

UCH-FC
MAG-BMCN
R741
C.1



MODIFICACIONES EN EL CITOESQUELETO NEURONAL INDUCIDAS POR REELINA

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas, mención en Biología Molecular, Celular
y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

SEBASTIÁN O. M. ROJAS BARRERA

Enero, 2009

Director de Tesis Dr:

CHRISTIAN GONZALEZ-BILLAULT



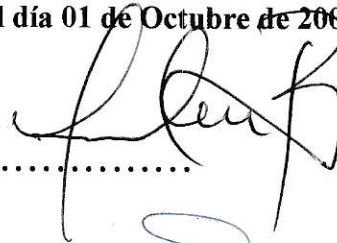
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

SEBASTIÁN O. M. ROJAS BARRERA

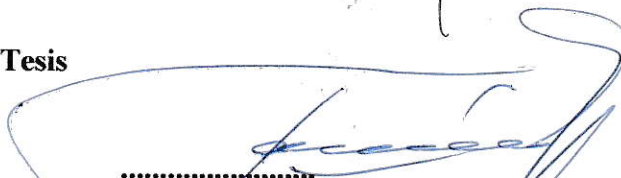
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 01 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:
Dr. Christian Gonzalez-Billault

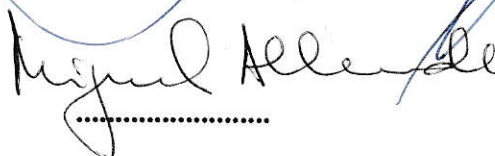
.....


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Fernández

.....


Dr. Miguel Allende

.....




DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre Silvia Barrera y a mi Padre Cristián Rojas. A su actual esposa Verónica Moreau, a mis hermanos Macarena, Verónica, Cristián y Cristóbal. A mi madrina Virginia Barrera, a mi abuela Virginia Ravera que siempre vivirá en mis recuerdos y a todas mis tías, tíos, primas y primos.

A mis amigos Mario Corrales, Rodrigo Gutiérrez, Carolina Carriel, Bárbara Tillería, Iván Balic, Mariela Huichalaf, Pablo Espejo, Cristóbal Dünner y a Fernanda Espinoza sólo por nombrar a algunos de todos los que fueron y son un gran apoyo.

A mi mascota, Baco, por su cariño e infaltable compañía.



FINANCIAMIENTO

La presente Tesis de Magíster fue desarrollada gracias al financiamiento de Fondecyt, proyecto N° 1060040.



AGRADECIMIENTOS



Agradezco a aquellos que fueron parte fundamental en el desarrollo de este trabajo comenzando por Carolina Montenegro; a mi tutor Christian Gonzalez-Billault, por su gran ayuda con las dudas experimentales y correcciones. Por supuesto también a los demás integrantes del Laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal de la Universidad de Chile, Cristina Olmos, Erick Contreras, Cristián De Gregorio, Daniel Bórquez, Vicente y Sara.



ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
Dedicatoria	<i>ii</i>
Financiamiento	<i>iii</i>
Biografía	<i>iv</i>
Agradecimientos	<i>v</i>
Índice de materias	<i>vi</i>
Índice de figuras	<i>viii</i>
Abreviaturas	<i>x</i>
1.- Resumen	<i>xii</i>
1.1.-Abstract	<i>xiv</i>
2.- Introducción	<i>1</i>
3.- Hipótesis	<i>14</i>
4.- Objetivos	<i>16</i>
5.- Materiales y Métodos	<i>18</i>
5.1.- Cultivo Celular	<i>19</i>
5.2.- Establecimiento de cultivos primarios	<i>20</i>
5.3.- Producción de Reelina recombinante	<i>21</i>
5.4.- Estimulación de cultivos primarios con medio enriquecido en Reelina	<i>22</i>
5.5.- Extracción de proteínas y complejos proteicos	<i>22</i>
5.6.- Anticuerpos	<i>23</i>



5.7.- Inmunodetección de Reelina	24
5.8.- Inmunocitoquímica	25
5.9.- Inmunoprecipitación	26
5.10.- Pull Down	27
5.11.- Estado de fosforilación de proteínas presentes en los cultivos primarios	28
5.12.- Inhibición farmacológica de JNK1	29
5.13.- Análisis morfométricos	29
6.- Resultados	30
6.1.- Caracterización de los cultivos primarios	30
6.2.- Obtención de la Reelina recombinante	32
6.3.- Cambios en los patrones de fosforilación de proteínas en respuesta a Reelina	35
6.4.- Análisis morfométrico de neuronas tratadas	39
6.5.- Proteínas asociadas al citoesqueleto de actina	42
6.6.- Actividad de los efectores de las Rho GTPasas	49
6.7.- Proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos	56
7.- Discusión	63
8.- Conclusiones	68
9.- Bibliografía	70



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Diagrama que ilustra el posicionamiento de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral.....	4
Figura 2: Modelo en el cual se ilustran los roles que cumplen las proteínas Rac1 y RhoA durante la migración de fibroblastos.....	10
Figura 3: Modulación de la actividad de Pak1 por el complejo Cdk5/p35.....	12
Figura 4: Cultivo de neuronas corticales de 2 días de cultivo <i>in vitro</i>	32
Figura 5: Detección mediante <i>dot blot</i> de Reelina recombinante.....	33
Figura 6: Inmunodetección de Reelina recombinante.....	34
Figura 7: Fosforilación en tirosina de mDab1 en respuesta a Reelina.....	36
Figura 8: Fosforilación de MAP1B en respuesta al tratamiento con Reelina.....	38
Figura 9: Inmunofluorescencias de cultivos de neuronas corticales estimuladas con Reelina.....	40
Figura 10: Cambios morfométricos de neuronas tratadas con Reelina.....	41
Figura 11: Actividad de Cdc 42 en respuesta a Reelina.....	43
Figura 12: Actividad de Rac1 en respuesta a Reelina.....	45
Figura 13: Obtención de la proteína de fusión GST-RBD.....	46
Figura 14: Actividad de RhoA en respuesta a Reelina.....	48

Figura 15: Inmunodetección de LIMK1 fosforilada.....	50
Figura 16: Inmunodetección de Cofilina fosforilada.....	52
Figura 17: Niveles de P35 en neuronas tratadas con Reelina.....	54
Figura 18: Actividad de JNK1 en respuesta a Reelina recombinante y en presencia del inhibidor farmacológico SP600125.....	57
Figura 19: Fosforilación de la MAP1B en respuesta a Reelina recombinante y en presencia del inhibidor farmacológico SP600125.....	59
Figura 20: Contenido de α -tubulina tirosinada.....	61



ABREVIATURAS

ApoER2	Receptor 2 de Apolipoproteína E
BSA	Seroalbúmina de bovino
Cdk5	Quinasa dependiente de ciclina 5
cDNA	DNA complementario
Dcx	Proteína Doblecortin
DMEM	Medio modificado Eagle de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Reactivo quimiolumincente para <i>western blot</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal de bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GEF	Factores intercambiadores de nucleótido guanina
G418	Geneticina sulfato
Gsk3 β	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
HBSS	Solución balanceada salina de Hank
HEK 293T	Línea celular HEK 293T sin transfectar (control)
HEK 293 T Reelina	Línea celular HEK 293T transfectada establemente con un plásmido que contiene el cDNA para Reelina

HS	Suero de caballo
JNK	c-JUN N quinasa terminal
LIMK1	Quinasa con dominio LIM 1
Lis1	Proteína cuya mutación está relacionada con lisensefalia en humanos
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
MAP1B	Proteína asociada a microtúbulos 1B
mDab1	Disabled, Proteína adaptadora Dab1
MYPT1	Fosfatasa de la cadena intermedia de la miosina 1
NB	Medio Neurobasal
Nudel	Proteína homóloga de NUDE en <i>Aspergillus</i>
PAK1	Proteína quinasa activada por p21
P35	Proteína activadora de Cdk5
P39	Proteína neuroespecífica activadora de Cdk5
PBS	Solución tampón fosfato salino
PBST	PBS-Tween 0,05%
SDS-PAGE	Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Solución tampón Tris-NaCl
TBST	TBS-Tween 0,05%
TRITC	Rodamina
VLDLR	Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular de alto peso molecular, capaz de unirse a los receptores neuronales ApoER2 y VLDLR. Su unión a estos receptores induce la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora mDab1, activando diversas cascadas de transducción de señales. Entre ellas, cabe destacar la que tiene como resultado la fosforilación de la MAP1B, una proteína específica de neuronas implicada en el control de la estabilidad de microtúbulos y que se ha postulado como un nexo entre microtúbulos y filamentos de actina.

Durante esta tesis de magíster se produjo Reelina a partir de células HEK-293T transfectadas establemente con un plásmido que codifica para el cDNA de Reelina.

La Reelina secretada al medio de cultivo de dichas células se concentró posteriormente utilizando un sistema de filtración con corte por peso molecular.

Se establecieron cultivos primarios de neuronas corticales de ratones y ratas en estadio embrionario entre los días 15 y 16 post-fertilización (E15-E16), que luego fueron estimulados con el medio condicionado enriquecido en Reelina.

Se detectó la fosforilación en tirosina de mDab1, así como también un aumento en la fosforilación de MAP1B en respuesta a Reelina en los cultivos primarios de neuronas, lo que indicó que la Reelina recombinante obtenida se encuentra biológicamente activa.

Mediante análisis morfométricos, se cuantificaron aumentos en la longitud de los axones y de las ramificaciones primarias de éstos en las neuronas tratadas, lo que dio cuenta que la Reelina podría modular la actividad de proteínas relacionadas con la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y filamentos de actina

Se determinó que en respuesta a Reelina se lleva a cabo una activación de Cdc42 y de Rac1, junto con una inhibición de RhoA. Además, se evaluaron cambios en la actividad de efectores río abajo de las GTPasas, como son LIMK1 y el factor dinamizante de actina Cofilina. Al medir el grado de fosforilación de estas proteínas, se percibió una disminución tanto para LIMK1 como para Cofilina en las neuronas tratadas. Detectamos que en respuesta a Reelina se lleva a cabo un aumento en la cantidad de p35, activador específico de Cdk5 en neuronas. Adicionalmente, en cultivos neuronales estimulados con Reelina se lleva a cabo un aumento en la activación de la proteína JNK1. Mediante ensayos de inhibición farmacológica se determinó que al inhibir la activación de JNK1, en tratamientos conjuntos con Reelina, se produce una disminución en la fosforilación de la MAP1B en comparación con el tratamiento con Reelina solamente. Junto con esto se determinó que hay una mayor cantidad de α -tubulina tirosinada, lo que indicó un aumento en las propiedades dinámicas de los microtúbulos.

Todo esto en conjunto, da cuenta de que Reelina está llevando a cabo una modulación tanto del citoesqueleto de microtúbulos como de microfilamentos de actina.

ABSTRACT

Reelin is an extracellular matrix glycoprotein that binds to ApoER2 and VLDLR neuronal receptors. This interaction triggers tyrosine phosphorylation of the adaptor protein mDab1 and can activate many signaling pathways. Amongst them we have found MAP1B phosphorylation, a neuron specific protein involved in the control of the dynamic stability of microtubules, postulated as a link between microtubules and actin filaments.

Recombinant Reelin was obtained from HEK 293T cells transfected with a plasmid encoding for Reelin cDNA. The secreted Reelin was then concentrated by filtration with molecular weight cut filters.

I have established cortical neuron primary cultures of mice and rats of stage 15 to 16 embryonic day (E15-16), that were treated with the concentrated Reelin containing media. In these cultures, I was able to detect tyrosine phosphorylation of mDab1 and an increase in MAP1B phosphorylation. These results indicated that the obtained Reelin was biologically active.

Using morphometric data, I have measured increases in the length of the axons and of its primary ramifications in the treated neurons. Indicating a modulation of the cytoskeleton dynamics in response to Reelin stimulation.

There is a modulation of the RhoGTPases family of proteins in response to Reelin, specifically an increase in Cdc42 and Rac1 activity with a concomitant decrease in RhoA activity, with a decreased phosphorylation degree of the downstream effectors of Rho GTPases, such as LIMK1 and the actin depolymerizing factor Cofilin. In response to Reelin treatment there is also an increase in the amount of p35, a Cdk5 specific activator.

As for neuronal microtubules, I have observed an activation of JNK1 in neurons treated with Reelin, additionally in presence of a pharmacologic inhibitor of the activator of this kinase there was a decrease in JNK1 and MAP1B phosphorylation state in comparison with neurons treated with Reelin only. In response to Reelin, there is also a greater quantity of tyrosinated α -tubulin, indicating an increase in the dynamic properties of the microtubules cytoskeleton.

Altogether, these results suggest that Reelin modulates the actin and microtubules neuronal cytoskeleton.

INTRODUCCIÓN

La formación de las regiones laminadas del sistema nervioso central (SNC) se lleva a cabo por series de olas migratorias, en las cuales neuronas post-mitóticas dejan su lugar de nacimiento en la zona ventricular y se mueven a lo largo de las prolongaciones de las glías radiales para posicionarse finalmente en capas bien definidas (*Rivas y Hatten, 1995; Trommsdorff y col., 1999; Nadarajah y col., 2001; Gupta y col., 2002; Nadarajah y Parnavelas, 2002*).

Los eventos moleculares que regulan la interacción de las neuronas que se encuentran migrando con su entorno y las señales que les indican su posición espacial durante el desarrollo del cerebro son complejas y poco conocidas (*Trommsdorff y col., 1999*).

Se han descrito algunas de las moléculas que dirigen y modulan las distintas etapas durante el proceso de migración neuronal, como Netrinas, Slits, Efrinas y Reelina, a través de la activación de complejas cascadas de señalización (*Hatten, 1999; Huber y col., 2003; Marín y Rubenstein, 2003*).

La Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular de 380 kiloDalton que ha sido postulada como una señal que les indica a las neuronas cuándo dejar de migrar durante su posicionamiento, de esta forma dirige la migración de las neuronas en una de las estructuras laminadas del cerebro, la corteza cerebral (*Ogawa y col., 1995*).

La formación de la corteza cerebral se lleva a cabo siguiendo un patrón *inside-out*, esto quiere decir que las neuronas nacidas en estadios tempranos del desarrollo se posicionarán en capas más profundas y las neuronas más jóvenes se posicionarán en capas más externas, dando origen finalmente a 6 capas de células en ratones y humanos (Trommsdorff y col., 1999; Nadarajah y Parnavelas, 2002), durante este proceso la Reelina es secretada por las células de Cajal-Retzius en la zona marginal o más externa de la corteza cerebral (Howell y col., 1999).

Otras regiones con estructuras laminares presentes en el cerebro, cuya formación también está comandada por Reelina son el bulbo olfatorio, el hipocampo y el cerebelo (Gupta y col., 2002).

Diversos experimentos y modelos animales han demostrado que la Reelina es una señal crítica involucrada en el correcto posicionamiento de las neuronas que se encuentran migrando durante la formación del sistema nervioso central en vertebrados (Rice y Curran, 2001). Entre estos modelos animales cabe mencionar al ratón *Reeler*, en el que sus células de Cajal-Retzius son incapaces de sintetizar y secretar Reelina. En esta situación, las neuronas corticales que se encuentran migrando son incapaces de separar la preplaca (PP), fenómeno que de manera normal da origen a la placa cortical (CP), entre la subplaca (SP) en la parte inferior y la zona marginal (MZ) en la parte superior. En su lugar las neuronas de la placa cortical (CP) quedan retenidas bajo una estructura llamada súper preplaca (SPP), dando origen a una inversión en el patrón normal de laminación, que se denominó *outside-in*. (Figura 1; D'Arcangelo y col., 1995; D'Arcangelo y Curran, 1998; Gilmore y Herrup, 2000; Rice y Curran, 2001; Gupta y col., 2002).

Mediante el uso de modelos murinos de pérdida de función se ha demostrado que junto a Reelina, existen otras proteínas que son claves para el correcto posicionamiento de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral, como el adaptador intracelular descrito para la vía de Reelina, Disabled 1, mDab1 (Howell y col., 1997; Ware y col., 1997; Ballif y col., 2003; Bielas y col., 2004; Olson y col., 2006), las proteínas asociadas a microtúbulos poco convencionales Doblecortina, Dcx (Gdalyahu y col., 2004) y lisencefalia1, Lis1 (Bielas y col., 2004), la proteína quinasa dependiente de Ciclina 5, Cdk5 (Ohshima y col., 1996) junto a sus activadores p35 y p39 (Chae y col., 1997; Ko y col., 2001; Gupta y Tsai, 2003); así como también los receptores para Reelina ApoER2 y VLDLR (Trommsdorff y col., 1999; Benhayon y col., 2003); además de otras proteínas que se han asociado a otras cascadas de señalización en respuesta a Reelina como son los receptores de $\alpha 3\beta 1$ integrina (Anton y col., 1999; Dulabon y col., 2000) y de protocaderinas, los que tendrían una función en la adhesión de las neuronas que se encuentran migrando (Kohmura y col., 1998; Senzaki y col., 1999). Nuestro grupo ha demostrado que la participación de la proteína asociada a microtúbulos 1B es también importante para la correcta migración de neuronas corticales (Gonzalez-Billault y col., 2000) y que esta participación requiere de la fosforilación de la MAP1B inducida por Reelina (Gonzalez-Billault y col., 2005).

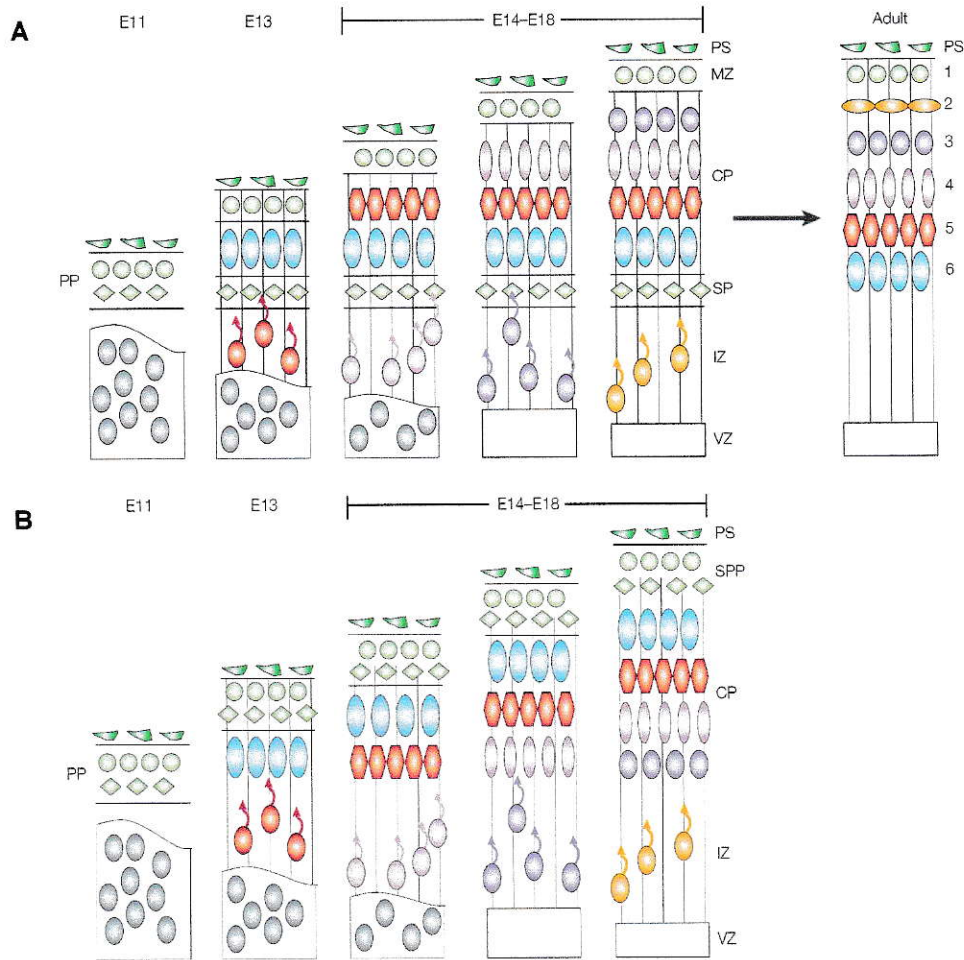


Figura 1. Diagrama que ilustra el posicionamiento de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral. En A se esquematiza el posicionamiento normal de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral y en B el posicionamiento que se lleva a cabo en animales deficientes en Reelina ó en alguna de las proteínas involucradas en su vía de transducción canónica, como sus receptores ApoER2 junto con VLDLR ó el adaptador mDab1. Se muestra además en la parte superior de cada figura el estadio embrionario en que se lleva a cabo cada etapa; las leyendas corresponden a zona ventricular, VZ; zona intermedia, IZ; preplaca, PP; subplaca, SP; placa cortical, CP; superplaca, SPP; zona marginal, MZ y superficie pial, PS. Los números a la derecha corresponden a las placas corticales. (Adaptado de *Gupta y col., 2002*)

Para que las neuronas puedan migrar se deben llevar a cabo modificaciones dinámicas de la morfología neuronal, que requieren de cambios en la formación y mantención de microtúbulos y filamentos de actina. (*Rivas y Hatten, 1995; González-Billault y col., 2005*).

La dinámica de los microtúbulos está regulada tanto por las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir éstos como por las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) en muchos tipos celulares, incluyendo neuronas (*Kreiss, 1987; Cheng y col., 1999*).

Dentro de las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir los microtúbulos se encuentra la tirosinación / destirosinación de la α -tubulina. En neuronas, durante el desarrollo del axón se produce la polimerización de nuevos microtúbulos, los cuales se caracterizan por poseer un residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal de la α -tubulina (*Tanaka y col., 1995*), luego esta tirosina puede ser removida una vez que el heterodímero de tubulina se encuentra incorporado a los microtúbulos (*Argarana y col., 1980*). La tirosinación de la subunidad alfa de la tubulina ha sido asociada con las características dinámicas de los microtúbulos, es decir, aquellos microtúbulos que poseen un mayor contenido de α -tubulina tirosinada, se consideran mas dinámicos (*Kreis, 1987*).

Dentro de la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), destaca la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) que tiene la capacidad de estabilizar a los microtúbulos y se comienza a detectar desde etapas muy tempranas durante el desarrollo del SNC, disminuyendo su expresión gradualmente en etapas posteriores (*Bloom y col., 1985; Cheng y col., 1999; Gordon-Weeks y Fischer, 2000*).

La MAP1B puede sufrir dos tipos de modificaciones post-traduccionales. La primera es la fosforilación en modo I que se lleva a cabo durante el desarrollo del sistema nervioso por proteínas pertenecientes a la familia de las quinasas de Serina/Treonina dirigidas por prolina (PDPKs). La MAP1B fosforilada en modo I se encuentra específicamente en los axones en crecimiento (*Trivedi y col., 2005*) y dicha modificación resulta en una pérdida de su capacidad estabilizadora de microtúbulos en neuronas cultivadas del ganglio de la raíz dorsal (*Goold, 1999; Del Rio, 2004*).

Reportes recientes señalan que la quinasa de c-Jun N-terminal 1 (JNK1), proteína que pertenece a la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), tiene un rol en el proceso de migración neuronal radial durante el desarrollo de la corteza cerebral dirigiendo la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos. JNK1 es capaz de ser activada por proteínas quinasas de las MAPKs (MKK) como MKK4 y MKK7, durante otros procesos celulares (*Wang y col., 2006; Takatori y col., 2008*). Debido a que JNK1 es una PDPK, se sospecha que podría ser capaz de fosforilar directamente a la MAP1B (*Kawauchi y col., 2003*). Además se ha señalado que las proteínas capaces de interactuar con JNK 1 y 2 (JIP-1 y JIP-2) pueden unirse directamente con ApoER2, uno de los receptores para Reelina (*Stockinger y col., 2000*).

Cabe mencionar que aunque se ha reportado que proteínas de la familia PDPKs son capaces de fosforilar a la MAP1B en modo I durante la migración cortical radial; hasta ahora sólo se ha reportado un papel en dicha modulación de la MAP1B para la quinasa de la glicógeno sintasa 3 β (GSK3 β) en cultivos primarios de neuronas corticales tratados con Reelina recombinante (*González-Billault y col., 2005; Kawauchi y col., 2005*).

En cerebros de animales nulos tanto para Reelina como para mDab1 no se ha disminuido completamente la fosforilación en modo I de la MAP1B, lo que indica que existen otras vías mediante las cuales se puede llevar a cabo la fosforilación en modo I de la MAP1B, independientes de Reelina (*González-Billault y col., 2005*).

La segunda modificación que puede sufrir la MAP1B es la fosforilación en modo II, que no es catalizada por PDPKs y se encuentra presente tanto en el axón como en los compartimentos somato-dendríticos de neuroblastomas y de neuronas hipocampales (*Ulloa y col., 1993; González-Billault y col., 2005*).

Ratones deficientes en la MAP1B muestran graves defectos en la estructura de su cerebro que son similares, aunque no idénticos, a los encontrados en el ratón *Reeler* (*Gonzalez-Billault y col., 2000; González-Billault y col., 2004; Gonzalez-Billault y col., 2005*). En neuronas hipocampales, la ausencia de MAP1B genera deficiencias en el desarrollo normal de axones (*Meixner y col., 2000; Gonzalez-Billault y col., 2001; Gonzalez-Billault y col., 2002*).

Las neuronas provenientes del ratón deficiente en MAP1B además presentan un desbalance en el contenido normal de microtúbulos tirosinados y destirosinados (Gonzalez-Billault y col., 2001; Gonzalez-Billault y col., 2002). No sólo eso, recientemente, nuestro grupo ha obtenido resultados que sugieren que la MAP1B es capaz de regular la tirosinación de la α -tubulina en microtúbulos neuronales a través de la interacción de la MAP1B con una de las enzimas involucradas en el ciclo de tirosinación-destirosinación, como es la tubulina tirosina ligasa (TTL) (Utreras y col., 2008).

En respuesta a Reelina se lleva a cabo también la activación de otras dos proteínas pertenecientes a las MAPKs, que no se han relacionado funcionalmente con JNK1, las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (Erk1/2), cuya activación depende de la fosforilación en tirosina de mDab1, así como de la actividad de integrantes de la familia de las quinasas Src y Fyn (SFK), encargadas de la fosforilación en tirosina de mDab1 en respuesta a Reelina. La activación de Erk1/2 lleva consigo su translocación al núcleo, donde es capaz de fosforilar sustratos como el factor de transcripción parecido a Ets 1 (Elk1), dando como resultado un aumento tanto en los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como de masa del factor de transcripción de respuesta a crecimiento temprano 1 (Egr-1). Esto nos da una evidencia de que se puede estar llevando a cabo una inducción en la expresión de algunos genes específicos en respuesta a Reelina (Simó y col., 2007).

Para determinar cambios en las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina, decidimos focalizarnos en la activación de las proteínas pequeñas de la familia de las Rho GTPasas. Estas proteínas controlan la polimerización y la dinámica de los filamentos de actina, funcionando como un interruptor molecular que puede pasar de un estado inactivo (con GDP unido) a uno activo cuando se encuentra con GTP unido, su activación es catalizada por proteínas pertenecientes a la familia de factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs) y su inactivación por proteínas que son capaces de aumentar su capacidad GTPásica intrínseca (GAPs). Existe otra familia de proteínas que es capaz de estabilizar la conformación de las Rho GTPasas cuando tienen unido GDP que se denominan proteínas inhibidoras de la disociación de GDP (GDIs), de esta forma son capaces de inhibir su activación (*Mackay y Hall, 1998; Luo, 2000*).

La familia de las Rho GTPasas esta subdividida en 3 grandes grupos de proteínas, a saber, Rac, Cdc42 y Rho. Estas proteínas tienen diferentes funciones, dependiendo del proceso que se requiera en un cierto lugar de la célula, es así que se ha demostrado en experimentos llevados a cabo en migración de fibroblastos que se requiere predominantemente de la actividad de Rac1 y de Cdc42 en la región de extensión del soma de la célula y de la actividad de RhoA en la zona de retracción de la célula (*Figura 2; Sastry y col., 2006*).

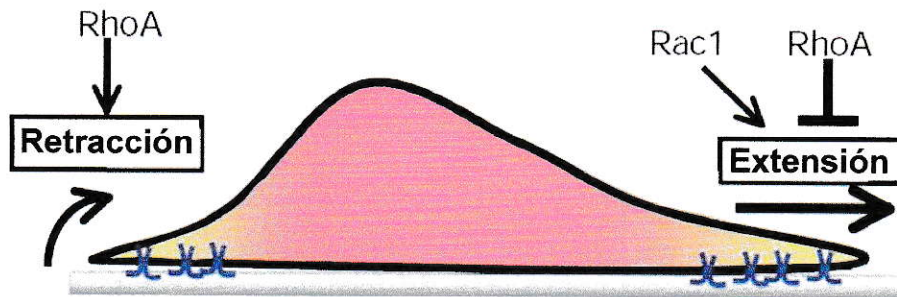


Figura 2. Modelo en el cual se ilustran los roles que cumplen Rac1 y RhoA durante la migración de fibroblastos. Ambas proteínas pertenecen a la familia de Rho GTPasas, La actividad de Rac1 está relacionada con la extensión del soma celular en la dirección del movimiento y la de RhoA con la retracción del cuerpo celular, por lo que se ha descrito que tienen roles antagónicos. (Modificado de *Sastry y col., 2006*).

En neuronas, la activación de Rac1 está íntimamente relacionada con la formación de lamelipodios, la activación de Cdc42 con la formación de filopodios y la de RhoA con el colapso ó retracción de las neuritas (*Arber y col., 1998; Yang y col., 1998; Luo, 2000*). Además, se ha descrito que una activación de Cdc42 está relacionada con un aumento en la actividad de Rac1, ya que la formación de filopodios se encuentra íntimamente relacionada con la formación de lamelipodios (*Luo, 2000*).

Se ha descrito que Rac1 activo (Rac1-GTP) puede interactuar con la proteína quinasa 1 activada por p21 (Pak1) y de esta manera inducir que Pak1 se autofosforile, dando como resultado su activación y la modulación de la actividad de proteínas efectoras involucradas directamente con la dinámica de actina (*Yang y col., 1998*). Uno de los sustratos fosforilables por Pak1 en neuronas, corresponde a la quinasa con dominio LIM 1 (LIMK1). Cuando LIMK1 es sobre expresada en células en cultivo se aprecia un

aumento en estructuras basadas en actina polimerizada (F-actina) y al contrario, dominantes negativos de LIMK1 inducen una disminución en el contenido de F-actina (*Arber y col., 1998*).

LIMK1 activa puede modular negativamente la actividad de Cofilina, fosforilándola en su Serina en posición 3. Cofilina es una proteína que pertenece a la familia de factores dinamizantes de actina (ADF) y su fosforilación tiene como resultado una disminución de su afinidad por microfilamentos de actina y por consiguiente, de su actividad (*Yang y col., 1998; Arber y col., 1998; Luo, 2000*).

Cofilina tiene actividad fragmentadora, despolimerizante y nucleadora de filamentos de actina, su función es vital para que se lleve a cabo una reorganización del citoesqueleto de actina, permitiendo así la formación de estructuras características compuestas por actina polimerizada en los conos de crecimiento en la parte distal de las prolongaciones de las neuronas, como lamelipodios (*Luo, 2000; Gungabissoon y Bamburg, 2003; Van Troys y col., 2008*). Inclusive, la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa (no fosforilable) de Cofilina en neuronas resulta en un aumento en la longitud de las neuritas (*Luo, 2000*).

En neuronas, la activación de Pak1 debida a Rac1, puede ser modulada negativamente por un complejo compuesto por la quinasa dependiente de Ciclina 5, su activador específico p35 y Rac1 (Pak1/Cdk5/p35/Rac1), esto puede explicar que aunque se esté llevando a cabo una activación de Rac1 puede haber una regulación negativa a nivel de Pak1 por este complejo (Figura 3), para modular la actividad de sus proteínas efectoras (*Nikolic y col., 1998; Yang y col., 1998; Gupta y col., 2002*).

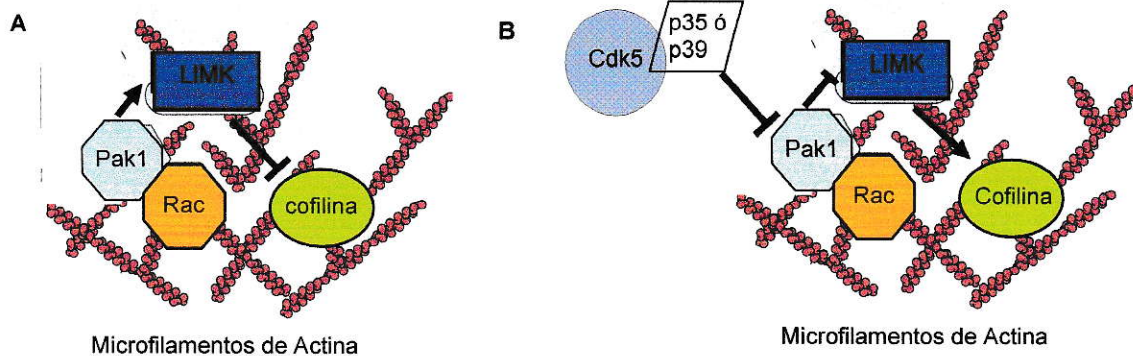


Figura 3. Modulación de la actividad de Pak1 por el complejo Cdk5/p35. En A se muestra que Rac1 puede interactuar con Pak1 induciendo su activación, esta a su vez puede fosforilar a LIMK1, la que es capaz de fosforilar e inhibir a Cofilina. En B se muestra que en presencia de Cdk5/p35 se puede inhibir la activación de Pak1, lo que tiene como resultado que LIMK1 no es capaz de inhibir a Cofilina. Se muestra en rojo a la actina polimerizada. (Adaptado de *Gupta y col., 2002*).

Existen otras formas de regular la fosforilación de LIMK1 y de Cofilina, como la que involucra a la quinasa dependiente de RhoA (ROCK), la cual es capaz de fosforilar directamente a LIMK1 en el mismo sitio que Pak1 y de esta forma inducir la inhibición de Cofilina. Éste se ha descrito como el mecanismo responsable del fenotipo en el cual se relaciona la vía RhoA/ ROCK con una regulación negativa en el crecimiento de las neuritas (*Santos Da Silva, 2003*).

$P27^{kip}$ es una proteína inhibidora de proteínas quinasas dependientes de ciclina (CDKI), ejerce su función durante el ciclo celular y está involucrada en el arresto de las células en Go. Se han encontrado nuevas funciones para $p27^{kip}$ en las neuronas post-mitóticas que se encuentran migrando, que tienen relación con remodelamientos en el citoesqueleto de actina. Esto debido a que Cdk5 puede fosforilar y estabilizar a $p27^{kip}$

inhibiendo su degradación vía el proteosoma y manteniendo niveles altos de esta proteína en neuronas. Específicamente se encontró que p27^{kip} es capaz de inhibir la actividad de RhoA, lo que produjo un aumento en los niveles de Cofilina activa. Es más, se ha descrito que transfecciones de neuronas corticales con RNAs interferentes (iRNAs) para p27^{kip} causan un arresto en la migración (*Kawauchi y col., 2006*).

HIPÓTESIS

Planteamos que la regulación del citoesqueleto neuronal en respuesta a Reelina dependería de cambios en la actividad de las Rho GTPasas y de cambios en la fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B), dependiente de la quinasa JNK1.

Los antecedentes que apoyan esta hipótesis son los siguientes:

- 1) La sobreexpresión de un dominante negativo de Rac1 *in útero*, produce un arresto de las neuronas corticales en la zona subventricular. (*Kawauchi y col., 2003*)
- 2) La sobreexpresión *in útero* de una forma dominante negativa de Tiam1, una proteína perteneciente a la familia de activadores de Rac1 (Rac1-GEF) produce un efecto similar, aunque no idéntico, a la sobreexpresión del dominante negativo de Rac1. (*Kawauchi y col., 2003*)
- 3) Neuronas derivadas del mutante deficiente en MAP1B que posee un fenotipo similar, aunque no idéntico, al mutante deficiente en Reelina muestran una estructuración aberrante de su citoesqueleto de actina. (*González-Billault y col., 2001; 2005*)

4) Mutantes en MAP1B muestran una disminución de las formas activadas de Rac1 y una disminución en la unión de Tiam1 a microtúbulos neuronales. (*González-Billault, resultados sin publicar*)

5) Cdk5 ha sido posicionado en la vía de transducción de señales dependiente de Reelina por debajo de mDab1. (*Gupta y col., 2002; Gupta y Tsai, 2003*)

6) JIP-2, una proteína de andamio que interacciona con el dominio citoplasmático del receptor ApoER2 (receptor de Reelina), puede reclutar a Rho-GEF una proteína involucrada en la activación/inactivación de las Rho GTPasas. (*Meyer y col., 1999*)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es dilucidar si una señal extracelular que dirige la migración radial de las neuronas, como es la Reelina, modifica la actividad de proteínas claves involucradas en el control de la dinámica de microtúbulos y filamentos de actina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar si existen cambios morfométricos en las neuronas tratadas con Reelina.

El primer objetivo consiste en evaluar cambios en los parámetros morfológicos y morfométricos como son la longitud de los axones y de sus ramificaciones primarias en las neuronas tratadas con Reelina.

2. Analizar si la Reelina induce modificaciones en el citoesqueleto neuronal de actina a través de la modulación de las Rho GTPasas.

El segundo objetivo específico propuesto es estudiar si la estimulación de cultivos primarios de neuronas corticales en estadio E15-16 con Reelina es capaz de inducir cambios en la actividad de proteínas pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas, como son Cdc42, Rac1 y RhoA.

3. Estudiar si la Reelina induce cambios en los patrones de activación de proteínas involucradas en la dinámica de microtúbulos.

El tercer objetivo específico es verificar si la estimulación de cultivos primarios de neuronas corticales en estadio E15-16 con Reelina es capaz de inducir cambios en la actividad de proteínas capaces de modificar la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Animales

Se utilizaron la cepa de ratón (*Mus musculus*) BALB/c y Ratas en estadio embrionario 15–16 días post-fecundación. Los animales fueron tratados según el protocolo de manipulación de animales, diseñado por la comisión de ética del Departamento de Biología de la Universidad de Chile.

Líneas celulares

Se utilizó la línea celular HEK-293T (proveniente de riñón embrionario humano), la cual fue previamente transfectada establemente con un plásmido que contiene un gen que codifica para el cDNA de la glicoproteína de matriz extracelular involucrada en migración neuronal radial, que corresponde a la Reelina (HEK-293T Reelina). Esta línea celular es capaz de producir y secretar al medio de cultivo la proteína recombinante en condiciones de privación de suero. Se utilizaron como control células HEK-293T sin transfectar.

Reactivos químicos y de cultivo celular

Los reactivos y productos químicos de uso general utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron obtenidos de Sigma, TCL, Calbiochem, Winkler y Sudelab. Los medios de cultivo, antibióticos y suplementos utilizados para cultivo celular son de Gibco. Los materiales utilizados en cultivo celular fueron adquiridos de Orange Inc.

MÉTODOS

Cultivo Celular

Las líneas HEK-293T y HEK-293T-Reelina fueron crecidas en Medio modificado Eagle de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5 ó 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en un incubador con 5% de CO₂ y humedad controlada al 95%. Como medio de selección para la línea recombinante se utilizó el antibiótico geneticina (G-418) a una concentración de 100 µg/mL.

Establecimiento de cultivos primarios

La preparación de cultivos de neuronas corticales se realizó a partir de embriones en estadio E15-E16, según un protocolo previamente descrito (*Banker y Cowan, 1977*). Luego de obtener los embriones y disectar el neocortex, el tejido se fragmenta y se incuba con medio salino balanceado de Hank's (HBSS) - EDTA Tripsina 1% por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan 3 lavados con HBSS y se disgrega suavemente el tejido con una pipeta Pasteur en medio DMEM suplementado con glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycinina y 10% suero de caballo (DMEM-HS). Finalmente se determina el número de neuronas por conteo en un hemocitómetro utilizando el método de exclusión por azul de tripán. Se utilizaron placas de Petri de 100, 60 y 35 mm para los análisis bioquímicos y cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro recubiertos de un sustrato adhesivo (poli-D-lisina 1,0 µg/mL) en placas de 24 pocillos para los análisis mediante inmunofluorescencia. Las células fueron plaqueadas en medio DMEM-HS a una densidad de 45.000 células/cm² para las placas y de 12.000 células/cm² para los cubreobjetos durante 3 horas. Luego de este intervalo de tiempo, se cambia el medio por Neurobasal suplementado con B27, glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina (Neurobasal-B27) y previamente a la estimulación, las células son mantenidas en un incubador humidificado a 37°C, 95% de humedad ambiental y 5% de CO₂ durante dos días.

Producción de Reelina recombinante

Las células HEK-293T y HEK-293T-Reelina se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una densidad del 80 a 90%, luego se procedió a inducir la producción de la proteína recombinante utilizando medio DMEM sin suero y se recolectó el medio condicionado durante 3 días consecutivos, realizando una recolección cada 24 horas, reponiendo el medio condicionado por medio DMEM sin suero fresco.

Purificación y concentración del medio condicionado

Los medios condicionados provenientes de células control y productoras de Reelina se centrifugaron a 2.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos para librarlos de restos celulares. Luego se filtraron utilizando filtros ORANGE Scientific con un tamaño de poro de 0,22 μm para eliminar posibles restos de células que pudiesen haber quedado del paso anterior y asegurarnos de no tapar los filtros concentradores. Posteriormente los medios filtrados se centrifugaron a 2.000 rpm y 4 °C en filtros para centrifuga MILLIPORE AMICON ULTRA, (que son capaces de retener proteínas más pesadas que 100 kiloDalton y dejar pasar a las más pequeñas). Luego estos medios concentrados 100 veces se guardaron a -20 °C hasta ser utilizados para la estimulación de los cultivos primarios.

Estimulación de cultivos primarios con medio enriquecido en Reelina

El medio que contiene a la Reelina recombinante fue diluido 3 veces con medio de cultivo Neurobasal-B27 fresco para luego ser agregado a los cultivos primarios de neuronas de 2 días *in vitro* durante diferentes tiempos. Los experimentos controles se realizaron utilizando medios concentrados de células controles tratados de la misma forma que los medios que contienen a la Reelina. Las neuronas fueron estimuladas cambiando un tercio del medio de cultivo por el volumen de estimulación por períodos variables de 15 minutos a 24 horas. Después de la estimulación con Reelina, las neuronas fueron utilizadas para experimentos de bioquímica o de inmunotinción con anticuerpos específicos. Para los experimentos bioquímicos se extrajeron las proteínas totales de las células y se almacenaron en solución tampón Laemmli 1X (Tris 250 mM/ SDS 4%/glicerol 10%/2-mercaptoetanol/ 2%/ azul de bromofenol 0,006%; pH 6,8) a -20°C.

Extracción de proteínas y complejos proteicos

Para extraer las proteínas y complejos proteicos totales, las células fueron lisadas en soluciones tampón de extracción de proteínas (Tris 20 mM pH 7,4/NaCl 100 mM/EDTA 1 mM/Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina 0,2 mM) ó en solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM pH 7,4/NaCl 150 mM/EDTA 1 mM/EGTA 1 mM/Tritón X-100 1%/ortovanadato de sodio 0,2 mM/NP-40 0,5% / DTT 1 mM/

PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1mM y Pepstatina 0,2 mM) y ácido okadaico 1 μ M como inhibidor de fosfatasa para el caso de proteínas fosforiladas. Luego de centrifugar los extractos a 15.000 rpm durante 15 minutos obtuvimos el sobrenadante, que se consideró como el lisado total.

Anticuerpos

Para los experimentos de *Dot Blot*, inmunodetección, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación se utilizaron los siguientes anticuerpos: Para Reelina, clon G10 (MAB5364, Chemicon Intl.); mDab1, (sc-13981, Santa Cruz Biotechnology); fosforilaciones en tirosina, clon 4G10 (05-321, Upstate); MAP1B total y fosforilada en modo I fueron N-19 (sc-8970, Santa Cruz Biotechnology) y SMI31 (SMI-31R, Sternberg), respectivamente. JNK1/2 (554285, BD Biosciences); JNK1/2 fosforilada (612540, BD Biosciences); Rac1 (AB4202, Chemicon Intl.); Cdc42 (AB4201, Chemicon Intl.); GST (05-311, Upstate); RhoA (AB 3884, Chemicon Intl.); p35 (sc-820, Santa Cruz Biotechnology); α -tubulina, clon DM 1A (T9026, SIGMA); β III-tubulina (G7121, Promega); GFAP (G5601, Promega); LIMK1 (sc-8387, Santa Cruz Biotechnology) para la población total y Phospho-LIMK1 Thr 508 (3841, Cell Signaling Technology) para la fosforilada. Para la detección de Cofilina fosforilada y total se utilizaron anticuerpos cedidos generosamente por el Dr. James Bamberg.

Dot Blot

Para realizar este ensayo cargamos muestras del medio condicionado en diluciones seriadas en potencias de 10 directamente sobre membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (Perkin Elmer) colocadas en una cámara de Dot blot (Bio-Rad). La presencia de Reelina en los diferentes pocillos fue evaluada utilizando un protocolo estándar de inmunodetección, descrito a continuación.

Inmunodetección

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) a concentraciones adecuadas para los pesos moleculares de las proteínas a analizar. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 μm , para posteriormente ser bloqueadas en una solución tampón Fosfato 12mM pH 7,2 con Tween 0,05% (PBST) ó solución tampón Tris 24mM pH 7,4 con Tween 0,05% (TBST), para el caso de proteínas fosforiladas, saturado con 5% leche e incubadas con los anticuerpos primarios en PBST ó TBST-1% leche a las diluciones previamente estandarizadas en el laboratorio. Luego de lavar 6 veces durante 5 minutos con PBST ó TBST se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, también preparados en PBST ó TBST-1% leche. Posteriormente, las membranas fueron nuevamente lavadas 6 veces durante 5 minutos con PBST ó TBST y finalmente, incubadas con el reactivo de

quimioluminiscencia aumentada (ECL, Pierce) y reveladas utilizando películas autoradiográficas (HR-U30, FujiFilm). Para realizar los análisis densitométricos, las señales obtenidas fueron cuantificadas utilizando el programa ImageJ 1.04g. Luego los valores obtenidos fueron normalizados contra los valores correspondientes a una proteína que se encuentra en niveles constantes en la célula, como la α -tubulina ó la β -III tubulina.

Inmunocitoquímica

Estos ensayos fueron realizados según protocolos previamente descritos (*Álvarez y col., 2001*). Brevemente, los cubreobjetos con las neuronas adheridas fueron fijadas con una solución de sacarosa 4%/ paraformaldehído 4% y luego permeabilizados con solución tampón fosfato 12mM pH 7,2 (PBS)/ Tritón X-100 0,2% durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron con PBS-seroalbúmina de bovino (PBS-BSA) al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios a las diluciones apropiadas en solución PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de lavar 3 veces con PBS, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos secundarios anti-conejo ó anti-ratón conjugados con fluoresceína (FITC, Alexa Fluor-488) ó con rodamina (TRITC, Alexa Fluor-546); en PBS-BSA 1%. Después de 3 lavados con PBS se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave

(Calbiochem). Para las proteínas fosforiladas se procedió de la misma manera, reemplazando el PBS por solución tampón Tris 24mM, pH 7,4 (TBS).

Adicionalmente, la actina polimerizada (F-Actina) fue detectada utilizando Faloidina-TRITC-546 ó Faloidina-FITC-488 (Cytoskeleton Inc.) y el núcleo con ToPro (Molecular Probes). Finalmente, las células fueron visualizadas en el microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss).

Inmunoprecipitación

Se cuantificó el lisado total de proteínas mediante el protocolo descrito por Bradford (*Bradford y col., 1976*) y 400 a 500 µg de proteínas totales fueron incubados con 3-5 µg de anticuerpos específicos en un volumen final de 500 µL de solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM pH 7,4/NaCl 150 mM/EDTA 1 mM/EGTA 1 mM/Tritón X-100 1%/ortovanadato de sodio 0,2 mM/NP-40 0,5% / DTT 1 mM). Se dejó interactuar durante toda la noche a 4°C y luego se agregaron 20 µL de Proteína A-Agarosa al 50% en PBS, se mezcló y dejó agitando durante 60 minutos a 4°C. Después de centrifugar la mezcla durante 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C, el pellet fue recuperado, lavado tres veces con tampón de inmunoprecipitación y resuspendido en la cantidad necesaria de solución tampón de carga Laemmli 4X. Las proteínas presentes en el precipitado fueron posteriormente caracterizadas mediante inmunodetección.

Pull down

Se cuantificaron las poblaciones activas de Rac1 y Cdc42 según el protocolo descrito en un kit específico (BK 035, Cytoskeleton Inc.), utilizando una proteína de fusión que contiene a la glutatión -S-transferasa (GST) unida a dominios de interacción con Cdc42 y Rac1 activos presentes en la proteína Pak1 (GST-PBD; *Bernard y col., 1999*).

Como control positivo para este ensayo se estimularon neuronas corticales con péptido β -amiloide 10 μ M, el cual es capaz de estimular la activación de Cdc42 y Rac1 al cabo de 4 horas (*Mendoza-Naranjo y col., 2007*).

Además se produjo una proteína recombinante obtenida a partir de una cepa de *Escherichia coli* que porta un plásmido con un constructo que codifica para la GST fusionado con un fragmento de Rho GTPasa (RBD-GST) para capturar la forma activa de RhoA. Luego de hacer interactuar a las proteínas de fusión con los extractos proteicos durante 2 horas a 4°C, las proteínas unidas fueron precipitadas utilizando bolas de glutatión sefarosa 4B (Amersham Biosciences) por centrifugación a 3.000 rpm por 5 minutos y lavadas 4 veces con solución tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,2/ NaCl 150 mM/ Tritón X-100 1%/ MgCl₂ 10 mM/PMSF 0,1 mM / Aprotinina, leupeptina y pepstatina 10 μ g/mL). Finalmente el precipitado fue resuspendido en el volumen necesario de solución tampón de carga Laemmli 4X y caracterizado mediante inmunodetección.

De esta forma analizaremos los cambios en la actividad de las Rho GTPasas en respuesta al tratamiento con Reelina.

Estado de fosforilación de proteínas presentes en los cultivos primarios

Fosforilación en tirosina de mDab1

Para llevar a cabo la detección de la fosforilación en tirosina de mDab1 primero se realizó una inmunoprecipitación de mDab1 total, para luego detectar su fosforilación en tirosina utilizando un anticuerpo específico para esta modificación post-traducciona. Para determinar la cantidad de proteína fosforilada se cuantificó a la población fosforilada y total de mDab1 mediante densitometría y se realizó una relación fosforilada versus total, previamente estandarizados contra controles de carga (α -tubulina ó β III-tubulina).

Cuantificación de la fosforilación de MAP1B, JNK1, LIMK1 y Cofilina

Para determinar el grado de fosforilación de estas proteínas se realizaron inmunodetecciones de las poblaciones fosforiladas y totales. Luego se cuantificaron por densitometría y se procedió a hacer la relación entre ambos estados, previamente estandarizados contra controles de carga (α -tubulina ó β III-tubulina).

Inhibición farmacológica del activador de JNK1

Con el fin de examinar cambios en los patrones de fosforilación de proteínas que se encuentren por debajo de JNK1 en la vía de señalización en respuesta a Reelina, se utilizó el fármaco SP600125 (Biomol International, LP), inhibidor específico de las quinasas MKK4 y MKK7, las cuales son capaces de activar a JNK1.

Las neuronas fueron tratadas con medio control, enriquecido en Reelina y cada uno de los medios anteriormente mencionados en conjunto con el inhibidor a una concentración final de 25 μ M durante los tiempos indicados.

Análisis morfométricos

Para los análisis morfométricos se utilizaron microfotografías tomadas mediante inmunocitoquímica de neuronas tratadas con Reelina y medio control durante diferentes tiempos, utilizando el microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss) y se procedió a medir la longitud de los axones utilizando el programa Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy, versión 4.0. Se procedió a cuantificar las longitudes de los axones según intervalos de distancia, así como también el número de ramificaciones axonales mayores a 50 μ m presentes en las neuronas tratadas según su frecuencia.

RESULTADOS

Si bien la migración neuronal dependiente de Reelina da cuenta de la estructuración de distintas áreas del cerebro, se eligió la corteza cerebral como material de estudio debido a que es la región de mayor masa del cerebro donde Reelina comanda la migración radial de neuronas y que además es fácil de identificar y disectar.

Se utilizaron embriones en estadio de desarrollo 15-16 días post fecundación (E15-16), debido a que es justamente la ventana temporal en que se está llevando a cabo el proceso de migración neuronal radial dependiente de Reelina durante la formación de las regiones laminadas del SNC.

Caracterización de los cultivos primarios

Para evaluar las consecuencias del tratamiento con Reelina sobre las neuronas corticales, se realizó la caracterización de estos cultivos primarios mediante microscopía confocal. Para ello, las células fueron teñidas con anticuerpos que reconocen proteínas estructurales (α -tubulina) y proteínas que se expresan exclusivamente en neuronas (β III-tubulina) y en astrocitos (GFAP).

Como se observa en la fotografía de contraste de fase (figura 4A) y mediante la inmunotinción contra α -tubulina (figura 4B), luego de dos días de cultivo *in vitro* (2DIV), las neuronas ya poseen procesos bien definidos. La generación de estos procesos se caracteriza por la presencia de una extensión citoplasmática que es mucho más larga que el resto de los procesos, que corresponde al axón. Así mismo, se observan numerosas proyecciones de menor tamaño y equivalentes entre ellas. Estas constituyen las neuritas menores, que en estadios posteriores del cultivo darán origen a las dendritas (Arimura y Kaibuchi, 2007).

Para dilucidar la naturaleza de las células presentes, se realizó una inmunotinción doble contra el marcador neuronal β -III tubulina (figura 4C, en verde) y contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; Figura 4C, en rojo, ver círculo blanco), que corresponde a un marcador para astrocitos. Adicionalmente, para detectar la población total de células presentes en el campo visual se tiñeron sus núcleos con ToPro (figuras 4B y 4C, en azul). De esta forma, se determinó que cerca del 98% de las células presentes en los cultivos corresponderían a neuronas y el 2% restante corresponde a astrocitos. Así pudimos establecer un cultivo de neuronas derivado de corteza cerebral en una ventana de tiempo en la cual son capaces de responder a la estimulación con Reelina. Nótese que la figura 4A corresponde al mismo campo visual que la figura 4B, no así la figura 4C.

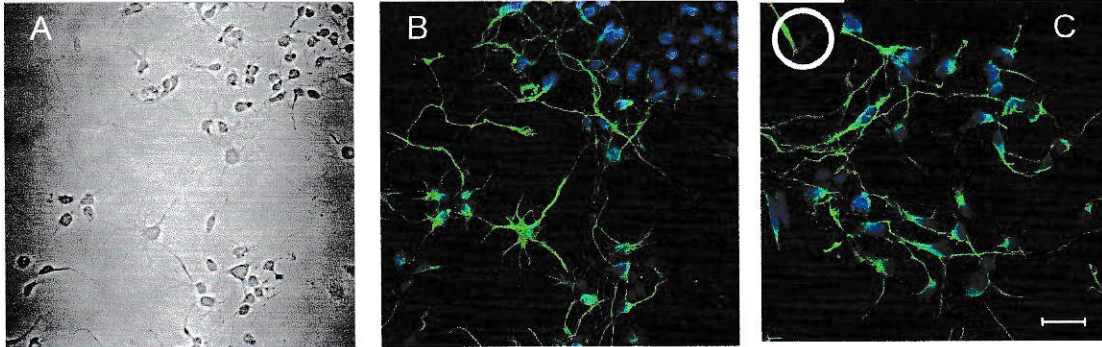


Figura 4. Cultivo de neuronas corticales de 2 días de cultivo *in vitro*. Se muestra en A una fotografía de contraste de fase, en B la inmunotinción contra α -tubulina total en verde y en C, la inmunotinción doble contra β III-tubulina en verde y para GFAP en rojo (ver círculo blanco). En B y C los núcleos teñidos con ToPro se muestran en color azul. Se utilizó un lente objetivo de magnificación 40X y el tamaño de la barra corresponde a 30 μ m.

Obtención de la Reelina recombinante

Una vez estandarizado el establecimiento de cultivos primarios de neuronas corticales, se procedió a la producción y obtención de la Reelina recombinante. La producción de proteínas recombinantes requiere ser comprobada. Por esto, se verificó la presencia de Reelina en los medios condicionados mediante las técnicas de *Dot blot* e inmunodetección, utilizando un anticuerpo que la reconoce específicamente.

Una vez producida y concentrada la Reelina, se realizaron diluciones seriadas que fueron analizadas por *Dot blot*. Se evaluó la presencia de Reelina para diferentes eventos de recolección y concentración de medio condicionado, tanto de células productoras de Reelina como de células control y una solución de BSA como controles negativos (Figura 5).

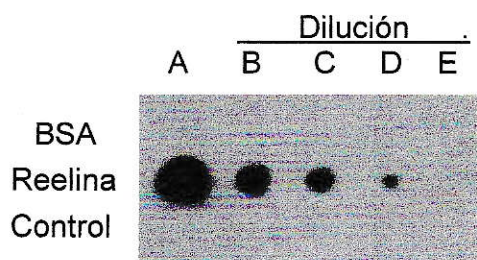


Figura 5. Detección mediante *dot blot* de Reelina recombinante. Las líneas corresponden a control negativo (BSA), medio condicionado concentrado de células productoras de Reelina (Reelina) y medio condicionado concentrado de células control (Control). Las columnas corresponden a una dilución seriada de las muestras. En A, sin dilución; B, 1/10; C 1/100; D, 1 /1.000 y E, 1/10.000.

La figura muestra que a medida que aumentamos la dilución del medio condicionado, decrece la señal debida al anticuerpo para Reelina, indicando que efectivamente la proteína recombinante es producida. Adicionalmente se observa que no hubo inmunoreacción en el medio condicionado de células control (Control) ni en la fracción correspondiente a BSA (BSA), usada como control negativo para el ensayo, lo que sugiere que efectivamente la inmunoreacción positiva asociada al ensayo se debe a la presencia de Reelina.

Sin embargo, como el ensayo de *Dot blot* no nos permite identificar el peso molecular de la proteína producida, se realizó una inmunodetección para corroborar la integridad de la proteína en los medios condicionados (Figura 6).

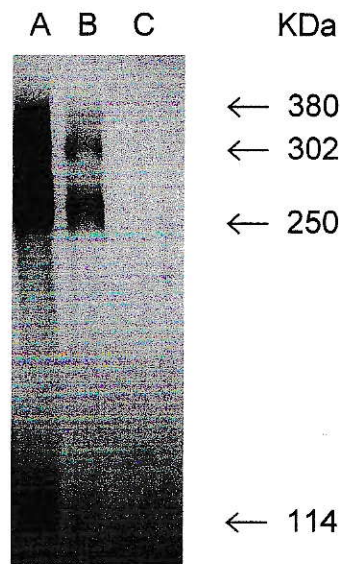


Figura 6. Inmunodetección de Reelina recombinante. Los carriles corresponden a diferentes diluciones de los medios condicionados. En A, dilución 1/10; B, 1/50 del medio condicionado de células productoras de Reelina y en C, sin dilución del medio condicionado de células control. Los pesos moleculares correspondientes a cada fragmento reconocido se encuentran indicados por flechas.

El anticuerpo reconoce a la Reelina, de 380 kiloDalton, como también a diferentes fragmentos fisiológicos de esta proteína. Podemos observar un fragmento de 250 KDa, que corresponde a la señal más intensa, éste junto con los otros fragmentos de 302 y 114 kDa obtenidos han sido previamente descritos por otros grupos y tienen la capacidad de activar la vía canónica en respuesta a Reelina (*D`Arcangelo y col., 1997; Niu y col., 2004*). Dichos fragmentos solamente aparecen en los carriles A y B, que corresponden a los medios condicionados de células que producen Reelina y no en el carril correspondiente al medio control (C). En conjunto estos experimentos demuestran que la Reelina recombinante está siendo producida.

Cambios en los patrones de fosforilación de proteínas en respuesta a Reelina

Para determinar si la Reelina recombinante producida se encuentra biológicamente activa *in vitro*, se procedió a determinar modificaciones en los patrones de fosforilación de las proteínas mDab1 y de MAP1B en respuesta a Reelina en cultivos primarios de corteza de ratones embrionarios de 2 días de incubación. Está bien descrito en la literatura que uno de los eventos claves y más tempranos que se llevan a cabo durante la activación de la vía de transducción de señales canónica inducida por Reelina, es la fosforilación en las tirosinas 198 y 220 de la proteína adaptadora mDab1 (*Howell y col., 1997; Howell y col., 1999; Keshvara y col., 2001; Ware y col., 1997*). Es por esto, que para determinar si la Reelina producida se encuentra biológicamente activa *in vitro*, evaluamos cambios en la fosforilación en tirosina de mDab1 (Figura 7).

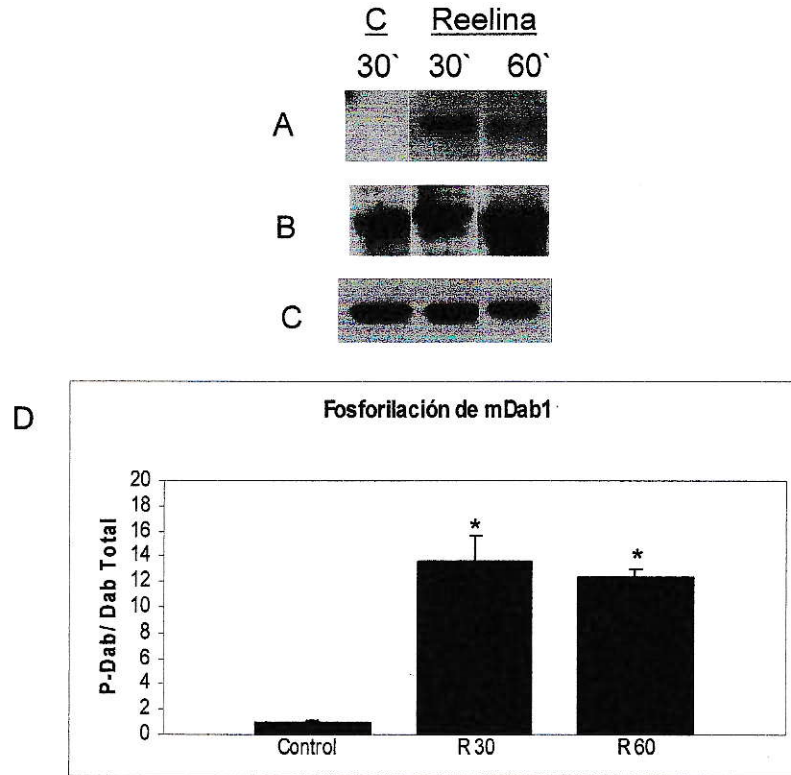


Figura 7. Fosforilación en tirosina de mDab1 en respuesta a Reelina. En A se determinó la fosforilación en tirosina y en B a la población total de la proteína mDab1. En C se muestra la inmunodetección de β -III tubulina como control de carga en los tratamientos con medio control (C) y Reelina (Reelina) a los tiempos señalados. En D se grafica la relación mDab1 fosforilada/ mDab1 total estandarizada contra la señal de β -III tubulina. Los datos graficados corresponden a 3 experimentos independientes y las diferencias significativas utilizando la prueba de significancia t de student con $t < 0,05$ con respecto a la condición control se muestran con asteriscos.

La cantidad de mDab1 fosforilada en tirosina llega a un máximo luego de 30 minutos en cultivos primarios de neuronas corticales estimulados con Reelina recombinante y a los 60 minutos observamos una leve disminución no significativa en la intensidad de la

banda en comparación a los 30 minutos. El tratamiento con el medio control se llevó a cabo durante 30 minutos.

El peso molecular calculado según la migración relativa de mDab1 es de 79 KDa y el peso molecular descrito en la literatura es de 80 KDa (*Howell y col., 1999*), todo esto en conjunto demuestra que efectivamente se lleva a cabo un aumento en la cantidad de mDab1 fosforilada en tirosina en los cultivos primarios de neuronas estimuladas con la Reelina recombinante. Adicionalmente, para corroborar que la vía de señalización de Reelina es funcional en nuestro sistema de estudio, analizamos los cambios en la fosforilación en modo I de la proteína MAP1B (Figura 8).

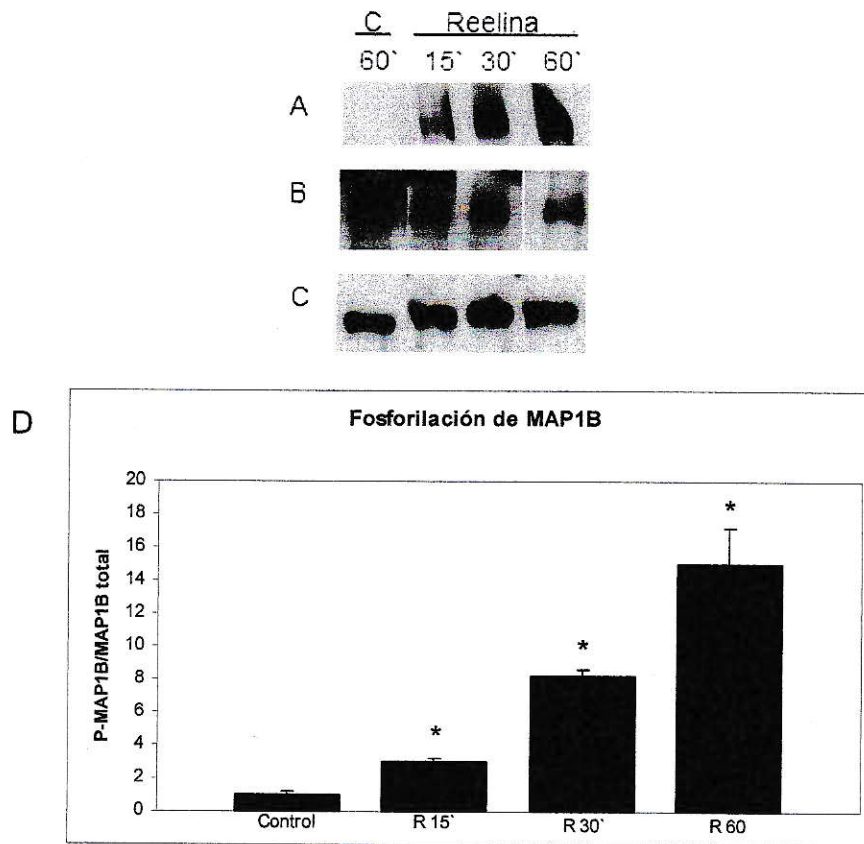


Figura 8. Fosforilación de MAP1B en respuesta al tratamiento con Reelina. En A se detectó la población de la MAP1B fosforilada en modo I, en B a la población total de la MAP1B y en C al marcador neuronal β -III tubulina como control de carga durante diferentes tiempos de estimulación con medio control (C) y enriquecido en Reelina (Reelina). En D se muestra un histograma que grafica la relación MAP1B fosforilada/ MAP1B total obtenida en 3 experimentos independientes. Los datos con diferencias significativas con respecto al control, utilizando la prueba t de Student con $t < 0,05$; se muestran con asteriscos.

Se observa que a tiempos cortos (15 minutos) se induce un aumento en el nivel de fosforilación en modo I de MAP1B, que se incrementa a tiempos mayores de estimulación con el medio condicionado enriquecido en Reelina recombinante.

El peso estimado de la MAP1B, según su migración relativa es de 320 KDa, dato que concuerda con lo descrito en la literatura (*Gonzalez-Billault y col., 2001*). La proteína MAP1B se encuentra por debajo de mDab1 y posiblemente muy río abajo en la cascada de señalización de Reelina, y por lo tanto de esta forma a través del análisis de modificaciones post-traduccionales de dos proteínas, una muy al comienzo y otra hacia el final de la vía de señalización podemos decir que la Reelina recombinante tiene actividad biológica *in vitro*.

Análisis morfométrico de las neuronas tratadas con Reelina

Debido a que el tratamiento con Reelina, induce cambios en proteínas que regulan la estabilidad de microtúbulos como MAP1B, decidimos analizar cual es el efecto de la Reelina sobre la morfología de las neuronas. Para esto se realizaron inmunotinciones contra α -tubulina en cultivos primarios de neuronas estimuladas por 2 horas con medios de células productoras de Reelina y de células control (Figura 9).

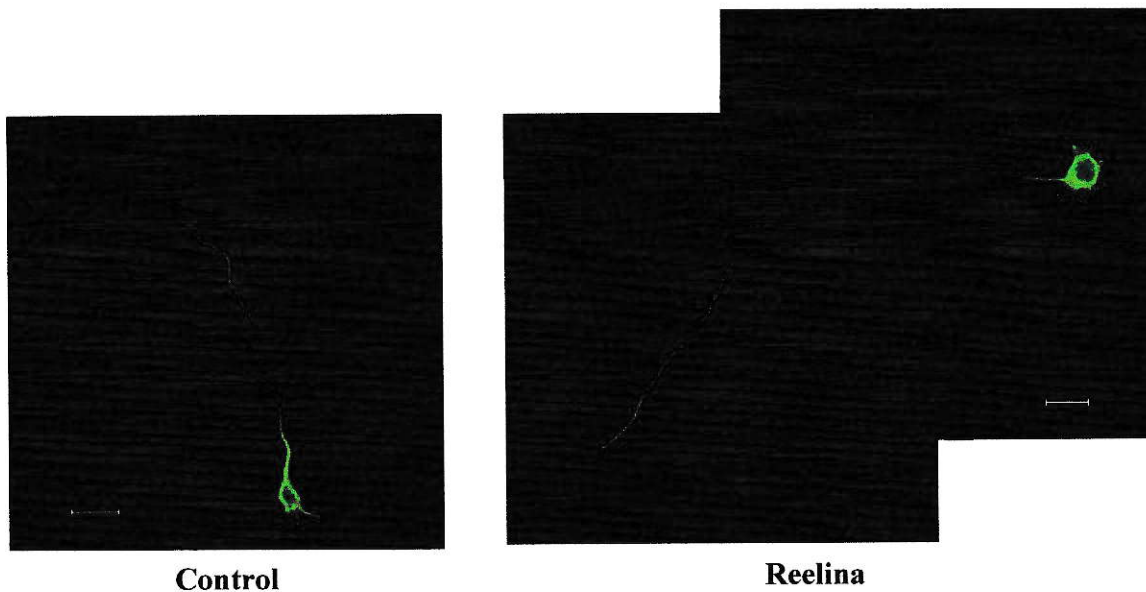


Figura 9. Inmunofluorescencias de cultivos de neuronas corticales estimuladas con Reelina. Se muestran neuronas estimuladas con medio control (Control) y tratadas con el medio enriquecido en Reelina (Reelina) durante 2 horas, teñidas contra α -tubulina en verde y núcleos en azul. Tomadas con un lente objetivo de magnificación 40x. El tamaño de la barra corresponde a 20 μ m.

Posteriormente a través de microscopia confocal analizamos los cambios morfométricos en las neuronas asociados al tratamiento con medio condicionado de Reelina. Encontramos que los cambios más dramáticos tienen relación con la longitud de los axones y el número de ramificaciones primarias de longitud mayor a 50 μ m de éstos, presentes en las neuronas tratadas, por lo que procedimos a cuantificar estos parámetros (Figura 10).

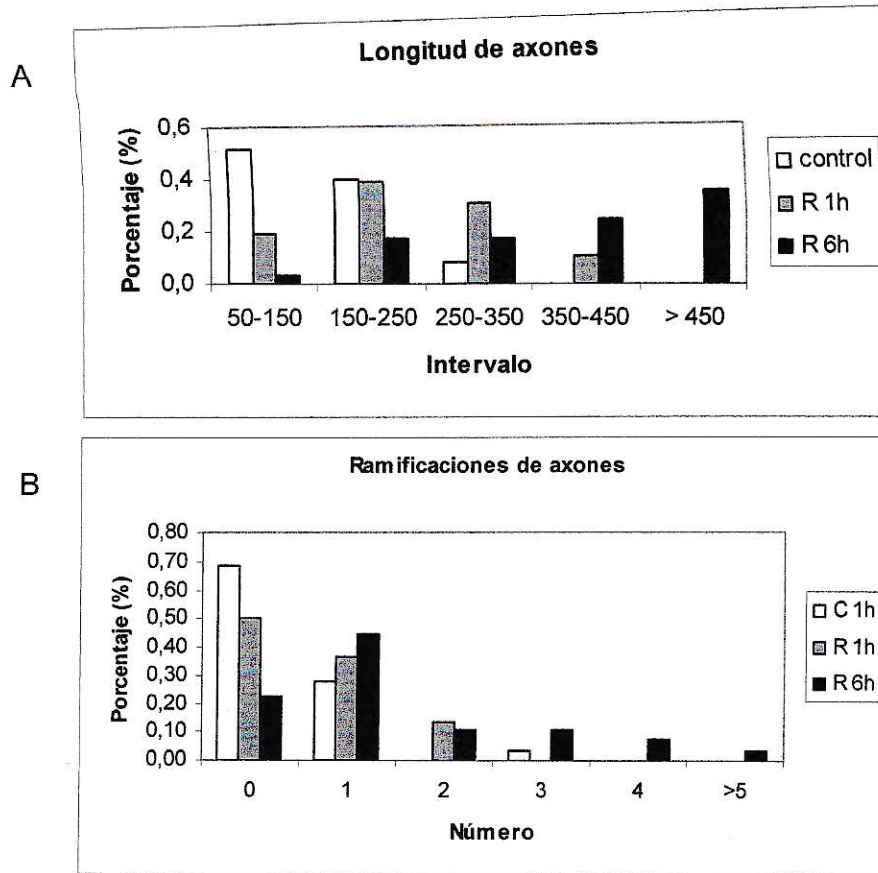


Figura 10. Cambios morfométricos de neuronas tratadas con Reelina. En A se cuantificaron las longitudes de axones de neuronas tratadas por 1 y 6 horas con Reelina y por 6 horas con medio control, así como también las ramificaciones axonales mayores a 50 µm a los mismos intervalos de tiempo en B.

Las neuronas tratadas con Reelina recombinante presentan axones de mayor tamaño y con un mayor número de ramificaciones mayores a 50 µm, en relación a los de neuronas tratadas con medio control. Se cuantificaron dichos parámetros de un total de 113 neuronas tratadas con Reelina y de 60 tratadas con medio control, en al menos tres experimentos independientes. Los valores calculados de longitud media axonal para las neuronas tratadas con Reelina durante 1 y 6 horas son de $255,37 \pm 83,54$ µm y de

385,21±95,02 μm , respectivamente. La longitud axonal media calculada para las neuronas estimuladas con medio control es de 159,13±75,48 μm

Proteínas asociadas al citoesqueleto de actina

Los cambios morfológicos que se verificaron en las neuronas tratadas con Reelina, dan cuenta de cambios estructurales en el citoesqueleto neuronal. Estos cambios no sólo afectarían a los microtúbulos, sino también a los filamentos de actina. La polimerización de actina en todas las células conocidas, está orquestada por una familia de proteínas G monoméricas. Estas proteínas denominadas Rho-GTPasas están involucradas en múltiples funciones celulares, siendo una de ellas, la migración de células epiteliales (*Sastry y col. 2006*). Es por esto que decidimos analizar si la Reelina tiene un efecto sobre la activación de estas GTPasas monoméricas y algunos de sus efectores. Para ello realizamos ensayos de *pull down* para aislar la población activa de las GTPasas e inmunodetecciones del estado de fosforilación de sus efectores LIMK1 y Cofilina.

En primer lugar analizamos la activación de la GTPasa Cdc42. Se determinaron los niveles de Cdc42-GTP (activo) en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón E15-E16 estimuladas con medio enriquecido en Reelina en comparación con los tratamientos con medio control a las cuatro horas de estimulación (Figura 11).

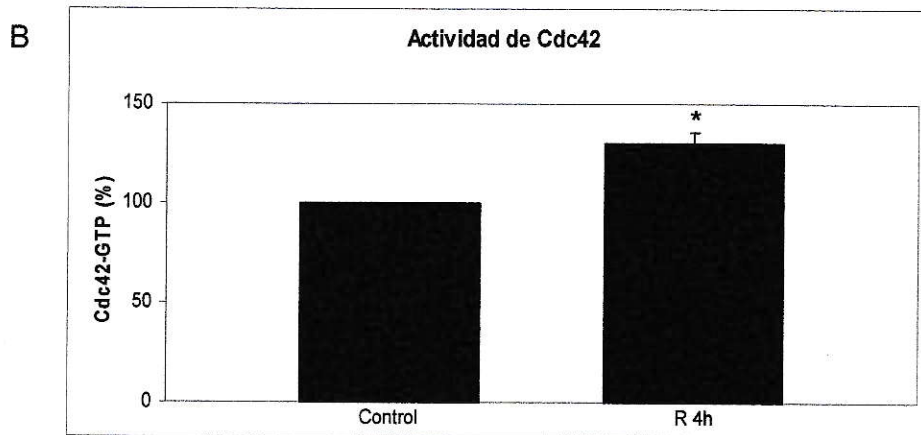
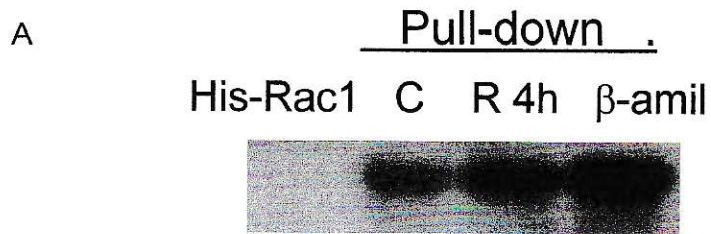


Figura 11. Actividad de Cdc42 en respuesta a Reelina. En A se muestra la inmunodetección de Cdc42. El primer carril corresponde a una proteína de fusión Rac1 con una cola de histidina (His-Rac1); el segundo carril a un extracto de neuronas tratadas con medio control (C); el tercer carril a neuronas tratadas con Reelina recombinante (R) y el cuarto carril a neuronas estimuladas con péptido β -amiloide (β -amil). Todos los tratamientos fueron realizados durante 4 horas. En B podemos apreciar el densitograma correspondiente a la cantidad de proteína activa en condiciones control (Control) y estimulada con Reelina (R 4h). Los valores representan un promedio de experimentos realizados en 3 ocasiones independientes, los asteriscos denotan diferencias significativas utilizando la prueba de significancia t de Student, con $t < 0,05$.

Se observa que la actividad de Cdc42 se ve aumentada en un $34,27 \pm 5,8\%$ al cabo de 4 horas en neuronas tratadas con Reelina recombinante en comparación con neuronas tratadas con medio control. Se utilizó como control negativo para la inmunodetección una proteína recombinante Rac1 con una cola de poli-histidina (Figura 11A, Rac1-His). El peso molecular calculado para Cdc42 concuerda con lo descrito en el kit de activación, que corresponde a 22 KDa. El aumento descrito para la activación de Cdc42 en respuesta a Reelina es significativamente estadístico y fue controlada contrastándola con el aumento en los niveles de activación de Cdc42 inducido en neuronas estimuladas con péptido beta amiloide, que es capaz de inducir la activación de tanto Cdc42 como de Rac1 al cabo de 4 horas (*Mendoza-Naranjo y col., 2007*).

De igual forma se analizó la activación de Rac1, utilizando la misma proteína de fusión que contiene un dominio de activación de Pak1, un efector de Cdc42 y Rac1. Debido a que se ha descrito que una activación de Cdc42 está íntimamente relacionada con un aumento en la actividad de Rac1 (*Luo, 2000*), sería lógico que dado un aumento en la cantidad de Cdc42 activo, seamos capaces de detectar también un aumento en la población de Rac1 activo (Figura 12).

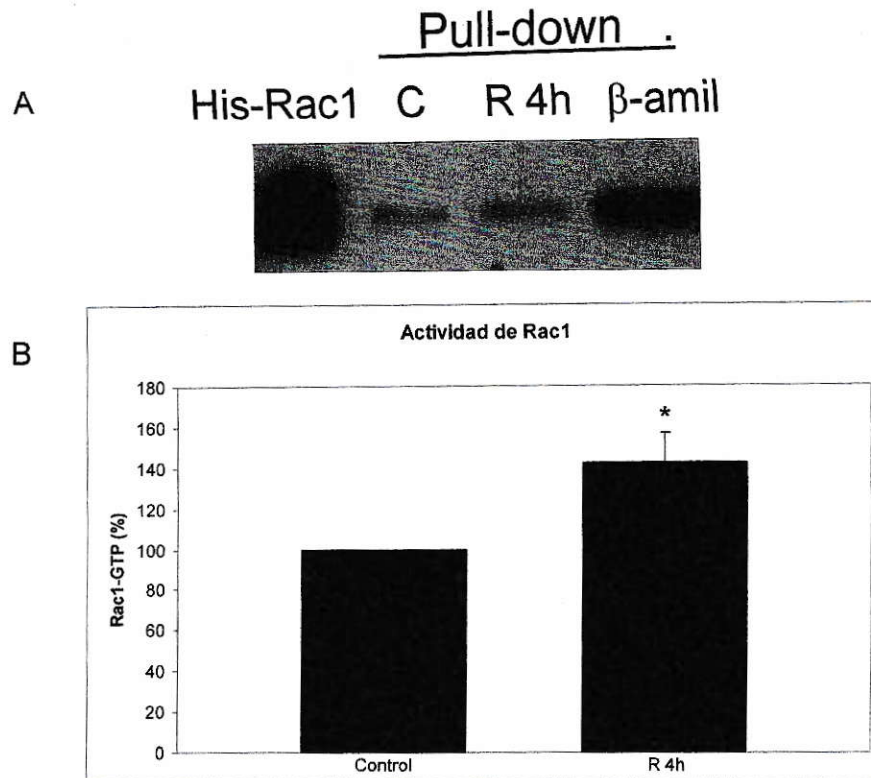


Figura 12. Actividad de Rac1 en respuesta a Reelina. En A se muestra la inmunodetección de Rac1 presente en el precipitado de los ensayos de Pull down. El primer carril corresponde a una proteína de fusión Rac1 con una cola de poli-histidina (His-Rac1) como control positivo para la inmunodetección; el segundo carril a un extracto de neuronas tratadas con medio control (C); el tercer carril a neuronas tratadas con Reelina (R) y el cuarto carril a neuronas estimuladas con péptido β-amiloide (β-amil). En B podemos apreciar el densitograma correspondiente a la cantidad de proteína activa en condiciones control (Control) y estimulada con Reelina durante 4 horas (R4h). Los valores graficados corresponden a 3 experimentos independientes y las diferencias significativas con respecto al control se señalan con asteriscos, se utilizó una prueba de significancia de t de Student con $t < 0,05$.

Efectivamente se detectó un aumento significativo de un $48,38 \pm 12,8\%$ en los niveles de Rac1 activo en el tratamiento con Reelina en relación a la condición control al cabo de cuatro horas. En este caso se utilizó la proteína de fusión Rac1-poli histidina (Figura 12A, His-Rac1) como un control positivo para el ensayo de inmunodetección.

Se calculó un peso molecular relativo de 22 kDa para Rac1, dato que es muy cercano a los 21 kDa descrito en el kit de activación. La activación de ambas GTPasas fue verificada por triplicado.

Finalmente, se analizaron cambios en la actividad del tercer miembro de la familia, la proteína RhoA. Para ello se generó una proteína de fusión GST-RBD (ver materiales y métodos). La producción e integridad de la proteína de fusión fue verificada mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce a la proteína GST (Figura 13)

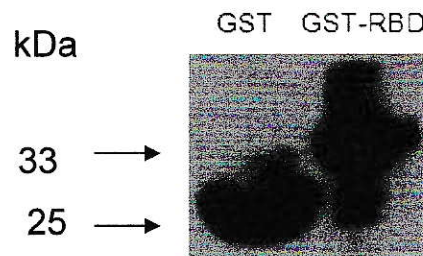


Figura 13. Obtención de la proteína de fusión GST-RBD. Podemos apreciar en el primer carril la señal correspondiente a la proteína GST (GST) y en el segundo carril la señal correspondiente a la proteína de fusión GST-Rhotequina (GST-RBD). Los pesos moleculares calculados para cada proteína se señalan mediante flechas.

Se observa que la proteína de fusión GST-RBD se encuentra más retrasada en su migración en comparación con la proteína GST sola, esto es de esperarse, ya que al tener un fragmento adicional, correspondiente al dominio de unión a RhoA activo (RBD), esta proteína tiene un peso molecular mayor. Los pesos moleculares calculados son de 25 kDa para GST y de 33 kDa para la proteína de fusión GST-RBD, los cuales concuerdan con los valores descritos para estas proteínas.

Se determinó que al cabo de 4 horas de tratamiento con Reelina la actividad de RhoA está disminuida en un $22,43 \pm 2,27\%$ con respecto a la situación control sin Reelina (Figura 14). Si bien esta disminución no es tan dramática como los cambios asociados a Rac1 y Cdc42, es estadísticamente significativa y estaría en línea con los supuestos roles antagónicos que jugarían Rac1/Cdc42 y RhoA, en células neuronales (Luo, 2000).

A

C Reel



B

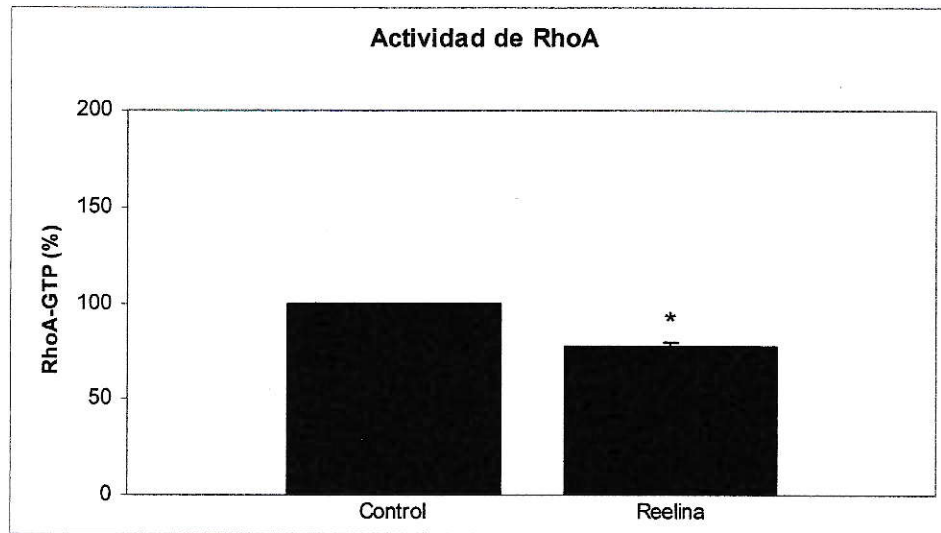


Figura 14. Actividad de RhoA en respuesta a Reelina. En A se cuantificó la cantidad de RhoA activo al cabo de 4 horas de tratamiento con medio control (C) y medio con Reelina (Reel). En B se muestra una densitometría que muestra la cuantificación de la cantidad de RhoA activo en neuronas tratadas con Reelina (Reelina) en relación a la condición control (Control). Los valores graficados corresponden a un promedio de cuatro experimentos independientes. La diferencia significativa utilizando la prueba de significancia t de Student con un $t < 0,05$ se denota con un asterisco.

Actividad de los efectores de las Rho GTPasas

El cambio en la actividad de las GTPasas debe ser transducido intracelularmente a través de proteínas efectoras, que finalmente son las que mediarán los cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina. Es por esto que se evaluó si hay cambios en la actividad de LIMK1 y de Cofilina para determinar si las variaciones en la actividad de las Rho GTPasas descritas anteriormente llevan consigo variaciones en la actividad de proteínas relacionadas directamente con la dinámica de actina en respuesta a Reelina.

LIMK1 es una quinasa de Serina/ Treonina que se activa en respuesta a la activación de Rac1, a través de una proteína quinasa intermediaria llamada Pak1. LIMK1 También es capaz de ser activada por ROCK, la cual es una quinasa dependiente de la actividad de RhoA (Luo, 2000). Por lo tanto podría ser que frente a una activación de Rac1 y una inhibición de RhoA, los niveles de LIMK1 fosforilado se vean alterados.

Se determinó que en respuesta a los tratamientos con Reelina hay una disminución en los niveles de LIMK1 fosforilada (Figura 15).

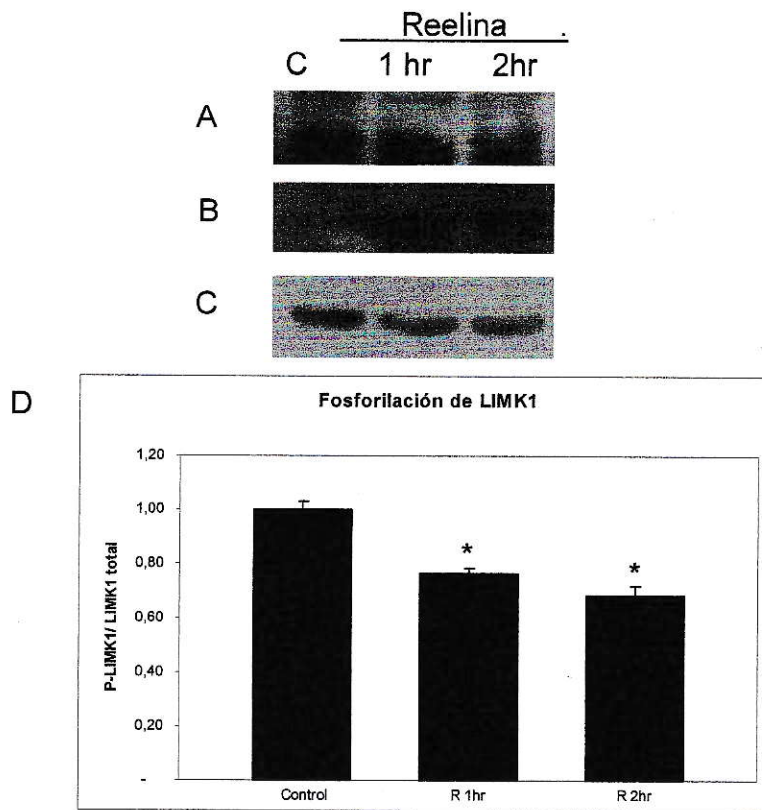


Figura 15. Inmunodetección de LIMK1 fosforilada. En A se aprecia la población de LIMK1 fosforilada, en B se encuentra la cantidad total de LIMK1 y en C el control de carga β -III tubulina presentes en cultivos primarios a 1 (1 hr) y 2 horas (2 hr) de estimulación con Reelina (Reelina) y 2 horas de tratamiento con medio control (C). En D se encuentra la densitometría correspondiente a la razón LIMK1 fosforilada/ LIMK1 total. Las diferencias significativas utilizando la prueba de t de Student con $t < 0,05$ con respecto a la situación control se denotan con asteriscos. Los valores corresponden a 3 experimentos realizados en ocasiones independientes.

En la figura 15 se observa que los niveles de LIMK1 fosforilado disminuyen significativamente al cabo de 1 y 2 horas de tratamiento con Reelina.

El cambio en la actividad de LIMK1 después del tratamiento con Reelina, debería implicar un cambio en el estado de fosforilación de la proteína de unión actina, Cofilina. Por lo tanto, el siguiente paso fue analizar que ocurre con la fosforilación de Cofilina en respuesta al tratamiento con Reelina, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo fosforilado en la proteína Cofilina, que da cuenta de su actividad. Los resultados muestran que los niveles de Cofilina fosforilada están disminuidos significativamente al cabo de 2 horas de estimulación con Reelina (Figura 16).

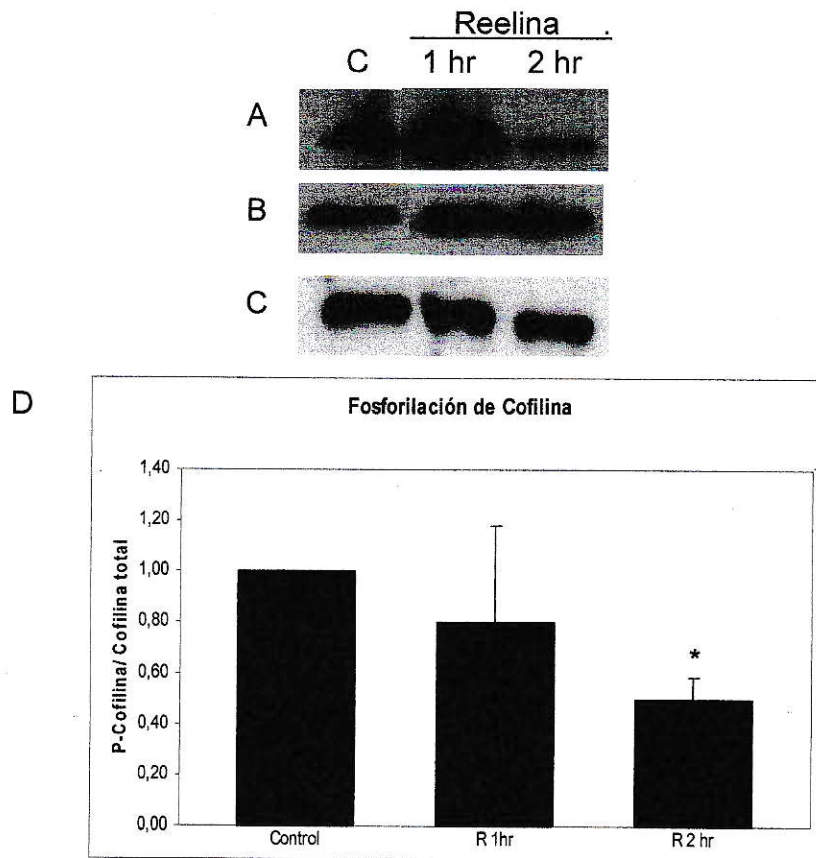


Figura 16. Inmunodetección de Cofilina fosforilada. En A se detectó a la población de Cofilina fosforilada, en B a la población total de Cofilina y en C a β -III tubulina como control de carga. En cultivos primarios a 1 (1 hr) y 2 horas (2 hr) de estimulación con Reelina (Reelina) y 2 horas de tratamiento con medio control (C). En D se aprecia la densitometría correspondiente a la razón Cofilina fosforilada/ Cofilina total. Las diferencias significativas utilizando la prueba t de Student con $t < 0,05$ en relación a la situación control se denotan con asteriscos.

Las determinaciones del estado de fosforilación tanto de LIMK1 como de Cofilina fueron realizadas en tres ocasiones independientes.

Un aspecto inesperado en los resultados obtenidos fue la inconsistencia entre la activación de Rac1 y la posterior disminución en la actividad de LIMK1 y fosforilación

de Cofilina. Una posible explicación para esto es que se ha descrito que el complejo Rac1/ Pak1 puede ser fosforilado por la enzima Cdk5, induciendo una inactivación de Pak1. Cdk5 es una quinasa de Serina/ Treonina cuyo papel en la migración neuronal dependiente de Reelina ya ha sido documentado previamente (*Gupta y Tsai, 2003*). Por lo tanto, para evaluar si la enzima Cdk5 podría estar modulando la vía de señalización a nivel del complejo Rac1/Pak1, se analizaron posibles variaciones en la cantidad del activador de Cdk5, p35, en respuesta al tratamiento con Reelina. Efectivamente, se observa un aumento en los niveles de p35 de un $311,79 \pm 45,61\%$ en los extractos proteicos de neuronas tratadas con Reelina durante de 1 hora (Figura 17).

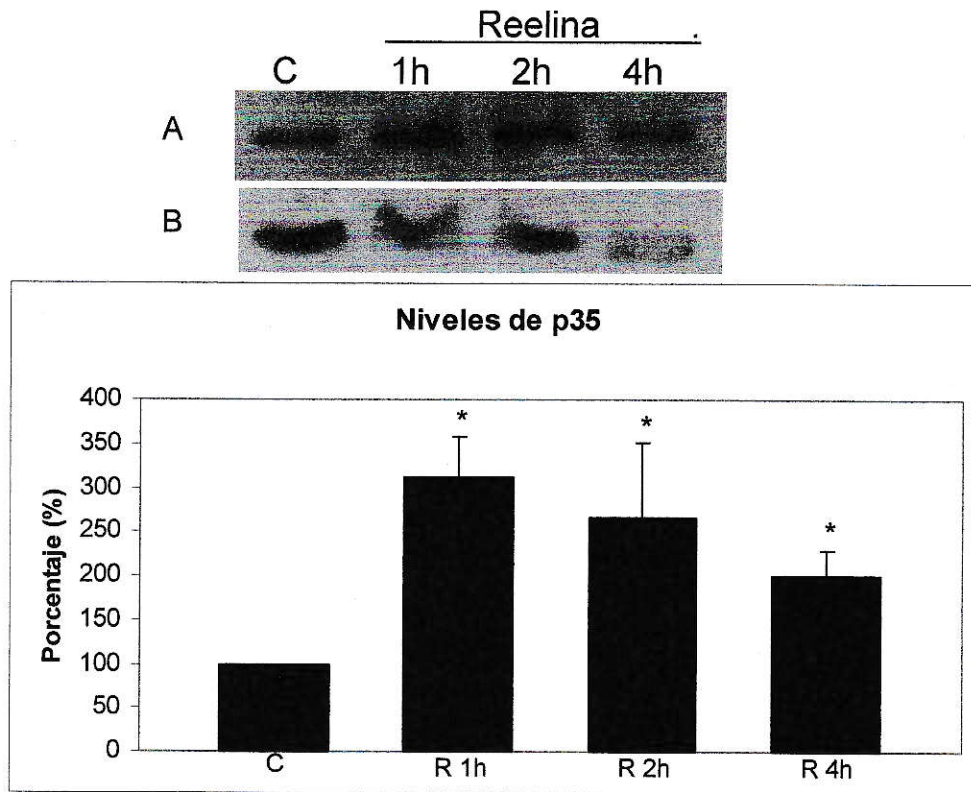


Figura 17. Niveles de P35 en neuronas tratadas con Reelina. En A se muestra una inmunodetección de p35 y en B los niveles de α -tubulina total presentes en extractos de neuronas tratadas con Reelina luego de 1 (1h), 2 (2h) y 3 (3h) horas y durante 4 horas con medio control (C). En C se grafican los datos obtenidos en 3 episodios independientes. Los valores que tienen diferencias significativas utilizando la prueba de t de Student con $t < 0,05$ con respecto al control se denotan con asteriscos.

Debido a que la actividad de la enzima Cdk5 es dependiente de los niveles disponibles de p35, parece razonable pensar que la enzima estaría sobre-activada en respuesta a Reelina. Adicionalmente, ha sido descrito que la Reelina induce un aumento en los niveles del factor de transcripción Egr-1, el que se sabe es capaz de comandar la expresión de p35 (Simó y col., 2006). De esta forma se sugiere un control indirecto de

la vía a través de la mayor síntesis de p35, y consistentemente con esto se esperaría una mayor actividad de Cdk5. La mayor actividad de Cdk5, en consecuencia podría hiperfosforilar a Pak1, reduciendo la actividad de LIMK1 y aumentando la de Cofilina, a pesar del incremento en la cantidad de Rac1 activo.

Proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la Reelina es capaz de modificar proteínas que son relevantes para dinámica del citoesqueleto de actina. La acción concertada de proteínas asociadas a microtúbulos y reguladores de la dinámica de actina, sería indispensable para permitir los cambios necesarios para la migración neuronal (*Rivas y Hatten, 1995*). La polimerización de microtúbulos y filamentos de actina están íntimamente relacionadas y existen numerosas moléculas que han sido propuestas para actuar como bisagras entre ambos compartimientos. Por lo tanto en nuestro siguiente set de experimentos nos enfocamos en analizar la participación de una proteína quinasa que podría cumplir dicho papel.

Uno de los aspectos interesantes de ser estudiados es la posible participación de la quinasa JNK1, la cual podría ser dependiente de la activación de Rac1 (*Kawauchi y col., 2003*). Se determinó si la proteína JNK1 es activada en neuronas estimuladas con el medio condicionado enriquecido en Reelina recombinante. Para esto se realizaron tratamientos con medio enriquecido en Reelina y medio control a diferentes tiempos, y posteriormente se analizó el estado de fosforilación en la treonina 183/ tirosina 185 de la quinasa JNK1, un indicador de su activación. Además, se evaluaron cambios en su patrón de fosforilación en presencia del inhibidor farmacológico SP600125, específico para las proteínas quinasas MKK4 y MKK7 que se encuentran río arriba de JNK1 y que podrían ser responsables de la activación de JNK1 en respuesta a Reelina (Figura 18).

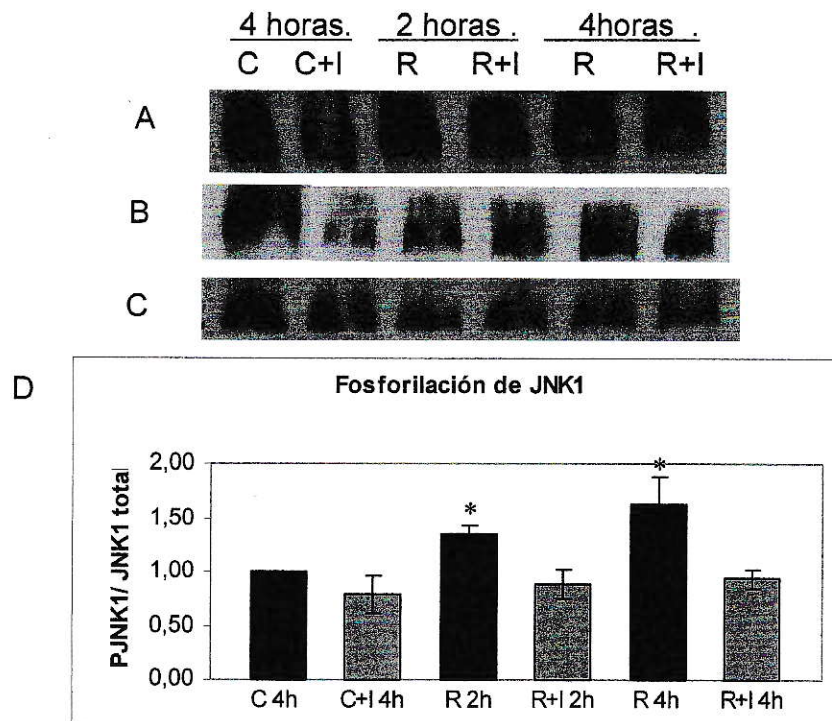


Figura 18. Actividad de JNK1 en respuesta a Reelina y en presencia del inhibidor farmacológico SP600125. En A se detectó la población de JNK1 activa, en B se muestra a la población total de JNK1 y en C los niveles de α -tubulina en neuronas expuestas a medio control durante 4 horas (C 4h), medio enriquecido en Reelina durante 2 y 4 horas (R2h y R4h, respectivamente), en medio control en presencia del inhibidor a las 4 horas (C+I 4h) y en medio enriquecido en Reelina en presencia del inhibidor a las 2 y 4 horas de tratamiento (R+I 2h y R+I 4h, respectivamente). En D se grafica la relación JNK1 fosforilada/ JNK1 total en relación a la situación control (C 4h), estandarizados con relación a la cantidad de α -tubulina detectada para cada caso mediante datos densitométricos de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas utilizando el test t de Student, con $t < 0,05$ con respecto al control se muestran con asteriscos.

Al cabo de 2 y 4 horas se percibe un aumento en los niveles de JNK1 activa en los extractos proteicos de neuronas tratadas con Reelina en comparación con las neuronas tratadas con el medio control. Sin embargo, al tratar las neuronas con medio control ó Reelina en presencia del inhibidor de los activadores de JNK1 se aprecia que no hay variaciones significativas en los niveles de JNK1 fosforilada ó activa.

Este resultado sugiere que el tratamiento con Reelina puede inducir la activación de JNK1 en cultivos primarios de neuronas corticales. Debido a que JNK1 es una de las enzimas que podría fosforilar a la MAP1B durante el desarrollo del sistema nervioso, el siguiente paso fue analizar que ocurre con la fosforilación de MAP1B inducida por Reelina, en presencia y ausencia del inhibidor para las quinasas de JNK1 (Figura 19).

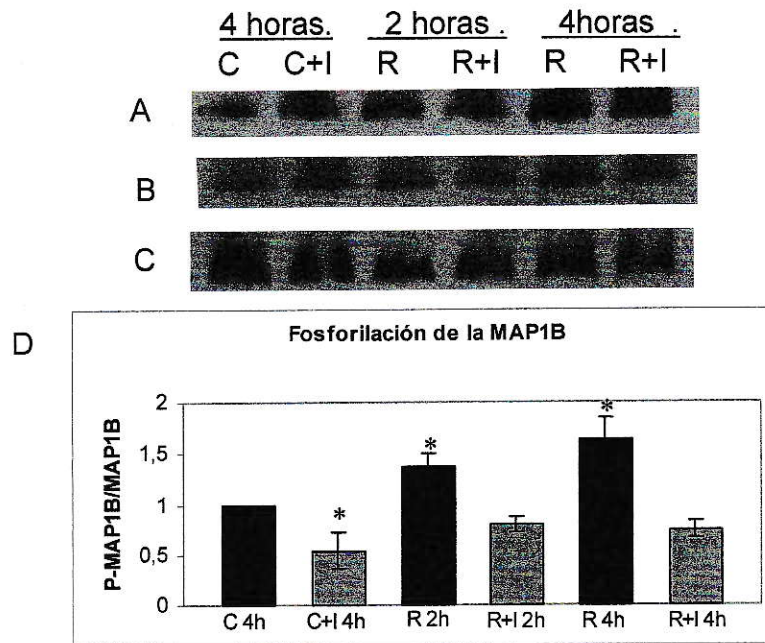


Figura 19. Fosforilación de la MAP1B en respuesta a Reelina y en presencia del inhibidor farmacológico SP600125. En A se detectó la población de la MAP1B fosforilada en modo I, en B se muestra a la población total de la MAP1B y en C a la α -tubulina como control de carga presentes en extractos de neuronas expuestas a medio control durante 4 horas (C 4h), a medio enriquecido en Reelina por 2 y 4 horas (R 2h y R 4h, respectivamente), a medio control en presencia del inhibidor durante 4 horas (C+I 4h) y a medio enriquecido en Reelina en presencia del inhibidor por 2 y 4 horas (R+I 2h y R+I 4h, respectivamente). En D se grafica la relación MAP1B fosforilada/ MAP1B total normalizada en relación al valor de la situación control (C 4h) mediante datos densitométricos de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas, utilizando la prueba de t de Student con $t < 0,05$ se muestran con asteriscos.

Se observa que la Reelina induce un aumento en la fosforilación en modo I de la MAP1B y que este aumento es bloqueado por el inhibidor para MKK4 y MKK7. Es más, al tratar las neuronas con los medios control y con Reelina en presencia del inhibidor de los activadores de JNK1 es posible apreciar una disminución en los niveles de MAP1B fosforilada que son parecidos a la disminución que sufre la activación de JNK1 en presencia del fármaco a los mismos intervalos de tiempo. En conjunto estos resultados sugieren que JNK se activa en respuesta a Reelina, y que su fosforilación sería dependiente de las quinasas MKK4 y MKK7.

Los cambios asociados a la fosforilación en modo I de la MAP1B han sido vinculados con cambios en el grado de tirosinación-destirosinación que sufre la alfa tubulina (*Gonzalez-Billault y col., 2001; Gonzalez-Billault y col., 2002*). Esta modificación post-traducciona es un marcador para poblaciones de microtúbulos dinámicos y estables en las células (*Kreis, 1987*). Por lo tanto, se determinó si el aumento observado en los niveles de fosforilación en modo I de la MAP1B va acompañado de un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados, indicando una mayor dinámica de los microtúbulos. Para probar esto, se realizaron inmunodetecciones de la población de alfa tubulina tirosinada y total (Figura 20).

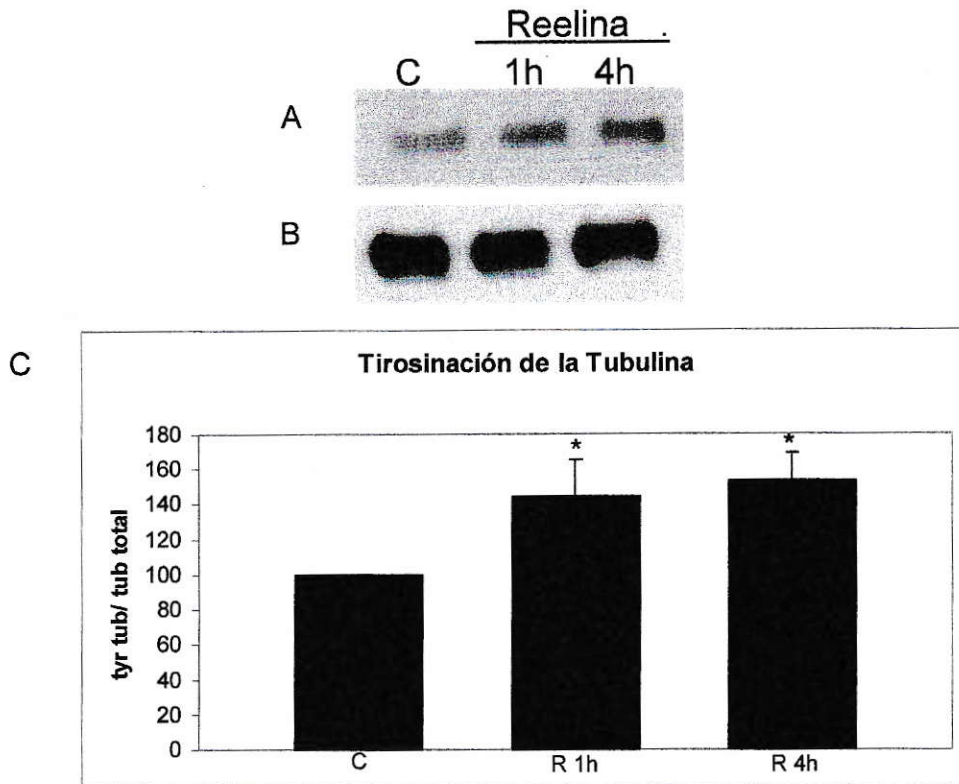


Figura 20. Contenido de α -tubulina tirosinada. En A se muestra la inmunodetección de la α -tubulina tirosinada y en B la población total de α -tubulina en neuronas tratadas por 1 (1h) y 4 horas (4h) con Reelina (Reelina) y con medio control durante 4 horas (C). En C se encuentran graficadas las relaciones de la α -tubulina tirosinada/ total en los diferentes tratamientos señalados en tres ocasiones independientes. Los valores con diferencias significativas en relación al control, utilizando la prueba t de Student con un $t < 0,05$ se denotan con asteriscos.

Se aprecia que la cantidad de alfa tubulina tirosinada en los tratamientos con Reelina luego de una hora aumenta en un $44,23 \pm 20,84\%$ y luego de 4 horas en un $53,19 \pm 15,99\%$. Demostrando que los cambios en la actividad de proteínas quinasas como JNK1, se asocian con cambios en la fosforilación de MAP1B, y éstos, con los niveles de microtúbulos tirosinados.

En su conjunto los resultados obtenidos en esta Tesis vinculan la vía de señalización de Reelina con el control de un conjunto de proteínas que regularían las propiedades dinámicas tanto de microtúbulos como de filamentos de actina. Por lo tanto, hemos descrito que cambios morfométricos de las neuronas estimuladas, se correlacionan con cambios en los patrones de activación de proteínas relacionadas con la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos en cultivos primarios de neuronas corticales tratadas con Reelina recombinante.

DISCUSIÓN

La migración coordinada de las neuronas es un paso clave para la formación de una arquitectura funcional en el cerebro de mamíferos. Esta migración es regulada por señales extracelulares y una pleyade de proteínas intracelulares, necesarias para permitir el movimiento de una neurona durante el desarrollo del sistema nervioso.

Para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen el proceso de migración radial de las neuronas durante la formación de la corteza cerebral, se han realizado diferentes aproximaciones desde el uso de genética molecular, a sofisticados procesos de inactivación específica de proteínas presentes en las neuronas corticales. Es así que a través de electroporaciones *in útero* de dominantes negativos de Rac1, y sus activadores STEF/Tiam1, se verificó que la supresión de la actividad de Rac1 ó STEF/Tiam1 causó una pérdida de la extensión citoplasmática hacia el frente de migración, y consecuentemente un arresto en la migración de las neuronas corticales. Adicionalmente, se observaron cambios en los niveles de JNK1 fosforilado lo que sugiere que JNK1 sería una molécula involucrada río abajo en la vía de transducción de señales que involucra a Rac1. La supresión de JNK1 no tuvo efecto sobre la formación del proceso adelantado, sino que las neuronas presentaban una morfología irregular y un aumento en la cantidad de microtúbulos estables (destirosinados) en los procesos, junto con una disminución en los niveles de fosforilación de la MAP1B, arrojando un posible rol para JNK1 en el control de la dinámica de microtúbulos en neuronas que se

encuentran migrando (*Kawauchi y col., 2003*). Todos estos antecedentes y el hallazgo de que en respuesta a Reelina se lleva a cabo un aumento en la actividad de Rac1 y de JNK1, sugieren que la actividad de estas proteínas y su acción coordinada estaría íntimamente relacionada con el proceso de migración neuronal radial y el correcto establecimiento de las neuronas en una capa determinada de la corteza cerebral.

En cuanto a los efectores descritos para las Rho GTPasas, se ha descrito que Cofilina puede tener diferentes grados de actividad en diferentes partes de la célula, dependiendo si se requiere una mayor o menor dinámica del citoesqueleto de actina. Al hacer el extracto total de proteínas se observa a la población total de Cofilina y su actividad como un promedio, lo que no discrimina diferentes grados de actividad locales en distintos lugares de la neurona (*Yang y col., 1998; Arber y col., 1998*). Es por esto que sería interesante evaluar cambios locales en el estado de activación tanto de Cofilina como de LIMK1.

Se ha demostrado que la activación de Erk1/2 induce la expresión de p35, un activador específico de Cdk5, a través de la estimulación de la expresión del factor de transcripción Egr-1 (*Harada y col., 2001*). Por lo que es lógico pensar que, ya que está descrito que en respuesta a Reelina se lleva a cabo una activación de Erk1/2 y la expresión de Egr-1 (*Simó y col., 2007*), esto lleve consigo un aumento en los niveles de p35. Efectivamente, aquí se describe un aumento en los niveles de p35 en respuesta a Reelina, lo que podría dar cuenta de una mayor actividad de Cdk5 y daría como resultado una disminución de la actividad de Pak1. Así como también una disminución

en la actividad de ROCK, debido a la inhibición de RhoA a través de un aumento en los niveles de p27^{kip}. Todo esto explicaría una disminución en los niveles de actividad de LIMK1 y por consiguiente, un aumento en la actividad de Cofilina. Sin embargo, es necesario cuantificar directamente si se está llevando a cabo un aumento en la actividad de Cdk5 en respuesta a Reelina.

Animales mutantes tanto para MKK4 como para MKK7 (quinasas encargadas de la activación de JNK) mueren antes de nacer, por lo que se excluye una función redundante entre ambas quinasas. Además la distribución subcelular de estas quinasas es diferencial dentro de las células, MKK7 se encuentra principalmente en el núcleo y MKK4 se distribuye en el cuerpo, dendritas y axones de las neuronas. Por lo que se piensa que MKK4 sería la quinasa encargada de modular la actividad de JNK en las neuritas de las neuronas, donde podría ejercer su función sobre proteínas asociadas a microtúbulos. Siguiendo con esta idea se ha generado recientemente un mutante condicional y cerebro-específico para la quinasa MKK4, en el cual se aprecia una disminución en la expresión de MKK4, en la actividad de JNK y en la fosforilación en modo I de la MAP1B, junto con un retraso en la migración de las neuronas corticales (Wang y col., 2007). Todo esto nos da un indicio de que el proceso de migración radial dependiente de Reelina estaría siendo afectado.

El aumento en la actividad de JNK1 y en la fosforilación en modo I de la MAP1B en respuesta a Reelina, junto con la inhibición de estos procesos observada en presencia del inhibidor farmacológico de las quinasas MKK4 y MKK7 nos genera dos escenarios posibles; uno es que JNK1 pueda ser capaz de fosforilar directamente a la MAP1B ó

bien, que la MAP1B es fosforilada por otra quinasa cuya actividad depende de JNK1. Sería interesante dilucidar este aspecto para generar una idea mas completa de lo que sucede con el citoesqueleto de microtúbulos de neuronas que son capaces de responder a Reelina.

Se ha descrito que un aumento en la actividad de RhoA tiene relación con un colapso de las neuritas ó neuritas de menor tamaño y que en neuronas transfectadas con una forma no fosforilable de Cofilina se favorece el crecimiento de las neuritas (*Luo, 2000; Billuart y col., 2001*), esto concuerda con que el tratamiento con Reelina tiene como resultado una disminución de la actividad de RhoA y en la fosforilación tanto de LIMK1 como de Cofilina, con un consiguiente aumento en la longitud de los axones.

Tratamientos de cultivos de neuronas con citocalasina B, un agente despolimerizador de filamentos de actina, inducen un arresto en la migración de las células, esto sugiere que el ensamblaje/ desensamblaje de los microfilamentos de actina es un evento importante durante la migración neuronal. A su vez, los microtúbulos presentes en el proceso adelantado podrían servir para orientar el movimiento hacia una dirección dada (*Rivas y Hatten, 1995*). En un trabajo previo, luego de fijar las células que se encontraban migrando se evaluó su morfología y se reportó acerca de la presencia de una interacción especializada entre la glía radial y la neurona caracterizada por involucrar elementos del citoesqueleto, que se encontraba ausente en células en reposo (*Gregory y col., 1988*). La proximidad observada durante la interacción entre estos dos

tipos celulares sugiere que componentes de la superficie celular y del citoesqueleto están involucrados en el proceso de migración neuronal (*Hatten, 1999*).

Todo lo antes mencionado concuerda con la idea de que se requieren cambios globales en el citoesqueleto neuronal a través de modulaciones de la actividad de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y de proteínas pertenecientes a las Rho GTPasas, eventos que tienen como resultado cambios en la morfología neuronal, mediante la modulación de los procesos de elongación y ramificación axonal (*Rivas y Hatten, 1995*).

Existen diversas enfermedades neurológicas relacionadas con fallas en los mecanismos involucrados en el correcto establecimiento de las capas que componen las regiones laminadas del cerebro y con mutaciones en el gen que codifica para Reelina, como son el autismo, esquizofrenia, desórdenes bipolares, lisencefalia (del latín, cerebro liso; en esta enfermedad se ve una disminución de los surcos cerebrales), heterotropía periventricular, etc (*Costa y col., 2002; Fatemi, 2001; Hong y col., 2000; Parrini y col., 2006*). Por lo que es interesante estudiar los mecanismos moleculares que gobiernan el proceso de migración neuronal durante la formación de las regiones laminadas del SNC.

CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvo Reelina recombinante a partir de células HEK 293T transfectadas establemente con un plásmido que codifica para el cDNA de Reelina. Se recolectó y concentró el medio condicionado de células productoras de Reelina y de células sin transfectar que se utilizó como control. Por otro lado, se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales de ratón embrionario en estadio E15-16 de desarrollo, los que fueron estimulados con los medios condicionados concentrados.
- 2.- La Reelina producida es activa *in vitro*, ya que bajo estas condiciones es capaz de inducir cambios en los patrones de fosforilación de proteínas que participan en su vía de señalización como mDab1 y MAP1B.
- 3.- En neuronas tratadas con Reelina se observa un aumento en la longitud de los axones y en la cantidad de ramificaciones primarias de éstos. Además la magnitud de dichos cambios depende del tiempo de estimulación.

4.- La Reelina recombinante producida modula positivamente la actividad de Cdc42 y de Rac1, mientras que inhibe a RhoA. Además, la Reelina induce un aumento en los niveles de p35, activador específico de Cdk5. Estos resultados, junto con los que tienen relación con una disminución en la fosforilación de efectores de las RhoGTPasas, LIMK1 y Cofilina, nos indican que Reelina tiene un efecto sobre la dinámica del citoesqueleto de actina.

5.- El aumento en la actividad de JNK1 y de la MAP1B, así como la disminución en la fosforilación de estas proteínas después de los tratamientos en conjunto con un inhibidor de las quinasas encargadas de la activación de JNK1, sugieren que la Reelina induce la activación de JNK1 y que esta quinasa es la responsable de la fosforilación de la MAP1B en respuesta a Reelina. Además, se detectó un aumento en el contenido de α -tubulina tirosinada, lo que da cuenta de un aumento en la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos.

Los antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo indican que durante el proceso de migración neuronal radial dependiente de Reelina se requiere una modulación del citoesqueleto de tubulina y de actina, así como también de sus proteínas asociadas para controlar los cambios necesarios en la morfología neuronal durante la formación de la corteza cerebral en vertebrados.

BIBLIOGRAFIA

Álvarez, A., Muñoz, J.P. and Maccioni R.B. (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp. Cell Res.* **264(2)**: 266-74.

Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8(3)**: 194-205.

Anton, E.S., Kreidberg, J.A. and Rakic, P. (1999) Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* **22**: 277-89.

Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. And Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**: 805-809.

Argarana, C.E., Barra, H.S. and Caputto, R. (1980) Tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *J. Neurochem.* **34(1)**: 114-8.

Ballif, B. A., Arnaud, L. And Cooper, J. A. (2003) Tyrosine phosphorylation of disabled-1 is essential for Reelin-stimulated activation of Akt and Src family kinases. *Molecular Brain Res.* **117**: 152-159.

Banker, G. A. and Cowan, W. M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* **126(3)**: 397-442.

Benhayon, D., Magdaleno, S. And Curran, T. (2003) Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Molecular Brain Res.* **112**: 33-45

Bernard, V., Bohl, B.P. and Bokoch, G.M. (1999) Characterization of Rac and Cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* **274**: 13198-13204.

Bielas, S., Higginbotham, H., Koizumi, H., Tanaka, T. And Gleeson J.G. (2004) Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 593-618.

Billuart, P., Winter, C. G., Maresh, A., Zhao, X. and Luo L. (2001) Regulating Axon Branch Stability: The Role of p190 RhoGAP in Repressing a Retraction Signaling Pathway. *Cell* **107**: 195-207.

Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (1985) Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *PNAS* **82**: 5404-5408.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Chae, T., Kwon, Y.T., Bronson, R., Diques, P., Li, E. and Tsai, L.H. (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* **18**: 29-42

Cheng, A., Krueger, B.K. and Bambrick L.L. (1999) MAP5 expression in proliferating neuroblasts. *Dev. Brain Res.* **113**: 107-113.

Costa, E., Chen, Y., Davis, J., Dong, E., Noh, J. S., Tremolizzo, L., Veldic, M., Grayson, D. R. and Guidotti, A. (2002) Reelin and Schizophrenia: A disease at the interface of the genome and the epigenome. *Molecular Interventions* **2(1)**: 47-57.

D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I. and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* **374**: 719-723.

D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. and Curran, T. (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci.* **17**: 23-31.

D'Arcangelo, G. and Curran, T. (1998) Reeler: new tales on an old mutant mouse. *Bioessays* **20**: 235-244.

Del Rio, J.A., Gonzalez-Billault, C., Urena, J.M., Jimenez, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., La Torre, A., Wandosell, F., Avila, J. and Soriano, E. (2004) MAP1B is required for netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance, *Curr. Biol.* **14**: 840-850.

Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. and Anton, E. S. (2000) Reelin binds $\alpha 3\beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**: 33-44.

- Fatemi, S. H. (2001) Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. *Molecular Psychiatry* **6**: 129-133.
- Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D. And Reiner, O. (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *The EMBO Journal* **23**: 823-832.
- Gilmore, C. and Herrup, K. (2000) Cortical development: Receiving Reelin. *Current Biology* **10**: 162-166.
- Gonzalez-Billault, C., Demandt, E., Wandosell, F., Torres, M., Bonaldo, P., Stoykova, A., Chowdhury, K., Gruss, P., Avila, J. and Sanchez, M.P. (2000) Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol. Cell Neurosci.* **16**: 408-421.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J. and Caceres, A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 2087-2098.
- Gonzalez-Billault, C., Owen, R., Gordon-Weeks, P.R. and Avila, J. (2002) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res.* **943**: 56-67.
- Gonzalez-Billault, C., Jiménez-Mateos E, Cáceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2004) Microtubule-Associated Protein 1B Function during Normal Development, Regeneration, and Pathological Conditions in the Nervous System. *J. Neurobiol.* **58**: 48-59.
- Gonzalez-Billault, C., Del Rio, J.A., Urena, J.M., Jiménez-Mateos, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., Torre, A.L., Gavin, R., Wandosell, F., Soriano, E. and Avila, J. (2005) A role of MAP1B in Reelin-dependent Neuronal Migration. *Cereb. Cortex*
- Goold, R.G., Owen, R. and Gordon-Weeks, P.R. (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J. Cell Sci.* **112**: 3373-3384.
- Gordon-Weeks, P.R. and Fischer, I. (2000) MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc. Res. Technol.* **48**: 63-74.
- Gungabissoon, R. and Bamberg, J. (2003) Regulation of growth cone dynamics by ADF/Cofilin. *J. Histochem. Cytochem.* **51** (4): 411-420.
- Gupta, A., Tsai, L.H. and Wynshaw-Boris, A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature reviews* **3**: 342-355.

- Gupta, A. and Tsai, L.H. (2003) Cyclin-dependent kinase 5 and neuronal migration in the neocortex. *Neurosignals* **12**: 173-179.
- Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S. and Nishida, E. (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr-1. *Nature Cell Biol.* **3**: 453-459.
- Hatten, M.E. (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 551-539.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J O'B., Martin, N. D. T. and Walsh, C. A. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics* **26**: 93-96
- Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P. And Cooper, J.A. (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**: 733-737.
- Howell, B.W., Herrick, T.M. and Cooper, J.A. (1999) Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled1 during neuronal positioning. *Genes & development* **13**: 643-648.
- Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D. and Cloutier, J.F. (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**: 509-563
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. And Hoshino, M. (2003) The in vivo roles of STEM/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *Embo. J.* **22**: 4190-4201.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nishimura, Y., Nabeshima, Y. and Hoshino, N. (2005) MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* **331**: 50-55.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. and Hoshino (2006) Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27^{kip} contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biology* **8 (1)**: 17-26.
- Keshvara, L., Benhayon, D., Magdaleno, S. and Curran, T. (2001) Identification of Reelin-induced sites of tyrosil phosphorylation on disabled 1. *J. Biol. Chem.* **276**: 16008-16014.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E. And Tsai, L.H. (2001) p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* **21**: 6758-6771.

- Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M. and Yagi, T. (1998) Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron*, **20**: 1137-1151.
- Kreis E (1987) Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *Embo J.* **9**: 2597-2606,
- Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature, Neuroscience* **1**: 173-180.
- Mackay, D. and Hall, A. (1998) Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **273 (33)**: 20685-88.
- Marin, O. And Rubenstein, J.L. (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**: 441-483.
- Mendoza-Naranjo, A., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R.B. (2007) A beta 1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases. *J. Cell Sci.* **120**: 279-88.
- Meyer, D., Liu, A. and Margolis, B. (1999) Interaction of c-Jun amino terminal kinase interacting protein-1 with p190 rhoGEF and its localization in differentiated neurons. *J. Biol.Chem.* **274**: 35113-35118.
- Meixner A, Haverkamp S, Wassle H, Fuhrer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner R, Lassmann H, Wiche G, Propst F (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**: 1169-1178
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O.L. and Pearlman, A.L. (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience* **4 (2)**: 143-150.
- Nadarajah, B. and Parnavelas J.G. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature* **3**: 423-432.
- Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J. and Tsai, L.H. (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* **395**: 194-198.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C., Sheldon, M. and D'Arcangelo, G. (2004) Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* **41**: 71-84.

- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seine, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. and Mikoshiba, K. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* **14**: 899-912.
- Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martio, L.J. and Kulkarni, A.B. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 11173-11178.
- Olson, E.C., Kim, S. And Walsh C.A. (2006) Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J. Neurosci.* **26 (6)**: 1767-1775.
- Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W. B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E.H., Dalla Bernardina, B., Goodwin, L., Bodell, A., Jones, M. C., Nangeroni, M., Palmeri, S., Said, E., Sander, J. W., Striano, P., Takahashi, Y., Van Maldergem, L., Leonardi, G., Wright, M., Walsh, C. A. and Guerrini, R. (2006) Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain Advance* 1-15.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 545-576
- Rice, D.S. and Curran, T. (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 1005-1039.
- Rivas, R.J. and Hatten M.E. (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **15 (2)**: 981-989.
- Rivas, R.J. and Hatten, M.E. (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **15 (2)**: 981-89.
- Santos Da Silva, J., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W. and Dotti, C. (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* **162 (7)**: 1267-1279.
- Sastry, S.K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J., Tremblay, M. and Burrridge, K. (2006) PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* **281**: 11627-11636.
- Senzaki, K., Ogawa, M. and Yagi, T. (1999) Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* **99**: 635-647.

- Simó, S., Pujadas, L., Segura, M., La Torre, A., Del Río, J., Ureña, J., Comella, J. and Soriano, E. (2007) Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb. Cortex* **17** (2): 294-303.
- Stockinger, W., Brandes, C., Fasching, D., Hermann, M., Gotthardt, M., Herz, J., Schnider, W.J. and Nimpf, J. (2000) The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **18**: 25625-32.
- Takatori, A., Esmond, G., Chen, L., Zhang, L., Meller, J. and Xia, Y. (2008) Differential transmission of MEKK1 morphogenetic signals by JNK1 and JNK2. *Development* **135** (1): 23-32.
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J. Cell Biol.* **128**: 139-155
- Trivedi N, Marsh P, Goold RG, Wood-Kaczmar A, Gordon-Weeks PR (2005) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell Sci.* **118**: 993-1005.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A. and Herz, J. (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**: 689-701.
- Ulloa L, Diaz-Nido J, Avila J (1993) Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Embo J.* **12**: 1633-1640.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerhove, J. and Ampe, C. (2008) Ins and outs of ADF/Cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* doi:10.1016/j.ecb.2008.04.001
- Wang, R., Zhang, Q.C., Han, D., Xu, J., Lu, Q. and Zhang, G.Y. (2006) Inhibition of MLK3-MKK4/7-JNK1/2 pathway by Akt1 exogenous estrogen-induced neuroprotection against transient global ischemia by a non-genomic mechanism in male rats. *J. Neurochem.* **99** (6): 1543-54.
- Wang, X., Nadarajah, B., Robinson, A. C., McColl, B. W., Jin, J., Dajas-Bailador, F., Boot-Handford, R. P. and Tournier, C. (2007) Targeted deletion of the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 gene in the nervous system causes severe brain developmental defects and premature death. *Mol. Cell Biol.* **27** (22): 7935-46.

Ware, M., Fox, J.W., González, J.L., Davis, N.M., Lambert de Rouvroit, C., Russo, C.J., Chua, S.C., Goffinet, A.M. and Walsh, C.A. (1997) Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron* **19**: 239-249.

Yang, N., Higushi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**: 809-812.