



NUEVOS MECANISMOS DE
SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADOS
POR REELINA EN EL CEREBRO
EMBRIONARIO Y ADULTO

2019

FRANCISCO JAVIER PÉREZ MARTÍNEZ

TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO JAVIER PÉREZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DR. JUAN M. LUQUE
TUTOR DR. MANUEL CIFUENTES RUEDA

PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
2019



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Francisco Javier Pérez Martínez

 <http://orcid.org/0000-0003-4308-7719>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



TESIS DOCTORAL

NUEVOS MECANISMOS DE
SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADOS
POR REELINA EN EL CEREBRO
EMBRIONARIO Y ADULTO

Francisco Javier Pérez Martínez

Málaga, 2019

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
Facultad de Ciencias



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

NUEVOS MECANISMOS DE
SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADOS
POR REELINA EN EL CEREBRO
EMBRIONARIO Y ADULTO

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Málaga

Francisco Javier Pérez Martínez

Málaga, 2019

Director
Dr. Juan M. Luque

Tutor
Dr. Manuel Cifuentes Rueda



Don **Juan Manuel Luque Gálvez**, Doctor en Psicología y Don **Manuel Cifuentes Rueda**, Doctor en Biología, Catedrático de Universidad del área de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, ACREDITAN:

Que el trabajo que presenta Don **Francisco Javier Pérez Martínez**, con el título “**Nuevos mecanismos de señalización celular mediados por reelina en el cerebro embrionario y adulto**” ha sido realizado en el laboratorio de Neuroanatomía Molecular del Instituto de Neurociencias de Alicante y en el laboratorio del Área de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología bajo nuestra DIRECCIÓN y TUTORIZACIÓN y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos en Málaga, a 22 de enero de 2019

Fdo. Dr. Juan Manuel Luque Gálvez
(Director)

Fdo. Dr. Manuel Cifuentes Rueda
(Tutor)

"Who knows what the tide could bring?"

Chuck Noland - Cast away

CONTENIDOS

Agradecimientos	5
Índice de figuras y tablas	7
Abreviaturas	9
Índice general	13
Resumen	17
Abstract	19
Introducción	21
Objetivos	33
Material y Métodos	35
Resultados	55
Discusión	83
Conclusiones	103
Bibliografía	105
Adendas	123
Anexos	129
Breve <i>Curriculum Vitae</i>	201

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que hay tras estas páginas contiene una parte de mí. Para el que suscribe, esta Tesis Doctoral ha supuesto algo más que unos cuantos años de esfuerzo y tesón, porque la finalización de este proyecto ha requerido una implicación mucho más allá de lo estrictamente laboral; engloba algo más que la puesta por escrito de unos experimentos llevados a cabo entre las paredes de un laboratorio. Puedo asegurar sin dudar, que las tapas de este “libro” contienen en su interior una época de mi vida, el jugo resultante de exprimir mi persona y también el de alguna persona más que me ha acompañado en este largo periodo de tiempo.

Mi primer agradecimiento y el mayor de todos va para el Dr. Juan M. Luque, el director de esta Tesis sobrepasando unos límites que habrían hecho detenerse a cualquier otra persona y además, aunque no lo contemplé al conocernos, somos amigos, así de simple. Así que, Juan, GRACIAS.

Por extensión, debo y quiero agradecer la inestimable ayuda que nos ha brindado Isabel, la Dra. Isabel Río, una persona con una capacidad insólita para ver y entender lo que la inmensa mayoría de la gente ni vemos ni entendemos. Ella también es “culpable” de que esto haya salido adelante, junto con Álvaro.

Muchas son las personas de las que he aprendido a trabajar en un laboratorio, desde que empecé de un cero absoluto; su paciencia conmigo ha permitido que consiguiera desenvolverme entre tampones, anticuerpos y una infinidad de aparatos. En

el Instituto de Neurociencias de Alicante, he de destacar a los miembros del laboratorio de la Dra. Carmen de Felipe, Maca, Trini, Eva, Tony, con los que siempre me sentí muy a gusto y que me enseñaron tantas y tantas cosas básicas y no tan básicas. Ha habido, además, mucha gente dentro del Instituto que me ha ayudado en mayor o menor medida, un sinfín de personas que se han cruzado directa o indirectamente en mi camino y que, sinceramente, carece de sentido enumerar.

También deseo agradecer a algunos miembros del laboratorio del Dr. Takaki Miyata, Dra. Ayano Kawaguchi, Dr. Akira Sakakibara, Dra. Sayaka Minobe y Makoto Masaoka, quienes, pese a su frenético ritmo de trabajo, se volcaron conmigo durante mi estancia en Nagoya (Japón).

No me puedo olvidar de Paco, Darío, Yolanda, Sonia y Gonzalo del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández a quienes considero unos excelentes profesionales y, además, siempre se mostraron muy cercanos y accesibles.

Mención especial para el Dr. Manuel Cifuentes, tutor de este trabajo y pieza fundamental, quien ha facilitado que esta Tesis Doctoral haya visto al fin la luz.

Y qué decir de toda mi familia, los que están y los que no están, que me han dado siempre la libertad y el apoyo para que siguiera mis propios pasos y tomara las decisiones que me han llevado a estar donde estoy. Y, por qué no, a mí mismo por aguantarme y encontrar mi camino.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Rutas migratorias neuronales y formación de la placa cortical.....	22
Figura 2: Nichos neurogénicos del desarrollo embrionario y adulto.....	28
Figura 3: Estructura de Reelina.....	29
Figura M1: Construcción del bloque de inclusión en gelatina.....	36
Figura M2: Cirugía estereotáxica.....	46
Figura M3: El sistema Cre-lox (1).....	47
Figura M4: Inducción del sistema Cre-lox.....	48
Figura M5: Proceso de reconstrucción tridimensional de cerebros adultos de ratón con el software “Neurolucida”.....	50
Figura 4: Localización de FRRs en la corteza cerebral en desarrollo del ratón.....	55
Figura 5: ApoER2 es el principal receptor funcional expresado en la neocorteza embrionaria.....	56
Figura 6: Los FRRs están incrementados en la corteza cerebral del ratón <i>reeler</i>	57
Figura 7: Las NPCs corticales expresan ApoER2 funcional.....	59
Figura 8: Las NPCs corticales expresan receptores funcionales de Reelina.....	60
Figura 9: La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal.....	61
Figura 10: La reducción de ApoER2 rescata la migración neuronal en el mutante <i>reeler</i>	62
Figura 11: La bajo-regulación de ApoER2 rescata los niveles de Dab1 en <i>reeler</i> por sí sola.....	63
Figura 12: Rescate parcial del posicionamiento neuronal en los dobles mutantes <i>reeler/ApoER2^{+/-}</i>	64
Figura 13: Rescate parcial del patrón <i>inside-out</i> en <i>reeler</i> debido a la Reelina ectópica de las NPCs.....	65
Figura 14: Rescate parcial de la bajo-regulación de ApoER2 en <i>reeler</i> mediante la expresión de Reelina ectópica en NPCs a E17.....	66
Figura 15: Rescate parcial de la bajo-regulación de ApoER2 en <i>reeler</i> mediante la expresión de Reelina ectópica en NPCs a P0.....	67
Figura 16: Rescate parcial de los niveles de Dab1 por la expresión de Reelina ectópica en NPCs.....	67

Figura 17: El principal receptor de Reelina en los nichos neurogénicos del cerebro adulto de ratón es ApoER2	69
Figura 18: Lugares de expresión de receptores funcionales de Reelina en el cerebro adulto	70
Figura 19: Reelina se une a los principales tipos celulares del mayor nicho neurogénico adulto	71
Figura 20: Los FRR se expresan en la RMS	72
Figura 21: La señalización de Reelina permanece activa en la SVZ adulta.....	73
Figura 22: Incremento del volumen ventricular en mutantes relacionados con Reelina y su vía de señalización	74
Figura 23: La expresión ectópica de Reelina recupera la densidad de los cilios ependimales.....	75
Figura 24: Efectos de la ablación de Dab1 tras el tratamiento con tamoxifeno en ratones adultos.....	76
Figura 25: Rescate de la morfología de la RMS en el núcleo del bulbo olfatorio.....	76
Figura 26: Ablación condicional de Dab1	77
Figura 27: Expresión de Reelina ectópica en el ratón transgénico <i>nestin-Reelin</i> adulto .	77
Figura 28: Expresión de CRE recombinasa bajo el promotor de nestina en el cerebro adulto de ratón	78
Figura 29: Reelina modifica <i>in vivo</i> la migración de los neuroblastos.....	79
Figura 30: Reconstrucción tridimensional usando el software NeuroLucida.....	80
Figura 31: Cuantificación del área englobada en diferentes RMS, ventrículo y telencéfalo a partir de la reconstrucción tridimensional.....	81
Figura 32: La sobreexpresión de ApoER2 altera la morfología de las neuronas corticales.....	87
Figura 33: Modelo propuesto	89
Figura 34: Expresión de receptores funcionales de Reelina en P25	91
Figura 35: Los receptores funcionales de Reelina se expresan en la LGE.....	92
Figura 36: Especificación regional y temporal de tipos neuronales	97

LÍNEAS CRONOLÓGICAS

Timeline 1: Funciones de Reelina más relevantes propuestas hasta 2004	26-27
Timeline 2: Funciones de Reelina propuestas desde 2004 hasta la actualidad	30-31

TABLAS

Tabla 1: Secuencias de cebadores y programas de amplificación	52
Tabla 2: Anticuerpos primarios.....	53
Tabla 3: Anticuerpos secundarios.....	54

ABREVIATURAS

- ◆ ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ◆ AP: Fosfatasa alcalina
- ◆ AP-RR36: Proteína de fusión fosfatasa alcalina - fragmentos repetidos de Reelina 3 a 6
- ◆ ApoE: Apolipoproteína E
- ◆ ApoER2: Receptor 2 de la apolipoproteína E
- ◆ ARN: Ácido ribonucleico
- ◆ BLBP: *Brain lipid binding protein*
- ◆ BrdU: Bromodeoxiuridina
- ◆ CdK: Kinasa dependiente de Ciclina
- ◆ cm: Centímetro
- ◆ COS: Fibroblastos derivados de células de riñón de mono
- ◆ aCSF: líquido cefalorraquideo artificial
- ◆ CTR: Fragmento C terminal
- ◆ Dab1: *Disabled 1*
- ◆ DB: Dot Blot
- ◆ DCX: Doblecortina
- ◆ DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
- ◆ dNTP: Didesoxinucleótido trifosfato
- ◆ ECL: Electroquimioluminiscencia
- ◆ EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- ◆ EEO: Electroendosmosis
- ◆ EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada
- ◆ EZ: Zona endodimal
- ◆ FBS: Suero fetal bovino
- ◆ FRR: Receptores funcionales de Reelina

- ◆ GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía
- ◆ GFP: Proteína verde fluorescente
- ◆ HEK: Human embryonic kidney (riñón embrionario humano)
- ◆ HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- ◆ IHC: Inmunohistoquímica
- ◆ IP: Inmunoprecipitación
- ◆ IZ: Zona Intermedia
- ◆ kb: Kilobase
- ◆ kDa: KiloDalton
- ◆ KLH: *Keyhole limpet haemocyanin*
- ◆ LCR: Líquido cefalorraquídeo
- ◆ LGE: Eminencia Ganglionar lateral
- ◆ LV: Ventrículo Lateral
- ◆ M: Molar
- ◆ mA: MiliAmperio
- ◆ MBC: Beta-Caseína de Ratón
- ◆ MGE: Eminencia Ganglionar Medial
- ◆ ml: Mililitro
- ◆ MZ: Zona marginal
- ◆ μ l: Microlitro
- ◆ mM: Milimolar
- ◆ μ M: Micromolar
- ◆ MOM: Mouse on Mouse
- ◆ NPC: Células precursoras neurales
- ◆ OB: Bulbo olfatorio
- ◆ PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
- ◆ pb: Pares de bases
- ◆ PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
- ◆ PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
- ◆ PF: Paraformaldehído

- ◆ PSA-NCAM: Molécula de adhesión celular neural polisializada
- ◆ RMS: Ruta migratoria rostral
- ◆ rpm: Revoluciones por minuto
- ◆ SBH: Banda heterotópica subcortical
- ◆ SDS: Dodecil sulfato sódico
- ◆ SFK: Kinasa de la familia Src
- ◆ siRNA: *Small interference* RNA
- ◆ SNC: Sistema Nervioso Central
- ◆ SVZ: Zona Subventricular
- ◆ SEZ: Zona Subependimal
- ◆ UV: Ultravioleta
- ◆ V: Voltio
- ◆ VLDLR: Receptor de la lipoproteína de muy baja densidad
- ◆ VZ: zona ventricular
- ◆ WB: Western Blot
- ◆ WT: *Wildtype* (silvestre)

ÍNDICE GENERAL

Resumen	17
Abstract	19
Introducción	21
1. Contexto histórico	21
2. El cerebro en desarrollo: el patrón <i>inside-out</i>	22
3. Vía de señalización de Reelina	23
4. Caracterización de la función de Reelina	24
5. Continuidad de la señal de Reelina en adulto.....	25
Objetivos	33
Material y Métodos	35
1. Animales	35
2. Procedimiento de perfusión cardiovascular	35
3. Inclusión en bloque de gelatina	36
4. Tinción de Nissl	37
5. Inmunohistoquímica / Inmunofluorescencia.....	37
5.1. Protocolo general.....	37
5.2. Protocolo para doble Inmunofluorescencia con dos anticuerpos primarios del mismo huésped	37
5.3. Doble marcaje con análogos de Timidina.....	38
6. <i>Binding in situ</i> de la sonda AP- <i>Reelin</i>	38
6.1. Construcción del vector.....	38
6.2. Cultivo celular, transfección y validación de la sonda de fusión AP	39
6.3. Análisis AP <i>in situ</i>	39
6.4. Análisis de densidad semi-cuantitativo de la señal de AP-RR36	40
7. Electroporación <i>in utero</i> de siRNA.....	40
8. Cuantificación y análisis estadístico.....	41
9. Obtención de Reelina recombinante.....	41
10. Obtención de ADN plasmídico de Reelina (mini-maxi prep).....	42
11. <i>Dot blot</i> y <i>Western Blot</i>	43
12. Ensayo de fosforilación de Dab1 en tejido adulto / IP de Dab1	43

13. Cirugía estereotáxica para la infusión de Reelina recombinante con bombas osmóticas.....	45
14. Activación del Sistema CRE-LOX mediante administración de Tamoxifeno	46
15. Reconstrucción tridimensional de cerebros de ratón	49
16. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	51
17. Información detallada de genotipado	51
Resultados	55
CAPÍTULO I: EMBRIÓN.....	55
1. Receptores funcionales de Reelina en la corteza cerebral en desarrollo.....	55
2. Los FRR son más abundantes en la pared cortical de ratones <i>reeler</i>	57
3. Localización de ApoER2 funcional en NPCs (<i>neural precursor cells</i> , precursores neurales)	58
4. La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal	59
5. La reducción de los niveles de ApoER2 rescata la migración neuronal y los niveles de Dab1 en <i>reeler</i>	61
6. Rescate parcial de laminación cortical y de los niveles de ApoER2 y Dab1 mediante la expresión de Reelina en NPCs en <i>reeler</i>	62
6.1. Evaluación del posicionamiento neuronal	63
6.2. Evaluación de los niveles de ApoER2 y Dab1	65
CAPÍTULO II: ADULTO	68
1. La mayor densidad de receptores funcionales en el cerebro adulto de ratón se encuentra en la vía migratoria rostral	68
2. Colocalización en EZ/SEZ/RMS de FRR y subpoblaciones de prácticamente todos los tipos celulares del nicho neurogénico	68
3. La señalización de Reelina permanece activa en la SVZ adulta	71
4. La falta de función de Reelina, ApoER2, o Dab1 provoca hipercelularidad en la RMS y ventriculomegalia	73
5. Manipulación de la señalización.....	74
5.1. Ganancia de función de Reelina	74
5.2. La interrupción condicional de la señalización en progenitores aumenta el volumen ventricular y produce una hipercelularidad en la RMS.....	75
5.3. La infusión intraventricular de Reelina altera la migración en neuroblastos... ..	78
6. Reconstrucción tridimensional.....	79
Discusión	83
CAPÍTULO I: EMBRIÓN.....	83
1. AP-RR36 es una sonda fiable para la detección <i>in situ</i> de receptores funcionales de Reelina (FRR)	83
2. Expresión de FRR y lugar de acción de Reelina en la corteza cerebral.....	83
3. Localización de receptores funcionales de Reelina en células precursoras neurales	

durante el desarrollo embrionario	83
4. La bajo-regulación de ApoER2 rescata la migración neuronal y los niveles de Dab1 en <i>reeler</i>	85
5. La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal	85
6. Rescate parcial de laminación y de los niveles de Dab1 y ApoER2 por la expresión de Reelina en NPCs de ratones <i>reeler</i>	87
MODELO	89
CAPÍTULO II: ADULTO	91
1. La mayor densidad de receptores funcionales en el cerebro adulto de ratón se encuentra en la vía migratoria rostral	91
2. Colocalización de FRR en subpoblaciones de los tipos celulares de la EZ/SEZ/RMS	92
3. La señalización de Reelina permanece activa en la SVZ adulta	93
4. Manipulación genética de la vía de señalización de Reelina.....	94
5. Especificación regional y temporal de tipos neuronales.....	96
6. El líquido cefalorraquídeo como fuente de Reelina	98
MODELO.....	99
Conclusiones.....	103
Bibliografía	105
Adendas.....	123
Adenda 1: Vía de señalización de Reelina.....	125
Adenda 2: Nichos neurogénicos	126
Adenda 3: Vínculos neurogénesis-migración neuronal.....	127
Anexos.....	129
Artículo 1	131
Artículo 2	151
Artículo 3 (borrador)	165
Breve <i>Currículum Vitae</i>	201

RESUMEN

Nuevos mecanismos de señalización celular mediados por Reelina en el cerebro embrionario y adulto

La señalización de Reelina es esencial para el correcto desarrollo del cerebro de los mamíferos. Reelina se une al receptor 2 de apolipoproteína E (ApoER2) y al receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR) e induce la fosforilación de Dab1. Sin embargo, cuándo y dónde ocurren estas reacciones es en gran medida desconocido y la función o funciones primarias de Reelina siguen sin estar claras. Se sabe que Reelina y su maquinaria receptora son necesarias para la migración y el posicionamiento de las neuronas de proyección neocortical durante el desarrollo embrionario. Más recientemente, se ha demostrado que Reelina es necesaria y suficiente para determinar la tasa de neurogénesis neocortical. Pero los mecanismos moleculares subyacentes a sus aparentemente distintas funciones proliferativa y post-proliferativa siguen resultando oscuros. Igualmente resulta incierto si la señalización canónica de Reelina persiste afectando los nichos neurogénicos remanentes en el cerebro adulto.

Aquí, explotando diversos enfoques genéticos de pérdida y ganancia de función junto con una variedad de ensayos *in vivo* y *ex vivo*, investigamos la señalización de Reelina en el cerebro embrionario y adulto. Específicamente, desarrollamos y validamos una proteína de fusión entre fosfatasa alcalina y la región de unión a receptores de Reelina para investigar cuantitativamente la localización de los receptores funcionales de Reelina (FRR) [es decir, aquéllos presentes en la membrana plasmática en su forma madura]. Durante el desarrollo, en la corteza cerebral silvestre, están presentes principalmente en las zonas intermedia y subventricular, así como en fibras radiales, pero mucho menos en cuerpos celulares de la placa cortical. Los FRR son mucho más abundantes en la placa cortical de mutantes deficientes en Reelina, lo que indica que, en la corteza silvestre, Reelina induce la bajo-regulación de los FRR y que ésta comienza antes de que las neuronas emigren fuera de la zona intermedia. En el cerebelo silvestre, los FRR se localizan principalmente en la zona ventricular, pero están escasamente presentes en las células de Purkinje que han migrado fuera de ella.

Esto sugiere que Reelina ejerce acciones críticas sobre las neuronas de proyección migratorias en sus etapas iniciales y/o premigratorias en ruta hacia sus destinos finales, tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo en desarrollo. De hecho, revelamos una expresión enriquecida de FRR, fundamentalmente de ApoER2, en los procesos basales de la glía radial y en las células progenitoras intermedias durante el desarrollo cortical medio/tardío. *In vivo*, demostramos que la sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal. En contraste, la reducción de los niveles excesivos de ApoER2 en las cortezas deficientes en Reelina, ya sea mediante el noqueo genético de ApoER2 o por la expresión transgénica de Reelina en las células progenitoras neurales (NPC), mejora la migración y el posicionamiento neuronal. Estos resultados desvelan cómo se inicia la separación delicadamente orquestada de las

neuronas neocorticales de sus lugares de nacimiento, indicando que un mecanismo de bajo-regulación de ApoER2 dependiente de Reelina desacopla las neuronas recién nacidas de sus células progenitoras, lo que permite a las neuronas migrar.

En el cerebro adulto, demostramos que la señalización de Reelina, resultante en fosforilación de Dab1, ocurre en la zona endodimensional/subendodimensional (EZ/SEZ) de los ventrículos laterales donde, junto a su asociada ruta migratoria rostral (RMS) de neuroblastos que proporciona interneuronas al bulbo olfatorio, se acumula la mayor densidad de ApoER2. La zona subgranular del giro dentado hipocámpal, otro nicho neurogénico del cerebro adulto, también contiene ApoER2 funcional. Los ratones deficientes en Reelina, ApoER2 o Dab1 presentan ventrículos agrandados y una SEZ/RMS hiper celular. Además, mientras la ablación condicional de Dab1 en NPC adultos amplía los ventrículos y dificulta la salida de los neuroblastos de la SEZ, la expresión ectópica de Reelina en NPC de ratones deficientes en Reelina normaliza el lumen ventricular y la densidad de cilios endodimensionales, mejorando a su vez la migración de neuroblastos; consistentemente, la infusión intraventricular de Reelina recombinante en estos mutantes redirige los neuroblastos. Estos resultados indican que, actuando desde el líquido cefalorraquídeo, la señalización de Reelina persiste regulando el nicho neurogénico de los ventrículos laterales, modulando a su vez la diferenciación y el comportamiento migratorio de los neuroblastos a través del RMS. Tomadas en conjunto, nuestras observaciones apuntan hacia una acción universal y simple de Reelina tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto.

ABSTRACT

New Reelin signaling cellular mechanisms in the embryonic and adult brain

Reelin signaling is essential for correct development of the mammalian brain. Reelin binds to apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and very low-density lipoprotein receptor and induces phosphorylation of Dab1. However, when and where these reactions occur is largely unknown, and the primary function(s) of Reelin remain unclear. Reelin and its receptor machinery are well known to be required for the migration and positioning of neocortical projection neurons during embryonic development. More recently, Reelin has been shown both necessary and sufficient to determine the rate of neocortical neurogenesis. The molecular mechanisms underlying its seemingly distinct proliferative and post-proliferative functions remain equally unknown. Whether and, if so, how canonic Reelin signaling affects the adult brain neurogenic niches also remains uncertain.

Here, we explore both loss- and gain-of-function genetic approaches along with *in vivo* and *ex vivo* assays to investigate Reelin signaling in the developing and adult brain. Specifically, we developed and extensively validated an alkaline phosphatase fusion of the receptor-binding region of Reelin to quantitatively investigate the localization of functional Reelin receptors (FRR) [i.e., those on the plasma membrane as mature forms]. During development, in the wild-type cerebral cortex, they are mainly present in the intermediate and subventricular zones, as well as in radial fibers, but much less in the cell bodies of the cortical plate. FRR are much more abundant in the Reelin-deficient cortical plate, indicating that Reelin induces their downregulation and that it begins before the neurons migrate out of the intermediate zone. In the wild-type cerebellum, FRR are mainly present in the cerebellar ventricular zone but scarcely expressed by Purkinje cells that have migrated out of it. It is thus strongly suggested that Reelin exerts critical actions on migrating projection neurons at their early/premigratory stages en route to their final destinations, in the developing cerebral cortex and cerebellum. Indeed, we reveal an enriched expression of FRR, largely of ApoER2, in radial glia basal processes and intermediate progenitor cells during mid/late cortical development. *In vivo*, ApoER2 overexpression inhibits neuronal migration. In contrast, precluding excessive levels of ApoER2 in Reelin deficient cortices, by either ApoER2 knock-down or the transgenic expression of Reelin in neural progenitor cells (NPC), improves neuronal migration and positioning.

These data provide groundwork for the highly orchestrated clearance of neocortical neurons from their birth site, suggesting that a Reelin-dependent ApoER2 downregulation mechanism uncouples newborn neurons from progenitor cells, thereby enabling neurons to migrate. In the adult brain we show that Reelin signaling, resulting in Dab1 phosphorylation, occurs in the ependymal/subependymal zone (EZ/SEZ) of the lateral ventricles where, along with its associated rostral migratory stream (RMS) of neuroblasts becoming interneurons for the olfactory bulb, the highest density of functional ApoER2 accumulates. The subgranular

zone of the hippocampal dentate gyrus, another neurogenic niche of the adult brain, also contains functional ApoER2. Mice deficient for Reelin, ApoER2 or Dab1 exhibit enlarged ventricles and hypercellular SEZ/RMS. Moreover, while the conditional ablation of Dab1 in adult NPC enlarges the ventricles and impairs neuroblasts clearance from the SEZ, the transgenic misexpression of Reelin in NPC of Reelin-deficient mice normalizes the ventricular lumen and the density of ependymal cilia, ameliorating in turn neuroblasts migration; consistently, intraventricular infusion of Reelin reroutes neuroblasts. These results indicate that, acting from the cerebrospinal fluid, Reelin signaling persists sustaining neurogenesis in the germinal niche of the lateral ventricles, influencing in turn the differentiation and migratory behavior of neuroblasts through the RMS. All together, our observations point to a universal and simple action of Reelin in both the developing and adult brain.

INTRODUCCIÓN

1. Contexto histórico

El sistema nervioso es la estructura biológica más compleja existente en la naturaleza. La primera cita conocida que trata sobre su existencia e importancia data del siglo XVI antes de Cristo: en el caso 31 del Papiro Edwin Smith, los médicos egipcios ya describieron que una dislocación cervical, acompañada de flaccidez de las extremidades, era “una dolencia que no debía ser tratada”. A pesar de los avances médicos que esta civilización logró, la curación de una lesión medular estaba fuera de su alcance. Christopher Reeve, el actor que encarnó a Superman, murió el 10 de octubre de 2004 tras 9 años luchando por recuperarse de la lesión medular causada por la fractura de sus dos primeras vértebras cervicales. En este tiempo, puso todo su empeño físico y su fortuna para mantener una tonificación muscular que le permitiera volver a caminar, confiando en que viviría lo suficiente para someterse a algún tratamiento exitoso, derivado de la investigación con células madre.

A lo largo de los casi 4000 años que nos separan de la civilización egipcia se han conseguido descubrimientos biomédicos tan asombrosos como innumerables pero, en lo que se refiere al entendimiento del sistema nervioso, todavía estamos muy lejos de llegar a comprender los misterios que envuelve semejante interconexión de circuitos neuronales.

La complejidad de la configuración cerebral obliga a especializar al máximo las

áreas de investigación. En este trabajo, nos centramos en el estudio de la migración neuronal y la neurogénesis; dos eventos que, tradicionalmente, se han tratado en la práctica totalidad de la literatura como sucesos completamente independientes, pero que nuestro estudio sobre la función de la proteína Reelina logra acercar para entenderlos como partes de un mismo engranaje.

La función y el desarrollo del cerebro requieren la génesis, migración y maduración coordinada de todos sus componentes celulares. La proteína Reelina, producto del gen *Reln*, ha sido identificada como una de las moléculas con mayor capacidad de determinación sobre la migración neuronal, jugando también un papel muy importante en los procesos de maduración celular y función sináptica, entre otros. Sólo recientemente, se han revelado evidencias que apuntan a que estos complejos mecanismos no serían completamente independientes, sino que Reelina, en unión a otras moléculas, podría actuar vinculando la neurogénesis, la especificación neuronal y la migración, como partes de un único programa.

El ratón *reeler* (carente de la proteína Reelina) es bien conocido desde hace décadas. Este ratón es uno de los mutantes neurológicos más estudiados, con una literatura que se extiende a más de 60 años. Fue Douglas Scott Falconer quien, en 1951, describió por primera vez el ratón *reeler*, al cual bautizó así por su peculiar paso (*reel*, en castellano, significa tambalearse).

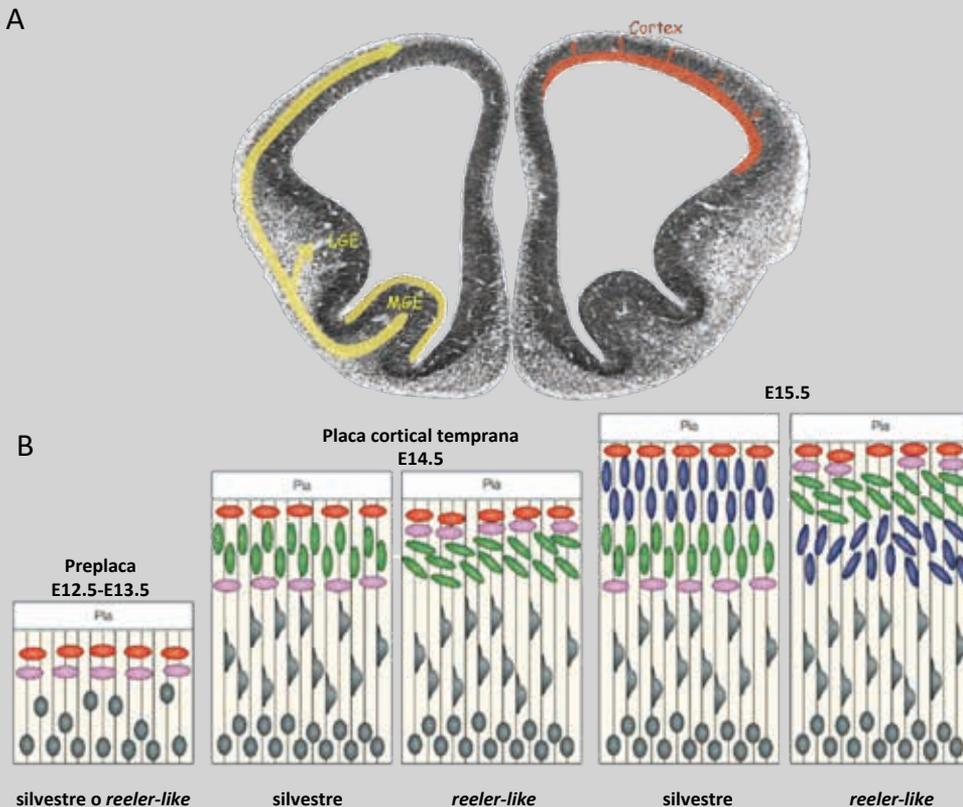
Los ratones *reeler* muestran un posicionamiento celular desordenado en la mayoría de las estructuras laminadas del cerebro, incluyendo la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo.

2. El cerebro en desarrollo: el patrón *inside-out*

En el ratón, las neuronas nacen entre los días embrionarios 10 y 17 (E10-E17). En este cerebro en desarrollo, las nuevas neuronas migran siguiendo dos trayectorias distintas (Fig. 1A). Alrededor del 80% de todas las neuronas migran de forma radial desde

la zona ventricular (VZ, *ventricular zone*, nicho neurogénico embrionario donde se encuentran las células progenitoras neurales, NPCs, *neural precursor cells*) y comienzan a generar capas de la corteza cerebral según un patrón arquitectónico en *inside-out* (Fig. 1B). Cohortes de neuronas destinadas a capas concretas nacen durante el mismo marco temporal y las capas corticales pueden identificarse por el momento en que nacieron las neuronas que las forman. Las células que nacen antes ocupan capas más profundas, más cercanas a la zona ventricular, mientras que las células más tardías ocupan capas más

Figura 1 | Rutas migratorias neuronales y formación de la placa cortical (modificado de Tissir and Goffinet, 2003 y Goffinet, 2006)



(A) Sección coronal del cerebro de un embrión de ratón en el día 12.5 de gestación (estadio de preplaca), que muestra las eminencias ganglionares lateral y medial (en sus siglas en inglés, LGE y MGE), de las que las interneuronas GABAérgicas migran tangencialmente hacia el primordio cortical (izquierda, amarillo). Las neuronas glutamatérgicas destinadas a la corteza se generan localmente en la zona ventricular cortical y migran de forma radial (derecha, rojo). (B) En el día 13.5 de desarrollo embrionario las neuronas pioneras migran para formar una red horizontal. Algunas son reelin positivas (rojo) y otras negativas (rosa). En este estadio, el fenotipo *reeler* no se puede apreciar. En E14.5, al crecer la complejidad del sistema, las células migran a lo largo de las fibras de la glía radial. La primera cohorte de neuronas se ubica en la placa cortical (verde), partiendo la preplaca en dos. La preplaca *reeler* no se divide en dos, acumulándose las neuronas bajo la ahora llamado superplaca. En E15.5, una segunda cohorte de neuronas (azul) migra a través de la placa cortical normal y se establece por encima de las anteriores, formando el gradiente *inside-out* normal, mientras que en un cerebro *reeler*, la segunda cohorte ocupa capas más profundas (gradiente *outside-in*).

superficiales (Angevine y Sidman, 1961); de este modo, las neuronas que se han generado más tarde en el desarrollo tienen que migrar atravesando las capas de neuronas tempranas hasta alcanzar su posición final. Cuando las neuronas alcanzan su destino, extienden largos procesos para conectar con las regiones de interés. Estas neuronas, del tipo glutamatérgico excitatorio, son las llamadas neuronas de proyección.

La segunda trayectoria de migración es la que fundamentalmente llevan a cabo, tangencialmente, neuronas nacidas en la eminencia ganglionar medial (MGE, *medial ganglionic eminence*; Fig. 1A). Estas neuronas migran a la corteza, donde se convierten en interneuronas de carácter inhibitorio (GABAérgicas) integrándose entre las neuronas de proyección (Anderson et al., 1997; Lavdas et al., 1999, Morest y Silver, 2003; Flames, 2004; Kriegstein y Noctor, 2004).

Tanto las neuronas de proyección como las interneuronas se ensamblan en la placa cortical. Esta estructura tiene un antecesor, la preplaca, una capa transitoria compuesta por una población heterogénea de neuronas, nacida entre E10 y E12 en el ratón (Bayer y Altman, 1990), localizada entre la zona ventricular y la piamadre. Las neuronas de proyección e interneuronas se van introduciendo en medio de esta capa, llevando a cabo un proceso conocido como *partición de la preplaca*. Las neuronas que la forman se ven entonces segregadas en la capa marginal (formada por las células Cajal-Retzius, productoras de Reelina, [Ogawa et al., 1995] y otras células pioneras) y la subplaca, todavía heterogénea.

En la corteza *reeler*, las neuronas migrantes no llegan a partir la preplaca (Sheppard y Pearlman, 1997) y las cohortes de neuronas que se generan posteriormente se “acumulan” tras las que se han generado con anterioridad (Fig. 1B, *reeler-like*), invirtiéndose, casi en su totalidad, el

orden normal de laminación de capas corticales (Caviness y Sidman, 1973).

Pero esto no ocurre únicamente en los ratones *reeler*; se han descrito otros mutantes que exhiben fenotipos similares de desorganización celular y ataxia por hipoplasia cerebelar (*reeler-like*). Tal es el caso de, por ejemplo, los mutantes *yotari* y *scrambler*, que muestran total ausencia o muy bajos niveles de la proteína Dab1 (*Disabled 1*), respectivamente (Sheldon et al., 1997). De igual modo, el doble mutante nulo para los receptores ApoER2 y VLDLR también comparte características fenotípicas con el *reeler* (Trommsdorff et al., 1999).

3. Vía de señalización de Reelina

Estos descubrimientos permitieron avanzar en el estudio de la vía de señalización de Reelina. Su vía canónica de señalización está bien caracterizada, gracias a la valiosa contribución a este campo de los miembros de los laboratorios de Jon Cooper, Tom Curran, André Goffinet, Joachim Herz, Brian Howell y Johannes Nimpf, los cuales han proporcionado la mayoría de los datos bioquímicos al respecto. Los componentes fundamentales y canónicos de la vía son (información detallada de la vía de señalización de Reelina en *Adenda 1*):

- ▷ El ligando: Reelina (que forma homodímeros para su unión al receptor).
- ▷ Los receptores: ApoER2 y VLDLR.
- ▷ El adaptador intracelular: Dab1
- ▷ Cascada de señalización: Dab1, una vez fosforilado por SFK's (quinasas de la familia de Src), interacciona con numerosos complejos de proteínas que se traducen finalmente en organización de microtúbulos, transporte vesicular, migración neuronal, laminación, entre otros.

Reelina promueve la fosforilación así como la degradación de Dab1. Esta

observación demuestra por qué la proteína Dab1 se acumula en el cerebro *reeler*, doble mutante ApoER2/VLDLR y doble mutante Fyn/Src (Kuo et al., 2005; Sheldon et al., 1997; Trommsdorff et al., 1999), así como en los cerebros de los que expresan una forma no fosforilable de Dab1 (Howell et al., 2000). La reconstitución de estos componentes en una línea celular de fibroblastos es suficiente para reconstituir la vía de señalización de Reelina (Mayer et al., 2006). Sin embargo, a pesar del detallado conocimiento bioquímico de esta vía de señalización y de los efectos morfológicos que provoca Reelina en la migración neuronal, la laminación cortical y diferenciación, los mecanismos moleculares por los que Reelina regula estos procesos a un nivel celular siguen sin conocerse.

4. Caracterización de la función de Reelina

La función mejor caracterizada de Reelina es el control de la migración neuronal radial y la formación de capas celulares durante la etapa prenatal del desarrollo. La formación de capas es una característica distintiva de todas las estructuras corticales incluyendo la corteza, el hipocampo y el cerebelo.

La observación de que la formación de las capas en todas las estructuras corticales del cerebro está alterada en los mutantes *reeler* y *reeler-like* demuestra que Reelina y su vía de señalización son cruciales para esta función (Caviness y Sidman, 1973; Caviness, 1973; Goffinet, 1983). Sin embargo, los mecanismos exactos que gobiernan la formación de las capas siguen sin entenderse completamente. De hecho, se han propuesto varios papeles para Reelina durante el desarrollo neocortical, en ocasiones contradictorios. Este extremo queda patente cuando, en el año 2002, el laboratorio de Tom Curran publica los resultados obtenidos al forzar la expresión de Reelina de forma ectópica en precursores neurales, bajo el promotor de nestina (Magdaleno et al., 2002). En este artículo hay algunos

resultados muy llamativos, como el rescate de la ataxia en los ratones *reeler* transgénicos, debido al rescate parcial de la laminación del cerebelo. Pero también deja entrever que la asignación de funciones concretas a Reelina no es tarea fácil, indicando que Reelina no actuaría simplemente como una señal posicional durante el desarrollo del cerebro, sino que parece desencadenar diversas respuestas sobre las neuronas en migración, dependiendo del contexto en el que éstas se encuentren. Es más, sus resultados sugieren que el papel de Reelina en el desarrollo cerebral debe ser reinterpretado. Los resultados de este estupendo trabajo estimularon sobremanera la investigación de nuestro grupo (Luque et al, 2003; Lakoma et al, 2011) y, más concretamente, los inicios de esta Tesis Doctoral.

Sus resultados demuestran que, sobre un fondo *reeler*, la Reelina ectópicamente expresada bajo el promotor de nestina (ratón *ne-Reelin*) es capaz de inducir la fosforilación de Dab1 en la zona ventricular y rescatar algunos de los fenotipos neuroanatómicos del *reeler*. De hecho, algunas neuronas de los ratones *reeler* transgénicos son capaces de sobrepasar la subplaca. Esto supone un punto de inflexión porque, hasta el momento, se daba por hecho que Reelina sólo surtía efecto en neuronas postmitóticas de la placa cortical, lo que sugiere que el mecanismo de la función de Reelina es más complejo de lo que se había propuesto hasta el momento (*Timeline 1*). Además, los tipos celulares específicos que expresan los elementos de la vía de señalización en la zona ventricular no estaban establecidos. Tampoco existe en este momento un trabajo que recoja la expresión de Reelina en embrión y en adulto y sólo hay disponibles datos parciales sobre el sistema de recepción de Reelina. El receptor es un elemento fundamental de una vía de señalización puesto que confiere la especificidad a la señal. Sin embargo, no hay sondas ni anticuerpos totalmente fiables ni caracterizados que reconozcan

indubitablemente el/los receptor/es de Reelina. De hecho, se llegó a proponer que la protocadherina CNR1 era un co-receptor de Reelina (Senzaki et al., 1999), lo cual fue específicamente testado y refutado por los resultados del grupo de André Goffinet (Jossin et al., 2004).

En general, no es fácil determinar la localización y la cantidad total de receptores funcionales de un determinado ligando. La hibridación *in situ* del ARN puede ser altamente específica y sensible, pero difícilmente proporciona información sobre la localización subcelular de la proteína y tampoco refleja la cantidad de proteína madura. El análisis inmunohistoquímico se complica a menudo por la reactividad cruzada del anticuerpo con otras proteínas y productos procesados o de degradación de la proteína de interés. Además, cuando hay más de una molécula receptora ejecutando funciones similares estas técnicas no permiten la determinación de sus cantidades “totales” porque la intensidad de las señales derivadas de diferentes sondas o anticuerpos no pueden ser cuantitativamente comparadas o acumuladas.

En el caso de los receptores de Reelina, la evidencia genética sugiere que ApoER2 y VLDLR funcionan principalmente de manera redundante (Trommsdorff et al., 1999), aunque cada uno de ellos puede tener sus propias funciones específicas (Benhayon et al., 2003; Hack et al., 2007). Por otra parte, ApoER2 se une a Reelina con más fuerza que VLDLR (Andersen et al., 2003), complicando aún más la interpretación. La utilización de sondas de fusión con fosfatasa alcalina (AP) es un método sensible y fácil para cuantificar las interacciones proteína-proteína en el medio extracelular (Flanagan et al., 2000). Nosotros desarrollamos y empleamos aquí una proteína de fusión AP con la principal unidad de *binding* al receptor de Reelina (dominios 3 a 6) [AP-RR36] para localizar la cantidad total de receptores funcionales de

Reelina (FRR, *functional Reelin receptors*) en el cerebro de ratones de tipo silvestre y en ratones mutantes. En relación a la validación de la proteína de fusión AP-RR36, mencionar que la proteína asociada a receptor (*receptor-associated protein* [RAP]) es un ligando común para los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) capaz de bloquear la interacción entre Reelina y ApoER2 o VLDLR (Herz et al., 1991; Andersen et al., 2003). Usamos por ello una proteína de fusión Glutathion S transferasa-RAP (GST-RAP) para descartar la posibilidad de que nuestra sonda AP-RR36 se ligue a moléculas que no sean receptores de lipoproteínas.

5. Continuidad de la señal de Reelina en adulto

La neurogénesis en los estadios embrionario y adulto del ratón resulta ser un proceso continuo a medida que se van revelando el linaje de las células precursoras neurales (NPC) y la conservación de muchas vías de señalización intrínsecas (revisado por Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; Ming y Song, 2011). El origen y las características de señales extrínsecas aún puede rebatir esta idea.

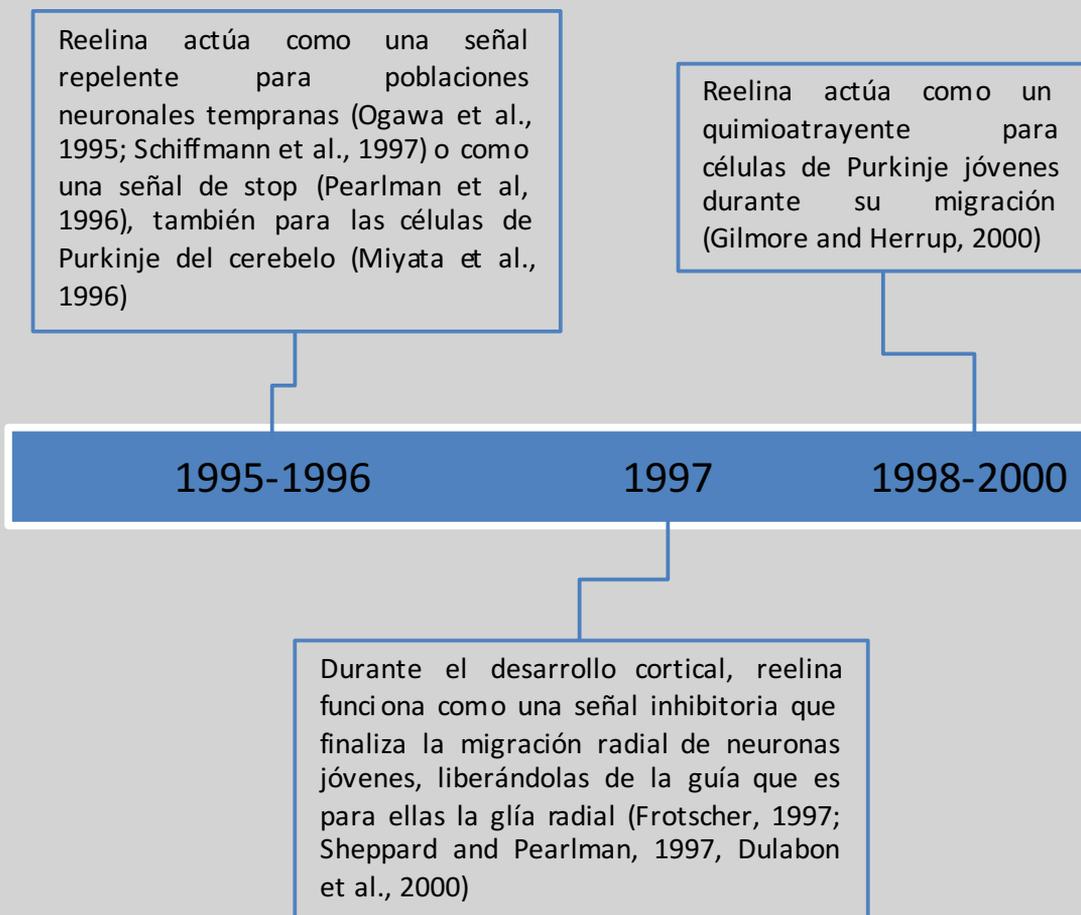
La glía radial durante el desarrollo y una subpoblación de astrocitos derivados de la glía radial en el cerebro adulto son considerados como las células fundadoras de la mayoría, si no de todos, los linajes neurales del Sistema nervioso central (SNC). Estas células madre neurales experimentan distintos tipos de división celular, dando lugar a la diversidad de tipos celulares macrogliales y neuronales del SNC (revisado por Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). En particular, las células neurales no actúan en sus lugares de nacimiento, sino que llevan a cabo migraciones más o menos extensas.

La neurogénesis adulta activa ocurre mayoritariamente en dos regiones restringidas en el cerebro: la zona endodivisional/

subependimal (EZ/SEZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del hipocampo. La EZ/SEZ de la pared de los ventrículos laterales constituye el mayor nicho neurogénico del cerebro mamífero adulto (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2011; información detallada de nichos neurogénicos en Adenda 2). Contiene multitud de poblaciones celulares incluyendo endimocitos que delimitan el ventrículo y astrocitos subependimales cuyo comportamiento es considerado como el de una célula madre

neural (las llamadas células tipo B). Las células tipo B dan lugar a células tipo C que son activamente proliferativas, funcionando como progenitores intermedios. Las células C a su vez generan neuroblastos inmaduros (células tipo A), las cuales migran formando cadenas a través de la vía migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio (OB), donde se diferencian en interneuronas granulares y periglomerulares (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch et al., 1999; Carleton et al., 2003; Brill et al., 2009).

Timeline 1 | Funciones de reelina más relevantes propuestas hasta 2004



Otras Funciones

*Sinaptogénesis y el correcto desarrollo dendrítico (Del Rio et al., 1997; Miyata et al., 1997; Ohshima et al., 2001; Rice et al., 2001; Niu et al., 2004; Yabut et al., 2007).

*Regulación de la plasticidad neuronal y modulación de los procesos de aprendizaje y memoria (Impagnatiello et al., 1998; Pesold et al., 1998, 1999; Guidotti et al., 2000; Rodriguez et al., 2000, 2002; Weeber et al., 2002).

Las células tipo B y C están también estrechamente asociadas a vasos sanguíneos y a la gran matriz extracelular circundante (Mercier et al., 2002; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Las células tipo B mantienen importantes propiedades de células de la glía radial, consideradas a su vez las células madre neurales durante el desarrollo cerebral. Por ejemplo, sus cuerpos celulares están ubicados generalmente justo bajo capa celular de la zona endosomal, pero tienen cortos procesos que se extienden a través del epéndimo con pequeñas terminaciones apicales sobre

el ventrículo que contactan con el líquido cefalorraquídeo (LCR). Por tanto, la zona subependimial puede ser considerada como una especie de neuroepitelio desplazado (nicho neurogénico esquematizado en figura 2). De manera interesante, la migración de los neuroblastos es paralela al flujo del líquido cefalorraquídeo y el batir del cilio endosomal es necesario para un flujo normal del LCR, la formación de un gradiente de concentración de moléculas del LCR y la migración direccional de los neuroblastos (Sawamoto et al., 2006).

En adulto, se ha propuesto que reelina actúa como una señal de despegamiento para los precursores de interneuronas que migran en cadena, constituyentes de la RMS, provocando el cambio de una migración tangencial colectiva a una migración radial individual desde el núcleo del bulbo olfatorio, final de la RMS, hacia las capas externas del mismo (Hack et al., 2002)

La proteína tenascina-R inicia también el despegamiento de los neuroblastos de sus cadenas y su migración radial dentro del bulbo olfatorio (Saghatelian et al., 2004). Sorprende la similitud de esta función con la propuesta para reelina en 2002 por Hack et al.

2001-2002

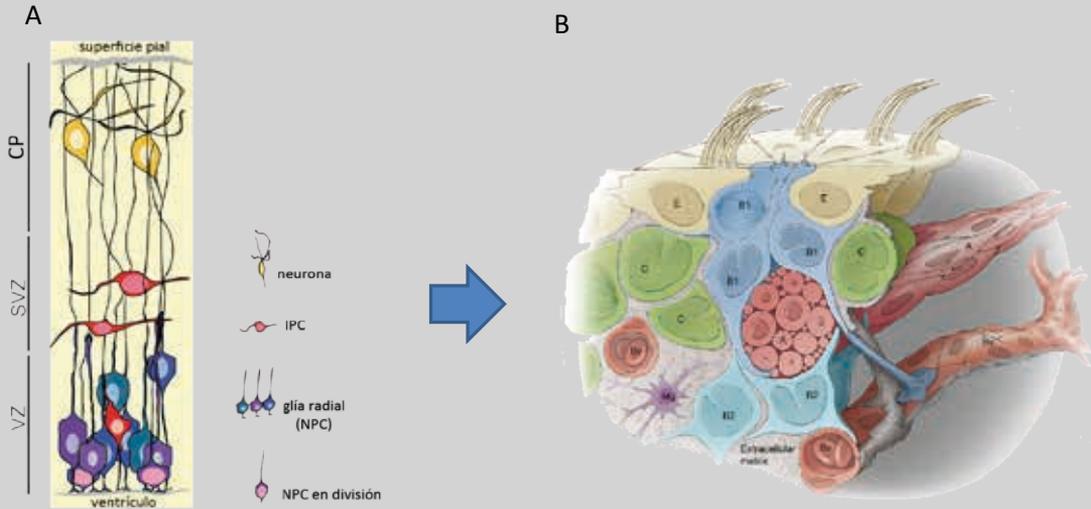
2002-2004

El trabajo del laboratorio de Tom Curran utilizando un ratón con expresión ectópica de reelina para evaluar sus efectos, indica que es poco probable que reelina funcione como una señal de parada o como un quimioatrayente (Magdaleno et al., 2002)

A pesar de estos y otros logros bioquímicos y genéticos, aún se desconoce el modo en que esta vía se relaciona con el comportamiento in vivo de las células nerviosas durante la migración. No existe un modelo coherente de la función de reelina (aunque ya existen más de 500 entradas en Pubmed)

*Implicación en varias enfermedades neurológicas y psiquiátricas, incluyendo esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, autismo y enfermedad de Alzheimer (Impagnatiello et al., 1998; Fatemi et al., 2001, 2002, 2005; Guidotti et al., 2000).

Figura 2 | Nichos neurogénicos del desarrollo embrionario y adulto



(A) Microambiente de las células madre neurales embrionarias. La complejidad del plato cortical (CP) aumenta a medida que se desarrolla el cerebro, debido a la generación de diferentes tipos neuronales y la aparición de una densa red de vasos sanguíneos (Herken et al., 1989). Paralelamente también se observa un incremento en la complejidad de la zona ventricular (VZ) (Pinto and Gotz, 2007), aunque esto no es estructuralmente obvio porque la VZ está dominada por células de la glía radial de diferentes subtipos con algunos progenitores intercalados (Gal et al., 2006, Hartfuss et al., 2003). La zona subventricular está dominada por los progenitores intermedios (IPCs), derivados de la glía radial (modificado de “The neural stem cell microenvironment” de Kazanis et al., 2008). (B) Ilustración que resume avances recientes en el entendimiento del nicho EZ/SEZ adulto. La zona ventricular apical se muestra arriba. Las células endoteliales (E) son multiciliadas, y los cuerpos basales de estos cilios están orientados en la dirección del líquido cefalorraquídeo. Forman estructuras en rueda alrededor del proceso apical de las células tipo B1, quienes extienden un cilio no móvil al ventrículo. Las células tipo B2 tienen características astrocíticas y no contactan con el ventrículo. Las células amplificadoras transitorias (tipo C) se encuentran asociadas a las tipo B y también cerca de los vasos sanguíneos (Bv). Los neuroblastos (células tipo A) migran tangencialmente en cadenas convergiendo en la ruta migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio. [Mg, macrogía de la matriz extracelular, también incluida en la EZ/SEZ] (Modificado de Rhie and Álvarez-Buylla, 2011).

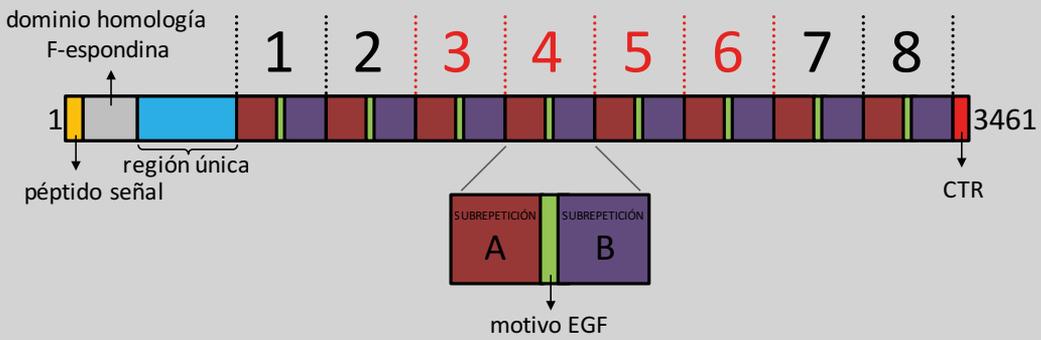
La conservación de varias vías de señalización intrínsecas subyace al remarkable parecido entre la neurogénesis embrionaria y adulta, aunque el origen y la naturaleza de señales extrínsecas puede que sea diferente (revisado por Ming y Song, 2011). Un rango de morfógenos, incluyendo Notch, varias Efrinas y receptores de Efrinas, factores de crecimiento, neurotrofinas, citoquinas, neurotransmisores y hormonas han sido identificados como importantes elementos extracelulares con un papel en la neurogénesis adulta (revisado por Ming y Song, 2011; Zhao et al., 2008; Jang et al., 2008).

Existe un conocimiento más bien limitado de las señales extracelulares que controlan la migración neuronal dirigida durante la neurogénesis adulta, o sobre las relaciones moleculares que conectan la neurogénesis y la migración (información

detallada en *Adenda 3*). Se sabe que unas cuantas moléculas de adhesión (como $\beta 1$ -integrin, PSA-NCAM y tenascin-R) y señales extracelulares (como neuroregulinas y slits) regulan la estabilidad, motilidad o direccionalidad de la migración neuronal durante la neurogénesis de la EZ/SEZ (revisado por Lledó et al., 2006; Ming y Song, 2005).

La glicoproteína secretable Reelina (Fig. 3) y su maquinaria de señalización son requeridos para un correcto desarrollo cerebral, afectando a la migración neuronal y a la posición de varios linajes neuronales. Como se ha mencionado anteriormente, la unión de Reelina al Receptor 2 de la Apolipoproteína E (ApoER2) o al receptor de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) induce la fosforilación del adaptador citoplásmico Disabled 1 (Dab1), produciendo una cascada de transducción de

Figura 3 | Estructura de reelina



Reelina es una glicoproteína secretable de la matriz extracelular, compuesta por 3461 aminoácidos con un péptido señal escindible, varios lugares potenciales de glicosilación y 8 fragmentos repetidos del tipo EGF (Epidermal Growth Factor) (D'Arcangelo et al., 1997). In vivo, reelina se escinde en 3 fragmentos por la existencia de dos lugares de corte, entre las repeticiones 2-3 y entre las repeticiones 6-7, si bien la función propia de cada uno de ellos se desconoce. Lo que sí se sabe es que la porción central (fragmento correspondiente a las repeticiones 3 a 6, aminoácidos del 1220 al 2664) es capaz de recapitular las funciones de la proteína completa, uniendo sus receptores ApoER2 y VLDLR, induciendo la fosforilación de Dab1 y rescatando un fenotipo *reeler* tras aplicar reelina recombinante a rodajas de cerebro embrionario *reeler* (Jossin et al., 2004).

señalización de tirosina quinasas y un recambio regulado de Dab1. De hecho, el ratón *reeler* (deficiente en Reelina) y los mutantes nulos para Dab1 o ApoER2/VLDLR muestran defectos de posicionamiento comparables (Rice y Curran, 2001; Tissir y Goffinet, 2003; Luque, 2007; Cooper, 2008). Sin embargo, Reelina no funciona simplemente como una señal de posicionamiento, si no que parece participar en múltiples procesos críticos para la migración neuronal y el posicionamiento celular (Magdaleno et al., 2002).

El ARNm y la proteína Reelina se expresan en altos niveles en las capas superficiales de las estructuras corticales embrionarias (Alcántara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Schiffmann et al., 1997). Las células de Cajal-Retzius de la zona marginal de la corteza, el *stratum lacunosum moleculare* del hipocampo, y la capa marginal externa del giro dentado son las fuentes mayoritarias de Reelina en la corteza embrionaria y el hipocampo postnatal temprano. Las células granulares jóvenes de la capa granular

externa del cerebelo embrionario y postnatal temprano también sintetizan altos niveles de Reelina. El patrón de expresión de Reelina, sin embargo, cambia dramáticamente durante el desarrollo postnatal. En el cerebro adulto, esta proteína ya no queda confinada a capas corticales superficiales, sino que se expresa en todas las capas de la corteza y el hipocampo por un subgrupo de interneuronas GABAérgicas (Alcantara et al., 1998; Pesold et al., 1998). En el bulbo olfatorio, se ha descrito la presencia de Reelina en algunas células periglomerulares de la capa glomerular, algunas células en penacho (*tufted cells*) de la capa plexiforme externa y, en mayor medida en las células mitrales (Valero et al., 2007). Además, se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo, encontrándose en el órgano subcomisural (SCO, uno de los órganos circunventriculares), altos niveles de expresión de Reelina.

Nuestro grupo ha demostrado que, durante el desarrollo cerebral, Reelina, actuando por encima de la señalización de Notch, es necesaria y suficiente para

Timeline 2 | Funciones de reelina propuestas desde 2004 hasta la actual

Regulación del posicionamiento de las células granulares del hipocampo (Heinrich et al., 2006); Implicación en la neurogénesis y reducción de la susceptibilidad a sufrir daño cerebral por un isquemia en el cerebro adulto (Won et al., 2006)

Reelina regula la tasa de neurogénesis a través de Notch (Lakomá et al., 2011); regulación autónoma-celular de la migración y desarrollo dendrítico de las neuronas hipocampales adultas (Teixeira et al., 2012). Reelina media el despegamiento de los neuroblastos para pasar de la RMS al bulbo olfatorio a través de ApoER2 (Hellwig et al., 2012).

2006

2007

2009-2010

2011-2012

Regulación del equilibrio entre neurogénesis y gliogénesis en el hipocampo adulto (Zhao et al., 2007); la función de los receptores ApoER2/VLDLR y Dab1 en la RMS es independiente de reelina (Andrade et al., 2007); roles divergentes mediados por ApoER2 o VLDLR, promover o detener la migración neuronal respectivamente (Hack et al., 2007). La vía de señalización de reelina opera exclusivamente en algunos linajes neuronales para regular la migración (Luque, 2007).

Reelina es requerida para la migración en cadena de las NSC (Massalini et al., 2009); modulación de la organización del citoesqueleto a través de Rho GTPasas (Leemhuis et al., 2010); intensificación de la potenciación a largo plazo (LTP) (Pujadas et al., 2010).

La señalización de reelina juega un papel crítico en la especificación de la dendrita distal y la modulación de la actividad sináptica (Park and Curran, 2014).

Recientemente se ha propuesto en hipocampo que reelina podría atraer las células granulares en migración, determinando su dirección, por su acción sobre el citoesqueleto a través de cofilina (Wang et al., 2018).

2013

2014

2017

2018

En las zonas germinales, reelina retrasa la migración neuronal y altera sus trayectorias (Britto et al., 2014).

Reelina es un componente importante en la orientación y migración dirigida de las neuronas corticales y en su correcta laminación (Frotscher et al., 2017). Reelina promueve la adhesión entre neuronas en cultivo (Matsunaga et al., 2017). Por otro lado, existen descritas varias funciones no-neuronales (Revisado en Khialeeva and Carpenter, 2017).

determinar la tasa de neurogénesis cortical (Lakoma et al., 2011). También se requiere esta interacción para la migración y el posicionamiento neuronal (Hashimoto-Torii et al., 2008). Por lo tanto, esta función temprana de Reelina en el compartimento proliferativo puede subyacer su requerimiento post-proliferativo, abriendo la posibilidad de que actúe acoplado la neurogénesis y la migración neuronal, quizás de una forma más parecida a una señal permisiva que a una señal instructiva para la migración celular. De hecho, un mecanismo de bajoregulación de ApoER2 dependiente de Reelina desacopla las nuevas neuronas de los NPCs, lo que habilita a las neuronas para migrar (Pérez-Martínez et al., 2012, Artículo 2).

Resaltando la dificultad de establecer un modelo coherente para la función de Reelina, en los últimos años ha habido un gran número de estudios que han proporcionado evidencias contradictorias, tales como si Reelina juega o no un papel durante la neurogénesis y migración celular adulta y, si es así, cuál. (Kim et al., 2002; Hack et al., 2002; Won et al., 2006; Zhao et al., 2007; Heinrich et al., 2006; Andrade et al., 2007; Gong et al., 2007; Simo et al., 2007; Blake et al., 2008; Massalini et al., 2009; Pujadas et al., 2010; Courtès et al., 2011; Teixeira et al., 2012 [Esquematzado en *Timeline 2*]).

Uno de los mensajes que quiere transmitir la primera parte de este trabajo es que Reelina, en contra de lo que hasta ahora se venía postulando, actúa en estadios neuronales muy tempranos de la corteza en desarrollo, ya en etapas premigratorias. Por lo tanto, se reta la concepción generalizada de que la vía de señalización de Reelina funciona una vez las neuronas de proyección han alcanzado la placa cortical, puesto que hay un gran enriquecimiento en la expresión de receptores funcionales de Reelina en la región ventricular/subventricular (VZ/SVZ), donde residen las células precursoras neurales

(NPCs). Además, se sugiere que Reelina bajo-regula el receptor, siendo principalmente ApoER2 (si no exclusivamente) el que expresan las neuronas premigratorias y conjeturamos que también las NPCs durante el desarrollo neocortical medio/tardío.

En una segunda parte del trabajo, usamos aproximaciones de pérdida y ganancia de función con ensayos *in vivo* y *ex vivo* para investigar si la señalización de Reelina persiste en el nicho germinal de los ventrículos laterales del cerebro adulto. Nuestros resultados sugieren que la señalización de Reelina permanece activa en la EZ/SEZ y es necesaria y suficiente para modular este nicho neurogénico. También sugieren que la Reelina presente en el LCR, actuando por encima de ApoER2 y Dab1, regula la integridad y funcionalidad del epéndimo ventricular, las NPCs circundantes y eventualmente el comportamiento migratorio de los neuroblastos a lo largo de la RMS (información adicional sobre fuentes de Reelina en *Adenda 4*). Tomados en conjunto, nuestros resultados apuntan hacia una acción universal y simple de Reelina en el cerebro en desarrollo que continúa en la edad adulta.

En vista de todo lo anterior, nuestra **hipótesis general de trabajo** explica, de forma tentativa, que más allá de un estricto requerimiento para la migración neuronal durante el desarrollo cerebral embrionario, la señalización mediada por Reelina conformaría una maquinaria maestra que, de forma universal y simple, regularía los diversos aspectos de la neurogénesis (incluyendo la migración, una expresión específica de la diferenciación neural) en los múltiples linajes neurales sensibles a su acción, tanto durante el desarrollo cerebral embrionario como en los nichos neurogénicos remanentes en el cerebro adulto. Dicha hipótesis de trabajo resulta experimentalmente contrastable, al menos en los términos en que se aclara en los objetivos de esta Tesis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Explorar nuevos mecanismos de señalización celular mediados por la proteína Reelina, tanto durante la neurogénesis embrionaria como en los nichos neurogénicos remanentes en el cerebro adulto y determinar si los mismos permanecen conservados.

Objetivos concretos

- 1.- Desarrollar y caracterizar la proteína de fusión AP-RR36 (fosfatasa alcalina-dominios de Reelina 3 a 6) para, evaluando su marcaje, determinar la localización de receptores funcionales de Reelina [FRR] (i.e., aquéllos presentes en su forma madura en la membrana celular).
- 2.- Estudiar la señalización mediada por Reelina en los esbozos de la corteza cerebral y el cerebelo durante el desarrollo embrionario y determinar en qué estadios celulares ejerce su acción.
- 3.- Examinar los efectos de la carga de las formas maduras del receptor de Reelina ApoER2 en la membrana plasmática.
- 4.- Determinar el mecanismo por el cual las nuevas neuronas de proyección se separan de sus células progenitoras y comienzan su migración hacia su destino final en la corteza, para discriminar si Reelina actúa como una señal permisiva o instructiva.
- 5.- Estudiar si la señalización mediada por Reelina persiste en el cerebro adulto.
- 6.- Determinar desde dónde actúa Reelina analizando uno de los principales nichos neurogénicos, como es la zona endodivisional y subendodivisional del sistema compuesto por los *ventrículos laterales-vía migratoria rostral-bulbo olfatorio* del cerebro adulto.
- 7.- Establecer si la señalización mediada por Reelina regula la neurogénesis a través de un mecanismo conservado que abarque desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los procedimientos experimentales con animales se han llevado a cabo según la legislación española (RD 1201/2005, modificado por el RD 53/2013), de la Unión Europea (2010/63/EU) o según la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Institute of Laboratory Animal Resources, The National Academies, USA*).

Los ratones silvestres de la cepa B6C3 se obtuvieron de la compañía Harlan (Harlan Laboratories, Inc. Indianapolis). Las líneas de mutantes usadas para los experimentos de esta tesis fueron obtenidas gracias a la generosidad de los siguientes investigadores: ratones transgénicos *nestin-Reelin* (Dr. Tom Curran), mutantes *reeler* (Dr. Masaharu Ogawa y Dr. Eduardo Soriano), mutantes ApoER2 (B6;129S6-Lrp8tm1Her/J) y VLDLR (B6;129S7-Vldlrm1Her/J) (Dr. Johannes Nimpf), ratón transgénico Nestin^{CreERT2} (Dr. Gord Fishell) y ratón mutante condicional Dab1 cKIneo (Dr. Brian Howell).

2. Procedimiento de perfusión cardiovascular

La anestesia utilizada para proceder a la perfusión de los ratones consta de una inyección mezcla 2:1 de ketamina:xilacina a razón de 100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se inyectó intraperitonealmente la dosis para cada ratón según su peso y, tras comprobar la ausencia de sensibilidad a estímulos mecánicos, se procedió a la perfusión, realizando un corte en la región ventral, bajo la caja torácica, para tener acceso al corazón.

La perfusión cardiovascular se realiza en un primer momento introduciendo una solución de lavado (PB 0.1 M. PB: Stock I: 0.5M Na₂HPO₄; Stock II: 0.5M NaH₂PO₄. 77,4 ml de Stock I + 22.6 ml de Stock II) a través del ventrículo izquierdo del corazón, para después abrir paso a una solución de Paraformaldehído al 4% en PB. En este procedimiento no se utilizaron bombas peristálticas, sino que se usó la fuerza de la gravedad.

Una vez perfundido se extrae el cerebro y se introduce en la misma solución fijadora durante 48 horas, a fin de producir una fijación total y uniforme (postfijación). Entonces se cambia el medio a una solución crioprotectora (PB 1X, 30% Sacarosa, 0.05% Azida de Sodio). La sacarosa ha de infiltrarse en el tejido para proteger la integridad celular en el momento de la congelación y corte en secciones.

Para la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas en cerebros embrionarios se llevaron a cabo diferentes métodos de fijación, dependiendo del estadio de desarrollo de los animales. Para embriones de 14 días (E14), una vez extraídos del útero materno, se extrajeron los cerebros y directamente se procedió a su inmersión en 4% Paraformaldehído durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se cambió esta solución por una al 20% de Sacarosa en tampón fosfato para su crioprotección. Su conservación se realizó a 4 °C.

En cambio, cuando interesaban estadios de desarrollo posteriores como E18 o P0 (día postnatal 0), los animales fueron perfundidos cardíacamente con 4% paraformal-

dehído y postfijados en la misma solución durante una o dos noches, respectivamente. Una vez pasado este período de tiempo también se crioprotegieron en misma solución de sacarosa empleada anteriormente.

3. Inclusión en bloque de gelatina

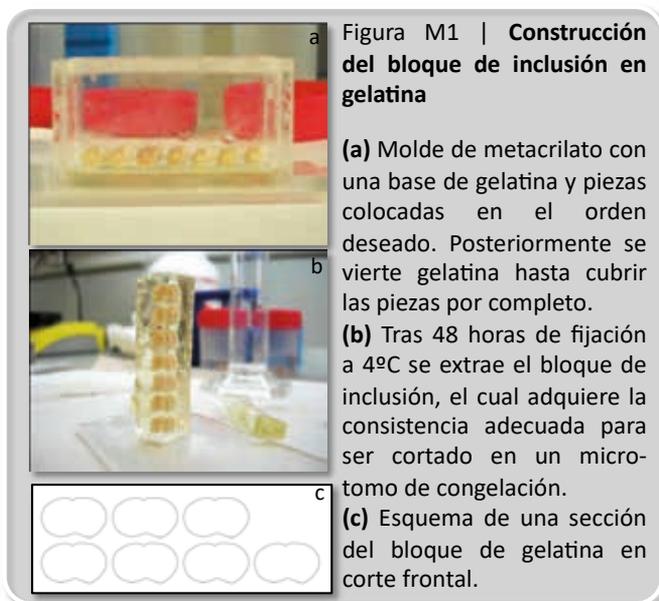
Para una mayor homogeneidad y capacidad de comparación de las secciones, se ha desarrollado un método de inclusión en gelatina, en bloques en los que pueden incluirse hasta 7 cerebros de ratón adulto para corte frontal o sagital. El bloque ha de fijarse para que adquiera una consistencia suficiente como para soportar el proceso inmunohistoquímico. Para ello se introduce en una solución fijadora durante 2 días (4% Paraformaldehído, 30% Sacarosa en PB; Heimer y Robards, Neuroanatomical Tract-Tracing Methods, 1981).

El bloque está compuesto de una solución de gelatina al 13,6%, 29,5% Sacarosa y H₂O. En primer lugar se disuelve la sacarosa en el agua y posteriormente, poco a poco se va vertiendo la gelatina (de piel de cerdo, fluka 04055) bajo constante agitación. La mezcla se incuba en un tubo de 50 ml bien sellado en un baño a 60 °C durante 30 minutos. Una vez la solución está homogénea, se ha de verter un poco en un molde de metacrilato (Figura M1a) y esperar a que endurezca a 4 °C (unos 5 minutos, para que no se solidifique demasiado y después se separe de la siguiente capa al cortarlo). Posteriormente se ponen el/los cerebro/s en la base solidificada del molde en la orientación deseada (es recomendable poner una gotita de la mezcla en la base del cerebro para facilitar su sujeción a la superficie) y volver a poner a 4 °C otros 5 minutos. Después de que el cerebro esté firmemente adherido a la base, se vierte lentamente el resto de la mezcla de gelatina, evitando

la formación de burbujas. Para facilitar el reconocimiento de las secciones una vez cortado el bloque, lo que hicimos fue disponer los cerebros de forma asimétrica durante la elaboración, es decir, una primera “planta” con 4 cerebros y una segunda con 3 (Fig. M1c).

Tras unos 20 minutos a 4 °C, se extrae el bloque del molde y se introduce en una solución crioprotectora durante 3 noches (4% Paraformaldehído y 30% sacarosa en PBS). Una vez pasado ese tiempo, la consistencia del bloque es la adecuada para cortarse en el criotomo (Fig. M1b); si no se va a cortar, el bloque puede conservarse en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato.

El bloque se corta entonces en secciones de 50 µm de grosor, utilizando un microtomo de congelación (Microm HM430). Las secciones se recogen en placas de 24 pocillos con KPBS. Este método nos permite tener hasta 7 secciones de tejido en una única gran sección flotante. Ofrece varias ventajas, como la de poder comparar diferentes genotipos a niveles anatómicos muy similares en los que se han dado exactamente las mismas condiciones de incubación de anticuerpos; también permite seriar con facilidad.



4. Tinción de Nissl

Una vez tuvimos los bloques de gelatina previamente desarrollados, todas las secciones cortadas al micrótopo de congelación fueron recogidas seriadamente, de forma que 1 de cada 5 secciones fue separada para realizar posteriormente una tinción Nissl.

Para llevar a cabo esta tinción, en primer lugar se montaron las secciones de los bloques de gelatina en los portas, y se dejaron secar 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se introdujeron en una cubeta con 200 ml de violeta de cresilo durante 10 minutos. Acto seguido, se eliminó el exceso de violeta mediante un rápido pase en agua. El siguiente paso fue la diferenciación con una solución de etanol 70% y ácido acético glacial 0.3%, durante 2-3 minutos. A partir de este momento se llevó a cabo una deshidratación total de las secciones mediante una serie de pases de 2 minutos en alcoholes de creciente graduación: etanol 70%, 96%, absoluto. Por último se introdujeron en Xilol hasta el momento de su montaje con el medio permanente Depex.

5. Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia (IF)

5.1. Protocolo general

Las secciones se lavaron 3 veces en el tampón KPBS ($0.37\text{M K}_2\text{HPO}_4$, $0.17\text{M K}_2\text{HPO}_4$, 0.63M NaCl , pH 7.4, H_2O) durante 15 minutos. Para el revelado con Diaminobenzidina (DAB, Sigma), es necesario inactivar la peroxidasa endógena con 3% de Peróxido de Hidrógeno durante (Sigma) 30 minutos, lavando nuevamente 3 veces con KPBS. En cambio, para realizar inmunofluorescencia, este paso no es necesario hacerlo, y directamente bloqueamos los sitios inespecíficos de unión con suero durante 1 hora (10% Suero, 0.025% Tritón X100, Sigma). Tras este paso se incuban las secciones con el anticuerpo primario (1%

suero, 0.025% Tritón X100) durante toda la noche a temperatura ambiente. A otra serie de tres lavados le siguió la incubación durante 2 horas con el anticuerpo secundario (con 1% de Suero). Tras una nueva serie de lavados, necesitamos un paso extra de incubación con el Complejo Avidina-Biotina (ABC, Vector) durante 90 minutos, para acoplar la peroxidasa a los mismos, mediante un puente avidina-biotina y poder llevar a cabo el revelado con Diaminobenzidina (DAB). Por último, se aplicó otra serie de lavados previa a revelar con una solución de 0.05% DAB y 0.032% H_2O_2 en KPBS durante 10 minutos. Éste último paso se obvia cuando se trata de Inmunofluorescencia.

Los cerebros de animales P0 fueron cortados usando un micrótopo de congelación a $50\ \mu\text{m}$, mientras que los cerebros E14 y E18 se cortaron en secciones de $16\ \mu\text{m}$ usando un criostato.

Para la detección de análogos de timidina, es necesario incorporar un paso adicional de desnaturalización del ADN usando HCl 2N con sus correspondientes 3 lavados, previo a la incubación con la solución de bloqueo. Pueden montarse entonces las secciones en portas convencionales. Se dejaron secar una noche y se montaron con el medio permanente de montaje Depex, previa deshidratación en etanol de progresiva graduación, empezando por Etanol 70%, 96%, Absoluto (2 minutos por cubeta) y por fin en Xilol.

5.2. Protocolo para doble IF con dos primarios del mismo huésped

Para la realización de esta doble inmunofluorescencia necesitamos el siguiente protocolo de 3 días:

- Anticuerpos primarios: rTbr1, rCux1.
- Anticuerpos secundarios: Cy2-Goat anti-rabbit, Cy3-Goat anti-rabbit.

Se realizó el bloqueo con 10% suero normal de oveja (NSS, *normal sheep serum*) 1 hora a temperatura ambiente) y se incubó toda la noche con rCux1 (1:50) en 1% NSS, 0.05% Triton x-100 (temperatura ambiente). Entonces se lavó 3 veces con KPBS durante 15 minutos. Incubamos con Cy2-*goat anti-rabbit* en 1% NSS (2 horas, TA) y se lavó de nuevo. El siguiente paso es crítico, puesto que se necesitan bloquear los sitios de unión del anticuerpo primario y secundario que quedan libres con 10% Suero normal de conejo (suero del mismo huésped en que se elaboraron los anticuerpos primarios) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se lava nuevamente, esta vez 4 veces 15 minutos en KPBS para eliminar totalmente los posibles restos de IgG para el paso siguiente, que es la incubación con un exceso de Fragmentos ab (Fab) de anticuerpo sin conjugar diseñados en la especie donde está producido el anticuerpo secundario y para unirse a los anticuerpos producidos en la especie del anticuerpo primario, por lo tanto, *Goat anti-rabbit* sin conjugar, toda la noche a 4 °C en 1% NSS. Posteriormente se lava 3 veces 15 minutos en KPBS. Posteriormente se bloqueó con 10% NSS durante 1 hora a temperatura ambiente y acto seguido se añadió en anticuerpo rTbr1 (dilución 1:100, en 1% NSS, 0.05% Triton x-100 a temperatura ambiente durante toda la noche). Tras una nueva serie de lavados se incubó con Cy3-*Goat anti-rabbit* en 1% NSS (2 horas a temperatura ambiente). Finalmante, realizamos una tinción nuclear con usando 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI).

5.3. Doble marcaje con análogos de Timidina

Para la inmunodetección de los análogos de Timidina, es necesario introducir un paso adicional en el protocolo estándar de inmunofluorescencia, como es la desnaturalización de las hebras de DNA con HCl 2N para que los análogos de timidina (BrdU, CldU o IdU) puedan

tener acceso a las mismas y se incorporen a ellas. Concretamente, para comprobar si se da rescate de la laminación en la placa cortical que queda por encima de la subplaca ectópica en el cerebro de los *reeler-Reelin* (transgénicos), administramos Clorodeoxiuridina intraperitonealmente en el 13^{er} día de desarrollo embrionario (E13) (Sigma, a razón de 41.66 mg/kg) y 24 horas más tarde Iododeoxiuridina (Fluka, 58.33 mg/kg) en hembras de ratón preñadas heterocigóticas para Reelina. La camada al completo se sacrificó al nacer (P0), perfundiéndose cardiovascularmente y genotipándose para el gen *Reln*.

6. *Binding in situ* de la sonda AP-*Reelin*

6.1. Construcción del vector

Los vectores de expresión para la proteína de fusión de Fosfatasa Alcalina-Reelina (AP-RR36) se construyeron sobre el plásmido pAPtag-5 (GenHunter) (Flanagan et al., 2000). La región de repeticiones de Reelina (*Reelin Repeats*, RR) se definió según un alineamiento computerizado (Ichihara et al., 2001). El constructo de cDNA de Reelina, pCrl (D'Arcangelo et al., 1997) se usó como plantilla para la amplificación por PCR. Para la construcción del vector de expresión para la fusión de AP y el fragmento central de Reelina, el fragmento de DNA codificante de la mitad N-terminal de la tercera región repetida de Reelina (RR3) se amplificó por PCR con los cebadores CCAGTCGACACTAGTACTTTGCCCCAGAACTTCTATG y GGTCTAGAATTCCTCTATAAGGACATC (los sitios de reconocimiento de Sall y XbaI están subrayados). El producto amplificado se digirió con Sall y XbaI y subclonado en pAPtag-5 (pAP-RR3A). Separadamente, el fragmento de DNA codificante para la mitad C-terminal de RR3 hasta el C-terminal de RR6 se amplificó con los cebadores CTTGGCCTGAAGTGTACG y CCTCTAGAGCCCGAGATGAGGACATTG (el sitio de XbaI está subrayado) y el producto am-

plicado fue entonces subclonado en pCrl digerido con BspEI y XbaI. Este vector fue digerido con XbaI y, subsiguientemente se insertaron un linker de DNA codificante para el epítipo FLAG (DYKDDDDK) y un codón de *stop*. Este vector por lo tanto, codifica una proteína truncada de Reelina que termina en el final del RR6 con el epítipo FLAG en su C-terminal. Finalmente, el fragmento AgeI/XbaI se escindió de este vector y subclonado en el pAP-RR3A digerido con las mismas enzimas, para generar el vector de expresión para AP-RR36. Todas las secuencias de expresión se verificaron mediante secuenciación de DNA. Los plásmidos de expresión de ApoER2 (Nakano et al., 2007), VLDLR y Dab1 (Morimura et al., 2005) han sido previamente descritos.

6.2. Cultivo celular, transfección y validación de la sonda de fusión AP

Células COS-7 y HEK293T se cultivaron en DMEM (Sigma) con 10% suero fetal de ternera (Equitech-Bio) y penicilina (5000 U/ml)/estreptomycin (5 g/ml) (Invitrogen). La transfección se realizó empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las proteínas de fusión AP se expresaron en células HEK293T. Los sobrenadantes se recogieron a los 2-3 días, se filtraron y suplementaron con azida de sodio (0.1% final). La concentración total de AP se determinó como se ha descrito previamente (Flanagan et al., 2000). La preparación del sobrenadante del cultivo conteniendo Reelina, SDS-PAGE y *Western blot* se llevaron a cabo según Nakano et al., (2007). Para la medida cuantitativa de la unión de AP-RR36 a células COS-7 o a cultivos primarios de neuronas corticales de ratones reeler, las células se incubaron con AP-RR36 y AP-control, lavadas e inactivadas por calor. Fueron entonces incubadas con el *buffer* de revelado [3.4 mg/ml sustrato de fosfatasa de Sigma (sal de 4-nitrophenyl fosfato disódico hexahidratado), 1 M dietanolamina, pH 9.5, y 0.5 mM MgCl₂], durante 20 minutos a

temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 500 mM de EDTA y se midió la densidad óptica a 405nm. Los valores de AP-control se sustrajeron de los de AP-RR36.

6.3. Análisis AP-*in situ*

Todos los procedimientos se llevaron a cabo esencialmente como están descritos en Flanagan et al., 2000 y Uchida et al., 2009. Los cerebros embrionarios o adultos en fresco se cortaron con un vibratomo VT1000S (Leica Microsystems, Nusslock, Alemania) en secciones de 200 μ m de grosor. Para obtener rodajas de tejido embrionario de alta calidad se hace necesaria la inclusión de los cerebros frescos en una agarosa de bajo punto de fusión, evitando la formación de burbujas y volteando repetidas veces el cerebro tras la inmersión, de forma que la inclusión sea total y homogénea. Este paso posibilita el corte de este tejido embrionario tan frágil.

Las secciones sin fijar se incubaron con AP-RR36 o AP-Control durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 6 veces durante 5 minutos con tampón HBAH (*Hanks' balanced salt solution* conteniendo 0.5 mg/ml albúmina de suero bovino, 0.1% (peso/volumen) Na₂N₃, y 20 mM HEPES) y fijadas con una solución a base de acetona/formaldehído durante 2 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con tampón HEPES (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0), calentado 1 hora a 65 °C para inactivar la AP endógena y lavadas con tampón AP (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9.5). Las células o las secciones se revelaron durante 45 minutos con 0.17 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) y 0.33 mg/ml de nitroazul tetrazolio (NBT) en tampón AP a temperatura ambiente.

Para poder llevar a cabo una doble detección mediante inmunofluorescencia de la localización de la proteína de fusión AP-RR36 junto con otras de interés, se hizo necesario introducir algunas modificaciones

en este protocolo original. La primera de ellas es que la fijación de las secciones se realizó con 4% Paraformaldehído durante 10 minutos, debido a que la fijación con acetona/formaldehído no es compatible con una inmunodetección adecuada. La inactivación de la fosfatasa alcalina endógena y la incubación con el reactivo NBT/BCIP también se obviaron, ya que la actividad enzimática de la proteína no va a ser requerida para la detección mediante anticuerpos. En su lugar, tras el paso de fijación, se aplicó un protocolo de inmunofluorescencia estándar como el descrito anteriormente.

6.4. Análisis de densidad semi-cuantitativo de las señal de AP-RR36

El análisis semi-cuantitativo de la intensidad de la señal de AP-RR36 se llevó a cabo usando la versión básica del programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Se utilizó un área de 1278.98 unidades arbitrarias² y se distribuyó aleatoriamente sobre las fotografías 3 veces por encima y 3 por debajo de la posición estimada de la subplaca (en +/rl, +/rl ne-*Reelin* y rl/rl ne-*Reelin*) y 3 veces únicamente por debajo de la superplaca (en caso de *reeler*). Mediante la herramienta “caja de densidad” (*density box*) se obtiene el valor medio de la intensidad de la señal de AP-RR36 dentro del área dibujada, dentro del rango 0 a 255 (blanco absoluto a negro absoluto de cada píxel). Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, California).

7. Electroporación *in utero* de siRNA

La electroporación *in utero* fue llevada a cabo en embriones de ratón de 14 días de gestación con un fondo genético *reeler*, como se ha descrito con anterioridad (Tabata y Nakajima, 2001). En los animales control, se inyectaron 90 ng/μl de un plásmido codificante para la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Pro-*

tein) en el ventrículo lateral, mientras que en el grupo de animales experimental, se procedió a coelectroporar 1 μg/μl de un ARN de interferencia pequeño (*small interfering RNA*), que tiene como diana el producto transcripcional del gen *lrp8*, para interferir en la expresión del receptor 2 de la Apolipoproteína E (ApoER2), bajando los niveles de traducción de la proteína cualitativamente.

La cuantificación de la intensidad de la señal de Dab1 en las células electroporadas se realizó usando el programa informático de libre acceso ImageJ, del organismo *National Institute of Health*.

El estudio del posicionamiento neuronal en corteza de embriones a los 18 días de desarrollo se realizó usando el programa NeuroLucida. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS.

Para este estudio se estableció la edad de 14 días de desarrollo embrionario (E14) para realizar la electroporación y 18 días de desarrollo para el análisis (E18). Como control, se electroporaron a E14 madres gestantes heterocigotas y homocigotas para *Reelina* (+/rl, rl/rl) con el plásmido EGFP únicamente. Se permite que los embriones se desarrollen hasta E18, momento en que son extraídos del útero y perfundidos con una solución 4% Paraformaldehído. Los cerebros se cortaron coronalmente en secciones de 16 μm en un criostato a -20 °C. Del mismo modo, varios embriones E14 *reeler* se electroporaron con plásmido EGFP y el ARN de interferencia. Este ARN (s69322), se obtuvo de la compañía AMBION, perteneciendo a la categoría de “ARN prediseñados seleccionados y validados”, teniendo su diana en el producto transcripcional del gen *lrp8*.

La concentración del plásmido EGFP usada fue de 90 ng/μl, mientras que la concentración final del ARN de interferencia fue de 1 μg/μl (basándonos en la publicación de Bonnin et al., 2007), en un volumen final

de $\approx 2 \mu\text{l}$, inyectado en uno de los ventrículos laterales del embrión. Para verificar que la solución había penetrado en el lugar correcto, se usó 10% “Fast Green” como colorante. Una vez comprobado esto, se aplicaron 5 pulsos de 28 voltios durante 50 ms y 950 ms de intervalo, mediante un electroporador CUY21E (Nepa Gene CO., LTD., Japón).

8. Cuantificación y análisis estadístico

La cuantificación de la intensidad de la señal de Dab1 se llevó a cabo mediante el programa informático gratuito ImageJ (del *National Institute of Health* americano). Todas las fotografías se tomaron en un microscopio de la marca Nikon Eclipse 80i con el sistema Optigrid. Las condiciones de captura del programa de imagen *Volocity* fueron idénticas en todas las fotografías, así como los ajustes de brillo y contraste en el programa ImageJ. En este programa, la herramienta “Analizar partículas” (condiciones: tamaño del pixel 2 10-300 y 0-1 circularidad) nos sirvió para crear una plantilla sobre el canal verde de cada fotomicrografía que contenía los bordes de todas las células electroporadas (expresión de EGFP), reconocidas por el programa. Posteriormente, esta plantilla se pegó sobre el canal rojo (expresión de Dab1), de forma que pudiera ser medida la intensidad media de la señal de Dab1 en cada célula electroporada, con valores entre 0 y 255.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete de software SPSS, con la ayuda de la Dra. Isabel Río, Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII).

Interesaba conocer si la diferencia en la intensidad promedio de la señal de Dab1 entre los datos obtenidos de la electroporación con el plásmido codificante para EGFP sólo y la electroporación conjunta con siRNA es estadísticamente significativa.

Para comparar dos medias con la prueba *t de Student* es preciso asumir que

las varianzas en los dos experimentos son iguales. Al análisis de las varianzas se le conoce como prueba de *Levene*. Una vez introducidos los datos en el programa, el primer paso que éste ejecuta es la prueba de *Levene* para comprobar si puede asumirse o no la igualdad de varianzas. En este caso, para nuestros datos, sí puede asumirse que las varianzas son iguales, por eso podemos realizar una *t de Student* convencional.

Al realizar la comparación de la densidad promedio de señal Dab1 en dos condiciones: Sólo GFP vs. GFP+siRNA, SPSS indica que la comparación de los datos de promedio es estadísticamente significativa: $p\text{-valor} < 0.001$.

9. Obtención de Reelina recombinante

Para este procedimiento, se utilizaron células HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, riñón embrionario humano 293) y COS7 (células CV-1 de riñón del mono verde africano modificadas genéticamente con material genético del virus SV40), a modo de ensayo para observar en qué línea celular se obtienen mejores resultados. Las células se descongelaron rápidamente en 2 ml de medio que contiene DMEM, 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Suero Fetal Bovino) y 1:100 penicilina/estreptomicina, previamente atemperado a 37 °C. Se centrifuga durante 4 minutos a 1000 rpm, suficiente para enviar al fondo las células para poder cambiar el medio, ya que el medio de congelación contiene DMSO, tóxico para ellas. Se resuspendieron en el mismo medio de cultivo y se sembraron en un frasco de cultivos de 25 cm². Cuando se alcanzó la confluencia deseada, se tripsinizaron durante 1 minuto, tras 2 lavados con PBS (el suero inactiva la tripsina).

Según el protocolo de transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), para la superficie de 1,9 cm² que tiene el pocillo de una placa de 24, han de sembrarse 2×10^5 células el día anterior a la transfección. Al

día siguiente, se cambió el medio a Optimem suplementado con glutamax, un medio de suero reducido, y sin antibiótico, medio recomendado para la transfección.

Se mezcló 1, 2 ó 3 μ l de ADN y se llevaron hasta 50 μ l de Optimem por un lado y 2 ó 3 μ l de Lipofectamina 2000 hasta otros 50 μ l de Optimem según correspondía. Tras 5 minutos se juntaron los medios que irían a cada pocillo y se dejaron 20 minutos agitando suavemente cada 5 minutos. Posteriormente se vertieron los 100 μ l de mezcla a cada pocillo y se añadieron 400 μ l más de Optimem, hasta un volumen final de 500 μ l. Tras 24 horas se cambió el medio de transfección por el medio de cultivo habitual con DMEM, FBS y antibiótico. Se recogieron 200 μ l de medio condicionado a los 2, 4 y 6 días posttransfección, para determinar también el pico de producción. La presencia de Reelina se identificó mediante un ensayo de *Dot blot*. Una vez identificada la mejor combinación se procedió a realizar otro experimento de transfección en una única placa de cultivo de 10 cm. Mediante *Western blot* se comprobó que la proteína no estaba degradada y que daba el característico patrón de 3 bandas (180, 250 y 400 kDa) con el anticuerpo monoclonal G10 (cedido por el Dr. André Goffinet), según D'Arcangelo et al., 1999, correspondientes a diferentes isoformas de Reelina.

Dado que la concentración a la que se obtiene esta Reelina recombinante es bastante baja, para rellenar las bombas osmóticas en el experimento de infusión de Reelina en el sistema ventricular del ratón adulto, se procedió a concentrarla mediante un sencillo método químico con Sulfato Amónico ((NH₄)₂SO₄, Scharlau AM0401)). Para ello, los medios condicionados obtenidos de los cultivos celulares se llevan hasta el 45% de concentración de sulfato amónico, añadiendo una solución 4,1 M en constante agitación y a 4°C. Tras 30 minutos, la solución se centrifugó a 12.000 rpm

durante 30 minutos a 4°C. El precipitado recogido se resuspendió en aCSF (líquido cefalorraquídeo artificial, cuya receta está disponible en la página web de ALZET, fabricante de las bombas osmóticas).

10. Obtención de ADN plasmídico de Reelina (mini-maxi prep)

La transfección de las células HEK293 y COS7 requiere una cierta cantidad de plásmido codificante para Reelina de la que no se disponía. El Dr. Johannes Nimpf (Viena), nos proporcionó amablemente el plásmido pCrl (vector pCDNA3, Invitrogén, con un inserto de 10,55 kb correspondiente a la secuencia codificante de Reelina, D'Arcangelo et al., 1997). Para comprobar si el plásmido estaba íntegro y tenía el tamaño esperado, primero se realizó una Mini-Prep. De este modo también conoceremos si las bacterias SURE y DH5 α eran competentes. Para hacerlas competentes se utilizó el método de Electroporación. Se añade 1 μ l de plásmido resuspendido, se dejan recuperar 30 minutos en medio LB y después se siembran en una placa de LB con ampicilina, antibiótico para el cual el plásmido confiere resistencia. Las bacterias que crezcan tras una noche a 37 °C habrán incorporado el plásmido. Se inocula entonces una colonia aislada en un tubo con 5 ml de TB con ampicilina (en TB crecen más despacio, pero da mejores resultados). El día número 3 se empezó la mini-prep. El *pellet* obtenido tras el proceso se resuspendió en 50 μ l de TE. Para comprobar la existencia del ADN esperado se tomó 1 μ l de ADN y se migró con 2 μ l de tampón de carga y 17 μ l de agua destilada en un gel de agarosa al 0,5%.

En el mismo gel, también se añadieron otras muestras que fueron digeridas con dos enzimas de restricción, StuI y EcoR1. Para la determinación de cuáles eran las enzimas que nos iban a proporcionar más información, se utilizó la aplicación SeqBuilder del software de análisis DNASTAR, junto con el mapa de la secuencia del vector original pCDNA3

de Invitrogén. El plásmido entero tiene un tamaño esperado de unas 16 kb, que corresponden con 5,4 kb de pcDNA3 y 10,55 kb del inserto del cDNA de Reelina. Según esta información, se usó *StuI* porque corta 2 veces el cDNA y 1 vez el vector y *EcoRI* que corta 1 vez en el polylinker y 2 veces el cDNA. El resultado nos da información de dónde está insertada la secuencia codificante de Reelina.

Una vez comprobado que teníamos los fragmentos esperados se realizó una maxi-Prep para la obtención de una mayor cantidad de plásmido, para lo que se usaron únicamente las células competentes DH5 α , dado que las células SURE parecían haber perdido el plásmido. El DNA final resuspendido se conservó a -20 °C para su posterior uso en la transfección de las líneas celulares HEK 293 y Cos7.

Los análisis de absorbancia a 260 nm indicaron que la concentración final de ADN plásmidico era de 543 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

11. Dot blot y Western blot

Los análisis mediante *dot blot* han sido utilizados básicamente para comprobar la existencia de Reelina recombinante en el medio condicionado tras la transfección de las líneas celulares HEK 293 y COS7. Por otro lado, el análisis de *western blot* (WB) se ha usado para la detección de Reelina recombinante producida y para experimento de fosforilación de Dab1 en la zona subventricular (SVZ) adulta tras la incubación con Reelina recombinante.

El *dot blot* presenta ventajas y desventajas. Permite ver rápidamente la presencia de la proteína en cuestión, o lo que es más exacto, lo que se observa es que el anticuerpo ha reconocido su epítipo específico, pero esto no excluye que la proteína esté parcialmente degradada, es decir, no funcional. También evita tener

que hacer un *western blot* completo en caso de no observar reacción positiva. Para esta técnica se pusieron directamente 5 μl de los diferentes medios condicionados sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.20 nm de poro (Biorad). Tras dejar secar, se realiza un rápido lavado de 5 minutos con TTBS, para después realizar un paso de bloqueo durante 1 hora con 7,5% de leche en polvo convencional en TTBS. Posteriormente se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario (G10, 1:1000 en TTBS) durante 2 horas. Siguieron 3 lavados de 15 minutos con TTBS, la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora (HRP-Donkey anti-mouse, 1:10000) y otra ronda de lavados antes de revelar el resultado mediante electroquimioluminiscencia usando un kit de ECL (Roche, Basilea, Suiza) que se incubó durante 5 minutos.

Para analizar la presencia de Reelina en los medios condicionados de los cultivos celulares mediante *western blot*, se realizó primero una SDS-PAGE en un gel al 6% de acrilamida/poliacrilamida. La electroforesis tuvo lugar a 90 Voltios durante 3 horas, y la posterior transferencia a 250 mA durante 2 horas a 4 °C. Es en este punto, cuando se saca la membrana del módulo de transferencia, en el que ambas técnicas convergen. Es decir, a partir de aquí, todo se hizo igual que el *dot blot* desde el primer lavado rápido de 5 minutos con TTBS.

12. Ensayo de fosforilación de Dab1 en tejido adulto / Inmunoprecipitación de Dab1

Para llevar a cabo este experimento era necesario cuidar al máximo las condiciones de extracción de los cerebros para evitar la degradación de las proteínas y así poder observar cambios sutiles de concentración en diferentes muestras. Por ello, el método de sacrificio de los animales adultos fue el de la dislocación cervical, método que facilita una mayor rapidez a la hora de extraer el

tejido. Para este experimento se emplearon animales adultos *reeler*. Una vez se extrajeron los cerebros se colocaron en una matriz acrílica diseñada para cortar coronalmente los cerebros de ratón en rodajas a partir de 1 mm de grosor, gracias a las muescas transversales de que dispone. Para nuestro interés particular, obtuvimos 2 rodajas de 2 mm de grosor de cada uno de los cerebros. Estas rodajas contenían la práctica totalidad de la porción rostral de los ventrículos laterales. Una vez realizados los cortes, las rodajas se sumergieron inmediatamente en la solución salina equilibrada de Hank (*Hank's balanced salt solution*, HBSS, que debido a sus componentes la hace idónea para la conservación de un tejido fresco).

La zona subventricular de cada rodaja se diseccionó cuidadosamente usando una aguja de 21g bajo una lupa estereoscópica Leica MZ6, procurando evitar la contaminación con cualquier tipo de tejido circundante, sobre una cama de hielo para retardar la degradación. A continuación, el tejido obtenido se homogeniza con una pipeta Pasteur de vidrio. Una vez en este punto, seguimos un procedimiento para provocar la fosforilación de Dab1 por parte de Reelina, lo cual ha sido descrito ya con anterioridad (Magdaleno et al., 2002). Una vez homogeneizado, la solución con el tejido se dividió en dos partes iguales en tubos eppendorf. Tras una breve centrifugación, el tampón se extrajo cuidadosamente y uno de los tubos se incubó con medio de cultivo DMEM conteniendo la proteína de fusión AP-*Reelin* o bien Reelina recombinante obtenida de la transfección de células HEK293T, mientras que el otro tubo nos sirvió de control, incubándose únicamente con medio de cultivo.

Tras la incubación en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un tampón de lisis (Tampón RIPA, 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM

NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% doxicolato sódico, 0.1% SDS, 10 mM fosfato sódico pH 7, 50 mM NaF, 2 mM ortovanadato sódico y 0,001 de un cocktail de inhibidores de proteasas, Sigma).

Los lisados se aclararon mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se usó para un ensayo de inmunoprecipitación de Dab1, usando un protocolo estándar. La inmunoprecipitación se hace necesaria debido a que no existían anticuerpos específicos para detectar Dab1 fosforilado en *Western blot*, viéndonos obligados a usar un anticuerpo genérico anti-tirosina fosforilada. Es por ello que necesitamos enriquecer la muestra únicamente en Dab1 mediante inmunoprecipitación, descartando el resto de proteínas.

Para ello, se añaden 50 µl de bolas de proteína A-Agarosa resuspendidas (Cat. No. 11719408001, Roche) a 500 µl de lisado celular, con la intención de unir a dichas bolas la inmunoglobulina libre presente en el lisado, durante 2 horas a 4 °C en un agitador orbital. Tras 20 segundos de centrifugación a 12000 rpm, al sobrenadante se le añade el anticuerpo *rabbit* anti-Dab1, a una dilución de 1:50, durante 2 horas a 4 °C nuevamente. Entonces, 50 µl de una nueva suspensión de proteína A-Agarosa se añade a la mezcla de lisado celular y anticuerpo, rotando en el agitador orbital durante 3 horas a 4 °C. Tras tres lavados, el precipitado resultante se resuspende en 75 µl de tampón de carga de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Finalmente, las proteínas se desnaturalizaron calentando la suspensión resultante a 100 °C durante 5 minutos, y recogidas cuidadosamente con una pipeta tras la última centrifugación, evitando tocar el *pellet* del tubo en el que estaban contenidas las bolas de proteína A-Agarosa.

Las muestras se migraron en un gel de Policrilamida-SDS al 13%, aplicando un

voltaje de 100 V durante 3 horas, procediendo posteriormente a su transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Protran), aplicando una corriente de 50 mA durante toda la noche a 4 °C. La membrana se incubó entonces con un anticuerpo genérico anti-tirosina fosforilada y revelada con un agente de quimioluminiscencia (Amersham), bajo la cámara de un Bioimager (sistema peltier de la marca Fuji). Una vez observadas las bandas de interés, se incubó con un tampón conteniendo β -mercaptoetanol, para deshacer la unión del anticuerpo y la proteína, durante 1 hora a 55 °C (Stripping buffer: 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM de tampón Tris HCl pH 6,7, H₂O). Tras dos lavados durante 10 min con TBS/Tween 20, se comprobó que la membrana no poseía reactividad a la quimioluminiscencia, se bloqueó de nuevo en leche 1% TBS y se volvió a incubar con otro anticuerpo, en este caso *rabbit* anti-Dab1 (1:500), para comprobar que las bandas observadas con el anticuerpo anterior se correspondían con Dab1.

Una vez obtenidas las imágenes se lleva a cabo un análisis densitométrico semi-cuantitativo, del mismo tipo al realizado para la señal de AP-RR36 del punto 6.4 de esta sección. En este caso, se utilizó un área rectangular de 819.55 unidades arbitrarias² para cuantificar el valor medio de la intensidad de las bandas, dentro del rango 0 a 255 (blanco absoluto a negro absoluto de cada píxel). La ratio entre el valor obtenido para la banda de α PTyr y el valor de α Dab1 en el control (AP-control) se normaliza al valor 1. La gráfica también se realizó con el programa GraphPad Prism.

13. Cirugía estereotáxica para la infusión de Reelina recombinante con bombas osmóticas

Para la realización de esta técnica se usó un aparato estereotáxico de la marca Stoelting (Wood Dale, Illinois) con unas barras de

sujeción craneal a la altura del orificio auditivo especialmente diseñadas para ratón.

La finalidad de la cirugía es el implante de una bomba osmótica para la infusión continuada de Reelina recombinante en el ventrículo lateral izquierdo del ratón, por lo que ha de realizarse la carga de dichas bombas antes de comenzar con la anestesia. Las bombas osmóticas usadas para este experimento son de la marca ALZET, modelo 2001 (*mini-osmotic pump*), con una capacidad de 220 μ l y diseñadas para liberar 1 μ l/hora, por lo que la duración máxima del suministro de Reelina sería de unos 9 días. Las bombas se rellenaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada una de las bombas lleva asociado un pequeño catéter que acaba en un dispensador metálico sujeto a un elemento plástico que facilita su maniobrabilidad. Será dicho dispensador (cánula) el que se introducirá finalmente en el cerebro del ratón. Dado que su longitud es de 5 mm, para nuestro propósito se hace necesario el uso de 4 espaciadores de 0,5 mm cada uno (proporcionados también en el “*Brain Infusion Kit*”) para que la profundidad máxima alcanzada por la cánula sea de 3 mm, con el objeto de alcanzar lo más limpiamente posible el ventrículo sin dañar estructuras adyacentes. Ésta sería una de las TRES coordenadas que se precisan para la localización tridimensional del punto deseado de inserción de la cánula. Dichas coordenadas, seleccionadas con la ayuda del Atlas de George Paxinos y Keith B.J. Franklin “*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*” (ELSEVIER Academic Press), son las siguientes:

- BREGMA (Eje Anteroposterior): -0,34
- LATERAL: 1
- DORSOVENTRAL: 3

Previa a la cirugía, se aplicó el anestésico Tribrometanol (TBE) a razón de 1-2 ml/100 g de peso del animal. El TBE ha de disolverse en Etanol 100%. La solución

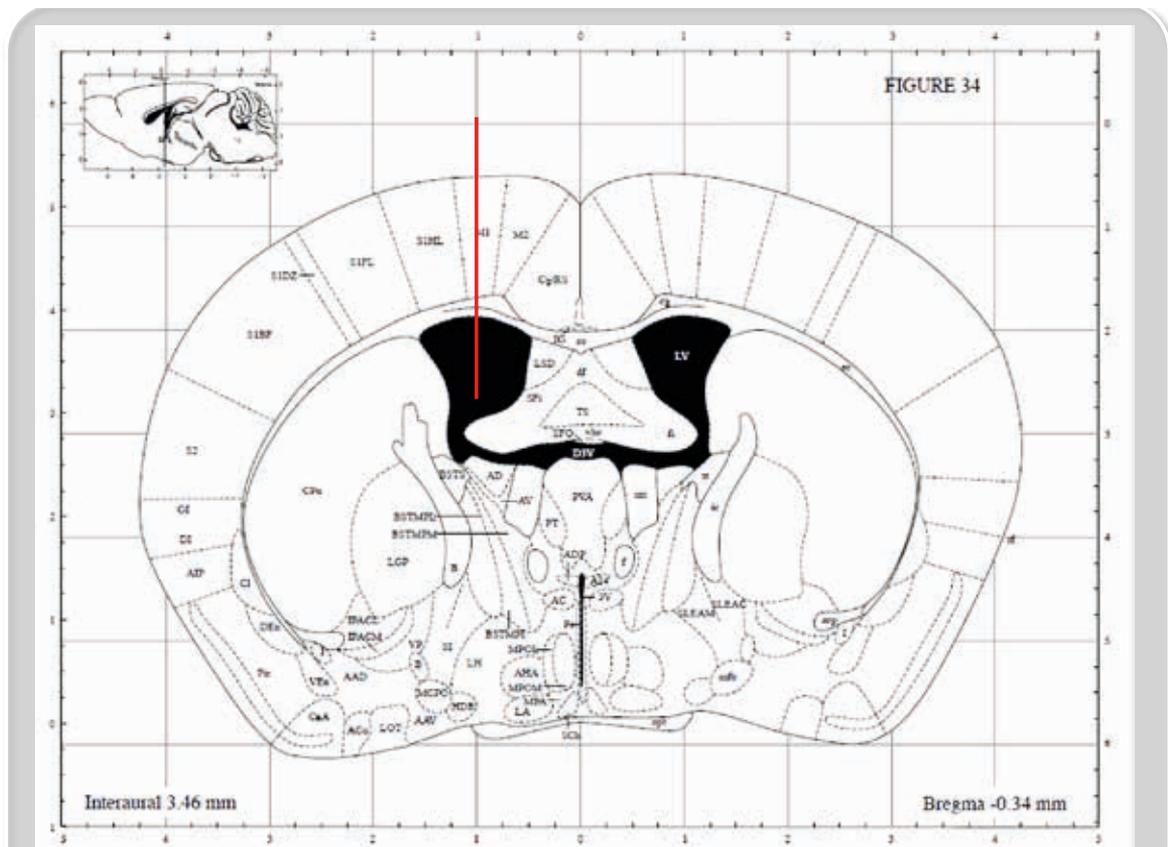


Figura M2 | **Cirugía estereotáxica**

La infusión intraventricular de reelina se realizó mediante una bomba osmótica, cuya cánula (representada por la línea roja de la figura), se insertó en el ventrículo lateral utilizando las coordenadas estereotáxicas: Bregma (eje anteroposterior): -0,34 mm; Lateral: 1 mm; Dorsoventral: 3 mm. [Modificado de Atlas de George Paxinos y Keith B.J. Franklin *“The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”* (ELSEVIER Academic Press)]

final a inyectar al ratón fue TBE al 2%, Etanol 8% y NaCl 0.9% en H₂O.

Para estos animales de entre 20-30 gramos (ratón adulto de cepa B6C3), se empieza con una dosis de 250 µl y otra de 100 µl de recordatorio cuando el animal empieza a recobrar mínimamente la sensibilidad. Este tipo de anestesia facilita la recuperación temprana del ratón y no se precisa de una gran exactitud en cuanto a la dosis administrada como en el caso de la mezcla Ketamina/Xylacina, usada en experimentos previos, donde un ligero exceso en la dosis provoca la muerte del animal con gran facilidad. Se hace necesario aplicar calor externo puesto que la temperatura del ratón disminuye durante el periodo en que está anestesiado; por ello se utilizó una manta eléctrica a 37 °C sobre la cual se apoyó el cuerpo del animal.

Una vez inmovilizado el ratón en la posición correcta se procedió al afeitado y aplicación de Polividona Yodada en la zona en la que se iba a practicar la cirugía, para minimizar el riesgo de infección. Con la ayuda del bisturí se realiza un corte longitudinal de unos 2,5 cm en la piel de la cabeza, dejando a la vista el cráneo. Se calcula el punto de interés con ayuda de las escalas micrométricas del aparato estereotáxico y se practica un orificio con un “Dremel” (pequeño taladro) en el cráneo, con sumo cuidado de no afectar a la integridad del cerebro. Se introduce posteriormente la cánula y la bomba se aloja bajo la piel del animal, en el lomo, a modo de pequeña mochila, entre las capas dérmica y muscular. En este momento comprobamos que la bomba empieza a funcionar, dado que es la temperatura corporal del ratón la que facilita el comienzo y constante flujo

osmótico. Finalmente se cose el tejido y se deja reposar al animal para su recuperación bajo una lámpara de luz infrarroja, que proporciona calor.

14. Activación del Sistema CRE-LOX mediante administración de Tamoxifeno

El sistema Cre-lox fue descubierto en el bacteriófago P1 como parte del ciclo normal de la vida de este organismo (Sauer y Henderson 1988; Sternberg y Hamilton 1981). El bacteriófago usa la recombinación Cre-lox par circularizarse y facilitar la replicación de su DNA genómico cuando se reproduce. Desde que fue descubierto, la estrategia de recombinación del bacteriófago se ha desarrollado como una tecnología para la manipulación del genoma y aplicada satisfactoriamente en cultivos de células de mamífero, levaduras, plantas y otros organismos (Araki et al., 1997). Gran parte de este éxito se debe a su simplicidad. Requiere únicamente dos componentes:

1. Cre recombinasa: es una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios “loxP”.
2. Sitios “loxP”: secuencias específicas de de 34 pb que consisten en una secuencia núcleo de 8 pb, donde la recombinación tiene lugar, flanqueada por dos secuencias repetidas invertidas de 13 pb.

Cre es una enzima del tipo recombinasa, la cual tiene la capacidad de eliminar fragmentos de DNA flanqueados por sitios lox-P (secuencias de DNA específicas). Por tanto, una mutación de interés se genera primero por recombinación homóloga, usando un vector blanco que contenga dos sitios lox-P. El gen cre se introduce en el sistema bajo el control de un promotor de tejido -o célula- específico, y el gen flanqueado por los sitios lox-P, es extraído únicamente donde la recombinasa es expresada. Este procedimiento elimina los genes de interés que sean dependientes del estado de desarrollo en una etapa específica

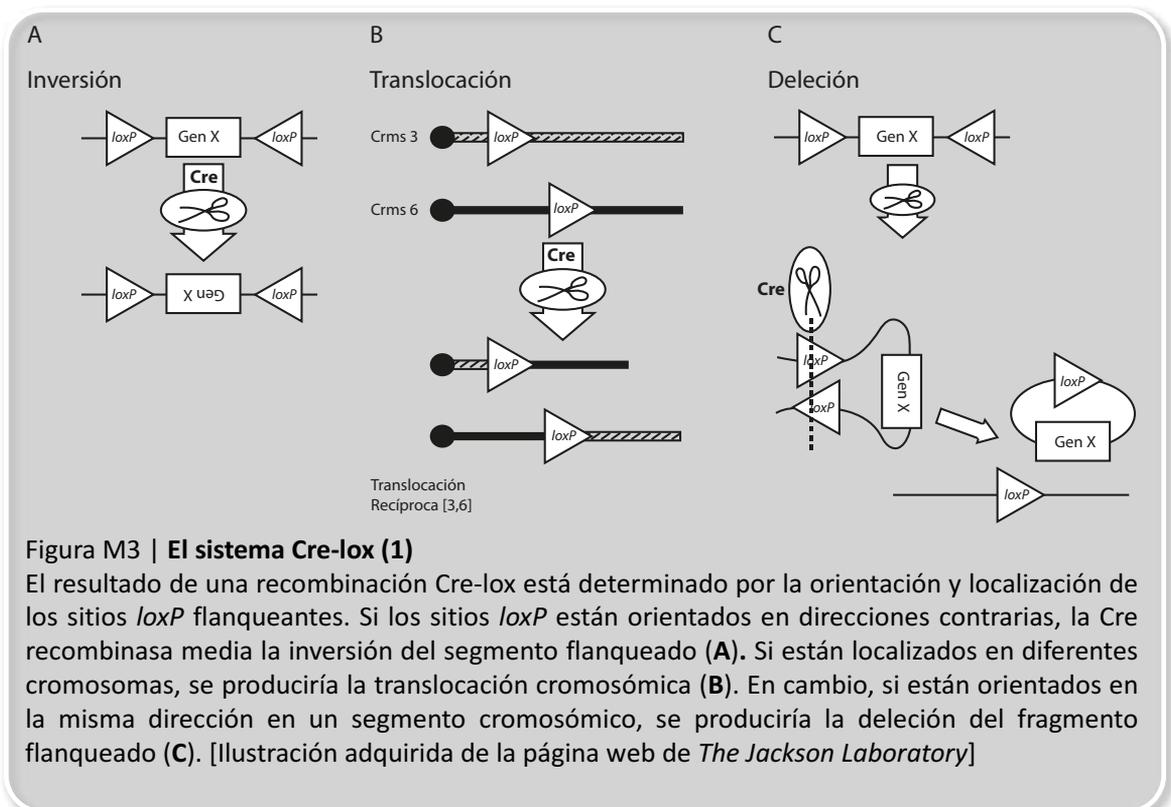


Figura M3 | El sistema Cre-lox (1)

El resultado de una recombinación Cre-lox está determinado por la orientación y localización de los sitios loxP flanqueantes. Si los sitios loxP están orientados en direcciones contrarias, la Cre recombinasa media la inversión del segmento flanqueado (A). Si están localizados en diferentes cromosomas, se produciría la translocación cromosómica (B). En cambio, si están orientados en la misma dirección en un segmento cromosómico, se produciría la delección del fragmento flanqueado (C). [Ilustración adquirida de la página web de The Jackson Laboratory]

de la célula, o bien, a través de un inductor específico (Fig. M3).

Dado que el gen Cre y los sitios loxP no están presentes en el genoma nativo del ratón, deben ser introducidos mediante tecnología transgénica (Nagy, 2000). La orientación y localización de los sitios loxP determinan si la recombinación por la enzima Cre induce una delección, una inversión o una translocación cromosómica (Nagy, 2000). La inmensa mayoría de las cepas Cre-lox desarrolladas han sido diseñadas para producir delecciones.

Típicamente, las líneas de ratones Cre y loxP se desarrollan separadamente y se cruzan para producir la línea Cre-lox correspondiente. Básicamente hay dos tipos de líneas Cre: las que lo expresan constitutivamente y las inducibles, las cuales contienen un transgén que expresa una forma modificada de la Cre recombinasa que no es funcional hasta que un agente inductor (como doxiciclina, tetraciclina o tamoxifeno) se administra en el punto temporal deseado, tanto en durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta del individuo.

La línea transgénica Cre utilizada es Nestin^{CreERT2} (Balordi y Fishell, 2007).

Pertenece a la categoría de transgénicos inducibles. La proteína de fusión Cre-ERT2 consiste en una Cre recombinasa fusionada a una forma triple mutante del receptor de estrógenos humano que no une su ligando natural (17β-estradiol) en concentraciones fisiológicas, pero sí puede unir los ligandos sintéticos Tamoxifeno (4-hidroxitamoxifeno, OHT) y, con menos sensibilidad, ICI 182780. Restringido al citoplasma, Cre-ERT2 puede únicamente acceder al compartimento nuclear tras la exposición a tamoxifeno, momento en el que podrá ejercer su actividad enzimática (Fig. M4). Esta construcción está bajo el control del promotor (en inglés “*promoter*”) de nestina, una proteína de los filamentos intermedios que se expresa selectivamente en las células madre neurales tanto del cerebro embrionario como del adulto.

Del otro lado, para inactivar el gen de Dab1 en el periodo postnatal, usamos un ratón con una inserción dirigida de un cassette de expresión de *floxed* Dab1 en lugar del exón de Dab1 que codifica los residuos 23 a 69 de Dab1 p(80). El Dab1 condicional “*knock in*” (cKI) sitúa los sitios loxP corriente arriba y abajo del cassette de expresión de Dab1, compuesto de un aceptor de escisión endógeno, la secuencia codificante de Dab1

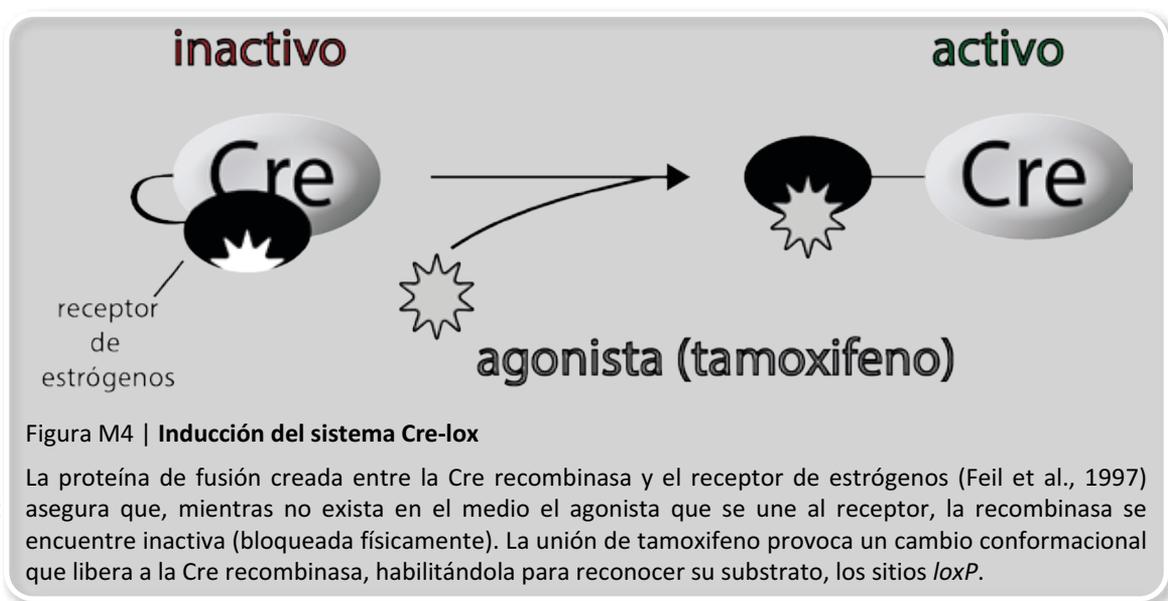


Figura M4 | Inducción del sistema Cre-lox

La proteína de fusión creada entre la Cre recombinasa y el receptor de estrógenos (Feil et al., 1997) asegura que, mientras no exista en el medio el agonista que se une al receptor, la recombinasa se encuentre inactiva (bloqueada físicamente). La unión de tamoxifeno provoca un cambio conformacional que libera a la Cre recombinasa, habilitándola para reconocer su sustrato, los sitios loxP.

p80 desde los residuos 23 a 555 y una triple secuencia de poliadelinación. Este vector también incluye un aceptor de escisión precediendo un chivato de β -galactosidasa, el cual está introducido para indicar el éxito de la escisión mediada por Cre en células con un locus transcripción activa de Dab1.

El alelo condicional consiste en un cassette de expresión de *floxed* Dab1 en el locus genético de Dab1. Un aceptor de escisión corriente abajo dirige la expresión de β -galactosidasas tras la escisión del cassette de expresión. La línea germinal de escisión del alelo Dab1 cKIneo por la recombinación mediada por Cre produce un fenotipo similar al mutante nulo Dab1 en animales homocigotos, demostrando que el alelo Dab1 cKIneo se inactiva por la escisión del cassette de expresión (Pramatarova et al., 2008). Los ratones que son homocigotos para el alelo Dab1 cKIneo expresan alrededor del 15% del nivel normal de Dab1 y presentan fenotipos suaves en el cerebelo y neocórtex (Pramatarova et al., 2008).

El cruce de las líneas Nestin^{CreERT2} y Dab1 cKIneo hasta obtener ratones homocigotos para el alelo con la secuencia de Dab1 *floxeada*, provocará que, en presencia de tamoxifeno, el Dab1 de las áreas donde se exprese el filamento intermedio nestina en el cerebro adulto se escinda y no se exprese. Otra característica de la enzima Cre es que puede actuar en *trans*. Esto nos permite eliminar Dab1 en las coordenadas espacio-temporales deseadas.

Se establecieron 4 grupos diferentes de 3 animales cada uno, según su genotipo, para llevar a cabo el experimento:

- **Grupo 1:** Dab1 cKIneo ^{+/+} ; Cre +
- **Grupo 2:** Dab1 cKIneo ^{+/-} ; Cre +
- **Grupo 3:** Dab1 cKIneo ^{-/-} ; Cre +
- **Grupo 4:** Dab1 cKIneo ^{+/+} ; Cre -

El protocolo de administración de tamoxifeno es el publicado en Balordi y Fishell, 2007. Se inyecta a los ratones de forma intraperitoneal a razón de 5 mg de tamoxifeno por cada 35 g de peso del ratón, a razón de una vez cada dos días durante 16 días, dejando un periodo de descanso de 1 semana para repetir nuevamente el ciclo de inyecciones cada dos días, conformando un total de 16 inyecciones por ratón. Se elabora una solución stock de tamoxifeno (Sigma, T-5648) de 20 mg/ml en aceite de maíz (Sigma, C-8267). El aceite es muy denso y hay que dejarlo disolver durante toda la noche bajo agitación a 37 °C. Una vez disuelto se puede guardar a 4 °C, pero es recomendable precalentarlo a 37 °C justo antes de la administración, puesto que la densidad del compuesto dificulta su inyección.

15. Reconstrucción tridimensional de cerebros de ratón

Mediante el uso del Software Neurolúcida (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), se ha realizado una reconstrucción tridimensional de la RMS de 8 diferentes genotipos, así como de la porción rostral de los ventrículos laterales, en su recorrido junto a la RMS y del volumen telencefálico correspondiente.

Para ello se usaron fotografías de secciones teñidas con violeta de cresilo, realizadas con una lupa estereoscópica Leica MZ6 y una cámara digital Leica. Para cada reconstrucción se usaron entre 20 y 24 secciones, cada una de ellas separada 300 μ m, de forma que, introduciendo dicho valor en el eje “z” (profundidad) del software Neurolucida, se pudo obtener una reconstrucción proporcional y escalada de la porción rostral del telencefalo de ratones adultos.

Para cada sección se realizan 3 tipos de medidas:

1) el contorno más externo de la sección, que nos daría una idea del volumen del telencefalo en última instancia.

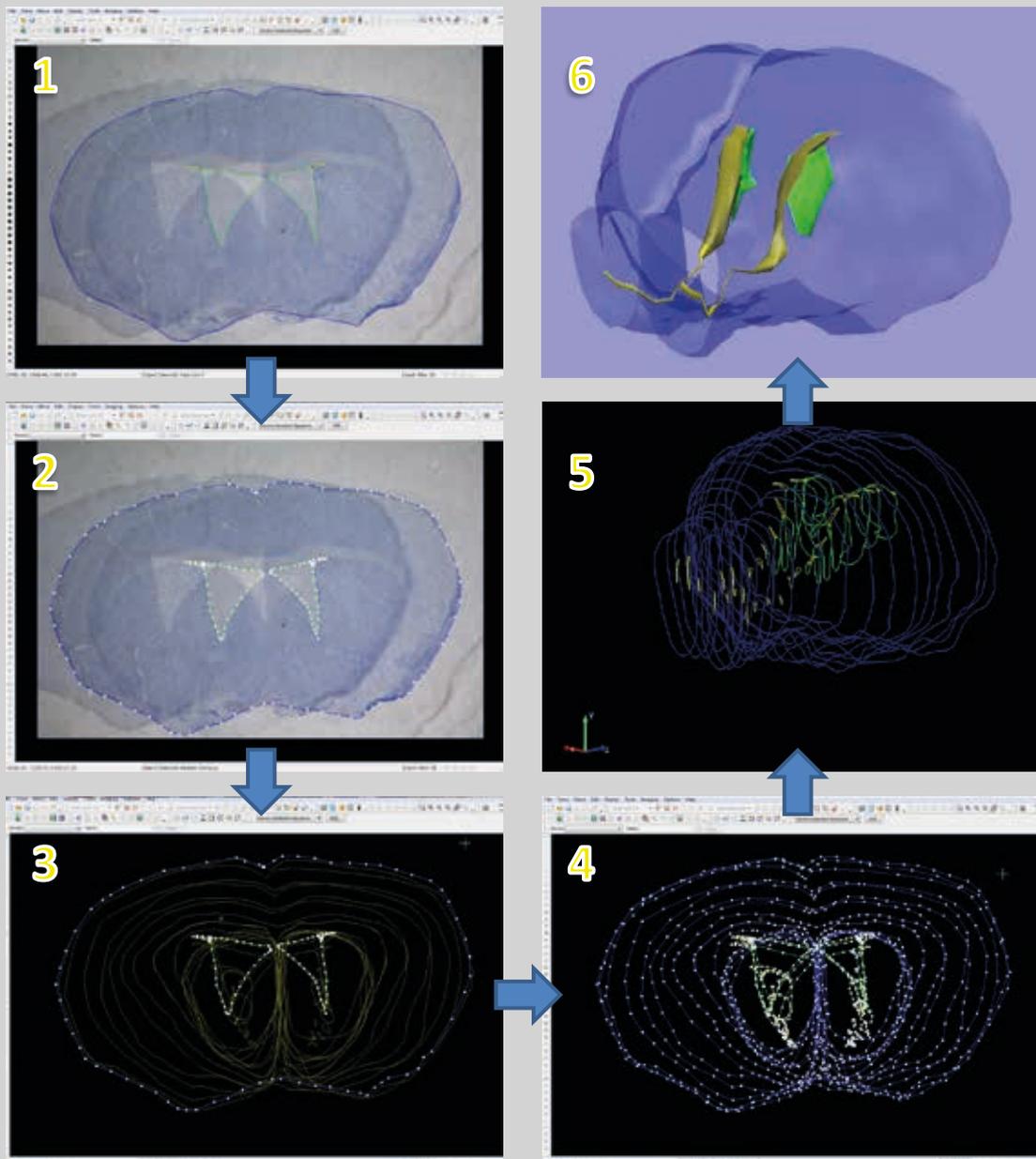


Figura M5 | **Proceso de reconstrucción tridimensional de cerebros adultos de ratón con el software “NeuroLucida”**

Se dibuja una línea siguiendo el contorno de la estructura que se desea reconstruir, utilizando un tipo de línea distinto para cada estructura (1,2). Cada sección, una vez procesada, se acopla a las secciones anteriores (3,4). La reconstrucción tridimensional que realiza el programa permite visualizar las regiones de interés y, además, facilita datos numéricos de área y volumen, entre otros, empleados para el análisis estadístico de los diferentes genotipos objetos de estudio (5,6).

2) el contorno de la RMS en cada uno de los hemisferios.

3) adicionalmente el contorno de los ventrículos laterales.

El software permite finalmente la reconstrucción 3D de una estructura a partir de varias mediciones vectoriales (Fig. M5). Este estudio nos permite realizar

una comparación estructural de la RMS simultáneamente en diferentes genotipos, así como de la morfología del ventrículo, también proporcionando valiosa información acerca de la posición relativa de estas estructuras dentro del cerebro del ratón adulto.

16. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta parte experimental fue llevada a cabo por el Dr. Manuel Cifuentes, investigador de la Universidad de Málaga. En nuestro laboratorio se realizó la perfusión de los animales según su protocolo; una vez perfundidos, los cerebros le fueron remitidos para realizar las microfotografías que se han empleado en esta tesis.

Se usó para ello ratones perfundidos con tampón fosfato (PB). Una vez los tejidos estaban libres de sangre, los cerebros se introdujeron en una solución fijadora al 2% Paraformaldehído y 2,5% Glutaraldehído en PB 0,1M (especial para la idónea aplicación de la técnica de microscopía electrónica de barrido) durante 1 hora. Se realizaron varios lavados en PB 0,1 M después de la fijación. Fue en este punto en que, hicimos llegar los cerebros a la Universidad de Málaga, donde el Dr. Cifuentes continuó el protocolo: se realiza otra fijación en una solución al 2% de tetróxido de ósmio en PB 0,1M durante dos horas. Tras este paso, las piezas de tejido se lavaron con agua destilada fría y se deshidrataron mediante soluciones hidro-alcohólicas de gradación creciente a 4 °C. Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron al punto crítico de desecación, que consiste básicamente, en la sustitución del etanol absoluto por CO₂ líquido, de forma que la evaporación ultrarrápida de dicho CO₂, en condiciones determinadas, permite la desecación de la pieza manteniendo las características del tejido, esencialmente las externas. Las piezas se fijaron y montaron en tambores de latón mediante el uso de una solución de plata coloidal en acetona

y se metalizaron con una fina capa de oro de aproximadamente 450 Å en una cámara de vacío, obteniendo así una superficie eléctricamente conductora para poder visualizarla en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-4100 y JEOL JSM-840).

17. Información detallada de genotipado

Como fuente de ADN para el genotipado de los ratones empleados en el estudio se decidió tomar muestras de cola, cortándose aproximadamente unos 3 mm de la parte distal, una vez el animal estuvo anestesiado momentáneamente con Isoflurano. Esta porción de cola se recogió en un tampón de lisis (25mM NaOH, 0,2mM EDTA). Se hirvió durante 20 minutos y se añadieron 200 µl de un tampón para equilibrar la muestra (40mM Tris-HCl). Se centrifugó 7 minutos a 14000 rpm y se guardó el sobrenadante a -20 °C. Para algunos casos concretos, se utilizó el kit de extracción de ADN Real Pure Turbo (Real, RBMET01).

El resultado de la amplificación por PCR se observó en un gel de agarosa de baja electroendosmosis al 2%, con 3 µl de bromuro de etidio, en TBE (0.045M Tris-Base, 0.045M ácido bórico, 0.001m EDTA pH 8.0). 9 µl del resultado de la amplificación se mezclan con 1 µl de tampón de carga (2% Ficoll 400, 0.01M Na₂EDTA, pH 8.0, 0.1% SDS, 0.025% (w/v) azul de bromofenol, 0.025% (w/v) xylene cyanol, H₂O) y se lleva a cabo la electroforesis a 100 V, en un gel de 14 cm de ancho por 5 cm de largo, durante 1 hora.

Los programas de amplificación y las secuencias de cebadores utilizados en el genotipado de las diferentes líneas de animales se detallan en la Tabla 1. Los anticuerpos para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, su procedencia y concentración de uso se detallan en las Tablas 2 y 3 (anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente).

Tabla 1.- Secuencias de cebadores y programas de amplificación

Transgén Nestina (ne-reelin) MBC*	sentido antisentido	5'-GAGCAGGGCAGGTGCTCATTTC 5'-GTTCAGGTCCT CCTCGGAATATC	1 kb
	sentido antisentido	5'- GATGTGCTCCA GGCTAAAGTT 5'-AGAAACGGAATGTTGTGGAGT	500 pb
<i>Programa PCR</i>	DI: 5 min a 94°C, D: 1 min a 94°C, A: 1 min a 57°C, E: 2 min a 72°C, EF: 10 min a 72°C. (D-A-E x 35). *MBC (Mouse Beta Casein), usado como control positivo de la presencia de ADN en la muestra.		
ReIn silvestre ReIn mutante	sentido antisentido antisentido	5'-TAATCTGTCTCACTCTGCC 5'-ACAGTTGACATACCTTAATC 5'- TGCATTAATGTGCAGTGTTG	242 pb 275 pb
<i>Programa PCR</i>	DI: 4 min a 94°C, D: 1 min a 94°C, A: 2 min a 55°C, E: 2 min a 72°C, EF: 10 min a 72°C. (D-A-E x 30).		
Lrp8 silvestre Lrp8 mutante	sentido antisentido sentido antisentido	5'-CCACAGTGTCACACAGGTAATGTG 5'-GCGACGACAGTAACCCAGTAGCA 5'-GATTGGGAAGAC AATAGCAGGCATGC 5'-CCATTG ACCGACTTAAGG TTGTTCG	520 pb 420 pb
<i>Programa PCR</i>	DI: 1 min a 95°C, D: 30 seg a 95°C, A: 30 seg a 65°C, E: 1 min a 72°C, EF: 5 min a 72°C. (D-A-E x 35).		
VLDLR silvestre VLDLR mutante	sentido antisentido sentido antisentido	5'- TGGTGATGAGAGGCTTGTATGTTGTC 5'- TTGACCTCATCGCTGCCGTCCTTG 5'-CGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCA 5'-GCGATACCGTAAAGC ACGAGGAAG	400 pb 200 pb
<i>Programa PCR</i>	<i>PCR EN GRADIENTE</i> - DI: 3 min a 94°C, D ₁ : 20 seg a 94°C, A ₁ : 30 seg a 64°C (-0.5°C por ciclo), E ₁ : 35 seg a 72°C, D ₂ : 20 seg a 94°C, A ₂ : 30 seg a 58°C, E ₂ : 35 seg a 72°C, EF: 2 min a 72°C. (D ₁ -A ₁ -E ₁ x 13; D ₂ -A ₂ -E ₂ x 26)		
Transgén CRE	sentido antisentido	5'-TAAAGATATCTCACGTA CTG 5'-TCTCTGACCAGAGTCATCCT	280 pb
<i>Programa PCR</i>	DI: 4 min a 94°C, D: 30 seg a 95°C, A: 30 seg a 52,2°C, E: 30 seg a 72°C, EF: 5 min a 72°C. (D-A-E x 35).		
Dab1 cKIneo	sentido antisentido	5'-TGATGCTATCCCTAGCAAGAC 5'-GTGGCTTCGCTGCGATCC TGAC	*
<i>Programa PCR</i>	DI: 4 min a 94°C, D: 30 seg a 95°C, A: 30 seg a 59,9°C, E: 1 min a 72°C, EF: 5 min a 72°C. (D-A-E x 35).		
*Estos cebadores amplifican una región del alelo silvestre de 356 pb y otra región mayor del alelo Dab1 cKIneo de 597 pb debido a la adición de una secuencia flanqueante loxP (Pramatarova et al, 2008).			

Tabla 2.- Anticuerpos Primarios

Antígeno	Especie	Procedencia	Concentración
Reelin	ratón	Dr. André Goffinet	1:1000
PCNA	conejo	Santa Cruz	1:50
Dab1 (b3)	conejo	Dr. Brian Howell	1:500
Tuj1	conejo	Covance	1:2000
GFAP	conejo	Dako	1:500
GFAP	ratón	Sigma	1:1000
Nestin	conejo	Covance	1:500
Calretinin	conejo	Swant	1:2000
GFP 488 conjugado	conejo	Invitrogen	1:1000
GFP	oveja	Dr. Takaki Miyata	1:1000
Tbr1	conejo	Chemicon	1:1000
Doblecortina	cabra	Santa Cruz	1:50
S100b	conejo	Dako	1:400
CD133	rata	Ebiosciences	1:500
BLBP	conejo	Chemicon	1:1000
Tbr2	conejo	Dr. Robert Hevner	1:2000
BrdU(x CldU)	rata	Serotec	1:100
BrdU	ratón	Sigma	1:1000
BrdU (xIdU)	ratón	BD Pharmigen	1:100
Fosfotirosina	ratón	Sigma	1:2000
HPAP	ratón	Abcam	1:250
HPAP	conejo	Abcam	1:50
AP	ratón	Exbio	1:200
AP	ratón	Biomeda	1:100
AP	conejo	BioMedtek	1:400
Mash1	ratón	BD Pharmigen	1:500
H3P	conejo	Dr. Takaki Miyata	1:1000
Cux1	conejo	Santa Cruz	1:50
CRE	ratón	Novagen	1:500
Vglut1	cobaya	Chemicon	1:10000

Tabla 3.- Anticuerpos Secundarios

Antígeno	Especie	Procedencia	Concentración
Anti-conejo, biotinilado	Burro	Jackson IR	1:500
Anti-ratón, biotinilado	Burro	Jackson IR	1:500
Anti-cabra, biotinilado	Burro	Jackson IR	1:500
Anti-cobaya, biotinilado	Burro	Jackson IR	1:500
Anti-rata, biotinilado	Cabra	Jackson IR	1:500
Anti-conejo, biotinilado	Cabra	Jackson IR	1:500
Anti-ratón, biotinilado	Cabra	Jackson IR	1:500
Anti-conejo, peroxidasa	Cabra	Jackson IR	1:5000
Anti-ratón, peroxidasa	Cabra	Jackson IR	1:5000
Anti-ratón, Cy2 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-conejo, Cy2 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-rata, Cy2 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-ratón, Cy2 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-conejo, Cy2 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-rata, Cy2 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-ratón, Cy3 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-conejo, Cy3 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-rata, Cy3 conj.	Cabra	Jackson IR	1:400
Anti-ratón, Cy3 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-conejo, Cy3 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-rata, Cy3 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-ratón, Cy5 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-rata, Cy5 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Fab anti-conejo, Cy3 conj.	Burro	Jackson IR	1:400
Anti-oveja, Alexa 488	Cobaya	Invitrogen	1:1000
Cy2-estreptavidina	-	Jackson IR	1:800
Cy3-estreptavidina	-	Jackson IR	1:800
Cy5-estreptavidina	-	Jackson IR	1:800

RESULTADOS

- CAPÍTULO I: EMBRIÓN -

1. Receptores funcionales de Reelina en la corteza cerebral en desarrollo

Nuestra colaboración con el grupo del Dr. Mitsuharu Hattori, de la Universidad de Nagoya (Japón), se centró en el uso extensivo y caracterización de la sonda AP-RR36 durante el desarrollo del cerebro embrionario. El día de desarrollo embrionario 15.5 (E15.5),

la sonda AP-RR36 tiñe la mayor parte de la pared cortical (Fig. 4A), mientras que la sonda AP-control no da señal aparente (Fig. 4C). La posibilidad de que AP-RR36 se una a una molécula diferente a receptores de lipoproteínas se descarta ya que la tinción se anula totalmente mediante la adición de GST-RAP (Fig. 4D). La mayor intensidad de la señal se observó alrededor de la zona subventricular (SVZ) y la zona intermedia (IZ), respectivamente (Fig. 4B). El área más cercana a la

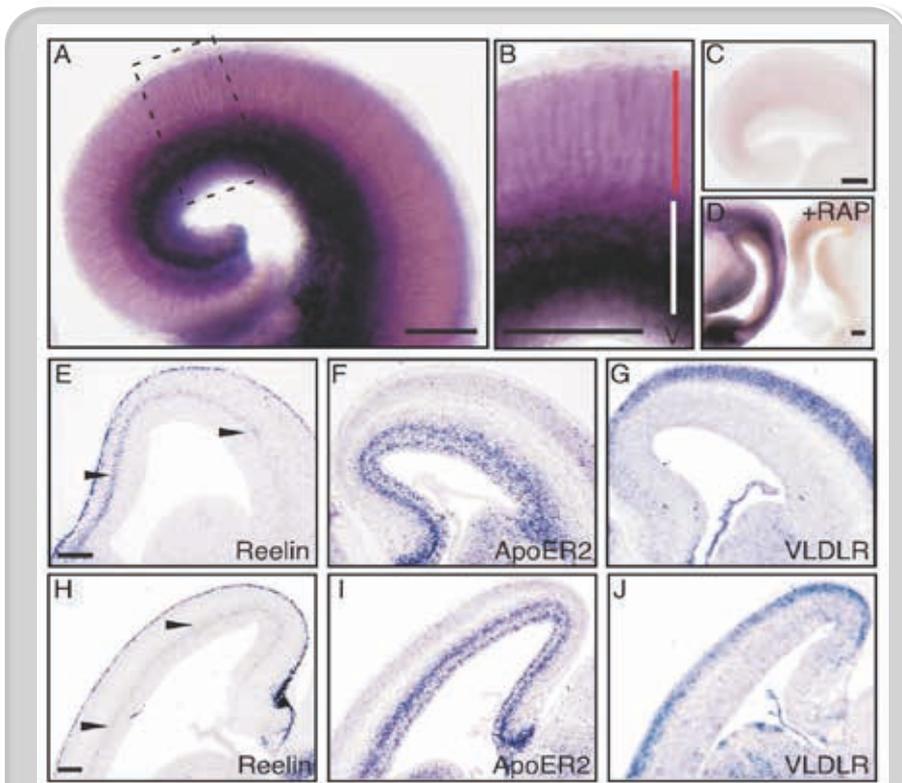


Figura 4 | Localización de FRRs en la corteza cerebral en desarrollo del ratón

(A,B) Cortes coronales de cerebro de ratón a E15.5 teñidos con AP-RR36. Una vista magnificada del área delimitada por la línea de puntos en A se muestra en B. Las líneas roja y blanca en B indican la región correspondiente a la placa cortical y a la IZ/SVZ, respectivamente. (C) Otra sección del mismo ratón mostrado en A se tiñó con AP-control. D, La tinción por AP-RR36 desaparece en presencia de GST-RAP. Las secciones de cerebro en E15.5 se tiñeron con AP-RR36 en presencia de control GST (izquierda) o GST-RAP (derecha). (E,J) Localización de mRNA en la corteza cerebral a E15.5. Secciones coronales (E-G) o sagitales (H-J) se hibridaron con sondas antisentido para reelina (E,H) ApoER2 (F, I) o VLDLR (G, J). Nótese la señal difusa del mRNA de reelina alrededor de la SVZ e IZ (puntas de flecha en E, H). La mayor parte del mRNA de ApoER2 se localiza en la VZ/SVZ/IZ (F, I), mientras que el mRNA de VLDLR se expresa de manera más abundante en la placa cortical (G, J). Barras de escala: 200 μ m.

superficie, la placa cortical (CP), no presenta una tinción clara por la sonda AP-RR36. Sin embargo, resulta muy interesante la señal que se observa en las fibras radiales perpendiculares a las superficies ventricular y pial (Fig. 4B). Esta tinción puede deberse o bien a las fibras de la glía radial que se extienden desde la VZ o a los procesos guía (*leading processes*) de neuronas premigratorias, ya que se ha propuesto que ambas son dianas directas de Reelina (Hartfuss et al., 2003; Luque et al., 2003; Luque, 2007).

Dado que resultaba inesperado que la expresión de FRR fuera detectable en la placa cortical, salvo en las fibras radiales, comparamos esta señal con el patrón de tinción que proporciona la expresión de Reelina, ApoER2 y VLDLR. En este estadio del desarrollo, el mRNA de Reelina se expresa fuertemente en la zona marginal y de forma más débil alrededor de la SVZ e IZ, como se ha descrito anteriormente (Fig.

4E, H) (Yoshida et al., 2006). El mRNA de ApoER2 se expresa principalmente en la VZ/SVZ/IZ y débilmente en la placa cortical (Fig. 4F, I). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores (Trommsdorff et al., 1999; Luque et al., 2003) y los que se pueden encontrar en bases públicas (www.genepaint.org). Por el contrario, el mRNA de VLDLR se expresa principalmente en la placa cortical (Fig. 4G, J). Por lo tanto, se sugiere de manera muy sólida que la fuerte tinción de AP-RR36 vista en la VZ/SVZ/IZ sea atribuible mayoritariamente a ApoER2. De hecho, la mayor parte de esta señal desaparece en la pared cortical deficiente en ApoER2, mientras que permanece virtualmente idéntica en el caso de la pared cortical deficiente en VLDLR (Fig. 5). Es destacable que la expresión difusa del mRNA de Reelina alrededor de la SVZ e IZ (Fig. 4E, H, puntas de flecha) parece delimitar la zona en la que los FRR dejan de ser abundantemente expresados.

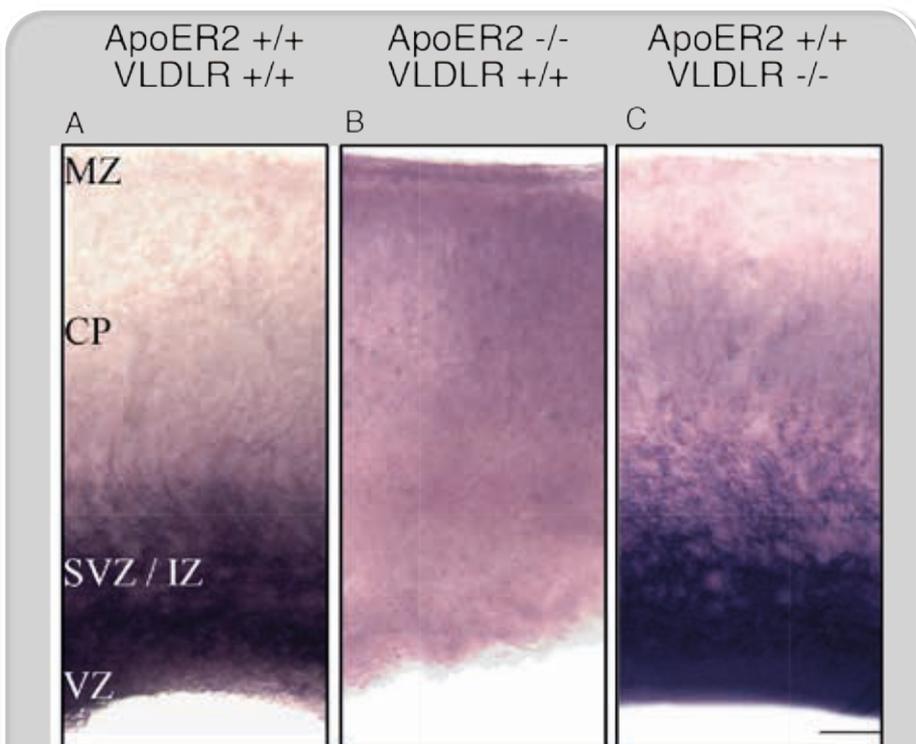


Figura 5 | ApoER2 es el principal receptor funcional expresado en la neocorteza embrionaria

ApoER2 constituye la mayor parte de los Receptores Funcionales de Reelina en la corteza cerebral en desarrollo. Tinción con la sonda AP-RR36 de secciones coronales de cerebro embrionario a E16.5 de ratones silvestres (A), mutantes nulos ApoER2 (B) y mutantes nulos VLDLR (C). Barra de escala: 50 μ m.

2. Los FRR son más abundantes en la pared cortical de ratones *reeler*

Existen dos posibles explicaciones a por qué las neuronas de la placa cortical no se tiñen fuertemente con AP-RR36. En el primer escenario, la traducción, maduración o tráfico de receptores de Reelina está regulada de forma que solo se expresan en la superficie celular mientras éstas se encuentran en la SVZ e IZ, y serían bajo-regulados antes de que las nuevas neuronas migren hacia la placa cortical, independientemente de la presencia o no de Reelina. En el segundo caso, los receptores de Reelina se bajo-regularían por la unión de Reelina, porque Reelina se expresa en gran cantidad en la MZ y de forma más difusa alrededor de la IZ (Fig. 4E,H) y Reelina activa la endocitosis de los receptores de Reelina (D'Arcangelo et al., 1999; Morimura et al., 2005). Para aclarar este punto, investigamos la cantidad y localización de FRR en ratones *reeler*

y *yotari*, quienes carecen de Reelina o *Dab1* respectivamente. Debido a que los ratones *reeler* y *yotari* muestran fenotipos casi indistinguibles en la corteza cerebral, si el patrón de tinción difiere entre ellos, entonces la diferencia debería ser atribuible a la deficiencia de cada gen en vez de a una arquitectura anormal.

En la pared cortical del ratón *reeler* a E15.5, la tinción de la sonda AP-RR36 proporciona una señal fuerte incluso en la región cercana a la MZ (Fig 6B). Además, toda la señal en general es mucho más fuerte que en el control (heterocigoto para Reelina, *rl/+*) (Fig. 6A). En E17.5 se observan resultados similares (Fig. 6E, F) o en P0 (Fig. 6I, J). Estos resultados sugieren que los FRR persisten en las neuronas de la placa cortical en *reeler* porque nunca encuentran Reelina. Los patrones de tinción fueron mucho menos diferentes entre el *yotari* y su hermano heterocigoto (Fig. 6C, D en E15.5,

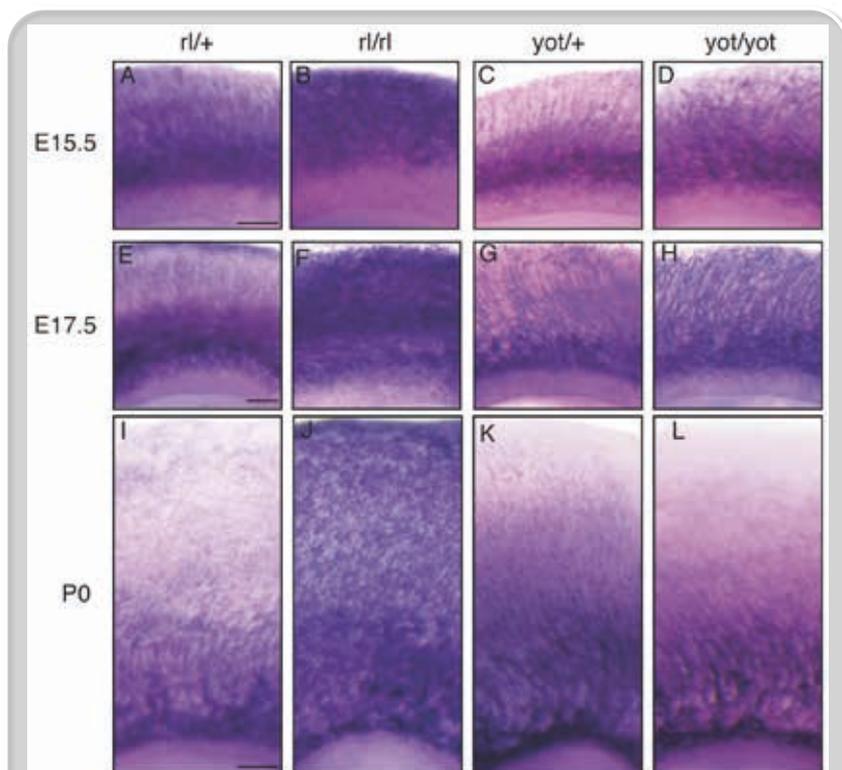


Figura 6 | Los FRRs están incrementados en la corteza cerebral del *reeler*

Tinción con la sonda AP-RR36 de secciones coronales de ratones *reeler* (*rl/rl*; B, F, J) o heterocigotos (*rl/+*; A, E, I) y *yotari* (*yot/yot*; D, H, L) o heterocigotos (C, G, K) en E15.5 (A-D), E17.5 (E-H) y P0 (I-L). Barras de escala: 100 μ m.

G, H en E17.5 y K, L en P0). Debido a que *yotari* tiene toda la carga de Reelina, igual que en el silvestre, estos resultados indican que los patrones de tinción de AP-RR36 observados en silvestre y en *reeler* reflejan la situación *in vivo* de los FRR, más que una ocupación diferencial de los receptores por Reelina endógena.

3. Localización de ApoER2 funcional en NPCs (*neural precursor cells*, *precursores neurales*)

Los resultados obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Hattori, nos llevaron a profundizar sobre qué tipos celulares concretos expresan los receptores funcionales de Reelina. Al especificar “funcionales”, nos referimos a aquellos que se localizan en la membrana plasmática, como formas maduras, dispuestos a recibir Reelina como ligando. Podemos hacer esta apreciación gracias al tipo de herramienta que utilizamos, la proteína de fusión formada por la enzima fosfatasa alcalina (AP) y la porción que comprende las repeticiones de Reelina 3 a 6 (AP-RR36).

Su construcción permite realizar un ensayo de *binding in situ*, puesto que la unión de este fragmento de Reelina a su receptor en las rodajas de cerebro frescas, puede ser revelada gracias a la aplicación de un reactivo que produce un precipitado coloreado por la acción enzimática de la fosfatasa alcalina. Otra alternativa es aplicar técnicas inmunohistoquímicas para reconocer la proteína fosfatasa alcalina mediante anticuerpos específicos (Fig. 7A, B). Para la identificación de los tipos celulares que expresan estos receptores funcionales de Reelina, se empleó doble inmunofluorescencia y microscopía confocal, para colocalizar AP-RR36 con distintos marcadores de NPCs.

En el cerebro embrionario, uno de los marcadores que nos permiten detectar

la presencia de células de la glía radial, las células precursoras neurales primarias en la zona ventricular, es la proteína BLBP [*Brain Lipid Binding Protein*] (Anthony et al., 2004). Hacia el día 15 de desarrollo embrionario (E15), se observa que los cuerpos celulares de la glía radial de la parte basal de la VZ y sus largos procesos que atraviesan la placa cortical expresan receptores funcionales de Reelina (Fig. 7C-H).

Por otro lado, para comprobar si estos receptores también están presentes en las células progenitoras intermedias (*Intermediate Progenitor Cells*, IPC), derivadas de la glía radial, se utilizó el marcador Tbr2 (Kriegstein et al., 2006). De este modo, se observa que dichas células también expresan altos niveles de receptores funcionales de Reelina (Fig. 7I-K).

Dado que estábamos trabajando en un cerebro en desarrollo, en la formación de la corteza cerebral, sistema donde se están llevando a cabo altas tasas de neurogénesis, también valoramos que sería interesante estudiar la expresión de los receptores funcionales de Reelina en los progenitores que se encuentran en la fase de *síntesis* (Fase S) del ciclo celular. Para ello, utilizamos la técnica de pulso y caza de BrdU (BromodeoxiUridina), con un tiempo de 1 hora de exposición, tras la cual los animales fueron sacrificados. Se observaron varios perfiles BrdU+ en la parte más basal de la VZ, en la interfaz entre la VZ/SVZ y en la misma SVZ (Fig. 7L-N).

Se puede afirmar también que los FRR se siguen expresando en las NPCs en E17; la colocalización con la proteína nestina (marcador genérico de NPCs) así lo demuestra, observándose tanto en cuerpos celulares de la VZ y SVZ como en procesos radiales de la placa cortical (Fig. 8).

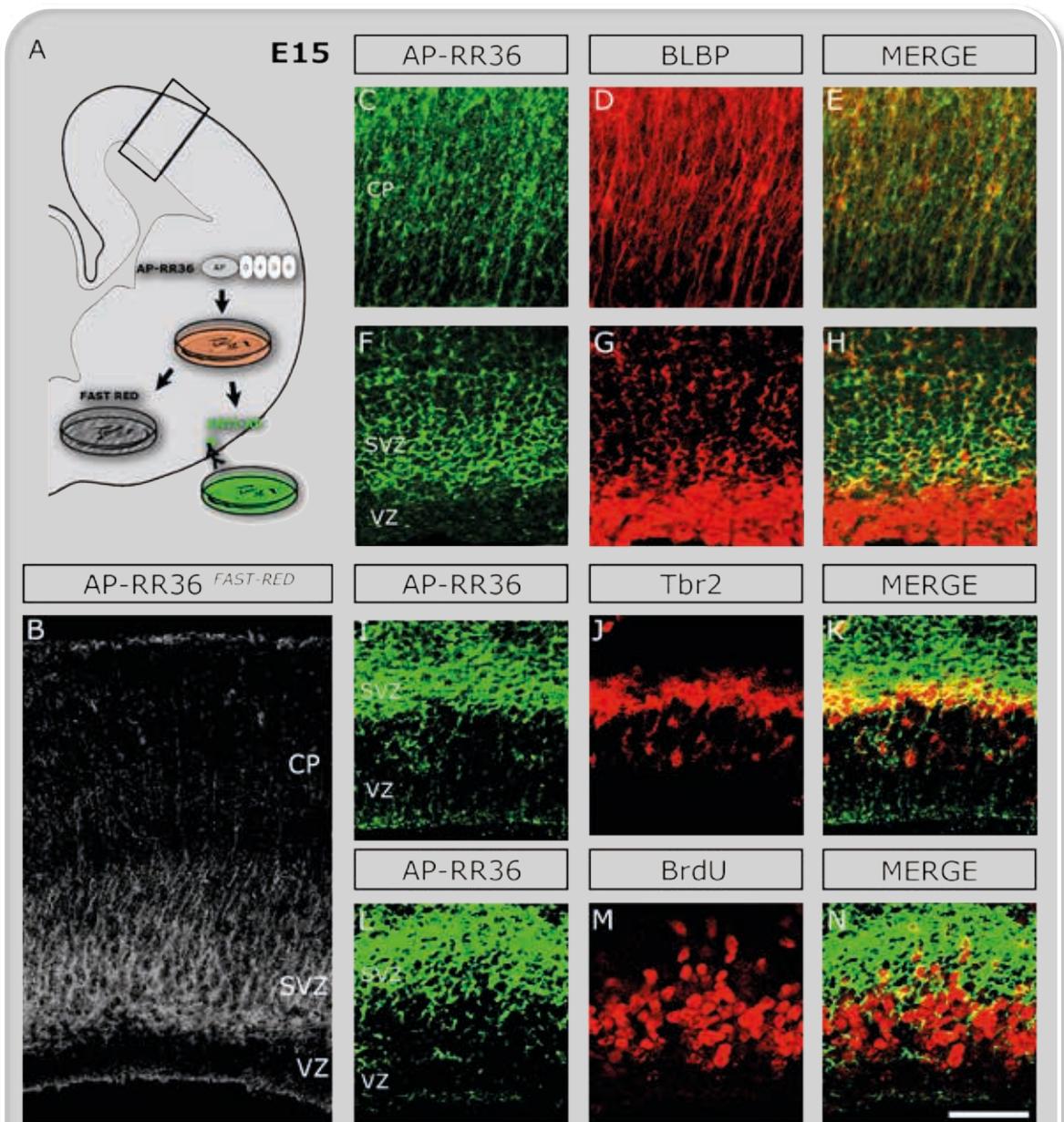


Figura 7 | Las NPCs corticales expresan ApoER2 funcional

El ensayo de *binding in situ* con la proteína de fusión entre la Fosfatasa Alcalina y los fragmentos repetidos 3 a 6 de reelina (AP-RR36) revela la presencia de receptores funcionales de Reelina, mayoritariamente ApoER2, en la corteza en desarrollo a la edad de E15 (A,B). La tinción con AP-RR36 está presente en varios procesos BLBP+ de la glía radial a lo largo de la pared cortical (C-E), así como en subpoblaciones de cuerpos celulares de la glía radial en la parte basal de la VZ (F-H). La mayoría de las IPCs Tbr2+ de la SVZ (I-K) y algunos progenitores en fase S del ciclo celular, BrdU+ (L-N) también se tiñen con AP-RR36. Barra de escala: 200 μ m en B; 150 μ m en C-E; 50 μ m en F-N.

4. La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal

Nuestro grupo ya había demostrado que en la corteza en desarrollo, prácticamente el único receptor de Reelina presente es ApoER2 ya que la expresión de FRR en mutantes nulos para este receptor queda prácticamente abo-

lida (Artículo 1). Apoyando esta observación, experimentos usando mutantes nulos para VLDLR ponen de manifiesto que este receptor apenas se expresaría en corteza. Además, la expresión de ApoER2 es mucho más abundante en la placa cortical de un *reeler* que en la de un animal silvestre, lo cual sugiere que Reelina induce su bajo-regulación (Artículo 1).

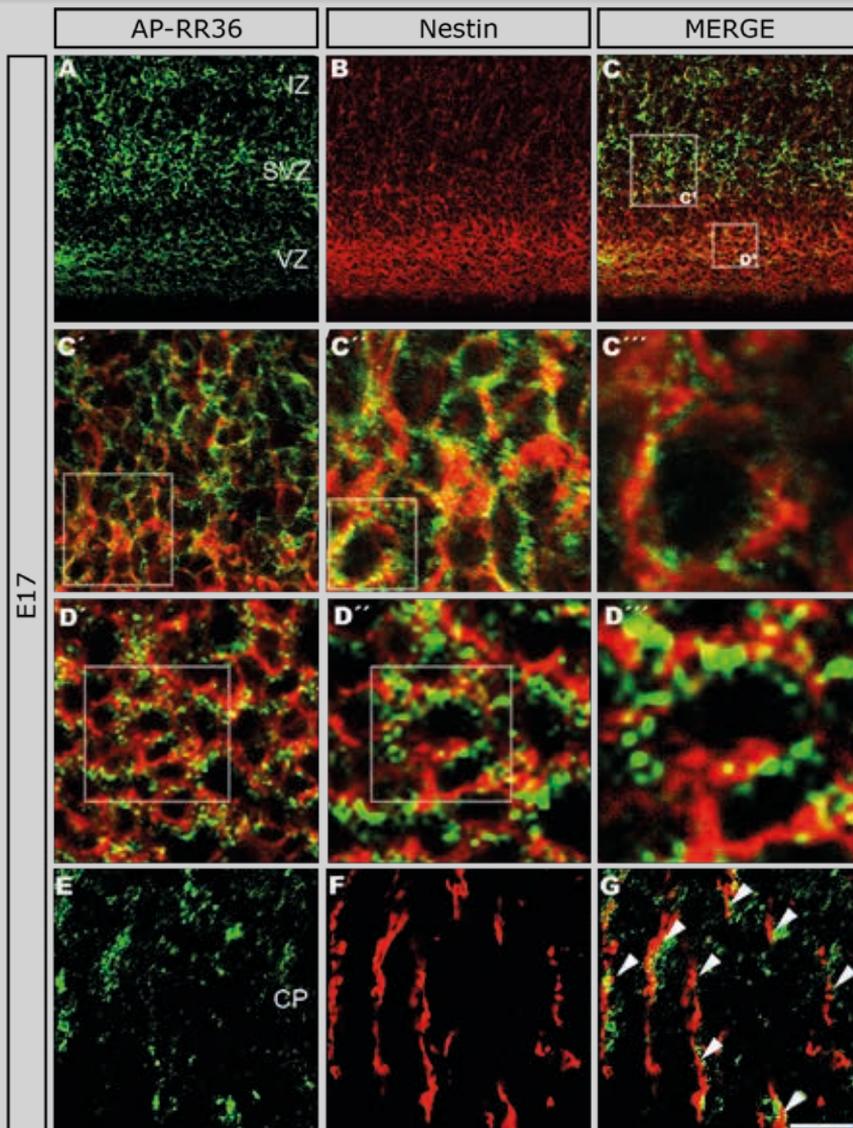


Figura 8 | Las NPCs corticales expresan receptores funcionales de reelina

La detección inmunohistoquímica de la Fosfatasa Alcalina y nestina tras el ensayo de *binding in situ* con la proteína de fusión AP-RR36, pone de manifiesto la presencia de receptores funcionales de reelina, mayoritariamente ApoER2 en NPCs a la edad de E17. La tinción con AP-RR36 se observa en varios cuerpos celulares de NPCs nestina+ (A-D''') en la región VZ/SVZ, así como en procesos de la glía radial a lo largo de la placa cortical (E-G). Barra de escala: 100 μ m en A-C; 40 μ m en C',D'; 15 μ m en C'',D'''; 5 μ m en C''',D''''; 60 μ m en E-G.

Todo ello nos llevó a pensar que la regulación de ApoER2 debía ser muy importante en el proceso de neurogénesis y migración neuronal. Basándonos en estas premisas, el siguiente objetivo se centró en el estudio de los efectos de la alteración de la expresión de ApoER2 en la corteza embrionaria.

En el laboratorio del Dr. Miyata en Japón, llevamos a cabo una serie de

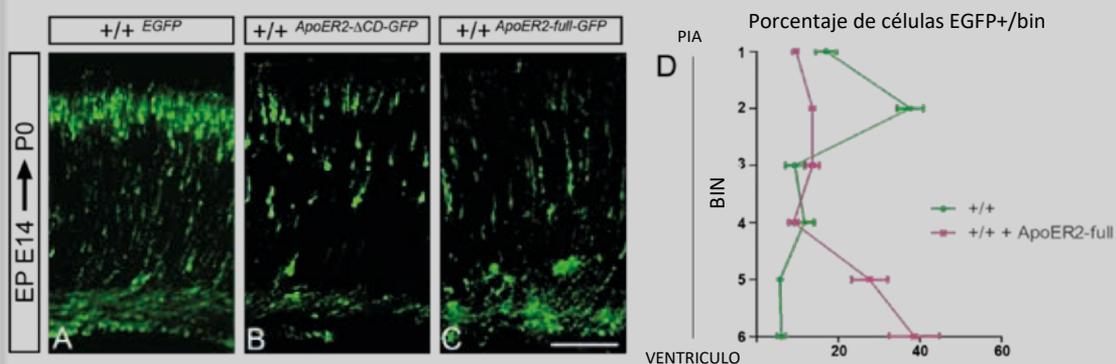
experimentos de electroporación *in utero*, con plásmidos que codifican para sólo EGFP (proteína verde fluorescente mejorada), GFP junto a la forma completa del receptor ApoER2 (ApoER2-full-GFP), o bien GFP junto a una forma truncada del receptor que carece del dominio citoplasmático (*cytoplasmic domain*, CD)(ApoER2- Δ CD-GFP). La electroporación de las cortezas cerebrales de animales silvestres se realizó en el día 14 de gestación (E14) y sus efectos

fueron examinados al nacimiento (día postnatal 0, P0).

En el caso del control (sólo EGFP; Fig. 9A), las células electroporadas están alineadas formando una capa perfectamente delimitada en la zona más superficial de la corteza, bajo la zona marginal. Sin embargo, la expresión de la forma truncada del receptor provoca una dispersión de muchas de las células a lo largo de la placa cortical, aunque se puede apreciar cierto alineamiento de

algunas de ellas (Fig. 9B). Pero el resultado más sorprendente lo exhiben las células que expresan la forma completa del receptor (ApoER2-full; Fig. 9C). La gran mayoría de ellas están dispersas por el CP, la zona intermedia y la SVZ, y prácticamente ninguna se encuentra en la que debería ser su posición natural, alineadas bajo la zona marginal. Para facilitar la interpretación, la figura 9D muestra una cuantificación de este efecto.

Figura 9 | La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal



Se muestran cerebros a P0 que habían sido electroporados a E14 con un plásmido codificante para la proteína EGFP (control, A), para una forma truncada del receptor ApoER2 (B) o para su forma completa (C). En A se puede observar el alineamiento de una capa de neuronas bajo la zona marginal. Sólo aparecen algunas células alineadas (B) o prácticamente ninguna (C) por alteración de su trayectoria de migración radial, cuando los cerebros son electroporados con los plásmidos codificantes para alguna de las formas de ApoER2. Para facilitar la interpretación de los resultados, se ha dividido la corteza en 6 capas artificiales (BIN), cuantificándose el porcentaje de células EGFP+ en cada bin (D). En el control (línea verde), el mayor porcentaje de estas células se encuentra en las “capas” superiores (más próximas a la piamadre). Por el contrario, al sobreexpresar una forma completa del receptor ApoER2 (línea magenta), muy pocas o prácticamente ninguna célula ocupa la que debería ser su posición natural, acumulándose en las capas (bins) intermedias y profundas de la placa cortical. Barra de escala: 150 μm.

5. La reducción de los niveles de ApoER2 rescata la migración neuronal y los niveles de Dab1 en *reeler*

Después de haber observado que la sobreexpresión de ApoER2 tiene un efecto tan aparentemente contraintuitivo, como es la inhibición de la migración neuronal, el siguiente experimento era lógico. Si la ganancia de función provoca esas consecuencias, ¿qué efectos tendría la pérdida de función del receptor? La predicción es que, si la sobrecarga de ApoER2 produce

una inhibición de la migración neuronal en cortezas silvestres, la reducción de su expresión debería, de algún modo, mejorarla.

Sin embargo, para analizar esto, tenemos que prescindir de los ratones silvestres y utilizar mutantes *reeler*, porque la presencia de Reelina endógena, cuyo efecto natural es la bajo-regulación del receptor tras su unión a él, interferiría claramente en los resultados obtenidos. De hecho, la reducción de los niveles de ApoER2 o VLDLR en cortezas silvestres no tiene prácticamente

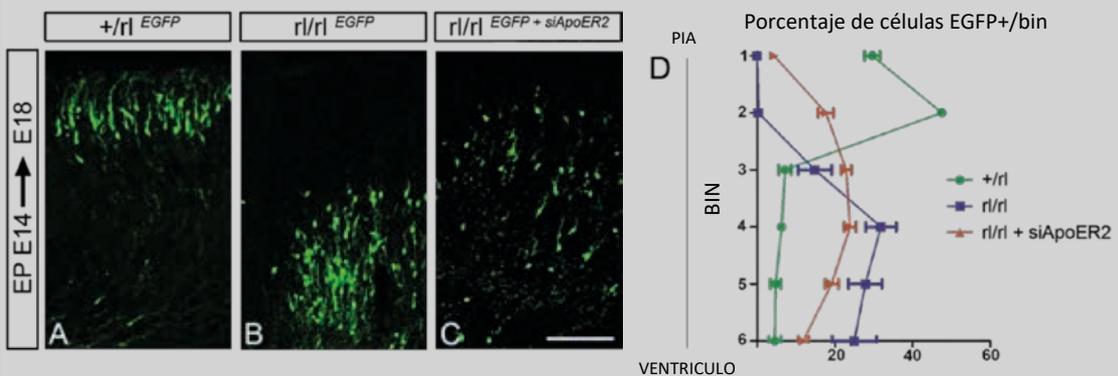
ningún efecto sobre el posicionamiento neuronal (Kubo et al., 2010). Por tanto, estábamos limitados a tener que usar ratones *reeler* y analizar el efecto de la reducción de ApoER2 en un entorno sin Reelina aunque, de nuevo, pueda resultar, en cierto modo, contraintuitivo.

Para provocar la reducción de ApoER2, elegimos el uso de la técnica de electroporación *in utero* de ARN de interferencia de pequeño tamaño (*small interference* RNA, siRNA), dirigido contra el transcrito del gen *lrp8* (siApoER2, codificante para este receptor). La introducción de esta molécula se llevaría a cabo en E14 para ser examinada en E18. Los controles fueron embriones heterocigotos para Reelina, en los que se introdujo el plásmido codificante para sólo EGFP, mientras que entre los embriones *reeler* establecimos dos grupos: a uno de ellos sólo se le introdujo el plásmido EGFP, mientras que al otro, conjuntamente se le incorporó el ARN de interferencia.

De nuevo, como en el caso de las cortezas silvestres del experimento anterior, el alineamiento de células EGFP+ bajo la zona marginal en las cortezas control es evidente (Fig. 10A). Por el contrario, las células EGFP+ de las cortezas *reeler* no forman una capa discernible, concentrándose en la mitad inferior de la pared cortical (Fig. 10B). Sorprendentemente, en las cortezas *reeler* electroporadas con EGFP + siApoER2, las células aparecen más dispersas y posicionadas en un patrón claramente invertido en comparación con las que sólo habían sido electroporadas con EGFP. Un porcentaje de ellas aparece bajo la zona marginal, en posiciones que perfectamente comparables a aquéllas del control heterocigoto (Fig. 10C). En la figura 10D se muestra una cuantificación de estos resultados, representados gráficamente.

En lo que afecta al adaptador citoplasmático Dab1, está bien descrito que se produce una acumulación del mismo por

Figura 10 | La reducción de ApoER2 rescata la migración neuronal en el mutante *reeler*



Se muestran cortezas a E18 que habían sido electroporadas a E14 con un plásmido codificante para EGFP (control) o junto a un ARN de interferencia de ApoER2 (siApoER2). Se puede observar una banda de neuronas alineadas bajo la zona marginal de un cerebro heterocigoto para reelina (A). Las neuronas electroporadas en una corteza *reeler* no forman ninguna banda y se encuentran concentradas en la zona inferior de la pared cortical (B). En la corteza *reeler* electroporada con EGFP+siApoER2 el rescate parcial de la migración neuronal es patente (C). De igual forma que en el experimento anterior, se divide la corteza en 6 capas artificiales (BIN), cuantificándose el porcentaje de células EGFP+ en cada *bin* (D). En el control heterocigoto (línea verde), la práctica totalidad de estas células se encuentra en las “capas” superiores (más próximos a la piamadre). Por el contrario, el control *reeler* (línea azul) muestra las células EGFP+ acumuladas en las capas profundas. Al silenciar la expresión del receptor ApoER2 sobre un fondo genético carente de reelina (línea roja), existe un porcentaje de células electroporadas que abandonan las capas profundas hacia capas más superficiales. Barra de escala: 150 μ m.

la interrupción de la vía de señalización de Reelina o por la ablación genética de Reelina, ApoER2, VLDLR o Fyn y Src (Arnaud et al., 2003; Bock y Herz, 2003; Kuo et al., 2005; Rice et al., 1998; Sheldon et al., 1997; Trommsdorff et al., 1999). Este hecho indica que, en las células capaces de responder a ella, Reelina ejerce su acción mediante la reducción de los niveles de Dab1.

Siguiendo con la línea de experimentos que estábamos llevando a cabo, una cuestión que debíamos examinar era si los niveles de Dab1 se veían alterados por la bajo-regulación de ApoER2 que habíamos producido gracias al ARN de interferencia. Los resultados obtenidos indican que en *reeler*, las neuronas electroporadas con EGFP + siApoER2 mostraban niveles de Dab1 más bajos que las neuronas electroporadas con EGFP únicamente (Fig 11A-G), posibilitando que, quizás, la reducción de ApoER2 por sí sola recapitule la función de Reelina en ausencia de Reelina endógena. Además, a favor de esta idea, reducir la dosis genética de ApoER2 también mejora el posicionamiento neuronal en la corteza *reeler* (Fig. 12).

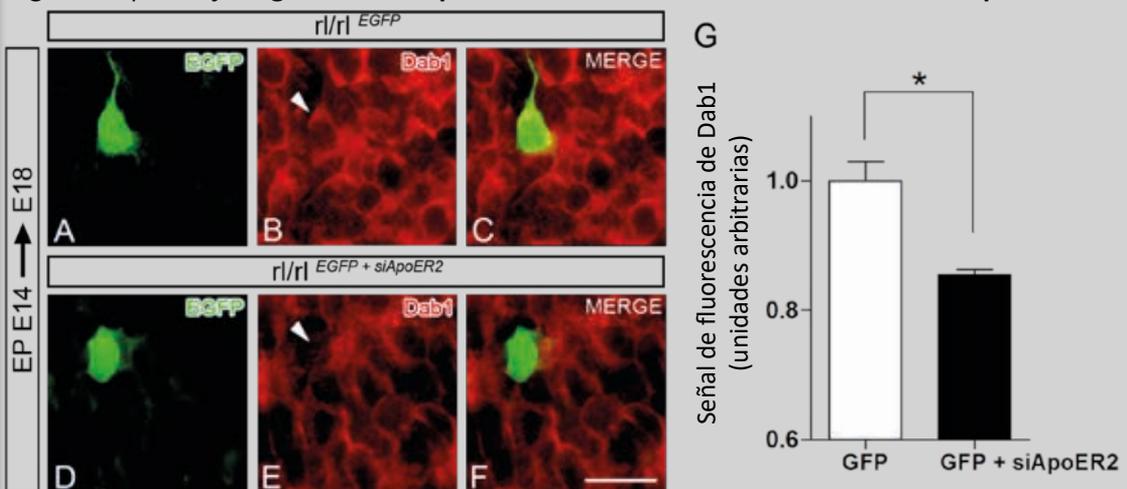
6. Rescate parcial de laminación cortical y de los niveles de ApoER2 y Dab1 mediante la expresión de Reelina en NPCs en *reeler*

En este punto, existen dos observaciones clave que predicen una posible función de Reelina en la zona VZ/SVZ: por un lado, el enriquecimiento de ApoER2 en NPCs y por otro, la evidencia de que la carga de ApoER2 determina el comportamiento migratorio celular. Reelina tendría una hipotética acción sobre el posicionamiento neuronal y los niveles de ApoER2 se verían reducidos. Es por ello que, para evaluar este pronóstico, se emplearon los ratones transgénicos *nestin-Reelin* (Magdaleno et al., 2002), quienes expresan Reelina de forma ectópica en NPCs bajo el control del promotor de nestina (proteína que se expresa exclusivamente en progenitores neurales).

6.1. Evaluación del posicionamiento neuronal

Para poder evaluar qué efecto pudiera tener la expresión de Reelina ectópica sobre la configuración de las capas neuronales, se

Figura 11 | La bajo-regulación de ApoER2 rescata los niveles de Dab1 en *reeler* por sí sola



Electroporación a E14 y observada a E18. Los niveles del adaptador intracelular Dab1 se reducen en las neuronas corticales *reeler* tras la electroporación con EGFP+siRNA (E), en comparación con la señal obtenida cuando solo se introduce EGFP (B). En C se observa una colocalización de los marcadores, no apreciable en F, por la reducción en la expresión de Dab1. Una cuantificación de este hecho es mostrada en G (ver métodos). Barra de escala: 15 μ m.

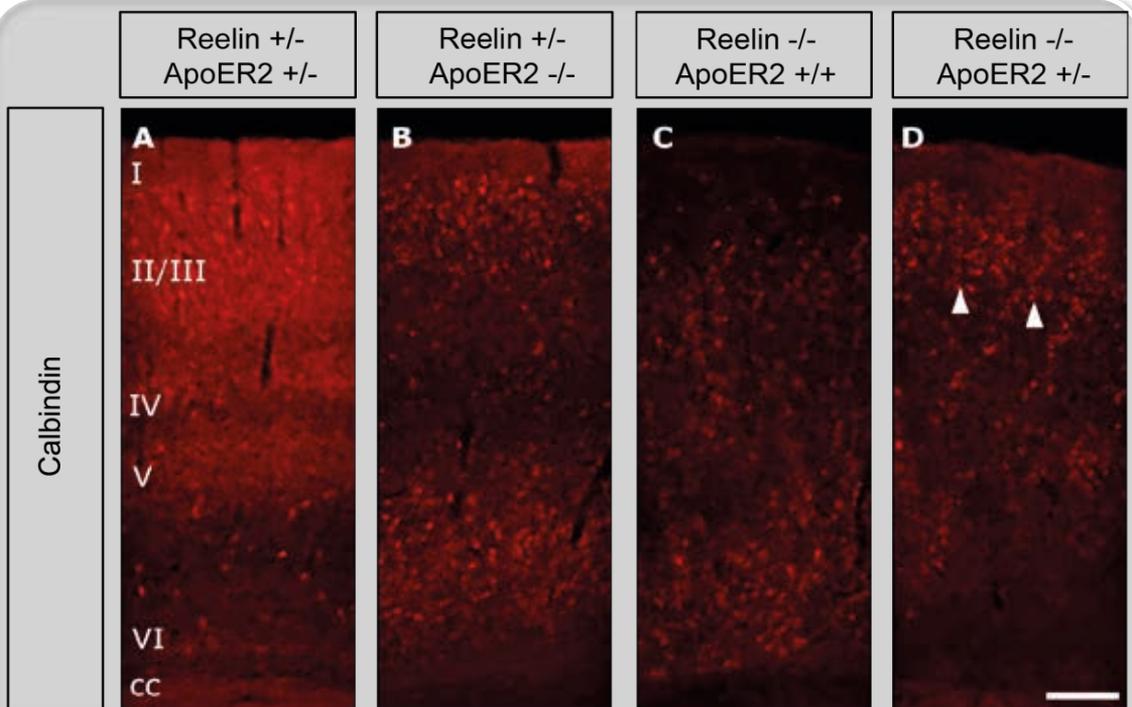


Figura 12 | **Rescate parcial del posicionamiento neuronal en los dobles mutantes *reeler/ApoER2*^{+/-}**

Detección inmunohistoquímica de calbindina en P60 en dobles mutantes *reelin*^{+/-}/*ApoER2*^{+/-} (A), *reelin*^{+/-}/*ApoER2*^{-/-} (B), *reelin*^{-/-}/*ApoER2*^{+/+} (C) y *reelin*^{-/-}/*ApoER2*^{+/-} (D). Las cortezas dobles heterocigotas para reelina y ApoER2 son indistinguibles de las silvestres (A). La reducción de la dosis genética de reelina no afecta a la posición deficiente de las neuronas en la corteza del mutante nulo ApoER2 (B). Sin embargo, la reducción de la dosis genética de ApoER2 mejora el posicionamiento neuronal en la corteza *reeler* (C,D). Barra de escala: 170 μ m.

llevó a cabo una triple inmunofluorescencia, combinando un marcador de células de la subplaca como Vglut1 (Ina et al., 2007) y los marcadores de capas corticales Tbr1 (para capa VI y células derivadas de la preplaca, Bulfone et al., 1995) y Cux1 (para capas II/III/IV, Nieto et al., 2004).

El análisis de las imágenes obtenidas permite confirmar que Reelina expresada de forma ectópica sobre un fondo genético silvestre no altera la laminación cortical (Fig. 13A,B,E). Sin embargo y, en contra de lo que se creía hasta el momento, la presencia de Reelina ectópica sobre un fondo *reeler* rescata parcialmente la laminación cortical, específicamente en la población celular posicionada por encima de una subplaca ectópica, no por debajo de ella (Fig. 13C,D,F).

Es decir, que aproximadamente un 15% del total de células Cux1+ (capas superficiales) y un 70% del total de las Tbr1+ (capas profundas) consiguen sobrepasar la subplaca para establecerse en una región rescatada de placa cortical. Consistente con observaciones anteriores (Feng y Cooper, 2009; Nieto et al., 2004), las células Cux1+ están virtualmente ausentes en el tercio superior de la pared cortical *reeler* (no mostrado).

Pero las células que sobrepasan la subplaca ectópica para situarse en esta rescatada placa cortical, una vez se confirma que provienen de poblaciones que constituyen capas corticales distintas, ¿mantienen allí su posición relativa? Es decir, ¿se rescata también el patrón *inside-out* natural?

Para responder a esta pregunta, se inyectaron secuencialmente los análogos de nucleótido CldU (ClorodeoxiUridina) e IdU (IododeoxiUridina) en hembras en su 13^{er} y 14^o día de gestación, respectivamente, realizando posteriormente triple inmunofluorescencia de las secciones a P0. Se observa que el patrón de posicionamiento celular en *inside-out* se había rescatado parcialmente en las cortezas *reeler ne-Reelin*, dado que las células que habían nacido más tarde (marcadas con IdU) habían sobrepasado a sus predecesoras (marcadas 24 horas antes con CldU), pero sólo por encima de la subplaca ectópica (Fig. 13G,H).

6.2. Evaluación de los niveles de ApoER2 y Dab1

Posteriormente, analizamos las variaciones de los niveles de ApoER2 mediante ensayo de tinción *in situ* con AP-RR36, empleada en anteriores experimentos. De nuevo, los ratones *reeler* transgénicos (*reeler ne-Reelin*) son los idóneos para detectar una posible bajo-regulación del receptor por acción de la expresión ectópica de Reelina, puesto que, como ya habíamos en el Artículo 1, la expresión de ApoER2 en la pared cortical *reeler* embrionaria es muy elevada.

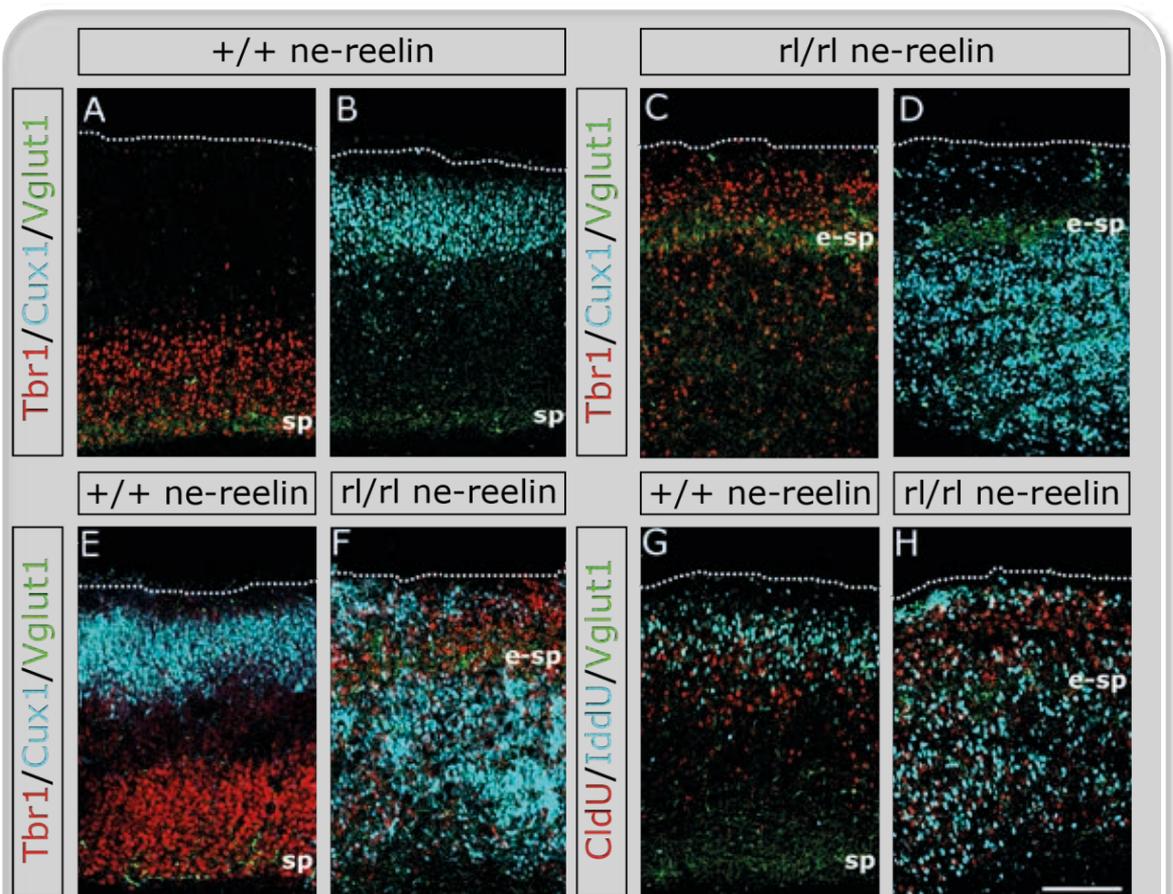


Figura 13 | Rescate parcial del patrón *inside-out* en *reeler* debido a la reelina ectópica de las NPCs

Detección inmunohistoquímica a P0 de Tbr1, Cux1 y VGlut 1 en secciones adyacentes de cortezas *ne-reelin* (A,B) y *reeler ne-reelin* (C,D). La expresión del transgén *ne-reelin* no altera la laminación cortical en un fondo genético silvestre. Sobre un fondo *reeler* sí rescata la laminación cortical en la población celular por encima de la subplaca ectópica (e-sp). El uso de fragmentos Fab bloqueantes confirmó estos resultados permitiendo la combinación de ambos anticuerpos en la misma sección (E,F). La inyección secuencial de los análogos de nucleótido CldU e IdU en E13 y E14, respectivamente, demuestra además un rescate del patrón de laminación *inside-out* por encima de la subplaca ectópica del *reeler ne-reelin* (G,H). Barra de escala: 200 μ m.

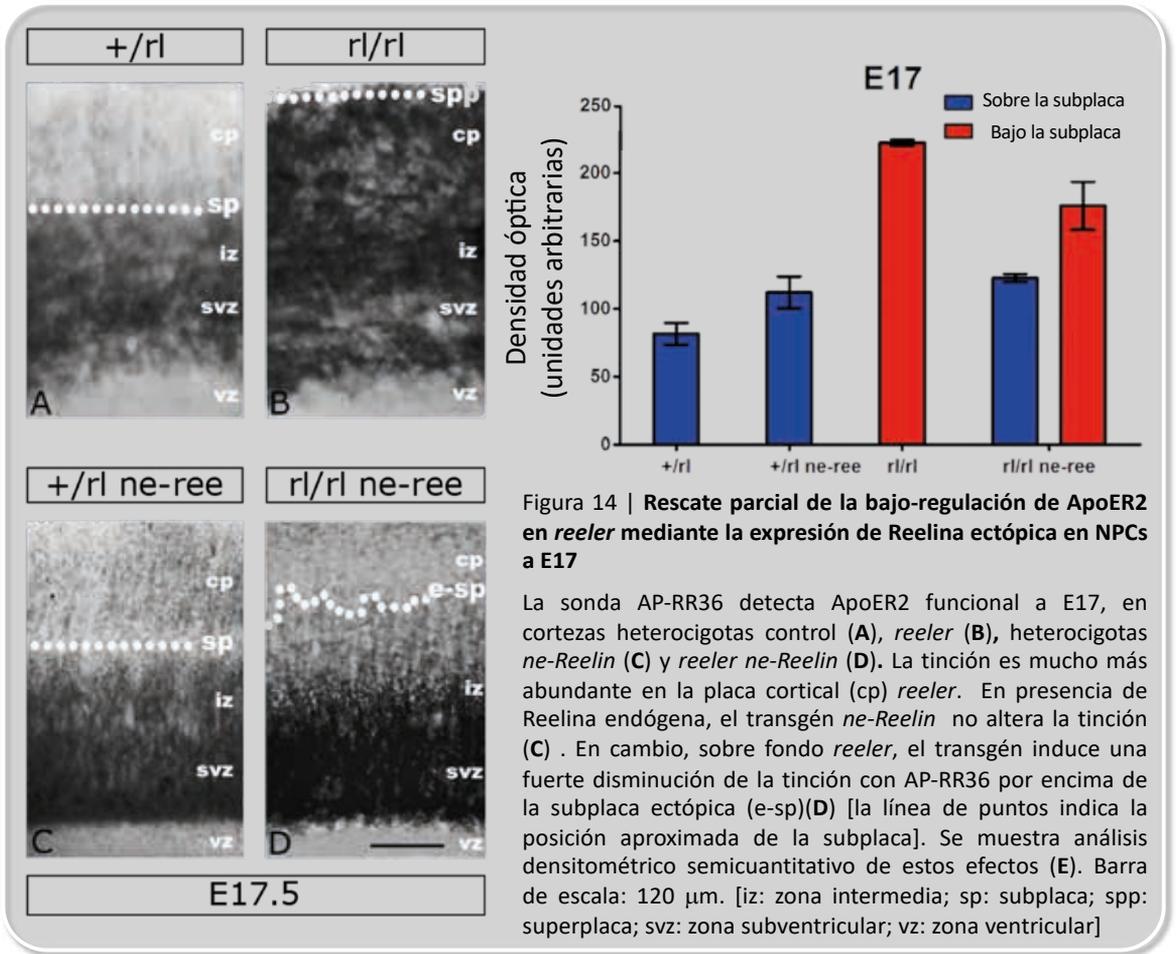


Figura 14 | Rescate parcial de la bajo-regulación de ApoER2 en *reeler* mediante la expresión de Reelina ectópica en NPCs a E17

La sonda AP-RR36 detecta ApoER2 funcional a E17, en cortezas heterocigotas control (A), *reeler* (B), heterocigotas *ne-Reelin* (C) y *reeler ne-Reelin* (D). La tinción es mucho más abundante en la placa cortical (cp) *reeler*. En presencia de Reelina endógena, el transgén *ne-Reelin* no altera la tinción (C). En cambio, sobre fondo *reeler*, el transgén induce una fuerte disminución de la tinción con AP-RR36 por encima de la subplaca ectópica (e-sp)(D) [la línea de puntos indica la posición aproximada de la subplaca]. Se muestra análisis densitométrico semicuantitativo de estos efectos (E). Barra de escala: 120 μm. [iz: zona intermedia; sp: subplaca; spp: superplaca; svz: zona subventricular; vz: zona ventricular]

Este resultado se pudo confirmar a E17, donde ApoER2 es mucho más abundante en la placa cortical *reeler* que en la silvestre (Fig. 14A,B). Reelina expresada de forma ectópica tampoco tiene ningún efecto aparente sobre la expresión de ApoER2 en presencia de Reelina endógena (fondos genéticos silvestre y heterocigoto). En cambio, sobre un fondo genético *reeler*, la Reelina ectópica produce una fuerte disminución de ApoER2 por encima de la

subplaca, también ectópica (Fig. 14C,D). La semicuantificación de estos efectos puede observarse en la gráfica mostrada en la Fig. 14E.

A la edad de P0, los cerebros analizados ponen de manifiesto resultados comparables (Fig. 15A,E). Pero además, en esta edad, los niveles de expresión de Dab1 están normalizados en la región rescatada de la placa cortical de ratones *reeler ne-Reelin* (Fig. 16).

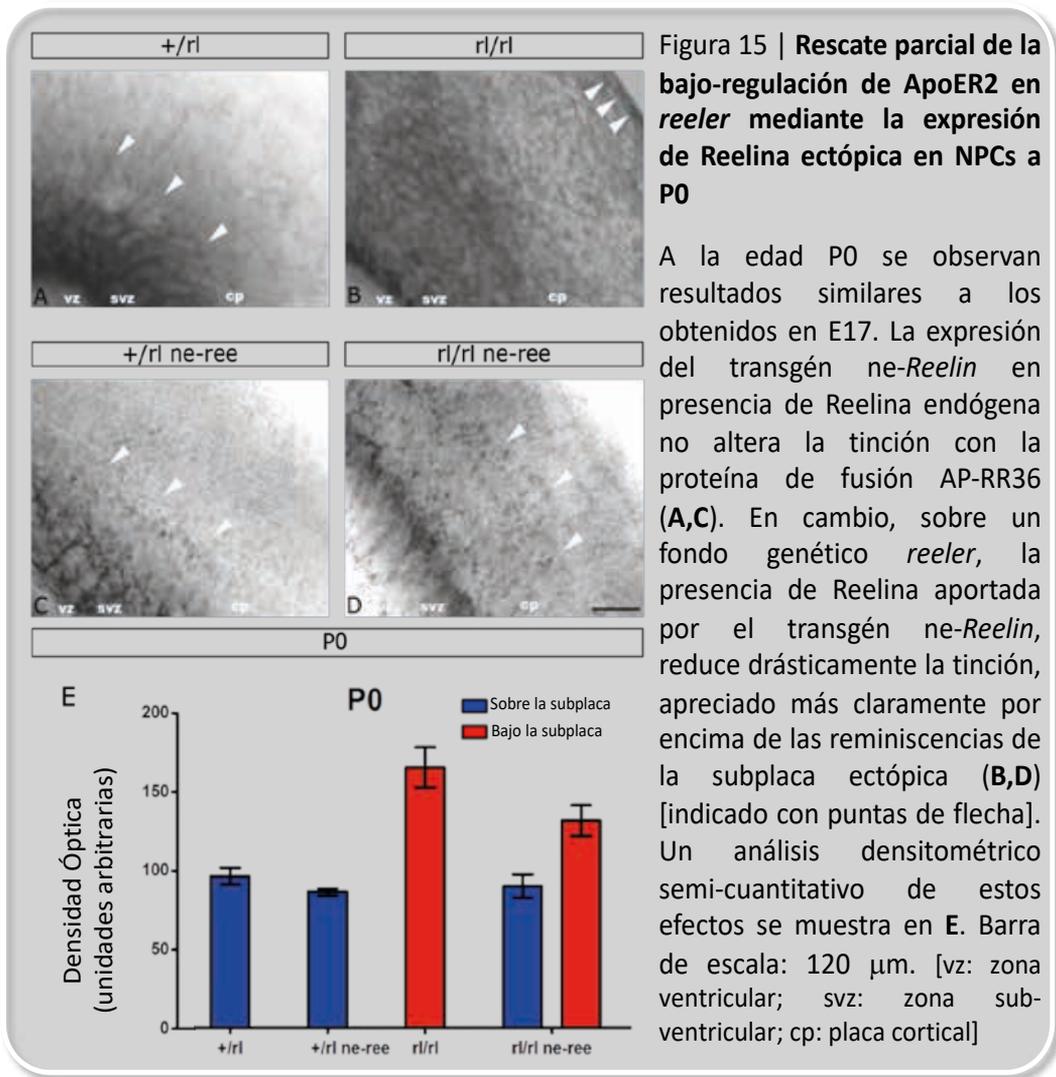
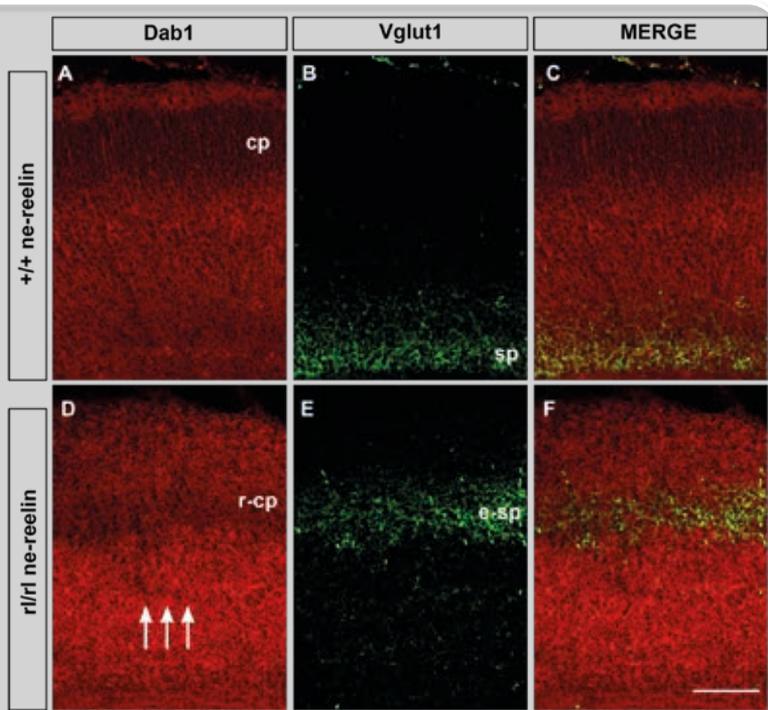


Figura 16 | Rescate parcial de los niveles de Dab1 por la expresión de reelina ectópica en NPCs

Detección inmunohistoquímica de Dab1 y VGlut1 en cortezas *reeler* a P0. En presencia de reelina endógena (+/+) el transgén *ne-reelin* no altera la tinción de Dab1 en comparación con la corteza silvestre convencional (no mostrado). En *reeler* (rl/rl), el transgén *ne-reelin* induce una fuerte disminución de la señal de Dab1 sólo por encima de la subplaca ectópica (e-sp, D-F), en comparación con el fuerte marcaje homogéneo de Dab1 en toda la pared cortical *reeler* convencional (no rescatada, flechas). Barra de escala: 180 μm . [cp: placa cortical; r-cp: placa cortical rescatada]



- CAPÍTULO II: ADULTO -

Una vez concluido el estudio de los receptores funcionales de Reelina en el embrión, pasamos a analizar su expresión en el cerebro adulto. Nuestras observaciones preliminares, como que los mutantes para Reelina, ApoER2 y Dab1, tenían un claro ensanchamiento ventricular y una ruta migratoria rostral hiper celular, permitían pensar que la vía de señalización de Reelina podría permanecer activa en el adulto. Es por ello que, utilizando la misma herramienta, la proteína de fusión AP-RR36, llevamos a cabo una cartografía de la expresión de los FRR a lo largo del cerebro del ratón adulto. Estos resultados, junto con la manipulación genética de los elementos de esta vía de señalización, los ensayos de fosforilación de Dab1 *ex vivo* y la infusión intraventricular de Reelina, permiten demostrar que la señalización de Reelina persiste en el nicho neurogénico adulto.

1. La mayor densidad de receptores funcionales en el cerebro adulto de ratón se encuentra en la vía migratoria rostral

Para intentar demostrar que la vía de Reelina sigue siendo activa en edades postnatales, era esencial conocer, en primer lugar, si había una continuidad en la expresión de sus receptores funcionales en animales adultos. Por tal motivo, llevamos a cabo un análisis de su expresión en el cerebro adulto, gracias a la herramienta que ya habíamos utilizado en los artículos 1 y 2, la proteína de fusión AP-RR36.

Aún con la dificultad que entraña manejar secciones frescas de cerebro de 200 μm de grosor, la magnífica resolución que ofrece el revelado enzimático de esta técnica permitió poder elaborar una cartografía rostro-caudal de la expresión de los FRR, desde el bulbo olfatorio hasta el tronco del encéfalo, incluyendo el cerebelo (Fig. 17). Así, observamos claramente que la mayor densidad de FRR en el cerebro adulto se

encuentra en la ruta migratoria rostral (RMS), si bien también se expresan en los dos nichos neurogénicos adultos conocidos, la zona endodimensional/subendodimensional (EZ/SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del hipocampo. Asimismo, se observa una tinción difusa en la capa glomerular del bulbo olfatorio, el núcleo habenular medial y la capa molecular del cerebelo (Fig. 18).

Se puede afirmar, además, que la mayor contribución a esta señal en los nichos neurogénicos del cerebro se debe a ApoER2, como queda patente al analizar los mutantes nulos de este receptor, prácticamente carentes de tinción, salvo por una señal difusa en la capa glomerular del bulbo olfatorio. En consonancia con estos resultados, están los obtenidos con los mutantes nulos para el otro receptor canónico de Reelina, VLDLR. La tinción de FRR a lo largo del cerebro pero ausente en el cerebelo (expresión prácticamente complementaria a la del mutante ApoER2), permite afirmar que VLDLR es el receptor principal presente en esta estructura.

Por otro lado, la tinción de la sonda AP-*Reelin* muestra un incremento gradual a medida que la carga genética de Reelina disminuye. La señal observada en el cerebro heterocigoto para Reelina es mayor que en el silvestre y, a su vez, es claramente mayor en el *reeler*, lo cual apoya que, en efecto, Reelina provoca la bajo-regulación del receptor.

2. Colocalización en EZ/SEZ/RMS de FRR y subpoblaciones de todos los tipos celulares del nicho neurogénico

Al observar las regiones tan específicas en las que se expresa ApoER2 en el cerebro, el siguiente objetivo fue determinar qué tipos celulares del nicho neurogénico de los ventrículos laterales serían competentes para responder a una señal desencadenada por Reelina, así como examinar la localización de ApoER2 en los componentes celulares

BINDING IN SITU SONDA AP-REELIN (P60)

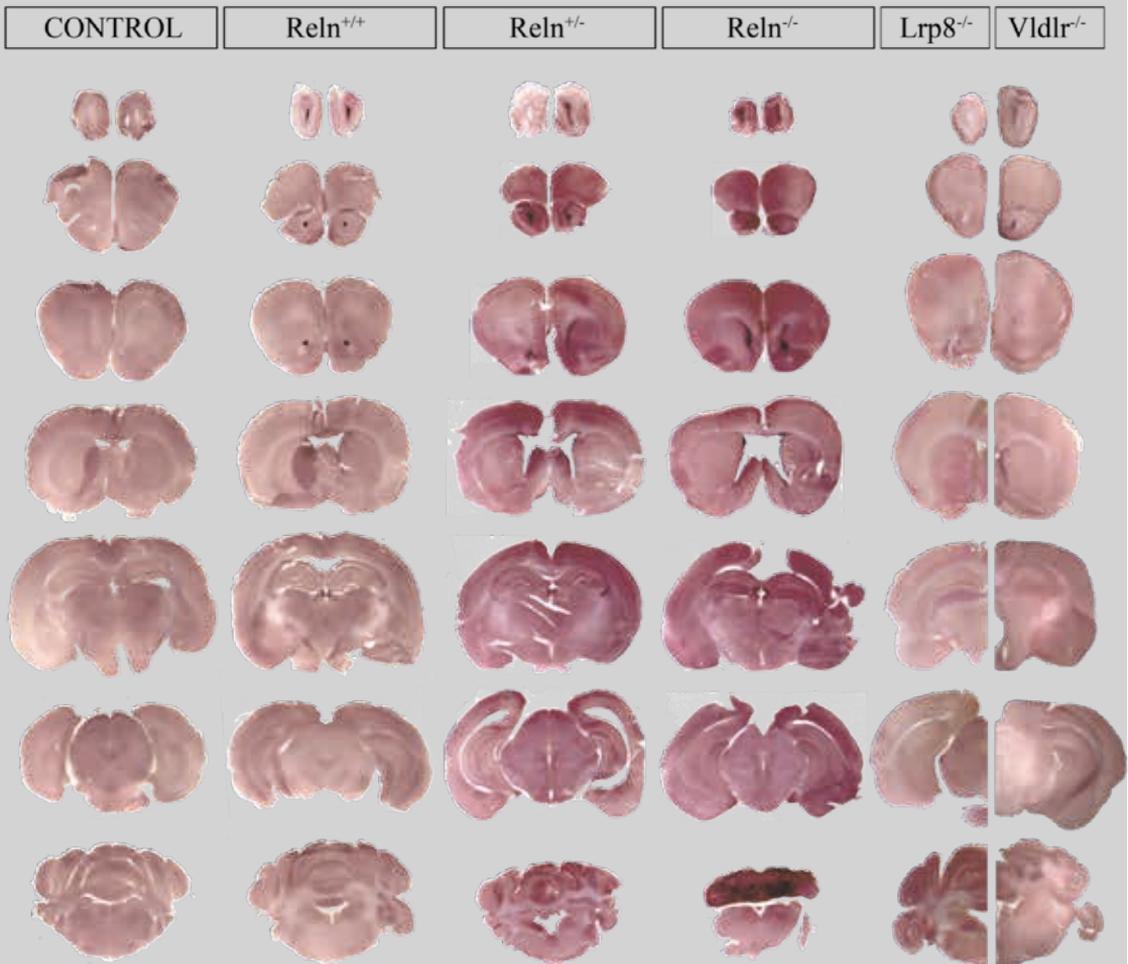


Figura 17 | El principal receptor de reelina en los nichos neurogénicos del cerebro adulto de ratón es ApoER2.

Cartografía de la expresión de lugares de unión de reelina mostrada a lo largo del eje rostro-caudal, desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo, revelados mediante el uso de la proteína de fusión AP-RR36. El lugar de máxima expresión se localiza en la vía migratoria rostral, la zona subventricular de los ventrículos laterales, la capa subgranular del hipocampo y la capa molecular del cerebelo. Nótese un incremento de la señal a medida que la dosis genética de reelina va disminuyendo, hasta alcanzar un nivel máximo en *reeler* (Reln^{-/-}). El mutante Lrp8, el cual carece del receptor ApoER2, prácticamente sólo muestra señal en cerebelo, indicando que es el principal, si no el único, receptor de reelina en los nichos neurogénicos del cerebro adulto, al contrario de lo que ocurre con el mutante VLDLR, que exhibe una tinción prácticamente silvestre a lo largo del cerebro, excepto en el cerebelo, donde se aprecia una disminución de la señal, indicando que VLDLR es el principal receptor en esta estructura.

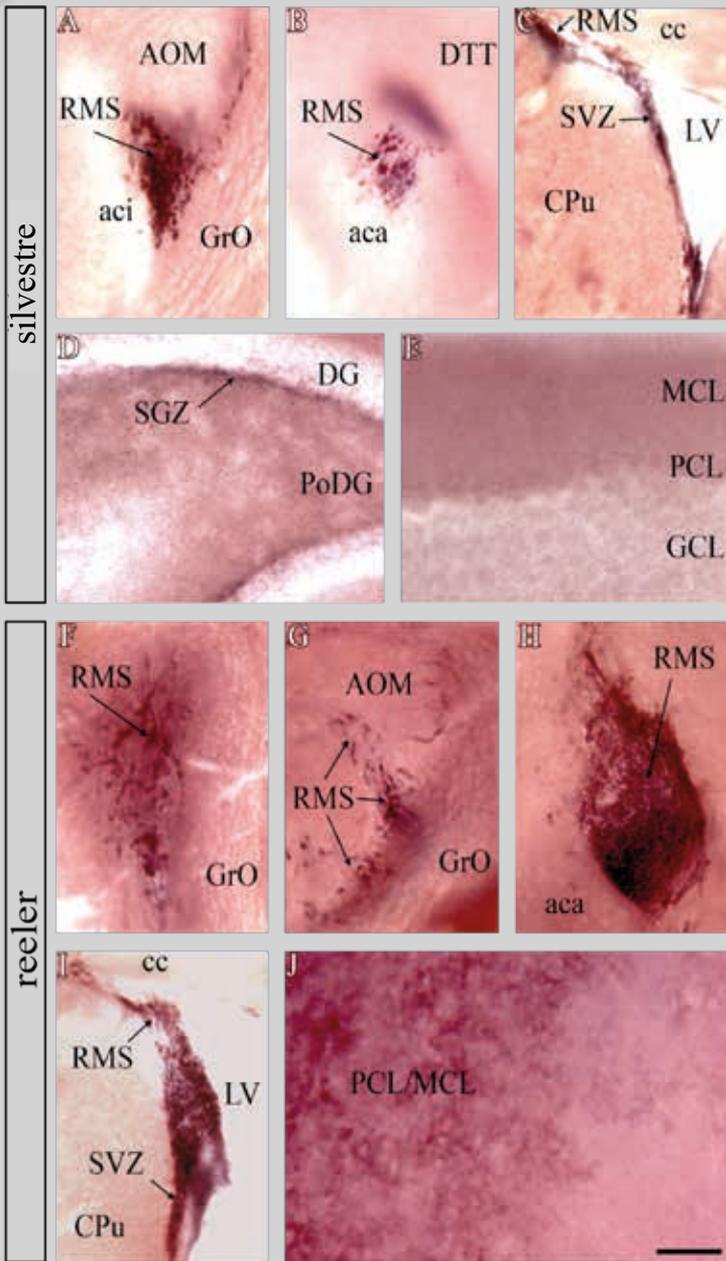


Figura 18 | Lugares de expresión de FRR en el cerebro adulto

La tinción con AP-reelin en el ratón silvestre (A-E) y en *reeler* (F-J) pone de manifiesto la presencia de receptores funcionales de reelina a lo largo de la SEZ/RMS tanto en silvestre (A-C) como en *reeler* (F-I). La RMS de los mutantes *reeler* aparece muy delgada (hipocelular) en su porción rostral (F-G), sin signos de acumulación de neuroblastos en el núcleo del bulbo olfatorio, pero bastante más gruesa (sumamente hiper celular) en su parte caudal (H-I). Los FRR también se encuentran en la zona subgranular del hipocampo (D). Cabe destacar la débil tinción de la capa molecular del cerebelo en el silvestre (E), que se incrementa notablemente en *reeler* (J).

aca: parte anterior de la comisura anterior; aci: parte intrabulbar de la comisura anterior; AOM: parte medial del núcleo olfatorio anterior; cc: cuerpo calloso; CPu: núcleo Caudado-Putamen; DTT: tecta de la tenia dorsal; DG: giro dentado; GCL: capa granular del cerebelo; GrO: capa granular del bulbo olfatorio; LV: ventrículo lateral; MCL: capa molecular del cerebelo; PCL: capa de células de Purkinje; PoDG: capa polimorfa del giro dentado; RMS: ruta migratoria rostral; SVZ: zona subventricular.

Barra de escala: 200 μ m.

que componen la RMS. La combinación del ensayo de *binding in situ* de la sonda AP-RR36 con la detección mediante inmunofluorescencia, pone de manifiesto que, en mayor o menor medida, de nuevo todas las subpoblaciones celulares de la EZ/SEZ son competentes para recibir Reelina como ligando, como queda demostrado por la colocalización de ApoER2 funcional con marcadores específicos para endimocitos (células tipo E) [S100 β], astrocitos subventriculares (incluyendo células tipo B) [GFAP],

células amplificadoras transitorias (células tipo C) [Mash1], neuroblastos (células tipo A) [DCX], así como células en plena fase S del ciclo celular [pulso y caza tras 1 hora de inyección con BrdU]. Es destacable que el mayor grado de colocación en la expresión de ApoER2 se da en los neuroblastos. Se pone de manifiesto, por tanto, una continuidad embrión-adulto en la expresión del receptor ApoER2 en los diversos linajes celulares del nicho neurogénico (Fig. 19).

Por lo que respecta a los componentes de la ruta migratoria rostral, consistentemente los neuroblastos (positivos para el marcador Doblecortina, DCX) siguen expresando ApoER2, junto con los astrocitos (GFAP+) que conforman los “tubos” por los que éstos discurren y que facilitan su migración a través de un ambiente adulto. Como se ha descrito anteriormente, los neuroblastos también llevan a cabo divisiones a lo largo de la RMS, desde su nacimiento en la EZ/SEZ hasta que alcanzan su destino en las distintas capas del bulbo olfatorio (Menezes et al., 1995). No es

menos significativo que estos elementos en división también serían competentes para responder a Reelina (Fig. 20).

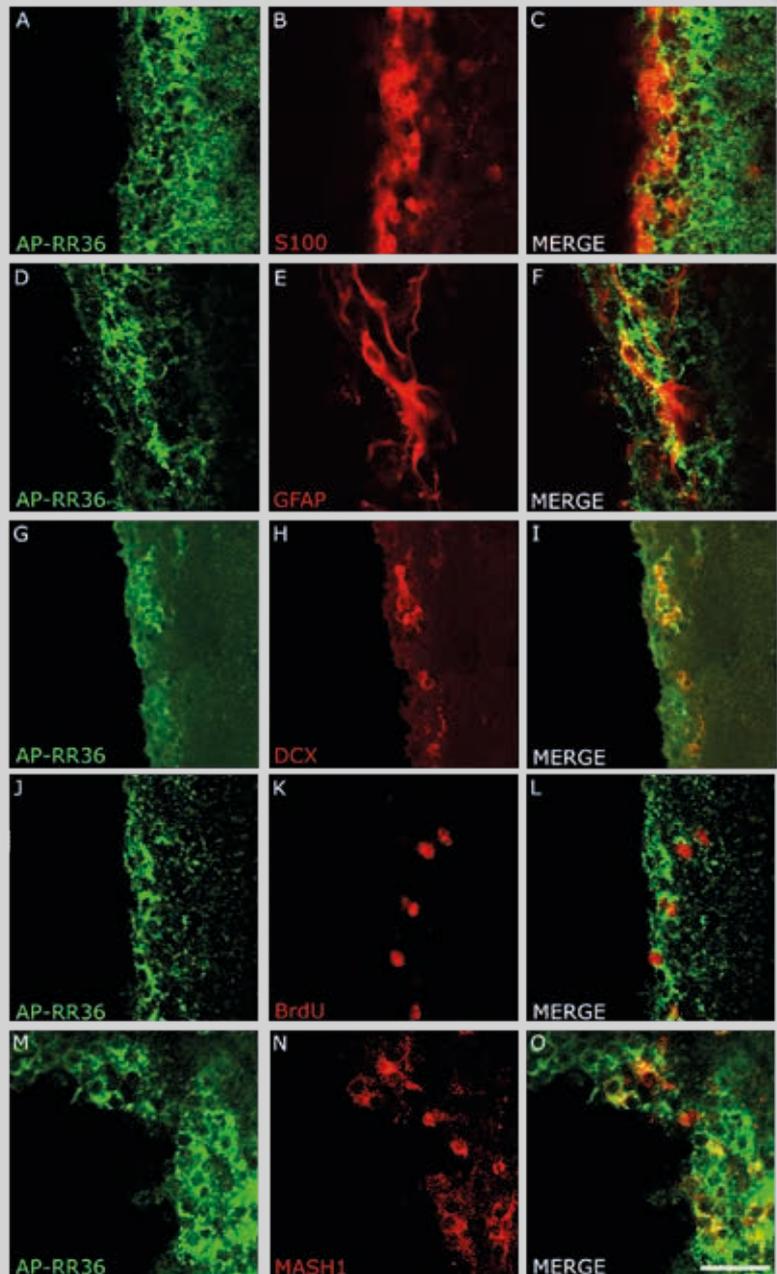
3. La señalización de Reelina permanece activa en la SVZ adulta

Si bien ApoER2 es considerado como un receptor promiscuo, los indicios que hasta ahora teníamos para pensar que la señalización desencadenada por Reelina seguía siendo activa en el adulto, eran más que suficientes para justificar el siguiente experimento.

Figura 19 | Reelina se une a los principales tipos celulares del mayor nicho neurogénico adulto.

Todas las subpoblaciones celulares de la EZ/SEZ son competentes para recibir reelina como ligando. Colocalización de ApoER2 funcional con marcadores específicos para células S100 β +, que corresponden a los endimocitos, células Tipo E (A-C). Los astrocitos subventriculares, conocidos como células tipo B, que expresan GFAP, también poseen cierto grado de expresión de receptores de reelina (D-F). El mayor grado de identidad en la expresión se observa entre ApoER2 y Doblecortina, marcador de neuroblastos, o células tipo A (G-I). Células en plena fase S del ciclo celular (1 hora tras la inyección de BrdU, J-L) y las llamadas células amplificadoras transitorias o células tipo C, que expresan Mash1, también presentan son competentes a la unión de reelina.

Barra de escala: A-C; G-I: 50 μ m. D-E: 30 μ m; M-O: 40 μ m.



Nuestro grupo había observado que el mutante *reeler* adulto mostraba un ensanchamiento ventricular desmesurado y una RMS hipercelular. Las células de la EZ/SEZ/RMS son competentes para recibir la señal de Reelina, es decir, expresan uno de los elementos canónicos de la vía de señalización, el receptor ApoER2. Además, se ha descrito la presencia del adaptador

intracelular Dab1 en la RMS, otro de los tradicionales componentes de la vía (Hack et al., 2002).

Como se sabe, una condición que ha de darse para que la señal de Reelina a través de su receptor sea transducida, es la fosforilación de Dab1 (Howell et al., 1999). Durante el desarrollo embrionario, hemos

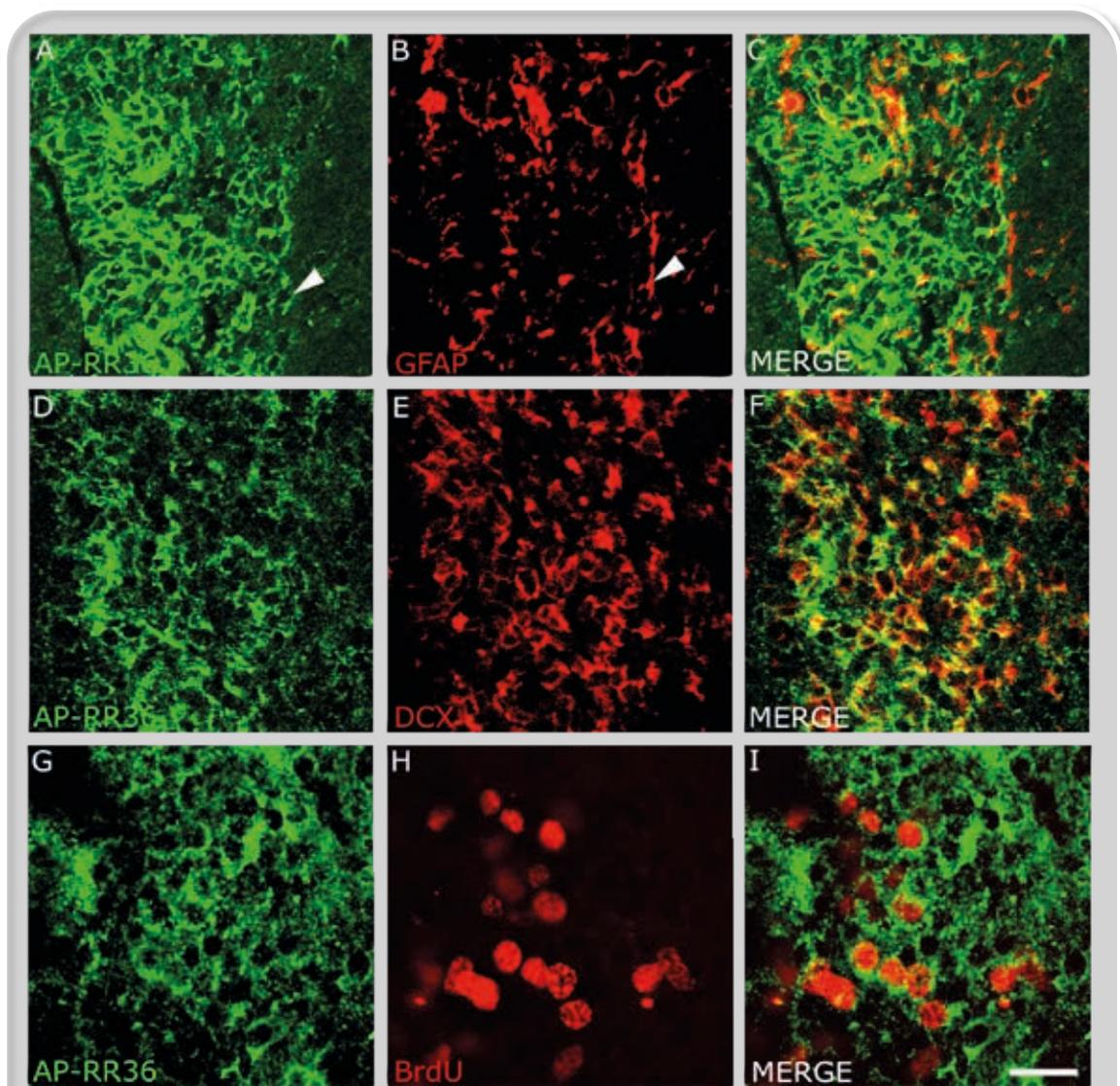


Figura 20 | Los FRR se expresan en la RMS.

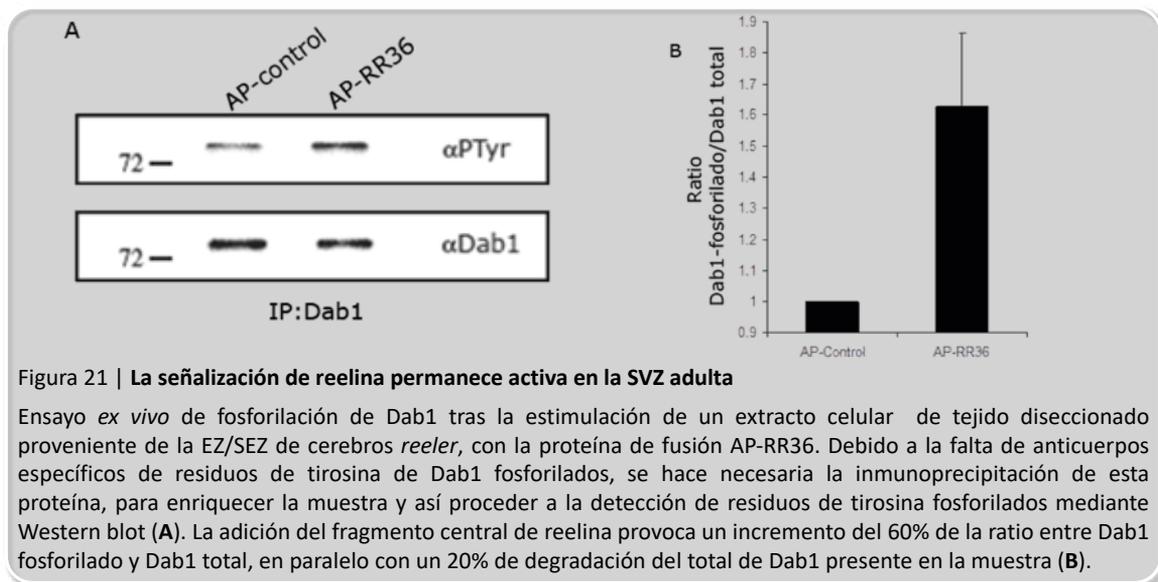
La expresión de receptores funcionales de Reelina se mantiene a lo largo de la ruta migratoria rostral, como se muestra mediante esta colocalización de la proteína de fusión AP-RR36 y los astrocitos GFAP+ (A-C), que forman los tubos por los que discurren los neuroblastos, DCX+ (D-F). Las células en fase S del ciclo celular, ubicadas a lo largo de toda la RMS, también son competentes a la acción de Reelina (G-H). Barra de escala: A-F: 40 μ m; G-I: 30 μ m.

demostrado que Reelina, mediante un mecanismo de bajo-regulación de ApoER2, promueve que las nuevas neuronas se desvinculen de sus progenitores y es capaz de normalizar los niveles de Dab1 sobre un fondo genético *reeler* (Artículo 1). Por todo ello y, con el afán de comprobar si la vía de señalización de Reelina sigue siendo activa en el cerebro adulto, realizamos un ensayo de fosforilación de Dab1 *ex vivo* bajo estimulación de Reelina, empleando como sustrato un homogenado de células extraídas de la EZ/SEZ de animales adultos *reeler*.

El fragmento de Reelina que comprende las repeticiones 3 a 6 (RR36) recapitula la gran mayoría de las funciones de la proteína y es capaz de desencadenar una señal (Jossin et al., 2004). Para seguir con la línea de experimentos llevados a cabo hasta el momento, para la realización de este ensayo

de fosforilación de Dab1 se empleó la proteína de fusión AP-RR36 (aunque previamente y, con idéntico resultado, ya lo habíamos realizado con Reelina recombinante, generada en nuestro laboratorio mediante transfección de células HEK293T). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se hizo necesaria una inmunoprecipitación de Dab1, para enriquecer la muestra con esta proteína, dado que se iba a emplear un anticuerpo que detecta genéricamente los residuos de Tirosina fosforilada.

Los resultados de este ensayo muestran que, en efecto, se produce la fosforilación de Dab1 tras la incubación de células de la EZ/SEZ con AP-RR36. El incremento de la señal de la banda de fosfotirosinas, en unión a la disminución de la señal de Dab1, consistente con el inicio de su degradación, permite afirmar que la señalización de Reelina persiste en la EZ/SEZ adulta (Fig. 21).



4. La falta de función de Reelina, ApoER2, o Dab1 provoca hipercelularidad de la RMS y ventriculomegalia

La falta de función de Reelina, ApoER2 o Dab1 en los mutantes que carecen de estas proteínas, provoca la hipercelularidad de la RMS (Andrade et al., 2007). Estrechamente relacionada con esta estructura, se encuentran los ventrículos laterales del

cerebro adulto. Al analizar la neuroanatomía de dichos mutantes, observamos que precisamente ellos muestran una evidente ventriculomegalia (aumento del tamaño ventricular, Fig. 22B, C, E), no así el mutante VLDLR (Fig. 22D), que no exhibe alteración fenotípica de ninguna de estas estructuras (lo cual apoya que el receptor principal de Reelina en los nichos neurogénicos del cerebro adulto, si no el único, es ApoER2).

5. Manipulación de la señalización

5.1. Ganancia de función de Reelina

Para definir la posible función de Reelina y de su vía de señalización en el sistema EZ/SEZ adulto, llevamos a cabo una serie de estudios con animales genéticamente manipulados. De igual modo que en el artículo 2, empleamos el ratón transgénico *ne-Reelin* para evaluar el efecto de la ganancia de función de Reelina sobre un fondo silvestre y en un paradigma de rescate sobre un fondo *reeler* (*reeler ne-Reelin*) adulto. El trabajo en el que se emplea este ratón transgénico por primera vez (Magdaleno et al., 2002) resalta el rescate de foliación del cerebelo en los animales *reeler ne-Reelin*, con la consecuente desaparición del fenotipo atáxico, si bien indican que la laminación cortical no está

recuperada, algo que en realidad, como vimos, sí ocurre (artículo 2). El análisis de la expresión de Reelina ectópica en el adulto, nos aporta ahora una información clave para profundizar en el entendimiento de la función de Reelina.

La proteína expresada de forma ectópica por los progenitores neurales de la EZ/SEZ (promotor de *nestina*) sobre un fondo *reeler* provoca una normalización del tamaño ventricular (Fig. 22B,F) y una recuperación de la densidad de cilios endimales, analizados por microscopía electrónica de barrido (Fig. 23). La representación gráfica de los valores obtenidos mediante software pone de manifiesto las diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño ventricular de los mutantes *reeler*, *Dab1* y *ApoER2* (Fig. 22G, columnas en rojo).

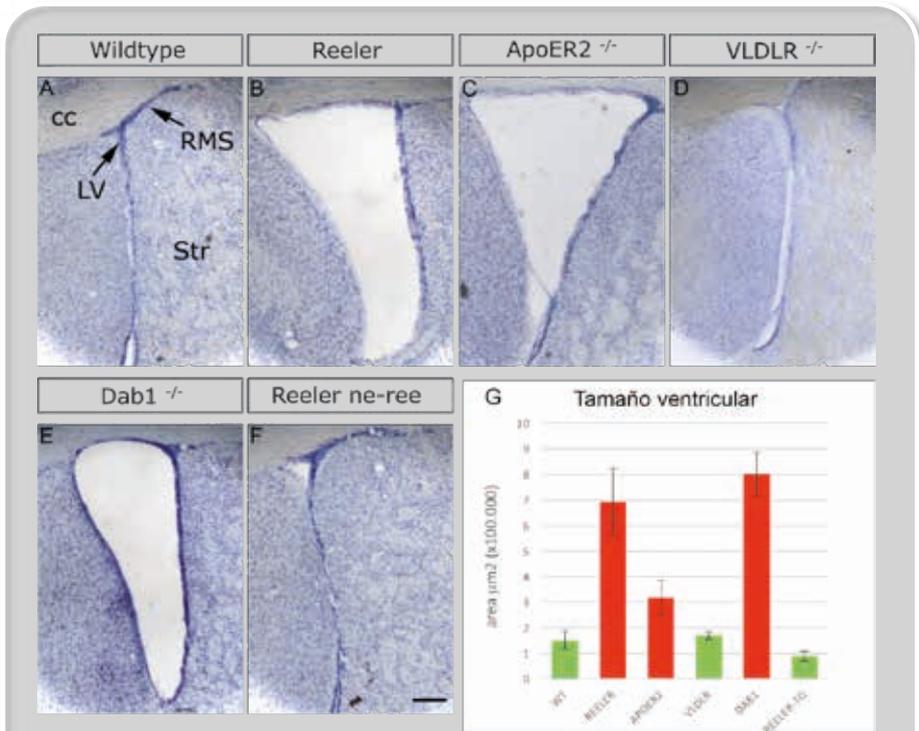
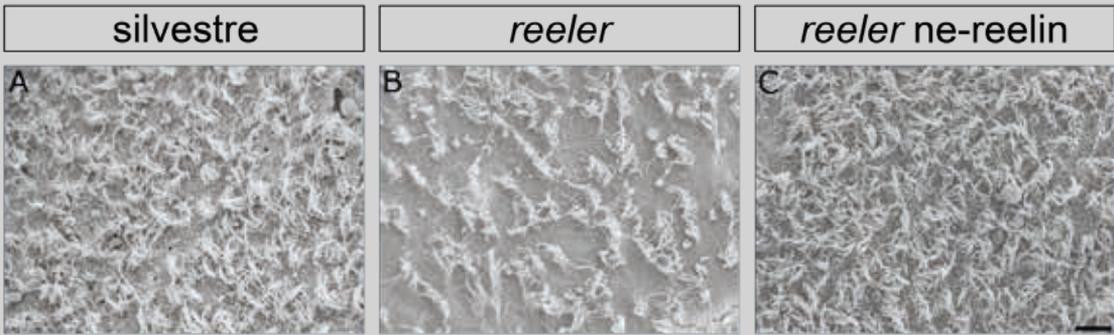


Figura 22 | Incremento del volumen ventricular en mutantes relacionados con reelina y su vía de señalización

Tinción de Nissl que muestra el tamaño de los ventrículos laterales de distintos mutantes en comparación con el genotipo silvestre (A). Los mutantes nulos para reelina, ApoER2 y Dab1 (B, C, E) y la ablación condicional de Dab1 en progenitores (G, H), presentan un incremento de esta estructura, mientras que la ganancia de función de reelina normaliza este defecto (F). El mutante VLDLR exhibe un fenotipo ventricular normal (D). Barra de escala: 100 µm.

Figura 23 | La expresión ectópica de reelina recupera la densidad de los cilios endiales



Microfotografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de los cilios endiales presentes en la pared del ventrículo lateral (A). La densidad y morfología de los cilios está severamente afectada en *reeler* (B). La expresión de reelina por los progenitores neurales de la zona subependimal adulta provoca la normalización de este defecto fenotípico (C). Barra de escala: 10 μ m.

5.2. La interrupción condicional de la señalización en progenitores aumenta el volumen ventricular y produce una hiper celularidad en la RMS

Para abordar este asunto desde el lado opuesto, decidimos llevar a cabo una ablación condicional de *Dab1*, ya que esta proteína se expresa en la RMS y tanto en la glía radial embrionaria (Luque et al., 2003) como en la EZ/SEZ adulta (Hack et al., 2002), lo cual aportaría datos que se complementarían a la perfección con los que habíamos obtenido con los experimentos de ganancia de función. Para ello, hicimos uso del sistema CRE-lox inducible por Tamoxifeno y así provocar la interrupción de la señalización de Reelina en progenitores, ya que brinda la posibilidad de seleccionar el lugar y el momento en el que deseamos eliminar el gen de interés, *Dab1* en este caso. Mediante los cruces entre la línea de ratones transgénicos *nestin-CRE^{ERT2}* (expresión de la enzima CRE recombinasa bajo el promotor de nestina; Balordi y Fishell, 2007) y la línea *floxed-Dab1* (las dianas loxP de la enzima flanquean el gen *Dab1*; Pramatarova et al., 2008; Teixeira et al., 2012), provocamos la ablación condicional de la señalización de Reelina en los progenitores de ratones adultos.

Esta ablación de *Dab1* en progenitores (Fig. 24A,B), produce un aumento del tamaño

de los ventrículos laterales (Fig. 24C,D) y perjudica el abandono de los neuroblastos de la SEZ hacia la RMS, acumulándose (Fig. 24E-F), por lo que se puede afirmar que este fenotipo observado en los mutantes de los elementos de la vía de señalización de Reelina no es un evento que dependa del desarrollo. En este experimento se observan alteraciones de las mismas estructuras y en sentido opuesto a las provocadas por la presencia de Reelina ectópica en el sistema.

En la figura 24E y F observamos cómo la interrupción de la vía de Reelina mediante la eliminación selectiva de *Dab1*, tiene como consecuencia una acumulación de células en las regiones más caudales de la RMS. Este resultado se obtuvo realizando un experimento de pulso y caza de BrdU de 3 días. En condiciones normales, un neuroblasto que nace en la EZ/SEZ tarda unos 3 días en migrar hasta el bulbo olfatorio a través de la RMS. En este caso, en los ratones *Dab1^{flx/flx;CRE+}*, se observa un dramático incremento de perfiles BrdU+ en la EZ/SEZ, lo que contrasta con aquéllos encontrados en los ratones *Dab1^{+ /flx;CRE+}*, donde la gran mayoría de células que incorporaron BrdU han abandonado su nicho neurogénico para iniciar su largo viaje hacia el bulbo olfatorio. La ablación genética de *Dab1* provoca, por tanto, un defecto en la migración de los neuroblastos.

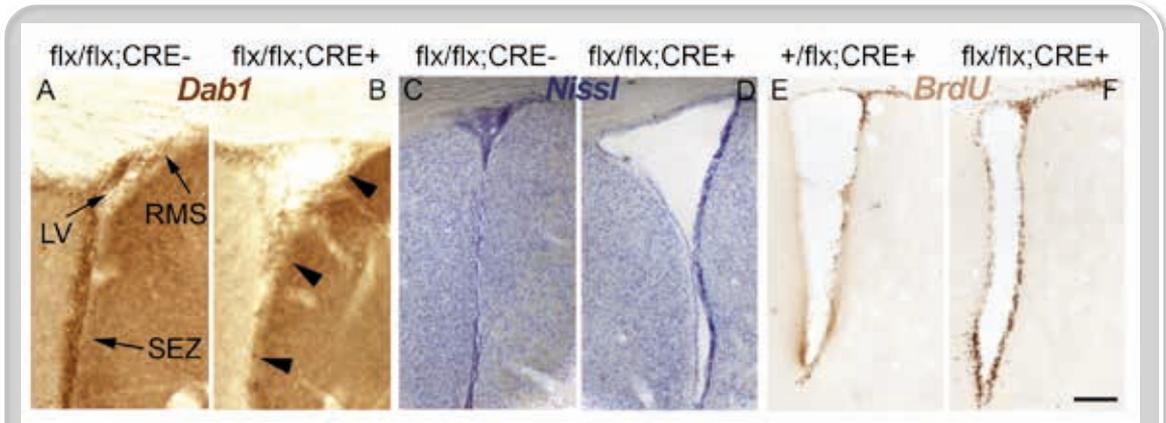


Figura 24 | Efectos de la ablación de Dab1 tras el tratamiento con tamoxifeno en ratones adultos

(A) Detección inmunohistoquímica de Dab1. La señal está presente en los neuroblastos de la zona subependimal y la RMS (A) y desaparece en aquellas células que expresan la enzima Cre recombinasa (B). Tinción de Nissl que muestra el aumento de tamaño del ventrículo lateral del ratón $Dab1^{flx/flx; CRE+}$ tras la exposición a tamoxifeno (D), en comparación a su control (C). Pulso y caza de BrdU de 3 días (E, F). En los ratones con ambos alelos de Dab1 *floxeados* (F), se observa una acumulación de células BrdU+ (neuroblastos) a lo largo de la zona subventricular y en el surco corticoestriatal, inicio de la RMS, en comparación con el control (E), donde los neuroblastos ya han abandonado la zona para migrar hacia el bulbo olfatorio. Barra de escala: 100 μm . [CPu: núcleo caudado-putamen; LV: ventrículo lateral; SEZ: zona subependimal; RMS: vía migratoria rostral].

En una aproximación complementaria, encontramos el efecto contrario en los cerebros transgénicos *reeler ne-Reelin*. En este caso, la acumulación de neuroblastos en la RMS observada en un *reeler*, con la consecuente dificultad migratoria para alcanzar el bulbo olfatorio, tiende a la normalización en presencia de Reelina ectópica en el sistema, recuperándose también la morfología de la RMS en el núcleo del bulbo olfatorio, algo dispersa en un bulbo *reeler* (Fig. 25). De todo ello se puede deducir que una de las funciones de Reelina es su contribución al mantenimiento de nicho neurogénico adulto.

Tras el tratamiento con tamoxifeno comprobamos la efectiva ablación de Dab1 puesto que no se detecta señal de esta proteína en los lugares donde es activo el promotor de nestina (núcleo olfatorio anterior, ventrículos laterales, zona subgranular del hipocampo, RMS caudal), si bien sí se detecta Dab1 en la RMS en el núcleo del bulbo olfatorio, probablemente debido a una menor actividad del promotor (Figs. 24 y 26).

El funcionamiento de los transgenes *nestin-Reelin* y *nestin-CRE* fue examinado mediante inmunofluorescencia (Figs. 27 y 28).

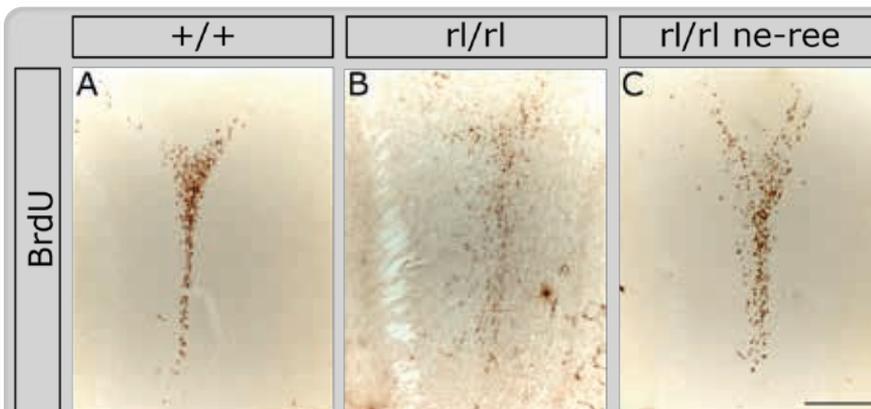


Figura 25 | Rescate de la morfología de la RMS en el núcleo del bulbo olfatorio

Detección inmunohistoquímica de BrdU tras un experimento de pulso y caza de 3 días. (A) Fenotipo silvestre. (B) En *reeler*, las células aparecen dispersas y en menos cantidad en comparación con el control. (C) La presencia de reelina ectópica sobre fondo *reeler* rescata este fenotipo, tanto en morfología como en el número de células que alcanzan el centro del bulbo olfatorio. Barra de escala: 200 μm .

Figura 26 | Ablación condicional de Dab1.

Inmunodetección de Dab1 tras 8 días de tratamiento con Tamoxifeno en el sistema CRE-lox inducible. CRE recombinasa se expresa en este caso en progenitores neurales bajo el promotor de nestina. La señal de Dab1 observada en la RMS a la altura del núcleo olfatorio anterior (A, flecha) está ausente en el individuo CRE+ (B, puntas de flecha). En el centro del bulbo olfatorio se detecta la señal de Dab1 tanto en el control (C) como los animales CRE+ (D), consistente con el patrón de expresión de nestina. En la zona subgranular del hipocampo (SGZ), donde persiste la actividad neurogénica, los perfiles celulares positivos para Dab1 (E) desaparecen en presencia de la recombinasa. Barra de escala: AB: 100 μ m; CD: 200 μ m; EF: 50 μ m. [DG: giro dentado; AOM: parte medial del núcleo olfatorio anterior, AOD: dorsal; AOV: ventral; GrO: capa granular del bulbo olfatorio; Gl: capa glomerular del bulbo olfatorio].

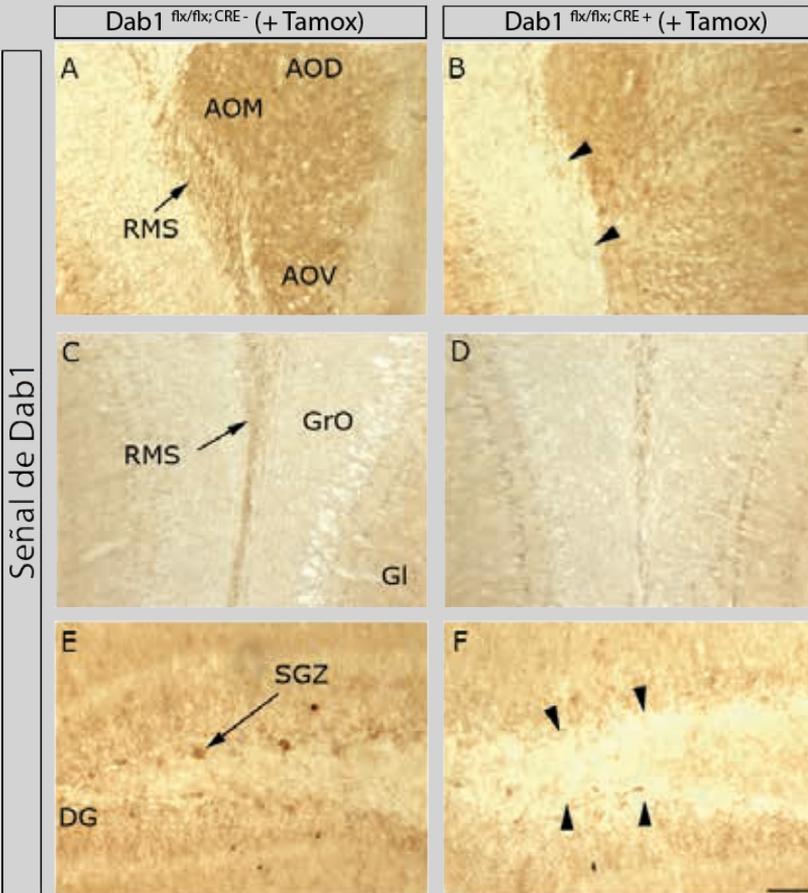
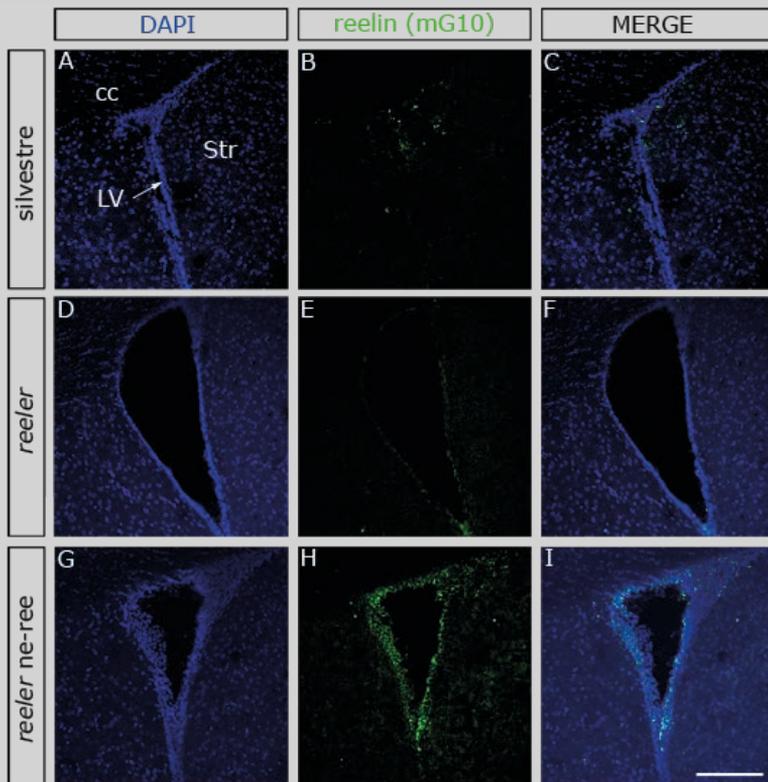


Figura 27 | Expresión de reelina ectópica en el ratón transgénico nestin-reelin adulto

Inmunofluorescencia para la detección de reelina empleando el anticuerpo monoclonal G10. No se observa inmunoreactividad a reelina en el animal silvestre (A-C) ni en el mutante *reeler* (D-F). Sin embargo, el promotor de nestina dirige la expresión de reelina en la zona subependimal, de forma ectópica, en el ratón transgénico *reeler* ne-reelin (G-I). Barra de escala: 150 μ m. [cc: cuerpo calloso; LV: ventrículo lateral; Str: núcleo estriado]



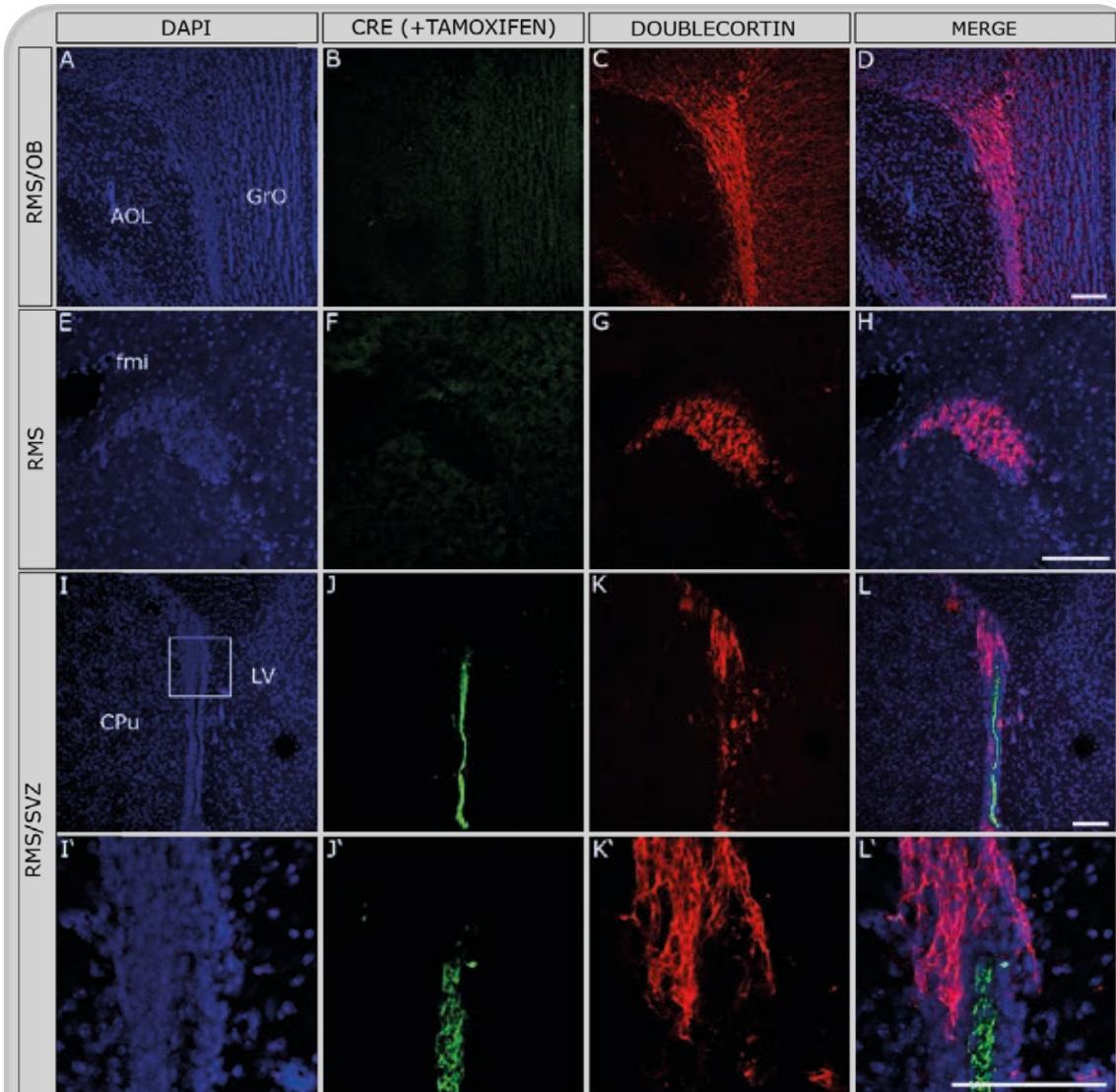


Figura 28 | Expresión de CRE recombinasa bajo el promotor de nestina en el cerebro adulto de ratón.

Inmunofluorescencia que revela el correcto funcionamiento del transgén nestin-CRE, cuyo producto se circunscribe estrictamente al lugar de expresión de nestina en el ratón adulto. No se observa señal de la proteína en los neuroblastos del bulbo olfatorio (A-D), ni a lo largo de la RMS (E-H), pero sí en la EZ/SEZ (I-L'). Barra de escala: 100 μ m. [AOL: porción lateral del núcleo olfatorio anterior; Cpu: núcleo caudado-putamen; fmi: forceps minor del cuerpo calloso; GrO: capa granular del bulbo olfatorio; LV: ventrículo lateral]

5.3. La infusión intraventricular de Reelina altera la migración de los neuroblastos

Tomados en conjunto, los resultados anteriores apuntan hacia una acción de Reelina en el mantenimiento de los nichos neurogénicos adultos. La interrupción de la vía de señalización de Reelina provoca defectos en la migración de los neuroblastos, junto a una alteración en la anatomía de los ventrículos laterales. En un ulterior enfoque complementario, en un medio con exceso

de Reelina, usamos mini-bombas osmóticas para administrar Reelina recombinante directamente en el ventrículo lateral de ratones *reeler* adultos (Fig. 29A). Las bombas se implantaron cuidadosamente usando cirugía estereotáxica y se dejaron funcionar durante 5 días, liberando Reelina recombinante a razón de 1 μ l/hora. Posteriormente, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas para detectar células Doblecortina+ (neuroblastos). La infusión de medio de cultivo control no altera la

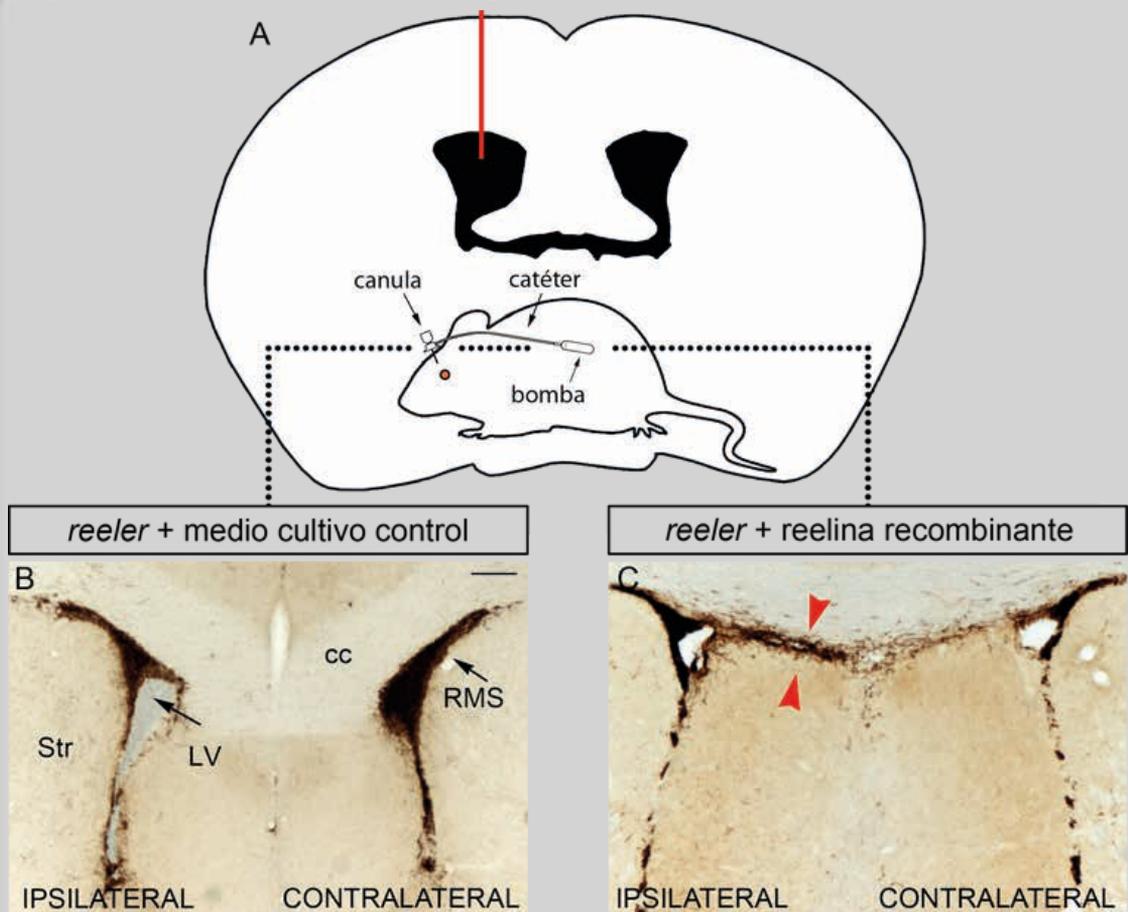
distribución de los neuroblastos (Fig. 29B), mientras que la infusión de Reelina afecta al comportamiento migratorio de los neuroblastos sobre un fondo genético carente de Reelina, produciendo una notable alteración en la localización habitual de los neuroblastos en el lado ipsilateral al de la inserción de la cánula de la bomba administradora de Reelina (Fig. 29C, puntas de flecha en rojo). Por lo tanto, se puede concluir que Reelina influye la migración de los neuroblastos en el cerebro adulto, y que probablemente lo haga desde el LCR, que de hecho, como demostró nuestro grupo anteriormente, la contiene (Sáez-

Valero et al., 2004), hasta tal punto que las células competentes a su acción inundan áreas como la zona de unión entre el cuerpo caloso y el núcleo septal.

6. Reconstrucción tridimensional

Los ventrículos laterales y la vía migratoria rostral son estructuras estrechamente relacionadas y en este trabajo se ha estudiado este vínculo en su contexto cerebral. Se han publicado algunas reconstrucciones tridimensionales del sistema ventricular de ratón (Taguchi y Chida, 2003, Acabchuk et al., 2015) y también en ratones *reeler* usando

Figura 29 | Reelina modifica *in vivo* la migración de los neuroblastos



Infusión de reelina recombinante o medio control durante 5 días en el ventrículo derecho de ratones *reeler* adultos, mediante el implante de mini-bombas osmóticas (A). La infusión de medio control no produce ningún cambio en la distribución de neuroblastos, como se pone de manifiesto en esta inmunohistoquímica para la detección de doblecortina (B). Por el contrario, la presencia de reelina recombinante altera dramáticamente la localización normal de los neuroblastos alrededor del ventrículo ipsilateral a la infusión (C, puntas de flecha). Barra de escala: 200 μ m. [cc: cuerpo caloso; LV: ventrículo lateral; RMS: vía migratoria rostral; Str: núcleo estriado].

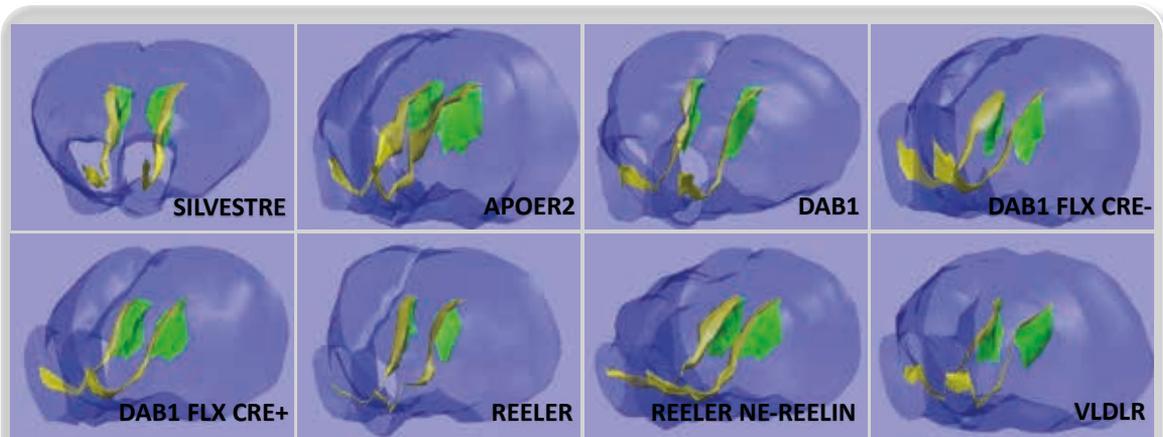


Figura 30 | Reconstrucción tridimensional usando el software NeuroLucida

Se ha reconstruido tridimensionalmente la porción rostral de los cerebros, ventrículos laterales y ruta migratoria rostral de los ratones adultos mutantes utilizados en esta tesis. Se puede apreciar la íntima relación entre los ventrículos laterales y la RMS y las diferencias de tamaño existentes entre ellos. La reconstrucción se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado Material y Métodos. Para una mejor visualización, se recomienda la visita a este enlace (goo.gl/1Gdvpk) donde se alojan 8 cortos clips de vídeo con una rotación de cada una de las reconstrucciones.

microscopía de resonancia magnética (Badea et al, 2007), si bien, la representación de la RMS o el sistema ventricular de los mutantes empleados no ha sido publicado hasta la fecha. En esta parte del estudio, se han analizado estas estructuras cerebrales de todos los mutantes utilizados en esta tesis, usando el software NeuroLucida y realizando una reconstrucción tridimensional de las tres estructuras en conjunto (ventrículos laterales -color verde-, vía migratoria rostral -color amarillo y porción rostral del cerebro -color morado-), a partir de secciones coronales seriadas cada 300 μm teñidas con Nissl (Fig. 30).

Esta representación espacial facilita la comparación de estas estructuras en los distintos mutantes y genera una gran cantidad de datos volumétricos. Por un lado, se confirman así los fenotipos ventriculares de los mutantes para Reelina, Dab1 y ApoER2 (no mostrado) y por otro, se ponen de manifiesto nuevos resultados: hay diferencias significativas entre los ventrículos y el volumen telencefálico de los ratones *reeler* y *reeler ne-Reelin*, pero no en la RMS considerada en su conjunto

(Fig. 31); la presencia de Reelina ectópica es suficiente para rescatar el volumen de los ventrículos laterales en ratones *reeler e*, interesantemente, aumentar el volumen total del telencéfalo (Fig. 31).

En línea con estas observaciones, cuando se compara el volumen del telencéfalo entre el genotipo silvestre y el de la ganancia de función (*wildtype ne-Reelin [wt ne-ree]*), se observa un incremento en el segundo caso, es decir, cuando existe un aporte extra de Reelina sobre un fondo silvestre (Fig. 31).

Tamaño de estructura

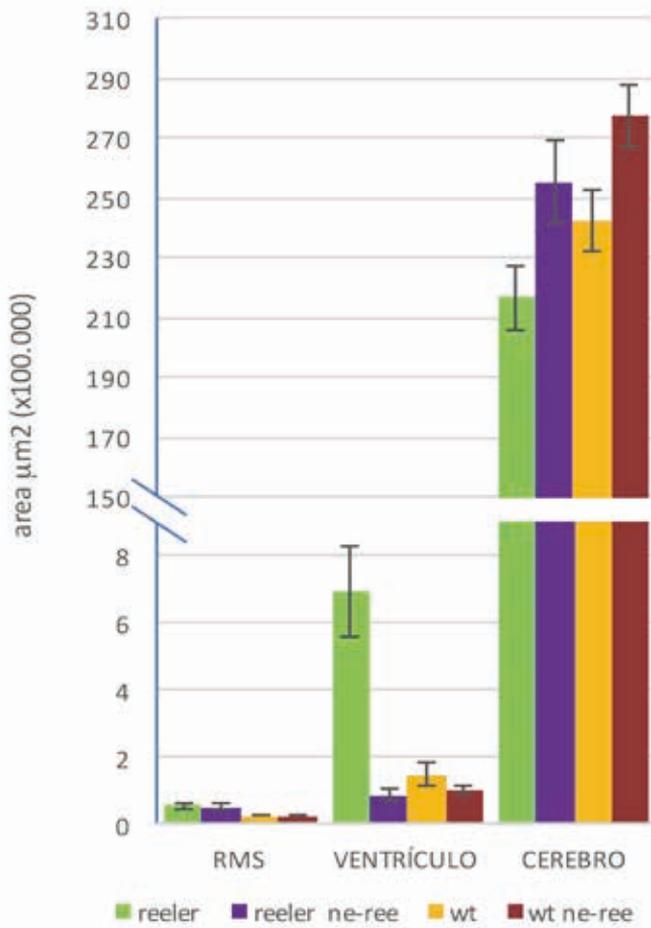


Figura 31 | Cuantificación del área englobada en diferentes RMS, ventrículo y telencéfalo a partir de la reconstrucción tridimensional

La cuantificación de estas estructuras revela un rescate del tamaño ventricular en caso de ratones *reeler ne-reelin* (grupo de barras "ventrículo", color morado), en comparación con los ratones *reeler* (color verde) y una mayor área telencefálica en los animales transgénicos (grupo de barras "cerebro", *reeler ne-ree* y *wt ne-ree*) en comparación con sus controles (*reeler* y *wt*). La presencia de reelina ectópica no afecta al tamaño de la RMS sobre fondo *reeler* (grupo de barras "RMS", colores verde y morado).

DISCUSIÓN

- CAPÍTULO I: EMBRIÓN -

1. AP-RR36 es una sonda fiable para la detección *in situ* de receptores funcionales de Reelina (FRR)

Las sondas de fusión con fosfatasa alcalina (AP) han sido ampliamente utilizadas para localizar cuantitativamente ligandos de la matriz extracelular (Flanagan et al., 2000). La sonda que contribuimos a desarrollar y que extensivamente validamos en esta Tesis Doctoral para investigar la expresión de FRR, AP-RR36, incluye el fragmento central de Reelina, siendo generada *in vivo*, es secretada eficientemente por células en cultivo, estable (hasta 6 meses a 4 °C), y específicamente une ApoER2 y VLDLR. Es destacable que todas las señales identificadas en las secciones cerebrales usando AP-RR36 son abolidas si se emplea un exceso de GST-RAP, un ligando común de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre esta familia, ApoER2 y VLDLR son los únicos miembros conocidos que unen Reelina. El receptor LDL es estructuralmente similar a ApoER2 y VLDLR pero no une Reelina (D'Arcangelo et al., 1999; Jossin et al., 2004). Otros miembros de la familia presentan estructuras diferentes. Por lo tanto, es razonable concluir que AP-RR36 detecta específicamente la cantidad total de ApoER2 y VLDLR en el cerebro.

2. Expresión de FRR y lugar de acción de Reelina en la corteza cerebral

A pesar de la intensiva investigación, el papel principal de Reelina durante la

corticogénesis sigue siendo un asunto a debatir. El descubrimiento original de que Reelina se expresa exclusivamente en la zona marginal (D'Arcangelo et al., 1999; Ogawa et al., 1995) generó muchos modelos insistiendo en la importancia de la función de Reelina en el final de la migración de cada neurona (Tissir y Goffinet, 2003; Soriano y Del Río, 2005; Cooper, 2008). Sin embargo, nuestros resultados indican que, en la corteza cerebral, los FRR están presentes en las neuronas migratorias radiales de la SVZ/IZ y/o en sus procesos. Las nuevas neuronas encuentran Reelina antes o hacia el momento en que pasan a través de la IZ y, destacablemente, bajo-regulan los FRR. Cuando estas neuronas entran en la placa cortical tienen menos FRR. El patrón de expresión de la proteína Dab1 (Rice et al., 1998) y el hecho de que Dab1 se fosforila en torno a la zona ventricular (Magdaleno et al., 2002) son consistentes con este modelo. Puede que Reelina difunda desde la zona marginal y bajo-regule los FRR. Las células de la glía radial y/o los progenitores intermedios cuyos cuerpos celulares se localizan en la zona ventricular/subventricular pueden tener FRR en sus fibras radiales y puede que Reelina señalice a través de ellos.

3. Localización de receptores funcionales de Reelina en células precursoras neurales durante el desarrollo embrionario

Hacia el día de desarrollo embrionario E15, hemos podido detectar la presencia de ApoER2 en las células de la glía radial (BLBP+), tanto en el soma, ubicado en la VZ, como en los procesos radiales que cruzan

la placa cortical hasta la zona marginal. También los progenitores intermedios de la SVZ (Tbr2+) expresan altos niveles de este receptor. Además, las células en plena fase S del ciclo celular (BrdU+), localizadas tanto en la zona ventricular, como en la interfaz VZ/SVZ y en la propia zona subventricular, presentan una marcada expresión de ApoER2. Hacia E17 se sigue observando el marcaje de AP-*Reelin* en las células precursoras, que expresan la proteína nestina. A menudo se podía observar una banda de expresión de receptores a unas 20-30 μm del lumen ventricular, con un marcaje algo más débil.

De acuerdo con trabajos anteriores en los que se detectaban los determinantes antigénicos o ARNm de los elementos de la vía de señalización de Reelina (Hartfuss et al., 2003; Kawaguchi et al., 2008; Keilani y Sugaya, 2008; Luque et al., 2003; Magdaleno et al., 2002), la expresión de receptores funcionales de Reelina tanto en la glía radial como en las células progenitoras intermedias sugiere que las NPCs son competentes para recibir Reelina durante la fase neurogénica del desarrollo neocortical. Consistente con esta noción, un estudio posterior ha demostrado que la señalización de Reelina regula la especificación temporal de los NPCs (Lakoma et al., 2011).

La mayoría de la señal de AP-*Reelin* desaparece en la corteza de ratones mutantes nulos para ApoER2, mientras que permanece prácticamente inalterada en los mutantes VLDLR (Artículo 1). De hecho, en ausencia de ApoER2 y no de VLDLR, aparecen varias anomalías severas en el posicionamiento neuronal, sobre todo en las capas II a VI (Benhayon et al., 2003; Hack et al., 2007). Por lo tanto, durante el desarrollo medio/tardío del desarrollo neocortical, los NPCs expresan principalmente, sino exclusivamente, ApoER2.

En cualquier caso, independientemente del marcaje de los procesos radiales

con AP-*Reelin*, no podemos excluir que un cierto nivel bajo de FRR permanezca en las neuronas localizadas en la placa cortical.

También se pueden encontrar nuevas neuronas (Tbr2-) cerca de los progenitores basales (Tbr2+) que expresan altos niveles de FRR. Una explicación podría ser que una gran parte de las neuronas corticales recién nacidas habrían “heredado” en su membrana plasmática esos FRR.

Con todo, los FRR parecen rápidamente bajo-regulados de la membrana plasmática de las nuevas neuronas, permitiendo por lo tanto su migración. Mientras el nivel más alto de FRR está presente en la zona subventricular donde habitan los progenitores basales, cierto nivel de FRR también se detecta en los progenitores apicales, particularmente en la interfaz VZ/SVZ y muy probablemente durante la fase S del ciclo celular (donde se encuentra la mayor expresión de nestina). Es tentador especular con la idea de que este hecho es consistente con la implicación de la señalización de Reelina en el control del movimiento interkinético de los progenitores apicales (y por tanto quizás que haya una exposición diferencial de los mismos a señales proliferativas *versus* diferenciadoras). Otra posibilidad no excluyente es que la población de células FRR+ de la interfaz VZ/SVZ sólo represente una maduración de la glía radial a un progenitor intermedio.

Finalmente, las posibles diferencias entre E15 y E17 pueden deberse a una reducción progresiva de la reserva de progenitores apicales. En cualquier caso, parece claro que los progenitores apicales y los procesos de la glía basal que cruzan la placa cortical expresan FRR, mayoritariamente ApoER2.

Los presentes resultados también pueden ser consistentes con la noción de que la función principal de Reelina (seguramente no la única) sea no-posicional y que la bajo-

regulación de ApoER2 esté implicada en esa función. Interesantemente, Reelina no influye en el comportamiento migratorio de un modelo de fibroblastos que expresan ApoER2 o VLDLR con Dab1 (Mayer et al., 2006).

4. La bajoexpresión de ApoER2 rescata la migración neuronal y los niveles de Dab1 en *reeler*

La electroporación de embriones *reeler*, por la que se incorpora un ARN de interferencia (siApoER2) diseñado para neutralizar el ARN mensajero de ApoER2 y así, noquear su expresión, provoca que cierto porcentaje de células alcancen cotas similares a los heterocigotos bajo la zona marginal, en lugar de permanecer concentradas en la mitad inferior de la pared cortical, como ocurre en los embriones *reeler* en los que no se ha interferido la expresión de ApoER2. Además, en los embriones *reeler* que incorporan siApoER2, el nivel de expresión de Dab1 de las células electroporadas es inferior a los niveles de las neuronas que sólo incorporan EGFP (control). Este efecto permite albergar la posibilidad de que la bajo-regulación de ApoER2 recapitule la función de Reelina en ausencia de Reelina endógena. Además, la reducción de la dosis genética de ApoER2 también mejora el posicionamiento neuronal en la corteza *reeler*.

Todo ello implica que las neuronas recién nacidas que no han activado la vía canónica de señalización de Reelina retienen su potencial migratorio, lo cual sugiere que la señalización de Reelina podría influenciar la migración regulando la competencia celular para responder a una segunda vía. ApoER2 es, de hecho, un receptor bastante promiscuo, encontrándose entre sus ligandos a trombospondina-1, f-espondina, el factor de coagulación XI, la proteína C o la clusterina (ApoJ) (Blake et al., 2008; Hoe et al., 2005; May et al., 2005; White-Adams et al., 2009; Yang et al., 2009; Leeb et al., 2014).

Esto hace concebible la existencia de una señal inhibitoria de la migración celular que podría ser eliminada tras la bajo-regulación de ApoER2 inducida por Reelina. También podría estar implicada una activación facilitada de la señalización de efrinas B. De hecho, un estudio identifica las efrinas B como co-receptores de Reelina, ya que se unen directamente a Reelina y a ApoER2/VLDLR, resultando en fosforilación de Dab1. Significativamente, el fenotipo migratorio cortical *reeler* parece rescatarse por la simple activación de la señalización de efrina B (Sentürk et al., 2011). Sin embargo, algunos elementos clave en la propuesta de este estudio liderado por Amparo Acker-Palmer no han podido ser confirmados. De hecho, se ha mostrado que las interacciones proteína-proteína entre las efrinas B y Reelina no afectan el posicionamiento neuronal durante el desarrollo cortical (Bouché et al., 2013; Pohlkamp et al., 2016).

5. La sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal

La expresión forzada de una forma truncada de ApoER2 (ApoER2- Δ CD-GFP) provoca una dispersión de las células a lo largo de la placa cortical, permitiendo que sólo unas cuantas consigan alcanzar su posición correcta, formando una capa bajo la zona marginal. El efecto es más dramático cuando se fuerza la expresión el receptor completo, ApoER2-full-GFP (lo cual constituye una sobreexpresión de ApoER2), donde muy pocas células consiguen alinearse bajo la zona marginal, y la mayoría aparecen dispersas por la placa cortical, la zona intermedia y la zona subventricular.

El efecto que produce la expresión de la forma truncada del receptor, en general más débil y heterogénea en comparación con la forma completa, apoya la idea de que la sobrecarga de ApoER2 en la membrana plasmática subyace, por sí misma, al fenotipo migratorio cortical

reeler. Concebiblemente, nuestra molécula de ApoER2 truncada podría competir con Reelina por receptores endógenos, pero no sería capaz de llevar a cabo la transducción de la señal intracelular, debido a que carece de la porción que interacciona con el adaptador intracitoplasmático Dab1, comportándose, por lo tanto, como una molécula dominante negativa¹ (Jossin y Cooper, 2011). Además, la bajoexpresión de ApoER2 produce una mejoría de la migración neuronal en cortezas *reeler*.

Por otro lado, nuestro ApoER2-full-GFP igualmente competiría por Reelina con receptores endógenos, pero en este caso, sí sería capaz de transmitir la señal al compartimento intracelular. Por tanto, si la migración se interrumpe en una célula o no, dependerá de la estequiometría particular entre Reelina/ApoER2 en su membrana plasmática; asumiendo que los niveles de Reelina deben ser limitantes, a mayor receptores *full* permanezcan sin acceso a Reelina y por tanto no bajo-regulados, la probabilidad de que la migración celular se vea inhibida será mayor. Este efecto podría explicar el mecanismo por el cual las NPCs (con altos niveles de receptores), no migran fuera de la zona ventricular/subventricular.

Pero, ¿por qué ambas formas del receptor afectan a la migración? O mejor dicho, ¿por qué afectan a la migración de forma diferente? La explicación más sencilla es que la sobrecarga de ApoER2 en la membrana plasmática es suficiente por sí sola (al menos parcialmente) para provocar el fenotipo migratorio cortical *reeler*. La

forma truncada del receptor daría lugar a una estequiometría heterogénea de Reelina/ApoER2 entre las células electroporadas. En aquellas células donde las moléculas de Reelina disponibles se unen a receptores ApoER2 endógenos (no a los truncados), Reelina forzaría su internalización y, consecuentemente, la célula migrará de forma normal. Por el contrario, en aquellas células en las que la Reelina disponible se una a una mayor proporción de formas truncadas del receptor, el ApoER2 endógeno permanecerá en la membrana plasmática sin acceso a Reelina y por tanto, ya que la forma truncada no es capaz de provocar la transducción de la señal, la migración celular se verá inhibida.

Lo que ocurre en caso de la sobreexpresión de la forma completa de ApoER2 es que se crea una estequiometría Reelina/ApoER2 homogénea en las células electroporadas. Es decir, todas ellas mantendrán siempre una proporción similar de ApoER2 silvestre (ya sea endógeno o introducido) en su membrana plasmática que, eventualmente, impedirá la migración celular.

Tras la publicación de los resultados derivados de esta primera parte de la Tesis Doctoral (Uchida et al., 2009; Pérez-Martínez et al., 2012), el grupo del Dr. Nakajima, usando electroporación *in utero*, demuestra que la sobreexpresión de Dab1 en el citoplasma celular inhibe la migración neuronal en la corteza embrionaria. Sin embargo, el transporte forzado de Dab1 dentro del núcleo celular atenúa este efecto inhibitorio. Por otra parte, empleando ensayos celulares, se observa también que el dominio intracelular de ApoER2 (o VLDLR) inhibe la translocación nuclear de Dab1. se sugiere que la regulación de la localización subcelular de Dab1 es importante para la apropiada migración radial de las neuronas excitatorias corticales, y admiten la necesidad de más estudios para clarificar la significación

¹ Una molécula dominante negativa es aquella que, como consecuencia de una mutación, resulta en un producto que afecta de forma adversa al normal funcionamiento de los productos silvestres dentro de una misma célula; en este caso, el producto de la mutación puede interactuar con los mismos elementos que la molécula silvestre, pero bloquea algunos aspectos de su función (es capaz de unir ligando pero no de transducir la señal).

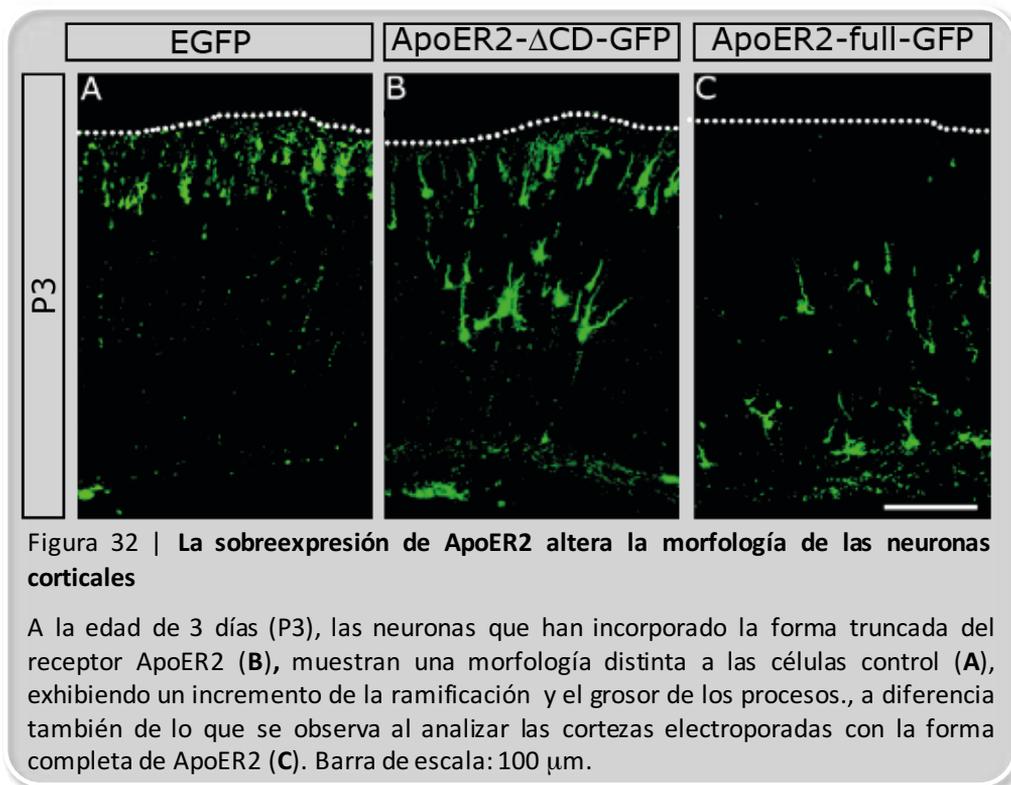


Figura 32 | La sobreexpresión de ApoER2 altera la morfología de las neuronas corticales

A la edad de 3 días (P3), las neuronas que han incorporado la forma truncada del receptor ApoER2 (B), muestran una morfología distinta a las células control (A), exhibiendo un incremento de la ramificación y el grosor de los procesos., a diferencia también de lo que se observa al analizar las cortezas electroporadas con la forma completa de ApoER2 (C). Barra de escala: 100 μ m.

fisiológica de la translocación nuclear de Dab1 (Honda y Nakajima, 2015). En cualquier caso, sus resultados están en línea con los aquí descritos y resultan compatibles con el modelo que proponemos (Pérez-Martínez et al., 2012; ver más adelante).

Es interesante destacar que, al analizar las cortezas en el día postnatal 3 (P3), muchas células electroporadas con el receptor truncado muestran procesos más ramificados y gruesos (Fig. 32). Apoyando esta observación, la neutralización de Reelina en estadios postnatales tempranos incrementa la complejidad dendrítica de las neuronas piramidales corticales, lo cual podría sugerir la existencia de una vía de transducción de la señal independiente de los receptores canónicos de Reelina (Chameau et al., 2009).

6. Rescate parcial de laminación y de los niveles de Dab1 y ApoER2 por la expresión de Reelina en NPCs de ratones *reeler*

La expresión ectópica de Reelina sobre fondo *reeler* rescata parcialmente la laminación

cortical, específicamente en la subpoblación de células posicionadas por encima de la subplaca ectópica y no por debajo de ella. A este rescate contribuye aproximadamente un 15% de las células de capas más superficiales (Cux1+) y un 70% de células de capas profundas (Tbr1+). Corroboramos estos resultados con los obtenidos de la inyección secuencial de análogos de nucleótidos, CldU y IdU, en los que observamos que el patrón de posicionamiento *inside-out* estaba parcialmente rescatado en las cortezas *reeler* ne-*Reelin*. Las neuronas más recientes sobrepasan a sus predecesoras sólo por encima de la subplaca ectópica, no por debajo.

Por lo tanto, mientras el papel de Reelina en la promoción de la partición de la preplaca no parece enteramente distinto de su efecto sobre el posicionamiento como había sido propuesto anteriormente (Magdaleno et al., 2002), el fallo de algunas células para responder a Reelina parece relacionado con su distancia migratoria y por lo tanto con el momento de su nacimiento. En consonancia,

el fenotipo neocortical (y cerebelar) del *reeler* ne-*Reelin* recuerda a los mutantes *Dab1^{cd/cd}*, quienes carecen de uno de los dos pares de sitios de fosforilación de tirosinas de *Dab1* (Feng y Cooper, 2009; Morimura y Ogawa, 2009). Esto sugiere que el transgén ne-*Reelin* podría sostener la función “activadora de quinasas” de *Dab1* (activación de SFK por los sitios *ab* de fosforilación), pero no suficientemente su función de “andamio” para ensamblar complejos de señalización, requerida para la migración de neuronas de capas superficiales (ensamblaje de *Crk/CrkL* para fosforilar C3G y estimular *Rap1*, gracias a los sitios *cd* de fosforilación).

En cuanto a los niveles de ApoER2, en E17 es mucho más abundante en la placa cortical *reeler* que en la silvestre. Sin embargo, la expresión ectópica de Reelina sobre fondo *reeler* produce una ostensible disminución en los niveles de ApoER2 tan sólo por encima de la subplaca ectópica. A la edad de P0, los resultados son comparables. Pero además, los niveles de expresión de *Dab1* están normalizados en la región rescatada de la placa cortical de ratones *reeler* ne-*Reelin*, lo cual apoya que, al menos en parte, la función que tiene Reelina en el compartimento proliferativo (VZ/SVZ) puede subyacer a su aparente requerimiento post-proliferativo para la migración y el posicionamiento neuronal en la placa cortical.

Para profundizar en una plausible explicación mecanística por la que la expresión ectópica de Reelina resulte en una fuerte disminución de la expresión de ApoER2 por encima de la subplaca ectópica, hay que tener en cuenta la suma de varios factores: se sabe que Reelina regula la tasa de divisiones neurogénicas (Lakoma et al., 2011); además, la membrana plasmática de las células hijas no se sintetiza de novo, si no que existe una continuidad en los componentes de la membrana que pasa de la célula madre a las células hijas; a esto hemos de añadir que, según nuestras propias observaciones,

la carga de ApoER2 en membrana determina el comportamiento migratorio celular. Por todo ello, en el Artículo 2 razonamos que la expresión enriquecida de ApoER2 en NPCs, sugiere fuertemente que Reelina tenga alguna acción en la VZ/SVZ que resulte en bajo-regulación de ApoER2, migración y posicionamiento neuronal. De hecho, confirmamos esta predicción usando los ratones ne-*Reelin* sobre un fondo *reeler*. En contra de lo que se había descrito (Magdaleno et al., 2002), la Reelina ectópica procedente del transgén rescata parcialmente la laminación cortical y el posicionamiento neuronal, así como los niveles de ApoER2 en membrana y *Dab1*, normalizándolos.

Nuestra propuesta parece aparentemente incompatible con los descubrimientos en los que la delección de *Dab1* sólo en neuronas en migración, fenocopia los defectos de laminación *reeler* (Franco et al., 2011). Sin embargo, el promotor NEX usado en dicho estudio puede dirigir la expresión también en progenitores intermedios (Goebbels et al., 2006). Por tanto, no se puede descartar que la delección de *Dab1* en las células progenitoras intermedias pueda haber contribuido a los efectos en las propiedades migratorias de las neuronas generadas.

Es formalmente posible que la Reelina ectópica secretada por los NPCs afecte a los niveles de ApoER2 en las cercanas nuevas neuronas e incluso a los mismos NPCs. Sin embargo, prácticamente todas las vías secretoras permanecen virtualmente inactivas durante la mitosis en progenitores animales (Kreiner y Moore, 1990). También podría suceder que, interactuando con las vías intracelulares de tráfico de vesículas hacia membrana, la Reelina ectópica se una a formas prematuras de ApoER2 antes (y quizás impidiendo) de que se inserten en la membrana de las NPCs. Sin embargo, no parece probable porque no se observan apenas diferencias en los niveles de ApoER2

funcional en la VZ/SVZ (donde residen los NPCs) entre los mutantes *reeler* y los silvestres (Art. 1), o entre los silvestres *ne-Reelin* y los *reeler ne-Reelin* (Art. 2).

Nuestros resultados proporcionan una base para explicar el abandono altamente orquestado de las neuronas de proyección corticales desde lugar de nacimiento, indicando que un mecanismo de bajo-regulación de ApoER2 dependiente de Reelina desacopla a las nuevas neuronas de sus NPCs, por lo tanto habilitando a las neuronas para migrar. Estudios en profundidad de los mecanismos moleculares de la regulación de ApoER2 y de la señalización que es capaz de mediar deberían revelar nuevos conceptos y patrones que establezcan un claro vínculo entre la proliferación de NPCs/destino neuronal y la migración neuronal. Podría hacerse cada vez más evidente que la neurogénesis y el posicionamiento neuronal están codificados menos separadamente de lo que se ha creído hasta el momento.

MODELO

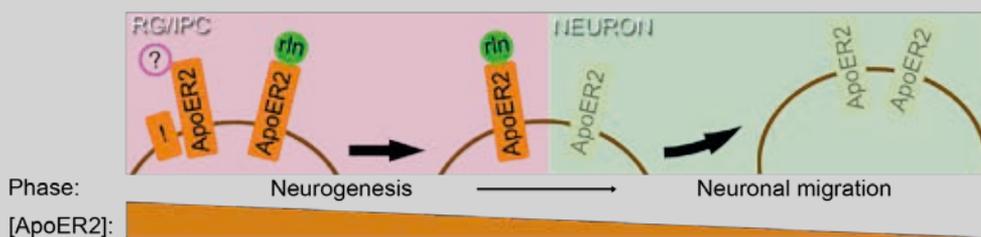
Mientras se han sugerido varios modelos, cómo funciona Reelina para posicionar las neuronas sigue siendo un mecanismo desconocido. Ni siquiera está claro si la migración neuronal *per se* está influenciada por Reelina (Mayer et al., 2006). Probablemente, Reelina no funciona sólo

como una simple señal posicional. De hecho, parece que participa en múltiples eventos críticos para la migración neuronal y el posicionamiento celular (Magdaleno et al., 2002). Nuestro grupo encontró evidencias de que Reelina está implicada en la especificación temporal de los progenitores corticales, estableciendo así la tasa de neurogénesis cortical (Lakoma et al., 2011).

La bajo-regulación de ApoER2 de la membrana plasmática permitiría a su vez la migración neuronal, posiblemente evitando la acción de otro hipotético ligando de este receptor que actuaría como una señal inhibitoria para la migración celular. Tal bajo-regulación mediada por Reelina en nuevas neuronas podría empezar durante la neurogénesis a nivel de la célula progenitora y entonces mantenida durante un corto espacio de tiempo a nivel postmitótico. Este modelo puede incorporar no sólo una explicación mecánica de la migración neuronal y posicionamiento sino también una explicación de por qué los progenitores neurales no migran (y puede abarcar incluso el movimiento interkinético nuclear del progenitor apical).

Este mecanismo se describiría mejor como “permisivo” para la migración neuronal, en tanto en cuanto es opuesto a un mecanismo “instructivo” como sería una señal de parada, por ejemplo (Fig. 33).

Figura 33 | Modelo propuesto



Las células de la glía radial y los progenitores intermedios (RG/IPC) están enriquecidos con ApoER2 funcional. Un mecanismo de bajo-regulación de ApoER2 reelina-dependiente desacopla las neuronas recién nacidas de la RG/IPC, por lo tanto, habilitando a las células para migrar (con un cambio de efectos negativos a positivos dependiente de la concentración de ApoER2 ([ApoER2]) en la membrana plasmática). Ligandos alternativos de ApoER2 (?) o co-receptores de reelina (!) quizás ayuden a perfilar reelina como una señal preferentemente permisiva, más que instructiva, para la migración neuronal.

El concepto “permisivo” no es enteramente nuevo. De alguna manera, André Goffinet ya considera la posibilidad de que Reelina juegue este papel (Jossin et al., 2004). El hecho de que la adición de Reelina recombinante a rodajas de cerebro *reeler* en cultivo rescate parcialmente el fenotipo demuestra que Reelina no tiene que producirse de manera local para ejercer su función. De algún modo Tom Curran ya lo había hecho anteriormente cuando sugirió que Reelina no funciona “simplemente” como una señal posicional (Magdaleno et al., 2002), ya que el modelo que emplea expresa Reelina en la VZ/SVZ, observándose un rescate en la partición de la preplaca (y también laminación, como hemos revelado en el Artículo 2). Todo esto sugiere que Reelina pondría a las neuronas en modo “permisivo” para responder quizá a otra señal, en lugar de ser una señal instructiva como una señal de stop. Nociones como “capacitante” (*enabling*, (Kubo et al., 2010) o incluso “estimulante” (*encouraging*, Miyata et al., 2010) no quedan muy lejos de este concepto. Por supuesto, tal mecanismo permisivo Reelina-ApoER2 para la migración neuronal puede coincidir con otros mecanismos de acción dependientes de contexto como las acciones de corto rango (*short range actions*, Miyata et al., 2010, Kubo et al., 2010).

En relación al trabajo descrito en Kubo et al., 2010, la mayor diferencia que existe entre su procedimiento y el empleado en Magdaleno et al., 2002, es que en este último caso, se expresó Reelina ectópica bajo el promotor de nestina (la expresión de Reelina ectópica está circunscrita a los progenitores neurales corticales durante la neurogénesis, sin datos sobre su posible secreción o efectos en las neuronas adyacentes), mientras que las electroporaciones de Kubo mantienen una expresión ectópica de Reelina en las nuevas neuronas (a un nivel postmitótico), documentando también la presencia de Reelina extracelular.

Con todo, distintas estrategias utilizando la combinación de los paradigmas

de pérdida y ganancia de función (Magdaleno et al., 2002; Lakoma et al., 2011; Pérez-Martínez et al., 2012 - Artículo 2), demuestran claramente que Reelina actúa sobre los progenitores neurales.

- CAPÍTULO II: ADULTO -

1. La mayor densidad de receptores funcionales en el cerebro adulto de ratón se encuentra en la vía migratoria rostral

La mayor densidad de receptores funcionales de Reelina del cerebro adulto se encuentra en la ruta migratoria rostral, aunque también se observa cierto marcaje en la zona subgranular del hipocampo, la capa granular del bulbo olfatorio, el núcleo habenular medial. En cuanto al cerebelo, la zona molecular expresa claramente receptores de Reelina, probablemente correspondiendo al árbol dendrítico de las células de Purkinje. El empleo de secciones de los mutantes nulos ApoER2 y VLDLR nos permitió apreciar la expresión diferencial de estos receptores en distintas regiones; concretamente, en el telencéfalo, ApoER2 aparece como el receptor más abundante, mientras que en el cerebelo quien se expresa mayoritariamente es VLDLR.

Es destacable que, en los mutantes ApoER2, la capa molecular del cerebelo presenta un sensible incremento en la intensidad de la señal, en comparación con el silvestre. Esto indica que el receptor VLDLR es ahí el más abundante, pero también sugiere que hay cierto grado de expresión compensatoria entre ambos receptores.

Se aprecia también un sensible y gradual aumento en la señal de los FRR, si comparamos un cerebro silvestre, uno heterocitogo para Reelina y un *reeler*, lo cual viene a apoyar que, en condiciones normales, los FRR se bajo-regulan por un mecanismo dependiente de Reelina.

El mutante ApoER2 presenta una severa hiper celularidad de la RMS (Andrade

et al., 2007) y una evidente ventriculomegalia (esta tesis), no así el mutante VLDLR. Ambos defectos fenotípicos recuerdan en gran medida a los que presenta el ratón *reeler* (Andrade et al., 2007; Badea et al., 2007, esta tesis). Además, también muestra también ciertos defectos de laminación cortical (Trommsdorff et al., 1999), reminiscentes de una corteza *reeler*. Nuestros resultados, derivados del uso de la sonda AP-*Reelin* que ponen de manifiesto que ApoER2 es prácticamente el único receptor que se expresa en la RMS, son consistentes con estas observaciones previas. No podemos asumir, sin embargo, que sea Reelina el único ligando capaz de desencadenar en el adulto una señal a través de ApoER2, dada la conocida promiscuidad del receptor, pero sería difícil descartarla como una seria candidata, a tenor del fenotipo hiper celular de la RMS *reeler*, ApoER2^{-/-} y Dab1^{-/-}.

Una de las conclusiones del artículo 2 es que Reelina regula el desacoplamiento

entre las nuevas neuronas y sus progenitores en la corteza embrionaria. En la corteza *reeler* hay una clara acumulación de receptores funcionales en comparación con la corteza silvestre. En el cerebro adulto, en cambio, no hay diferencias evidentes en cuanto a la expresión de receptores en la RMS o en el mismo bulbo olfatorio entre un silvestre y un *reeler* (Fig. 34). El hecho de que no se observe una sobreexpresión sugiere que Reelina no tendría un papel principal sobre la migración radial de los neuroblastos en el bulbo olfatorio, en contra de lo que se ha propuesto con anterioridad (Hack et al., 2002; Hellwig et al., 2012), si bien, en el mutante de degeneración de células de Purkinje (*pcd*), el cual pierde adicionalmente las células mitrales (neuronas de proyección del bulbo olfatorio que expresan altas dosis de Reelina), se han observado cambios en la distribución de las nuevas neuronas que se incorporan al bulbo olfatorio, viéndose alterado el tramo de migración radial de los neuroblastos (Valero et al., 2007).

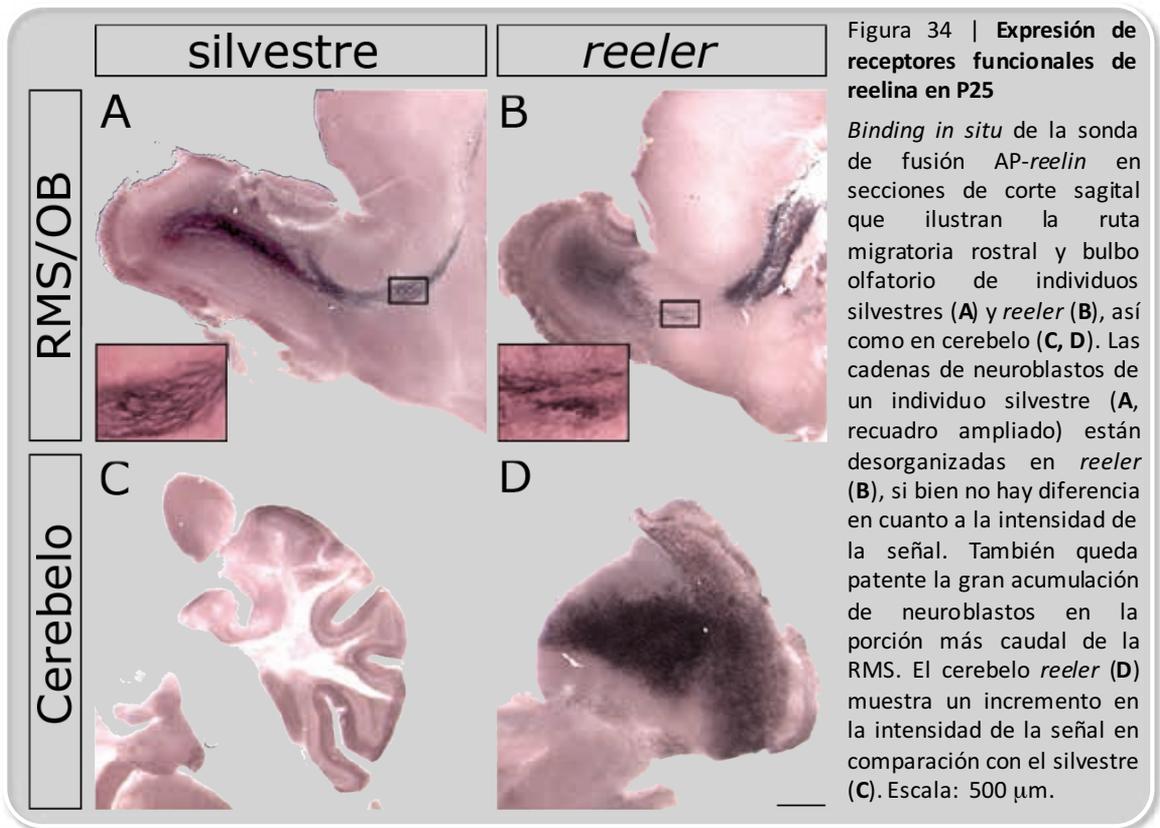


Figura 34 | **Expresión de receptores funcionales de reelina en P25**

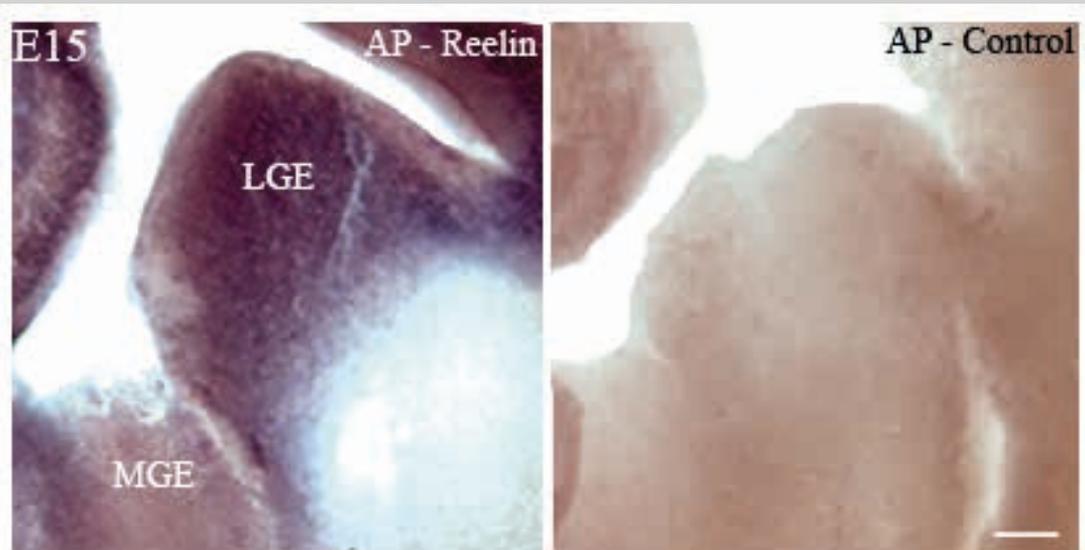
Binding in situ de la sonda de fusión AP-*reelin* en secciones de corte sagital que ilustran la ruta migratoria rostral y bulbo olfatorio de individuos silvestres (A) y *reeler* (B), así como en cerebelo (C, D). Las cadenas de neuroblastos de un individuo silvestre (A, recuadro ampliado) están desorganizadas en *reeler* (B), si bien no hay diferencia en cuanto a la intensidad de la señal. También queda patente la gran acumulación de neuroblastos en la porción más caudal de la RMS. El cerebelo *reeler* (D) muestra un incremento en la intensidad de la señal en comparación con el silvestre (C). Escala: 500 μ m.

2. Colocalización de FRR en subpoblaciones de los tipos celulares de la EZ/SEZ/RMS

La adaptación de la técnica de *binding in situ* a la inmunofluorescencia nos permitió identificar que los diferentes tipos celulares que componen la EZ/SEZ adulta expresan en mayor o menor medida receptores funcionales de Reelina. Ependimocitos (células tipo E, S100 β +), astrocitos subventriculares (células tipo B, GFAP+), células amplificadoras transitorias (células tipo C, Mash1+), neuroblastos (células tipo A, DCX+) y células en fase S del ciclo celular (BrdU+), son competentes para recibir Reelina como ligando. Parece existir, por tanto, una continuidad embrión-adulto en los linajes que expresan FRR. De hecho, podemos comprobar cómo durante el desarrollo embrionario, la eminencia ganglionar lateral (LGE), no así la medial (MGE), el origen principal del sistema EZ/SVZ/RMS del cerebro adulto (Wichterle et al., 1999, 2001), expresa FRR (Fig. 35).

Las células que muestran un mayor índice de colocalización de receptores tanto en la EZ/SEZ como en la RMS del cerebro adulto son los neuroblastos, aunque es destacable que también son competentes a la acción de Reelina las consideradas como las células madre neurales adultas, los astrocitos subventriculares (células tipo B), que retienen propiedades importantes de la glía radial. Sus cuerpos celulares, por ejemplo, están localizados justo bajo la EZ, pero tienen unos cortos procesos que se extienden a través del epéndimo con un cilio que contacta con el líquido cefalorraquídeo (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). Los neuroblastos migran siguiendo la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo y el batir de los cilios endodiales es fundamental para mantenerlo (Sawamoto et al., 2006). Además, nuestro grupo demostró que Reelina está presente en el líquido cefalorraquídeo (Sáez-Valero et al., 2003). Un hallazgo posteriormente confirmado por el grupo de André Goffinet (Ignatova et al., 2004).

Figura 35 | Los receptores funcionales de Reelina se expresan en la LGE



Binding in situ con la sonda AP-RR36 y AP-Control sobre una sección de cerebro de ratón en el día 15 de desarrollo embrionario. Se puede observar claramente cómo la tinción, correspondiente a los receptores funcionales de Reelina se circunscribe a la eminencia ganglionar lateral (LGE), origen embrionario de la EZ/SVZ/RMS adulta, dejando la eminencia ganglionar medial (MGE) libre de marcaje. Barra de escala: 100 μ m.

Sin embargo, hay un gran número de moléculas extracelulares a las que se les atribuye papeles importantes en la neurogénesis adulta, como Notch, efrinas, factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores y hormonas (revisado por Ming y Song, 2011). Neuregulinas, *slits* y algunas moléculas de adhesión también se conocen por regular la estabilidad, motilidad o direccionalidad de la migración neuronal durante la neurogénesis adulta (revisado por Lledó et al., 2006; Ming y Song, 2005).

En todo caso, es destacable que la mayor densidad de FRR en el cerebro adulto se da en la RMS y ya podemos afirmar que, concretamente, son los neuroblastos los que siguen manteniendo elevados niveles de expresión de ApoER2, también a lo largo de su largo camino migratorio hacia el bulbo olfatorio. Curiosamente, sigue habiendo divisiones a lo largo de la RMS (Menezes et al., 1995), pero los neuroblastos mantienen su limitada capacidad diferenciadora (y su expresión de ApoER2) hasta que no se produce el cambio de migración tangencial a radial en el bulbo olfatorio, momento en que comienzan su maduración hacia interneuronas de las capas granular y periglomerular, la mayoría GABAérgicas y algunas glutamatérgicas yuxtglomerulares (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Doetsch et al., 1999; Carleton et al., 2003; Brill et al., 2009). La presencia de ApoER2 en la membrana de las células del nicho neurogénico es consistente con que éstas se mantengan en estadios relativamente indiferenciados.

3. La señalización de Reelina permanece activa en la zona subventricular adulta

La acción de Reelina sobre un extracto celular de la zona endodimensional/subendodimensional provoca la fosforilación de Dab1. En otras palabras, la vía de señalización de Reelina permanece activa en el mayor nicho neurogénico del cerebro adulto de ratón. La EZ/SEZ de los ventrículos laterales son, junto con su ruta

migratoria rostral asociada, las zonas donde se alcanzan los mayores niveles de expresión de ApoER2.

El grupo de Johannes Nimpf en Viena publicó en 2007 que, el mecanismo por el que los neuroblastos de un explante subventricular, procedente de un mutante doble para ApoER2/VLDLR y de un mutante *Dab1*, son incapaces de generar cadenas, ha de ser independiente de Reelina, abogando que Reelina no está presente en la zona subventricular o en la ruta migratoria rostral. En cambio, los explantes procedentes de un cerebro *reeler* presentan un aspecto normal (Andrade et al., 2007). Poco tiempo más tarde proponen que Trombospondina 1 (THBS-1) sería un buen candidato alternativo como ligando de ApoER2 y VLDLR, puesto que ésta sí se expresa en la RMS (Blake et al., 2008). Estos resultados son inconsistentes con Simó et al., 2007, donde se demuestra que Reelina sí tiene un efecto sobre las cadenas de neuronas en cultivo, provenientes también de explantes subventriculares. Por otro lado, al eliminar Reelina o los elementos de su vía de señalización (ApoER2/VLDLR, *Dab1*) se obtienen fenotipos comparables de hiper celularidad de la RMS y afectación de la integridad ventricular. Sin embargo, el mutante nulo para Trombospondina 1, no comparte ninguno de estos fenotipos y además, no promueva la degradación de *Dab1* (Blake et al., 2008).

Las células de la glía radial embrionaria expresan la maquinaria receptora de Reelina, ApoER2 y *Dab1* (Luque et al., 2003) y fosforilan *Dab1* tras la estimulación con Reelina (Magdaleno et al., 2002; Benhayon et al., 2003). Por lo tanto, hay una fuerte evidencia de que las células madre neurales reciben una señal funcional de Reelina (Luque et al., 2003). Lo mismo ocurre con los neuroblastos de la RMS adulta, quienes mantienen la expresión de receptores funcionales de Reelina (principalmente ApoER2) y *Dab1* (Hack et al., 2002). Los

resultados obtenidos aquí con el ensayo de fosforilación de Dab1 en la zona endependimal/subependimal son, por tanto, compatibles con que Reelina siga teniendo una función sobre la neurogénesis y la migración en el cerebro adulto. Además, la migración de los neuroblastos sigue el flujo del líquido cefalorraquídeo (Sawamoto et al., 2006) y Reelina está presente en él (Sáez-Valero et al., 2003; Ignatova et al., 2004).

Dab1 posee cuatro sitios clave de fosforilación de tirosinas. Los dos primeros (ab) tendrían la función de reclutar SFKs (Src Family Kinases) y activarlas, fosforilando al propio Dab1, mientras que a los dos últimos (cd) se les atribuye una función de andamiaje para formar complejos Crk/CrkL/C3G, también sustratos de las quinasas anteriores, lo cual se traduciría en activación de Rap1, quien regula mecanismos de adhesión de fibroblastos y otros tipos celulares (Ballif, et al., 2004). Todo este mecanismo se pone en marcha cuando ApoER2 y/o VLDLR se aproximan por la acción de oligómeros de Reelina presentes en la matriz extracelular. De hecho, el mutante nulo para Dab1 tiene un fenotipo migratorio indistinguible del *reeler* (Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Ware et al., 1997).

4. Manipulación genética de la vía de señalización de Reelina

Los mutantes nulos para Reelina, ApoER2 y Dab1 muestran dos evidentes defectos fenotípicos: una hiper celularidad de la RMS (Andrade et al., 2007, Artículo 3) y un agrandamiento patológico de los ventrículos laterales (Badea et al., 2007, esta tesis). La expresión de Reelina de forma ectópica sobre fondo *reeler* normaliza el tamaño ventricular aunque no aparentemente la hiper celularidad de la RMS; sin embargo promueve la migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfatorio. El rescate de defectos anatómicos, al menos parcial, lo confirmamos con la recuperación de la población de cilios

ependimales de la cara estriatal de los ventrículos laterales. Consistentemente, la pérdida condicional de la función de Dab1 en la zona endependimal/subependimal, provoca alteraciones diametralmente opuestas: aumento del tamaño ventricular, aparición de una hiper celularidad estructural de la RMS, posiblemente provocado por el defecto migratorio de los neuroblastos, que permanecen acumulados en la EZ/SEZ, en lugar de abandonar el nicho neurogénico en dirección al bulbo olfatorio. Parece evidente que la señalización mediada por Reelina altera el comportamiento migratorio de los neuroblastos.

También se han descrito interacciones entre la vía de señalización de Reelina y la proteína Lis1 (Assadi et al., 2003; Zhang et al., 2007), cuya mutación resulta en lisencefalia en los humanos. La mutación del gen que codifica para esta proteína es letal en ratón. La frecuencia de individuos hidrocefálicos se ve incrementada al combinar la heterocigosis del gen que codifica para Lis1 y la homocigosis para Reelina, VLDLR, ApoER2 o Dab1, sugiriendo por tanto un papel de los elementos integrantes de la vía de Reelina en el mantenimiento de la integridad ventricular.

Es bien conocido que la activación de la señalización Notch promueve y mantiene el carácter de progenitor neural, inhibiendo la diferenciación neuronal. La proteína Numb, en cambio, antagoniza la función de Notch durante la división de precursores neurales (revisado por Roegiers y Jan, 2004; Engler et al., 2018). La señalización canónica de Notch se muestra de hecho muy activa en el nicho neurogénico EZ/SVZ regulando el mantenimiento de los progenitores neurales troncales (Imayoshi et al., 2010; Aguirre et al., 2010). Si bien no se conocen los mecanismos precisos de regulación de la actividad de la señalización Notch en la EZ/SVZ del ratón, se sabe que algunos ligandos de Notch se expresan a lo largo de la misma y tanto Delta1

como Jagged1 han sido detectados en IPCs y también en neuroblastos (Aguirre et al., 2010; Irvin et al., 2004; revisado en Fuentealba et al., 2012). Interesantemente, la ablación condicional postnatal de las proteínas Numb/Numblake en la zona endependimal/subependimal provoca el ensanchamiento de los ventrículos laterales además de una marcada hiper celularidad de RMS (Kuo et al., 2006), fenotipos coincidentes con los aquí descritos para las carencias de Reelina, ApoER2 o Dab1. Consistentemente, la sobreexpresión del dominio intracelular activado de Notch en la EZ/SVZ fenocopia la hiper celularidad de la RMS; sin embargo, la integridad y tamaño de los ventrículos laterales no resultan comprometidos, sugiriendo la posibilidad de que la regulación vía Numb de la integridad endependimal suceda a través de un mecanismo independiente de Notch (Kuo et al., 2006). En cambio, un estudio más reciente muestra cómo las células endependimales son dependientes de la señalización canónica de Notch, que mantiene activamente la quiescencia, fenotipo y posición de las mismas. La inhibición de la señalización Notch exclusivamente en el epéndimo ventricular permite la reentrada de los endependimocitos en el ciclo celular y la producción de neuronas del bulbo olfatorio, mientras la señalización forzada de Notch es suficiente para bloquear la plástica respuesta de las células endependimales al infarto cerebral (Carlén et al., 2009). Sin duda, la señalización Notch tiene diversas funciones en las diferentes poblaciones celulares del nicho neurogénico del ventrículo lateral. Por otra parte, aunque la interacción entre las señalizaciones de Reelina y Notch resulta importante para la modulación de la neurogénesis y migración celular durante el desarrollo cortical (Hashimoto-Torii et al., 2008; Lakoma et al., 2011), los mecanismos moleculares precisos no han sido aún esclarecidos. De hecho, cerca de un centenar de genes se han revelado directamente regulados *in vivo* en NSCs corticales por el dominio intracelular de Notch (NICD) y su

co-factor RPB1. Uno de ellos es Dab1, cuya transcripción tras la activación de Notch, no es activada, sino reprimida (Li et al., 2012). Asimismo, conviene recordar que Numb y Dab1 son proteínas accesorias endocíticas, capaces de regular la endocitosis y el subsiguiente tráfico post-endocítico de sus receptores afines [tales como Notch, TrkB, b-APP, VLDLR y ApoER2] (excelentemente revisado por Yap y Winckler, 2015). Como quiera que ambas proteínas comparten el dominio PTB (*Phosphotyrosine binding/NPXY binding region*), la posibilidad de una interacción cruzada y en función del contexto celular no resulta descartable. Un estudio reciente demuestra cómo la inhibición de la señalización Notch en el nicho neurogénico adulto del ventrículo lateral da lugar a que las células abandonen la zona subventricular migrando hacia la ruta migratoria rostral más rápidamente que lo observado en los cerebros de control. Por el contrario, la sobreexpresión de Notch resulta en una mayor proporción de células quedando retenidas en la SVZ durante más tiempo del observado en los cerebros de control (Piccin et al., 2013), un fenotipo claramente similar al descrito para la ablación condicional de Dab1 en esta Tesis Doctoral. También, la abundancia de Notch en los neuroblastos (PSA-NCAM+) localizados en la RMS, mucho menor en aquéllos que han alcanzado el bulbo olfatorio, sugiere que la actividad de Notch puede inhibir su prematura diferenciación (Givogri et al., 2006). Evidentemente, un patrón de expresión fuertemente reminiscente del aquí demostrado para la localización de ApoER2. Con todo, sería interesante explorar si la interacción entre las señalizaciones de Reelina y Notch persiste en el eje neurogénico EZ/SVZ/RMS del cerebro adulto.

Circunstancialmente, los resultados de la manipulación del glicoconjugado PSA-NCAM resultan de particular interés en nuestro contexto. El ácido poli- α 2,8-siálico (PSA), una modificación post-translacional única de la molécula de adhesión celular

neural (NCAM), está fuertemente vinculado al desarrollo y la plasticidad neural. La eliminación de PSA (mediante la ablación genética de sus enzimas sintetizadores), independientemente de NCAM, da lugar a una expansión de la RMS y a un ensanchamiento ventricular (Weinhold et al., 2005), fenotipos comparables a los aquí demostrados para la ausencia de Reelina, ApoER2 o Dab1. Asimismo, la administración intratecal de endoneuraminidasa (endo N) [un enzima que selectivamente elimina PSA] demuestra que PSA no sólo promueve la migración tangencial rostral de los neuroblastos sino que también suprime la diferenciación de los mismos inducida por NCAM. Dicha diferenciación, dependiente de contacto célula-célula, implica la activación de la vía de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Petridis et al., 2004). De hecho, como en nuestro caso ApoER2, en los ratones silvestres resulta evidente la bajo-regulación de PSA una vez que los neuroblastos alcanzan el bulbo olfatorio para comenzar a migrar radialmente y diferenciar. Interesantemente, se ha mostrado que Reelina induce la separación de los neuroblastos migrando en cadena desde explantes de la SVZ (Hack et al., 2002) y que dicho efecto depende también de la activación de la vía MAPK (Simó et al., 2007). Además, la administración intraventricular de endo N (y no la eliminación de PSA mediante manipulación genética) provoca una dispersión masiva de neuroblastos en zonas cerebrales circundantes, incluida la región estriatal (Battista y Rutishauser, 2010); un efecto ciertamente comparable a la redirección de neuroblastos que aquí observamos tras la infusión intraventricular de Reelina recombinante en mutantes *reeler*. No se conoce una interacción directa entre Reelina o ApoER2 con PSA o NCAM. Se sabe, sin embargo, que PSA sobre NCAM es capaz de unirse directamente a moléculas bioactivas tales como neurotrofinas, neurotransmisores y factores de crecimiento, implicadas en una gran diversidad de funciones

neurales, regulando así sus concentraciones extracelulares y modos de señalización. De esta forma, PSA se une al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y BDNF en la cadena PSA puede migrar hacia los receptores TrkB y p75NTR (Sato et al., 2016, para una excelente revisión). A su vez, las neurotrofinas, incluida BDNF, son capaces de regular el procesamiento proteolítico de ApoER2 mediante la activación de la vía de señalización Trk (Larios et al., 2014). Por otra parte, NCAM puede interactuar heterofílicamente con otras moléculas de adhesión celular tales como L1 (Horstkorte et al., 1993). Un estudio reciente demuestra la escisión proteolítica de L1 por Reelina, indicando además su relevancia para la migración neuronal durante el desarrollo cortical (Lutz et al., 2017). Sería igualmente interesante explorar si estas interacciones moleculares transitivas persisten en el eje neurogénico EZ/SVZ/RMS del cerebro adulto. Después de todo, las funciones de adhesión y señalización celular no parecen tan incompatibles como durante tiempo se consideró. Sorprende la escasez de literatura al respecto, cuando en estudios pioneros, tanto Notch (Fehon et al., 1990) como Reelina (Ogawa et al., 1995), fueron funcionalmente vinculados con la adhesividad celular.

5. Especificación regional y temporal de tipos neuronales

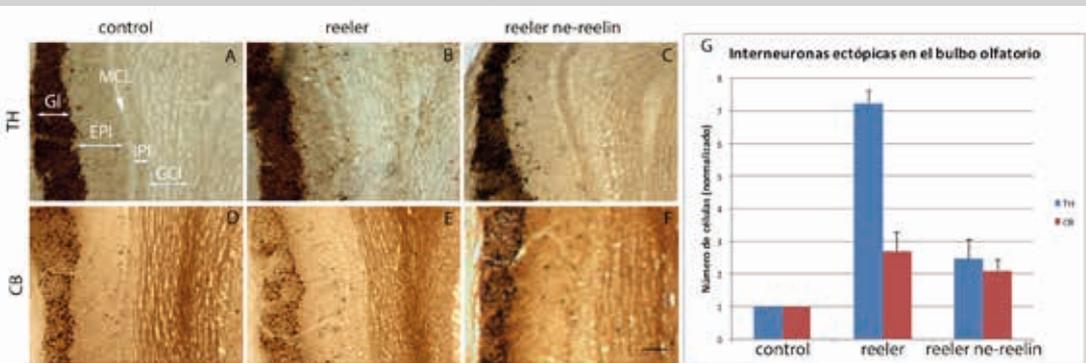
Desde un punto de vista meramente morfológico resulta evidente que en el cerebro *reeler* coexisten regiones cerebrales abiertamente afectadas como el cerebelo, el hipocampo o la corteza, con aquellas otras aparentemente no afectadas o mínimamente afectadas como el bulbo olfatorio o el estriado (Luque, 2007). La explicación más parsimoniosa estriba en que durante el desarrollo embrionario Reelina actúa sobre linajes neuronales únicos de forma que, por ejemplo, en la corteza cerebral es requerida para la migración radial de las neuronas de proyección, pero no así para la migración

tangencial de las interneuronas (Luque, 2007 [Epub 2006]; Pla et al., 2006). Considerando la continuidad entre los nichos neurogénicos embrionario y postnatal nos preguntamos si una predilección comparable podría revelarse también en el bulbo olfatorio y el posicionamiento de algunos subtipos de interneuronas en él. Confirmamos que en el mutante *reeler* adulto dos subpoblaciones de interneuronas periglomerulares (calbindina-positiva [CB+] y tirosina hidroxilasa-positiva [TH+]) se encuentran en posiciones ectópicas, dispersas en la capa plexiforme externa, sin alcanzar los glomérulos del bulbo olfatorio (Hellwig et al., 2012; Fig. 36). Sin embargo, extendiendo estos resultados, descubrimos que la expresión del transgén *ne-Reelin* sobre un fondo *reeler* produce un significativo rescate del posicionamiento ectópico de las células TH+, si bien no modifica el de las células CB+. Se sabe que la producción de interneuronas periglomerulares TH+ es máxima durante la embriogénesis temprana decreciendo progresivamente con el desarrollo. En cambio, la generación de interneuronas periglomerulares CB+ es máxima durante la embriogénesis tardía decreciendo a continuación también de forma progresiva (Batista-Brito et al., 2008).

Es formalmente posible que una mayor actividad del promotor de *nestina* que dirige la expresión de *Reelin* (en el constructo *ne-Reelin*) durante la embriogénesis temprana explique el rescate del posicionamiento de las interneuronas TH+. Es posible incluso, como especulábamos anteriormente, que *ne-Reelin* pueda sostener la función de *Dab1* como activador de quinasas, pero no suficientemente su función facilitadora del ensamblaje de complejos de señalización requerida para la migración de neuronas generadas más tardíamente durante la embriogénesis (Pérez-Martínez et al., 2012).

Interesantemente, sin embargo, mientras las células periglomerulares CB+ del OB comparten una relación directa de linaje (esto es, derivan de un progenitor ancestral común) con aquellas neuronas estriatales generadas tempranamente durante el desarrollo (<E15), las células periglomerulares TH+ lo hacen con aquellas neuronas corticales generadas también antes de E15 (Fuentealba et al., 2015). Como quiera que la actividad de *Reelin* no parece un requerimiento para la migración de las neuronas estriatales, pero sí para la migración de las neuronas principales de la corteza, dicha correspondencia sugiere que la existencia de

Figura 36 | Especificación regional y temporal de tipos neuronales



En los mutantes *reeler*, las subpoblaciones de interneuronas periglomerulares tirosina hidroxilasa-positiva [TH+] (B) y calbindina-positiva [CB+] (E) se encuentran en posiciones ectópicas, dispersas en la capa plexiforme externa, sin alcanzar los glomérulos del bulbo olfatorio. Sin embargo, la expresión del transgén *ne-reelin* sobre un fondo genético *reeler* produce un significativo rescate del posicionamiento ectópico de las células TH+ (C), si bien no modifica el de las células CB+ (F), en comparación con sus respectivos controles (A, B, respectivamente). En la gráfica G se representan datos normalizados de número de células ectópicas TH+ y CB+ en los bulbos olfatorios *reeler* y *reeler ne-reelin*. Barra de escala: 100 μ m. [GL: capa glomerular; EPI: capa plexiforme externa; MCL: capa de células mitrales; IPI: capa plexiforme interna; GCI: capa granular].

una sofisticada especificación regional (y temporal) a nivel de las células progenitoras troncales subyace a la generación de la gran diversidad de tipos neuronales susceptibles a la acción de Reelina.

6. El líquido cefalorraquídeo como fuente de Reelina

Una conclusión evidente es que Reelina ayuda a mantener la integridad del ventrículo y que tiene cierto efecto sobre la migración tangencial de los neuroblastos en la ruta migratoria rostral. Pero quisimos ir más allá. Hay que tener en cuenta que la proteína ectópica proveniente del transgén, aunque probablemente en pequeñas cantidades, se está sintetizando de forma constante en tanto en cuanto se mantenga la actividad del promotor de nestina, incluso en la edad adulta del animal.

¿Qué ocurriría si se introduce Reelina directamente en el líquido cefalorraquídeo dentro del ventrículo lateral de un *reeler* adulto? ¿Tendría esto algún efecto? Los experimentos de la infusión intraventricular de Reelina recombinante demuestran que sí. El comportamiento migratorio de los neuroblastos se ve claramente alterado. Es decir, unas células que no han estado nunca expuestas a Reelina, son capaces de responder a ella. No hay duda de que debe haber mecanismos compensatorios que, en ausencia total de Reelina, se activen para intentar subsanar los defectos provocados por su carencia. Pero el hecho de que los neuroblastos sean capaces de interpretar la señal “Reelina” como ligando, en unión al resto de resultados de esta parte del trabajo, demuestra que la vía de Reelina sigue siendo activa en el adulto. Además, los neuroblastos modifican su comportamiento migratorio en respuesta a un ligando introducido en el ventrículo lateral. No procede ni de la corteza, ni del bulbo olfatorio, ni tampoco obviamente de la RMS, de hecho, en el cerebro silvestre existe Reelina en el líquido

cefalorraquídeo (Sáez-Valero et al., 2003; Ignatova et al., 2004) y los neuroblastos migran siguiendo el flujo de éste (Sawamoto et al., 2006). Consistente con todo ello, resulta el espectacular rescate del fenotipo *reeler* en la pared ciliada ependimal de los ventrículos laterales impuesto por la infusión de Reelina recombinante en el interior de los mismos (Fig. 23). Cabe considerar, por tanto, que la Reelina presente en el líquido cefalorraquídeo tiene efecto sobre la integridad del ventrículo y la migración neuronal, manteniendo el nicho neurogénico adulto.

El trabajo que muchos laboratorios han dado a conocer sugiere que es conveniente una re-evaluación del papel de señales intrínsecas y extrínsecas durante la neurogénesis en el cerebro en desarrollo. La polaridad celular que el nicho neurogénico promueve, permite que se dé un enriquecimiento de receptores de factores de crecimiento a lo largo de la superficie ventricular, donde residen los progenitores corticales, lo cual fuertemente sugiere que los progenitores analizan selectivamente el líquido cefalorraquídeo en busca de señales difusibles que instruyan la neurogénesis. De hecho, hay evidencias de varias regiones cerebrales y de diferentes especies que apoyan un nuevo modelo en el que las señales difusibles distribuidas a través del líquido cefalorraquídeo permitan el crecimiento y la supervivencia del cerebro en desarrollo.

De forma colectiva, estos descubrimientos sugieren que el LCR embrionario es un componente integral del nicho neurogénico. Una posibilidad es que se controle la neurogénesis regulando el acceso de los progenitores a las moléculas que circulan en el líquido cefalorraquídeo (revisado por Lehtinen y Walsh, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la idea de que el líquido cefalorraquídeo siga teniendo un papel en el mantenimiento de la neurogénesis y en los nichos neurogénicos remanentes en el cerebro adulto.

MODELO

Nuestro grupo ha demostrado que, durante el desarrollo embrionario, Reelina, actuando aguas arriba de la señalización Notch, regula la especificación temporal de los progenitores neurales, resultando así necesaria y suficiente para determinar el ritmo de neurogénesis en la corteza cerebral (Lakoma et al., 2011). Tal interacción entre las señalizaciones de Reelina y Notch es requerida también para la migración y el posicionamiento neuronal (Hashimoto-Torii et al., 2008). Es por tanto concebible que la función de Reelina en el compartimento proliferativo (neurogénesis) subyazca a su requerimiento post-proliferativo (migración), emergiendo la posibilidad de que Reelina actúe vinculando ambos procesos, resultando más bien una señal permisiva, antes que instructiva, para la migración celular. De hecho, los resultados descritos en la primera parte de esta Tesis Doctoral permiten sustentar un modelo según el cual un mecanismo de bajo-regulación del receptor ApoER2 dependiente de Reelina desacopla los progenitores neurales corticales de las neuronas recién generadas permitiendo así la migración de estas últimas (Uchida et al., 2009; Pérez-Martínez et al., 2012). Los resultados obtenidos en la segunda parte de esta tesis (Pérez-Martínez et al., 2019, sin publicar) describen cómo Reelina permanece activa en los nichos neurogénicos remanentes del cerebro adulto: mostramos que la cascada de señalización bioquímica activada por Reelina, resultante en la fosforilación de la proteína adaptadora intracelular Dab1, ocurre en la zona endodimensional/subendodimensional de los ventrículos laterales que ubica a las células troncales y otros progenitores neurales donde, junto a su asociada y extensa ruta migratoria rostral de neuroblastos, se concentra la más alta concentración de ApoER2 funcional del cerebro adulto.

Los ratones mutantes carentes de Reelina (*reeler*), ApoER2 o Dab1 exhiben un

prominente ensanchamiento del volumen ventricular y una marcada hiper celularidad de la RMS, particularmente en su aspecto proximal. Mientras la ablación genética condicional de Dab1 en las células progenitoras neurales aumenta el volumen ventricular e inhibe la migración celular desde la SVZ hacia la ruta migratoria rostral, la expresión transgénica ectópica de Reelina en los progenitores neurales de mutantes *reeler* normaliza el lumen ventricular y la densidad de cilios endodimensionales, mejorando en cambio la migración de los neuroblastos; consistentemente, la infusión intraventricular de Reelina recombinante en mutantes *reeler* también afecta la migración de neuroblastos, indicando que Reelina actúa desde el líquido cefalorraquídeo. Estos resultados demuestran que, la señalización de Reelina, no sólo permanece activa, sino que además resulta necesaria y suficiente para modular el nicho neurogénico EZ/SEZ/RMS.

Un extenso plexo vascular corre paralelo a la EZ/SEZ y un especializado pie terminal en el proceso basal de los progenitores troncales neurales (células B) les permite interactuar estrechamente con las células endoteliales vasculares (ECs). De hecho, las ECs, y probablemente factores derivados de la circulación sanguínea, sostienen la proliferación y renovación de los progenitores de la EZ/SEZ *in vitro* (Shen et al., 2004). Conglomerados de células B y progenitores celulares intermedios están asociados con regiones de los vasos sanguíneos donde la barrera hematoencefálica (BBB) parece tener fugas (Tavazoie et al., 2008). Factores derivados de la sangre pueden así acceder directamente a las células B e IPCs y regular su proliferación (revisado en Fuentealba et al., 2012). Reelina no sólo está presente en la sangre (Smalheiser et al., 2000; Underhill et al., 2003; Tseng et al., 2010), sino en las propias ECs que forman los vasos sanguíneos (Ikeda y Terashima, 1997; Pérez-Costas et al., 2015). Recientemente el grupo de Amparo Acker-Palmer ha reportado

que, durante el desarrollo cortical, Reelina posee propiedades angiogénicas. ApoER2 y Dab1 expresados en las células endoteliales son necesarios para la vascularización de la corteza cerebral. La eliminación de Dab1 en las ECs afecta tanto la funcionalidad de la BBB como la migración y el posicionamiento neuronal. Sin embargo, no encontrando afectado el número de glías radiales o de células progenitoras intermedias, los autores consideran que los defectos migratorios neuronales no resultan consecuencia de defecto neurogénico alguno (Segarra et al., 2018). Permanece por demostrar si Reelina podría actuar sobre las células endoteliales en la EZ/SVZ regulando las propiedades de barrera de la unión neurovascular y, en tal caso, a qué función podría servir dicha regulación.

La dinámica y composición molecular del líquido cefalorraquídeo resultan objeto de renovado interés, particularmente en la medida en que éste también emerge como un componente clave en la regulación del nicho neurogénico EZ/SVZ (revisado en Lun et al., 2015; Guerra et al., 2015). La presencia de Reelina en el LCR del cerebro adulto ha sido documentada por nuestro grupo (Sáez-Valero et al., 2003) y posteriormente confirmada por otros (e.g., Ignatova et al., 2004; Gulbrandsen et al., 2014; Macron et al., 2018). Diversos mecanismos están implicados en la compleja dinámica del LCR (revisado en Iliff et al., 2013; Hladky y Barrand, 2014). Uno de ellos, el movimiento orquestado de los cilios endodiales de la pared ventricular provoca un flujo laminar supraependimal de aproximadamente 200 μm de espesor (Worthington y Cathcart, 1966; Cifuentes et al., 1994; Siyahhan et al., 2014). Se ha observado que este tipo de movimiento no sólo resulta necesario para el flujo normal del líquido cefalorraquídeo en el ventrículo lateral, sino también para la formación de gradientes de concentración de moléculas contenidas en el fluido y para la migración direccional de los neuroblastos

que corre pareja a dicho flujo (Sawamoto et al., 2006). Además, múltiples evidencias relacionan las alteraciones ciliares y de la polaridad planar de los endodiales con la distensión ventricular y el hidrocefalo (revisado en Jiménez et al., 2014; Ohata y Alvarez-Buylla, 2016).

Nuestros resultados implicando a la actividad de Reelina en el mantenimiento de la integridad del manto ciliado endodial/volumen ventricular y la regulación de la neurogénesis/migración de los neuroblastos resultan consistentes con dichas observaciones.

Por otra parte, la pequeña superficie apical de las células B está en contacto directo con el LCR cuyos factores en solución pueden modular la conducta de estos progenitores troncales (Lehtinen et al., 2011; Zappaterra et al., 2007). Además, al igual que hacen la glía radial y las células neuroepiteliales durante el desarrollo embrionario, la gran mayoría de las células B contactan el ventrículo mediante pequeños procesos apicales que contienen un único cilio primario (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). Este cilio primario bien podría integrar directamente señales activadas desde moléculas presentes en el LCR (revisado en Fuentealba et al., 2012). Y en otro orden de cosas, las propias células endodiales (que rodean los procesos apicales de las células B), principal interfaz entre el líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral, están unidas entre sí por “*gap junctions*”, un tipo de conexión intercelular que no proporciona una restricción severa a la difusión de moléculas entre ambos compartimentos (Whish et al., 2015). E intrigante resulta sin duda la detección de ApoER2 y VLDLR (así como la de Notch y algunos de sus ligandos) en el propio líquido cefalorraquídeo (Gulbrandsen et al., 2014; Macron et al., 2018). Tal vez su presencia pueda estar relacionada con la liberación de partículas extracelulares de membrana (prominina/

CD133+) desde células progenitoras neurales y otras células epiteliales al LCR (Marzesco et al., 2005; Huttner et al., 2008). Pero, ¿de dónde procede entonces la Reelina del LCR adulto? Se sabe que muy probablemente no deriva de la sangre sino del CNS (Ignatova et al., 2004; Aasebø et al. 2014). Por otra parte, si bien su expresión resulta detectable durante el desarrollo embrionario (Lein et al., 2007; Johansson et al., 2013, 2014), no se encuentra Reelina en el secretoma del plexo coroideo del ventrículo lateral, clásicamente considerado un productor primario del LCR y recientemente revelado como un componente clave del nicho EZ/SVZ adulto (Silva-Vargas et al., 2016). Sin embargo, es posible que Reelina alcance el nicho neurogénico EZ/SVZ tras ser secretada al líquido cefalorraquídeo desde alguno otro órgano circunventricular (CVO). Por ejemplo, el órgano subfornical, situado sobre la superficie ventral del fórnix cercano al foramen de Monro que interconecta los ventrículos laterales con el tercer ventrículo, expresa fuertemente Reelina (Lein et al., 2007). Considerado tradicionalmente un CVO sensorial, recientemente se ha revelado su capacidad secretora (Agassandian et al., 2017). También expresa Reelina el órgano subcomisural (SCO), localizado en la región dorsocaudal del tercer ventrículo, a la entrada del acueducto cerebral (Lein et al., 2007). Se sabe que el SCO secreta SCO-espondina, transtirretina y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (BFGF), proteínas que participan en diversos aspectos de la neurogénesis tales como la proliferación de los progenitores troncales y la diferenciación neuronal, incluida la guía axonal. Algunos compuestos solubles no identificados secretados por el SCO han sido detectados en el ventrículo lateral (Guerra et al., 2015). En términos estructurales, la principal secreción del SCO, SCO-espondina, pertenece a la superfamilia TSR (*thrombospondin type 1 repeat*), que incluye a F-espondina y tromboespondina-1 entre otras proteínas (Adams y Tucker, 2000).

Reelina posee un dominio homólogo al terminal N de F-espondina (Ranaivoson et al., 2015) y a su vez la proteína F-espondina es capaz de interactuar, a través de sus dominios TSR, con ApoER2 (Hoe et al., 2005).

Asimismo, tromboespondina-1 (TBHS-1) puede interactuar con ApoER2 y VLDLR; se ha propuesto que TBHS-1 estabiliza las cadenas de precursores neurales derivadas de explantes de la zona subventricular (Blake et al., 2008), sin embargo su función *in vivo* permanece por esclarecer. Interessantemente, la falta de función secretoria del órgano subcomisural es una característica común en diversos modelos animales de hidrocefalia (Meinzel, 2007), clásicamente definida como una distensión del sistema ventricular resultante de una activa acumulación de líquido cefalorraquídeo. Múltiples evidencias asocian el hidrocefalo con una neurogénesis anormal; los resultados más recientes implican a las alteraciones neurogénicas antes que a la acumulación activa de LCR en su patogénesis (Furey et al., 2018). En cualquier caso, e independientemente de dónde proceda la Reelina del LCR del cerebro adulto, existe un sugerente paralelismo entre dicha asociación causal y nuestros propios resultados indicando que la inhibición de la actividad de Reelina sobre el nicho EZ/SVZ provoca alteraciones que comprometen tanto la neurogénesis como el volumen ventricular.

Con todo, nuestras observaciones en el cerebro adulto resultan consistentes con un modelo según el cual, actuando desde el líquido cefalorraquídeo Reelina controla, a través de ApoER2 y Dab1, la integridad y funcionalidad del epéndimo ventricular, la conducta de los progenitores celulares de la EZ/SVZ, regulando finalmente la producción y migración de los neuroblastos vía RMS hasta el mismo centro del bulbo olfatorio. Puede resultar menos evidente, pero en nuestra opinión, dicho modelo no resulta

inconsistente con el previamente propuesto para el desarrollo embrionario de la corteza cerebral. De hecho, el requerimiento de una bajo-regulación de ApoER2 en los neuroblastos a lo largo de la RMS en los ratones silvestres es claramente deducible de la mayor intensidad de ApoER2 funcional observada en el mutante reeler. Teniendo en cuenta que los neuroblastos mientras transitan la RMS no han abandonado el ciclo celular, es decir no constituyen una población enteramente post-mitótica, dicha bajo-regulación en ningún caso alcanzaría los mínimos observados en la

placa cortical embrionaria. Sin embargo, una vez que los neuroblastos alcanzan el centro del bulbo olfatorio podría requerirse una bajo-regulación completa de ApoER2 que capacitase o permitiese (tal vez por señales distintas a Reelina) la migración radial de las interneuronas olfatorias producidas en el nicho neurogénico adulto. Sin más especulación, no habiendo sido objeto de esta Tesis Doctoral, la consistente detección de ApoER2 funcional en el nicho neurogénico de la zona subgranular del giro dentado hipocampal adulto merece una investigación por sí misma.

CONCLUSIONES

1. El desarrollo y extensa validación de **AP-RR36**, una proteína de fusión resultante de la combinación entre la fosfatasa alcalina y los dominios de repetición 3 a 6 de Reelina (constituyentes de su principal unidad de acoplamiento a receptores), pone a disposición de la comunidad científica una herramienta altamente sensible y de fácil empleo que **permite localizar (y eventualmente cuantificar) la cantidad total de receptores funcionales de Reelina**, i.e. aquéllos que, en su forma madura, se encuentran en la membrana plasmática celular.
2. **Durante el desarrollo**, la precisa bajo-regulación de los receptores funcionales de Reelina en las neuronas de proyección (corticales y cerebelares) implica que **la acción primaria de Reelina tiene lugar en estadios celulares tempranos y/o pre-migratorios**. Consistente con esta noción, en la corteza cerebral, una expresión enriquecida de receptores funcionales de Reelina, fundamentalmente ApoER2, se localiza en los procesos basales de los progenitores neurales troncales (glía radial), en los progenitores neurales intermedios, así como en las neuronas locales recién generadas aún presentes en la zona subventricular/zona intermedia. Además,
3. **La carga de ApoER2 en la membrana plasmática determina la conducta migratoria celular durante el desarrollo cortical**. In vivo, la sobreexpresión de ApoER2 inhibe la migración neuronal en ratones silvestres; en cambio, la reducción de niveles excesivos de ApoER2 en mutantes reeler (carentes de Reelina), sea por su derribo genético o bien mediante la expresión ectópica de Reelina en progenitores neurales, normaliza los niveles de Dab1, mejorando a su vez la migración y posicionamiento neuronal. Todo ello indica que,
4. **Un mecanismo de bajo-regulación de ApoER2 dependiente de Reelina subyace a la orquestada separación entre las células progenitoras neurales corticales y su progenie neuronal, permitiendo o capacitando la migración de las nuevas neuronas de proyección desde sus lugares de origen**.
5. **La actividad Reelina persiste en los nichos neurogénicos del cerebro adulto**. Consistente con esta noción, la zona endpinal/subendpinal de los ventrículos laterales (con su asociada ruta migratoria rostral de neuroblastos) y, en menor medida, la zona subgranular del giro dentado hipocámpal, concentran la mayor abundancia de receptores funcionales de Reelina, fundamentalmente ApoER2, además de Dab1. De hecho, Reelina funciona sobre el nicho neurogénico del ventrículo lateral fosforilando Dab1. Además,

6. **Actuando desde el fluido cerebroespinal Reelina sustenta, vía ApoER2/Dab1, el nicho neurogénico del ventrículo lateral en el cerebro adulto, habilitando la migración en cadena, aún restringiendo la diferenciación, de los neuroblastos en ruta hacia el bulbo olfatorio.** Así, los ratones carentes de Reelina, ApoER2 o Dab1 exhiben fenotipos comparables (ensanchamiento ventricular e hiper celularidad de la ruta migratoria rostral de neuroblastos, particularmente en su región proximal). La ablación condicional de Dab1 en las células progenitoras neurales de ratones silvestres afecta el lumen ventricular e inhibe el despeje de los neuroblastos de la zona subventricular; en cambio, la expresión ectópica de Reelina en los progenitores neurales de mutantes reeler normaliza el lumen ventricular, la densidad de cilios endiales y la corriente de neuroblastos; la infusión intraventricular de Reelina recombinante en estos mismos mutantes re-direcciona el movimiento de los neuroblastos. Tomados en su conjunto, nuestros resultados revelan que,

7. **Tomados en su conjunto, nuestros resultados apuntan a que la señalización mediada por Reelina conforma una maquinaria maestra que, de forma universal y simple, regula los diversos aspectos de la neurogénesis, tanto durante el desarrollo cerebral embrionario como en los nichos neurogénicos remanentes en el cerebro adulto.**

BIBLIOGRAFÍA

- Aasebø E, Opsahl JA, Bjørlykke Y, Myhr KM, Kroksveen AC, Berven FS. Effects of blood contamination and the rostro-caudal gradient on the human cerebrospinal fluid proteome. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e90429.
- Acabchuk RL, Sun Y, Wolferz R Jr, Eastman MB, Lennington JB, Shook BA, Wu Q, Conover JC. 3D Modeling of the Lateral Ventricles and Histological Characterization of Periventricular Tissue in Humans and Mouse. *J Vis Exp*. 2015 May 19;(99):e52328.
- Adams JC, Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn*. 2000 Jun;218(2):280-99.
- Agassandian K, Grobe JL, Liu X, Agassandian M, Thompson AP, Sigmund CD, Cassell MD. Evidence for intraventricular secretion of angiotensinogen and angiotensin by the subfornical organ using transgenic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017 Jun 1;312(6):R973-R981.
- Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):323-7.
- Alcántara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E. Regional and cellular patterns of Reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci*. 1998 Oct 1;18(19):7779-99.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004 Mar 4;41(5):683-6.
- Andersen OM, Benhayon D, Curran T, Willnow TE. Differential binding of ligands to the apolipoprotein E receptor 2. *Biochemistry*. 2003 Aug 12;42(31):9355-64.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):474-6.
- Andrade N, Komnenovic V, Blake SM, Jossin Y, Howell B, Goffinet A, Schneider WJ, Nimpf J. ApoER2/VLDL receptor and *Dab1* in the rostral migratory stream function in postnatal neuronal migration independently of Reelin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 15;104(20):8508-13.
- Angevine JB Jr, Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 1961 Nov 25;192:766-8.
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. and Heintz, N.. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 2004 Mar 25;41(6):881-90.
- Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem*. 1997 Nov;122(5):977-82.

- Arnaud L, Ballif BA, Cooper JA. Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development. *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(24):9293-302.
- Arnaud, L., Ballif, B. A., Förster, E. and Cooper, J. A. Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol.* 2003 Jan 8;13(1):9-17.
- Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD. Interaction of Reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):270-6.
- Badea A, Nicholls PJ, Johnson GA, Wetsel WC. Neuroanatomical phenotypes in the reeler mouse. *Neuroimage.* 2007 Feb 15;34(4):1363-74.
- Ballif BA, Arnaud L, Cooper JA. Tyrosine phosphorylation of Disabled-1 is essential for Reelin-stimulated activation of Akt and Src family kinases. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Oct 7;117(2):152-9.
- Balordi F, Fishell G. Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci.* 2007 Dec 26;27(52):14248-59.
- Bayer SA, Altman J. Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol.* 1990 Jan;107(1):48-62.
- Beffert U, Nematollah Farsian F, Masiulis I, Hammer RE, Yoon SO, Giehl KM, Herz J. ApoE receptor 2 controls neuronal survival in the adult brain. *Curr Biol.* 2006 Dec 19;16(24):2446-52.
- Benhayon, D., Magdaleno, S. and Curran, T. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Apr 10;112(1-2):33-45.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jul;3(7):517-30.
- Battista D, Rutishauser U. Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci.* 2010 Mar 17;30(11):3995-4003.
- Blake, S. M., Strasser, V., Andrade, N., Duit, S., Hofbauer, R., Schneider, W. J. and Nimpf, J. (2008). Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *EMBO J.* 27, 3069-3080.
- Bock, H. H. and Herz, J. Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol.* 2003 Jan 8;13(1):18-26.
- Bouché E, Romero-Ortega MI, Henkemeyer M, Catchpole T, Lemhuis J, Frotscher M, May P, Herz J, Bock HH. Reelin induces EphB activation. *Cell Res.* 2013 Apr;23(4):473-90.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascón S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci.* 2009 Dec;12(12):1524-33.

- Britto JM, Tait KJ, Lee EP, Gamble RS, Hattori M, Tan SS. Exogenous Reelin modifies the migratory behavior of neurons depending on cortical location. *Cereb Cortex*. 2014 Nov;24(11):2835-47.
- Bulfone, A., Smiga, S. M., Shimamura, K., Peterson, A., Puellas, L. and Rubenstein, J. L. (1995). T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15, 63-78.
- Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci*. 2009 Mar;12(3):259-67.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2003 May;6(5):507-18.
- Caviness V.S., Jr. Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol*. 1973 Sep 15;151(2):113-20.
- Caviness, V.S., Jr, Nowakowski, R. S. and Bhide, P.G. Neocortical neurogenesis: morphogenetic gradients and beyond. *Trends Neurosci*. 2009 Aug;32(8):443-50
- Caviness VS Jr, Sidman RL. Time of origin of corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol*. 1973 Mar 15;148(2):141-51.
- Chameau, P., Inta, D., Vitalis, T., Monyer, H., Wadman, W. J. and van Hooft, J. A. The N-terminal region of Reelin regulates postnatal dendritic maturation of cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28;106(17):7227-32
- Cifuentes M, Rodríguez S, Pérez J, Grondona JM, Rodríguez EM, Fernández-Llebrez P. Decreased cerebrospinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of Reissner's fibre. *Exp Brain Res*. 1994;98(3):431-40.
- Cooper, J. A. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*. 2008 Mar;31(3):113-9.
- Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, Durbec P, Cayre M. Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One*. 2011;6(5):e20430.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999 Oct;24(2):471-9.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 1995 Apr 20;374(6524):719-23.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci*. 1997 Jan 1;17(1):23-31.
- de Bergeyck V, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C. A panel of monoclonal antibodies against Reelin, the extracellular matrix protein defective in reeler mutant mice. *J Neurosci Methods*. 1998 Jul 1;82(1):17-24.

- de Bergeyck V, Nakajima K, Lambert de Rouvroit C, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K. A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the 'Orleans' reeler mutation (Reln[r1-Orl]). *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Oct 15;50(1-2):85-90.
- Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E. A role for Cajal-Retzius cells and Reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*. 1997 Jan 2;385(6611):70-4.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES. Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*. 2000 Jul;27(1):33-44.
- Engler A, Rolando C, Giachino C, Saotome I, Erni A, Brien C, Zhang R, Zimmer-Strobl U, Radtke F, Artavanis-Tsakonas S, Louvi A, Taylor V. Notch2 Signaling Maintains NSC Quiescence in the Murine Ventricular-Subventricular Zone. *Cell Rep*. 2018 Jan 23;22(4):992-1002.
- Falconer, D.S. Two congenital defects of the limb bones in the mouse. *Acta Anat (Basel)*. 1951;13(4):371-8.
- Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T. Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol Psychiatry*. 2000 Nov;5(6):654-63, 571.
- Feng, L. and Cooper, J. A. (2009). Dual functions of Dab1 during brain development. *Mol Cell Biol*. 2009 Jan;29(2):324-32.
- Fatemi SH, Kroll JL, Sary JM. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport*. 2001 Oct 29;12(15):3209-15.
- Fatemi SH, Snow AV, Sary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, Brooks AI, Pearce DA. Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry*. 2005 Apr 1;57(7):777-87.
- Fatemi SH, Sary JM, Egan EA. Reduced blood levels of Reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cell Mol Neurobiol*. 2002 Apr;22(2):139-52.
- Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, Artavanis-Tsakonas S. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*. 1990 May 4;61(3):523-34.
- Feng L, Cooper JA. Dual functions of Dab1 during brain development. *Mol Cell Biol*. 2009 Jan;29(2):324-32.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marín O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44: 251 – 61.
- Flanagan JG, Cheng HJ, Feldheim DA, Hattori M, Lu Q, Vanderhaeghen P. Alkaline phosphatase fusions of ligands or receptors as in situ probes for staining of cells, tissues, and embryos. *Methods Enzymol*. 2000;327:19-35.

- Fox JW, Lamperti ED, Ekşioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*. 1998 Dec;21(6):1315-25.
- Fox JW, Walsh CA. Periventricular heterotopia and the genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Am J Hum Genet*. 1999 Jul;65(1):19-24.
- Franco, S. J., Martínez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R. and Müller, U. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*. 2011 Feb 10;69(3):482-97.
- Frotscher M. Dual role of Cajal-Retzius cells and Reelin in cortical development. *Cell Tissue Res*. 1997 Nov;290(2):315-22.
- Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X. Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci*. 2017 May 23;11:148.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):698-708.
- Furey CG, Choi J, Jin SC, Zeng X, Timberlake AT, Nelson-Williams C, Mansuri MS, Lu Q, Duran D, Panchagnula S, Allocco A, Karimy JK, et al. De Novo Mutation in Genes Regulating Neural Stem Cell Fate in Human Congenital Hydrocephalus. *Neuron*. 2018 Jul 25;99(2):302-314.e4.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*. 2006 Jan 18;26(3):1045-56.
- Ge, W., He, F., Kim, K. J., Bianchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J. I., Martinowich, K. et al. Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1319-24.
- Gilmore EC, Herrup K. Cortical development: receiving Reelin. *Curr Biol*. 2000 Feb 24;10(4):R162-6.
- Givogri MI, de Planell M, Galbiati F, Superchi D, Gritti A, Vescovi A, de Vellis J, Bongarzone ER. Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. *Dev Neurosci*. 2006;28(1-2):81-91.
- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M. H. and Nave, K. A. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEXCre mice. *Genesis*. 2006 Dec;44(12):611-21.
- Goffinet AM. The embryonic development of the cerebellum in normal and reeler mutant mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1983;168(1):73-86.
- Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM. Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 2007 Feb 21;27(8):1803-11.
- Guerra MM, González C, Caprile T, Jara M, Vío K, Muñoz RI, Rodríguez S, Rodríguez EM. Understanding How the Subcommissural Organ and Other Periventricular Secretory Structures Contribute via the Cerebrospinal Fluid to Neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2015 Dec 23;9:480.

- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. Decrease in Reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Nov;57(11):1061-9. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry* 2002 Jan;59(1):12. DiGiorgi.
- Guldbrandsen A, Vethe H, Farag Y, Oveland E, Garberg H, Berle M, Myhr KM, Opsahl JA, Barsnes H, Berven FS. In-depth characterization of the cerebrospinal fluid (CSF) proteome displayed through the CSF proteome resource (CSF-PR). *Mol Cell Proteomics*. 2014 Nov;13(11):3152-63.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2002 Oct;5(10):939-45.
- Hack, I., Hellwig, S., Junghans, D., Brunne, B., Bock, H. H., Zhao, S. and Frotscher, M. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*. 2007 Nov;134(21):3883-91.
- Hartfuss, E., Förster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., Leprince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M. and Götz, M. Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development*. 2003 Oct;130(19):4597-609.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol*. 2001 Jan 1;229(1):15-30.
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M. R., Bartley, C. M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N. and Rakic, P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60, 273-284.
- Heimer L and Robards MJ. *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods*. Plenum Press. 1981.
- Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 2006 Apr 26;26(17):4701-13.
- Hellwig S, Hack I, Zucker B, Brunne B, Junghans D. Reelin together with ApoER2 regulates interneuron migration in the olfactory bulb. *PLoS One*. 2012;7(11):e50646.
- Herken R, Götz W, Wattjes KH. Initial development of capillaries in the neuroepithelium of the mouse. *J Anat*. 1989 Jun;164:85-92.
- Herz J1, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem*. 1991 Nov 5;266(31):21232-8.
- Hibi, T., Mizutani, M., Baba, A. and Hattori, M. Splicing variations in the ligand-binding domain of ApoER2 results in functional differences in the binding properties to Reelin. *Neurosci Res*. 2009 Apr;63(4):251-8.
- Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS*. 2014 Dec 2;11(1):26.
- Hoe, H. S., Wessner, D., Beffert, U., Becker, A. G., Matsuoka, Y. and Rebeck, G.W. F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9259-68.

- Honda T, Nakajima K. Proper Level of Cytosolic Disabled-1, Which Is Regulated by Dual Nuclear Translocation Pathways, Is Important for Cortical Neuronal Migration. *Cereb Cortex*. 2016 Jul;26(7):3219-36.
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):93-6. Erratum in: *Nat Genet* 2001 Feb;27(2):225.
- Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B. The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol*. 1993 Jun;121(6):1409-21.
- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):733-7.
- Howell BW, Herrick TM, Cooper JA. Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev*. 1999 Mar 15;13(6):643-8. Erratum in: *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1642.
- Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA. Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr Biol*. 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):877-85.
- Hunter-Schaedle KE. Radial glial cell development and transformation are disturbed in reeler forebrain. *J Neurobiol*. 1997 Oct;33(4):459-72.
- Huttner HB, Janich P, Köhrmann M, Jászai J, Siebzehnrubl F, Blümcke I, Suttorp M, Gahr M, Kuhnt D, Nimsky C, Krex D, Schackert G, Löwenbrück K, Reichmann H, Jüttler E, Hacke W, Schellinger PD, Schwab S, Wilsch-Bräuninger M, Marzesco AM, Corbeil D. The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease. *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3):698-705.
- Ignatova N, Sindic CJ, Goffinet AM. Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol Dis*. 2004 Mar;15(2):326-30.
- Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):674-86.
- Ikeda Y, Terashima T. Expression of Reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn*. 1997 Oct;210(2):157-72.
- Illiff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, Deane R, Nedergaard M. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013 Nov 13;33(46):18190-9.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*. 2010 Mar 3;30(9):3489-98.

- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E. A decrease of Reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15718-23.
- Ina, A., Sugiyama, M., Konno, J., Yoshida, S., Ohmomo, H., Nogami, H., Shutoh, F. and Hisano, S. Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex. *Eur J Neurosci*. 2007 Aug;26(3):615-23.
- Irvin DK, Nakano I, Paucar A, Kornblum HI. Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 and Delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitors and differentiated cells. *J Neurosci Res*. 2004 Feb 1;75(3):330-43.
- Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2014 Mar 19;2:e28426.
- Johansson PA. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Front Neurosci*. 2014 Oct 24;8:340.
- Johansson PA, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, Götz M. The transcription factor *Otx2* regulates choroid plexus development and function. *Development*. 2013 Mar;140(5):1055-66.
- Jossin, Y. and Cooper, J. A. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci*. 2011 Jun;14(6):697-703.
- Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):514-21.
- Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H. R., Kurimoto, K., Saitou, M. and Matsuzaki, F. Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development*. 2008 Sep;135(18):3113-24.
- Kazanis I, Lathia J, Moss L, French-Constant C. The neural stem cell microenvironment. 2008 Aug 31. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-.
- Keilani, S. and Sugaya, K. Reelin induces a radial glial phenotype in human neural progenitor cells by activation of Notch-1. *BMC Dev Biol*. 2008 Jul 1;8:69.
- Keshvara L, Benhayon D, Magdaleno S, Curran T. Identification of Reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled 1. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16008-14.
- Khialeeva E, Carpenter EM. Nonneuronal roles for the Reelin signaling pathway. *Dev Dyn*. 2017 Apr;246(4):217-226.
- Kreiner T, Moore HP. Membrane traffic between secretory compartments is differentially affected during mitosis. *Cell Regul*. 1990 Apr;1(5):415-24.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149-84.

- Kriegstein AR, Noctor SC. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 2004 Jul;27(7):392-9.
- Kriegstein, A., Noctor, S. and Martínez-Cerdeño, V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Nov;7(11):883-90.
- Kubo, K., Honda, T., Tomita, K., Sekine, K., Ishii, K., Uto, A., Kobayashi, K., Tabata, H. and Nakajima, K. Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent “inside-out” alignment in the developing neocortex. *J Neurosci.* 2010 Aug 18;30(33):10953-66.
- Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O’Brien, P. Cooper, J. A. Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J Neurosci.* 2005 Sep 14;25(37):8578-86.
- Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, Sestan N, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Jan LY, Jan YN. Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell.* 2006 Dec 15;127(6):1253-64.
- Lakomá, J., Garcia-Alonso, L. and Luque, J. M. Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. *Development.* 2011 Dec;138(23):5223-34.
- Larios JA, Jausoro I, Benitez ML, Bronfman FC, Marzolo MP. Neurotrophins regulate ApoER2 proteolysis through activation of the Trk signaling pathway. *BMC Neurosci.* 2014 Sep 19;15:108.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 1999 Sep 15;19(18):7881-8.
- Leeb C, Eresheim C, Nimpf J. Clusterin is a ligand for apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and very low density lipoprotein receptor (VLDLR) and signals via the Reelin-signaling pathway. *J Biol Chem.* 2014 Feb 14;289(7):4161-72.
- Leemhuis J, Bouché E, Frotscher M, Henle F, Hein L, Herz J, Meyer DK, Pichler M, Roth G, Schwan C, Bock HH. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation. *J Neurosci.* 2010 Nov 3;30(44):14759-72.
- Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:653-79.
- Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D’Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):893-905.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007 Jan 11;445(7124):168-76.
- Li Y, Hibbs MA, Gard AL, Shylo NA, Yun K. Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells.* 2012 Apr;30(4):741-52.

- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):179-93.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994 May 20;264(5162):1145-8.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 1996 Feb 16;271(5251):978-81.
- Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Aug;16(8):445-57.
- Luque, J. M. Puzzling out the reeler brainteaser: does Reelin signal to unique neural lineages? *Brain Res*. 2007 Apr 6;1140:41-50.
- Luque, J. M., Morante-Oria, J. and Fairén, A. Localization of ApoER2, VLDLR and Dab1 in radial glia: groundwork for a new model of Reelin action during cortical development. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003 Feb 16;140(2):195-203.
- Lutz D, Sharaf A, Drexler D, Kataria H, Wolters-Eisfeld G, Brunne B, Kleene R, Loers G, Frotscher M, Schachner M. Proteolytic cleavage of transmembrane cell adhesion molecule L1 by extracellular matrix molecule Reelin is important for mouse brain development. *Sci Rep*. 2017 Nov 10;7(1):15268.
- Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming GL, Gage FH, Song H. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2010 Nov;13(11):1338-44.
- Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ. Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci*. 1997 May 15;17(10):3644-52.
- Macron C, Lane L, Núñez Galindo A, Dayon L. Identification of Missing Proteins in Normal Human Cerebrospinal Fluid. *J Proteome Res*. 2018 Aug 17.
- Magdaleno, S., Keshvara, L. and Curran, T. Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron*. 2002 Feb 14;33(4):573-86.
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*. 2000 Dec;127(24):5253-63.
- Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, Huttner WB. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 2005 Jul 1;118(Pt 13):2849-58.
- Massalini S, Pellegatta S, Pisati F, Finocchiaro G, Farace MG, Ciafrè SA. Reelin affects chain-migration and differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2009 Dec;42(4):341-9.
- Matsunaga Y, Noda M, Murakawa H, Hayashi K, Nagasaka A, Inoue S, Miyata T, Miura T, Kubo KI, Nakajima K. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21;114(8):2048-2053.
- May, P., Herz, J. and Bock, H. H. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Oct;62(19-20):2325-38.

- Mayer, H., Duit, S., Hauser, C., Schneider, W. J. and Nimpf, J. Reconstitution of the Reelin signaling pathway in fibroblasts demonstrates that Dab1 phosphorylation is independent of receptor localization in lipid rafts. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(1):19-27.
- Meinil A. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):463-8.
- Menezes JR, Smith CM, Nelson KC, Luskin MB. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci.* 1995 Dec;6(6):496-508.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science.* 2007 Jul 20;317(5836):381-4.
- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 14;101(50):17528-32.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-50.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 2011 May 26;70(4):687-702.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):265-78.
- Miyata T, Nakajima K, Aruga J, Takahashi S, Ikenaka K, Mikoshiba K, Ogawa M. Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogeneic antibody CR-50 on normal and reeler mice. *J Comp Neurol.* 1996 Aug 19;372(2):215-28.
- Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K, Ogawa M. Regulation of Purkinje cell alignment by Reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci.* 1997 May 15;17(10):3599-609.
- Miyata T, Ono Y, Okamoto M, Masaoka M, Sakakibara A, Kawaguchi A, Hashimoto M, Ogawa M. Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Dev.* 2010 Sep 1;5:23.
- Morest DK, Silver J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia.* 2003 Jul;43(1):6-18.
- Morimura, T. and Ogawa, M. Relative importance of the tyrosine phosphorylation sites of Disabled-1 to the transmission of Reelin signaling. *Brain Res.* 2009 Dec 22;1304:26-37.
- Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Aug;20(4):416-23.
- Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000. 26:99-109.
- Nakano Y, Kohno T, Hibi T, Kohno S, Baba A, Mikoshiba K, Nakajima K, Hattori M. The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20544-52.

- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J. M. and Guillemot, F. p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 2006 Jun 1;20(11):1511-24.
- Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M. and Walsh, C. A. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 2004 Nov 8;479(2):168-80.
- Ninkovic J, Götz M. Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol.* 2007 Jun;17(3):338-44.
- Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron.* 2004 Jan 8;41(1):71-84.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 2001 Feb 8;409(6821):714-20.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagy K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron.* 1995 May;14(5):899-912.
- Ohata S, Alvarez-Buylla A. Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends Neurosci.* 2016 Aug;39(8):543-551.
- Ohkubo N, Vitek MP, Morishima A, Suzuki Y, Miki T, Maeda N, Mitsuda N. Reelin signals survival through Src-family kinases that inactivate BAD activity. *J Neurochem.* 2007 Oct;103(2):820-30.
- Ohshima T, Ogawa M, Veeranna, Hirasawa M, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Kulkarni AB, Mikoshiba K. Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27;98(5):2764-9.
- Park TJ, Curran T. Neurobiology: Reelin mediates form and function. *Curr Biol.* 2014 Nov 17;24(22):R1089-92.
- Pawlisz, A. S., Mutch, C., Wynshaw-Boris, A., Chenn, A., Walsh, C. A. and Feng, Y. Lis1-Nde1-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination. *Hum. Mol. Genet.* 2008. 17, 2441-2455.
- Paxinos G. and Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact Edition, 2001. Elsevier Academic Press.
- Pearlman AL, Sheppard AM. Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res.* 1996;108:117-34.
- Perez-Costas E, Fenton EY, Caruncho HJ. Reelin expression in brain endothelial cells: an electron microscopy study. *BMC Neurosci.* 2015 Mar 24;16:16.
- Pérez-Martínez FJ, Luque-Río A, Sakakibara A, Hattori M, Miyata T, Luque JM. Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biol Open.* 2012 Dec 15;1(12):1258-63.

- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3221-6.
- Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete Reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):3217-22.
- Petridis AK, El-Maarouf A, Rutishauser U. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Dev Dyn*. 2004 Aug;230(4):675-84.
- Piccin D, Yu F, Morshead CM. Notch signaling imparts and preserves neural stem characteristics in the adult brain. *Stem Cells Dev*. 2013 May 15;22(10):1541-50.
- Pinto L, Götz M. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol*. 2007 Sep;83(1):2-23.
- Pohlkamp T, Xiao L, Sultana R, Bepari A, Bock HH, Henkemeyer M, Herz J. Ephrin Bs and canonical Reelin signalling. *Nature*. 2016 Nov 24;539(7630):E4-E6.
- Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 12;110(11):E1045-54.
- Pramatarova A, Chen K, Howell BW. A genetic interaction between the APP and Dab1 genes influences brain development. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Jan;37(1):178-86.
- Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM, Soriano E. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci*. 2010 Mar 31;30(13):4636-49.
- Ranaivoson FM, von Daake S, Comoletti D. Structural Insights into Reelin Function: Present and Future. *Front Cell Neurosci*. 2016 May 27;10:137.
- Rice, D. S. and Curran, T. Role of the Reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1005-39.
- Rice DS, Nusinowitz S, Azimi AM, Martínez A, Soriano E, Curran T. The Reelin pathway modulates the structure and function of retinal synaptic circuitry. *Neuron*. 2001 Sep 27;31(6):929-41.
- Rice DS, Sheldon, M., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Goldowitz, D. and Curran, T. Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development*. 1998 Sep;125(18):3719-29.
- Rodriguez MA, Caruncho HJ, Costa E, Pesold C, Liu WS, Guidotti A. In Patas monkey, glutamic acid decarboxylase-67 and Reelin mRNA coexpression varies in a manner dependent on layers and cortical areas. *J Comp Neurol*. 2002 Sep 23;451(3):279-88.
- Rodriguez MA, Pesold C, Liu WS, Kriho V, Guidotti A, Pappas GD, Costa E. Colocalization of integrin receptors and Reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3550-5.
- Roegiers F, Jan YN. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Apr;16(2):195-205.

- Sáez-Valero J, Costell M, Sjögren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM. Altered levels of cerebrospinal fluid Reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2003 Apr 1;72(1):132-6.
- Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 2004 Apr;7(4):347-56.
- Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5166-70.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 2006 Feb 3;311(5761):629-32.
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM. Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur J Neurosci.* 1997 May;9(5):1055-71.
- Segarra M, Aburto MR, Cop F, Llaó-Cid C, Härtl R, Damm M, Bethani I, Parrilla M, Husainie D, Schänzer A, Schlierbach H, Acker T, Mohr L, Torres-Masjoan L, Ritter M, Acker-Palmer A. Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science.* 2018 Aug 24;361(6404).
- Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K. and Acker-Palmer, A. Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature.* 2011 Apr 21;472(7343):356-60.
- Senzaki K, Ogawa M, Yagi T. Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell.* 1999 Dec 10;99(6):635-47.
- Sheldon, M., Rice, D. S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B. W., Cooper, J. A., Goldowitz, D. and Curran, T. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):730-3.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004 May 28;304(5675):1338-40.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):289-300.
- Sheppard AM, Pearlman AL. Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol.* 1997 Feb 10;378(2):173-9.
- Silva-Vargas V, Maldonado-Soto AR, Mizrak D, Codega P, Doetsch F. Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2016 Nov 3;19(5):643-652.
- Simó S, Pujadas L, Segura MF, La Torre A, Del Río JA, Ureña JM, Comella JX, Soriano E. Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb Cortex.* 2007 Feb;17(2):294-303.



- Siyahhan B, Knobloch V, de Zélicourt D, Asgari M, Schmid Daners M, Poulidakos D, Kurtcuoglu V. Flow induced by ependymal cilia dominates near-wall cerebrospinal fluid dynamics in the lateral ventricles. *J R Soc Interface*. 2014 Mar 12;11(94):20131189. Print 2014 May 6.
- Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V, Pappas GD. Expression of Reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):1281-6.
- Soriano E, Del Río JA. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron*. 2005 May 5;46(3):389-94.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):10-8.
- Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*. 1981 Aug 25;150(4):467-86.
- Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, Herz J, Weeber EJ, Sweatt JD, Pramatarova A, Howell B, Schneider WJ, Nimpf J. Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(3):1378-86.
- Suetsugu S, Tezuka T, Morimura T, Hattori M, Mikoshiba K, Yamamoto T, Takenawa T. Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. *Biochem J*. 2004 Nov 15;384(Pt 1):1-8.
- Sun J, Sun J, Ming GL, Song H. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Eur J Neurosci*. 2011 Mar;33(6):1087-93.
- Tabata, H. and Nakajima, K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience*. 2001;103(4):865-72.
- Taguchi M, Chida K. Computer reconstruction of the three-dimensional structure of mouse cerebral ventricles. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 Aug;12(1):10-5.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):279-88.
- Teixeira CM, Kron MM, Masachs N, Zhang H, Lagace DC, Martinez A, Reillo I, Duan X, Bosch C, Pujadas L, Brunso L, Song H, Eisch AJ, Borrell V, Howell BW, Parent JM, Soriano E. Cell-autonomous inactivation of the Reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *J Neurosci*. 2012 Aug 29;32(35):12051-65.
- Teixeira CM, Masachs N, Muhaisen A, Bosch C, Pérez-Martínez J, Howell B, Soriano E. Transient downregulation of Dab1 protein levels during development leads to behavioral and structural deficits: relevance for psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2014 Feb;39(3):556-68.
- Tissir, F. and Goffinet, A. M. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Jun;4(6):496-505.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. and Herz, J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):689-701.

- Tseng WL, Huang CL, Chong KY, Liao CH, Stern A, Cheng JC, Tseng CP. Reelin is a platelet protein and functions as a positive regulator of platelet spreading on fibrinogen. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Feb;67(4):641-53.
- Uchida T, Baba A, Pérez-Martínez FJ, Hibi T, Miyata T, Luque JM, Nakajima K, Hattori M. Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages. *J Neurosci.* 2009 Aug 26;29(34):10653-62.
- Underhill GH, George D, Bremer EG, Kansas GS. Gene expression profiling reveals a highly specialized genetic program of plasma cells. *Blood.* 2003 May 15;101(10):4013-21.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gómez C, Alonso JR. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev Neurobiol.* 2007 Jun;67(7):839-59.
- Wang S, Brunne B, Zhao S, Chai X, Li J, Lau J, Failla AV, Zobiak B, Sibbe M, Westbrook GL, Lutz D, Frotscher M. Trajectory Analysis Unveils Reelin's Role in the Directed Migration of Granule Cells in the Dentate Gyrus. *J Neurosci.* 2018 Jan 3;38(1):137-148.
- Ware ML, Fox JW, González JL, Davis NM, Lambert de Rouvroit C, Russo CJ, Chua SC Jr, Goffinet AM, Walsh CA. Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron.* 1997 Aug;19(2):239-49.
- Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39944-52.
- Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42971-7.
- Whish S, Dziegielewska KM, Møllgård K, Noor NM, Liddel SA, Habgood MD, Richardson SJ, Saunders NR. The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Front Neurosci.* 2015 Feb 12;9:16.
- White-Adams, T. C., Berny, M. A., Tucker, E. I., Gertz, J. M., Gailani, D., Urbanus, R. T., de Groot, P. G., Gruber, A. and McCarty, O. J. Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Oct;29(10):1602-7.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci.* 1999 May;2(5):461-6.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development.* 2001 Oct;128(19):3759-71.
- Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Exp Neurol.* 2006 Mar;198(1):250-9.
- Worthington WC Jr, Cathcart RS 3rd. Ciliary currents on ependymal surfaces. *Ann N Y Acad Sci.* 1966 Sep 30;130(3):944-50. No abstract available.

- Yabut O, Renfro A, Niu S, Swann JW, Marín O, D'Arcangelo G. Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res.* 2007 Apr 6;1140:75-83.
- Yang, X. V., Banerjee, Y., Fernández, J. A., Deguchi, H., Xu, X., Mosnier, L. O., Urbanus, R. T., de Groot, P. G., White-Adams, T. C., McCarty, O. J., Griffin, J.H. Activated protein C ligation of ApoER2 (LRP8) causes Dab1-dependent signaling in U937 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan 6;106(1):274-9.
- Yap CC, Winckler B. Adapting for endocytosis: roles for endocytic sorting adaptors in directing neural development. *Front Cell Neurosci.* 2015 Apr 8;9:119.
- Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J Proteome Res.* 2007 Sep;6(9):3537-48.
- Zhang G, Assadi AH, McNeil RS, Beffert U, Wynshaw-Boris A, Herz J, Clark GD, D'Arcangelo G. The Pafah1b complex interacts with the Reelin receptor VLDLR. *PLoS One.* 2007 Feb 28;2(2):e252.
- Zhao S, Chai X, Frotscher M. Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for Reelin. *Dev Neurosci.* 2007;29(1-2):84-90.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):645-60.

ADENDAS

Adenda 1

Vía de señalización de Reelina

La unión de homodímeros de Reelina a los receptores ApoER2 (receptor 2 de la apolipoproteína de la membrana plasmática) y VLDLR (receptor de lipoproteína de muy baja densidad) provoca que los mismos se agrupen, hecho que induce la fosforilación del adaptador intracelular Dab1 (Disabled 1), iniciándose una cascada de señalización a través de tirosina quinasas y un recambio finamente regulado de Dab1 (Rice y Curran, 2001; Tissir y Goffinet, 2003; Cooper, 2008). La fosforilación de Dab1 en respuesta a la unión de Reelina a sus receptores, es mediada por miembros no receptores de la familia Src. Tras la unión de Reelina, los receptores se asocian (Strasser et al., 2004) causando la activación de Fyn y Src (Arnaud et al., 2003b; Bock y Herz, 2003), el cual a su vez fosforila Dab1 sobre residuos específicos de tirosina (Ballif et al., 2004; Howell et al., 1999; Keshvara et al., 2001). Este suceso resulta en la ubiquitinación de Dab1, y su degradación por vía proteasoma (Arnaud et al., 2003a; Suetsugu et al., 2004). Dab1 fosforilado (activo) puede interactuar con Lis1 (Assadi et al., 2003), PI3K y otros grupos de proteínas con el objetivo común del control de la dinámica del citoesqueleto, con lo que ello implica (transporte de vesículas, migración celular). No es de extrañar esta relación entre Reelina y Lis1 puesto que la deficiencia de Reelina es la causa de las malformaciones neuro-anatómicas en los ratones reeler (D'Arcangelo et al., 1995; Hong et al., 2000) y en la lisencefalia del tipo Norman Robers en el hombre (Hong et al., 2000).

Adenda 2

Nichos neurogénicos

Al nacer, las paredes de los ventrículos laterales todavía mantienen similitudes con la zona ventricular presente en el neuroepitelio inmaduro. Están compuestos principalmente de glía radial, progenitores con cuerpos celulares cercanos a los ventrículos y un largo proceso radial que contacta la superficie pial del cerebro (Hartfuss et al., 2001; Merkle et al., 2004). La glía radial, que funciona como células madre neurales (NSCs) en el cerebro embrionario, generan una gran diversidad de neuronas y células gliales en un corto periodo de tiempo (días en el ratón, semanas en el humano) para ensamblar el sistema nervioso central. Un selecto grupo de glía radial se transforma entonces en subpoblaciones únicas de astrocitos (células tipo B1, fase S de 4 horas, Ponti et al., 2013) que continúan funcionando como los progenitores neurales primarios durante la vida juvenil y adulta de la zona endodimensional/subendodimensional [EZ/SVZ] (Merkle et al., 2004, 2007; Spassky et al., 2005). Sus cuerpos celulares se encuentran generalmente inmediatamente por debajo de la zona endodimensional pero tienen unos cortos procesos que se extienden a través del epéndimo con pequeñas terminaciones apicales (cilio) que contacta con la luz del ventrículo y por tanto con el líquido cefalorraquídeo (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). Así, este nicho germinal periventricular, referido como EZ/SEZ, también incluye un compartimento que directamente contacta con el ventrículo, lo cual recuerda a la zona ventricular (VZ) del embrión.

Estos astrocitos, mediante divisiones simétricas y asimétricas, dan lugar a nuevos astrocitos y a los llamados amplificadores transitorios (célula tipo C, fase S de 14 a 17 horas) (Malatesta et al., 2000, Noctor et al., 2001). A su vez, las células tipo C, mediante su última mitosis, dan lugar a los neuroblastos migratorios (células tipo A, fase S de 9 horas), futuras neuronas, aún inmaduras (Álvarez-Buylla y Lim, 2004, Ponti et al., 2013). A lo largo de la vida adulta, estas células tipo A nacidas en la SVZ, recorren largas distancias tangencialmente formando cadenas hacia el bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral [RMS, rostral migratory stream, en inglés] (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003), una red de rutas interconectadas distribuidas a lo largo de la pared del ventrículo lateral. Estas cadenas están envueltas por los procesos de los astrocitos subventriculares. En el núcleo del bulbo olfatorio, los más de 30.000 neuroblastos diáricos que viajan por la RMS se dispersan radialmente, diferenciando a interneuronas que se integran en las capas granular y periglomerular (revisado por Lledó et al., 2006).

De todos modos existen evidencias a favor de que el origen de la célula madre en este caso pudiera ser también el endodimocito (Carlén et al., 2009). El otro nicho neurogénico adulto está localizado en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo SGZ (Ming y Song, 2005; Zhao et al., 2008; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009), no siendo objeto de estudio de esta tesis.

Adenda 3

Vínculos neurogénesis - migración neuronal

La migración celular y la neurogénesis son procesos conectados muy estrechamente de forma temporal, aunque se ha visto mediante el uso de diversas mutaciones que son procesos separados. ¿Dónde se encuentra el vínculo entre ambos? Las funciones DUALES de los factores bHLH acoplan la migración con la neurogénesis, capacitando para migrar a las nuevas neuronas. En el estudio recogido en Ge et al. 2006, se propone que los factores de transcripción proneurales bHLH (*basic hélix-loop-helix*) no sólo inician la diferenciación neuronal sino que además potencian la migración celular. Mecánicamente, los factores bHLH regulan la expresión de genes críticamente involucrados en migración, incluyendo la bajo-regulación de RhoA small GTPasa y la sobre-regulación de doblecortina y p35, los cuales, a su vez, modulan la actina y el ensamblaje del citoesqueleto de microtúbulos, capacitando a las nuevas neuronas para migrar. Durante la corticogénesis de los mamíferos, uno de los primeros eventos que tienen lugar es la expresión de genes proneurales a través de factores bHLH como Ngn1 y Ngn2, que inician una cascada de activación de genes bHLH que a su vez lleva a la expresión de genes de diferenciación neuronal terminal (Bertrand et al, 2002; Ma et al., 1997). La mayoría de las neuronas no funcionan en sus lugares de nacimiento y las nuevas neuronas generadas llevan a cabo a menudo migraciones radiales y/o tangenciales bastante grandes.

Por otro lado, la neurogénesis y la migración neuronal parecen ser de algún modo dos procesos distintos, porque existen mutaciones específicas tanto en genes de ratón y de humano que afectan sólo uno de estos dos eventos, como es el caso de la heterotopia periventricular humana, donde se encuentra mutado el gen filamin1 (Fox et al., 1998; Fox et al., 1999). Los genes bHLH podrían servir como vínculo entre los dos procesos porque no sólo activan la maquinaria neurogénica sino también genes involucrados en migración. Además, los genes bHLH regulan las maquinarias de neurogénesis y migración mediante mecanismos parcialmente distintos ya que se ha visto que, mutaciones en genes bHLH, afectan específicamente sólo a la migración o sólo a la maquinaria neurogénica.

ANEXOS

Artículo 1

Downregulation of Functional Reelin Receptors in Projection Neurons Implies That Primary Reelin Action Occurs at Early/Premigratory Stages

Takayuki Uchida,¹ Atsushi Baba,¹ F. Javier Pérez-Martínez,² Terumasa Hibi,¹ Takaki Miyata,³ Juan M. Luque,² Kazunori Nakajima,⁴ and Mitsuharu Hattori¹

¹Department of Biomedical Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan,

²Laboratory of Molecular Neuroanatomy, Instituto de Neurociencias, University Miguel Hernandez-Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

San Juan de Alicante, E-03550, Spain, ³Department of Anatomy and Cell Biology, Nagoya University School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Aichi

466-8550, Japan, and ⁴Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Reelin signaling is essential for correct development of the mammalian brain. Reelin binds to apolipoprotein E receptor 2 and very low-density lipoprotein receptor and induces phosphorylation of Dab1. However, when and where these reactions occur is essentially unknown, and the primary function(s) of Reelin remain unclear.

Here, we used alkaline phosphatase fusion of the receptor-binding region of Reelin to quantitatively investigate the localization of functional Reelin receptors (i.e., those on the plasma membrane as mature forms) in the developing brain. In the wild-type cerebral cortex, they are mainly present in the intermediate and subventricular zones, as well as in radial fibers, but much less in the cell bodies of the cortical plate. Functional Reelin receptors are much more abundant in the Reelin-deficient cortical plate, indicating that Reelin induces their downregulation and that it begins before the neurons migrate out of the intermediate zone. In the wild-type cerebellum, functional Reelin receptors are mainly present in the cerebellar ventricular zone but scarcely expressed by Purkinje cells that have migrated out of it. It is thus strongly suggested that Reelin exerts critical actions on migrating projection neurons at their early/premigratory stages en route to their final destinations, in the developing cerebral cortex and cerebellum.

Introduction

Reelin is a secreted glycoprotein essential for brain development (D'Arcangelo et al., 1995). When Reelin is deficient, migration of many projection neurons such as pyramidal neurons in cerebral cortex and Purkinje cells in cerebellum become aberrant, and they eventually reside in abnormal positions (for review, see Tissir and Goffinet, 2003). Reelin is highly expressed near where those neurons target and/or stop: the marginal zone (MZ) in the developing cerebral cortex (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995), and the nuclear transitory zone (NTZ) and the external granular layer (EGL) in the developing cerebellum (Miyata et al., 1996). Proposed functions of Reelin include stop, detach, permissive, attractive, and branch-inducing signals, but none of these alone can explain all the phenotypes observed in the Reelin-deficient mouse, *reeler* (Tissir and Goffinet, 2003; Soriano and

Del Río, 2005; Luque, 2007; Cooper, 2008). Reelin binds to apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and very-low-density lipoprotein receptor (VLDLR) (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999) and then induces tyrosyl phosphorylation of an intracellular protein, Dab1 (Howell et al., 1999). Dab1 is then ubiquitinated and degraded, which is necessary for correct layer formation in the forebrain (Feng et al., 2007). Importantly, when and where these reactions occur has not been fully elucidated because the precise localization of “functional Reelin receptors” (FRRs) (the receptors on the plasma membrane as fully mature form) is not known, because ApoER2 and VLDLR undergo regulated and complicated intracellular trafficking (D'Arcangelo et al., 1999; Morimura et al., 2005; Hoe et al., 2008) (for review, see Stolt and Bock, 2006).

Generally, it is not easy to ascertain the localization and total amount of functional receptors to a certain ligand. RNA *in situ* hybridization can be highly specific and sensitive, but it provides no information on the subcellular localization of the protein and may not even reflect the amount of mature protein. Immunohistochemical analysis is often complicated by the cross-reactivity of the antibody with other proteins and degraded products. Most importantly, when there is more than one receptor molecule performing similar functions, these techniques do not allow ascertainment of their “total” amounts because the intensity of the signals derived from different probes or antibodies cannot be quantitatively compared or accumulated. In the case of Reelin

Received Jan. 22, 2009; revised July 1, 2009; accepted July 21, 2009.

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture (M.H., A.B.), Ono Medical Research Foundation, and Kanagawa Foundation for the Promotion of Medical Science (M.H.). T.H. is a Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science. J.M.L. is a Ramón y Cajal Research Fellow funded by Grant SAF2004-07685 and Fundación Mutua Madrileña. We thank the members of our laboratories for helpful comments and discussions.

Correspondence should be addressed to Mitsuharu Hattori, Department of Biomedical Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan. E-mail: mhattori@phar.nagoya-cu.ac.jp.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0345-09.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/2910653-10\$15.00/0

Artículo 2

Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells

F. Javier Pérez-Martínez¹, Álvaro Luque-Río², Akira Sakakibara³, Mitsuharu Hattori⁴, Takaki Miyata³ and Juan M. Luque^{1,*‡}

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de San Juan, E-03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain

²Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Campus de San Vicente del Raspeig, E-03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain

³Department of Anatomy and Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan

⁴Department of Biomedical Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan

*Present address: San Vicente 106, E-03560 El Campello, Alicante, Spain

‡Author for correspondence (luque.coeruleus@gmail.com)

Biology Open 1, 1258–1263

doi: 10.1242/bio.20122816

Received 11th August 2012

Accepted 17th September 2012

Summary

Reelin and its receptor machinery are well known to be required for the migration and positioning of neocortical projection neurons. More recently, reelin has been shown both necessary and sufficient to determine the rate of neocortical neurogenesis. The molecular links underlying its seemingly distinct proliferative and post-proliferative functions remain unknown. Here we reveal an enriched expression of functional reelin receptors, largely of Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2), in radial glia basal processes and intermediate progenitor cells during mid/late cortical development. *In vivo*, ApoER2 overexpression inhibits neuronal migration. In contrast, precluding excessive levels of ApoER2 in reelin-deficient cortices, by either ApoER2 knock-down or the transgenic expression of reelin in neural progenitor cells,

improves neuronal migration and positioning. Our study provides groundwork for the highly orchestrated clearance of neocortical neurons from their birth site, suggesting that a reelin-dependent ApoER2 downregulation mechanism uncouples newborn neurons from progenitor cells, thereby enabling neurons to migrate.

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

Key words: Reelin, ApoER2, Dab1, Neurogenesis, Neuronal migration, Mouse

Introduction

Excitatory long distance projecting neurons originate from neural progenitor cells (NPCs) locally arranged in the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) zones of the dorsal pallium. Newborn postmitotic neurons migrate out from their birth sites in the basal direction to form the cortical plate (CP), the cerebral cortex anlage, where they end forming highly organized connections within the cortex or with subcortical targets. The mechanisms regulating NPCs proliferation also regulate total numbers of neurons produced at specific developmental periods and destined to a specific neocortical layer (Caviness et al., 2009). The mechanisms underlying the tight spatiotemporal link between neurogenesis and neuronal migration remain, however, less well understood (Ge et al., 2006; Nguyen et al., 2006; Pawlisz et al., 2008).

The gene mutated in *reeler* mouse encodes reelin, a glycoprotein whose function is required for laminar positioning of cortical neurons. Reelin, synthesized and secreted by Cajal-Retzius cells in the marginal zone, is thought to deliver a signal to young migrating projection neurons instructing them to reach their right position. It is well established that reelin binding to Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2) or Very Low Density

Lipoprotein Receptor (Vldlr) induces phosphorylation of the cytoplasmic adaptor protein Disabled 1 (Dab1), a tyrosine kinase signal transduction cascade, and Dab1-regulated turnover. Indeed, the *reeler* mice and the mutant null mice for Dab1 or for both ApoER2 and Vldlr show similar positioning defects (Cooper, 2008; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). However, despite numerous proposals (quite often incompatible), a coherent model of reelin action to position neurons does not yet exist (Luque, 2007). Reelin signaling decoding is often assumed to occur exclusively in neurons but it is even unclear whether neuronal migration *per se* is influenced by reelin (Mayer et al., 2006). Cells in the VZ, where primary NPCs reside, are indeed competent to respond to exogenous reelin by phosphorylating Dab1 and the reelin pathway is normally activated in these cells at the preplate stage of development. Likewise, ectopic expression of reelin in the VZ of *reeler* mice promoted migration of a subset of neurons past the subplate so rescuing preplate splitting during CP formation. Nevertheless, reelin in the VZ was found not enough to establish correct cortical lamination (Magdaleno et al., 2002). Moreover, reelin receptors are much more abundant in the *reeler* CP, suggesting that reelin induces their downregulation and that

Artículo 3 (borrador)

Continual reelin signaling by the prime neurogenic niche of the adult brain

F. Javier Pérez-Martínez^{1,5}, Álvaro Luque-Río², Brian Howell³, Mitsuharu Hattori⁴, Manuel Cifuentes⁵ & Juan M. Luque^{1,6,7}

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de San Juan, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain.

²Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Campus de San Vicente del Raspeig, 03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain.

³Department of Neuroscience and Physiology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York 13210, USA.

⁴Department of Biomedical Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya Aichi 467-8603, Japan.

⁵Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain.

⁶Current address: San Pedro 140, 03560 El Campello, Alicante, Spain.

⁷**Correspondence to:** Juan M. Luque (luque.coeruleus@gmail.com)

Running title: Reelin signaling in the EZ/SEZ

Keywords: Reelin, ApoER2, Dab1, adult neurogenesis, ependymal/ subependymal zone, rostral migratory stream

Summary

During development reelin sets the pace of neocortical neurogenesis enabling in turn newborn neurons to migrate, but whether and, if so, how reelin signaling affects the adult neurogenic niches remains uncertain. We show that reelin signaling, resulting in Dab1 phosphorylation, occurs in the ependymal-subependymal zone (EZ/SEZ) of the lateral ventricles where, along with its associated rostral migratory stream (RMS), the highest density of functional ApoER2 accumulates. Mice deficient for reelin, ApoER2 or Dab1 exhibit enlarged ventricles and dysplastic RMS. Moreover, while the conditional ablation of Dab1 in neural progenitor cells (NPCs) enlarges the ventricles and impairs neuroblasts clearance from the SEZ, the transgenic misexpression of reelin in NPCs of reelin-deficient mice normalizes the ventricular lumen and the density of ependymal cilia, ameliorating in turn neuroblasts migration; consistently, intraventricular infusion of reelin reroutes neuroblasts. These results demonstrate that reelin signaling persists sustaining the germinal niche of the lateral ventricles and influencing neuroblasts migration in the adult brain.

Introduction

Neurogenesis in the embryonic and adult stages emerges like a continuous event as the lineage of neural progenitor cells (NPCs) and the conservation of many intrinsic signaling pathways are being revealed (reviewed by Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ming and Song, 2011). The origin and characteristics of extrinsic signals might still challenge this notion.

Radial glia during development and a subpopulation of radial glia-derived like-astrocytes in the adult brain are regarded as the founder cells for most, if not all, neural lineages in the central nervous system (CNS). These neural stem cells undergo distinct modes of cell division, giving rise to the diversity of macroglial and neuronal cell types in the CNS (reviewed by Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Particularly, neural cells do not function in their birth sites but undergo more or less extensive migrations. Active adult neurogenesis largely occurs in two restricted regions of the forebrain, the ependymal-subependymal zone (EZ/SEZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) in the dentate gyrus of the hippocampus. The EZ/SEZ in the wall of the lateral ventricles constitutes the largest neurogenic niche of the adult mammalian brain (reviewed by Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011). It contains multiple cell populations including ependymocytes lining the ventricle and SEZ-astrocytes that are thought to behave as neural stem cells (so-called type B cells). Type B cells give rise to actively proliferating C cells that function as intermediate progenitor cells. C cells in turn generate immature neuroblasts (type A cells) which migrate in chains through the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb (OB) where they differentiate into granular and periglomerular interneurons (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch et al., 1999; Carleton et al., 2003; Brill et al., 2009). Type B and C cells are also closely associated to blood vessels and to a nearby large extracellular matrix (Mercier et al., 2002; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Type B cells retain important properties of radial glial cells, considered in turn neural stem cells during brain development. For example, their cell bodies are generally located just under the EZ cell layer but have short processes that extend through the ependyma with small apical endings on the ventricle contacting the cerebrospinal fluid (CSF) (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). Thus, the SEZ can be regarded as a sort of displaced neuroepithelium. Interestingly, neuroblasts migration parallels CSF flow and beating of ependymal cilia

is required for normal CSF flow, concentration gradient formation of CSF molecules, and directional migration of neuroblasts (Sawamoto et al., 2006).

The conservation of many intrinsic signaling pathways underlies the remarkable similarity between embryonic and adult neurogenesis, although the origin and nature of extrinsic signals might be different (reviewed by Ming and Song, 2011). A range of morphogens, including Notch, many Ephrins and Eph receptors, growth factors, neurotrophins, cytokines, neurotransmitters and hormones have been identified as major extracellular players of adult neurogenesis (reviewed by Ming and Song, 2011; Zhao et al., 2008; Jang et al., 2008). A rather limited knowledge exists of extracellular cues controlling targeted neuronal migration during adult neurogenesis, or about the molecular links connecting neurogenesis and migration. A few adhesion molecules (such as β 1-integrin, PSA-NCAM and tenascin-R) and extracellular cues (such as neuregulins and slits) are known to regulate the stability, motility, or directionality of neuronal migration during EZ/SEZ neurogenesis (reviewed by Lledo et al., 2006; Ming and Song, 2005).

The secretable glycoprotein reelin and its signaling machinery are well known to be required for proper brain development, affecting neuronal migration and positioning of several neuronal lineages. It is well established that reelin binding to Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2) or Very Low Density Lipoprotein Receptor (Vldlr) induces phosphorylation of the cytoplasmic adaptor protein Disabled 1 (Dab1), a tyrosine kinase signal transduction cascade, and Dab1-regulated turnover. Indeed, the *reeler* mice (deficient in reelin) and the mutant null mice for Dab1 or for both ApoER2 and Vldlr show comparable positioning defects (reviewed by Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003; Luque, 2007; Cooper, 2008). However, reelin does not function simply as a positional signal. Rather, it appears to participate in multiple events critical for neuronal migration and cell positioning (Magdaleno et al., 2002). Recently, we have shown that during forebrain development reelin, acting upstream of Notch signaling, it is both required and sufficient to determine the rate of neocortical neurogenesis (Lakoma et al., 2011). Such interaction is also required for neuronal migration and positioning (Hashimoto-Torii et al., 2008). Thus, the early function of reelin in the proliferative compartment might underlie its post-proliferative requirement raising the

possibility that acts coupling neurogenesis and neuronal migration, perhaps akin to a permissive rather than instructive signal for cellular migration. Indeed, a reelin-dependent ApoER2 downregulation mechanism uncouples neocortical newborn neurons from NPCs, thereby enabling neurons to migrate (Perez-Martinez et al., 2012). Highlighting the difficulty to establish a coherent model of reelin function, a number of studies has provided exceedingly contradictory evidence as to whether or not reelin plays a role during adult neurogenesis and cell migration (Kim et al., 2002; Hack et al., 2002; Won et al., 2006; Zhao et al., 2007; Heinrich et al., 2006; Andrade et al., 2007; Gong et al., 2007; Simo et al., 2007; Blake et al., 2008; Massalini et al., 2009; Pujadas et al., 2010; Courtes et al., 2011; Teixeira et al., 2012).

In the present study, we use both loss- and gain-of-function genetic approaches along with *in vivo* and *ex vivo* assays to investigate reelin signaling in the adult brain. We seek to reveal whether it persists by the germinal niche of the lateral ventricles. Ours results show that reelin signaling remains active inside, and is necessary and sufficient to modulate, the EZ/SEZ neurogenic niche. They suggest that cerebrospinal fluid reelin acting upstream of ApoER2 and Dab1 regulates the integrity and functionality of the ventricular ependyma, the nearby NPCs, and eventually the differentiation and migratory behavior of neuroblast through the RMS.

Material and Methods

Mice

Heterozygous *reeler* mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). *ApoER2*-null and *Vldlr*-null mice were a gift from Johannes Nimpf (University of Wien, Austria) and were genotyped as described previously (Trommsdorff et al., 1999). *Nestin-reelin* mice were a gift from Tom Curran (The Children's Hospital of Philadelphia, PA) and were genotyped as previously described (Magdaleno et al., 2002). *Nestin^{CreERT2}* mice were a gift from Gordon Fishell (University of New York, NY) and were genotyped as previously described (Balordi and Fishell, 2007). *Dab1*-null mice and conditional (floxed) *Dab1* (*Dab1^{c/c}*) mice were obtained and genotyped as described elsewhere (Howell et al., 1997b; Pramatorova et al., 2008). Mutant mice (*Nestin^{CreER/+};Dab1^{c/c}*) were generated by crossing homozygous conditional *Dab1* mice (*Dab1^{c/c}*) with mice homozygous for the conditional *Dab1* allele and heterozygous for the *Nestin^{CreER}* allele (*Nestin^{CreER/+};Dab1^{c/c}*). All primers sequences, PCR conditions and the expected sizes of PCR products are available upon request. Animals were handled according to protocols approved by the European Union, NIH guidelines and the Instituto de Neurociencias Animal Care and Use Committees.

Tamoxifen and bromodeoxyuridine administration

Tamoxifen (Sigma, St. Louis, MO) was prepared as a 25 mg/ml stock solution in corn oil (C-8267; Sigma). For Cre induction and analysis of P60 *Nestin^{CreER/+};Dab1^{c/c}* mice, tamoxifen was administrated by intraperitoneal injection (5mg/35g of body weight) every other day for a total of eight injections. After a break of 1 week, another round of eight injections was administered. The recombination effectiveness of this dosage in *Nestin^{CreERT2}* mice and the lack of appreciable short or long-effect of tamoxifen exposure on proliferation in the E/SEZ have been previously shown (Balordi and Fishell, 2007). Bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma) was administrated intraperitoneally at 100 mg/g of body weight.

Alkaline phosphatase-reelin *in situ* staining

An alkaline phosphatase (AP)-fusion probe of the receptor-binding region of reelin (repeats 3 to 6, AP-RR36) was generated as previously described (Uchida et al., 2009). Validation of the probe, binding conditions and alternative staining procedures has been also described (Uchida et al., 2009; Perez-Martinez et al., 2012). AP-RR36 *in situ* binding was detected using AP substrates or by double immunofluorescence labeling of AP along with several cell markers.

Immunohistochemistry

Immunostaining was performed as previously described (Lakoma et al., 2011). Primary and secondary antibodies were acquired and diluted as indicated. Primary antibodies: rabbit anti-human placental alkaline phosphatase (Abcam, 1:100), mouse anti-human placental alkaline phosphatase (Abcam, 1:50), goat anti-doublecortin (Santa Cruz, 1:100), rabbit anti-GFAP (Dako, 1:500), rabbit anti-tyrosine hydroxylase (Pel-Freez, 1:1000), rabbit anti-calbindin (Swant, 1:10000), rat anti-BrdU (Serotec, 1:100), mouse anti-reelin (G10, Abcam, 1:1000), rabbit anti-S100b (Dako, 1:400), rabbit anti-Dab1 (B3, 1:500, [Howell et al., 1997a; Luque et al., 2003]), mouse anti-CRE (Novagen, 1:500), mouse anti-Mash1 (BD Pharmingen, 1:500), mouse anti-phosphotyrosine (Sigma, 1:2000). Secondary antibodies: biotinylated-donkey anti-rabbit, biotinylated-goat anti-rat, biotinylated-donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch, 1:500), Cy3-donkey anti-rabbit, Cy3-Goat anti-rat, Cy3-donkey anti-goat, Cy3-donkey anti-mouse, Cy2-donkey anti-rabbit, Cy2-donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 1:200) and HRP-goat anti-rabbit, HRP-goat anti-mouse (Jackson Immuno-research, 1:5000). Images were captured on a Leica TCS SP2 AOBS inverted Laser Scanning Confocal Microscope. Image J (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), and Adobe Photoshop software were used for image capturing and analysis.

Production of reelin

Recombinant reelin was produced using the mammalian expression construct pCrl, encoding mouse reelin cDNA (D'Arcangelo et al., 1997), Cell culture and transfection procedures have been previously described (Saez-Valero et al., 2003).

Dab1 phosphorylation assay

Brains were harvested from P60 *reeler* mice. Two-mm thick coronal slices were obtained and the E/SEZ at the striatal side of the lateral ventricles was microdissected under a low-power dissecting microscope in ice-cold DMEM. Tissues were homogenized in cell lysis buffer and precleared by short centrifugation. Anti-Dab1 immunoprecipitation was carried out from equal amounts of protein, and Dab1 protein levels and phosphorylation status upon reelin stimulation were determined as previously described (Howell et al., 1999).

Ultrastructural analysis

For scanning electron microscopy, P60 wild type, *reeler* and *reeler ne-reelin* mice were used. Briefly, the entire wall of the lateral ventricles was dissected as whole mount, and fixed with 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde overnight. The tissues were incubated in 2% OsO₄ for 1h, dehydrated with ethanol, and dried with a critical point drier. After sputter coating with platinum, the mounted samples were examined with a Hitachi S-4100 scanning electron microscope.

Intraventricular infusion of reelin

Recombinant reelin was produced and concentrated as previously described (Saez-Valero et al., 2003). The concentrated protein (or mock) was infused using a mini osmotic pump (Alzet model 2001) into the caudal region of the lateral ventricle of P60 wild type and *reeler* mice at the coordinate- 0.7mm, 1.2mm, 2.0mm (anterior, lateral, depth coordinates relative to bregma). Five days later the brains were processed for immunohistochemistry using anti-doublecortin antibodies.

Results

The EZ/SEZ and RMS contain the highest density of functional reelin receptors in the adult brain.

To test whether or not the reelin pathway continues to be active in postnatal ages, it was essential to know if there was a continuity in the expression of its functional receptors in adult animals. For this reason, we carried out an analysis of its expression in the adult brain using fusion protein AP-RR36 that we previously developed and extensively validated in isolated cells and embryonic tissues (Uchida et al., 2009; Pérez-Martínez et al., 2012). Even with the difficulty involved in handling fresh brain sections of 200 μm in thickness, the excellent resolution offered by the enzymatic development of this technique made it possible to elaborate a rostral-caudal cartography of the expression of FRR, from the olfactory bulb to the brainstem, including the cerebellum (Fig. X). Thus, we clearly observed that the highest density of FRR in the adult brain in the two known adult neurogenic niches, the ependymal/subependymal zone (EZ/SVZ) of the lateral ventricles, including the rostral migratory stream (RMS), and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus. A diffuse staining was also observed in the glomerular layer of the olfactory bulb, the medial habenular nucleus and the molecular layer of the cerebellum (Fig. X). Moreover, the greatest contribution to this signal in the neurogenic niches of the brain is due to ApoER2, as is clear when analyzing the null mutants of this receptor, practically lacking staining except for a diffuse signal in the glomerular layer of the olfactory bulb. Consistent with these results are those obtained with the null mutants for the other canonic reelin receptor, VLDLR: the wild-type-like staining of FRR throughout the brain but minimal in the cerebellum (expression practically complementary to that of the mutant ApoER2), allows confirm that VLDLR is the main receptor present in this structure. On the other hand, the staining of the AP-reelin probe shows a gradual increase as the genetic load of reelin decreases. Thus, the signal observed in reeler brain is greater than in the heterocytotic brain for reelin that, in turn, is greater than in the wild-type brain, which supports that, in effect, reelin causes a down-regulation of the receptor.

Functional ApoER2 is present in the main cellular compartments of the EZ/SEZ/RMS neurogenic axis

By looking at the specific regions in which ApoER2 is expressed in the brain, the next objective was to determine which cell types of the neurogenic niche of the lateral ventricles would be competent to respond to a signal triggered by reelin, as well as to examine the localization of ApoER2 in the cellular components building up the RMS. The combination of the in situ binding test of the AP-RR36 probe with the detection by immunofluorescence, shows that, to a greater or lesser extent, all the cellular subpopulations of the EZ / SEZ are again competent to receive reelin as a ligand, as demonstrated by the colocalization of functional ApoER2 with specific markers for ependymocytes (E-type cells) [S100 β], subventricular astrocytes (including B-type cells) [GFAP], transient amplifying cells (type C cells) [Mash1], neuroblasts (cells type A) [DCX], as well as cells in full S phase of the cell cycle [pulse and hunting after 1 hour of injection with BrdU]. It is noteworthy that the highest colocalization in the expression of ApoER2 occurs in the neuroblasts. Therefore, an embryo-adult continuity is expressed in the expression of ApoER2 in the different cell lineages of the neurogenic niche (Fig. 19).

As regards the components of the rostral migratory route, the neuroblasts (positive for the doublecortin marker, DCX) consistently continue to express ApoER2, together with the astrocytes (GFAP +) that make up the "tubes" through which they run and which facilitate its migration through an adult environment. As previously described, neuroblasts also carry out divisions along the RMS, from their birth in the EZ / SEZ until they reach their destination in the different layers of the olfactory bulb (Menezes et al., 1995). It is no less significant that these elements in division would also be competent to respond to reelin (Fig. 20).

Reelin signaling remains active in the EZ/SEZ

Although ApoER2 is considered a promiscuous receptor, the indications that until now we had to think that the signaling triggered by reelin was still active in the adult, were more than enough to justify the following experiment.

Our group had observed that the adult reeler mutant showed an exaggerated ventricular enlargement and a hyperplastic RMS. The cells of the EZ / SEZ / RMS are competent to receive the reelin signal, that is, they express one of the canonical elements of the signaling pathway, the ApoER2 receptor. In addition, the presence of the intracellular adapter Dab1 has been described in the RMS, another of the traditional components of the pathway (Hack et al., 2002).

As is known, a condition that must be met for the reelin signal through its receptor to be transduced is the phosphorylation of Dab1 (Howell et al., 1999). During embryonic development, we have shown that reelin, through a mechanism of low regulation of ApoER2, promotes the new neurons dissociate from their parents and is able to normalize the levels of Dab1 on a reeler genetic background (Article 1). For all this and, with the aim of checking if the reelin signaling pathway is still active in the adult brain, we performed an *ex vivo* Dab1 phosphorylation assay under reelin stimulation, using a homogenate of cells extracted from the EZ as substrate. / SEZ of adult animals reeler.

The reelin fragment comprising the repeats 3 to 6 (RR36) recapitulates the vast majority of the functions of the protein and is capable of triggering a signal (Jossin et al., 2004). In order to continue with the line of experiments carried out so far, for carrying out this phosphorylation assay of Dab1, the AP-RR36 fusion protein was used (although previously and, with the same result, we had already done it with recombinant reelin, generated in our laboratory by transfection of HEK293T cells). Once the incubation time had elapsed, an immunoprecipitation of Dab1 was necessary to enrich the sample with this protein, since an antibody that generically detects the phosphorylated tyrosine residues would be used.

The results of this test show that, in effect, Dab1 phosphorylation occurs after incubation of EZ / SEZ cells with AP-RR36. The increase of the signal of the phosphotyrosine band, together with the decrease of the Dab1 signal, consistent with the beginning of its degradation, allows to affirm that the reelin signaling persists in the adult EZ / SEZ (Fig. 21).

Lack of function of reelin, ApoER2 or Dab1, but not of VLDLR, causes analogous phenotypes in the lateral ventricles and RMS

The lack of function of reelin, ApoER2 or Dab1 in mutants lacking these proteins, causes hyperplasia of RMS (Andrade et al., 2007). Closely related to this structure are the lateral ventricles of the adult brain. When analyzing the neuroanatomy of these mutants, we observed that they precisely show an evident ventriculomegaly (increase in ventricular size, Fig. 22B, C, E), but not the VLDLR mutant (Fig. 22D), which does not exhibit phenotypic alteration of any of these structures (which supports that the main receptor of reelin in the neurogenic niches of the adult brain, if not the only one, is ApoER2).

Partial rescue of lateral ventricle integrity and neuroblast migration by ectopic expression of reelin in NPCs of *reeler* mutants

To define the possible reelin function and its signaling pathway in the adult EZ / SEZ system, we carried out a series of studies with genetically manipulated animals. In the same way as in article 2, we used the ne-reelin transgenic mouse to evaluate the effect of the reelin gain function on a wild background and in a rescue paradigm on a *reeler* (*reeler* ne-reelin) adult background. The work in which this transgenic mouse is used for the first time (Magdaleno et al., 2002) highlights the rescue of foliation of the cerebellum in *reeler* ne-reelin animals, with the consequent disappearance of the ataxic phenotype, although they indicate that the lamination cortical is not recovered, something that actually, as we saw, does occur (article 2). The analysis of the expression of ectopic reelin in the adult, now provides a key information to deepen the understanding of the reelin function.

The protein expressed ectopically by the neural progenitors of the EZ / SEZ (nestin promoter) on a *reeler* background causes a normalization of the ventricular size (Fig. 22B, F) and a recovery of the density of ependymal cilia, analyzed by microscopy. scanning electronics (Fig. 23). The graphic representation of the values obtained by means of software shows the statistically significant differences between the ventricular size of the *reeler* mutants, Dab1 and ApoER2 (Fig. 22G, columns in red).

Conditional ablation Dab1 in NPCs impairs neuroblast clearance from the SVZ

To address this issue from the opposite side, we decided to carry out a conditional ablation of Dab1, since this protein is expressed in the RMS and both in the embryonic radial glia (Luque et al., 2003) and in the adult EZ / SEZ (Hack et al., 2002), which would provide data that would complement perfectly with those we had obtained with gain-of-function experiments. For this, we made use of the CRE-lox system induced by Tamoxifen and thus cause the interruption of reelin signaling in progenitors, since it provides the possibility of selecting the place and the moment in which we wish to eliminate the gene of interest, Dab1 in this case. Through crosses between the line of transgenic mice nestin-CREERT2 (expression of the enzyme CRE recombinase under the nestin promoter, Balordi and Fishell, 2007) and the floxed-Dab1 line (the loxP targets of the enzyme flank the Dab1 gene; Pramatarova et al., 2008; Teixeira et al., 2012), we provoke the conditional ablation of reelin signaling in the progenitors of adult mice.

This ablation of Dab1 in progenitors (Fig. 24A, B), produces an increase in the size of the lateral ventricles (Fig. 24C, D) and impairs the abandonment of the neuroblasts of the SEZ towards the RMS, accumulating (Fig. 24E- F), so it can be affirmed that this phenotype observed in the mutants of the elements of the reelin signaling pathway is not an event that depends on development. In this experiment alterations of the same structures are observed and in the opposite direction to those caused by the presence of ectopic reelin in the system. In Figure 24E and F we observed how the interruption of the reelin pathway by the selective elimination of Dab1, results in an accumulation of cells in the more caudal regions of the RMS. This result was obtained by performing a 3 day BrdU pulse and hunting experiment. Under normal conditions, a neuroblast that is born in the EZ / SEZ takes about 3 days to migrate to the olfactory bulb through the RMS. In this case, in the Dab1^{flx / flx}; CRE + mice, a dramatic increase in BrdU + profiles was observed in the EZ / SEZ, which contrasts with those found in the Dab1 + / flx; CRE + mice, where the great majority of cells that incorporated BrdU have abandoned their neurogenic niche to begin their long journey towards the olfactory bulb. The genetic ablation of Dab1 causes, therefore, a defect in the migration of neuroblasts.

In a complementary approach, we found the opposite effect in the transgenic reeler ne-reelin brains. In this case, the accumulation of neuroblasts in the RMS observed in a reeler, with the consequent migratory difficulty to reach the olfactory bulb, tends to normalize in the presence of ectopic reelin in the system, recovering also the morphology of the RMS in the nucleus. of the olfactory bulb, somewhat dispersed in a reeler bulb (Fig. 25). From all this it can be deduced that one of the functions of reelin is its contribution to the maintenance of adult neurogenic niche.

The effective ablation of *Dab1* after the application of Tamoxifen, is evident by immunodetection of the protein in the RMS at the level of the olfactory bulb, but not in more caudal regions such as in the area of the anterior commissure, the lateral ventricles or the zone. subgranular of the hippocampus, these last places being neurogenic niches where nestin is expressed with more intensity (Fig. 26).

The functioning of the nestin-reelin and nestin-CRE transgenes was examined by immunofluorescence (Fig. 26).

Intraventricular infusion of reelin alters the migration of neuroblasts

Taken together, the previous results point to a reelin action in the maintenance of adult neurogenic niches. The interruption of the reelin signaling pathway causes defects in the migration of the neuroblasts, together with an alteration in the anatomy of the lateral ventricles. In a further complementary approach, in an environment with excess reelin, we used osmotic mini-pumps to administer recombinant reelin directly into the lateral ventricle of adult reeler mice (Fig. 29A). The pumps were carefully implanted using stereotaxic surgery and left to work for 5 days, releasing recombinant reelin at a rate of 1 μ l / hour. Subsequently, immunohistochemical techniques were performed to detect Doblecortin + cells (neuroblasts). The infusion of control culture medium does not alter the distribution of the neuroblasts (Fig. 29B), whereas the infusion of reelin affects the migratory behavior of the neuroblasts on a genetic background lacking reelin, producing a remarkable alteration in the usual location of the neuroblasts on the side ipsilateral to that of the cannula insertion of the reelin pump (Fig. 29C, arrowheads in red). Therefore, we can conclude that reelin influences the migration of neuroblasts in the

adult brain, and probably from the CSF, which in fact, as our group showed before, contains it (Sáez-Valero et al., 2004), to such an extent that the cells competent to its action flood areas such as the junction between the corpus callosum and the septal nucleus.

Discussion

Here we show that in the adult brain the reelin-activated biochemical-signaling cascade, resulting in phosphorylation of the intracellular adapter Dab1, occurs in the ependymal-subependymal zone (EZ/SVZ) of the lateral ventricles. We also show that the EZ/SEZ, localizing stem cells and other neural progenitors, and its associated and extensive rostral migratory stream (RMS) of neuroblasts, concentrate the highest density of functional ApoER2 in the adult brain. Mutant mice lacking reelin (*reeler*), ApoER2 or Dab1 exhibit a prominent widening of ventricular volume and a marked hypercellularity of the RMS, particularly in its proximal aspect. The conditional ablation of Dab1 in neural progenitor cells of wild types increases the ventricular volume and inhibits cell migration from the SVZ to the RMS. In contrast, the ectopic transgene expression of reelin in the neural progenitors of *reeler* mutants normalizes the ventricular lumen and the density of ependymal cilia, improving in turn the migration of neuroblasts; consistently, the intraventricular infusion of recombinant reelin in *reeler* mutants also affects the migration of neuroblasts, indicating that reelin acts from the cerebrospinal fluid. These results show that reelin signaling not only remains active, but also is necessary and sufficient to modulate the adult EZ/SEZ/RMS neurogenic axis.

The dynamics and molecular composition of cerebrospinal fluid (CSF) are the object of renewed interest, particularly insofar as it also emerges as a key component in the regulation of the neurogenic niche EZ/SVZ (reviewed in Lun et al., 2015). The presence of reelin in the CSF of the adult brain has been documented by our group (Sáez-Valero et al., 2003) and later confirmed by others (eg, Ignatova et al., 2004, Guldbrandsen et al., 2014; Macron et al. al., 2018). Various mechanisms are involved in the complex dynamics of the CSF (reviewed in Iliff et al., 2013; Hladky and Barrand, 2014). One of them, the orchestrated movement of the ependymal cilia of the ventricular wall causes a laminar supraependymal flow of approximately 200 μm in thickness (Worthington and Cathcart, 1966, Cifuentes et al., 1994, Siyahhan et al., 2014). It has been observed that this type of movement is not only necessary for the normal flow of CSF in the lateral ventricle, but also for the formation of gradients of concentration of molecules contained in the fluid and for the directional migration of the neuroblasts that runs parallel to said flow (Sawamoto et al., 2006). In addition, multiple evidences relate the ciliary alterations and the planar polarity of the ependymocytes with the ventricular

distension and the hydrocephalus (reviewed in Jiménez et al., 2014; Ohata and Alvarez-Buylla, 2016). Our results involving the activity of reelin in maintaining the integrity of the ciliated mantle ependymal / ventricular volume and the regulation of neurogenesis/migration of neuroblasts are consistent with these observations. On the other hand, the small apical surface of the B cells is in direct contact with the CSF whose factors in solution can modulate the behavior of these stem parents (Lehtinen et al., 2011; Zappaterra et al., 2007). Moreover, as radial glia and neuroepithelial cells do during embryonic development, the vast majority of B cells contact the ventricle through small apical processes containing a single primary cilium (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). This primary cilium could well integrate signals directly from molecules present in the CSF (reviewed in Fuentealba et al., 2012). In another vein, the ependymal cells themselves (which surround the apical processes of the B cells), the main interface between the CSF and the brain parenchyma, are linked together by "gap junctions", a type of intercellular connection that does not it provides a severe restriction to the diffusion of molecules between both compartments (Whish et al., 2015). Undoubtedly intriguing is the detection of ApoER2 and VLDLR (as well as that of Notch and some of its ligands) in the cerebrospinal fluid itself (Guldbrandsen et al., 2014; Macron et al., 2018). Perhaps its presence may be related to the release of extracellular membrane particles (prominin/CD133+) from neural progenitor cells and other epithelial cells to CSF (Marzesco et al., 2005; Huttner et al., 2008). Where does the CSF reelin come from then? Most likely, CSF reelin is not derived from blood but from the CNS (Ignatova et al., 2004, Aasebø et al., 2014). On the other hand, although its expression is detectable during embryonic development (Lein et al., 2007; Johansson et al., 2013, 2014), reelin was not found in the secretome of the choroidal plexus of the lateral ventricle, classically considered a primary producer of CSF, and recently revealed as a key component of the adult EZ/SVZ niche (Silva-Vargas et al., 2016). However, it is possible that reelin reaches the neurogenic niche EZ/SVZ after being secreted into the CSF from some other circumventricular organ (CVO). For example, the subfornical organ, located on the ventral surface of the fornix near the foramen of Monro that interconnects the lateral ventricles with the third ventricle, strongly expresses reelin (Lein et al., 2007). Traditionally considered a sensory CVO, its secretory capacity has recently been revealed (Agassandian et al., 2017). It also expresses reelin the subcomisural organ (SCO), located in the dorsocaudal region of

the third ventricle, at the entrance of the cerebral aqueduct (Lein et al., 2007). It is known that the SCO secretes SCO-spondine, transtirretin and basic fibroblast growth factor (BFGF), proteins that participate in various aspects of neurogenesis such as the proliferation of stem progenitors and neuronal differentiation, including axonal guidance. Some unidentified soluble compounds secreted by the SCO have been detected in the lateral ventricle (Guerra et al., 2015). In structural terms, the main SCO secretion, SCO-spondine, belongs to the TSR superfamily (thrombospondin type 1 repeat), which includes F-spondine and thrombospondin-1 among other proteins (Adams and Tucker, 2000). Reelin possesses a domain homologous to the N-terminus of F-spondine (Ranaivoson et al., 2015) and in turn the F-spondine protein is able to interact, through its TSR domains, with ApoER2 (Hoe et al., 2005). Thrombospondin-1 (TBHS-1) can interact with ApoER2 and VLDLR and it has been proposed that TBHS-1 stabilizes the chains of neural precursors derived from explants of the SVZ (Blake et al., 2008), however, its function *in vivo* remains to be clarified. Interestingly, the lack of secretory function of the SCO is a common feature in various animal models of hydrocephalus (Meinzel, 2007), classically defined as a distension of the ventricular system resulting from an active accumulation of CFS. Multiple evidences associate the hydrocephalus with abnormal neurogenesis; the most recent results involve neurogenic alterations rather than the active accumulation of CSF in its pathogenesis (Furey et al., 2018). In any case, and independently of where the CSF reelin of the adult brain comes from, there is a suggestive parallelism between this causal association and our own results indicating that the inhibition of reelin activity on the EZ / SVZ niche causes alterations that compromise both the neurogenesis as the ventricular volume.

It is well known that the activation of Notch signaling promotes and maintains the character of neural progenitor, inhibiting neuronal differentiation. The Numb protein, on the other hand, antagonizes the function of Notch during the division of neural precursors (reviewed by Roegiers and Jan, 2004, Engler et al., 2018). The canonical signaling of Notch is in fact very active in the neurogenic niche EZ / SVZ regulating the maintenance of the stem neural progenitors (Imayoshi et al., 2010, Aguirre et al., 2010). Although the precise mechanisms of regulation of the activity of Notch signaling in the mouse EZ-SVZ are not known, it is known that some Notch ligands are expressed along the same and both Delta1 and Jagged1 have been detected in IPCs and also in

neuroblasts (Aguirre et al., 2010, Irvin et al., 2004, reviewed in Fuentealba et al., 2012). Interestingly, the postnatal ablation of Numb / Numbl like proteins in the EZ-SVZ causes widening of the lateral ventricles as well as a marked hypercellularity of MSY (Kuo et al., 2006), phenotypes coinciding with those described here for the deficiencies of reelin, ApoER2 or Dab1. Consistently, overexpression of the activated intracellular domain of Notch in the EZ-SVZ phenocopy the hypercellularity of the RMS; however, the integrity and size of the lateral ventricles are not compromised, suggesting the possibility that Numb regulation of ependymal integrity occurs through a mechanism independent of Notch (Kuo et al., 2006). In contrast, a more recent study shows how the ependymal cells are dependent on the canonical signaling of Notch, which actively maintains the quiescence, phenotype and position of the same. The inhibition of Notch signaling exclusively in the ventricular ependyma allows the reentry of ependymocytes in the cell cycle and the production of neurons of the olfactory bulb, while the forced signaling of Notch is sufficient to block the plastic response of the ependymal cells to cerebral infarction (Carlén et al., 2009). Undoubtedly, Notch signaling has different functions in the different cellular populations of the neurogenic niche of the lateral ventricle. On the other hand, although the interaction between reelin and Notch signaling is important for the modulation of neurogenesis and cell migration during cortical development (Hashimoto-Torii et al., 2008; Lakoma et al., 2011), molecular mechanisms precise have not yet been clarified. In fact, a hundred of genes are directly regulated *in vivo* in cortical NSCs by the intracellular domain of Notch (NICD) and its co-factor RPB1. One of them is Dab1, whose transcription after the activation of Notch, is not activated, but repressed (Li et al., 2012). Moreover, Numb and Dab1 are endocytic accessory proteins, capable of regulating the endocytosis and the subsequent post-endocytic trafficking of their related receptors [such as Notch, TrkB, b-APP, VLDLR and ApoER2] (Yap and Winckler, 2015). Since both proteins share the PTB domain (Phosphotyrosine binding/NPXY binding region), the possibility of a cross interaction and depending on the cellular context is not ruled out. A recent study demonstrates how the inhibition of Notch signaling in the adult neurogenic niche of the lateral ventricle results in the cells leaving the SVZ migrating towards the RMS more rapidly than that observed in the control brains. In contrast, the overexpression of Notch results in a greater proportion of cells being retained in the SVZ for longer than that observed in the control brains (Piccin et al., 2013), a phenotype clearly similar to that

described for conditional ablation of *Dab1* in this work. Also, the abundance of Notch in the neuroblasts (PSA-NCAM+) located in the RMS, much lower in those that have reached the OB, suggests that the activity of Notch can inhibit its premature differentiation (Givogri et al., 2006). Again, a pattern of expression strongly reminiscent of the here shown for the localization of ApoER2. Doubtless, it would be interesting to explore if the interaction between reelin and Notch signaling persists in the EZ/SVZ/RMS neurogenic axis of the adult brain.

The literature results of the manipulation of the PSA-NCAM glycoconjugate are also of particular interest in our context. The poly- α 2,8-sialic acid (PSA), a unique post-translational modification of the neural cell adhesion molecule (NCAM), is strongly linked to the development and neural plasticity. The elimination of PSA (by means of the genetic ablation of its synthesizing enzymes), independently of NCAM, results in an expansion of the RMS and a ventricular widening (Weinhold et al., 2005), phenotypes comparable to those shown here for the absence of reelin, ApoER2 or *Dab1*. Also, intrathecal administration of endoneuraminidase (endo N) [an enzyme that selectively eliminates PSA] demonstrates that PSA not only promotes rostral tangential migration of neuroblasts but also suppresses the differentiation thereof induced by NCAM. Said differentiation, dependent on cell-cell contact, involves the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Petridis et al., 2004). In fact, as in our case ApoER2, in the wild mice the low-regulation of PSA is evident once the neuroblasts reach the OB to begin to migrate radially and differentiate. Interestingly, it has been shown that reelin induces the separation of neuroblasts by migrating in chain from explants of the SVZ (Hack et al., 2002) and that said effect also depends on the activation of the MAPK pathway (Simó et al., 2007). In addition, the intraventricular administration of endo N (and not the elimination of PSA by genetic manipulation) causes a massive dispersion of neuroblasts in surrounding brain areas, including the striatal region (Battista and Rutishauser, 2010); an effect certainly comparable to the redirection of neuroblasts observed here after the intraventricular infusion of recombinant reelin in reeler mutants. There is not known direct interaction between reelin or ApoER2, with PSA or NCAM. However, PSA on NCAM is capable of directly binding to bioactive molecules such as neurotrophins, neurotransmitters and growth factors, involved in a wide variety of neural functions, thus regulating their extracellular

concentrations and signaling modes. In this way, PSA binds to the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BDNF in the PSA chain can migrate to the TrkB and p75NTR receptors (Sato et al., 2016). In turn, neurotrophins, including BDNF, are able to regulate the proteolytic processing of ApoER2 by activating the Trk signaling pathway (Larios et al., 2014). On the other hand, NCAM can interact heterophilically with other cell adhesion molecules such as L1 (Horstkorte et al., 1993). A recent study demonstrates the proteolytic cleavage of L1 by reelin, further indicating its relevance for neuronal migration during cortical development (Lutz et al., 2017). It would be equally interesting to explore if these transitive molecular interactions persist in the EZ/SEZ/RMS neurogenic axis.

We propose that, acting through ApoER2 and Dab1, CSF reelin controls the integrity and functionality of the ventricular ependymal, and the behavior of the cellular progenitors in the EZ/SEZ; finally regulating the production, differentiation and migration of the RMS neuroblasts at least up to the OB core. While admittedly less obvious, this model is not ad odds with the one we previously proposed for the embryonic development of the cerebral cortex (Pérez-Martínez et al., 2012). In fact, the requirement for a down-regulation of ApoER2 in the neuroblasts along the RMS in the wild mice is clearly deductible from the higher intensity of functional ApoER2 observed in the *reeler* mutant. Taking into account that the neuroblasts while transiting the RMS have not left the cell cycle, that is, they do not constitute an entirely post-mitotic cellular population, in no way ApoER2 down-regulation would reach the minimum observed in the embryonic cortical plate. However, once the neuroblasts reach the core of the OB, a complete down-regulation of ApoER2 could be required to enable (perhaps by signals other than reelin) the radial migration of the olfactory interneurons produced in the adult neurogenic niche. Finally, the consistent detection of functional ApoER2 in the neurogenic niche of the subgranular zone of the adult hippocampal dentate gyrus deserves further investigation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF2004-07685 and the Fundación Médica Mutua Madrileña [to JML]; Japanese Grant-in-Aids for Scientific Research on Innovative Area (Neural Diversity and Neocortical Organization), and for Scientific Research (B) [to MH]; XXXXXX [to BH]. XXXXXX [to MC]. We thank Dr. J. Nimpf for ApoR2- and Vldlr-null mice. We also thank Dr. T. Curran for the Nestin-reelin allele and Dr. G. Fishell for the Nestin-CreER allele.

References

Aasebø E, Opsahl JA, Bjørlykke Y, Myhr KM, Kroksveen AC, Berven FS. Effects of blood contamination and the rostro-caudal gradient on the human cerebrospinal fluid proteome. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e90429. doi: 10.1371/journal.pone.0090429. eCollection 2014.

Adams JC, Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn*. 2000 Jun;218(2):280-99.

Agassandian K, Grobe JL, Liu X, Agassandian M, Thompson AP, Sigmund CD, Cassell MD. Evidence for intraventricular secretion of angiotensinogen and angiotensin by the subfornical organ using transgenic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017 Jun 1;312(6):R973-R981. doi: 10.1152/ajpregu.00511.2016. Epub 2017 May 10.

Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):323-7. doi: 10.1038/nature09347.

Andrade N, Komnenovic V, Blake SM, Jossin Y, Howell B, Goffinet A, Schneider WJ, Nimpf J. (2007). ApoER2/VLDL receptor and Dab1 in the rostral migratory stream function in postnatal neuronal migration independently of Reelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 104:8508-8513.

Balordi F, Fishell G. (2007). Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J. Neurosci*. 27:14248-14259.

Battista D, Rutishauser U. Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci*. 2010 Mar 17;30(11):3995-4003. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4382-09.2010.

Blake SM, Strasser V, Andrade N, Duit S, Hofbauer R, Schneider WJ, Nimpf J. (2008). Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *EMBO J*. 27:3069-3080.

Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascón S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M. (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature Neurosci.* 12:1524-1533.

Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci.* 2009 Mar;12(3):259-67.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neurosci.* 6:507-518.

Cifuentes M, Rodríguez S, Pérez J, Grondona JM, Rodríguez EM, Fernández-Llebrez P. Decreased cerebrospinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of Reissner's fibre. *Exp Brain Res.* 1994;98(3):431-40.

Cooper JA. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci.* 31:113-119.

Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, Durbec P, Cayre M. (2011). Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One* 6:e20430.

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

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.

Engler A, Rolando C, Giachino C, Saotome I, Erni A, Brien C, Zhang R, Zimmer-Strobl U, Radtke F, Artavanis-Tsakonas S, Louvi A, Taylor V. Notch2 Signaling Maintains NSC Quiescence in the Murine Ventricular-Subventricular Zone. *Cell Rep.* 2018 Jan 23;22(4):992-1002. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.094. Epub 2018 Jan 28.

- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):698-708. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.012.
- Furey CG, Choi J, Jin SC, Zeng X, Timberlake AT, Nelson-Williams C, Mansuri MS, Lu Q, Duran D, Panchagnula S, Allocco A, Karimy JK, Khanna A, Gaillard JR, DeSpensa T, Antwi P, Loring E, Butler WE, Smith ER, Warf BC, Strahle JM, Limbrick DD, Storm PB, Heuer G, Jackson EM, Iskandar BJ, Johnston JM, Tikhonova I, Castaldi C, López-Giráldez F, Bjornson RD, Knight JR, Bilguvar K, Mane S, Alper SL, Haider S, Guclu B, Bayri Y, Sahin Y, Apuzzo MLJ, Duncan CC, DiLuna ML, Günel M, Lifton RP, Kahle KT. De Novo Mutation in Genes Regulating Neural Stem Cell Fate in Human Congenital Hydrocephalus. *Neuron*. 2018 Jul 25;99(2):302-314.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.06.019. Epub 2018 Jul 5.
- Givogri MI, de Planell M, Galbiati F, Superchi D, Gritti A, Vescovi A, de Vellis J, Bongarzone ER. Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. *Dev Neurosci*. 2006;28(1-2):81-91.
- Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM. (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J. Neurosci*. 27:1803-1811.
- Guerra MM, González C, Caprile T, Jara M, Vío K, Muñoz RI, Rodríguez S, Rodríguez EM. Understanding How the Subcommissural Organ and Other Periventricular Secretory Structures Contribute via the Cerebrospinal Fluid to Neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2015 Dec 23;9:480. doi: 10.3389/fncel.2015.00480. eCollection 2015.
- Guldbrandsen A, Vethe H, Farag Y, Oveland E, Garberg H, Berle M, Myhr KM, Opsahl JA, Barsnes H, Berven FS. In-depth characterization of the cerebrospinal fluid (CSF) proteome displayed through the CSF proteome resource (CSF-PR). *Mol Cell Proteomics*. 2014 Nov;13(11):3152-63. doi: 10.1074/mcp.M114.038554. Epub 2014 Jul 18.
- Hashimoto-Torii K, Torii M, Sarkisian MR, Bartley CM, Shen J, Radtke F, Gridley T, Sestan N, Rakic P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60:273-284.

Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neurosci.* 5:939-945.

Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA. (2006). Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 26:4701-4713.

Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS.* 2014 Dec 2;11(1):26. doi: 10.1186/2045-8118-11-26. eCollection 2014.

Hoe, H. S., Wessner, D., Beffert, U., Becker, A. G., Matsuoka, Y. and Rebeck, G.W. (2005). F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9259-9268.

Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B. The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1993 Jun;121(6):1409-21.

Howell BW, Gertler FB, Cooper JA. (1997a). Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16:121-32.

Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. (1997b). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389:733-737.

Howell BW, Herrick TM, Cooper JA. (1999). Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13:643-648.

Huttner HB, Janich P, Köhrmann M, Jászai J, Siebzehnrubl F, Blümcke I, Suttorp M, Gahr M, Kuhnt D, Nimsky C, Krex D, Schackert G, Löwenbrück K, Reichmann H, Jüttler E, Hacke W, Schellinger PD, Schwab S, Wilsch-Bräuninger M, Marzesco AM, Corbeil D. The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human

cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease. *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3):698-705. Epub 2007 Dec 20.

Ignatova N, Sindic CJ, Goffinet AM. Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol Dis*. 2004 Mar;15(2):326-30.

Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70:674-686.

Iloff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, Deane R, Nedergaard M. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013 Nov 13;33(46):18190-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1592-13.2013.

Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*. 2010 Mar 3;30(9):3489-98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010.

Irvin DK, Nakano I, Paucar A, Kornblum HI. Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 and Delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitors and differentiated cells. *J Neurosci Res*. 2004 Feb 1;75(3):330-43.

Jang MH, Song H, Ming GL. (2008). Regulation of adult neurogenesis by neurotransmitters. In *Adult Neurogenesis*, FH Gage, G Kempermann, and H Song, eds. (Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press), pp. 397-423.

Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2014 Mar 19;2:e28426. doi: 10.4161/tisb.28426. eCollection 2014.

Johansson PA. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Front Neurosci*. 2014 Oct 24;8:340. doi: 10.3389/fnins.2014.00340. eCollection 2014. Review.

Johansson PA, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, Götz M. The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development*. 2013 Mar;140(5):1055-66. doi: 10.1242/dev.090860. Epub 2013 Jan 30.

Kim HM, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Costa E, Sugaya K. (2002). Reelin function in neural stem cell biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 99:4020-4025.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:149-184.

Lakomá J, Garcia-Alonso L, Luque JM. (2011). Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. *Development* 138:5223-5234.

Larios JA, Jausoro I, Benitez ML, Bronfman FC, Marzolo MP. Neurotrophins regulate ApoER2 proteolysis through activation of the Trk signaling pathway. *BMC Neurosci.* 2014 Sep 19;15:108. doi: 10.1186/1471-2202-15-108.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):168-76. Epub 2006 Dec 6.

Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:653-79. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154026. Epub 2011 Jul 21.

Li Y, Hibbs MA, Gard AL, Shylo NA, Yun K. Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells.* 2012 Apr;30(4):741-52. doi: 10.1002/stem.1030.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Rev. Neurosci.* 7:179-193.

Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.

Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Aug;16(8):445-57. doi: 10.1038/nrn3921. Epub 2015 Jul 15. Review.

Luque JM, Morante-Oria J, Fairén A. (2003). Localization of ApoER2, VLDLR and Dab1 in radial glia: groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Dev. Brain Res.* 140:195-203.

Luque JM. (2007). Puzzling out the reeler brainteaser: does reelin signal to unique neural lineages? *Brain Res.* 1140:41-50.

Lutz D, Sharaf A, Drexler D, Kataria H, Wolters-Eisfeld G, Brunne B, Kleene R, Loers G, Frotscher M, Schachner M. Proteolytic cleavage of transmembrane cell adhesion molecule L1 by extracellular matrix molecule Reelin is important for mouse brain development. *Sci Rep.* 2017 Nov 10;7(1):15268. doi: 10.1038/s41598-017-15311-x.

Macron C, Lane L, Núñez Galindo A, Dayon L. Identification of Missing Proteins in Normal Human Cerebrospinal Fluid. *J Proteome Res.* 2018 Aug 17. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00194.

Magdaleno S, Keshvara L, Curran T. (2002). Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron* 33:573-586.

Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, Huttner WB. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci.* 2005 Jul 1;118(Pt 13):2849-58.

Massalini S, Pellegatta S, Pisati F, Finocchiaro G, Farace MG, Ciafrè SA. (2009). Reelin affects chain-migration and differentiation of neural precursor cells. *Mol. Cell Neurosci.* 42:341-349.

Meinzel A. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):463-8. Epub 2006 Nov 2

Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. (2002). Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J. Comp. Neurol.* 451:170-188.

Ming GL, Song H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 223-250.

Ming GL, Song H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.

Ohata S, Alvarez-Buylla A. Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends Neurosci.* 2016 Aug;39(8):543-551. doi: 10.1016/j.tins.2016.05.004. Epub 2016 Jun 13.

Perez-Martinez FJ, Luque-Rio A, Sakakibara A, Hattori M, Miyata T, Luque JM (2012). Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biology Open*, in press.

Petridis AK, El-Maarouf A, Rutishauser U. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Dev Dyn.* 2004 Aug;230(4):675-84.

Piccin D, Yu F, Morshead CM. Notch signaling imparts and preserves neural stem characteristics in the adult brain. *Stem Cells Dev.* 2013 May 15;22(10):1541-50. doi: 10.1089/scd.2012.0390. Epub 2013 Feb 19.

Pramatarova A, Chen K, Howell BW. (2008). A genetic interaction between the APP and Dab1 genes influences brain development. *Mol. Cell. Neurosci.* 37:178-186.

Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM, Soriano E. (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30:4636-4649.

Ranaivoson FM, von Daake S, Comoletti D. Structural Insights into Reelin Function: Present and Future. *Front Cell Neurosci.* 2016 May 27;10:137. doi: 10.3389/fncel.2016.00137. eCollection 2016.

Rice DS, Curran T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1005-1039.

Roegiers F, Jan YN. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Apr;16(2):195-205

Sáez-Valero J, Costell M, Sjögren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM. (2003). Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 72:132-6.

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.

Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.

Silva-Vargas V, Maldonado-Soto AR, Mizrak D, Codega P, Doetsch F. Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016 Nov 3;19(5):643-652. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.013. Epub 2016 Jul 21.

Simó S, Pujadas L, Segura MF, La Torre A, Del Río JA, Ureña JM, Comella JX, 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* 17:294-303.

Siyahhan B, Knobloch V, de Zélicourt D, Asgari M, Schmid Daners M, Poulikakos D, Kurtcuoglu V. Flow induced by ependymal cilia dominates near-wall cerebrospinal fluid dynamics in the lateral ventricles. *J R Soc Interface*. 2014 Mar 12;11(94):20131189. doi: 10.1098/rsif.2013.1189. Print 2014 May 6.

Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279-288.

Teixeira CM, Kron MM, Masachs N, Zhang H, Lagace DC, Martinez A, Reillo I, Duan X, Bosch C, Pujadas L, Brunso L, Song H, Eisch AJ, Borrell V, Howell BW, Parent JM, Soriano E. (2012). Cell-Autonomous Inactivation of the Reelin Pathway Impairs Adult Neurogenesis in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 32:12051-12065.

Tissir F, Goffinet AM. (2003). Reelin and brain development. *Nature Rev. Neurosci.* 4:496-505.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, 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.

Uchida T, Baba A, Pérez-Martínez FJ, Hibi T, Miyata T, Luque JM, Nakajima K, Hattori M. (2009). Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons

implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages. *J. Neurosci.* 29:10653-10662.

Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42971-7. Epub 2005 Nov 2.

Whish S, Dziegielewska KM, Møllgård K, Noor NM, Liddelow SA, Habgood MD, Richardson SJ, Saunders NR. The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Front Neurosci.* 2015 Feb 12;9:16. doi: 10.3389/fnins.2015.00016. eCollection 2015.

Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. (2006). Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Exp. Neurol.* 198:250-259.

Worthington WC Jr, Cathcart RS 3rd. Ciliary currents on ependymal surfaces. *Ann N Y Acad Sci.* 1966 Sep 30;130(3):944-50. No abstract available.

Yap CC, Winckler B. Adapting for endocytosis: roles for endocytic sorting adaptors in directing neural development. *Front Cell Neurosci.* 2015 Apr 8;9:119. doi: 10.3389/fncel.2015.00119. eCollection 2015.

Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-660.

Zhao S, Chai X, Frotscher M. (2007). Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for reelin. *Dev. Neurosci.* 29:84-90.

Breve Curriculum Vitae

1998-2002

Licenciatura en Biología (Especialidad Biotecnología)

Universidad de Alicante

2002-2004

Licenciatura en Bioquímica

Universidad Miguel Hernández de Elche

2004-2006

Diploma de Estudios Avanzados

Instituto de Neurociencias de Alicante (Centro mixto UMH-CSIC)

2006-2008

Becario Predoctoral en el Instituto de Neurociencias de Alicante

Financiado por la Fundación Mutua Madrileña

Ene-Mar 2009

Becario en la Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya (Japón)

Financiado por el Programa Global Center of Excellence (GCOE)

Sept 2009

Ingreso en Cuerpo Nacional de Policía

Brigada Provincial de Policía Científica de Valencia

2011-2012

Máster en Ciencias Policiales (Especialidad Infografía Forense)

Universidad de Alcalá

2017-2018

Máster en Química Forense

Universidad de Valencia

PUBLICACIONES

Uchida T, Baba A, Pérez-Martínez FJ, Hibi T, Miyata T, Luque JM, Nakajima K, Hattori M. Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages. *J Neurosci.* 2009 Aug 26;29(34):10653-62.

Pérez-Martínez FJ, Luque-Río A, Sakakibara A, Hattori M, Miyata T, Luque JM. Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biol Open.* 2012 Dec 15;1(12):1258-63.

Pérez-Martínez FJ, Lorente M. Infografía forense: aplicaciones en Policía Científica. *Ciencia Policial* 114 (47-96). 2012.

Teixeira CM, Masachs N, Muhaisen A, Bosch C, Pérez-Martínez J, Howell B, Soriano E. Transient downregulation of Dab1 protein levels during development leads to behavioral and structural deficits: relevance for psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2014 Feb;39(3):556-68.

Pérez-Martínez FJ, Luque-Río A, Howell B, Hattori M, Cifuentes M & Luque JM. Continual Reelin signaling by the prime neurogenic niche of the adult brain. (Borrador).

