

UCH-FC  
Biotecnología  
R 741  
C-1

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**MODIFICACIONES EN EL CITOESQUELETO**

**NEURONAL INDUCIDAS POR REELINA**



**SEBASTIÁN OSVALDO MATÍAS ROJAS**

**BARRERA**

**2007**



**“MODIFICACIONES EN EL CITOESQUELETO NEURONAL INDUCIDAS POR REELINA.**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

***SEBASTIÁN OSVALDO MATÍAS ROJAS BARRERA***

*Dr. Christian González-Billault*  
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'González-Billault', written over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dra. Cecilia Vergara Montecino*  
Presidente Comisión

A handwritten signature in green ink, appearing to read 'C. Vergara M.', written over a horizontal line.

*Dr. Alejandro Roth Metcalfe*  
Corrector

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alejandro Roth', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ de 2007

# **MEMORIA DE TÍTULO CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

Sebastián Osvaldo Matías Rojas Barrera

Director de Memoria: Dr. Christian González-Billault

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Teléfono: 9787176, Fax: 2712983; Ubicado en Las palmeras 3425, comuna de Ñuñoa, Santiago, Chile.

E-mail Alumno: [sebarojas19@hotmail.com](mailto:sebarojas19@hotmail.com)

E-mail Director de Memoria: [chrgonza@uchile.cl](mailto:chrgonza@uchile.cl)

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre Silvia y a mi Padre Cristián, a mis hermanos Cristóbal, Cristián, Verónica y Macarena, a Verónica, a mi madrina Virginia, a mi abuela Virginia que siempre vivirá en mis recuerdos y a todas mis tías, tíos, primas y primos.

También agradecer a aquellos que fueron parte fundamental en el desarrollo de este trabajo comenzando por mi tutor, Christian y a Carolina, por su gran ayuda con las correcciones y por supuesto a los demás integrantes del Laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Chile, Erick, Elías, Pamela, Cristina, Vicente, Nancy y Juan.

A mis amigos Carolina, Iván, Mariela, Pablo, Fernanda, Mario sólo por nombrar a algunos de todos que los que fueron y son un gran apoyo.

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

## ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
ÍNDICE DE MATERIAS.....	<i>i-iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	<i>v-vi</i>
1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	3
3.- HIPÓTESIS.....	9
4.- OBJETIVO GENERAL.....	11
4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1.- MATERIALES.....	13
5.1.1.- Material Biológico.....	13
5.1.2.- Reactivos químicos y de cultivo celular.....	14
5.2.- MÉTODOS.....	14
5.2.1.- Cultivo Celular.....	14
5.2.2.- Establecimiento de cultivos primarios.....	15
5.2.3.- Producción de Reelina recombinante.....	16
5.2.4.- Estimulación de cultivos primarios corticales de ratón con Reelina recombinante.....	17
5.2.5 Extracción de proteínas y complejos proteicos totales a partir de cultivos primarios.....	18

5.2.6.- Inmunodetección.....	18
5.2.7.- Inmunofluorescencia.....	19
5.2.8.- Inmunoprecipitación.....	20
5.2.9.- Determinación de la actividad de proteínas cuya actividad depende de fosforilación en cultivos primarios corticales de ratón.....	21
5.2.10.- Determinación de la actividad de Rac.....	22
6.- RESULTADOS.....	24
6.1.- INMUNOFLUORESCENCIAS DE CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES DE RATÓN EN E15-E16.....	24
6.2.- OBTENCIÓN DE REELINA RECOMBINANTE.....	26
6.2.1.- Detección de Reelina recombinante mediante <i>Dot blot</i> .....	26
6.2.2.- Detección de Reelina recombinante mediante <i>Western blot</i> .....	27
6.3.- ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDA EN RESPUESTA A REELINA.....	28
6.3.1.- Fosforilación de mDab1.....	29
6.3.2.- Fosforilación de MAP1B.....	30
6.4 ACTIVACIÓN DE Rac1.....	32
6.5 LIM quinasa (LIMK) y Cofilina.....	33
6.6 FOTOGRAFÍAS DE CONTRASTE DE FASE DE CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES DE RATÓN EN E15-E16 TRATADOS CON REELINA RECOMBINANTE.....	35
7.- DISCUSIÓN.....	37

8.- CONCLUSIONES.....	43
9.- PROYECCIONES.....	45
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Diagrama que ilustra el posicionamiento de las neuronas según el estadio de desarrollo.....	4
<b>Figura 2:</b> Proteínas involucradas en la cascada de señalización canónica inducida por Reelina.....	6
<b>Figura 3:</b> Modelo en el cual se ilustra los roles antagónicos que cumplen las proteínas Rac y Rho en fibroblastos.....	7
<b>Figura 4:</b> Inmunofluorescencias de cultivos de neuronas corticales de 2 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	25
<b>Figura 5:</b> Detección mediante <i>dot blot</i> de Reelina recombinante.....	27
<b>Figura 6:</b> Detección mediante <i>Western blot</i> de Reelina recombinante.....	28
<b>Figura 7:</b> Fosforilación en tirosina de mDab1 en respuesta a Reelina recombinante.....	29
<b>Figura 8:</b> Fosforilación de MAP1B en respuesta al tratamiento con Reelina recombinante.....	31
<b>Figura 9:</b> Pull-down de Rac1-GTP.....	32
<b>Figura 10:</b> Inmunodetección de Fosforilación de LIMK y de cofilina.....	34
<b>Figura 12:</b> Fotografías de contraste de fase de cultivos de neuronas corticales estimuladas con medio control y enriquecido en Reelina.....	35



## ABREVIATURAS

ApoER2	Receptor 2 de apolipoproteína E
BSA	Suero albúmina de bovino
Cdk5	Quinasa dependiente de ciclina 5
cDNA	DNA complementario
Dcx	Proteína Doblecortin
DMEM	Medio Eagle de Dulbecco modificado
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 $\beta$	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
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos

MAP1B	Proteína asociada a microtúbulos 1B
mDab1	Proteína adaptadora Dab1
NB	Medio Neurobasal
Nudel	Proteína homóloga de NUDE en <i>Aspergillus</i>
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

## **1.- RESUMEN**

---

La Reelina es una proteína de matriz extracelular, que es capaz de unirse a los receptores neuronales ApoER2 y VLDLR. La unión de Reelina a estos receptores induce la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora mDab1, la que a su vez puede unirse a múltiples proteínas activando diversas cascadas de transducción de señales; entre ellas la que involucra la activación de Gsk3 $\beta$  y Cdk5, con la subsecuente fosforilación en modo I de MAP1B, una proteína específica de neuronas implicada en el control de la estabilidad dinámica de microtúbulos y la comunicación entre microtúbulos y filamentos de actina.

En esta memoria de título hemos producido Reelina recombinante a partir de células HEK-293T transfectadas establemente con un plásmido que codifica para el cDNA de Reelina. La Reelina recombinante, presente en el medio condicionado de dichas células, fue luego concentrada utilizando un sistema de filtración con corte por peso molecular.

Por otro lado, establecimos cultivos primarios de neuronas corticales de ratones en estadio embrionario entre los días 15 y 16 post-fertilización (E15-E16), que procedimos a estimular con el medio concentrado enriquecido en Reelina.

Fuimos capaces de detectar la activación de la vía canónica de transducción de señales activada en respuesta a Reelina en cultivos primarios de neuronas, en la cual aún no se ha demostrado la participación de Rho GTPasas pequeñas. Esto nos indicó que la Reelina recombinante obtenida se encuentra biológicamente activa.

Además determinamos la actividad de proteínas involucradas en la dinámica de actina en respuesta a Reelina, encontramos que la actividad de Rac1 no estaría siendo

modificada, pero si estaría siendo modificada la actividad de efectores río abajo como son LIMK y Cofilina. Indicando que tal vez existe una regulación a través de la modulación de otras proteínas involucradas diferentes de Rac1 con función similar.

## 2.- INTRODUCCIÓN

La formación de las regiones laminadas del sistema nervioso central (SNC) está marcada por series de olas migratorias, en las cuales neuronas post-mitóticas dejan su lugar de nacimiento en la zona ventricular y se mueven sobre las fibras de glías radiales a su destino final, en donde se posicionan en capas bien definidas, durante este proceso, las neuronas que nacen en estadios comunes de desarrollo se dispondrán en la misma capa (*Rivas y Hatten, 1995; Trommsdorff et al, 1999; Gupta et al, 2002; Nadarajah et al, 2001; Nadarajah y Parnavelas, 2002*).

Los eventos moleculares que regulan la interacción de las células que se encuentran migrando con su entorno y las señales que les indican su posición espacial durante el desarrollo del SNC son complejas y aún muy poco entendidas (*Trommsdorff et al, 1999*).

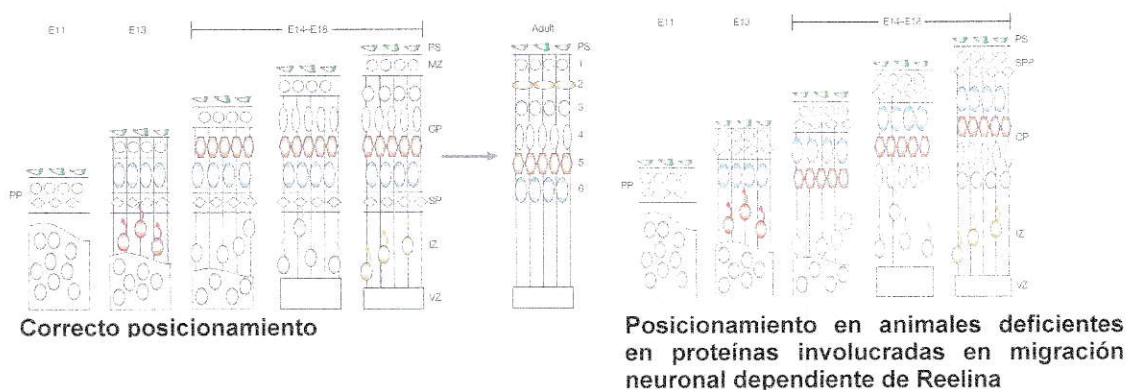
Se han descrito muchas moléculas que dirigen y modulan distintas etapas durante los procesos migratorios, como Netrin, Slits, Efrinas y Reelina, a través de la activación de complejas cascadas de señalización (*Hatten, 1999; Huber et al, 2003; Marín y Rubenstein, 2003*).

La Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular de 380 kilodalton que es secretada por las células de Cajal-Retzius en la zona marginal o más externa de la corteza, generando un gradiente hacia las zonas más profundas y ha sido postulada como una señal que les indica a las neuronas cuándo dejar de migrar durante su posicionamiento (*Ogawa et al., 1995*), de esta forma dirige la migración de las neuronas en una de las estructuras laminadas del cerebro, que corresponde a la corteza cerebral (*Howell et al, 1999*), dando origen a 6 capas bien definidas en ratones y humanos (*Gupta et al., 2002*). Otras estructuras

laminadas del cerebro, en cuya formación también está involucrada Reelina corresponden al hipocampo y el cerebelo.

Para que las neuronas puedan migrar se requiere que el citoesqueleto neuronal sea modificado dinámicamente. Dicha modulación requiere cambios en la formación y mantención de microtúbulos y microfilamentos de actina. (*Rivas y Hatten, 1995; González-Billault et al, 2005*).

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 (*Gupta et al, 2002; Rice y Curran, 2001*). Podemos observar en el diagrama de la figura 1 que durante la formación de la corteza del ratón Reeler (deficiente en Reelina; *D`Arcangelo et al., 1995; D`Arcangelo y Curran, 1998*) se observa una inversión en la posición de las capas corticales, lo que se observa también en animales mutantes para proteínas involucradas en su cascada de transducción (*Gupta et al., 2002*).



**Figura 1. Diagrama que ilustra el posicionamiento de las neuronas según el estadio de desarrollo.** Se esquematiza el posicionamiento normal de las neuronas durante

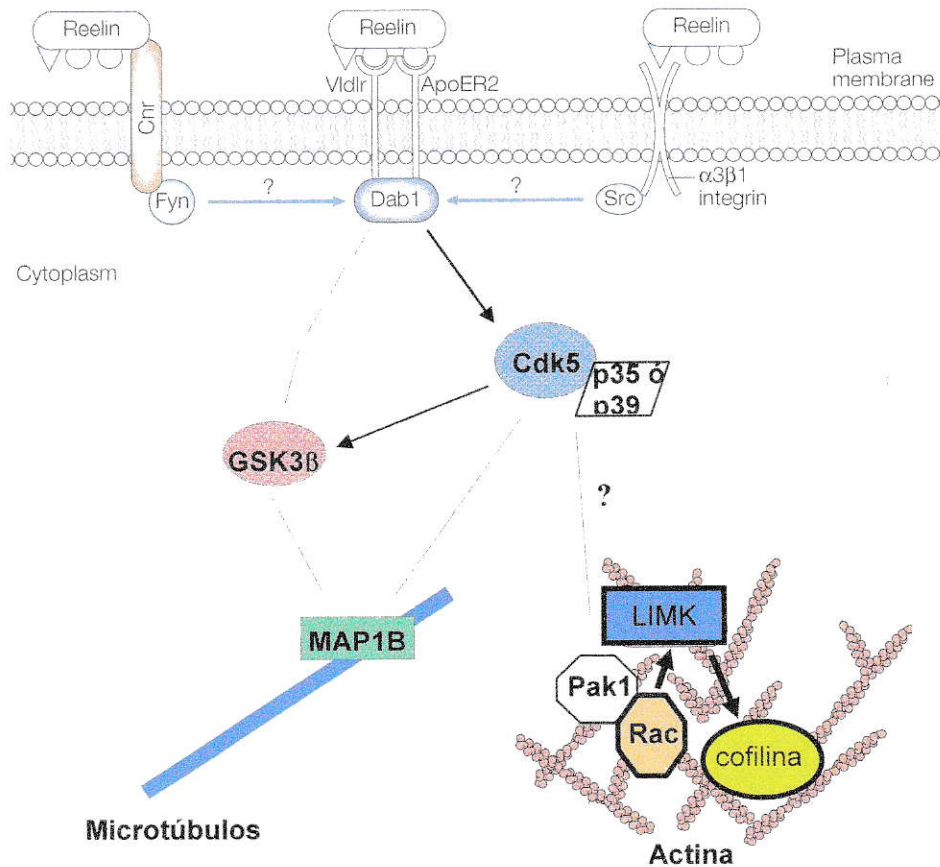
el desarrollo de la corteza cerebral y el posicionamiento que se lleva a cabo en animales mutantes deficientes en Reelina ó alguna de las proteínas involucradas en su vía de transducción canónica, como mDab1 ó sus receptores ApoER2 junto con VLDLR. (Adaptado de *Gupta et al., 2002.*)

Se ha demostrado, mediante el uso de modelos murinos de pérdida de función, que adicionalmente a Reelina, existen otras proteínas involucradas que son claves para el correcto posicionamiento de las neuronas durante el desarrollo de las estructuras laminadas del SNC, como el adaptador mDab1 (*Howell et al, 1997; Ware et al, 1997; Ballif et al, 2003; Bielas et al, 2004; Olson et al, 2006*), las proteínas asociadas a microtúbulos poco convencionales Dcx (*Gdalyahu et al, 2004*) y Lis1 (*Bielas et al, 2004*), la proteína quinasa dirigida por prolina Cdk5 (*Ohshima et al, 1996*) junto a sus activadores p35 y p39 (*Chae et al, 1997; Ko et al, 2001; Gupta y Tsai, 2003*); así como también los receptores para Reelina ApoER2 y VLDLR (*Trommsdorff et al, 1999; Benhayon et al., 2003*); junto con otros receptores que se han asociado a otras cascadas de señalización en respuesta a Reelina como son los receptores de  $\alpha 3 \beta 1$  integrina (*Anton et al, 1999; Dulabon et al, 2000*) y de protocaderinas (*Kohmura et al, 1998; Senzaki et al, 1999*).

Nuestro grupo ha demostrado la participación de una proteína asociada a microtúbulos de tipo estructural, la MAP1B (*González-Billault et al, 2004*), en la vía de señalización de Reelina. Muchas de las proteínas antes descritas son moduladas por la cascada de señalización canónica dependiente de Reelina (figura 2).

Se ha descrito que la actividad de Pak1 puede ser modulada por Cdk5, por lo que sería lógico que fuera también capaz de regular indirectamente a Rac1 y sus proteínas

efectoras río abajo LIMK y Cofilina (Nikolic *et al.*, 1998; proteínas cuyo borde en el dibujo es más grueso en la figura 2, que se proponen como blancos para modular la dinámica de microfilamentos de actina).



**Figura 2. Proteínas involucradas en la cascada de señalización canónica inducida por Reelina.** (Adaptado de Gupta *et al.*, 2002.)

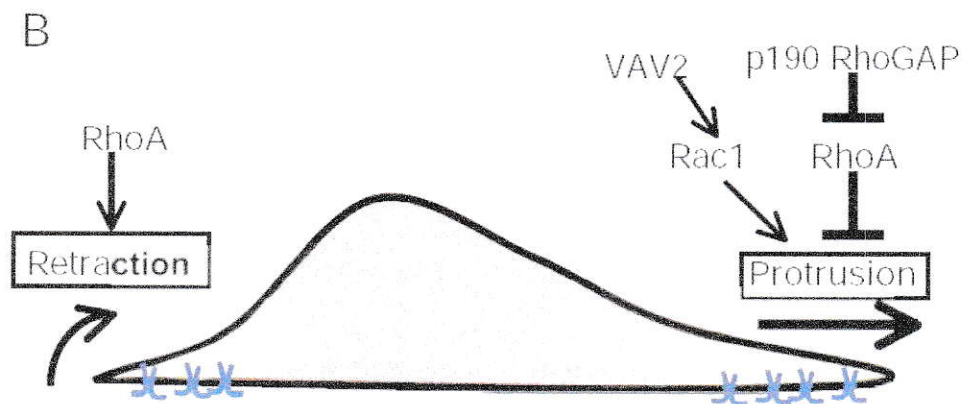
Para determinar cambios en las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina decidimos focalizarnos en la activación de las pequeñas proteínas GTPasas de la familia Rho (Luo, 2000). Esta familia de proteínas controla la polimerización y dinámica de los microfilamentos de actina, funcionando como un interruptor molecular que puede pasar de un estado inactivo (unido a GDP) a uno activo cuando se encuentra unido a GTP, esta



activación/inactivación es catalizada por proteínas GEF (intercambiadores de nucleótidos guanina, por sus siglas en inglés; Luo, 2000).

La familia esta subdividida en 3 grandes grupos de proteínas, a saber, Rac1, cdc42 y Rho. Es así, que se ha descrito que en neuronas la activación de Rac induce la formación de lamelipodios, la activación de cdc42 la formación de filopodios, y la de Rho induce el colapso de las neuritas (Arber *et al.*, 1998; Luo, 2000; Yang *et al.*, 1998). Es por esto que nos enfocamos en la activación de Rac1, para lo cual contamos con un ensayo bioquímico que nos permitirá establecer cambios en la actividad de esta GTPasa monomérica.

Las proteínas pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas tienen diferentes funciones, dependiendo del proceso que se requiera llevar a cabo en un cierto lugar de la célula (Sastry *et al.*, 2006), podemos ver un ejemplo en la figura 3.



**Figura 3. Modelo en el cual se ilustra los roles antagónicos que cumplen las proteínas Rac1 y RhoA en fibroblastos.** Ambas proteínas pertenecen a la familia de Rho GTPasas. (Modificado de Sastry *et al.*, 2006.)

La vía de señalización dependiente de Rac1 puede activar a la proteína quinasa LIMK, la cual a su vez tiene como sustrato a la proteína de unión a actina Cofilina.

Cofilina, es una proteína que tiene actividad despolimerizante de microfilamentos de actina que cuando se encuentra desfosforilada está en su estado activo, se ha determinado que su función es vital para la formación de estructuras características compuestas por actina en los conos de crecimiento en la parte distal de los procesos de las neuronas.

LIMK es una proteína que es capaz de autofosforilarse y de unirse directamente a microfilamentos de actina, en su estado activo, es decir, fosforilado, puede modular la actividad de cofilina fosforilándola en la serina en posición 3 (*Yang et al., 1998*) y de esta manera disminuir su afinidad por microfilamentos de actina, lo que tiene como resultado una reorganización del citoesqueleto de actina, permitiendo así la formación de lamelipodios (*Yang et al., 1998; Arber et al, 1998; Luo, 2000*).

### **3.- HIPÓTESIS**

Con base en trabajos previos que han demostrado la participación de MAP1B, una proteína estructural asociada a los microtúbulos, en la vía de señalización de Reelina, (*González-Billault et al, 2000, 2001, 2005*; trabajos sobre migración neuronal y estructuración del citoesqueleto) proponemos que la Reelina es capaz de modular la actividad de proteínas claves involucradas en la dinámica del citoesqueleto de actina como la Rho GTPasa Rac1.

Antecedentes que validan esta hipótesis son los siguientes:

1) La sobreexpresión de un dominante negativo de Rac *in útero*, produce un arresto de las neuronas corticales en la zona subventricular (*Kawauchi et al, 2003*).

2) La sobreexpresión *in útero* de una forma dominante negativa de Tiam1, una proteína perteneciente a la familia de activadores de Rac (GEF), produce un efecto similar aunque no idéntico a la sobreexpresión del dominante negativo de Rac (*Kawauchi et al, 2003*).

3) Neuronas derivadas del mutante deficiente en MAP1B, que posee un fenotipo similar aunque no idéntico al mutante de Reeler, muestran una estructuración aberrante de su citoesqueleto de actina (*González-Billault et al, 2001; 2002*).

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

5) Cdk5 ha sido colocado en la vía de transducción de señales dependiente de Reelina por debajo de mDab1 (*Gupta et al, 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 Rho (*Meyer et al., 1999*).

## **4.- OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta memoria de título es Analizar los mecanismos moleculares que controlan las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina en respuesta a Reelina.

Es de nuestro interés ver la activación de proteínas Rho-GTPasas y sus efectores en respuesta a Reelina, ya que se ha involucrado la actividad de estas proteínas en los procesos de polimerización/despolimerización de microfilamentos de actina. Para ello analizaremos la posible modulación en la actividad de Rac1 y Cdc42 (proteína de la familia Rho-GTPasa con función muy similar a Rac1) y de LIMK y cofilina, proteínas capaces de unirse directamente a la actina polimerizada, en neuronas estimuladas con Reelina, esto se llevará a cabo mediante *pull down* y utilizando un kit de activación disponible en el laboratorio para el caso de Rac1 y Cdc42; para determinar la modulación de LIMK y cofilina detectaremos las poblaciones fosforiladas y totales de estas proteínas, analizando si existe alguna variación en su razón.

## **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **4.1.1 Producción de Reelina recombinante a partir de células transfectadas establemente con un plásmido que contiene el cDNA de Reelina**

El primer objetivo específico propuesto es la mantención de la línea celular HEK 293T Reelina (transfectada establemente con un plásmido que contiene el cDNA codificante para Reelina), la inducción de la producción de Reelina recombinante y la posterior recolección y concentración del medio condicionado que la contiene.

### **4.1.2 Establecimiento de cultivos primarios corticales de ratón en estadio embrionario día 15 a día 16 post –fecundación (E15-E16).**

Nuestro segundo objetivo específico es poner a punto el cultivo primario de neuronas corticales de ratón embrionario en los días 15 a 16 post-fecundación.

### **4.1.3 Detección de la actividad biológica de la Reelina recombinante producida anteriormente**

El tercer objetivo es estudiar si la Reelina recombinante producida es biológicamente activa, para ello determinaremos la activación de proteínas ya descritas involucradas en su vía canónica de señalización mediante la estimulación de cultivos primarios corticales.

## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **5.1 MATERIALES**

#### **5.1.1 Material biológico**

##### **5.1.1.1 Animales**

Se utilizaron las cepas de ratones (*Mus musculus*) C57BL/6J y BALB/c. Se utilizaron estas dos cepas diferentes de ratones debido a que se ha descrito que el fondo genético puede afectar los resultados obtenidos, debido a esto se ha propuesto utilizar fondos genéticos comunes para tener resultados más reproducibles. Ambas cepas utilizadas son recomendadas como cepas estándares (*Frankel, 1998*).

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.

##### **5.1.1.2 Líneas celulares**

Se utilizó la línea celular HEK-293T (proveniente de riñón humano embrionario), 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 Reelina (HEK-293T Reelina), inducible por privación de suero. Se utilizaron células HEK-293T sin transfectar como control.



### **5.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular**

Los reactivos y productos químicos de uso general utilizados durante el desarrollo de esta memoria de título fueron obtenidos de Sigma, TCL, Calbiochem, Winkler y Sudelab. Las películas autoradiográficas de FujiFilm (HR-U30). Los medios, antibióticos y suplementos utilizados para cultivo celular son de Gibco. Las placas de cultivo utilizadas fueron adquiridas de Orange Inc. El ECL es de Perkin Elmer.

## **5.2 MÉTODOS**

### **5.2.1. Cultivo Celular**

Las líneas HEK-293T (línea control, sin transfectar) y HEK-293T-Reelina fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 5 ó 10% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin, geneticina (G418) 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (como medio de selección para las células transfectadas) y cultivadas en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad controlada al 95% hasta alcanzar una densidad de 80 a 90%. Para inducir la producción de la proteína recombinante se utilizó el mismo medio sin suero.



### 5.2.2 Establecimiento de cultivos primarios

La preparación de cultivos de neuronas corticales se realizó a partir de embriones en estadio E15-E16, según el protocolo previamente descrito (*Banker y Cowan, 1977*). Este protocolo consiste en: después de obtener los embriones y disectar el neocortex, el tejido se fragmenta y se incuba con HBSS - EDTA Tripsina 0,25% por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan 3 lavados con HBBS y se disgrega suavemente el tejido con una pipeta Pasteur. Finalmente se determina el número de neuronas por conteo en un hemocitómetro y se siembran en placas de Petri de 100 mm (Orange científico inc.) ó cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro recubiertos de un sustrato adhesivo (poli-D-lisina) en placas de 24 pocillos; a una densidad de cerca de 2,5 millones de células para las placas y de cerca de 70.000 células para los cubreobjetos, en medio neurobasal-10% suero de caballo (HS) suplementado con glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin, durante 3 horas. Luego de este intervalo de tiempo, se cambia el medio neurobasal-10% HS por el medio neurobasal suplementado con B27, glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Posteriormente las placas se mantienen en incubador humidificado a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> durante dos días.

### **5.2.3 Producción de Reelina recombinante**

#### **5.2.3.1 Inducción de la producción de Reelina recombinante en células HEK-293T**

##### **Reelina**

Las células HEK-293T Reelina se mantuvieron en cultivo hasta una confluencia de cerca del 80%, cuando se indujo la producción de Reelina cambiando el medio de cultivo 5 ó 10% suero por uno carente de suero y se les permitió producir Reelina durante 3 días, realizando una recolección diaria, cambiando el medio condicionado por medio fresco. El medio condicionado recolectado luego fue filtrado a través de membranas porosas de 0,22  $\mu\text{m}$  y finalmente concentrado utilizando un sistema de filtración que separa las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Se procedió de la misma manera para el medio proveniente de células control.

#### **5.2.3.2 Purificación y concentración del medio condicionado**

Los medios condicionados con la Reelina recombinante y control se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 minutos para librarlos de restos celulares presentes. Luego se filtraron utilizando filtros ORANGE Scientific de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar posibles restos remanentes que pudiesen haber quedado del paso anterior. Posteriormente los medios filtrados se centrifugaron a 2.000 rpm utilizando filtros para centrífuga MILLIPORE AMICON ULTRA a 4 °C y los concentrados se guardaron a -20 °C hasta ser utilizados para la estimulación de los cultivos primarios.

#### **5.2.4 Estimulación de cultivos primarios corticales de ratón con medio enriquecido en Reelina recombinante**

El medio que contiene a la Reelina fue diluído con medio fresco para luego ser agregado a los cultivos primarios de neuronas de dos días de incubación *in vitro* (2DIV) durante diferentes tiempos. Los experimentos controles se realizaron utilizando medios de células sin transfectar y medio fresco solamente. Las neuronas fueron estimuladas durante períodos variables de 15 minutos a 6 horas para detectar las diferentes etapas de la vía de transducción de señales canónica activada en respuesta a Reelina.

Después de la estimulación con Reelina, las células fueron utilizadas para experimentos de bioquímica o para inmunotinciones con anticuerpos específicos. Para los experimentos bioquímicos se extrajeron las proteínas totales de las células y se colectaron en solución tampón Laemmli 2X (Tris 250 mM/ SDS 4%/glicerol 10%/2-mercaptoetanol/ 2%/ azul de bromofenol 0,006%; pH 6,8) y posteriormente se analizaron por electroforesis e inmunodetección.

### **5.2.5 Extracción de proteínas y complejos proteicos totales a partir de cultivos**

#### **primarios**

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 e inhibidores de proteasas PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1mM y Pepstatina 0,2 mM) y tratadas según el tipo de experimento que se realizará. Luego de centrifugar el extracto a 12.000 rpm durante 15 minutos, obtuvimos el sobrenadante, el cual se consideró como el lisado total.

### **5.2.6 Inmunodetección**

#### **5.2.6.1 *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  $\mu\text{m}$  (PerkinElmer) colocada en una cámara de Dot blot (Bio-Rad). La presencia de Reelina en los diferentes pocillos fue evaluada utilizando un protocolo estándar de inmunodetección.

### 5.2.6.2 *Western blot*

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida a concentraciones adecuadas para los pesos moleculares de las proteínas a caracterizar. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , para posteriormente ser bloqueadas con PBST ó TBST 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 cinco veces por 5 minutos con PBST ó TBST se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados, también preparados en PBST ó TBST-1% leche. Posteriormente, las membranas fueron nuevamente lavadas cinco veces durante 5 minutos con PBST ó TBST. Finalmente, las membranas fueron incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia aumentada ECL y reveladas utilizando filmes autoradiográficos. Para los análisis densitométricos se normalizaron las señales obtenidas contra una proteína “house-keeping” como  $\alpha$ -tubulina (Sigma) ó  $\beta$ -tubulina (Santa Cruz biotechnology) como controles de carga.

TBST fue utilizado para la inmunodetección de proteínas foforiladas

### 5.2.7 Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunocitoquímica fueron realizados según protocolos descritos por *Álvarez et al, 2001*. Brevemente, los cubreobjetos que contienen las neuronas fueron fijadas con una solución de sacarosa 4%/paraformaldehído 4% y posteriormente con metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , luego fueron permeabilizados con PBS 1X/Tritón X-100 0,2% durante 5

minutos. Posteriormente se incubaron con PBS-BSA 1% (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo 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 en solución de bloqueo conjugados a FITC (Alexa Fluor), TRIC (Alexa Fluor) 546 anti-rabbit y anti-mouse (Molecular Probes) según fuera necesario. Después de 3 lavados con PBS se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave (Calbiochem). Adicionalmente, el citoesqueleto de actina fue detectado utilizando Faloidina-TRITC (Cytoeskeleton Inc.) y el núcleo con ToPro (Invitrogen). Finalmente, las células fueron visualizadas en el microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss).

### **5.2.8 Inmunoprecipitación**

Se cuantificó el lisado total de proteínas mediante el protocolo descrito por Bradford (*Bradford et al, 1976*) y 400-500 µg de esta preparación fueron incubados con 3-5 µg de anticuerpos específicos en un volumen final de 1 mL de solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM/NaCl 150 mM/EDTA 1 mM/EGTA 1 mM/Tritón X-100 1%/ortovanadato de sodio 0,2 mM/NP-40 0,5% pH 7,4/ DTT 1 mM). Esta mezcla se dejó interactuar durante 1 hora a 4°C. Luego, se agregaron 20 µL de una solución Proteína A- Agarosa al 50% en PBS, se mezcló y se 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 Laemmli 2X. Las proteínas fueron finalmente separadas por SDS-PAGE y caracterizadas mediante *Western blot*.

### **5.2.9 Determinación de la actividad de proteínas cuya actividad depende de fosforilación en cultivos primarios corticales de ratón**

#### **5.2.9.1 Actividad de mDab1**

Para llevar a cabo la detección de la fosforilación en tirosina de mDab1 primero se realizó una inmunoprecipitación de mDab1 (anticuerpo de Santa Cruz biotechnology, producido en conejo), para luego detectar la fosforilación mediante inmunodetección con un anticuerpo que reconoce específicamente fosforilaciones en tirosina, obtenido de Upstate, producido en ratón, clon 4G10.

#### **5.2.9.2 Detección de la actividad de MAP1B, LIMK 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 (Kodak Digital Sciences 1D 3.0.2) y se procedió a hacer la relación entre estos dos estados.

Los anticuerpos utilizados para detectar MAP1B total y fosforilada en modo I fueron N-19 producido en cabra (Santa Cruz biotechnology) y SMI31, monoclonal (Sternberg) respectivamente.

Para la detección de cofilina fosforilada y total se utilizaron anticuerpos cedidos generosamente por el Dr. James Bamburg. Para LIMK se utilizaron anticuerpos producidos en cabra de Santa Cruz biotechnology para la población total y producidos en conejo de Cell signaling Technology para la población fosforilada y el anticuerpo usado para detectar la Reelina recombinante producida fue obtenido de Chemicon, producido en ratón, clon G10.

#### **5.2.10 Determinación de la actividad de Rac1**

Para determinar la actividad de Rac1 en cultivos primarios corticales en E15-E16 se utilizó un kit de activación de Rac1 obtenido de Cytoskeleton inc.

Este ensayo se basa en la capacidad que tienen algunas proteínas efectoras, las cuales poseen un dominio conservado llamado PAK, de interactuar con la forma activa de Rac1, es decir, la que se encuentra unida a GTP (*Bernard et al., 1999*).

Se procedió a seguir un protocolo de *Pull-down* utilizando los componentes del kit, que consiste en realizar un extracto total de neuronas tratadas con el medio control y el medio enriquecido en Reelina recombinante entre 2 a 4 horas, tiempo prudente para detectar una activación de Rac (*Mendoza-Naranjo et al., 2007*) en solución tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,5/ MgCl<sub>2</sub> 10 mM/ NaCl 0,3 M/ 2% IGEPAL) para luego clarificarlo mediante centrifugación a 8.000 rpm por 5 minutos y medir concentración de proteínas. Luego se toman al menos 2 mg de proteínas totales y se lleva a 1 mL con solución tampón de lisis, se añaden 20 µL (cerca de 20 µg) de PBD-GST, que contiene al dominio PAK, y



10  $\mu$ L de inhibidores de proteasas (concentrado 100 veces). Posteriormente se dejan interactuar por 1 hora a 4°C, se centrifuga a 5.000 g por 3 minutos a 4°C y se procede a lavar 2 veces con solución de lavado (Tris 25 mM pH 7,5/ MgCl<sub>2</sub> 30 mM/ NaCl 40 mM). Luego el pellet se resuspende en solución tampón de Laemmli 2X y se guarda a -20°C hasta ser utilizado para la inmunodetección de Rac1.

## **6.- RESULTADOS**

Se eligió corteza cerebral como material de estudio por las siguientes razones:

a) Reelina es una señal que comanda la migración radial de neuronas en las regiones laminadas del cerebro, que corresponden a hipocampo, corteza y cerebelo.

b) Esta región posee una gran masa, es fácil de identificar y de disectar. Además se utilizaron embriones en estadio de desarrollo 15-16 días post fecundación, debido a que es justamente la ventana temporal en que se está llevando a cabo parte del proceso de migración neuronal radial dependiente de Reelina durante la formación de las regiones laminadas del SNC.

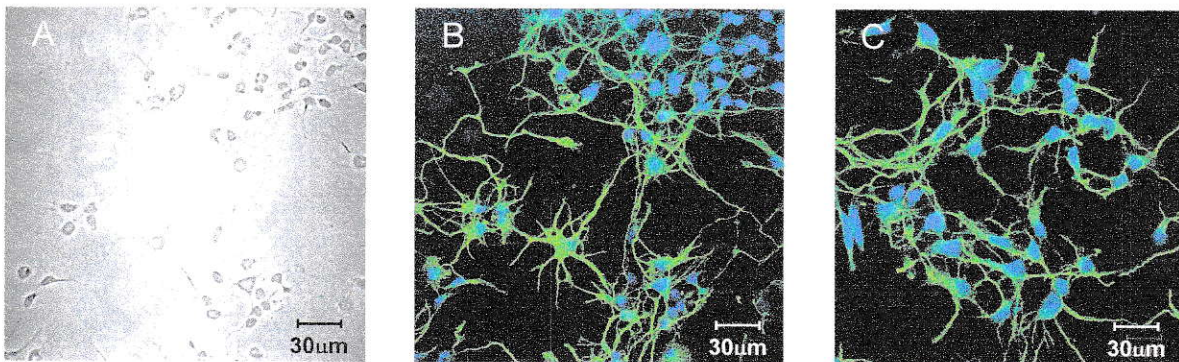
### **6.1 INMUNOFLUORESCENCIAS DE CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES DE RATÓN EN E15-E16.**

En primer lugar realizamos la caracterización de los cultivos primarios de neuronas corticales. Para ello, las neuronas fueron teñidas con anticuerpos que reconocen proteínas estructurales ( $\alpha$ -tubulina, figura 4B) y proteínas que se expresan exclusivamente en neuronas ( $\beta$  III-tubulina, figura 4C). Vemos en la fotografía en contraste de fase y mediante la inmunotinción contra  $\alpha$ -tubulina (figuras 4A y 4B), que luego de dos días de cultivo *in vitro* (2DIV), las neuronas ya poseen procesos bien definidos. Estos cambios morfológicos muestran que existe una extensión citoplasmática que es mucho mas larga

que el resto de los procesos, correspondiendo este al axón. Así mismo, se observan numerosas proyecciones de menor tamaño y equivalentes entre ellas. Estas constituyen las neuritas menores, las que en estadios posteriores del cultivo darán origen a las dendritas.

Para corroborar que las células presentes son realmente neuronas, realizamos una inmunotinción con el marcador neuronal  $\beta$ -III tubulina (figura 4C). Adicionalmente, para detectar la población total de células presentes en el campo visual se tiñeron sus núcleos con ToPro (en azul, figura 4C). De esta forma, podemos asegurar que la mayoría de las células presentes en nuestros cultivos primarios corresponden a neuronas.

Nótese que la figura 4A corresponde al mismo campo visual que la figura 4B, no así la figura 4C



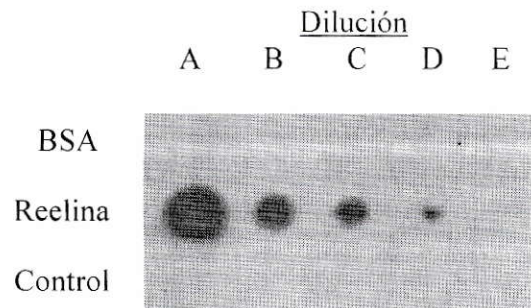
**Figura 4. Cultivo de neuronas corticales de 2 días de cultivo *in vitro*.** A, Fotografía de contraste de fase; B, inmunotinción contra  $\alpha$ -tubulina total en verde y en azul los núcleos; C, inmunotinción contra  $\beta$ III-tubulina en verde y azul tinción nuclear. La magnificación utilizada corresponde a 40X y el tamaño de la barra es de 30  $\mu$ m.

## **6.2 OBTENCIÓN DE REELINA RECOMBINANTE**

Una vez estandarizado el cultivo primario de neuronas corticales, procedimos a la obtención de Reelina recombinante. La producción de proteínas recombinantes requiere ser comprobada. Por esto, se llevaron a cabo dos ensayos bioquímicos con el fin de detectar la Reelina en los medios condicionados, obtenidos de las células transfectadas en condiciones privadas de suero.

### **6.2.1 Detección de Reelina recombinante mediante *Dot blot***

Se evaluó la presencia de Reelina para diferentes eventos de recolección de medio condicionado, tanto de células productoras de Reelina, como de células control y una solución de BSA como controles negativos (Figura 5). Como podemos ver en la figura 5, sólo se observa señal en la segunda línea correspondiente al medio condicionado de células productoras de Reelina recombinante, además se ve que ésta va disminuyendo acorde aumentamos la dilución.

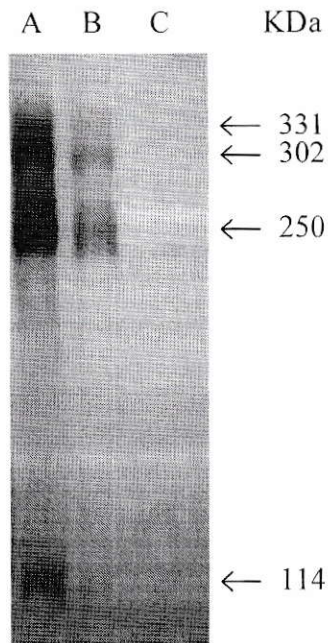


**Figura 5. Detección mediante *dot blot* de Reelina recombinante.** Las líneas corresponden a control negativo (BSA), medio condicionado concentrado con Reelina (Reelina) y medio condicionado concentrado de células control (Control); las columnas corresponden a una dilución seriada de las muestras;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

### 6.2.2 Detección de Reelina recombinante mediante *Western blot*

Adicionalmente a la detección de Reelina mediante *dot-blot*, se realizó un Western Blot para corroborar la presencia de la proteína en los medios condicionados.

Como se puede observar en la figura 6, el anticuerpo reconoce no solo a la proteína completa, sino que también a los fragmentos proteolíticos derivados de ella debido a su gran tamaño. De entre estos fragmentos podemos observar uno de 250 KDa en nuestro ensayo que es justamente la señal que se ve más intensamente, este fragmento ha sido previamente descrito por otros grupos y tiene la capacidad de activar la vía canónica en respuesta a Reelina (*D`Arcangelo et al., 1997*).



**Figura 6. Detección mediante *Western blot* de Reelina recombinante.** Los carriles corresponden a diferentes diluciones de los medios condicionados extraídos de: A, dilución 1/10; B, 1/50 del medio condicionado de células productoras de Reelina recombinante y C, sin dilución del medio condicionado de células control. Los pesos moleculares correspondientes a cada fragmento reconocido están indicados por flechas.

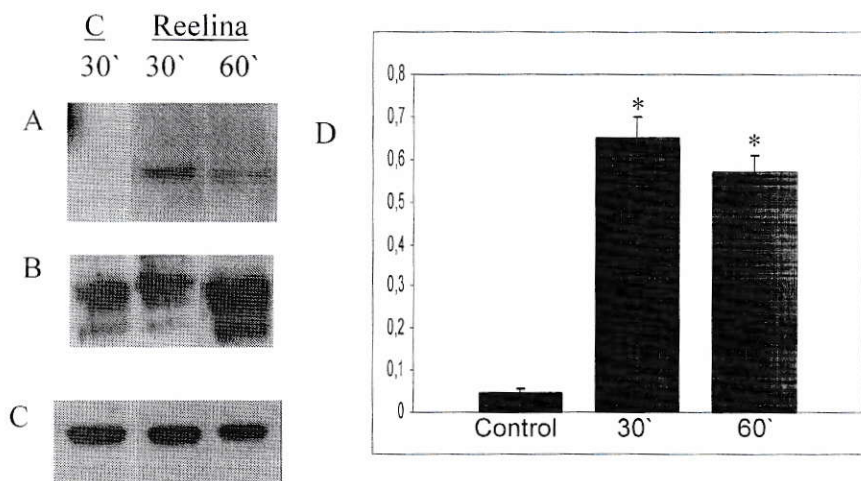
### 6.3 ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDA EN RESPUESTA A REELINA

Para determinar si la Reelina recombinante producida se encuentra biológicamente activa, se procedió a determinar si existen modificaciones de algunas de las proteínas involucradas en la vía de transducción canónica inducida en respuesta a Reelina en cultivos primarios de corteza de ratones embrionarios (E15-E16), luego de dos días de cultivo *in vitro*.

### 6.3.1. Activación de mDab1

Está bien descrito en la literatura que uno de los eventos claves y más tempranos presentes en la vía de transducción de señales canónica inducida por Reelina, son las fosforilaciones en las tirosinas 198 y 220 de la proteína adaptadora mDab1 (Howell *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1999; Keshvara *et al.*, 2001; Ware *et al.*, 1997).

Aquí, demostramos que la cantidad de mDab1 fosforilada llega a un máximo luego de 30 minutos en cultivos primarios de neuronas corticales estimulados con Reelina recombinante, a los 60 minutos observamos una leve disminución en la intensidad de la banda en comparación a los 30 minutos (Figura 7D). El tratamiento con el medio control se llevó a cabo durante 30 minutos (Figura 7A).



**Figura 7. Fosforilación en tirosina de mDab1 en respuesta a Reelina recombinante.** A, Se determinó la fosforilación en tirosina y B, la población total de la proteína mDab1. C, inmunodetección de  $\beta$ -III tubulina como control de carga; D,

histograma que muestra la estandarización de los datos mediante la relación mDab1 fosforilada/ mDab1 total mediante densitometría de las señales. Las diferencias significativas con respecto al control se muestran con asteriscos, se utilizó la prueba de significancia t de student con un  $t < 0,05$ .

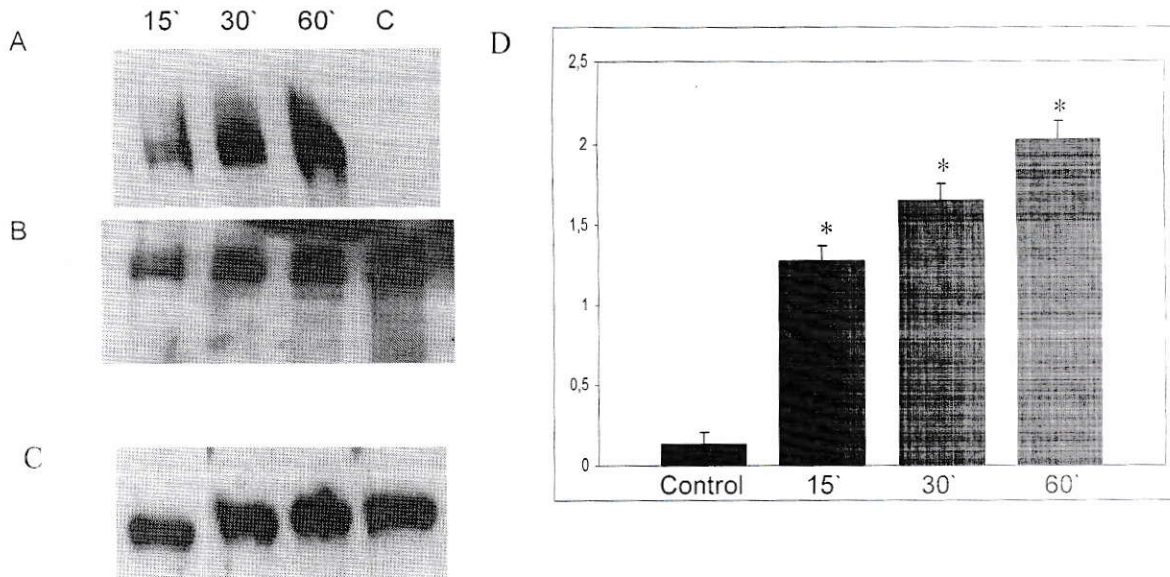
El peso molecular calculado según la migración relativa de mDab1 es de cerca de 79 KDa y el peso molecular descrito en la literatura es de 80 KDa (*Howell et al., 1999*). El ensayo fue realizado 3 veces.

### **6.3.2. Fosforilación de MAP1B**

Otro evento bien descrito en la vía de transducción de señales dependiente de Reelina es la fosforilación en modo I de la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B; *Gonzalez-Billault, 2005*). Es por esto que también evaluamos el grado de fosforilación de esta proteína en cultivos neuronales expuestos a Reelina recombinante a distintos intervalos de tiempo.

Podemos ver en la figura 8, que a tiempos cortos como 15 minutos ya se indujo un aumento en la fosforilación en modo I de MAP1B, la cual se incrementó a los 30 minutos y alcanzó el máximo nivel observado luego de 1 hora del tratamiento con el medio condicionado enriquecido en Reelina recombinante (Figura 8).





**Figura 8. Fosforilación de MAP1B en respuesta al tratamiento con Reelina recombinante.** A, Se detectó la población de MAP1B fosforilada en modo I y B, la población total de MAP1B; C,  $\beta$ -III tubulina como control de carga y D, Histograma que muestra la razón MAP1B-P/MAP1B total mediante datos de densitometría. Carril 1 corresponde al tratamiento de 15 minutos con el medio condicionado; carril 2, 30 minutos; carril 3, 60 minutos y carril 4, tratamiento con el medio control. Los datos con una diferencia de  $t < 0,05$  con respecto al control se muestran con asteriscos. Los datos graficados corresponden a tres experimentos independientes.

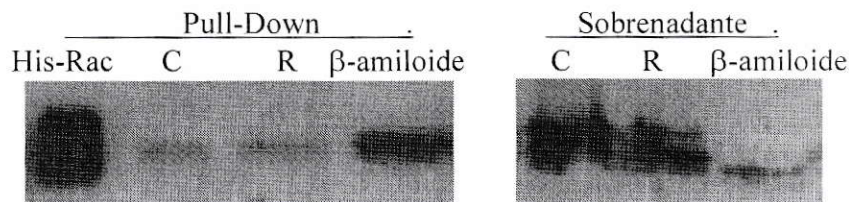
El peso estimado de MAP1B, según su migración relativa, es de 320 KDa. Dato que concuerda con lo descrito en la literatura (*Gonzalez-Billault et al., 2001*).

#### 6.4 Activación de Rac1 en respuesta a Reelina

Mediante ensayos de *pull-down*, que permite capturar a la GTPasa Rac1 en su configuración activa (unida a GTP), se evaluó si Rac1 es activada en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón E15-E16 en respuesta a Reelina recombinante a diferentes tiempos de estimulación.

Podemos apreciar que la actividad de Rac1 no se ve influenciada en neuronas tratadas con Reelina recombinante en relación a neuronas tratadas con medio control (Figura 9). No tenemos una significancia entre los niveles de Rac1 activo en ambas condiciones debido a que el ensayo se realizó una vez, se requiere repetir el ensayo un mayor número de veces.

Cabe mencionar que la cantidad de proteína detectada en el precipitado corresponde a Rac1 unida a GTP, en su estado activo; mientras que en el sobrenadante se encuentra la fracción de proteína Rac1 unida a GDP, es decir, en su estado inactivo.



**Figura 9. Pull-down de Rac1-GTP.** En la figura se muestra la inmunodetección de Rac. El primer carril corresponde a una proteína de fusión Rac1 con una cola de histidina; segundo carril, extracto de neuronas tratadas con medio control; tercer carril, neuronas tratadas con Reelina

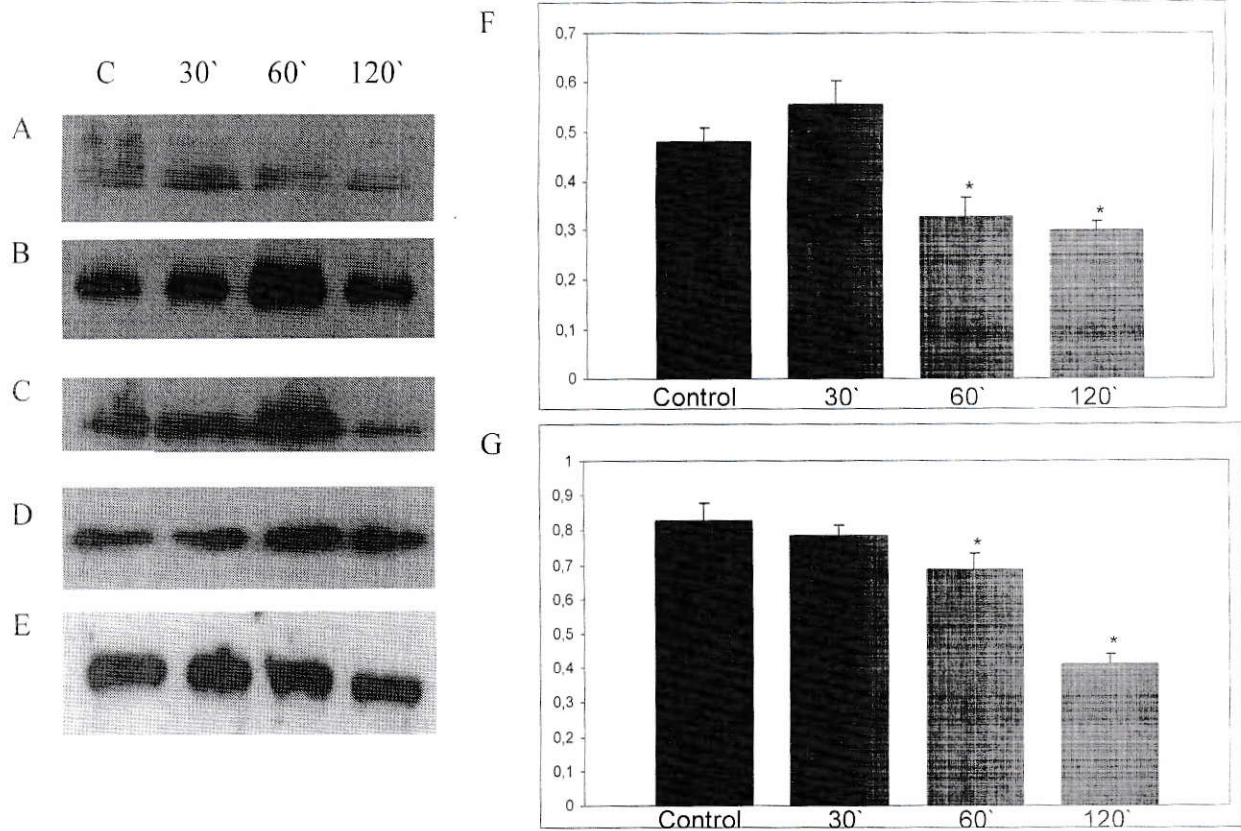
recombinante; cuarto carril, neuronas estimuladas con péptido  $\beta$ -amiloide. Se utilizó la misma simbología para los sobrenadantes del *Pull-Down*.

En el carril 1 se cargó la proteína de fusión Rac1-poli histidina provista en el kit de activación de Rac1 como un control positivo para el protocolo de Western blot. El peso molecular calculado para Rac1 concuerda con lo descrito en el kit de activación de Rac1, este valor corresponde a 21 KDa.

### **6.5 LIM quinasa (LIMK) y Cofilina**

En esta parte evaluaremos cambios en la actividad de Cofilina y LIMK para determinar variaciones en la dinámica de actina en respuesta a Reelina.

Se observa que a los 30 minutos de exposición de las neuronas a Reelina, el grado de fosforilación de LIMK es máximo y a medida que pasa el tiempo decae a niveles similares al tratamiento con el medio control; resultado que concuerda con lo obtenido para Cofilina en el mismo intervalo de tiempo, también vemos una dependencia entre los niveles de fosforilación entre ambas proteínas a tiempos mayores que 30 minutos (Figura 10). Por lo tanto estos resultados sugieren indirectamente la modulación río arriba de Rac, ó bien de alguna otra proteína perteneciente a la familia de Rho GTPasas y sustentan un papel para Reelina en los cambios asociados al citoesqueleto de actina.



**Figura 10. Inmunodetección de Fosforilación de LIMK y de cofilina.** A, LIMK fosforilada; B, LIMK total; C, cofilina fosforilada; D, cofilina total y E,  $\beta$ -III tubulina como control de carga; presente en cultivos primarios a 30 (carril 2), 60 (carril 3) y 120 minutos (carril 4) de estimulación con Reelina recombinante y 120 minutos de tratamiento con medio control (carril 1); F y G, Densitometrías correspondientes a la razón P-LIMK/LIMK total y de P-Cofilina/Cofilina total, respectivamente. Las diferencias con una  $t < 0,05$  con respecto a la situación control se denotan con asteriscos. Los experimentos fueron realizados 3 veces independientes.

## 6.6 FOTOGRAFÍAS DE CONTRASTE DE FASE DE CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES DE RATÓN EN E15-E16 TRATADOS CON REELINA RECOMBINANTE

Para evaluar si hubo algún cambio morfométrico en cultivos neuronales de dos días tratados con Reelina recombinante, procedimos a realizar fotografías de contraste de fase de neuronas primarias estimuladas por 60 minutos con medio enriquecido en Reelina y control.

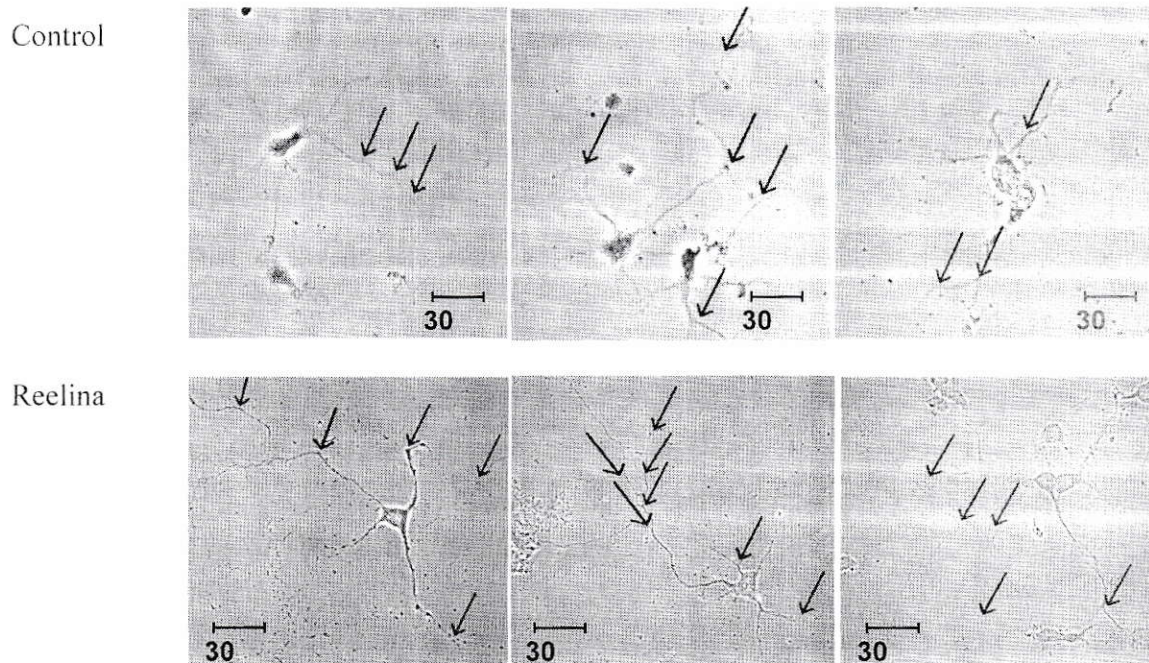


Figura 11. Fotografías de contraste de fase de cultivos de neuronas corticales estimuladas con medio control y enriquecido en Reelina. A, neuronas estimuladas con medio control y B, neuronas tratadas con el medio enriquecido en Reelina durante 60 minutos. Se muestran tres campos visuales tomados al azar en cada condición, las flechas indican puntos de

ramificaciones de procesos, todas las fotografías tienen una magnificación de 40x y el tamaño de la barra corresponde a 30  $\mu\text{m}$ .

Detectamos, de manera preliminar, que las neuronas tratadas con Reelina recombinante tienen un número mayor de ramificaciones, tanto en el axón como en los procesos menores, algunas se encuentran señaladas mediante cabezas de flechas (Figura 11).

Las neuronas tratadas con Reelina tienen 6 ramificaciones en promedio, mientras que las tratadas con el medio control tienen 4 ramificaciones en promedio.

Cabe mencionar que estos resultados son preliminares y que se requiere analizar un número mayor de células para tener un resultado estadísticamente significativo, ya que se cuantificaron 10 neuronas controles y 16 neuronas tratadas con Reelina recombinante.

## 7.- DISCUSION

---

En este trabajo hemos puesto a punto las técnicas necesarias para estudiar el efecto de la glicoproteína de matriz extracelular Reelina sobre la dinámica del citoesqueleto neuronal. Como primer paso, determinamos mediante inmunotinción con el marcador neuronal “ $\beta$ -III tubulina” que las células presentes en nuestro cultivo primario son mayoritariamente neuronas. (Figura 4).

La presencia de Reelina recombinante en los medios condicionados se detectó mediante *dot blot* (Figura 5) y *Western blot* (Figura 6). Además, se pudo determinar tanto el peso molecular de la Reelina como de diferentes fragmentos proteolíticos de ella.

Para verificar si la Reelina recombinante que se obtuvo desde los medios condicionados se encontraba realmente activa, se estudió si ésta era capaz de activar la vía canónica que involucra a la proteína adaptadora mDab1. Como resultado se encontró que la proteína recombinante indujo la fosforilación en la tirosina de mDab1, siendo la respuesta máxima observada a los 30 minutos de tratamiento (Figura 7). Además se observó que la fosforilación disminuye levemente a los 60 minutos, esto puede ser debido a que una vez que se activa la cascada de transducción de señales en respuesta a Reelina, hay proteínas con actividad tirosina fosfatasa que son capaces de desfosforilar a mDab1, ó bien se lleva a cabo una inactivación de la ó las quinasas (posiblemente pertenecientes a la familia Src) responsables de fosforilar a mDab1 (*Ballif et al, 2003*), con el fin de que no exista un estímulo continuo de activación de la vía en respuesta a Reelina sobre la neurona.

Como mDab1 puede interactuar con diferentes proteínas que están involucradas en distintos procesos celulares, su activación por un período prolongado de tiempo podría traer efectos pleiotropicos no deseables. Cabe destacar que aún no se han demostrado de manera consistente los eventos moleculares responsables de la activación/inactivación de mDab1 (*Ballif et al, 2003*).

Además se determinó si la proteína asociada a microtúbulos MAP1B es fosforilada en modo I en respuesta al tratamiento con Reelina, tal como se describe en la literatura (*González-Billault et al, 2001*). Como resultado, se pudo observar que al cabo de 15 minutos de tratamiento con Reelina recombinante se obtuvo un aumento en la fosforilación de MAP1B siendo máxima la respuesta observada a los 60 minutos (Figura 8).

En el caso de la modulación de la actividad de las GTPasas, determinamos que la Reelina recombinante producida no estaría modulando la actividad de Rac1 (Figura 9), esto requiere ser verificado aumentando el número de ensayos. También puede que este resultado sea influenciado por la cantidad de proteínas presentes en el extracto total, debido a que el kit requiere una cantidad de 2 mg de proteínas totales y esta cantidad es muy difícil de obtener en cultivos primarios de neuronas en los cuales las células no se dividen. Se utilizó como control positivo el tratamiento de neuronas con péptido  $\beta$ -amiloide que recientemente ha sido descrito que activa a Rac1 (*Mendoza-Naranjo et al, 2007*). Como un control negativo para experimentos futuros utilizaremos ácido lisofosfatídico para estimular a Rho, y de esta forma inhibir a Rac1.



Observamos diferencias en los patrones de fosforilación de LIMK y cofilina, que son proteínas cuya actividad puede ser modificada por proteínas de la familia de las Rho GTPasas pequeñas y particularmente por Rac1 (*Yang et al., 1998*), presentes en cultivos primarios corticales de ratón E15-E16 en respuesta a Reelina con relación al tratamiento con medio control. Tal como se esperaba, encontramos que hay cambios en la actividad de estas proteínas, que se sabe, están relacionadas con la modulación del citoesqueleto de actina, el que debe ser modificado dinámicamente durante el proceso de migración neuronal mientras se está estableciendo el SNC (*Huber et al., 2003; Kawauchi et al., 2003*).

Cofilina es una proteína con actividad despolimerizante involucrada en la dinámica de filamentos de actina y se encuentra activa cuando está en su estado no fosforilado, nuestros resultados preliminares concuerdan con lo descrito anteriormente, que corresponde a que existe relación entre una disminución en el grado de fosforilación de cofilina producto de una disminución de la actividad ó fosforilación de LIMK (figura 10; *Pollard et al., 2000*). Cabe mencionar, que cofilina puede tener diferentes grados de actividad en diferentes partes de la célula, dependiendo si se requiere una mayor o menor dinamicidad 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 et al., 1998; Arber et al., 1998*).

Se determinó, de manera preliminar, mediante microscopía de contraste de fase que las neuronas tratadas con Reelina recombinante tienen un mayor número de procesos y ramificaciones (Figura 11); no obstante, para asegurar esto hace falta un número mayor de campos a analizar y medir longitud axonal promedio y total, de neuritas y número de ramificaciones primarias y secundarias. Estas observaciones concuerdan con la idea de que

se requieren cambios en el citoesqueleto, mediados por modulaciones de la actividad de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y de proteínas GTPasas pequeñas, eventos que tienen como resultado cambios en la morfología neuronal, mediante la modulación de los procesos de elongación axonal, ramificación de axones y de procesos menores (*Rivas y Hatten, 1995*).

La alta concentración de filamentos de actina vista en el proceso adelantado de células que se encuentran migrando se cree que están involucradas en la extensión y retracción de sus lamelipodios y filopodios; además el arresto de la migración de células luego del tratamiento con citocalasina B sugiere que el ensamblamiento de las subunidades de actina es un evento importante durante la migración neuronal, mientras que los microtúbulos estarían especializados en la locomoción del soma neuronal. Los microtúbulos presentes en el proceso adelantado podrían servir para orientar el movimiento hacia una dirección dada, sirviendo como una estructura para el flujo de organelos y vesículas que se observan en células que se encuentran migrando (*Rivas y Hatten, 1995*).

En otro trabajo previo, luego de fijar células que se encontraban migrando se evaluó su morfología. En ellas se reportó la observación de una interacción especializada entre la glía radial y la neurona caracterizada por involucrar elementos de citoesqueleto, que se encontraba ausente en células en reposo (*Gregory et al, 1988*). La proximidad observada durante la interacción entre estos dos tipos celulares sugiere que componentes de la superficie celular están involucrados en el proceso de migración (*Hatten, 1999*).

La migración coordinada de las neuronas es un paso clave para la formación de una arquitectura funcional en el cerebro de mamíferos. Para elucidar los mecanismos moleculares que subyacen este proceso, *Kawauchi* y colaboradores, el año 2003 realizaron electroporaciones *in útero* de dominantes negativos de Rac1, y sus activadores STEF/Tiam1, además de la molécula involucrada río abajo en la vía de señales c-Jun N-terminal quinasa (JNK). Dando como resultado una inhibición del proceso de migración radial de las neuronas sin afectar su diferenciación. Interesantemente, se observaron diferentes fenotipos, la supresión de la actividad de Rac1 causó una pérdida del proceso adelantado, mientras que la supresión de JNK no tuvo efecto sobre él, si no que tuvo como consecuencia una morfología irregular y un aumento de microtúbulos estables en los procesos, junto con una disminución en los niveles de fosforilación de MAP1B, arrojando un posible rol para JNK en el control de la dinámica de tubulina en neuronas que se encuentran migrando (*Kawauchi et al, 2003*).

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 tanto del citoesqueleto de tubulina y de actina como de sus proteínas asociadas para controlar cambios necesarios en la morfología neuronal durante la formación del SNC en vertebrados (*Ogawa et al, 1995*). Existen diversas enfermedades neurológicas relacionadas a 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 et al., 2002; Fatemi, 2001; Hong et al., 2000; Parrini et al., 2006*).

Los resultados y proyecciones de esta memoria de título permitirán estudiar parte de los mecanismos involucrados en la regulación del citoesqueleto en respuesta a Reelina.

## **8.- CONCLUSIONES**

---

1.- Produjimos Reelina recombinante a partir de células HEK 293T transfectadas establemente con un plásmido que codifica para el cDNA de Reelina. La producción de Reelina recombinante fue demostrada mediante dos ensayos bioquímicos de inmunodetección; *Dot blot* y *Western blot*, los que arrojaron resultados positivos para el medio con Reelina. Paralelamente se recolectó y concentró medio condicionado de células HEK 293T sin transfectar, que fue utilizado como control.

2.- Pusimos a punto el establecimiento de cultivo primario de neuronas corticales de ratón embrionario en estadio E15-E16 de desarrollo, los que luego fueron estimulados con el medio condicionado concentrado enriquecido en Reelina.

3.- Demostramos que la Reelina producida es fisiológicamente activa, ya que es capaz de inducir cambios en los patrones de fosforilación de proteínas que participan en su vía de señalización como mDab1 y MAP1B.

4.- Reelina no estaría modulando la actividad de Rac1 mediante el kit que permite cuantificar su activación, no obstante este resultado requiere ser verificado.

5.- Los ensayos preliminares sobre la modulación de la actividad de proteínas que regulan la dinámica de actina (LIMK, cofilina), sugieren que Reelina tendría un efecto sobre el citoesqueleto de actina.

## 9.- PROYECCIONES

1.- Con los resultados obtenidos en esta memoria, tenemos como proyecciones ver la activación de la vía JNK en cultivos primarios de corteza e hipocampo de ratón en estadio embrionario E15-E16, para determinar el rol que cumple el citoesqueleto de microtúbulos en el proceso de migración neuronal dependiente de Reelina. Esto se basa en que JNK puede interactuar con proteínas que se unen a los receptores de Reelina y que puede fosforilar a MAP1B.

2.- En este momento tenemos en nuestro poder una cepa de Bacterias E. coli que portan un plásmido con un gen que codifica para la proteína de fusión GST-RBD, el dominio "RBD" tiene una alta afinidad por Rho activo; por lo que podremos hacer experimentos de pull-down utilizando este constructo. De esta forma veremos si Reelina puede modular a Rho.

3.- Con este sistema de estimulación de cultivos primarios con Reelina recombinante ya montado, estudiaremos si existe un balance entre la activación de Rac y Cdc42 y la inactivación de Rho, o viceversa; para luego profundizar más en la interacción de las GTPasas con sus proteínas activadoras de la familia de los factores intercambiadores de nucleótido de guanina (abreviados como GEF en inglés).

4.- Sería bueno determinar, mediante un análisis estadístico más intenso, si Reelina induce un cambio en la longitud, el número de procesos y cantidad de ramificaciones de éstos en neuronas corticales estimuladas.

## **10.- 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.

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.

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 Research*, **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 Research*. **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.

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

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.

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  $\alpha3\beta1$  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.

Frankel, W.N. (1998) Mouse strain backgrounds: More than black and white. *Neuron*, **20**: 183.

Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulay, D. And Reiner, O. (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *The EMBO Journal*, **23**: 823-832.

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, 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., 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*.

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.

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. *Letters to 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.

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.

Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews, Neuroscience* **1**: 173-180.

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. *Journal of Cell Science*. **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.

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 Reviews*, **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.

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. U.S.A.*, **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. *The journal of Neuroscience* **26 (6)**: 1767-1775.

Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyys, 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. *The journal of Neuroscience*, **15 (2)**: 981-989.

Rivas, R.J. and Hatten, M.E. (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience*, **15 (2)**: 981-89.

Sastry, S.K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J., Tremblay, M. and Burridge, K. (2006) PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *Journal of Biological Chemistry*, **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.

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.

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.