix un continu redescubrimet de noves funcions abans descartades per a una proteïna. En aquest estudi observem la funció que exerceix la Reelina com a senyal d'stop o de deshadésio, demostrant que les cèl·lules granulars de cerebel aturen la seva migració en resposta al tractament amb sobrenedants que contenen la proteïna Reelina. Es creia, fins al moment, que en el cerebel l'única funció de Reelina era participar en el correcte posicionament de les cèl·lules de Purkinje per arribar a formar la PCL i que no exercia cap altra funció. En aquest punt vam investigar si la participació de la via de l'ERK en el control de la migració de les cèl·lules granulars per part de Reelina era plausible. Els nostre estudis van confirmar que en aquest model, de forma similar a com succeeix a RMS, la via de les ERK participa de forma activa i dependent de Reelina.

Aquests resultats aporten una nova funció de la Reelina al cerebel. A més a més, demostren que la funció per la qual la Reelina activa la via d'ERK no queda restringida únicament al cervell anterior i suggereix que podria ser una via activada en la majoria de processos desenvolupats per Reelina.

La proteolització de la Reelina i els seus efectes en migració

Com hem comentat la Reelina és una proteïna molt gran de més de 400 kDa de pes. Aquest fet sembla contradir-se amb la propietat de ser un proteïna d'ECM difusible de possibles efectes a llarg abast, com seria el cas del seu paper en la desadhesió de les cèl·lules de la RMS (Hack *et al.*, 2002). Si considerem a més que ha estat provat que la seva funció *in vivo* depèn de l'epítot de l'anticòs CR-50, que es creu que participa en la dimerització de la proteïna, ens trobem davant d'un dímer de mes de 800 kDa, el qual sembla poc probable que pugui difondre com una proteïna de pes molecular més moderat i amb mecanismes d'actuació similars com

podria ser la Netrina-1 (proteïna d'uns 80kDa) (Barallobre *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2002; Utsunomiya-Tate *et al.*, 2000). Aquest problema sembla resoldre's en part amb el processament proteolític que pateix la Reelina *in vivo* (Jossin *et al.*, 2004). *in vitro* la producció de Reelina ofereix un patró de bandes per western-blot característic, amb bandes al voltant de 180, 250, 320 i 400 kDa, patró que es repeteix en les diferents produccions de Reelina recombinant que hem obtingut al llarg de tot aquest temps (Figura 33). Aquest patró no es manté constant en el temps i a mesura que la producció de Reelina envelleix la proporció de les bandes obtingues varia, augmentant aquelles de menys pes molecular. Havent observat això l'estandarització del procés d'obtenció de Reelina i el període d'utilització van esdevenir punts claus per homogenitzar la resposta dels experiments davant del tractament amb la Reelina. Per un altra banda és necessari discernir els possibles efectes que poden desencadenar els diferents productes de proteòlisi de la Reelina. S'ha descrit que el fragment mínim de la Reelina per desencadenar la senyal que fosforilarà la proteïna mDab1 en un cultiu primari de cervell anterior és el fragment central de la proteïna format pels dominis 3-6, a més aquest fragment rescata parcialment el fenotip reeler en models *ex-vivo* de desenvolupament cortical (Jossin *et al.*, 2004). Els autors d'aquest treball descriuen el rescat del fenotip com a similar al que succeeix en els animals reeler que sobre-expressen la Reelina completa sota el promotor de Nestina (Magdaleno *et al.*, 2002). En canvi, en els estudis de l'activitat dels fragments de Reelina, s'observa que aquells que contenen el fragment N-term indueixen una fosforilació d'mDab1 més marcada en comparació als que no el presenten, cosa que podria explicar els efectes bloquejants de l'anticòs CR-50. Aquests resultats podrien ser interpretats com a un paper multifuncional exercit per la Reelina. Els efectes de llarg abast podrien estar desenvolupats per aquells

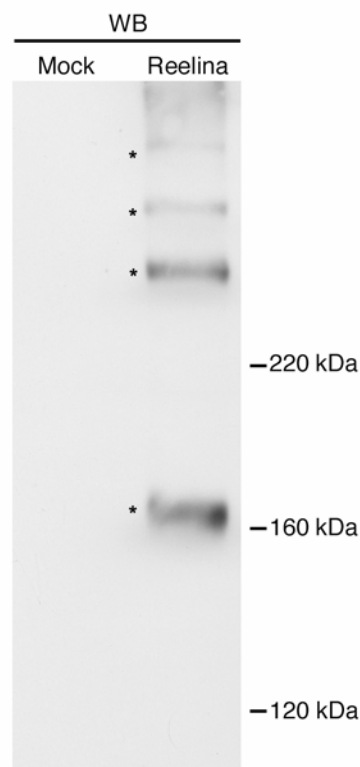


Figura 33 Anàlisi per western blot de la Reelina i els seus productes de proteòlisi. Al carril de l'esquerra s'analitza un sobrenedant control obtingut de cèl·lules transfectades amb un vector buit i a la dreta un sobrenedant amb Reelina recombinant. Com és d'esperar al carril control (Mock) no s'observa presència de la proteïna Reelina. En canvi al carril del sobrenedant que conte la Reelina (Reelina) s'observen les 4 bandes esperades per la Reelina, de dalt a baix 420, 320, 250 i 180 kDa. Les bandes del marcador de pes molecular estan senyalades a la dreta.

fragments de la Reelina més petits i hipotèticament més difusibles que podrien exercir un efecte estimulador de migració, mitjançant una fosforilació més làbil de la proteïna mDab1 que podria desencadenar una sèrie de cascades de senyalització específiques (Jossin *et al.*, 2004; Magdaleno *et al.*, 2002). Per una altra banda, podria existir un efecte a curt abast, o fins i tot dependent de contacte, on participés la proteïna completa (Derer *et al.*, 2001). En aquest punt no només tindriem la fosforilació induïda pel fragment central sinó un enriquiment de la senyal ja que comptariem amb tots els dominis repetits de Reelina i el seu fragment N-term. Aquest enriquiment de la senyal es podria traduir, com ja s'ha demostrat, amb un augment dels nivells de fosforilació d'mDab1 (Jossin *et al.*, 2004), que podrien desencadenar altres vies de senyalització o les mateixes amb un grau d'intensitat diferent que fessin viables l'activació d'altres processos específics en aquest nivell, com podrien ser una senyal d'stop de migració o senyal de deshadeció de la glia radial, o del substrat de migració corresponent, per part de la neurona (Dulabon *et al.*, 2000).

Per estudiar la importància dels fragments o de la Reelina completa, estudis on s'utilitzessin isoformes de la Reelina modificada per no ser degradada permetrien identificar el possible paper funcional dels fragments proteolitzats. A més a més caldria identificar els enzims proteolítics o la possible propietat auto-proteolítica de Reelina alhora d'entendre la importància global d'aquests fragments (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1999; Quattrocchi *et al.*, 2002).

Noves cascades de senyalització induïdes per la Reelina

La Reelina i la seva participació en la fosforilació de MAP1B

Com hem comentat en diverses ocasions quan parlàvem de proteïnes que participaven en la cascada de senyalització de Reelina, la mutació d'aquestes genera un animal amb fenotip *reeler* o *reeler-like*. Amb l'estudi fenotípic dels animals mutants podem deduir el nivell en el qual les proteïnes absents participen dins de la cascada de senyalització de Reelina, per exemple els animals mutants per la proteïna mDab1 i per les proteïnes ApoER2 o VLDLR presenten un fenotip indistingible del de l'animal *reeler*. En canvi existeixen altres proteïnes que malgrat relacionar-se amb la via de senyalització de la Reelina no són essencials i en aquest casos és lògic pensar que els animals mutants d'aquestes proteïnes presentin un fenotip similar però no idèntic al *reeler*. Un exemple és el cas de l'animal deficient per *cdk5* o per *p35/p39* que presenten fenotips que recorden el fenotip *reeler* encara que aquests no

siguin idèntics (Gilmore *et al.*, 1998; Kwon and Tsai, 1998; Ohshima *et al.*, 2001). A partir dels resultats presentats en el Capítol 1 de resultats d'aquesta Tesi, podem incloure la proteïna MAP1B dins d'aquest últim grup de proteïnes.

Com es mostra en el nostre treball l'animal *MAP1B* *-/-*, generat a partir de tècniques de *gene-trap* (Chowdhury *et al.*, 1997; Gonzalez-Billault *et al.*, 2000), presenta alteracions en el patró típic cortical "dins-fora" obtenint un presència difusa de neurones a l'escorça, a més presenten alteracions en la capa de cèl·lules piramidals i lleus alteracions en l'organització de la PCL; aquest resultats en conjunt recorden en gran mesura a aquells observats en els animals deficients en Reelina o en *mDab1* (Rice and Curran, 2001). A diferència del que s'observa en animals *reeler* aquí demostrarem que el procés de separació de la preplaca s'executa correctament, obtenint dues capes de cèl·lules que formen la zona marginal i la subplaca. Aquesta distribució *reeler-like* recorda a la seva vegada la dels animals mutants *cdk5* *-/-* o *p35* *-/-*, proteïnes que com hem comentat s'han relacionat amb la via de senyalització de la Reelina (Gilmore *et al.*, 1998; Kwon and Tsai, 1998).

A diferència de la relació Reelina-Cdk5/p35 on no s'observen canvis ni de fosforilació ni d'activitat per part de Cdk5 en resposta a la Reelina, nosaltres observem que el tractament de cultius telencefàlics amb Reelina indueix la fosforilació específica de MAP1B en mode I. La proteïna MAP1B té dos locus de fosforilació funcionalment independents, anomenats mode I i mode II. El primer es veu fosforilat per dues proteïnes quinasa la GSK3 β i la Cdk5 i el segon per la Caseïna quinasa II (Gonzalez-Billault *et al.*, 2004). La fosforilació en mode II es creu que participa en el correcte desenvolupament neurític i es dona lloc en tots els compartiments cel·lulars de la neurona, tant al compartiment somato-dendrític com a l'axó. En canvi la fosforilació en mode I es dona específicament en les parts més distal de l'axó i en el con de creixement. S'ha suggerit que la fosforilació en mode I està implicada en l'estabilització local dels microtúbuls durant el procés de gir, això significa que aquella part del con de creixement que presenta MAP1B activa, presenta un punt de suport per permetre el gir en la seva direcció (Mack *et al.*, 2000).

Els nostre resultats per assajos de western-blot confirmen la participació de MAP1B en la cascada de senyalització induïda per Reelina. Aquests experiments indiquen que la Reelina estimula la fosforilació en mode I de la proteïna MAP1B en un rang temporal similar al que succeeix en l'estimulació d'altres molècules guia com pot ser la Netrina-1 (Del Rio *et al.*, 2004). La confirmació de que la via de la Reelina

participava en aquesta fosforilació va provenir de l'anàlisi dels nivells de fosfo-MAP1B mode I en animals *reeler* i en animals deficients per *mDab1*. En tots dos casos es va veure una disminució substancial de la fosforilació de MAP1B encara que no completa, cosa que indica que la fosforilació d'aquesta proteïna no depèn exclusivament de la via activada per Reelina.

Com hem comentat al principi d'aquest punt, es coneixen dues quinases amb capacitat de fosforilar MAP1B en mode I, aquestes quinases són GSK3 β i Cdk5 (Gonzalez-Billault *et al.*, 2004). Els assajos amb inhibidors tant de Cdk5 (roscovitina) com de GSK3 β (LiCl) ens van permetre demostrar que en les nostres condicions d'assaig la quinasa principal era la GSK3 β per davant de la Cdk5. L'activació de GSK3 β està regulada per l'equilibri existent entre les fosforilacions en tirosines i en serines. Es creu que les fosforilacions en tirosines tenen una funció activadora de la proteïna i per contra les fosforilacions en serines tenen una funció inhibidora. Com demostrem en les nostres condicions experimentals, som capaços de detectar forts increments en els nivells de fosforilació en tirosines en resposta a l'acció de Reelina, que suposadament activarien la quinasa GSK3 β . També és veritat que la fosforilació en serines augmenta, encara que amb uns nivells menys destacats. Vam confirmar que el resultat final d'aquest conjunt de fosforilacions era l'activació de la GSK3 β mitjançant un assaig d'activitat en resposta a la Reelina. Aquesta afirmació ens contradiu amb d'altres autors que demostren que la Reelina indueix la inactivació de GSK3 β per fosforilació en serines mitjançant l'activació prèvia de la proteïna Akt1 (Beffert *et al.*, 2002; Ohkubo *et al.*, 2003). La principal raó que ens permet afirmar que els nostres resultats són creïbles es basa en l'assaig d'activitat de GSK3 β que demostra que malgrat l'existència de l'augment de fosforilació en serines, el nivell d'activitat de GSK3 β augmenta gràcies a l'acció de la Reelina i es manté relativament constant fins a les 6 hores de tractament. L'explicació d'aquesta diferència de resultats es podria basar en l'edat dels cultius utilitzats, en el nostre cas són cultius acabats d'obtenir o utilitzats dos dies després de la seva obtenció. En canvi, els altres dos estudis que afirmen l'opció contrària han realitzat els seus experiments en cultius més envellits, on les neurones es troben més madures, o en extractes d'animals de tres setmanes d'edat en comparació als nostres extractes proteics d'animals perinatals. Aquesta dualitat d'efecte dependent de l'edat del cultiu ja ha estat observat en altres molècules senyalitzadores com pot ser la Netrina-1 on

les cèl·lules poden respondre de formes absolutament oposades depenent de l'estat de maduració de les mateixes (Cohen-Cory, 2002; Shewan *et al.*, 2002).

L'altre proteïna que s'ha suggerit que pot fosforilar GSK3 β és la quinasa Cdk5. Com ja hem comentat la quinasa Cdk5 necessita de co-activadors per exercir la seva activitat, aquest co-activadors poden ser p35 o p39 (Hisanaga and Saito, 2003). Se sap per estudis de mutagènesi que només la mutació dels dos co-activadors és suficient per obtenir el mateix fenotip que l'animal *cdk5* *-/-*, en canvi la mutació d'un de sol no presenta alteracions tant greus suggerint un possible efecte compensatori entre els dos (Hisanaga and Saito, 2003). Dit això, comentar que en els nostres experiments malgrat vàrem observar que l'activitat quinasa de Cdk5 podia participar en la fosforilació de MAP1B, en canvi no ho feia d'una forma prioritària. Nosaltres proposem que la participació de Cdk5 en el control de la fosforilació de MAP1B en mode I sigui d'una forma indirecte, fosforilant residus en posició -4 respecte aquells que són fosforilats per la GSK3 β . S'ha demostrat la necessitat de la fosforilació prèvia d'aquests residus en posició -4 per què en el pas següent la GSK3 β fosforili MAP1B (Cohen and Frame, 2001). Aquest mecanisme explicaria el sinergisme funcional que observem entre les dues quinases en els experiments d'inhibició de la fosforilació de MAP1B en cultius tractats amb clorur de liti o roscovitina per separat i els dos inhibidors junts.

De totes maneres la participació de la quinasa Cdk5 en la fosforilació de MAP1B és un tema controvertit, només cal comentar els dos articles sorgits recentment on en un s'afirma la participació única de Cdk5 en la fosforilació mode I de MAP1B i en l'altre es descarta donant aquest paper a la proteïna quinasa JNK (Hahn *et al.*, 2005; Kawauchi *et al.*, 2005).

Per la seva banda també es controvertida l'activació de la proteïna Cdk5 per la via de la Reelina, ja que no s'ha observat fins al moment que l'estimulació de la via de la Reelina alteri ni els nivells de fosforilació de la proteïna Cdk5 o p35, ni els nivells de fosforilació de les proteïnes substrat de Cdk5/p35 (Beffert *et al.*, 2004), encara que els mateixos autors creuen que pot existir algun tipus d'interacció entre elles. Malgrat tot els resultats obtinguts al llarg d'aquesta tesi ens permeten hipotetitzar una possible relació entre la via de la Reelina i l'activitat de Cdk5/p35. Com hem demostrat en el Capítol 2 dels resultats l'estimulació de neurones amb Reelina desencadenava l'activació de la cascada d'ERK amb l'augment d'expressió

final de la proteïna Egr-1. Com també hem comentat la proteïna Egr-1 és un factor de transcripció amb capacitat d'induir l'expressió d'altres gens. Un d'aquest gens és el que codifica per el co-activador p35, al promotor del qual es pot unir Egr-1 i induir la seva expressió (Lee and Kim, 2004). Amb aquesta hipòtesi podríem donar una explicació plausible que relaciona la Reelina i la quinasa Cdk5. A més podria explicar el manteniment de la fosforilació de MAP1B en resposta a Reelina durant un període relativament llarg de temps. Les fosforilacions induïdes per Reelina acostumen a ser de caire curt i els nivells basals de fosforilació s'acostumen a recuperar al voltant de les 2 hores post-estimulació (Resultats Capítol 2). Aquí en canvi observem que la fosforilació mode I es conserva i fins i tot augmenta a temps relativament llargs com 6 hores d'estimulació. Nosaltres suggerim que en un primer moment existeix una fosforilació basal de MAP1B en el residu -4 que permet que la quinasa GSK3 β fosforili MAP1B en mode. Aquesta fosforilació basal en posicions -4 explicaria els nivells relativament baixos de fosforilació obtinguts en els primers moments de l'estimulació de Reelina (10'-30'). Després a mesura que la senyalització paral·lela de la via d'ERK induís l'expressió d'Egr-1 amb la consegüent expressió de p35, es podria activar el complex Cdk5/p35 fosforilant els residus en posició -4 de forma més massiva i permeten aleshores l'augment tant important de fosforilació de MAP1B en mode I dependent de la Reelina.

MAPK/ERK, la nova via de senyalització de la Reelina

En el moment de començar aquesta Tesi doctoral el coneixement de les funcions desencadenades i les cascades de senyalització activades per la Reelina era bastant inicial. En aquell punt se sabia que Reelina era una proteïna de matriu extracel·lular responsable del fenotip *reeler* (D'Arcangelo *et al.*, 1995). També se sabia que els receptors que transduïen la seva senyal eren el receptors d'ApoER2 i VLDLR, que aquesta transducció desencadenava la fosforilació d'una proteïna adaptadora anomenada mDab1 i que l'absència d'aquesta proteïna era responsable del fenotip *scrambler*, indistingible del fenotip *reeler* (Arnaud, Ballif, Forster *et al.*, 2003; Bock and Herz, 2003; Howell *et al.*, 1997; Howell, Herrick *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 1997; Trommsdorff *et al.*, 1999). Una mica més tard es va començar a caracteritzar la via amb l'aparició de múltiples proteïnes que interaccionaven amb aquesta cascada de senyalització entre les quals cal destacar les quinases SFK,

sobretot dos dels seus membres, Fyn i Src, (Arnaud, Ballif, Forster *et al.*, 2003; Bock and Herz, 2003) i la proteïna Akt1 (Beffert *et al.*, 2002).

Amb aquest base vam decidir buscar noves vies de senyalització desencadenades per l'estimulació de la Reelina en cultius neuronals. La via de les MAPK/ERK és una via de senyalització clàssica que participa en la transducció de senyal de multitud de processos al SNC, com per exemple en la resposta a neurotrofines com BDNF o NGF (Huang and Reichardt, 2003), o en la resposta a molècules guia com són la Netrina-1, semaforines, o efrines (Atwal *et al.*, 2003; Elowe *et al.*, 2001; Forcet *et al.*, 2002). L'exemple més clar d'activació d'aquesta via es pot trobar en resposta al factor neurotròfic BDNF. Quan BDNF interacciona amb el seu receptor d'alta afinitat TrkB, aquest es fosforila permetent la unió del complex Shc-Grb2-Sos i activant la GTPasa Ras. La forma activa de Ras, Ras-GTP, a la seva vegada recluta la proteïna Raf a la membrana activant-la i aquesta finalment activa la quinasa MEK (MAPKK, MKK) mitjançant la fosforilació en serines localitzades a la nansa d'activació. Els substrats de la proteïna MEK són les quinases regulades extracel·lularment 1 i 2 (o Erk1/2, de l'anglès *extracellular regulated kinases 1 and 2*), que pateixen un procés de fosforilació en serines i treonines activant en conseqüència la seva activitat quinasa (Huang and Reichardt, 2003).

El model que vam decidir utilitzar és similar al que vam utilitzar en els experiments de MAP1B, i es basa en la utilització de cultius primaris telencefàlics de ratolins wt embrionaris. Aquests cultius es deixen reposar *in vitro* 3 o 4 dies i, prèviament deprivats durant unes hores, són tractats amb sobrenedants que contenen la proteïna Reelina recombinant, o el sobrenedant control. Amb aquest model vam comprovar que podíem repetir els resultats més destacats en relació a la senyalització de la Reelina que havien sortit a la literatura com són la fosforilació d'mDab1 i la d'Akt1 en resposta a l'estímul de la Reelina (Beffert *et al.*, 2002; Howell, Herrick *et al.*, 1999). El següent pas va ser testar l'activació de diferents membres de les MAPK, com són Erk1/2, p38 o JNKs. En aquests experiments vam observar que específicament Erk1/2 eren fosforilades en resposta a la Reelina, per contra no vam trobar cap canvi en els nivells de fosforilació ni de la p38 ni de les JNKs.

Un cop confirmada la inducció per part de la Reelina de la fosforilació, i l'activació, de les quinases Erk1/2 vàrem voler caracteritzar tota la cascada de senyalització. En aquest punt vam intentar dues aproximacions, la primera de les quals va ser veure si mDab1 interaccionava amb alguna de les proteïnes clàssiques

conegudes que transmeten la senyal per activar Ras. El candidat més favorable era la proteïna Shc (de l'anglès, *Src-homology/collagen protein*). Experiments de co-immunoprecipitació entre mDab1 i Shc en cultius primaris telencefàlics tractats amb Reelina no ens van permetre confirmar una interacció directe entre les dues proteïnes, ni de forma estable ni induïda pel tractament amb Reelina. La segona aproximació va ser examinar els nivells de Ras actiu (Ras·GTP) després dels tractament amb Reelina, però sorprenentment, i en contra del que ens esperàvem, aquesta proteïna no es veia activada significativament en cap dels temps en que l'efecte de Reelina va ser estudiat, 5 i 15 minuts. S'han descrit altres processos on l'activació d'Erk1/2 es produeix de forma independent de Ras. En alguns casos dependent de la proteïna PI3K, un procés que pot ser mitjançat per la proteïna quinasa C (o PKC, de l'anglès *protein kinase C*) (Takeda *et al.*, 1999; Wandzioch *et al.*, 2004; Yart *et al.*, 2002). Un altre cas d'activació d'Erk1/2 independent de Ras pot ser la via de Rap1. S'ha descrit àmpliament en neurones la participació de Rap1·GTP en una activació sostinguda de la via d'ERK (Stork, 2005; York *et al.*, 1998).

Davant d'aquest escenari on havíem de localitzar el mecanisme d'activació de la via d'ERK independent de Ras vam descartar ràpidament el possible paper de Rap1. Aquesta decisió va ser presa basant-nos en els perfils temporals de fosforilació d'Erk1/2 en resposta a Reelina. Com es pot observar en la figura 1 dels Capítol 2 dels resultats, la fosforilació d'Erk1/2 induïda per Reelina comença a ser detectada a temps curts, 5 minuts, obtenint el màxim de fosforilació al voltant de 15 minuts de tractament i reduint el senyal a nivells basals de forma ràpida a partir dels 30 minuts. Aquest patró de fosforilació és incompatible amb el descrit en els casos d'activació d'Erk1/2 dependent de Rap1, on s'ha observat estimulacions més sostingudes que arriben a 1 hora o més (Sasagawa *et al.*, 2005; Stork, 2005; York *et al.*, 1998). Això no descarta la participació de Rap1 en altres processos induïts per la Reelina com es desprèn dels estudis realitzats per Ballif i col·laboradors (Ballif *et al.*, 2004). En aquest estudi es descriu l'activació de Rap1 en un procés que depèn de la fosforilació d'mDab1 i de la unió de les proteïnes adaptadores Crk/CrkL i C3G. Rap1 en aquest context podria participar en processos diferents als d'inducció d'Erk1/2, mitjançant el múltiples efectors que se li coneixen com són: Raf, PI3K, Ral, PLC, Afadin o Arap3. A més la proteïna Rap1 s'ha associat sovint en la regulació de les propietats d'adhesió cel·lulars i en la regulació dinàmica dels filaments d'actina (Bos, 2005;

Caron, 2003); i també pot regular el creixement neurític regulat per cAMP (York *et al.*, 1998).

Descartada la possibilitat de Rap1 com a possible activador d'Erk1/2 en la via de Reelina, vam abordar la possibilitat que fos PI3K l'encarregada d'aquest paper. Això es va provar pre-tractant cultius primaris neuronals amb l'inhibidor de PI3K, LY 294002, i estimulants-los amb Reelina. Aquest experiment ens va permetre afirmar que la inhibició de PI3K amb l'LY294002, bloquejava específicament la fosforilació d'Erk1/2 desencadenada per Reelina, mentre que no ho feia en d'altres paradigmes com pot ser l'activació d'Erk1/2 en resposta a BDNF.

Finalment amb la utilització d'inhibidors específics de les SFKs, de la PI3K i de la MEK (PP2, LY 294002 i PD 98059, respectivament), podem afirmar que la fosforilació d'Erk1/2 induïda per la Reelina, es desencadena en un procés lineal que depèn primer de la fosforilació d'mDab1, segon de l'activació de la subunitat catalítica de PI3K i tercer de l'activació de la quinasa MEK; quinasa que fosforilarà a les proteïnes Erk1 i Erk2.

Reelina: p38 i JNKs

Els nostres experiments, sintetitzats al Capítol 2 dels resultats, van permetre demostrar que la Reelina induïa la fosforilació específicament de les proteïnes Erk1/2, i que en canvi no ho feia en d'altres membres de les MAPK com són p38 o JNK1/2/3 (Johnson and Lapadat, 2002; Zarubin and Han, 2005), descartant una acció inespecífica de la Reelina sobre totes les MAPKs. Per altra banda destacar que tant p38 com JNKs s'han relacionat amb processos d'apoptosi (Wada and Penninger, 2004; Xia *et al.*, 1995; Zarubin and Han, 2005). No obstant cal remarcar que no sempre hi ha una relació directa entre activació de les p38 i JNKs i la inducció d'apoptosi ja que el paper que juguen aquestes proteïnes en els processos de mort programada és molt divers i depèn del tipus cel·lular (Wada and Penninger, 2004).

En el cas de la Reelina, aquesta no ha estat vinculada en la regulació de la supervivència neuronal. De fet no s'han descrit alteracions en el processos de supervivència o d'apoptosi en els animals *reeler* o en els animals *mdab1* *-/-*. Cal destacar en aquest punt que la Reelina si que afecta al número de cèl·lules granulars existents al cerebel, encara que ho fagi d'una manera indirecta i segurament independent tant de p38 com de les JNKs. En aquest cas l'absència de Reelina o d'mDab1 afecta al correcte posicionament de les cèl·lules de Purkinje al cerebel i

aquestes no es col·loquen correctament formant una monocapa per sota de l'EGL (Miyata *et al.*, 1996). A causa d'aquest posicionament erroni les cèl·lules de Purkinje no poden induir, mitjançant la proteïna Sonic Hedgehog (o Shh), la proliferació massiva de les cèl·lules granulars a l'EGL, observant una disminució importantíssima del número d'aquestes cèl·lules en els animals adults de fenotip *reeler* (Lewis *et al.*, 2004; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Recentment, s'ha descrit una nova funció de la Reelina en el control de la neurogènesis adulta tant en SVZ com en SGZ (Won *et al.*, 2006), i en aquest cas la participació de p38 o de les JNKs hauria de ser estudiada.

Efectes moleculars de la cascada d'ERK activada per Reelina

Com hem comentat fins ara la Reelina estimula de forma específica la fosforilació, i l'activació, de les proteïnes MAPK Erk1/2. En el nostre estudi ens va interessar seguir aprofundint en els possibles efectes que exercia la Reelina mitjançant l'activació d'Erk1/2. S'ha descrit a la literatura molts i diversos substrats susceptible de ser fosforilats i/o activats per Erk1/2, entre els quals destaquen factors de transcripció, co-activadors o altres proteïnes quinasa (Huang *et al.*, 2004; Huang and Reichardt, 2003). Un dels més destacats és el factor de transcripció Elk-1, que forma part dels anomenats complex de factors ternaris (o TCFs, de l'anglès *ternary complex factor*) juntament amb les proteïnes SAP1a i SRF. Elk-1 és fosforilat ràpidament quan la cascada de senyalització MAPK/ERK s'activa (Shaw and Saxton, 2003). La fosforilació d'Elk-1 permet l'activació del TCFs que un cop actiu s'unirà a les seqüències d'ADN anomenades elements de resposta a sèrum (o SRE, de l'anglès *serum response element*) regulant l'expressió de diferents gens com poden ser els gens immediatament primerencs *egr-1* o *c-fos* (Shaw and Saxton, 2003). Una altra possibilitat on ERK participa en la regulació de la transcripció gènica podria ser aquella on Erk1/2 controla la fosforilació/activació del factor de transcripció CREB (de l'anglès, *cAMP response element binding protein*), mitjançant la participació de la família de quinases Rsk (de l'anglès, ribosomal S6 kinases) i de la proteïna quinasa activada per MAPK 2 (o MAPKAP-2, de l'anglès MAPK-activated kinase 2) (Shaw and Saxton, 2003). S'ha demostrat que CREB pot regular l'expressió de gens els productes dels quals són essencials per la diferenciació i la supervivència de les neurones (Lonze *et al.*, 2002; Riccio *et al.*, 1999). Davant d'aquestes possibilitats vam decidir estudiar si Reelina, a causa del seu efecte sobre

Erk1/2, podia també regular l'expressió gènica a partir d'alguna d'aquestes tres possibilitats. Com es demostra en el Capítol 2 dels resultats, la Reelina estimula positivament l'expressió del gen primerenc *egr-1* tant a nivell d'ARN missatger com a nivell proteic. A nivell transcripcional observem la màxima expressió al voltant dels 30-60 minuts i a nivell de proteïna al voltant de 60-90 minuts, aquests temps d'inducció són comparables als que s'observen en d'altres models (Harada *et al.*, 2001; Hodge *et al.*, 1998; Knapska and Kaczmarek, 2004). En canvi, no hem detectat increments de l'expressió de *c-fos* a nivell proteic ni vàrem poder detectar amb precisió canvis en la fosforilació de la proteïna CREB, pas previ per la seva activació, en cultius primaris telencefàlics tractats amb Reelina a diferents temps. Per tant podem concloure que Reelina estimula de forma específica l'expressió d'*egr-1* a nivell neuronal.

El possible paper d'Egr-1 en la modulació de la cascada de senyalització desencadenada per Reelina

Egr-1, també conegut com Zif268 o NGFI-A o Krox-24 o TIS8 o ZENK, és un factor de transcripció que s'ha relacionat amb diversos processos com el control de la plasticitat sinàptica i la memòria, creixement neurític, processos cardiopatològics, capacitat reproductiva femenina, el control del creixement o l'apoptosi (Harada *et al.*, 2001; Khachigian, 2006; Knapska and Kaczmarek, 2004; Lee *et al.*, 1996; Thiel and Cibelli, 2002). Entre d'altres gens, la via ERK/Egr-1 controla l'expressió del co-activador de Cdk5, la proteïna p35. Com ja hem comentat p35 participa en l'activació la quinasa Cdk5 que se sap que participa en el control de la migració neuronal en el desenvolupament i se suggereix que està implicada en la fosforilació d'mDab1 en serines (Kwon and Tsai, 1998; Ohshima *et al.*, 2001). Un paper molt recent descriu que l'activitat serina/treonina quinasa de Cdk5/p35 regula a la baixa els nivells de fosforilació en tirosines d'mDab1 (Ohshima *et al.*, 2006). Aquesta regulació s'hipotetitza que es deguda a possibles canvis conformacionals en l'mDab1 o impediments estèrics generats per part de les fosforilacions dependents de Cdk5/p35, que privarien en part l'activitat de Fyn (Ohshima *et al.*, 2006). Aquest model de regulació d'mDab1 conjuntament amb els nostres resultats bioquímics ens permeten suggerir l'existència d'un possible circuit d'auto-regulació negativa. Aquesta circuit implicaria que quan es desencadena la senyal de Reelina induint la fosforilació d'mDab1 i tota la cascada que ja hem comentat, un possible efecte

d'aquesta seria regular l'expressió de p35, via Egr-1 (Harada *et al.*, 2001; Lee and Kim, 2004). Amb l'augment dels nivells de p35 l'activitat quinasa de Cdk5 incrementaria fosforilant, en conseqüència, la part C-term d'mDab1 fet que atenuaria les següents senyals de fosforilació en tirosines sobre mDab1 (Ohshima *et al.*, 2006). Aquest sistema permetria mantenir una finestra de resposta d'mDab a diferents senyals extracel·lulars durant un període concret fins que els nivells de p35 puguin activar Cdk5 i modular la fosforilacions en tirosina d'mDab1.

Amb la mateixa idea una altra possible nansa de regulació negativa podria ser la generada per la proteïna homòloga a fosfatasa i tensina eliminada del cromosoma 10 (o PTEN, de l'anglès *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*). PTEN és una fosfatasa que participa en l'hidròlisi del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (o PI-[3,4,5]P₃) a PI-[4,5]P₂. La reacció inversa per contra és catalitzada per la PI3K, generant el PI-[3,4,5]P₃ que és l'encarregat d'activar la proteïna Akt1. En models apoptòtics induïts per exposició de cèl·lules a llum ultraviolada, s'ha demostrat que s'indueix l'expressió de Egr-1, via JNKs, i que Egr-1 pot unir-se al promotor de *PTEN* activant-lo. Aquest augment d'expressió de PTEN defosforilarà PI-[3,4,5]P₃ i inhibirà la quinasa Akt1, encarregada de la supervivència cel·lular com a efectora de la PI3K (Thiel and Cibelli, 2002; Virolle *et al.*, 2001). En relació al cas que ens ocupa, es pot hipotetitzar que Reelina activant de forma lineal tota la cascada descrita al Capítol 2 dels resultats induint l'expressió d'Egr-1 i a la seva vegada la de PTEN activant un mecanisme de inhibició retroactiva que permetria modular la senyalització de la via de la Reelina per sota d'Akt1.

Amb Egr-1 com a efector final de la cascada de MAPK/ERK ens permet hipotetitzar diversos processos de control que permetrien no saturar la via, i juntament amb el procés de proteòlisis per ubiquitinització de la proteïna mDab1 (Arnaud, Ballif and Cooper, 2003), tindriem una cascada de senyalització plenament regulada amb fins a tres punts de control possibles.

Possibles efectes de la Reelina mitjançant Egr-1

Paper de Reelina en processos de memòria i LTP:

El terme potenciació a llarg termini (o LTP, de l'anglès *long-term potentiation*) es refereix al fenomen de l'increment de l'eficàcia sinàptica dependent d'activitat i està ben caracteritzat que participa en els processos de memòria i d'aprenentatge (Knapska and Kaczmarek, 2004). Existeixen diversos tipus de LTP,

que es classifiquen depenent de la durada dels seus efectes: l'E-LTP, amb efectes que s'esvaeixen en un curt període de temps d'aproximadament 2 hores, i l'L-LTP, els efectes del qual poden durar des de dies fins a mesos. La inducció dels dos tipus de l'LTP comporta l'activació de vies de senyalització que inclouen les SFKs, la PKC, la PKA, i en particular de la α CaMKII (Soderling and Derkach, 2000). En canvi només la inducció de l'L-LTP desencadena transcripció gènica i síntesi de proteïnes (Krug *et al.*, 1984; Otani and Abraham, 1989). La via de senyalització d'ERK també es veu activada en processos d'LTP i és essencial per a determinats tipus d'aprenentatge (Atkins *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 1999; English and Sweatt, 1996, 1997).

L'activació de la via d'ERK i la subsegüent inducció de l'expressió de l'*egr-1* són claus per al procés d'LTP també en models in vivo (Davis *et al.*, 2000). A més de la correlació entre la inducció de l'LTP i la transcripció de l'*egr-1*, s'ha pogut corroborar que l'Egr-1 és bàsic per als processos de plasticitat i memòria a llarg terme (Jones *et al.*, 2001). Els animals deficients en *egr-1* mantenen intacta la memòria curta però en canvi mostren deficiències importants de memòria a llarg terme (Bozon *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2001). D'altra banda, els animals knock-out per *erk1*, una de les dues MAPKs de la via d'ERK no disminueix la plasticitat sinàptica sinó que la incrementen (Mazzucchelli *et al.*, 2002). S'evidencia un efecte diferenciat de les quinases Erk1 i Erk2 en determinades funcions i processos de senyalització en determinades regions del cervell. La deficiència d'Erk1 fa incrementar els nivells de la proteïna Erk2, i aquesta facilita la plasticitat (Mazzucchelli *et al.*, 2002). La Reelina és un dels estímuls amb capacitat d'induir l'LTP en hipocamp (Weeber *et al.*, 2002), i alhora, segons els resultats d'aquesta Tesi, la Reelina indueix l'activació de la via d'ERK/Egr-1 en cultius primaris neuronals (Capítol 2 dels resultats). Així doncs, tot i que no podem afirmar que la Reelina indueixi l'LTP mitjançant l'expressió de l'Egr-1, les dades apunten fortament cap a aquesta possibilitat encara no confirmada.

Dos articles de recent aparició han aportat noves dades que impliquen la senyalització de la Reelina en la inducció de l'LTP i en processos d'aprenentatge (Beffert *et al.*, 2006; Beffert *et al.*, 2005). En aquest articles es descriu la participació específica d'un exó, concretament l'exó 19, del receptor ApoER2 en els processos de memòria i aprenentatge. En aquests articles es suggereix que la unió de les proteïnes JIP1/2 o PSD-95 (de l'anglès, *JNK interaction protein* i *post-synaptic density protein*

95, respectivament) a la seqüència proteica codificada per l'exó 19 permetria la interacció i l'activació del receptor d'NMDA, i que aquesta interacció explicaria els efectes de la Reelina en LTP i aprenentatge (Beffert *et al.*, 2005). Amb aquest resultat podríem inferir que la participació d'Egr-1 induïda per Reelina en els processos d'LTP és petita o nul·la, ja que amb la unió directe entre ApoER2 i NMDA no seria necessària la participació de la via de les ERK activada per Reelina. Per contra, els mateixos autors han descrit que la participació d'mDab1, i la seva cascada de senyalització, és necessària, juntament amb la presència de l'exó 19, per obtenir una resposta global i completa a l'estímul de Reelina (Beffert *et al.*, 2006).

Paper de la Reelina en la Malaltia d'Alzheimer:

Recentment ha aparegut a la literatura diversos articles que relacionen la proteïna Reelina amb la Malaltia d'Alzheimer (o AD, de l'anglès *Alzheimer Disease*) (Baloyannis, 2005; Saez-Valero *et al.*, 2003; Wirths *et al.*, 2001).

L'AD és un desordre neurodegeneratiu que afecta principalment aquelles àrees del cervell involucrades en l'aprenentatge i en els processos de memòria, incloent els lòbuls temporals i frontals, com a resultat de la degeneració dels contactes sinàptics i la mort neuronal (Mattson, 2004). La característica principal en tots els malalts d'AD la trobem en la presència de plaques senils i cabdells neurofibril·lars. Les plaques senils són dipòsits d'agregats, fibrilars o amorfs, extracel·lulars del pèptid β -amiloide, per la seva banda els cabdells neurofibrilars són agregats fibrilars intracel·lulars formats principalment per la proteïna Tau hiperfosforilada (Mattson, 2004).

Entre els possibles mecanismes del desencadenament de la malaltia s'han descrit tres gens que se sap que causen l'AD de forma hereditària o familiar. Aquest tres gens són: el gen que codifica per la proteïna precursora del β -amiloide (o APP, de l'anglès *amyloid precursor*

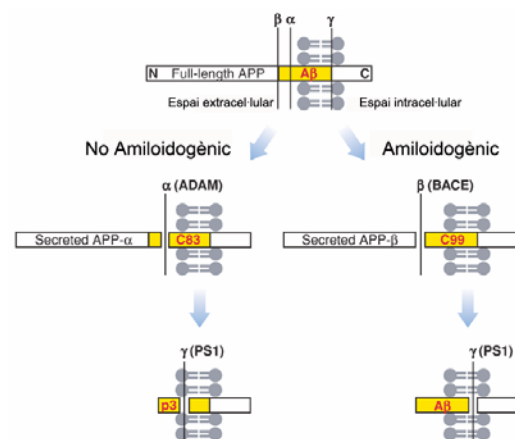


Figura 34 Esquema de les dues possibles vies de proteolització sobre la proteïna APP. L'APP pateix dos processos de proteolització seqüencials: No Amiloidogènica i Amiloidogènica. El No Amiloidogènica implica el tall d'APP per la posició α , per l'enzim α -secretasa o ADAM, i el posterior tall per la γ -secretasa obtenint uns pèptids no implicats en citotoxicitat. La via Amiloidogènica, en canvi, necessita del tall en posició β , per la β -secretasa o BACE, i el posterior tall en la posició γ , per obtenir el pèptid β -amiloide que participa en el progrés de la malaltia d'Alzheimer. Adaptat de Stokin i Goldstein, 2006.

protein) i els gens que codifiquen per les proteïnes Presenilina 1 i 2 (o PS1 i PS2) (Haass, 2004; Selkoe and Kopan, 2003; Sherrington *et al.*, 1995). Actualment se sap que APP es una proteïna transmembrana que pateix diversos processos de proteòlisi (Figura 34), depenent dels quals pot adquirir el seu fenotip patològic. L'APP pot ser proteolitzada per tres llocs diferents anomenats α , β , γ . La proteòlisi en α evita la formació del pèptid β -amiloide i pot donar, per la posterior proteòlisi en la posició γ , els pèptids p3 i C83 que s'hipotetitza poden tenir funcions senyalitzadores. En canvi si el primer tall es produeix per la β -secretasa (o BACE) en posició β , quan posteriorment l'APP es proteolitzada per la γ -secretasa (en posició γ) s'allibera el pèptid β -amiloide (Brunkan and Goate, 2005; Kojro and Fahrenholz, 2005). La γ -secretasa per la seva banda és un enzim multiproteic on destaca la PS1 com a enzim principal, encara que la PS2 pot substituir-la parcialment (Brunkan and Goate, 2005). Amb el temps s'ha postulat la "hipòtesi de la cascada amiloide", que suggereix que l'AD es desencadena com a resultat de l'acumulació del pèptid β -amiloide per un augment de producció, a causa de mutacions hereditàries de PS1/PS2/APP o a causa de factors epigenètics, juntament amb una insuficient eliminació del pèptid (Hardy, 1997).

Com hem descrit en el Capítol 2 dels resultats l'estimulació de cultius primaris telencefàlics amb la Reelina desencadena l'activació de la proteïna MEK i aquesta comporta l'augment d'expressió d'Egr-1, molt possiblement via Elk-1 (Huang and Reichardt, 2003). Significativament, l'expressió dels gens *PS1* i *PS2* poden ser controlats per la senyalització MAPK/ERK via diferents dels seus efectors com són els factors de transcripció Elk-1 i CREB, en el cas de PS1, i del factor Egr-1, en el cas de PS2 (Mitsuda *et al.*, 2001; Renbaum *et al.*, 2003). Aquest fet permetria relacionar molecularment la senyalització desencadenada per Reelina i com a mínim un dels membres del complex γ -secretasa que participen en la proteòlisi de l'APP. S'ha observat en diferents estudis l'augment significatiu dels nivells de Reelina en pacients d'Alzheimer en comparació amb individus normals (Botella-López *et al.*, 2006; Saez-Valero *et al.*, 2003). Per una altra banda també s'ha demostrat que nivells augmentats de l'activitat presenilina, tant de PS1 com de PS2, en models animals transgènics de sobreexpressió poden induir un augment en el processament de l'APP cap al pèptid β -amiloide (Brunkan and Goate, 2005). Molt probablement el control que pugui exercir Reelina sobre l'expressió de les

presenilines, i de la seva activitat proteolítica, no sigui un factor clau en el procés que conduirà a l'AD, però en base a la "hipòtesi de la cascada amiloide" alteracions dels nivells basals de Reelina que repercutirien en un augment de l'expressió de les presenilines al cervell podrien afavorir l'aparició de dipòsits amiloides. A més a més en aquest punt cal destacar que la proteïna mDab1 pot interaccionar amb l'APP i la família de proteïnes similars a l'APP, anomenada APLP (Homayouni *et al.*, 1999; Howell, Lanier *et al.*, 1999; Pramatarova *et al.*, 2006; Trommsdorff *et al.*, 1998). Encara que el paper, si en té, d'mDab1 en AD és desconegut, estudis recents suggereixen que la interacció entre l'APLP i mDab1 servirien per modular la fosforilació en tirosines d'mDab1 produïdes per les SFKs (Pramatarova *et al.*, 2006).

Un altre punt que ens permet seguir especulant amb la possibilitat de que les presenilines es puguin relacionar d'alguna manera amb la via de la Reelina es troba en l'estudi de l'animal deficient en PS1 (Hartmann *et al.*, 1999; Wines-Samuelson *et al.*, 2005). Aquest animal presenta alteracions en el patró de migració que porta al desenvolupament d'un cervell similar a l'humà amb lissencefàlia tipus 2, amb el posicionament invertit de les neurones sobretot d'aquelles que van dirigides a les capes II/III que són les últimes en migrar. Aquest fet s'explica per la degradació de les cèl·lules presents a la zona marginal, com són les cèl·lules de CR. Val a dir que es creu que aquesta mort es produeix per les alteracions en les cèl·lules leptominengials que secreten factors tròfics que estimulen la supervivència de les cèl·lules de CR, i les alteracions en el patró de migració podrien ser causades o per l'absència de Reelina o per la desestructuració i la pèrdua de la glia radial en aquest animals produïda per l'alteració de les cèl·lules localitzades a la meninge (Hartmann *et al.*, 1999; Wines-Samuelson *et al.*, 2005). I malgrat que en aquest cas la interacció entre la Reelina i la Presenilina1 és probablement indirecta, el seu estudi podria aportar gran informació en l'estudi dels processos de migració tardans a l'escorça i la participació de la Reelina en aquests.

En un futur proper, l'estudi de la possible relació entre la Reelina i les presenilines podria ajudar a comprendre millor, tant el correcte desenvolupament del SNC com el paper d'aquestes proteïnes en els processos de senescència i senescència patològica com són l'AD, la demència frontotemporal o fins i tot la malaltia de Parkinson.

La participació de la via de les MAPK/ERK en els efectes de la Reelina sobre la migració cel·lular

La Reelina i el seu efecte sobre la migració de les cèl·lules de la SVZ

Com hem comentat àmpliament un dels efectes de Reelina sobre els cultius primaris telencefàlics és l'activació de la via de les MAPK/ERK i el consegüent augment d'expressió d'un factor d'expressió com és Egr-1. Malgrat que aquesta afirmació ja es de per si interessant, no deixa de ser però una via de senyalització més oberta per un factor soluble de l'ECM. Per realment poder creure que aquesta via és una via interessant a nivell del funcionament global del SNC (tant en el desenvolupament com en l'adult) s'havia de buscar un model funcional *in vitro* o *in vivo* on la Reelina tingués un efecte clar i es pogués per tant testar la funcionalitat de la nostra via en ell. En el moment en que aquest experiments es van començar a desenvolupar pocs models *in vitro* permetien el tipus d'aproximació que nosaltres desitjàvem, excepte un de recent aparició a l'època que relacionava la Reelina amb una funció de deshadésio de les cèl·lules de la SVZ (Hack et al 2002). La funció de Reelina en processos de deshadésio ja havia estat postulada anteriorment tant en escorça com en cerebel, i fins i tot s'havien publicat experiments *in vitro* on s'hipotetitzava que la deshadésio induïda per Reelina podia ser mitjançada per la Integrina $\alpha 3$ (Dulabon et al 2000, Ogawa et al 1995, Miyata et al 1997).

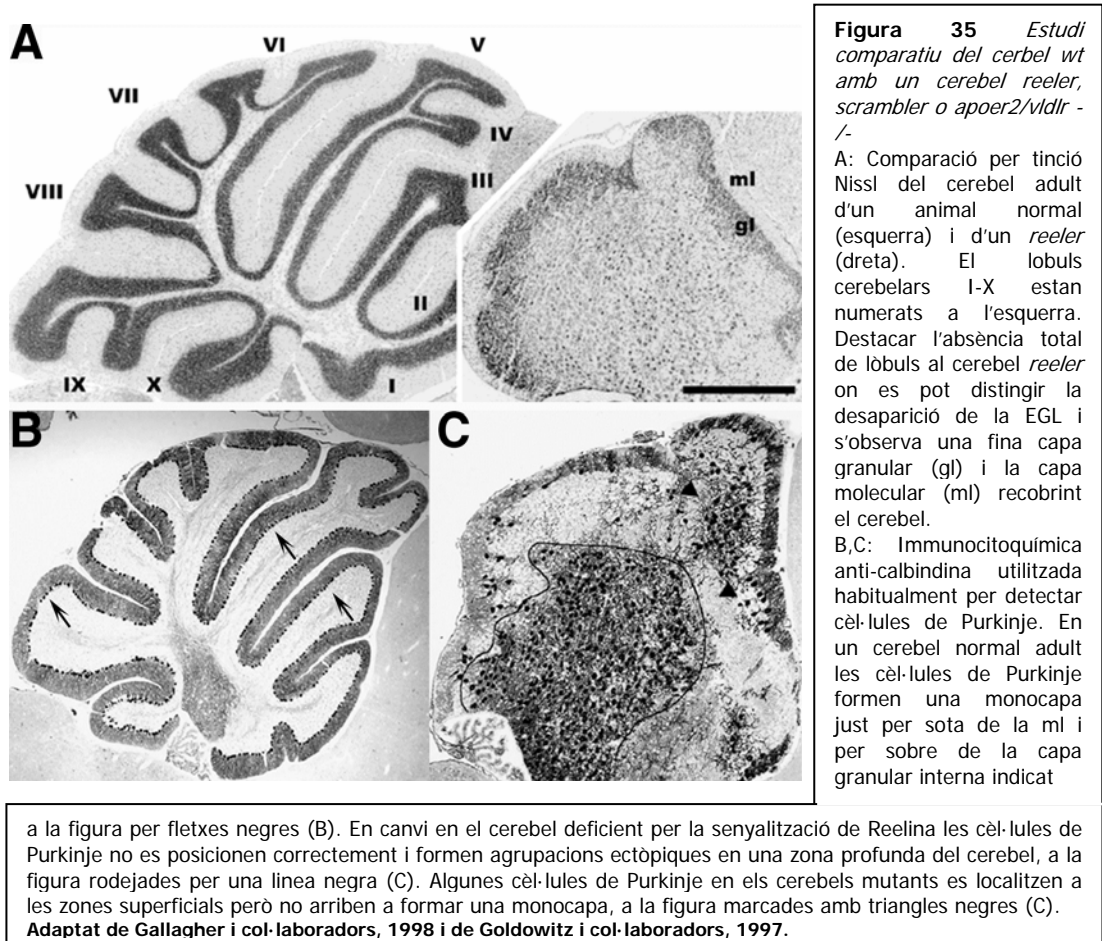
Les cèl·lules de la SVZ es generen a la banya de la paret lateral del ventricle lateral i migren per la RMS fins a l'OB on es desadhereixen, canviant el patró de migració per migrar radialment fins adquirir la seva posició final dins la capa periglomerular o granular (Ming & Song 2005). Explants de la SVZ són cultivats en una matriu de Matrigel, una matriu tridimensional que permet un la migració en cadena dels precursors neuronals generats a la SVZ (Chazal et al 2000, Witchterle et al 1997). Com ja havia estat descrit per Hack i col·laboradors, la Reelina en les nostres condicions de treball també promou la deshadésio de les cèl·lules migrants en forma de cadena obtenint un cultiu de cèl·lules pràcticament individualitzades. Amb aquest paradigma vàrem poder demostrar que tota la via que havia estat proposada per aproximacions moleculars podia ser corroborada amb un model funcional *in vitro*. Tant el bloqueig de la quinasa MEK o el de la fosforilació de la proteïna mDab1 utilitzant inhibidors químics (PD 98109 i PP2, respectivament) com la carència de la proteïna mDab1 utilitzant explants de la SVZ d'animals deficients per *mdab1* inhibeixen l'efecte de Reelina sobre les cèl·lules en migració. Amb aquest

experiments es demostra que la Reelina exerceix la seva funció activant la via de l'ERK. Vam confirmar l'especificitat de l'efecte de la Reelina utilitzant un activador àmpliament conegut de la via de les MAPK com és el BDNF. L'activació independent del via de les MAPK no va ser suficient per produir els mateixos efectes que la Reelina, suggerint que la Reelina desencadena l'activació de la via de les MAPK amb un patró específic que és el necessari per desencadenar la deshadeció cel·lular. Aquests experiments no descarten la possibilitat que a més de l'activació de les MAPK es necessiti d'alguna altra cascada paral·lela de senyalització, ja sigui activada per mDab1 o PI3K o fins i tot per un altre receptor per transduir l'efecte complet de la Reelina. La idea d'una cascada paral·lela de les actualment conegudes, encara que dependent en aquest cas de la MAPK/ERK com es demostra per la inhibició de l'efecte de la Reelina quan s'utilitza l'inhibidor PD 98109, és un punt que hem comentat amb anterioritat i que precisa de ser estudiat aquí novament.

A l'OB la Reelina es produeix principalment a la capa de cèl·lules mitrals (Alcantara *et al.*, 1998). Des d'aquest punt de síntesi la Reelina ha d'exercir els seus efectes sobre les cèl·lules que penetren a l'OB des de la RMS, recorreguent una distància considerable. S'ha postulat que aquesta distància pot ser recorreguda de dos formes diferents, per una banda la Reelina produïda per les cèl·lules mitrals es secretada a nivell somàtic i aquesta difon en gradient fins a la GCL on trobem els precursors neuronals de la RMS (Hack *et al.*, 2002); si aquest fos el cas entrariem novament en el "necessari" paper de la proteòlisi de Reelina per facilitar la difusió, i com les possibles alteracions en aquesta proteòlisi alterarien la resposta dels precursors interneuronals en migració (Jossin *et al.*, 2004). L'altra possibilitat de transportar la Reelina fins a la RMS recau en el fet observat en una soca *reeler*, la *reeler* Orleans, la qual pot expressar Reelina, però en canvi no la pot secretar, acumulant-se en els axons; això podria indicar que la Reelina normalment utilitzaria els axons per ser secretada i en absència d'una senyal efectiva de secreció s'acumularia als axons (Derer *et al.*, 2001). En el cas de l'OB aquesta opció hauria de ser estudiada ja que els axons de les cèl·lules mitrals arriben al centre de l'OB justament on trobem els precursors migrant per la RMS i existeix la possibilitat que la Reelina sigui transportada activament per la cèl·lula fins a l'axó i que aquí s'alliberi una forma completa, no truncada, de la proteïna Reelina.

La Reelina i el seu efecte sobre la migració de les cèl·lules granulars del cerebel

Les cèl·lules granulars del cerebel tenen l'origen al llavi ròmbic i migren tangencialment fins a formar l'EGL (Sotelo, 2004). En aquest punt les cèl·lules granulars comencen a expressar Reelina que se sap que serveix com a senyal de guia final per les cèl·lules de Purkinje, que han migrat prèviament cap a la superfície pial del cerebel, per col·locar-se en una monocapa just per sota de la ML i per sobre de la IGL (Miyata *et al.*, 1997). El paper de la Reelina i de la seva cascada de senyalització en aquest posicionament de les cèl·lules de Purkinje és imprescindible,



com s'observa en el cerebel d'animals *reeler* o *reeler-like* on aquesta organització no es produeix (Figura 35) (Goldowitz *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 1997; Trommsdorff *et al.*, 1999).

Com es mostra a la figura 35C, en absència de la senyalització de la Reelina les cèl·lules de Purkinje es localitzen en agrupacions cel·lulars ectòpiques en la part profunda del cerebel (Figura 35). Aquest fet impedeix que les cèl·lules de Purkinje puguin secretar el factor Shh que estimula la neurogènesi dels precursors de les cèl·lules granulars localitzats a l'EGL proliferativa, amb la conseqüència que el

número final de cèl·lules granulars al cerebel es molt inferior al que li correspondria (Lewis *et al.*, 2004). Donades les observacions prèvies on es descriu que les cèl·lules de Purkinje són l'únic tipus cel·lular al cerebel que expressa tota la maquinària de resposta a Reelina (ApoER2/mDab1) (Tissir and Goffinet, 2003), podríem dir que l'única funció de Reelina al cerebel és posicionar correctament les cèl·lules de Purkinje. Aquest fet però no explica per què l'expressió de Reelina es manté alta fins i tot després que la PCL s'hagi format correctament en edats perinatals i només decreix fins quasi desaparèixer quan totes les cèl·lules granulars han migrat per formar la IGL, més enllà de P15 (Miyata *et al.*, 1996). Aquesta qüestió més la possibilitat que la Reelina afectes de forma directe o indirecte la migració de les cèl·lules granulars com es desprèn d'uns experiments de co-cultiu de cerebel d'animals perinatals i cèl·lules de CR (Soriano 1997), vam decidir aprofundir en la investigació de la relació que podrien mantenir la Reelina i les neurones granulars en el desenvolupament.

Es van prendre dos abordatges per realitzar aquests estudis, un abordatge incloïa tractaments aguts de Reelina i l'altre tractaments crònics de Reelina sobre explants d'EGL. Els resultats que es presenten al Capítol 3 dels resultats es refereixen a aquesta segona aproximació. Amb els tractaments aguts preteníem respondre si la Reelina era típicament una senyal d'stop de migració, i si aquesta senyal depenia d'una concentració mínima de Reelina. Parlàvem de una concentració mínima efectiva ja que les pròpies cèl·lules granulars expressen Reelina i que potser només en concentracions elevades de Reelina, com es poden donar quan les cèl·lules migren dins de la IGL, hi hagués una senyalització efectiva. Aquest abordatge no ens va oferir unes conclusions clares, però el que si vàrem observar és que durant el període de tractament de les cèl·lules amb Reelina i el període de post-tractament s'observava una cert alentiment de la migració del cultiu i sobretot una tendència a la parada de la migració granular. Significativament la migració granular es recuperava després de diversos rentats amb medi fresc sense Reelina. Aquest abordatge es va realitzar amb filmacions de les cèl·lules granulars mitjançant un equip de captura digital d'imatges acoblat a un microscopi de contrast de fases. Malgrat que aquests experiments ens van permetre pensar en la participació de la Reelina en el control de la migració granular no és va permetre observar diferències significatives amb que corroborar-ho. Interessant va ser el punt que després de diversos rentats amb medi sense Reelina la majoria de cèl·lules recuperaven el contorn fusiforme del soma,

indicatiu de migració en aquestes cèl·lules (Komuro and Rakic, 1995), i la velocitat de migració es recuperava.

El segon abordatge implicava un cultiu de llarga durada de les cèl·lules granulars amb la Reelina. Vam comprovar que els nostres cultius en absència de tractament es comportaven de la mateixa manera que havia estat descrita per altres autors (Nagata and Nakatsuji, 1990), permetent-nos considerar el nostre model com un model estandarditzat i apte per l'estudi que volíem desenvolupar. Les cèl·lules granulars del cerebel *in vivo* migren de tres formes diferents depenent del moment en que les observem. Primer migren de forma tangencial dins de l'EGL, aquesta migració s'ha postulat necessària per localitzar la futura neurona dins d'una unitat radial; quan la migració tangencial finalitza es desencadena una migració radial gliofílica, utilitzant les extensions de la glia de Bergmann per creuar la ML i arribar fins a la PCL; i en aquest punt les cèl·lules granulars migren en un procés radial independent de glia que podríem assimilar a la translocació somal (Komuro and Yacubova, 2003). El nostre model experimental s'aproxima més a l'última fase de migració de les cèl·lules granulars *in vivo* ja que les cèl·lules migren radialment i no utilitzen cap suport gliofílic per migrar. Aquest últim punt ha estat comprovat per tècniques immunocitoquímiques fluorescents utilitzant anticossos contra la proteïna àcida fibril·lar glial (o GFAP, de l'anglès *glial fibrillary acidic protein*) present en les cèl·lules glials, observant que malgrat existeixen algunes extensions positives per GFAP, aquestes no participen en la migració de les cèl·lules granulars en el nostre model.

Quan vam analitzar l'acció de la Reelina sobre les cèl·lules granulars de cerebel vam obtenir les dades presentades al Capítol 3 dels resultats, on s'observa que la Reelina indueix la inhibició de la migració d'aquestes cèl·lules. Aquesta inhibició pot ser efecte d'stop per part de la Reelina cap a la cèl·lula o una senyal de desadhesió del substrat on està migrant. Entendre el mecanisme pel qual la Reelina atura la migració d'aquestes neurones pot ser molt interessant per comprendre realment la funció de la Reelina *in vivo* ja que les cèl·lules granulars expressen Reelina tant a l'EGL com a la IGL.

La cascada de senyalització clàssica de la Reelina implica els receptors VLDLR/ApoER2 i la proteïna adaptadora mDab1, sorprenentment aquestes proteïnes no s'han detectat fins al moment en les cèl·lules granulars de cerebel (Howell *et al.*, 1997; Perez-Garcia *et al.*, 2004). Aquestes observacions resulten

contradictòries amb resultats de recent obtenció en el nostre grup on s'observa que en cultius semi-purificats de cèl·lules granulars la proteïna mDab1 es pot

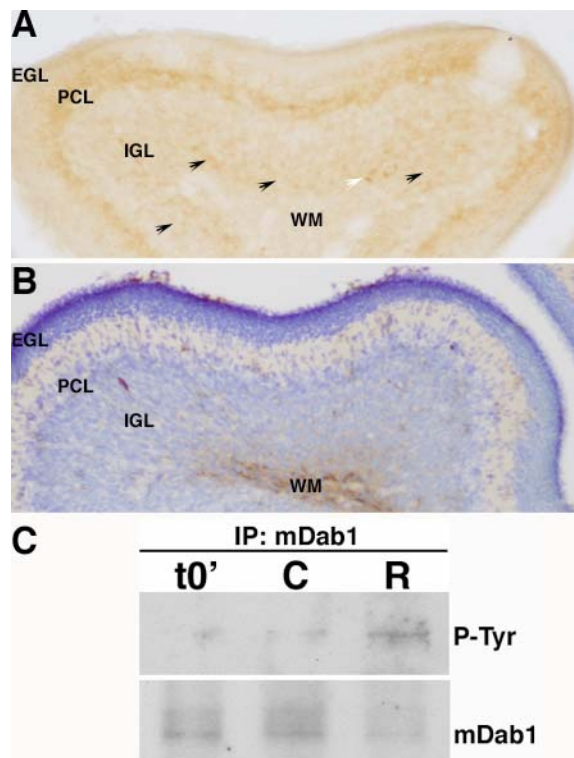


Figura 36 Expressió d'*mDab1* a les cèl·lules granulars del cerebel. A, Immunocitoquímica anti-*mDab1* del cerebel d'un animal wt d'edat P8. Observem un marcatge fort en el soma de la capa de cèl·lules de Purkinje i en les seves dendrites que comencen a ocupar la capa molecular, també s'observa un fort marcatge en cèl·lules grans dins de la capa granular interna (fletxa blanca) que pel tamany i la ubicació semblen ser cèl·lules de Golgi. Per una altra banda s'observa un marcatge més lleu al voltant de la zona més profunda de la IGL que podria correspondre a cèl·lules granulars en la seva última fase de migració o que just han acabat de migrar (fletxes negres). B, Marcatge cel·lular per tinció de Nissl d'un tall similar al de la immunocitoquímica anterior. És interessant observar que la zona de la IGL marcada lleument en (A) per *mDab1* es troba just per sobre de la substància blanca. C, Immunoprecipitació d'un cultiu primari de cerebel tractat amb Reelina (R), amb un medi control (C) o sense tractar (t0'). Al panell superior s'observa que l'estimulació de les cèl·lules amb Reelina induïx específicament la fosforilació en *mDab1*, detectada amb un anticòs anti-P-Tyr. Al panell inferior s'observa el control de càrrega de la mateixa membrana revelat amb l'anticòs anti-*mDab1* B3. EGL, capa granular externa; PCL, capa de cèl·lules de Purkinje; IGL, capa granular interna; WM, substància blanca; P-Tyr, fosfo-tirosina

immunoprecipitar amb un anticòs comercial i tractaments d'aquestes cèl·lules amb Reelina incrementen els nivells de fosforilació de la proteïna *mDab1* (Figura 36C). Utilitzant tècniques immunocitoquímiques nosaltres no som capaços de detectar cap tipus de senyal d'*mDab1* a l'EGL en canvi si que detectem una lleu senyal en la zona més profunda de la capa de la IGL (Figura 36A,B). Si aquest resultat es confirméssim podríem hipotetitzar que la maquinària de resposta a la Reelina podria començar a expressar-se quan les cèl·lules granulars creuen la PCL, com passa en d'altres casos (Komuro and Yacubova, 2003), facilitant la resposta de les cèl·lules granulars a l'acció de la Reelina.

Se sap que les MAPK juguen un paper important en el control de la migració cel·lular en diferents tipus cel·lulars (Huang *et al.*, 2004), i juntament amb els resultats que hem presentat amb anterioritat això ens va fer pensar que les MAPK també podrien estar participant de la cascada

de Reelina en les cèl·lules granulars del cerebel com succeeix en les cèl·lules de la SVZ. Aquesta suposició va ser confirmada amb l'observació que el tractament de cèl·lules granulars cerebelars amb Reelina estimulava la fosforilació de les proteïnes Erk1/2 i a més a més induïa la seva relocalització cap al nucli. Aquesta relocalització

d'Erk1/2 activat al nucli és una observació similar a la descrita pel tractament de Reelina tant en cultius cel·lulars telencefàlics com en cultius cel·lulars de SVZ (Capítol 2 dels resultats i (Pouyssegur *et al.*, 2002). Per observar la possible funcionalitat de la via de la Reelina/ERK en el procés d'inhibició de la migració, es va bloquejar la via de les ERK amb l'inhibidor de la proteïna MEK, el PD 98109. Amb aquest tractament observem que l'efecte de Reelina sobre les cèl·lules granulars en migració queda inhibit i les cèl·lules malgrat la presència de la Reelina migren igual que un cultiu sense tractar. Aquest resultat de bloqueig de funció de la Reelina amb l'inhibidor de la quinasa MEK són molt similars als observats en la desadhesió de les cèl·lules de la SVZ que migren en forma de cadena, suggerint que la Reelina pot utilitzar un mecanisme comú d'actuació en diferents tipus cel·lulars. En aquest punt la confirmació de la presència de la proteïna mDab1 i d'algun dels receptors de la Reelina és necessària per afirmar amb més rigor que les cascades de senyalització dels tres models són iguals. En canvi si no fos així, hauríem de buscar la participació d'altres receptors com podrien ser les integrines, més concretament la Integrina $\alpha\beta1$, les quals ja havien estat suggerides com a possibles receptors de la Reelina amb una funció en l'adhesivitat i la migració de les neurones corticals del cervell anterior (Dulabon *et al.*, 2000). Per una altra banda també se sap que la via d'ERK pot participar en la migració cel·lular suprimint la unió de les integrines als seus lligands a l'ECM (Chou *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 1997), fet que podria explicar que la Reelina mitjançant la via de les MAPK/ERK participes en el bloqueig de la unió de les integrines amb els seus lligands promovent un procés de desadhesió i per tant d'aturada de la migració.

Altres autors han fet estudis globals de l'activació de les proteïnes Erk1/2 al llarg del desenvolupament i fins l'edat adulta (Zsarnovszky and Belcher, 2004). En aquest estudi s'observa un augment de la senyal d'Erk1/2 fosforilat en cèl·lules granulars a partir de P4-6, període en el qual les cèl·lules granulars de cerebel migren de l'EGL per formar la IGL. Aquests marcatge de fosfo-Erk1/2 en cèl·lules individualitzades podria referir-se al moment on aquestes cèl·lules en resposta a Reelina comencen a aturar o aturen la seva migració. Interessant és l'observació que apunten els autors d'aquest treball pel fet que la senyal de la fosforilació d'Erk1/2 augmenta a mesura que ens allunyem de les PCL i aprofundim dins del cerebel. Això coincidiria espacialment amb el fet que les neurones granulars migren a través de totes les cèl·lules granulars de la IGL fins arribar al marge més profund IGL/WM on

aturen la seva migració. Val a dir que els mateixos autors afirmen però que el pic màxim de fosfo-Erk1/2 en cèl·lules granulars es produeix al voltant d'E12-15 quan les cèl·lules granulars post-migratòries comencen a formar contactes els contactes sinàptics immadurs amb les fibres molsoses (Zarnovszky and Belcher, 2004).

Conclusions

- 1. La Reelina indueix la fosforilació, en mode I, de la proteïna MAP1B mitjançant l'activació de la proteïna GSK3 β . La presència de la proteïna mDab1 és essencial per transduir la senyal de Reelina i obtenir la fosforilació de MAP1B.**
- 2. L'animal mutant *MAP1B* $-/-$ mostra deficiències en el patró de desenvolupament del sistema nerviós central, sobretot en estructures laminades, com l'escorça o l'hipocamp, i de forma més subtil al cerebel.**
- 3. La Reelina indueix la fosforilació, i la conseqüent activació, de les quinases regulades extracel·lularment 1 i 2 (Erk1/2) en cultius primaris telencefàlics. Aquesta fosforilació depèn de la fosforilació/activació seqüencial prèvia de les proteïnes mDab1, de les quinases de la família Src (SFks) i de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).**
- 4. L'activació de la via de les MAPK/ERK induïda per la Reelina, desencadena l'expressió del gen primerenc *egr-1*.**
- 5. La Reelina promou el procés de desadhesió de les cèl·lules de la zona subventricular, que formen la via de migració rostral, mitjançant l'activació de la cascada de senyalització que inclou l'mDab1, les SFks, la PI3K i l'ERK. La inhibició de qualsevol membre d'aquesta cascada bloqueja l'efecte de Reelina sobre les cèl·lules de la zona subventricular.**
- 6. Tractaments crònics amb Reelina afecten la migració de les cèl·lules granulars del cerebel, *in vitro*. En aquests casos la Reelina actua com a senyal d'stop inhibint la migració radial neuronal.**
- 7. Tractaments amb inhibidors de la proteïna MEK bloquegen l'efecte de la Reelina sobre les cèl·lules granulars migrants, suggerint que la via de les MAPK/ERK participa en la transducció de senyal desencadenada per la Reelina.**

