

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE RhoE EN EL  
SISTEMA NERVIOSO DEL RATÓN. ESTUDIO  
EN UN MODELO DE RATÓN  
GENÉTICAMENTE MODIFICADO**

TESIS DOCTORAL

Autor: Begoña Ballester Lurbe

Dirigido por: Dr. José Terrado Vicente

Dr. Enric Poch Jiménez

**VALENCIA  
2010**



**JOSÉ TERRADO VICENTE, DOCTOR EN VETERINARIA Y PROFESOR AGREGADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU-CARDENAL HERRERA Y ENRIC POCH JIMÉNEZ, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y PROFESOR ADJUNTO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA MISMA UNIVERSIDAD**

**INFORMAN:**

Que Dña. BEGOÑA BALLESTER LURBE, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE RhoE EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL RATÓN. ESTUDIO EN UN MODELO DE RATÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO”, el cual consideramos reúne todas las condiciones científicas y formales necesarias para su presentación ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Moncada, 8 de junio de 2010.

José Terrado Vicente

Enric Poch Jiménez



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. La familia Rho .....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Proteínas Rho y citoesqueleto .....	14
1.1.2. Proteínas Rnd .....	16
1.1.3. RhoE/Rnd3.....	17
<b>1.2. Desarrollo del sistema nervioso central .....</b>	<b>18</b>
1.2.1. Neurogénesis en la zona subventricular .....	19
1.2.2. El sistema motor: la unión neuromuscular .....	20
<b>1.3. Proteínas Rho y SNC .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. Proteínas Rnd en el SNC .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Modelos animales para el estudio de la función de las proteínas Rho .....</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Animales y estabulación .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Generación ratones a los que se les elimina el gen de RhoE (RhoE gt/gt) .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Genotipado de los ratones .....	34
3.2.2. Extracción del ADN .....	34
3.2.3. PCR de genotipado.....	34
<b>3.3. Sacrificio de los animales y extracción de tejidos.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. Análisis de las proteínas mediante western blot .....</b>	<b>36</b>
3.4.1. Aislamiento de proteínas.....	36
3.4.2. Cuantificación de las proteínas .....	37
3.4.3. Migración electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	37
3.4.4. Transferencia .....	37
3.4.5. Incubación con el primer y segundo anticuerpo.....	38

<b>3.5. Análisis de las proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ)...</b>	<b>38</b>
3.5.1. Recuperación antigénica.....	39
3.5.2. Inactivación de la peroxidasa endógena.....	39
3.5.3. Incubación con los anticuerpos y revelado de la reacción.....	39
<b>3.6. Tinción con X-Gal.....</b>	<b>40</b>
3.6.1. Tinción con X-Gal sobre sección .....	41
3.6.2. Tinción con X-Gal en el embrión entero.....	41
<b>3.7. Tinción con cresil violeta .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8. Marcaje con BrdU.....</b>	<b>42</b>
3.8.1. Incorporación de BrdU .....	42
3.8.2. Inmunohistoquímica frente a BrdU.....	42
<b>3.9. Test de footprint.....</b>	<b>43</b>
<b>3.10. Tinción con Hematoxilina-Eosina.....</b>	<b>44</b>
3.10.1. Obtención y tinción de las muestras .....	44
<b>3.11. Tinción con <math>\alpha</math>-bungarotoxina.....</b>	<b>45</b>
3.11.1. Medición del tamaño de las placas motoras .....	45
3.11.2. Análisis de la maduración de las placas motoras .....	46
<b>3.12. Fijación de nervios con tetraóxido de osmio .....</b>	<b>46</b>
<b>3.13. Análisis estadístico.....</b>	<b>46</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Expresión de RhoE en el sistema nervioso central del ratón durante el desarrollo .....</b>	<b>49</b>
4.1.1. En ratones adultos, RhoE se expresa mayoritariamente en el SNC .....	49
4.1.2. Existe una expresión decreciente de RhoE a lo largo del tiempo en las diferentes regiones del SNC.....	50
4.1.3. Caracterización inmunohistoquímica de la localización de RhoE en el SNC. ....	51
4.1.4. Expresión de RhoE durante el desarrollo embrionario del ratón mediante el análisis de la expresión de X-Gal.....	55
4.1.5. Localización de RhoE en el SNC postnatal mediante el análisis de la expresión con X-Gal .....	61

<b>4.2. La ausencia de RhoE provoca graves alteraciones del SNC. Caracterización morfológica e inmunohistoquímica.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3. La ausencia de RhoE produce un retraso en la migración de las células del sistema ZSV-CMR-BO .....</b>	<b>72</b>
4.3.1. Caracterización inmunohistoquímica de la corriente migratoria rostral y la zona subventricular de los ratones RhoE gt/gt.....	72
4.3.2. Las células de la CMR presentan una migración alterada en ratones RhoE gt/gt.....	77
4.3.3. La ausencia de RhoE provoca alteraciones celulares en el bulbo olfatorio. ....	79
<b>4.4. La ausencia de RhoE provoca alteraciones motoras .....</b>	<b>83</b>
4.4.1. Los ratones deficientes en RhoE presentan una marcha alterada .....	83
4.4.2. El músculo esquelético de ratones RhoE gt/gt no presenta alteraciones histológicas evidentes.....	84
4.4.3. La ausencia de RhoE provoca un retraso en la maduración de las placas motoras.....	86
4.4.3. La falta de RhoE provoca la ausencia del nervio peroneo común en el ratón .....	87
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
5.1. La expresión de RhoE está regulada espacio-temporalmente ....	93
5.2. La eliminación de la expresión de las proteínas Rho muestra su importancia en el desarrollo .....	96
5.4. RhoE está implicado en la migración de las células a través de la CMR hacia el bulbo olfatorio .....	99
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>7. RESUMEN.....</b>	<b>109</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>113</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>





# ABREVIATURAS

**3N:** Núcleo del nervio oculomotor

**AchR:** Receptor de acetilcolina (de *Acetylcholine receptor*)

**Ba:** Bazo

**Bo:** Bulbo olfatorio

**BSA:** Albúmina sérica bovina (de *Bovine Serum Albumine*)

**BrdU:** Bromodesoxiuridina

**Cb:** Cerebelo

**CGE:** Capa granular externa

**CMR:** Corriente migratoria rostral

**Co:** Corteza

**Cr:** Cristalino

**DAB:** Diaminobenzidina

**DDT:** 1, 4 ditiotreitól

**Di:** Diencéfalo

**Enc:** Encéfalo

**Es:** Estriado

**GDP:** Guanosin difosfato

**GI Ma:** Glándula mandibular

**Gr:** Capa granular del bulbo olfatorio

**GTP:** Guanosin trifosfato

**Hi:** Hipocampo

**Hu:** Hueso

**In:** Intestino

**KO:** Knock-out

**Me:** Mesencéfalo

**MC:** Médula cervical

**ML:** Médula lumbar

**MT:** Médula torácica

**Mo:** Médula oblongada

**Mo5:** Núcleo del nervio trigémino

**Mo7:** Núcleo del nervio facial

**Mu:** Músculo esquelético

**Ne:** Neuroblastos de la retina

**NT:** Notocorda

**P:** Puente

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehído

**Pn:** Páncreas

**Pu:** Pulmón

**PVDF:** Polivinilideno fluoruro

**Ri:** Riñón

**RN:** Núcleo rojo

**Rt:** Núcleo reticulotegmental del puente

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

**SNC:** Sistema nervioso central

**Su:** Seno urogenital

**TBS:** Tampón tris salino

**TBT:** Tampón tris salino con tween 20

**Te:** Testículo

**Ti:** Timo

**TI:** Tálamo

**Tr:** Tronco

**ZSV:** Zona subventricular

# **1. INTRODUCCIÓN**

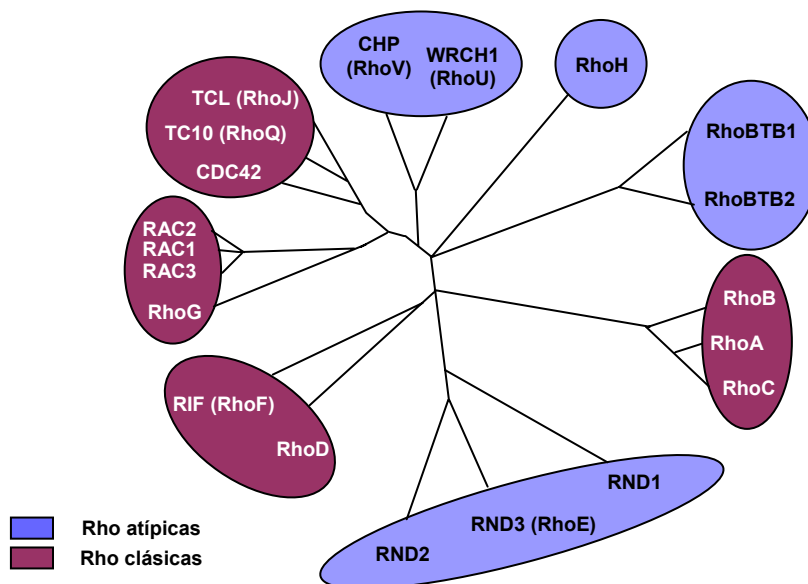


# 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión y localización de la GTPasa de pequeño tamaño RhoE, así como el efecto de su ausencia en ratones modificados genéticamente, y más concretamente su función en procesos tan importantes como la migración neuronal y la formación del sistema motor.

## 1.1. La familia Rho

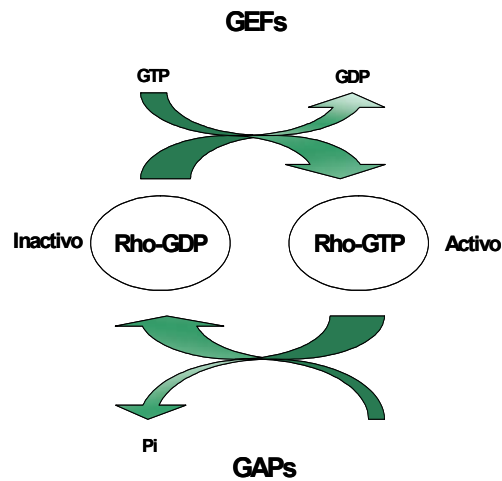
La familia de proteínas Rho (*Ras* *homologue*) está compuesta por pequeñas GTPasas homólogas a Ras, que se subdividen en 8 familias, siendo RhoA, Cdc42 y Rac1 los miembros hasta el momento mejor estudiados (Esquema 1).



Esquema 1. Diagrama representativo de los miembros de la familia Rho. Se han clasificado los 20 miembros según sus propiedades bioquímicas y funcionales (Heasman and Ridley, 2008)

De igual manera que Ras, las proteínas Rho ciclan entre un estado activo en el que se encuentran unidas a GTP, y uno inactivo en el que están unidas a GDP (Esquema 2). Se conocen varias formas en las que se regula la función de las proteínas Rho. En primer lugar existen proteínas que actúan como factores intercambiadores de guanina llamados Rho-GEF, que activan a las proteínas Rho al unirles una molécula de GTP. Por otro lado también se encuentran reguladas por las proteínas Rho-GAP, encargadas de activar la capacidad intrínseca de las proteínas Rho para hidrolizar el GTP a GDP y de esa manera inactivarse (Govek et al., 2005; Luo, 2000). Finalmente, existe otro nivel de regulación que se produce a través de

moléculas Rho-GDIs, que secuestran las proteínas Rho en el citoplasma e impiden su unión a GTP evitando así que puedan activarse y ejercer su función (Dovas and Couchman, 2005).



**Esquema 2. Representación esquemática de los diferentes estados en los que ciclan las proteínas Rho.**

Las proteínas Rho ejercen su efecto directo a través de sus efectores, muchos de los cuales son kinasas. Entre las kinasas efectoras de las proteínas Rho se encuentran la kinasa activadora de p21 (PAKs), que es activada por Cdc42 y Rac1, o las kinasas ROCK (*Rho* associated *coiled-coil-forming* *kinases*), que son activadas por RhoA (Govek et al., 2005; Riento et al., 2005).

Clásicamente a las proteínas Rho se les ha asignado un papel exclusivo en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, aunque en los últimos años se está viendo la importancia que tienen en otros procesos relevantes para las células como la migración y la polaridad celular, la endocitosis, el tráfico intracelular, la regulación de la transcripción, el control del ciclo celular y la apoptosis (Bektic et al., 2005; Poch et al., 2006; Villalonga and Ridley, 2006).

### 1.1.1. Proteínas Rho y citoesqueleto

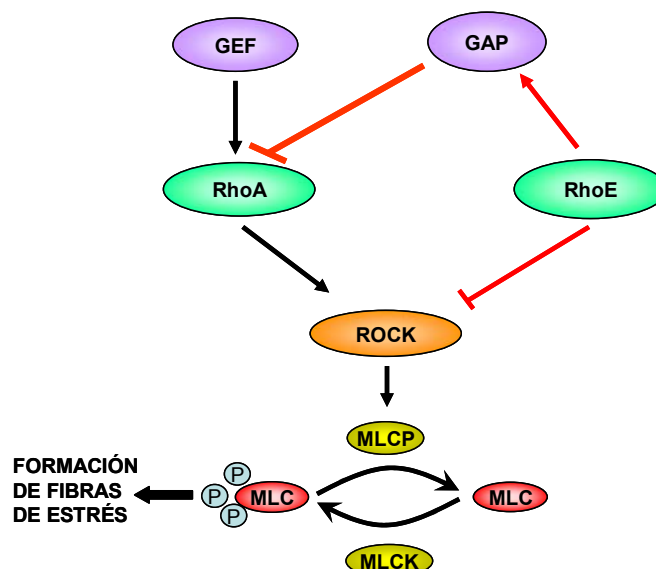
La capacidad de las células eucariotas para mantener o cambiar su forma y nivel de anclaje al sustrato en respuesta a señales externas, depende en gran parte de la reorganización de su citoesqueleto. Dicha reorganización juega un papel importante en diversos procesos como la movilidad celular, citoquinesis o fagocitosis (Heasman and Ridley, 2008; Ridley, 2001; Ridley, 2006).

El citoesqueleto de las células está compuesto por filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos de actina y miosina; estos microfilamentos de actina

pueden organizarse para formar diferentes estructuras entre las que se encuentran los filopodios, los lamelipodios y las fibras de estrés (Purves et al., 2004b).

Los miembros de la familia Rho constituyen el grupo de reguladores más importante de la dinámica del citoesqueleto en células eucariotas, y juegan un papel crucial en los procesos biológicos como la movilidad o el cambio en la forma celular (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005; Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). En células de mamífero, los miembros mejor caracterizados de la familia Rho son RhoA, Rac 1 y Cdc42. En su conformación activa son capaces de unirse a diferentes efectores, muchos de los cuales, están implicados directamente en la regulación del citoesqueleto (Hall and Nobes, 2000; Kozma et al., 1995).

Se ha demostrado que RhoA induce la formación de fibras de estrés y la aparición de adhesiones focales (Ridley and Hall, 1992). Existen numerosas proteínas que son capaces de unirse a la forma activa de RhoA y que dan lugar a la formación de fibras de estrés y adhesiones focales en diversos tipos celulares. En particular se han descrito una serie de proteínas con actividad serina/treonina kinasa de la familia ROCK llamadas ROK $\beta$  (ROCK I o Rho-kinasa) o la proteína p160 ROCK (ROCK II o ROK $\alpha$ ) (Matsui et al., 1996; Nakagawa et al., 1996). La interacción de Rho con estas proteínas aumenta su actividad kinasa (Ishizaki et al., 1996; Kakimoto et al., 2004; Leung et al., 1995).



Esquema 3. Esquema representativo de la vía de señalización RhoA-ROCK-MLC y de la función antagonista de RhoE frente a RhoA mediante la inhibición de ROCK y la activación de p190GAP.

El análisis de la función de ROCK I proviene de los estudios realizados *in vitro* con una de sus dianas: la cadena ligera de la miosina (MLC). La MLC presenta dos estados: una forma fosforilada (activa) y una forma no fosforilada (inactiva). La regulación de estos dos estados conformacionales viene determinada por una kinasa (MLCK) y una fosfatasa (MLCP). ROCK I es capaz de unirse a la forma activa de RhoA (Rho-GTP) y a su vez a MLCP, fosforilándola e inactivándola. De este modo, y sin actividad fosfatasa, la MLCK es capaz de fosforilar a la MLC (Ikeda et al., 2003), lo que da lugar a la formación de fibras de estrés (Esquema 3) (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Por otra parte, la proteína Rac juega un papel importante en la reorganización del citoesqueleto inducida por factores de crecimiento en fibroblastos. La microinyección de una forma activada de Rac (RacV12) es suficiente para inducir la formación de lamelipodios y fibras de estrés (Ridley and Hall, 1992).

En cuanto Cdc42 se ha visto que su sobreexpresión en fibroblastos desencadena la formación de filopodios en la periferia celular, seguido de la formación de lamelipodios (Kozma et al., 1995).

### **1.1.2. Proteínas Rnd**

La subfamilia Rnd (*round*) representa un subgrupo dentro de las proteínas Rho. Está compuesta por Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE. Estas proteínas se caracterizan por poseer unas propiedades inusuales dentro de la familia Rho, debido a la carencia de actividad GTPasa intrínseca, con lo que no son capaces de unirse a GDP, permaneciendo, por tanto, constitutivamente activas (Chardin, 2006).

De manera similar a otras proteínas Rho, las proteínas Rnd son capaces, entre otras funciones, de actuar sobre el citoesqueleto de actina. Además de su función a este nivel, también participan en la regulación del ciclo celular y en diversos aspectos del desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Chardin, 2006).

A diferencia de otros miembros de la familia Rho, las proteínas Rnd sólo se han encontrado en animales vertebrados (mamíferos, aves, ranas y peces), lo que podría indicar una posible relación con funciones más sofisticadas en el citoesqueleto como, por ejemplo, la plasticidad neuronal (Chardin, 2006).

Las proteínas Rnd también juegan un papel importante en el control del citoesqueleto de actina. Concretamente, se ha demostrado que inhiben la formación de fibras de estrés e inducen la pérdida de adhesiones focales, de manera que



las células resultantes, pierden por tanto la capacidad de extenderse y adquieren forma redondeada, fenotipo celular que da lugar a su nombre (Guasch et al., 1998).

En general, se considera que las proteínas Rnd juegan un papel antagonista a las proteínas Rho a través de dos mecanismos. Uno de ellos mediante su unión con la proteína p190-Rho-GAP: las proteínas Rnd son capaces de interactuar con esta proteína aumentando la actividad GTPasa intrínseca de RhoA, teniendo como consecuencia una inactivación de la misma y la inhibición de la formación de fibras de estrés. Se ha visto que, por ejemplo, mientras que la activación de RhoA promueve la retracción de las neuritas, la de Rnd1 se relaciona con la extensión de las mismas (Chardin, 2006). Además de la inhibición mediante p190-Rho-GAP, se ha descrito que RhoE es capaz de inhibir directamente la función de RhoA (ver Esquema 3), uniéndose a ROCK I, su principal efector e impidiendo que éste realice su función sobre MLC (Riento et al., 2003).

En cuanto a Rnd2, se ha visto que no posee los mismos efectos sobre fibroblastos que los otros miembros de la familia Rnd (Nobes et al., 1998), siendo su unión a p190-Rho-GAP muy tenue (Wennerberg et al., 2003).

Hasta el momento apenas se sabe sobre la expresión y localización de estas proteínas *in vivo*. En diversos estudios se ha comprobado mediante la técnica de Northern blot la presencia de ARNm en diferentes órganos de ratas adultas, observando altos niveles de Rnd1 en encéfalo e hígado y de Rnd2 en testículos (minoritariamente también en encéfalo). Por el contrario, la expresión de RhoE se describe como ubicua y en general con bajos niveles, apareciendo en encéfalo, páncreas, timo y testículo (Nobes et al., 1998).

### **1.1.3. RhoE/Rnd3**

Una de las proteínas de la subfamilia Rnd que recientemente ha suscitado la atención de numerosos investigadores es RhoE (también conocida como Rnd3). RhoE regula la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular de una forma antagónica a RhoA. La microinyección de RhoE en macrófagos produce una reorganización de los filamentos de actina, que forman extensiones similares a filopodios o pseudópodos. En células epiteliales MDCK, RhoE provoca la desaparición de fibras de estrés. Curiosamente, RhoE no afecta, en este tipo celular, a la reorganización de los filamentos de actina que se relacionan con la membrana plasmática y que está descrito que están regulados por RhoA (Guasch et al., 1998).

La sobreexpresión de RhoE produce la pérdida de fibras de estrés y de las adhesiones focales, promoviendo un aumento de la migración celular mediante la

inhibición de ROCK I (Guasch et al., 1998; Riento et al., 2003). La unión de RhoE a ROCK I se produce a través de su región N-terminal, una zona diferente a la que se une RhoA (Fujisawa et al., 1996). Sin embargo, RhoE y RhoA no son capaces de unirse a ROCK I de manera simultánea. En concreto, se ha planteado una hipótesis que implicaría que, cuando ROCK I está inactiva (no fosforilada), RhoE es incapaz de unirse, y es necesario que ROCK I se active para adoptar una conformación abierta y permitir así su unión a RhoE (Riento et al., 2003). La unión en primera instancia de RhoA a ROCK I podría inducir esta conformación abierta y permitir, su posterior unión a RhoE, favoreciendo la inhibición de su actividad y la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales en fibroblastos.

Además de su función sobre la organización del citoesqueleto, RhoE contribuye a la regulación de la proliferación y transformación celular, de esta manera se ha comprobado que RhoE posee un papel en la regulación de la proliferación celular en líneas tumorales. Así, la sobreexpresión de RhoE produce una parada del ciclo celular y, además, induce apoptosis en líneas de glioblastoma, melanoma y carcinoma de colon, resultados que han llevado a proponer a RhoE como posible supresor de tumores (Poch et al., 2006; Villalonga et al., 2004).

## **1.2. Desarrollo del sistema nervioso central**

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) es un proceso extremadamente complejo, que comprende la generación y diferenciación de las neuronas, la formación de vías axonales y la elaboración de gran número de sinapsis, imprescindibles para un correcto funcionamiento del sistema. Las alteraciones en los mecanismos normales del desarrollo neuronal dan lugar a un número importante de defectos encefálicos congénitos.

La formación del SNC comienza con la separación de las tres capas germinativas, ectodermo, mesodermo y endodermo. El ectodermo, entre otras estructuras, forma la totalidad del SNC. En primer lugar el neuroectodermo se hace más grueso y forma un epitelio cilíndrico denominado placa neural, que posteriormente se pliega dando lugar al tubo neural, el cual en último término originará el encéfalo y la médula espinal. A nivel celular se producirán divisiones, diferenciaciones de múltiples tipos de células, migraciones, extensión de neuritas, formación y posterior maduración de sinapsis. Numerosos son los mecanismos implicados en el desarrollo del SNC y basados en la interacción de las células precursoras neurales con señales

extracelulares, así como con moléculas de adhesión y reconocimiento que determinan la identidad apropiada, las posiciones y las conexiones de las neuronas en desarrollo (Purves et al., 2004b).

El posicionamiento de las células depende, mayoritariamente, de la migración de los neuroblastos en el encéfalo fetal. La localización final de las células nerviosas posmitóticas es en especial importante porque la función neural depende de conexiones precisas entre las neuronas y sus estructuras diana. Si bien la mayor parte de las migraciones se producen durante la vida fetal, en algunos sistemas, como por ejemplo en las células que partiendo de la zona subventricular del telencéfalo (ZSV) alcanzan el bulbo olfatorio (BO) a través de la corriente migratoria rostral (CMR), se mantiene un flujo constante de migraciones celulares hasta la vida adulta, al menos en roedores (Wichterle et al., 1997).

Tanto para este tipo de movimientos celulares, como para la extensión de los axones de las células y la formación del cono de crecimiento, es necesaria la formación de lamelipodios y filopodios, que en el caso del crecimiento axonal, modulan los cambios en la forma del cono de crecimiento y por último el recorrido del axón a través de los tejidos en desarrollo (Purves et al., 2004b).

### **1.2.1. Neurogénesis en la zona subventricular**

La neurogénesis es un proceso muy complejo que se lleva a cabo en diferentes capas germinativas que, frecuentemente, se localizan lejos del destino final de las células. La formación de la arquitectura del cerebro y de las conexiones entre las neuronas correspondientes depende, en gran medida, de la capacidad de las jóvenes neuronas de migrar, en ocasiones, a largas distancias. Es un proceso que, mayoritariamente, ocurre a nivel embrionario, de manera que durante mucho tiempo se consideró que no existía formación de nuevas neuronas en el SNC desarrollado. Sin embargo, se ha comprobado que, al menos en los roedores, existen dos zonas en las que se mantiene la formación de nuevas neuronas en el animal adulto: el hipocampo y la zona adyacente a los ventrículos laterales o ZSV (Eriksson et al., 1998; Kempermann and Gage, 1999).

En el caso de las células de la ZSV, las células allí formadas migrarán rostralmente hasta el bulbo olfatorio, donde se diferenciarán en células granulares y periglomerulares, a través de un camino que se denomina CMR. A este tipo de migración se denomina migración tangencial (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; Purves et al., 2004b; Wichterle et al., 1997).

Durante el desarrollo embrionario la zona proliferativa se sitúa en la zona ventricular, en la que se generan las neuronas que migran y forman estructuras en todo el cerebro. La ZSV es un segundo foco germinal que se forma más tarde durante la embriogénesis y genera tanto neuronas como células de la glía. Durante el desarrollo peri y postnatal, estas zonas proliferativas, disminuyen hasta quedar únicamente como una pequeña capa en la ZSV. En esta pequeña zona de proliferación permanecen 4 tipos celulares característicos (Doetsch et al., 1997). Por un lado, una monocapa de células endimarias multiciliadas (células E) dispuestas en la pared del ventrículo que permanecen en contacto con el lumen. Junto a éstas aparece una población de astrocitos (células B) que son las células madre neurales adultas (Doetsch et al., 1999); estas células extienden protusiones de la membrana intercalándola con las células endimarias. Las células B realizan divisiones simétricas con las que se renuevan, y divisiones asimétricas por las que generan una amplia población intermedia, las células-C (Doetsch et al., 1999). Las células C generan, tras su división, un tercer tipo de precursor que son los neuroblastos migrantes (células A). Estas células delimitan la parte anterior de la ZSV y migran a través de la CMR hasta el BO, donde se diferenciarán a interneuronas de la capa granular y periglomerular (García-Verdugo et al., 1998; Lois et al., 1996).

La anatomía de las paredes laterales de los ventrículos cambia dramáticamente durante el desarrollo postnatal del ratón. Las regiones periventriculares germinales disminuyen de manera drástica y dos semanas después del nacimiento ya son prácticamente iguales que en el cerebro adulto. Sin embargo, la neurogénesis persiste en la ZSV del cerebro durante toda la vida del animal adulto (Tramontin et al., 2003).

### **1.2.2. El sistema motor: la unión neuromuscular**

De igual manera que en el desarrollo del SNC, durante el desarrollo embrionario se dan todos los procesos necesarios para la correcta formación de las sinapsis neuromusculares y el desarrollo del sistema nervioso periférico.

La unión neuromuscular se define como la sinapsis química entre una motoneurona alfa y una célula muscular. La unión neuromuscular de los vertebrados es una sinapsis colinérgica nicotínica en la que el neurotransmisor es la acetilcolina y su agonista la nicotina. La unión neuromuscular está formada por tres elementos celulares: la motoneurona, la fibra muscular y las células de Schwann. Las porciones sinápticas de estos tipos celulares están altamente especializadas para la correcta innervación de la musculatura.

La motoneurona consta de un cuerpo celular, o soma, ubicado en el asta ventral de la médula espinal y en algunos núcleos encefálicos, dendritas, y un axón mielinizado por las células de Schwann, que sale de la médula espinal. Cuando llegan cerca del músculo que han de inervar, se dividen progresivamente de manera que un mismo axón puede inervar desde uno a cientos de miocitos o fibras musculares. El terminal axónico está especializado en la liberación de la molécula neurotransmisora. En él se encuentran gran cantidad de vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor acetilcolina, que se libera al espacio sináptico (Purves et al., 2004a).

Los músculos están formados por fibras musculares multinucleadas. La membrana de la fibra muscular (membrana postsináptica), se enfrenta directamente con el terminal nervioso y está altamente especializada para responder rápida y eficientemente al efecto del neurotransmisor liberado por el terminal nervioso. La membrana postsináptica presenta una concentración elevadísima de receptores de acetilcolina (AChRs, de *acetylcholine receptors*) (Salpeter and Loring, 1985). Aunque se encuentran AChRs a lo largo de toda la fibra muscular, la densidad de éstos en el área sináptica es 1000 veces superior a la extrasináptica (Salpeter et al., 1988). La agrupación de los receptores de acetilcolina da lugar a unas estructuras de morfología peculiar, que algunos definen como “pretzel”, que irá cambiando conforme se desarrollen y maduren las sinapsis neuromusculares, simultáneamente con el proceso de eliminación sináptica.

En el momento del nacimiento los AChR se encuentran alineados y formando placas ovas. Es, posteriormente, durante el desarrollo postnatal temprano, cuando las placas se perforan formando huecos dentro de ellas. Este proceso continúa con la transformación de las placas en forma de ramas acabando finalmente con la forma característica de “pretzel” (Sanes and Lichtman, 2001). Esto tiene lugar en las primeras semanas postnatales y permite la identificación de distintos tipos de sinapsis según el grado de maduración de las mismas (Lanuza et al., 2002).

Las fibras musculares en el ratón se forman alrededor de los días 12-14 de desarrollo embrionario. En cada fibra muscular, los receptores de acetilcolina se van agrupando y, hacia el día 17 de gestación, se establece el patrón maduro. Para la especialización de los terminales nerviosos pre y postsinápticos se requiere la coordinación entre los terminales nerviosos y el músculo (Sanes and Lichtman, 2001). Aunque la inervación no es necesaria para la formación del músculo (Hughes et al., 1992; Nikovits et al., 2001), la formación de las sinapsis, la formación de ramas nerviosas intramusculares y la supervivencia neuronal requieren de señales recíprocas entre el nervio y el músculo (Heeroma et al., 2003; Kablar and Rudnicki, 1999; Terrado

et al., 2001). Durante el desarrollo normal de las uniones neuromusculares, las miofibras inicialmente están inervadas por más de una motoneurona. Conforme progresa el desarrollo postsináptico se reducen los contactos múltiples hasta que las miofibras quedan inervadas por una sola motoneurona. Con la maduración, aproximadamente la mitad de las motoneuronas degenera (Witzemann, 2006).

### **1.3. Proteínas Rho y SNC**

En los últimos años se han puesto en evidencia el papel de las proteínas Rho en diversas funciones relacionadas con el desarrollo y fisiología del sistema nervioso. Precisamente por su función como moduladores del citoesqueleto, muchas de estas proteínas juegan un papel importante en diversos aspectos del desarrollo neuronal, como son la migración neuronal, la formación y crecimiento de neuritas o la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas (Govek et al., 2005; Talens-Visconti et al., 2010). En consecuencia, estas proteínas están implicadas en la correcta formación del complejo entramado de conexiones neuronales (Nakayama et al., 2000; Threadgill et al., 1997). Las funciones de los diferentes miembros de la familia Rho siguen dos formas de actuar: mientras que Rac y Cdc42 inducen la formación y extensión de las dendritas, RhoA se encarga de su retracción. Así, se ha comprobado que Cdc42 en cooperación con Rac es capaz de estimular el crecimiento axonal (Kozma et al., 1997). En oposición a ellas RhoA induce el colapso del cono del crecimiento mediante la activación de su efector ROCK I (Gallo, 2006; Wahl et al., 2000). También se ha descrito que miembros de la familia Rho intervienen en la migración celular (Nobes and Hall, 1999; Zipkin et al., 1997), así como en la formación de sinapsis neuromusculares (Weston et al., 2000).

La importancia de las proteínas Rho en el funcionamiento del sistema nervioso se ha demostrado porque mutaciones de sus efectores y reguladores contribuyen a diversos problemas neurológicos, de manera que, bien las proteínas Rho directamente, bien sus reguladores, han sido implicadas en numerosas enfermedades del sistema nervioso (Linseman and Loucks, 2008). Se ha visto que las vías de señalización de estas proteínas son esenciales para el desarrollo cognitivo normal y que varios genes que aparecen mutados en el retraso mental ligado al cromosoma X son componentes de las vías de señalización de las proteínas Rho (Boda et al., 2006; Govek et al., 2005; van Galen and Ramakers, 2005). También esta familia de proteínas parece implicada en la progresión de la muerte celular que tiene lugar tras una isquemia cerebral o en casos de excitotoxicidad (Semenova et al., 2007; Trapp et al., 2001). Igualmente, la activación de la vía Rho/ROCK inhibe el crecimiento de las

neuritas, influyendo, por tanto, negativamente en la reparación de las neuronas del sistema nervioso central tras una lesión traumática (Hirose et al., 1998; Monnier et al., 2003; Mueller et al., 2005). Por ello, se ha sugerido que la inhibición de estas vías podría mejorar la recuperación funcional en algunas formas de neurotrauma.

De especial interés es el hecho de que las motoneuronas (aunque también otros tipos neuronales como las neuronas simpáticas del ganglio cervical craneal) requieren la correcta expresión de Rho y/o Rac para su supervivencia tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, en ratones que expresan mutantes dominantes negativos de RhoA o ROCK muestran un aumento de la apoptosis en las motoneuronas durante el desarrollo (Kobayashi et al., 2004).

Igualmente destacable en relación a la fisiopatología de las neuronas motoras es que se ha comprobado que alsin, el producto del gen ALS2, cuya mutación es causante de algunos casos de esclerosis lateral amiotrófica, es un GEF que activa Rac1, y, al menos *in vitro*, parece que gran parte de la capacidad que alsin tiene para inducir la supervivencia de las motoneuronas es vía Rac1 (Jacquier et al., 2006; Topp et al., 2004; Yang et al., 2001). En este sentido, se ha descrito recientemente, que la reducción en los niveles del gen SMN *in vitro* (cuyas mutaciones y deleciones ocasionan la atrofia muscular espinal, enfermedad que presenta características similares a la esclerosis lateral amiotrófica pero que afecta a niños) acaba provocando una activación inapropiada de la vía RhoA/ROCK que altera el citoesqueleto y la neuritogénesis (Bowerman et al., 2007).

#### **1.4. Proteínas Rnd en el SNC**

De la misma manera que van apareciendo cada vez más datos que señalan la importancia de diversas proteínas Rho en el funcionamiento del SNC, también, aunque en menor medida, se está empezando a conocer la implicación de las proteínas de la subfamilia Rnd.

Los tres miembros de esta familia están presentes en el SNC. La expresión del ARNm de Rnd1 se ha descrito en la corteza olfatoria, corteza piriforme, estriado, hipocampo, giro dentado y capa granular del cerebelo. Además, niveles menores de expresión están presentes en los colículos, la sustancia negra, el área tegmental ventral y en diversos núcleos del tronco del encéfalo (Nobes et al., 1998). Los niveles del ARNm de Rnd1 se incrementan gradualmente desde el día 14 de desarrollo embrionario, llegando al pico de expresión a los 14 días de edad, para posteriormente disminuir de forma progresiva hasta la edad adulta (Ishikawa et al., 2003).

En cuanto a Rnd2, los mayores niveles del mensajero se encuentran en el cerebelo, en el hipocampo y en la corteza cerebral, aumentando sus niveles, progresivamente, en la vida postnatal (Decourt et al., 2005). Rnd2 parece tener una función especialmente importante en el desarrollo de la corteza cerebral; recientemente, se ha mostrado que Rnd2 es el mayor efector de neurogenin2, proteína que controla la neurogénesis en la corteza cerebral del embrión (Heng et al., 2008). Neurogenin2 puede promover la migración radial de las células corticales a través de la inducción de Rnd2. Rnd2 está presente en las células corticales embrionarias y su bloqueo mediante silenciadores de ARN, genera un defecto en la migración radial de las neuronas de proyección cortical que, además, presentan anomalías morfológicas. La sobreexpresión de Rnd2 en mutantes a los que se les delecciona neurogenin2 recuperan parcialmente el fenotipo ocasionado por la ausencia de la proteína (Heng et al., 2008).

## **1.5. Modelos animales para el estudio de la función de las proteínas**

### **Rho**

La generación de animales en los que se ha eliminado la expresión de alguno de los genes que codifican proteínas Rho, ha proporcionado información muy valiosa sobre el papel de estas proteínas. La eliminación de los genes en estudio por medio de la generación de animales knockout (KO), en algunos casos, ha producido incluso resultados inesperados respecto a lo que predecían los análisis *in vitro*. Hasta la fecha se han descrito varios modelos de ratones KO para diversas proteínas de la familia Rho (Heasman and Ridley, 2008).

Uno de los primeros ratones generados fue el ratón KO de Cdc42. Este ratón muere alrededor de los 7,5 días de gestación por defectos en la organización del citoesqueleto de actina (Chen et al., 2000). Los ratones KO condicionales de Cdc42 tampoco sobreviven al nacimiento y mueren como consecuencia de un descenso en el número y tamaño de los axones en la corteza cerebral, probablemente por la alteración de los filopodios, que son necesarios para la dirección de los conos de crecimiento (Garvalov et al., 2007)

También se han generado ratones en los que se han eliminado la expresión de genes de la subfamilia Rac. El ratón que no expresa Rac1 es letal en etapas embrionarias, y presenta importantes deficiencias en la formación de las capas germinales del embrión (Sugihara et al., 1998). Por otro lado, los animales a los que se ha eliminado la expresión de Rac2, Rac3 y RhoG no presentan grandes alteraciones en el desarrollo, aunque sí presentan defectos concretos en algunos tipos celulares



que no afectan a la viabilidad de los animales (Corbetta et al., 2005; Gomez et al., 2008; Roberts et al., 1999; Vigorito et al., 2004).

Dentro de la subfamilia de RhoA, los ratones que carecen de RhoB y los que carecen de RhoC son viables y no presentan defectos graves en el desarrollo (Hakem et al., 2005; Liu et al., 2001). Únicamente se observa que los ratones RhoB-KO son más pequeños que los controles y presentan defectos en la angiogénesis, el desarrollo de la retina y una mayor predisposición a la formación de tumores (Adini et al., 2003; Liu et al., 2001). Por otro lado aún no hay constancia de la generación de un ratón KO de RhoA.

Uno de los últimos ratones KO de la familia Rho que se ha publicado son los RhoH-KO, estos animales son viables y fértiles (Gu et al., 2006), pero presentan defectos en la maduración de las células-T, generando un déficit de las mismas por el torrente sanguíneo (Dorn et al., 2007; Gu et al., 2006).

Otros trabajos que han contribuido a que se conozcan las funciones de la familia Rho son los que estudian el efecto de la eliminación de la expresión de proteínas reguladoras y efectoras de las mismas. Entre ellos destacan el efecto de la eliminación del regulador p190-Rho-GAP y los de los efectores de RhoA, ROCK I y ROCK II.

La proteína p190-Rho-GAP junto con p190-B es responsable de una fracción importante de la inhibición total de la actividad de las proteínas de la familia Rho (Diekmann et al., 1995; Settleman et al., 1992; Vincent and Settleman, 1999). Los ratones que carecen de p190-Rho-GAP mueren durante el periodo perinatal, sufren severos daños en el desarrollo neuronal, con alteraciones en la morfología del cerebro que carece de cuerpo calloso, presenta defectos en el tercer ventrículo y desorden en las capas celulares de la corteza (Brouns et al., 2000). Ensayos con neuronas de estos ratones han desvelado que la ausencia de p190-Rho-GAP disminuye el número y tamaño de las dendritas (Brouns et al., 2001).

Por otra parte, los ratones KO de ROCK I mueren antes de los 21 días de vida. Además gran parte de los ratones nacen sin parpados y un 50% lo hacen con un defecto en el cierre de la cavidad abdominal (onfalocela) (Shimizu et al., 2005).

Finalmente, los ratones que no expresan ROCK II presentan un aumento en la formación de trombos, disfunción de la placenta, retraso en el crecimiento intrauterino y muerte fetal (Thumkeo et al., 2003).

Hasta el momento, dentro de la subfamilia Rnd no se ha descrito el efecto que causa la eliminación de sus miembros, pero lo que se sabe sobre su papel *in vitro*, como lo que se va conociendo sobre sus funciones in vivo (como por ejemplo que el silenciamiento de Rnd2 es esencial para el desarrollo del cerebro (Heng et al., 2008)) sugieren que pueden ser esenciales en algunos procesos del desarrollo.

En este trabajo, nos planteamos el estudio del papel in vivo de RhoE en el desarrollo del SNC.

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Dada la implicación de la familia de proteínas Rho y más concretamente de la subfamilia Rnd en el correcto funcionamiento y desarrollo del SNC el objetivo global de este trabajo es conocer la localización y función de RhoE en el SNC del ratón. Para ello vamos a:

- Caracterizar la expresión espacio-temporal de la GTPasa de pequeño tamaño RhoE durante el desarrollo embrionario y en el SNC postnatal del ratón.
- Identificar las posibles alteraciones en el SNC causadas por la ausencia de RhoE en un ratón modificado genéticamente.
- Analizar el papel de RhoE en la migración neuronal *in vivo*, y más concretamente en el sistema zona subventricular-corriente migratoria rostral-bulbo olfatorio.
- Determinar la función de RhoE en el sistema motor.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Animales y estabulación

Se utilizaron ratones con un fondo genético mixto C57BL/6 / 129SvEvBrd. Todos ellos tuvieron libre acceso al agua y se alimentaron *ad libitum* con pienso completo para ratones (Harlan Interfauna Ibérica S.L, Barcelona) bajo condiciones controladas de temperatura ( $21\pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad (40-45 %) y fotoperiodo de 12 horas de duración.

Todos los animales utilizados nacieron en nuestro estabulario. Los que se sacrificaron a 0, 7, 15 y 21 días después del nacimiento se mantuvieron con las madres hasta el momento del sacrificio. Los embriones se obtuvieron a partir de hembras gestantes a los 8,5, 9,5, 10,5 y 14,5 días de gestación (dpc). Para cada parámetro analizado se utilizaron al menos 3 individuos.

Las instalaciones, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 1201/2005, y la Transposición de la Directiva Comunitaria 86/609/CEE, 2003/65/CE. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad Ceu-Cardenal Herrera

### 3.2. Generación ratones a los que se les elimina el gen de RhoE (RhoE gt/gt)

La generación del animal RhoE gt/gt se realizó en los laboratorios de la empresa Lexicon (Texas, USA), utilizando la técnica de "exon trapping", metodología que consiste en eliminar la expresión de un gen (en este caso RhoE) mediante la inserción por recombinación homóloga de un vector retroviral que da lugar a un procesamiento aberrante del ARN mensajero correspondiente. Como resultado la síntesis de la proteína no se produce correctamente (Zambrowicz et al., 1998).

En nuestro caso, el vector insertado contenía varias secuencias, entre las que destacan:  $\beta$ -GEO, región que codifica la proteína  $\beta$ -galactosidasa y otorga resistencia a la neomicina, una región SA (splice acceptor), una región SD (splice donor), implicadas en el procesamiento y maduración del ARN mensajero, y finalmente un sitio de poliadenilación, que da lugar al extremo 3' del ARN mensajero.

### **3.2.1. Genotipado de los ratones**

Para la identificación de los genotipos de los animales se realizó la extracción del ADN genómico y una amplificación mediante PCR. Tanto la extracción del ADN genómico como la PCR de genotipación se realizó mediante el Kit REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).

### **3.2.2. Extracción del ADN**

Para la obtención de las muestras se realizó una biopsia de la cola del ratón. Esta porción de tejido se digirió siguiendo el protocolo especificado por el fabricante del kit. A continuación se añadió la combinación de solución de extracción con la solución de preparación del tejido a la cola del ratón durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se calentaron hasta 95° C durante 3-5 minutos y se añadió la solución de neutralización.

### **3.2.3. PCR de genotipado**

Para el genotipado de los ratones se realizó la amplificación de una región del gen de RhoE mediante PCR, para ello se utilizaron los siguientes cebadores:

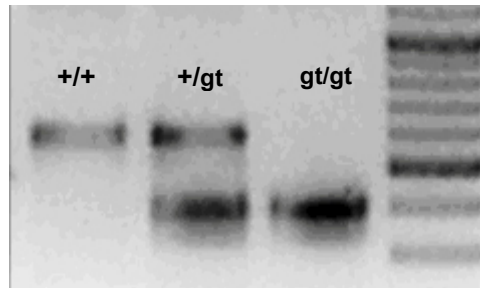
- LTR2-2: AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTAGCTTGC
- Rev3: TGAGCTAGGAAGATGCGGATGT
- RhoE KO dir: TTTACACAGTAGGCTGACTC

Para la identificación de los genotipos se utilizaron 3 cebadores. En el caso del animal +/+ se utilizaron los cebadores RhoE Ko dir y Rev3. Para la identificación del alelo gt se utilizaron los cebadores RhoE Ko dir y LTR 2-2. Los productos de amplificación de los alelos +/+ y gt fueron de 600 y 400pb, respectivamente.

Las condiciones de amplificación empleadas fueron:

- Ciclo de desnaturalización de 15 segundos a 94°C
- 10 ciclos (desnaturalización: 30 segundos a 94°C; anillamiento: 30 segundos a 65°C en cada ciclo descendía 1°C; y polimerización: 40 segundos a 72°C),
- 30 ciclos (desnaturalización: 15 segundos 94°C; anillamiento: 30 segundos a 55°C; y polimerización: 40 segundos a 72°C)
- Ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

Tras la reacción de amplificación los productos de PCR (20 µl de las muestras) se analizaron mediante separación en un gel de agarosa al 1%. Para la visualización de los fragmentos, los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo la luz ultravioleta (Esquema 4).



**Esquema 4. Genotipado de cola de ratón mediante PCR. En el primer carril se observa una banda de 600 pb que se corresponde con el alelo silvestre (+). En el segundo carril se observan ambas bandas (600 pb - 400 pb) correspondientes a los dos alelos + y gt. El último carril solo aparece la banda de 400 pb correspondiente al alelo (gt).**

### **3.3. Sacrificio de los animales y extracción de tejidos**

El sacrificio de los animales se realizó por sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal® solución inyectable. Vetoquinol, Lure cedex Francia). Tras el sacrificio se extrajeron inmediatamente los diferentes órganos. En función de la técnica que se fuera a realizar el tejido se congeló o se fijó para evitar su deterioro.

#### **3.3.1. Extracción de tejido para western blot**

Los encéfalos y las médulas espinales se diseccionaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congelados a -80°C hasta el momento de su uso.

#### **3.3.2. Extracción y fijación de tejidos para histoquímica**

En el caso de los tejidos utilizados para técnicas histoquímicas, los animales fueron perfundidos por vía cardiaca y tras realizar un lavado previo con PBS se procedió a la fijación con PFA 4% pH 7,3 (paraformaldehído al 4% en PBS (tampón fosfato salino 10X: 137mM NaCl, 2,7 mM HCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5)). A continuación, se extrajeron los órganos y se mantuvieron en el fijador durante 8-12 horas. En el caso de los embriones, se sacrificó a las hembras gestantes a los 8,5, 10,5 y 14,5 dpc, y por laparotomía se extrajeron los embriones que se mantuvieron en fijador PFA 4% durante 2-4 horas.

Los tejidos que necesitaban ser incluidos en parafina se lavaron en alcohol al 30 %, para posteriormente, iniciar la inclusión automática utilizando un inclusor de parafina HMP110 (MYR), programado con los siguientes tiempos de incubación: 2 horas con alcohol al 80%, 2 horas con alcohol al 96%, 1 hora con alcohol al 100%, 1 hora con alcohol al 100%, 2 horas con alcohol-xilol, 1 hora con xilol, 1 hora con xilol, 2 horas con parafina, 2 horas con parafina.

Tras incluir las muestras en parafina se realizaron secciones de 4 µm de grosor con un microtomo de parafina HM310 (Microm, Walldorf, Alemania), y se montaron sobre portas impregnados de poli-L-Lisina (Thermo scientific, Walldorf, Alemania). A continuación, se desparafinaron e hidrataron realizando 2 lavados con xilol durante 15 minutos, 2 lavados de 5 minutos con alcohol 100%, 1 lavado de 5 minutos con alcohol 96 %, 1 lavado de 5 minutos con alcohol de 60% y, finalmente, 5 minutos en agua corriente, para la realización de las técnicas descritas a continuación.

En el caso de los tejidos que iban a ser cortados en criostato (Microm Walldorf, Alemania), se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 30% en PBS 1X, se incluyeron en medio OCT (Diapath, Martinengo, Italia), se congelaron a -80°C y se almacenaron a esta temperatura hasta su uso. Posteriormente se realizaron secciones de 20-25 micrometros, que se recogieron en portas cubiertos con poli-L-lisina y que se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **3.4. Análisis de las proteínas mediante western blot**

La metodología de western-blot empleada está descrita en “Current Protocols in Protein Science” (Coligan et al., 2000). Este procedimiento consistió en la separación de proteínas por electroforesis en geles de acrilamida y su posterior transferencia. La presencia de las proteínas estudiadas en las muestras obtenidas a partir de los diferentes órganos de los ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt se puso de manifiesto por medio de anticuerpos específicos.

#### **3.4.1. Aislamiento de proteínas**

Los tejidos extraídos de los animales se homogenizaron en un tampón de lisis (150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1mM DTT, 50mM Tris pH 8.0) más un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Mannheim, Germany) y de fosfatasa (10mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (20.800g, 20 minutos en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5417 R, Barkhausenweg, Germany) se recogió el sobrenadante para su posterior cuantificación.

### **3.4.2. Cuantificación de las proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el kit de detección Bio-Rad protein assay (BioRad, Hercules, CA, USA). La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro modelo Spectronic® 20 Genesys™.

### **3.4.3. Migración electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) se realizó en cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) en geles del 11-15% de poliacrilamida, cargando 50 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5X (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β-mercapto-etanol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos.

Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y un tampón compuesto por 50mM Tris, 27mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realizó a 200V durante 60 minutos.

Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador el Bench/Mark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Paisley, UK).

### **3.4.4. Transferencia**

La transferencia se hizo a una membrana de PVDF (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, MA, USA) durante 1 hora a 100V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y con un tampón compuesto por 20% Metanol, 20mM Tris y 150mM Glicina.

Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavaron con tampón tris salino (TBS, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo en TBS + 0.1% Tween-20, TBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

### 3.4.5. Incubación con el primer y segundo anticuerpo

A continuación las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (tabla 1) disueltos en BSA 3% (Albúmina sérica bovina) en TBT durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se lavaron 3 veces con TBT durante 30 minutos para eliminar los restos de anticuerpo.

Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 45 minutos con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (HRP), y se volvieron a lavar 2 veces con TBT durante 10 minutos cada uno, siendo el último lavado de TBS durante 10 minutos.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Las membranas se expusieron a films X-OMAT de Kodak.

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo primario distinto, fueron tratadas con 200mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron abundantemente con TBS.

Anticuerpos primarios (WB)	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
<b>Anti-NeuN</b>	Millipore	MAB377	1:100	Monoclonal de ratón
<b>Anti.GFAP</b>	Millipore	MAB360	1:2000	Monoclonal de ratón
<b>Anti-MBP</b>	Abcam	Ab7349	1:100	Monoclonal de ratón
<b>anti RhoE</b>	Upstate	05-723	1:500	Monoclonal de ratón
<b>anti Actina-HRP</b>	Sigma	A-3854	1: 20000	Monoclonal de ratón

Anticuerpos secundarios (WB)	Casa comercial	Referencia	Concentración
<b>anti Mouse IgG-HRP (Fc)</b>	Pierce	31437	1 :5000

Tabla 1: Lista de anticuerpos empleados en la realización del western blot.

### 3.5. Análisis de las proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ)

Por medio de esta técnica estudiamos la localización de las proteínas en cortes histológicos.

### **3.5.1. Recuperación antigénica**

Las secciones de tejido desparafinadas e hidratadas se sumergieron en tampón citrato (Acido cítrico 10 mM a pH 8) y se incubaron a 100° C durante 15 minutos para desenmascarar los epítomos de la proteína de manera que pudiera ser reconocida por el anticuerpo primario.

### **3.5.2. Inactivación de la peroxidasa endógena**

Tras lavar los cortes se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena incubando las muestras 40 minutos en oscuridad con una solución de agua oxigenada al 0,3% junto con metanol al 70%. Después se lavaron las muestras 2 veces con PBS durante 10 minutos.

### **3.5.3. Incubación con los anticuerpos y revelado de la reacción**

Para la realización de los siguientes pasos se utilizaron los componentes del Kit Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

En primer lugar se bloquearon las muestras para evitar las reacciones inespecíficas. Para ello, se incubaron las secciones durante 20 minutos con suero de cabra o de caballo. Luego se eliminó el exceso de suero y, sin lavar, se incubaron con el primer anticuerpo diluido en PBS con 3% BSA a 4° C durante 16-18 horas (tabla 2).

A continuación, se lavaron las secciones 2 veces con PBS durante 10 minutos, y se incubaron 40 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado. Posteriormente, se lavaron las muestras 2 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron 40 minutos con el complejo avidina-biotina–peroxidasa.

Finalmente, se lavaron las preparaciones 2 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con diaminobenzidina (DAB, Peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a temperatura ambiente durante 3-5 minutos hasta que se produjo la reacción enzimática. Tras esto, se lavaron los cortes durante 5 minutos en agua corriente, se deshidrataron pasándolos por los alcoholes de 60%, 96% y 100%, y por último, se montaron las muestras con DPX y se dejaron secar 24 horas antes de observarlas al microscopio óptico.

Como control negativo de la reacción se incubaron secciones adyacentes en ausencia del anticuerpo primario.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
$\alpha$ -RhoE	Upstate	05-723	1:500	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -NeuN	Millipore	MAB377	1:100	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -GFAP	Millipore	MAB360	1:1000	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -MBP	Abcam	ab7349	1:100	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -Dcx	Abcam	ab18723	1:500	Policlonal de conejo
$\alpha$ -PSA-NCAM	Millipore	MAB5324	1:50	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -Calbindina	Chemicon	AB1778	1:200	Policlonal de conejo
$\alpha$ -TH	Millipore	AB152	1:500	Policlonal de conejo
$\alpha$ -Reelin	Millipore	MAB5364	1:500	Monoclonal de ratón
$\alpha$ -PCNA	Santa Cruz	SC-56	1:50	Monoclonal de ratón
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
anti mouse IgG Biotilizado	Vector Laboratories	BA-9200	1:300	Policlonal de cabra
anti rabbit IgG Biotilizado	Vector Laboratories	BA-1000	1:300	Policlonal de cabra

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunohistoquímica

### 3.6. Tinción con X-Gal

La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima de origen bacteriano que transforma un sustrato (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- $\beta$ -D-galactósido, o X-Gal) en un producto insoluble y de color azul de manera que otorga esta coloración al tejido en que se expresa la enzima.

Como se ha descrito anteriormente la construcción insertada para alterar el procesamiento del transcrito de RhoE en el ratón incluye el gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Al estar situada dentro de la región codificante, la enzima  $\beta$ -galactosidasa se expresará en este ratón bajo el promotor de RhoE, de manera que en animales RhoE +/gt y RhoE gt/gt, la expresión de la enzima se producirá en el momento y en la localización en la que RhoE debiera estar expresándose.



### 3.6.1. Tinción con X-Gal sobre sección

Los tejidos se seccionaron en el criostato y las secciones seleccionadas se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 - 15 minutos. A continuación se procedió como se indica:

- Postfijación con una solución de paraformaldehído al 0,2% + 2 mM MgCl<sub>2</sub> durante 15- 20 minutos a 4°C
- 2 lavados con PBS+ 2mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos a 4°C, 1 lavado con solución de lavado (PBS, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% desoxicolato sódico, 0,02% NP-40).
- Tinción de las secciones con solución de tinción (5 mM ferrocianuro potásico \* 3 H<sub>2</sub>O, 5 mM ferrocianuro potásico \* 6 H<sub>2</sub>O, 0,01% desoxicolato sódico, 0,02 % NP-40, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml X-gal (Biotest), en PBS. Se incubaron las muestras durante toda la noche a 30°C y en agitación.

A continuación, las secciones se lavaron varias veces en PBS, se tiñeron 3 minutos con eosina 1% y se deshidrataron en alcoholes de 60%, 96% y 100%. Por último, se montaron con DPX y se dejaron secar 24 horas antes de observarlos al microscopio óptico.

### 3.6.2. Tinción con X-Gal en el embrión entero

Los embriones seleccionados se lavaron con PBS al menos 3 veces durante 5 minutos a continuación se procedió como se indica:

- Cada uno de los embriones se lavó con solución de lavado (PBS, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% desoxicolato sódico, 0,02% NP-40) 3 veces durante al menos 20 minutos.
- Posteriormente, se realizó la tinción de las secciones con solución de tinción (5 mM ferrocianuro potásico \* 3 H<sub>2</sub>O, 5 mM ferrocianuro potásico \* 6 H<sub>2</sub>O, 0,01% desoxicolato sódico, 0,02 % NP-40, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml X-gal, en PBS. Se incubaron los embriones durante toda la noche a 30°C y en agitación. Finalmente los embriones se lavaron, se mantuvieron en PBS y se observaron en la lupa.

### 3.7. Tinción con cresil violeta

Para el análisis morfológico de las estructuras del SNC se utilizó la tinción de cresil violeta. Este colorante se compone de una anilina básica (cargada de forma positiva) que se une a regiones basófilas de las células del tejido nervioso.

Se sacrificaron animales de 15 días de vida, se extrajeron los encéfalos (4 animales +/+ y 4 animales RhoE gt/gt), que se fijaron, incluyeron y cortaron tal y como se ha descrito previamente.

Tras desparafinar e hidratar los cortes, éstos se tiñeron con cresil violeta durante 10 segundos. Para retirar el exceso de colorante las preparaciones se lavaron con abundante agua. Posteriormente se deshidrataron y montaron con medio de montaje DPX para su posterior observación al microscopio óptico.

### 3.8. Marcaje con BrdU

La 5-bromo-2-deoxiuridina es un análogo sintético de la timidina que se utiliza para la detección de células proliferantes. Al inyectarlo en el animal se incorpora en el ADN de todas aquellas células que estén en fase S del ciclo celular, pudiendo posteriormente detectar mediante un anticuerpo específico. En nuestro caso se utilizó para analizar la movilidad de las células marcadas con BrdU en la CMR de los ratones.

#### 3.8.1. Incorporación de BrdU

Se escogieron ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt de 9 días de vida a los que se les inyectó intraperitonealmente una solución de BrdU (50mg/kg disuelto en un tampón Tris 0,1M pH 7,3). Pasados 6 días de la inyección se sacrificaron los animales, se les extrajeron los encéfalos, se fijaron y cortaron en secciones de 4 µm de espesor (3 animales de cada genotipo). A continuación se estudió una sección cada 10, contando las células BrdU + presentes en el área ZSV-CMR-BO.

#### 3.8.2. Inmunohistoquímica frente a BrdU

Tras seleccionar y desparafinar las secciones elegidas se trataron de la siguiente forma:

- Recuperación antigénica: Las secciones se sumergieron en tampón citrato (Acido cítrico 10 mM a pH 8) y se incubaron a 100°C durante 15 minutos para desenmascarar los epítomos de la proteína de manera que pudiera ser reconocida por el anticuerpo primario.

- Desnaturalización del ADN de las secciones incubando las secciones con HCl 2N (en PBS con 0,5% tritón) durante 30 minutos a 37°C. A continuación se sumergieron en tampón borato 0,1M pH 8,5 durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
- Repetidos lavados con PBS de forma abundante para retirar los restos de HCl y tampón borato. Posteriormente se realizó el bloqueo de las peroxidasas endógenas incubando las muestras con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03%.
- Tras nuevos lavados se bloquearon las reacciones inespecíficas con BSA 3% suplementado con suero de caballo 1:200.
- Incubación con el anticuerpo primario  $\alpha$ -BrdU (Zymed Laboratories Inc. Ref: 03-3940) que se encuentra biotinilado, por la noche a 4°C.
- Nuevamente 3 lavados con PBS e incubación con el complejo avidina-biotina del kit Elite ABC durante 40 minutos.
- Revelado con DAB a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. La reacción enzimática se paró sumergiendo los cortes en agua.
- Finalmente se contratiñeron con eosina durante 3 minutos y se deshidrataron y montaron con DPX para su posterior observación al microscopio óptico.

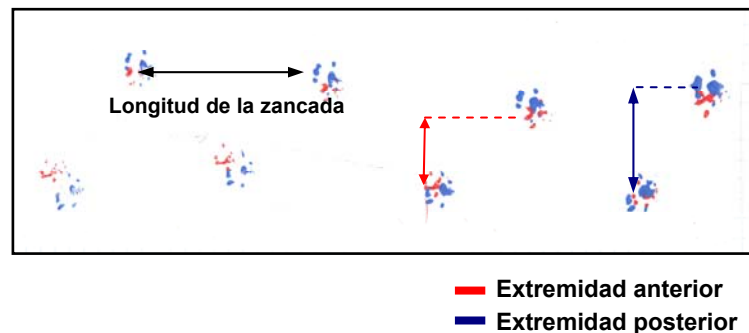
### 3.9. Test de footprint

Este test permite el análisis de la marcha y movilidad de los ratones RhoE gt/gt con respecto a los controles mediante las marcas dejadas por las extremidades pintadas de diversos colores sobre una superficie lisa (Carter et al., 1999). Para obtener las huellas marcadas se mancharon las palmas de las extremidades torácicas de color rojo y las plantas de las pelvianas de color azul con pintura no tóxica. Se preparó una superficie de papel de 50cm de longitud y 10cm de ancho en una caja cerrada, donde se motivó a los animales a caminar con comida dispuesta en el otro extremo; cada ratón realizó dos carreras y se utilizaron 6 ratones de cada genotipo.

En cada footprint se analizaron 3 parámetros (Esquema 5):

- Longitud de la zancada: Se calculó midiendo desde el centro de una huella trasera hasta el centro de la anterior. Puesto que los ratones RhoE gt/gt eran más pequeños que los controles y, lógicamente, tenían una menor longitud de zancada, se decidió calcular la relación entre estos valores para eliminar el efecto del menor tamaño del animal. Para ello se calculó un

- Índice de longitud de zancada para cada ratón, resultado del cociente entre la longitud media de la zancada y la longitud media de los animales de los diferentes genotipos.
- Distancia entre las extremidades: se midió como la distancia entre las huellas derecha e izquierda de las extremidades delanteras y traseras respectivamente.



**Esquema 5. Test de footprint donde se especifican las mediciones tomadas.**

Con posterioridad a la carrera se midieron los diferentes parámetros y se calculó la media para cada animal, y con ella, la media de todos los animales.

### **3.10. Tinción con Hematoxilina-Eosina**

Las tinciones con hematoxilina-eosina permiten el estudio morfológico de los tejidos. La hematoxilina es un colorante azul basófilo que tiñe los núcleos celulares, mientras que la eosina al ser acidófila se une al citoplasma de las células.

#### **3.10.1. Obtención y tinción de las muestras**

Los animales se sacrificaron a los 7 días de vida, diseccionando tríceps braquial y cuádriceps de animales de cada genotipo.

Las muestras desparafinadas e hidratadas se tiñeron de la siguiente manera:

- Hematoxilina durante 5 minutos
- Las secciones se lavaron con abundante agua corriente para retirar el exceso de colorante.
- Eosina 3 minutos

Seguidamente, se lavaron los cortes durante 5 minutos en agua corriente, se deshidrataron pasándolos por los alcoholes de 60%, 96% y 100% y, por último, se

montaron las muestras con DPX y se dejaron secar 24 horas antes de observarlas al microscopio óptico.

### **3.11. Tinción con $\alpha$ -bungarotoxina**

La  $\alpha$ -bungarotoxina es un potente antagonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina, ya que se une irreversible y competitivamente a los mismos bloqueando su actividad. En nuestro caso se utilizó bungarotoxina conjugada con rodamina (Tetramethylrhodamine- $\alpha$ -bungarotoxine, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) detectable mediante microscopía de fluorescencia.

Se seleccionaron los tejidos cortados en criostato y se dejaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos para atemperarse. Posteriormente se lavaron con PBS durante 5 minutos 3 veces y se dejaron en agitación con una solución 0,3 M de glicina en PBS durante 20 minutos para reducir la autofluorescencia.

Transcurrido este tiempo se volvieron a lavar las muestras con PBS y se permeabilizaron con 0,1% tritón en PBS durante 20 minutos.

A continuación se lavaron con PBS y se incubaron con BSA 3% en PBS durante 30 minutos. Finalmente las muestras se incubaron con  $\alpha$ -bungarotoxina 10  $\mu$ M en una solución de 3% de BSA en PBS durante 30 minutos y en oscuridad.

Una vez realizada la incubación se lavaron las muestras con PBS resguardadas de la luz y se montaron con un medio de montaje (Mounting medium for fluorescent with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) que contenía DAPI, para teñir los núcleos celulares.

#### **3.11.1. Medición del tamaño de las placas motoras**

Para la medición de las placas motoras se extrajeron músculos tríceps braquial y cuádriceps femoral de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt de 7 días de vida. Estos músculos se fijaron y tiñeron con  $\alpha$ -bungarotoxina.

Para la medición del tamaño de las placas motoras se utilizó una cámara (Nikon DS-fi1) acoplada a un microscopio óptico (Olympus Bx40) y un programa informático (NIS-Elements BR 2.30) con el que se seleccionó el área a medir obteniéndose un valor en  $\mu\text{m}^2$ . A partir de ese valor se calculó la media de tamaño para cada músculo y posteriormente la media de ese músculo para cada genotipo.

### **3.11.2. Análisis de la maduración de las placas motoras**

Se realizó un análisis morfológico de los agregados de receptores de acetilcolina (AChRs) en los diferentes genotipos para determinar el efecto de la ausencia de RhoE sobre la distribución de los AChRs en la placa motora.

Para ello se estudió el grado de maduración de las placas motoras *in vivo* en animales RhoE +/+ y RhoE gt/gt de 21 días de edad (3 animales de cada genotipo). Para el análisis de la maduración de las placas motoras se realizó con un marcaje con  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada con rodamina se observaron al microscopio y se clasificaron, según lo descrito en (Lanuza et al., 2002), en una escala de maduración que comprendía 6 estadios, en los que M1 era el de menor desarrollo y M6 el que se correspondía con una placa motora totalmente desarrollada similar a las de los animales adultos.

### **3.12. Fijación de nervios con tetraóxido de osmio**

Esta técnica se realizó para la tinción de las vainas de mielina en las fibras nerviosas. El tetraóxido de osmio es un fuerte oxidante que reacciona con lípidos insaturados presentes en las vainas de mielina. La reducción de este reactivo genera un depósito negro en el lugar de la reacción.

Se sacrificaron animales de 21 días de vida tal y como se ha descrito previamente. En este caso se diseccionó el nervio ciático rápidamente y se fijó en PFA 4% durante 2-4 horas.

El protocolo seguido fue el descrito en (Di Scipio et al., 2008). Los nervios se lavaron con glicina 0,2% en PBS durante 1 hora. A continuación se lavaron con PBS varias veces y se sumergieron en una solución de tetraóxido de osmio al 2% en PBS (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) durante 2 horas. Posteriormente se lavaron con alcohol al 30%. Seguidamente se deshidrataron e incluyeron en parafina y se seccionaron en un microtomo. Finalmente se seleccionaron las secciones, se desparafinaron e hidrataron pasándolas por concentraciones decrecientes de alcohol, y se volvieron a deshidratar y montar para su posterior observación al microscopio óptico.

### **3.13. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos representados y sus medias  $\pm$  desviación estándar se utilizó un test de t de Student. Los resultados con  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **4. RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expresión de RhoE en el sistema nervioso central del ratón durante el desarrollo

#### 4.1.1. En ratones adultos, RhoE se expresa mayoritariamente en el SNC

Para empezar el estudio de la proteína RhoE, y dada la falta de información sobre su papel fisiológico en SNC, decidimos comprobar el patrón de expresión que presenta RhoE en animales controles.

En primer lugar, comparamos los niveles de expresión de RhoE en los diferentes órganos del ratón adulto mediante la técnica del western blot. En general la expresión de la proteína fue baja, detectándose los mayores niveles en el encéfalo (**Figura 1A**). Además también detectamos la presencia de RhoE en testículos, hígado y pulmón, mientras que los niveles más bajos se observaron en bazo e intestino. En el timo y los riñones no observamos expresión de la proteína. La doble banda detectada por el anticuerpo así como las ligeras diferencias de tamaño en los diferentes tejidos pudieron ser debidas a modificaciones postraduccionales (Fortier et al., 2008; Klein et al., 2008; Riento et al., 2005).

Para analizar con mayor detalle la expresión de RhoE en el SNC diseccionamos el encéfalo y la médula espinal en varias regiones. Separamos los bulbos olfatorios, estriado, corteza cerebral, hipocampo, diencefalo, mesencefalo, cerebelo y tronco del encéfalo (considerando como tal el puente y la médula oblongada). Además la médula espinal se separó en cervical, torácica y lumbar.

Los resultados del western blot mostraron que RhoE se expresaba en todas las regiones (**Figura 1B**). Los mayores niveles de RhoE en el animal adulto se observaron en el bulbo olfatorio y la corteza, niveles intermedios en el diencefalo, mesencefalo y estriado, mientras que hipocampo, cerebelo y tronco del encéfalo mostraron los niveles más bajos. Los segmentos de médula cervical, torácica y lumbar también expresaron RhoE en niveles menores. La preincubación del anticuerpo con un exceso de la proteína de RhoE provocó la desaparición de la banda correspondiente a la proteína, confirmando así la especificidad del anticuerpo (**Figura 1B**).

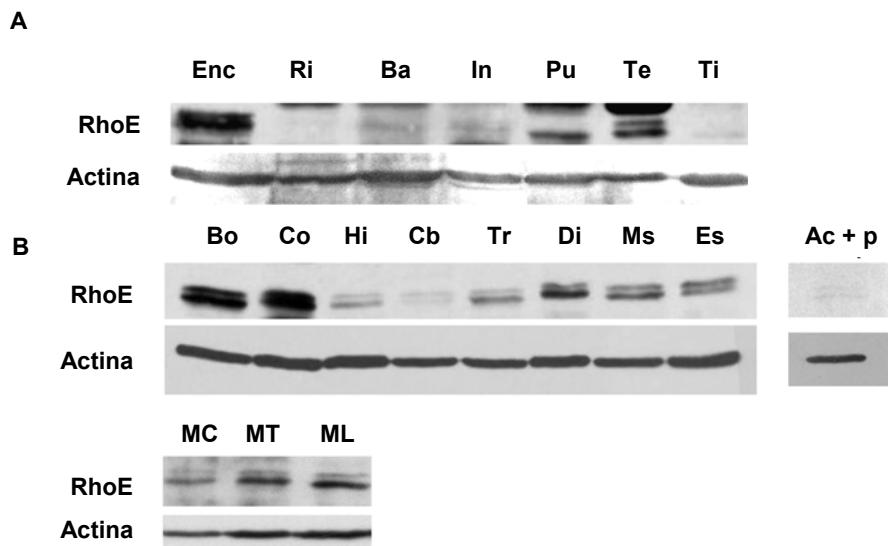


Figura 1. A. Análisis de la expresión de RhoE en diferentes tejidos de ratón adulto. (Enc) Encéfalo, (Ri) riñón, (Ba) bazo, (In) intestino, (Pu) pulmón, (Te) testículo, (Ti) timo. B. Análisis de la expresión de RhoE en diferentes regiones del SNC del ratón adulto. (Bo) Bulbo olfatorio, (Co) corteza, (Hi) hipocampo, (Cb) cerebelo, (Tr) tronco del encéfalo, (Di) diencefalo, (Ms) mesencefalo, (Es) estriado, (MC) médula cervical, (MT) médula torácica, (ML) médula lumbar. En el western blot con extracto de corteza preincubado con el anticuerpo (Ac+p) desaparece la banda que se corresponde con RhoE, demostrando la especificidad del anticuerpo utilizado.

#### 4.1.2. Existe una expresión decreciente de RhoE a lo largo del tiempo en las diferentes regiones del SNC.

Dada la implicación de las proteínas Rho en el desarrollo del SNC, analizamos si la expresión de RhoE estaba regulada a lo largo del desarrollo postnatal del SNC del ratón. Con este propósito analizamos extractos proteicos de animales sacrificados el día de su nacimiento (P0), y a los 7, 15 y 21 días postnatal (P7, P15, P21 respectivamente). Se consideraron animales adultos aquellos mayores de 3 meses.

Al analizar los resultados observamos que, de manera generalizada la expresión de RhoE fue mucho mayor durante las primeras semanas de vida. En el estriado, diencefalo, mesencefalo, tronco del encéfalo, cerebelo y médula espinal la expresión fue mayor en P0, P7 y P15 a partir de ese momento decrecía hasta la edad adulta (**Figura 2**). Por otro lado los niveles de RhoE permanecían elevados en el bulbo olfatorio y en la corteza cerebral a lo largo del desarrollo postnatal y solamente decrecieron ligeramente en el adulto. Curiosamente, los niveles de expresión en el hipocampo llegaban a su máximo en P15 aunque, siguiendo el patrón general, su expresión disminuía posteriormente.

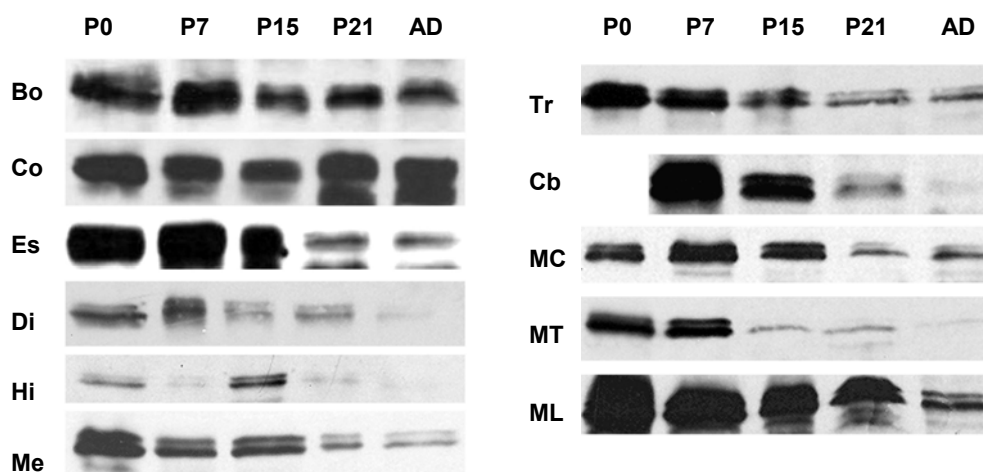


Figura 2. Análisis de la expresión temporal de RhoE a lo largo del desarrollo. Los tiempos analizados son: P0 (animales de 0 días de vida), P7 (7 días), P15 (15 días de vida), P21 (21 días de vida) y AD (animales mayores de 3 meses). (Bo) Bulbo olfatorio, (Co) Corteza, (Es) Estriado, (Di) Diencefalo, (Hi) Hipocampo, (Me) Mesencefalo, (Tr) Tronco, (Cb) Cerebelo, (MC) Médula cervical, (MT) Médula torácica, (ML) Médula lumbar. En general existe una disminución progresiva de la expresión con la edad.

#### 4.1.3. Caracterización inmunohistoquímica de la localización de RhoE en el SNC.

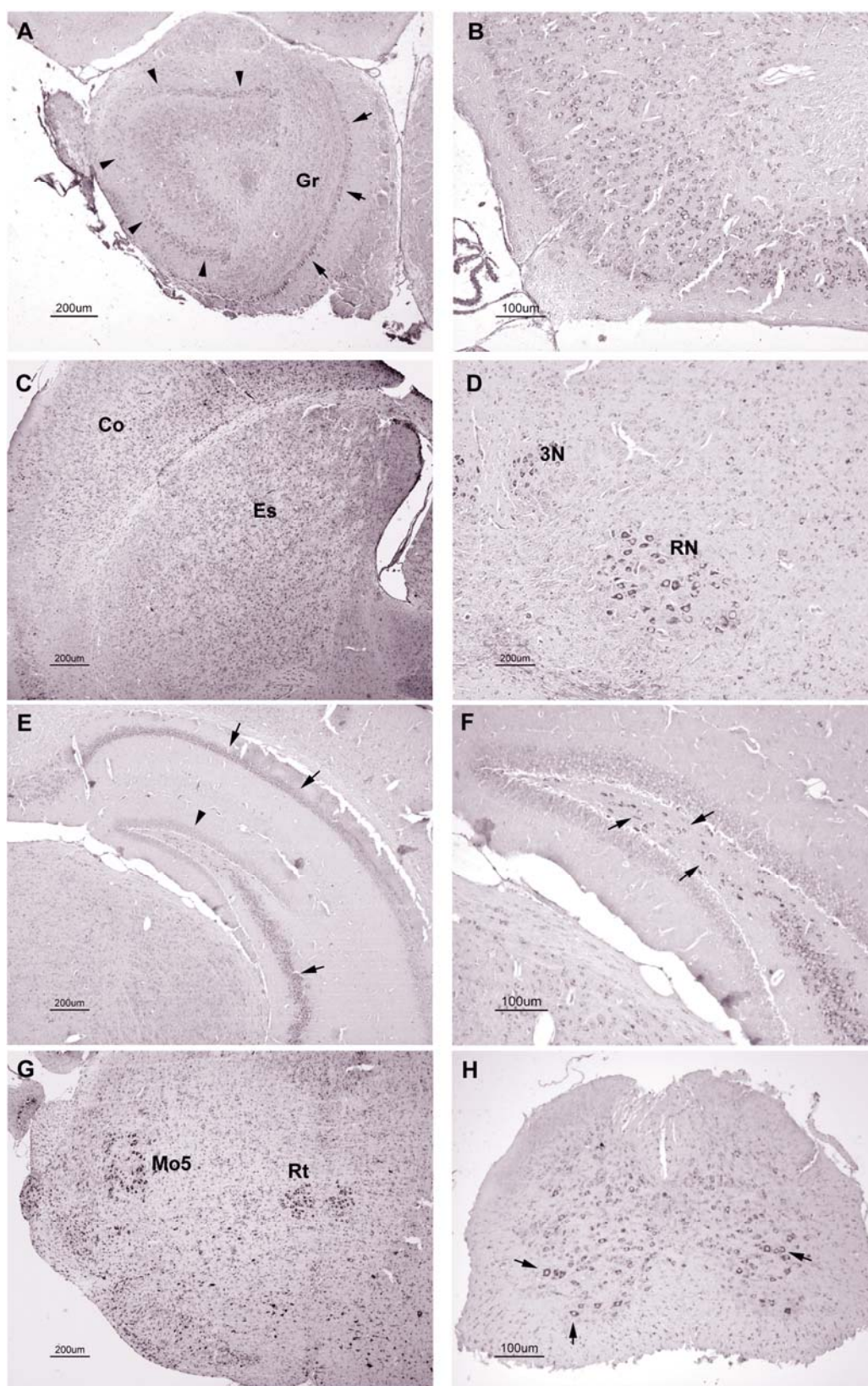
Una vez estudiada la expresión de RhoE en función del tiempo, analizamos la localización exacta de la proteína en el SNC de ratón. Para este estudio utilizamos la edad de 21 días, en este momento la arquitectura del cerebro es muy similar a la del ratón adulto. La descripción del marcaje se realizó mediante la observación de cortes coronales seriados del encéfalo empezando por las zonas más rostrales del mismo, así como en cortes transversales de la médula espinal.

En un primer momento observamos, de acuerdo con nuestros resultados de western blot, que la expresión de RhoE era generalizada por todo el cerebro y la médula espinal. No se hicieron análisis detallados de la descripción subcelular de la proteína pero, según nuestras imágenes RhoE tiene una localización extranuclear o de membrana plasmática, de manera similar a lo previamente descrito en células (Riento et al., 2005; Roberts et al., 2008).

Rostralmente observamos una gran densidad de marcaje en el bulbo olfatorio, en el que aparecían marcadas la mayoría de células de la capa granular, núcleos olfatorios y la capa mitral (**Figura 3A**). En la corteza cerebral la presencia de RhoE se extendía por todas las capas y no se apreciaban diferencias en distintas regiones de corteza (**Figura 3B**). También aparecía de manera muy intensa en el estriado, tálamo, hipotálamo y mesencefalo; esta última zona de entre un marcaje disperso, destacaba

una gran intensidad de marcaje en las neuronas de los núcleos motores y el núcleo rojo (**Figura 3D**). En el hipocampo se observó un intenso marcaje en la capa piramidal CA1, CA2 y CA3 y en la capa de células polimórficas, pero no en la capa granular del giro dentado (**Figura 3E, 3F**). En el tronco del encéfalo destacó el marcaje en los núcleos motores y el núcleo reticulotegmental (**Figura 3G**).

Finalmente, en la médula espinal también se apreció un marcaje generalizado, destacando el asta ventral de la misma, región donde se sitúan las motoneuronas, que también aparecían intensamente marcadas (**Figura 3H**).



**Figura 3.** Inmunodetección de RhoE en cortes coronales del SNC. A. Bulbo olfatorio, en el que se aprecia abundante expresión en la capa mitral (flechas), en la capa granular (Gr) y en los diferentes núcleos olfatorios (puntas de flecha). B. Corteza retrosplenial. C. (Co) corteza y (Es) estriado. D. En el mesencéfalo existe un intenso marcaje en el núcleo oculomotor (3N) y en el núcleo rojo (RN) además de un marcaje disperso. E. En el hipocampo se observa un intenso marcaje en las

capas CA1-CA3 (flechas) mientras que la capa granular del giro dentado no se observa marcaje (punta de flecha). F. Ampliación del giro dentado, detalle de la capa polimórfica (flechas) G. Tronco del encéfalo donde se observa marcaje en el núcleo motor del trigémino (Mo5) y el núcleo reticulotegmental del puente (Rt) H. Sección de la médula espinal, las flechas señalan motoneuronas.

Para confirmar que la localización de RhoE era la misma durante el desarrollo postnatal del ratón, comparamos cortes sagitales de cerebros de animales de 21 días con cerebros de animales de 7 días de vida. A pesar de que se observó que la expresión era la misma que en animales de más edad, destacó, de forma muy interesante, la amplia e intensa expresión en las células que partían de la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio y que formaban la corriente migratoria rostral (**Figura 4B, 4C**).

Por otro lado también se observó un intenso marcaje en la capa de células que corresponde con la capa granular externa del cerebelo, estas células aparecen en las primeras semanas de vida de los animales y posteriormente migran para formar la capa granular interna en el adulto (**Figura 4B, 4D**).



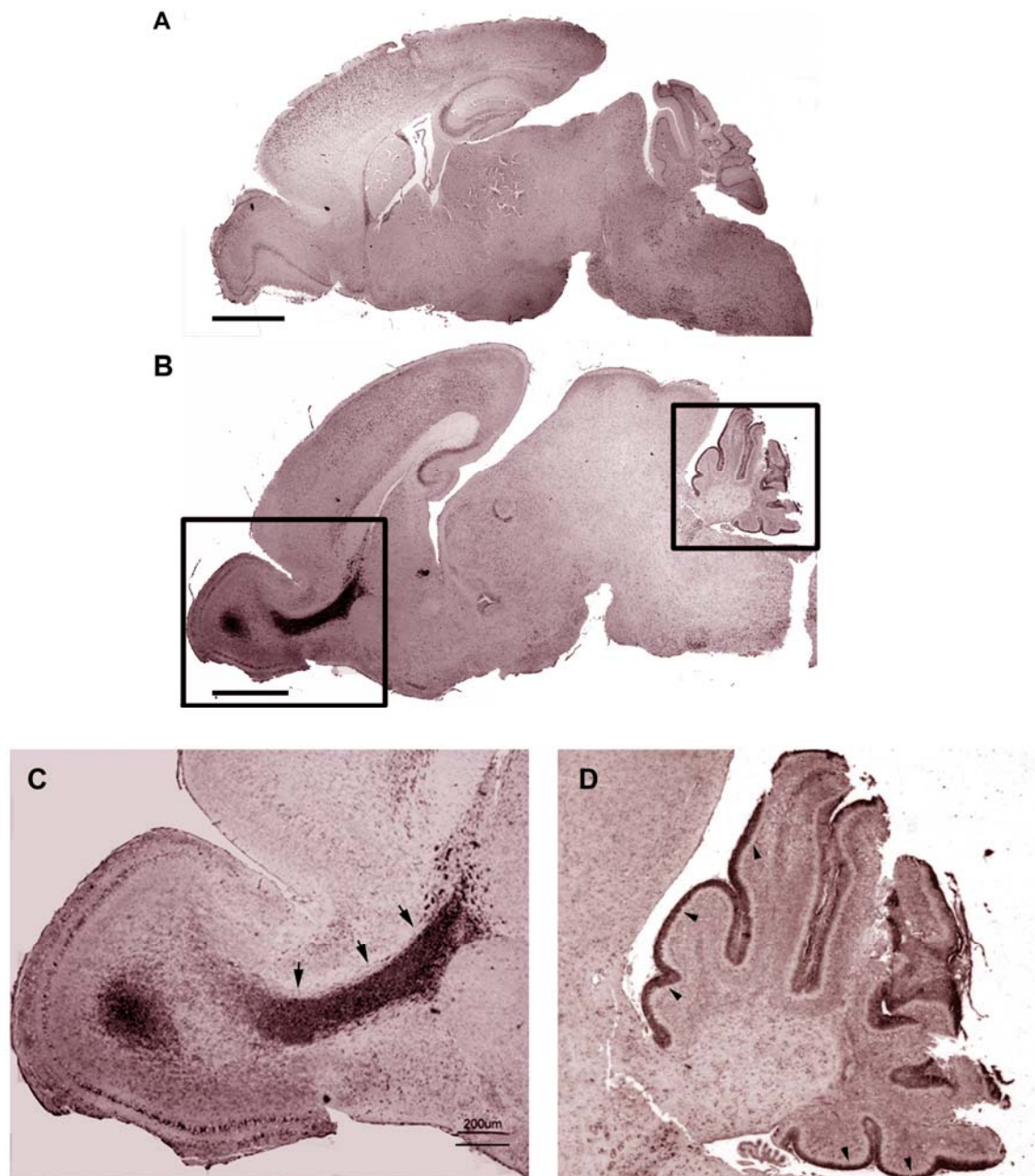


Figura 4. A. Sección sagital de un animal de 21 días. B. Sección sagital de un animal de 7 días, se observa un marcaje generalizado con una mayor intensidad en las células que se corresponden con la corriente migratoria rostral (CMR) (flechas) (C) y en la capa granular externa del cerebelo CGE (puntas de flecha) (D).

#### 4.1.4. Expresión de RhoE durante el desarrollo embrionario del ratón mediante el análisis de la expresión de X-Gal

Como se ha indicado en material y métodos, se generaron ratones heterocigotos para RhoE (+/gt) usando la metodología de “gene-trapping” (Zambrowicz et al., 1998). Dichos animales se mantuvieron en un background híbrido (50% C57BL/6 y 50% 129SvEvBrd). Para la obtención de los ratones deficientes en RhoE (gt/gt) se cruzaron ratones heterocigotos. El genotipo de los ratones utilizados en

nuestros estudios se confirmó por PCR con ADN extraído de las colas. La ausencia de la proteína en animales RhoE gt/gt se analizó por western blot.

Puesto que el cassette insertado contiene la construcción *lacZ* (que contiene el gen de la  $\beta$ -galactosidasa) bajo el control de la región reguladora de RhoE, nos permitió conocer la expresión del gen mediante tinciones con X-Gal en secciones de embriones completos RhoE gt/gt obtenidas en criostato. El color azul obtenido, resultante de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, era indicativo de la expresión de RhoE.

Analizamos embriones desde 8,5 días de vida embrionaria (dpc) en adelante. A 8,5 dpc, RhoE estaba presente en las paredes de la cavidad amniótica así como en el ectodermo no neural. En esta edad también observamos una intensa concentración del marcaje en la notocorda y una tinción más difusa por el mesénquima. En este momento, en el tubo neural en desarrollo no aparecía expresión de RhoE (**Figura 5A, B**).

Conforme avanzaba el desarrollo un gran número de estructuras empezó a expresar RhoE (**Figura 5**). A la edad de 10,5 dpc se observó un intenso marcaje en el mesénquima, concretamente en células que más adelante formarán músculo y hueso (**Figura 5D**). El marcaje con X-Gal en el SNC empezó en esta edad, iniciándose por la parte más externa del tubo neural (**Figura 5D, E**). También apareció en la piel, donde se hizo más evidente a 13,5 -14,5 dpc, como se puede apreciar en las imágenes de tinciones del embrión entero (**Figura 5F**). A 14,5 dpc continuamos observando una expresión generalizada, no sólo por todo el SNC, sino por todo el embrión.

Con más detalle, en el SNC se apreció un fuerte marcaje en la capa intermedia de la corteza cerebral y en la zona endimaria/subendimaria del mesencefalo, diencefalo, y rombencéfalo. Además apareció también muy marcado el estriado e hipotálamo y la zona subventricular del bulbo olfatorio (**Figura 6**).

En el ojo, la mayor intensidad se apreciaba en la capa ganglionar de la retina y de forma más dispersa en el epitelio cuboidal del cristalino (**Figura 6E**). Otra de las estructuras que destacaron por la gran intensidad de marcaje fue el primordio de la cóclea en el oído interno (**Figura 6F**). En las glándulas submandibulares y en el timo el marcaje se apreció en la cápsula y en el estroma (**Figura 6G, H**).

En la cavidad torácica, RhoE se localizaba en el epitelio de revestimiento de la cavidad pleural, en el epicardio, mesénquima pulmonar, de manera dispersa en el miocardio y más intensamente en las válvulas cardiacas (**Figura 7A, B**).



En la cavidad abdominal la tinción con X-Gal estaba presente en las paredes del mesenterio y en el peritoneo. Además también se observaba el marcaje azulado indicativo de la expresión de RhoE en la pared muscular del tubo digestivo (en el intestino y con mayor intensidad en el estómago) y en la cápsula de los órganos abdominales (hígado, riñón, glándulas adrenales) (**Figura 7C**). En el páncreas la tinción de X-Gal era evidente en el tejido exocrino mientras que los islotes de Langerhans no expresaban RhoE (**Figura 7D**). Además, el tubérculo genital y el seno urogenital, así como el mesonefros en degeneración, estaban intensamente marcados (**Figura 7E**). En los primordios de las extremidades la mayor expresión se encontró en el mesénquima que formará los músculos, mientras que por el contrario los huesos en desarrollo dejaban de expresar RhoE (**Figura 7F**).

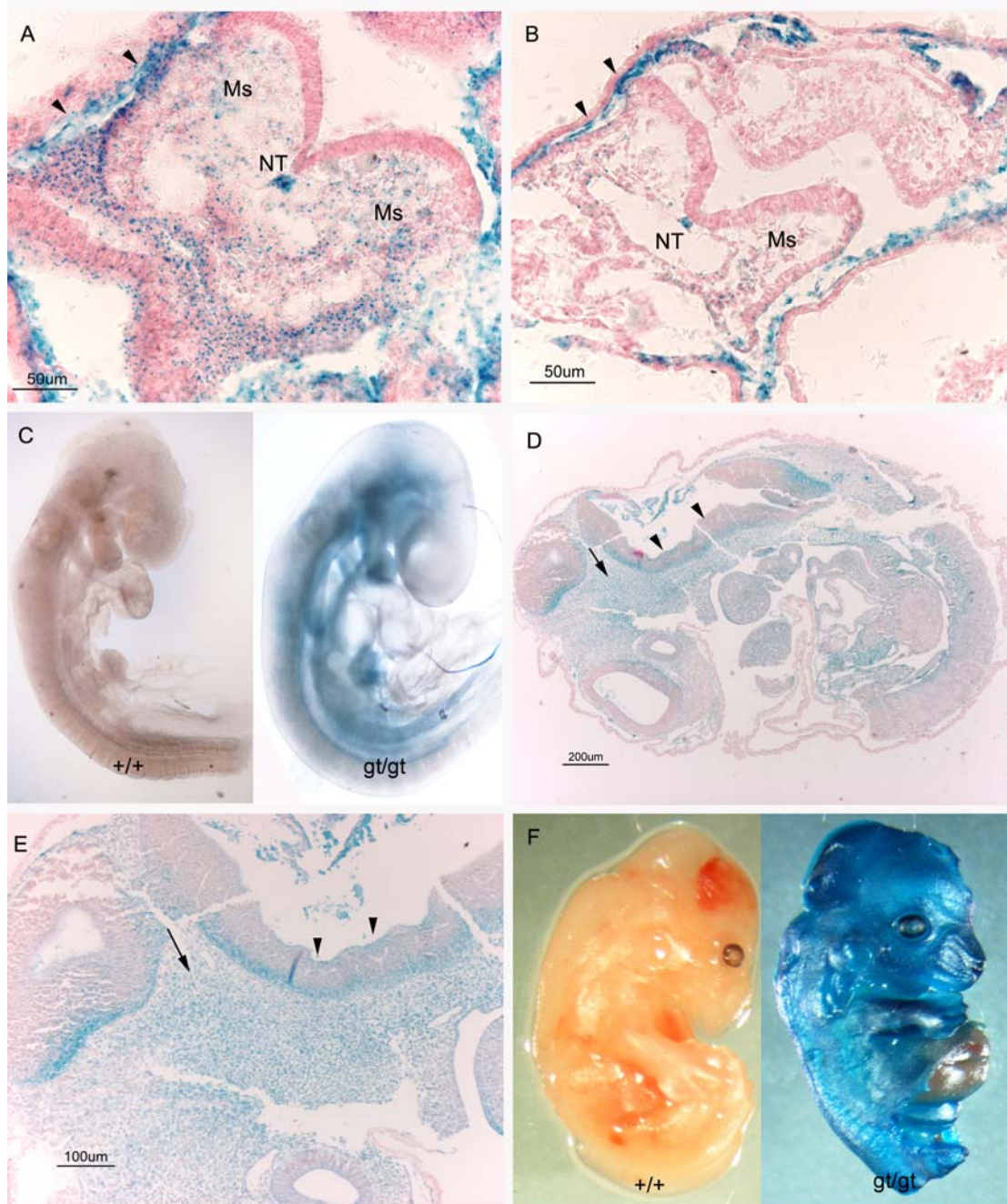


Figura 5. Expresión de RhoE durante el desarrollo embrionario del ratón.

A. y B. Embrión de 8,5 dpc. Las flechas indican la expresión en el mesénquima y las puntas de flecha marcan las paredes de la cavidad amniótica. Además se observa un intenso marcaje en la notocorda (NT).

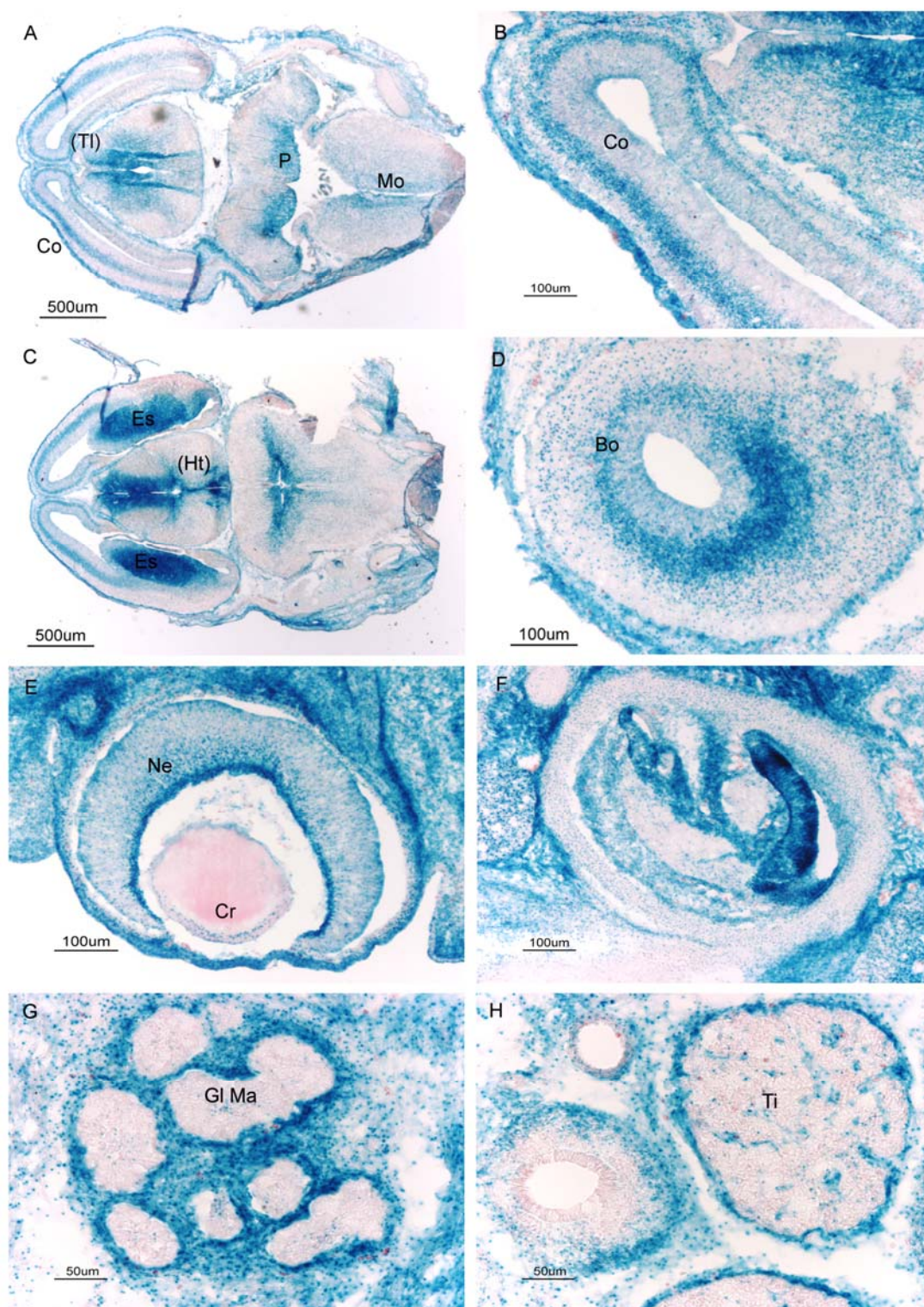
C. Embriones completos RhoE  $+/+$  (panel izquierdo) y RhoE  $gt/gt$  (panel derecho) de 9,5 dpc teñidos con x-Gal en donde se puede apreciar la coloración azul únicamente en el embrión mutante.

D. Sección de un embrión de 10,5 dpc donde se observa una expresión generalizada: la flecha indica una zona mesenquimatosa de células precursoras de músculo y hueso. Las puntas de flecha señalan el tubo neural, cuyo marcaje se aprecia en la periferia.

E. Detalle de la figura D.

F. Embriones de 14,5 dpc teñidos enteros: ratón RhoE  $+/+$  sin coloración (panel izquierdo) y ratón RhoE  $gt/gt$  completamente azul (panel derecho).

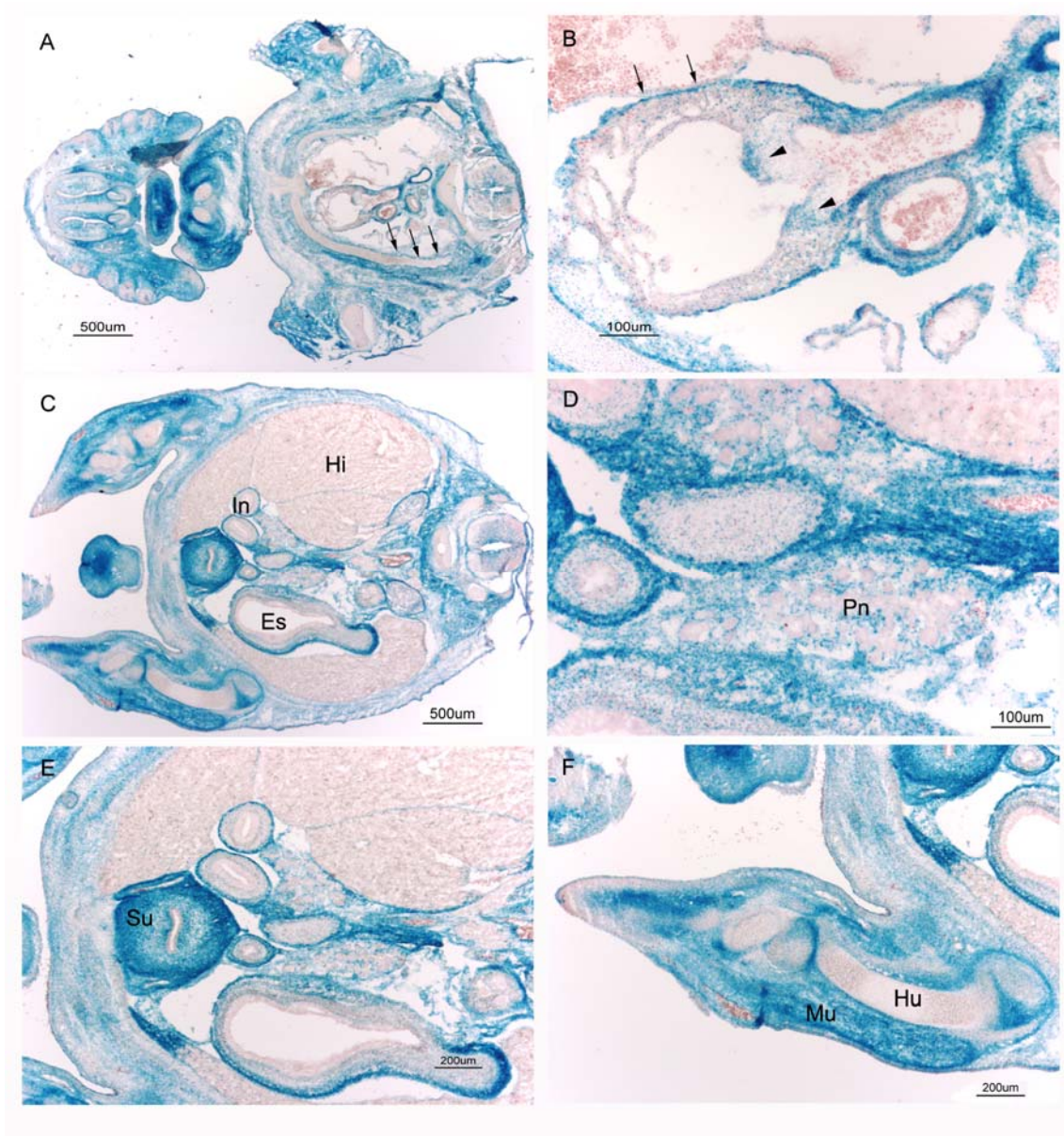




**Figura 6.** Expresión de RhoE durante el desarrollo embrionario del ratón. Cortes transversales de embriones de 14,5 dpc.

**A.** Expresión en el SNC: capa intermedia de la corteza (Co), tálamo (TI), puente (P) y médula oblongada (Mo). **B.** Detalle de la imagen anterior en la que se amplía la zona de la corteza. **C.** Imagen donde se observa una elevada expresión en el estriado (Es), y en el hipotálamo (Ht). **D.** Detalle del bulbo olfatorio. **E.** Sección transversal del ojo en la que se observa marcaje en la capa de neuroblastos de la retina (Ne) y en el epitelio cuboidal de la parte anterior del cristalino (Cr). Expresión en el oído interno (F), en la glándula mandibular (GI Ma) (G) y en el timo (Ti) (H).





**Figura 7. Expresión de RhoE durante el desarrollo del ratón. Secciones transversales de embrión de 14,5 dpc.**

**A. En la cavidad torácica se observa marcaje en las membranas pleurales (flechas) y de forma más dispersa en el mesénquima pulmonar.**

**B. Detalle del corazón: las flechas señalan el miocardio mientras que las puntas de flecha indican un acúmulo de marcaje en las válvulas.**

**C. Cavidad abdominal: aparece marcaje en la cápsula de los órganos abdominales y en la pared muscular del intestino (In) y estómago (Es) . No hay expresión en el parénquima del hígado (Hi)**

**D. Ampliación de la figura C para mostrar la expresión de RhoE en el páncreas (Pn) exocrino.**

**E. Ampliación de la figura C, en la que se observa el intenso marcaje del seno urogenital (Su).**

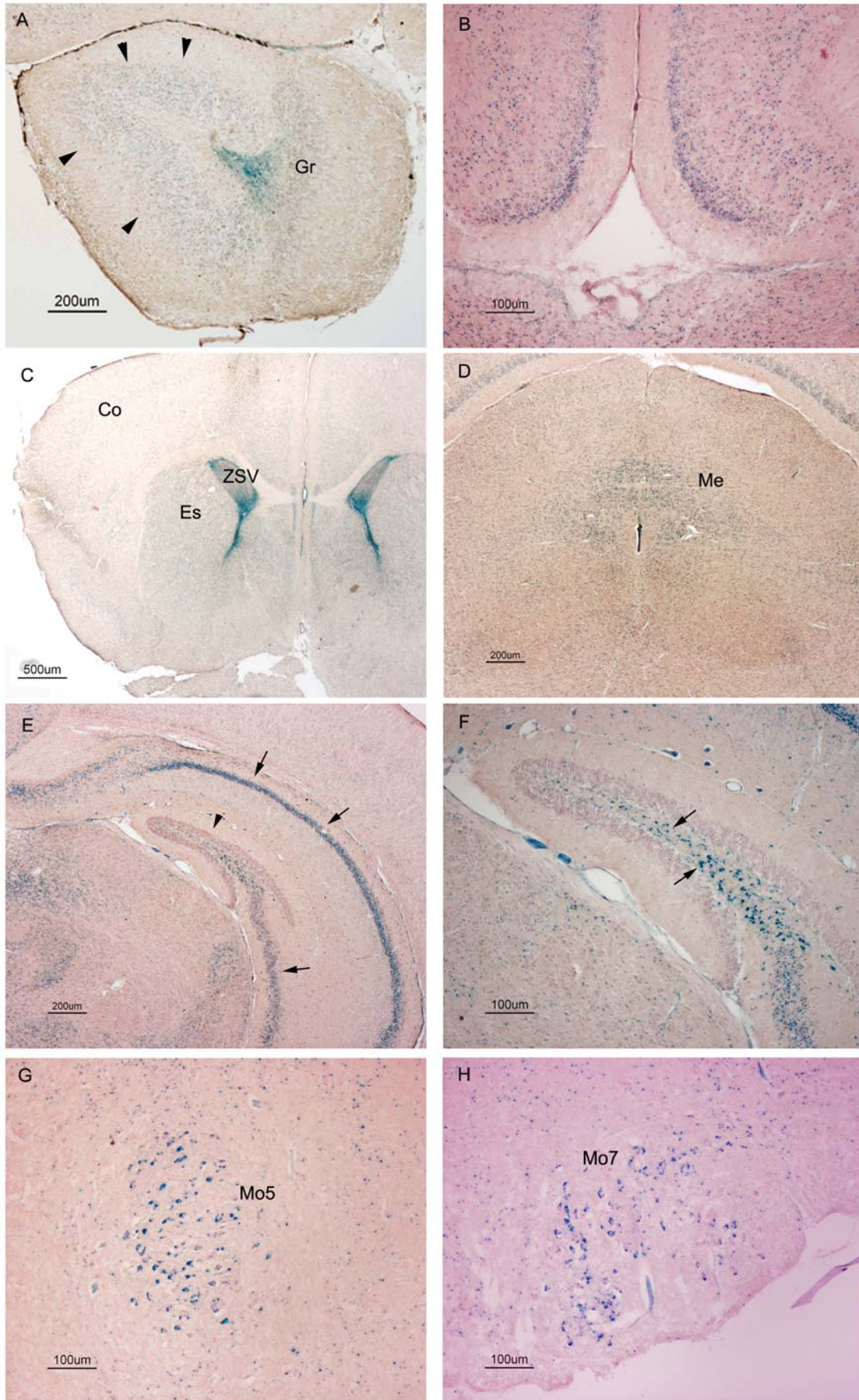
**F. Ampliación de la figura C correspondiente a la extremidad pelviana El músculo esquelético (Mu) se encuentra muy marcado mientras que hueso en desarrollo (Hu) carece de marcaje.**

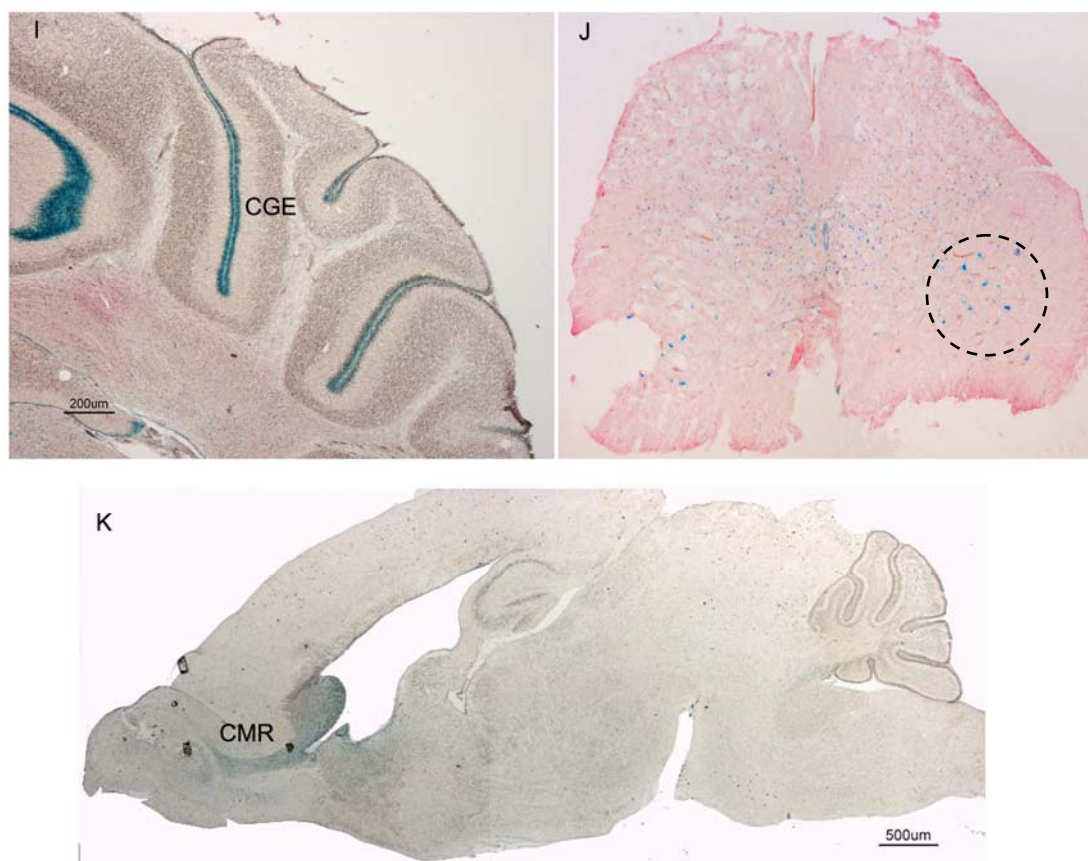
#### **4.1.5. Localización de RhoE en el SNC postnatal mediante el análisis de la expresión con X-Gal**

La técnica de X-Gal también nos permitió analizar la localización de RhoE en encéfalos de ratones RhoE gt/gt, comparando estos resultados con los obtenidos mediante inmunohistoquímica en animales control.

Como se puede observar en las secciones de encéfalos, el marcaje de X-Gal se apreció claramente en el bulbo olfatorio y corteza cerebral (**Figura 8A, B**). Más caudalmente, también se observó en el estriado y en la zona subventricular (**Figura 8C**). En el mesencéfalo (**Figura 8D**) y tronco del encéfalo aparecía un marcaje disperso con especial concentración en los núcleos motores (**Figura 8G, H**). En el hipocampo se repitió la imagen observada por inmunohistoquímica, con marcaje evidente en las áreas CA1-3 y en las células polimórficas del giro dentado (**Figura 8E, F**). En el cerebelo únicamente se apreció marcaje con X-Gal en la capa granular externa (**Figura 8I**) y en la médula espinal, en la que entre un marcaje disperso destacaba la intensidad que se apreciaba en las motoneuronas (**Figura 8J**). Finalmente, en secciones sagitales observamos cómo las células de la corriente migratoria rostral expresaban RhoE desde su inicio en la zona subventricular hasta su llegada al bulbo olfatorio (**Figura 8K**).







**Figura 8. Localización de RhoE en el SNC postnatal de ratones de 15 días utilizando la técnica de X-Gal.**

**A. Tinción con X-Gal del bulbo olfatorio. Se observa marcaje por los diferentes núcleos olfatorios (puntas de flecha), en la capa granular (Gr) y en la zona endimaria y subependimaria del BO.**

**B. Se observa marcaje en las diferentes capas de la corteza retrosplenial.**

**C. RhoE se expresa en el estriado (Es) y en la corteza (Co), siendo especialmente intenso en la ZSV.**

**D. Tinción con X-Gal donde se muestra expresión dispersa de RhoE en el mesencéfalo (Me).**

**E. Marcaje de RhoE en el hipocampo. Destaca el marcaje de las capas CA1-CA3 (flechas) y la ausencia del mismo en la capa granular del giro dentado (puntas de flecha).**

**F. Ampliación de la imagen anterior. Obsérvese el intenso marcaje de la capa polimórfica (flechas).**

**G, H. Marcaje de RhoE en núcleos motores. Aparece un marcaje destacado en el núcleo del trigémino (Mo5) y en el núcleo del nervio facial (Mo7).**

**I. Tinción con X-Gal en el cerebelo. RhoE aparece en la capa granular externa del cerebelo (CGE).**

**J. Médula espinal, se aprecia marcaje en toda la sustancia gris, destaca en las astas ventrales, zona donde se concentran las motoneuronas.**

**K. Corte sagital de KO P7. Se aprecia un intenso marcaje en la corriente migratoria rostral (CMR). Composición de dos fotografías.**



#### 4.2. La ausencia de RhoE provoca graves alteraciones del SNC. Caracterización morfológica e inmunohistoquímica

La caracterización de la expresión y localización de RhoE durante el desarrollo pre y postnatal del ratón sugería que esta proteína podría desempeñar un papel importante en la correcta formación de múltiples estructuras en el ratón. Para confirmar esta hipótesis, utilizamos el modelo de ratón deficiente en RhoE (RhoE *gt/gt*). Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que las proporciones de los tres genotipos (RhoE<sup>+/+</sup>, RhoE <sup>+/gt</sup> y RhoE *gt/gt*), que se obtenían del cruce de ratones heterocigotos eran ligeramente submendelianas (26,7%, 55,5 % y 17,8% respectivamente). Así, mientras que los heterocigotos no mostraban ningún fenotipo, los ratones RhoE *gt/gt* presentaban una serie de anomalías detectables desde el momento del nacimiento. Los ratones carentes de RhoE mostraban ataxia, temblores frecuentes, y una posición anormal de las extremidades pelvianas caracterizada por una hiperextensión del pie con incapacidad para flexionar los dedos (**Figura 9**). Además, los ratones deficientes en RhoE presentaban un menor crecimiento (**Figura 9**) y una mayor mortalidad postnatal, de manera que la supervivencia de los ratones era menor del 50% a los 21 días, no llegando ninguno de ellos a los 28 días (resultados no mostrados).



**Figura 9.** Imágenes de ratones RhoE <sup>+/+</sup> y RhoE *gt/gt* recién nacidos (P0) y de 21 días de edad (P21). En las imágenes se puede observar la hiperextensión de los tarsos (flecha), así como su menor tamaño.

Puesto que, como habíamos visto, los mayores niveles de expresión de RhoE se localizaban en el SNC y muchos de los síntomas que mostraban los animales RhoE *gt/gt* tenían una probable base nerviosa, decidimos estudiar las características del SNC de los ratones mutantes. Para ello, analizamos histológicamente y mediante



marcadores específicos el encéfalo de ratones RhoE gt/gt y ratones control de 15 días de vida.

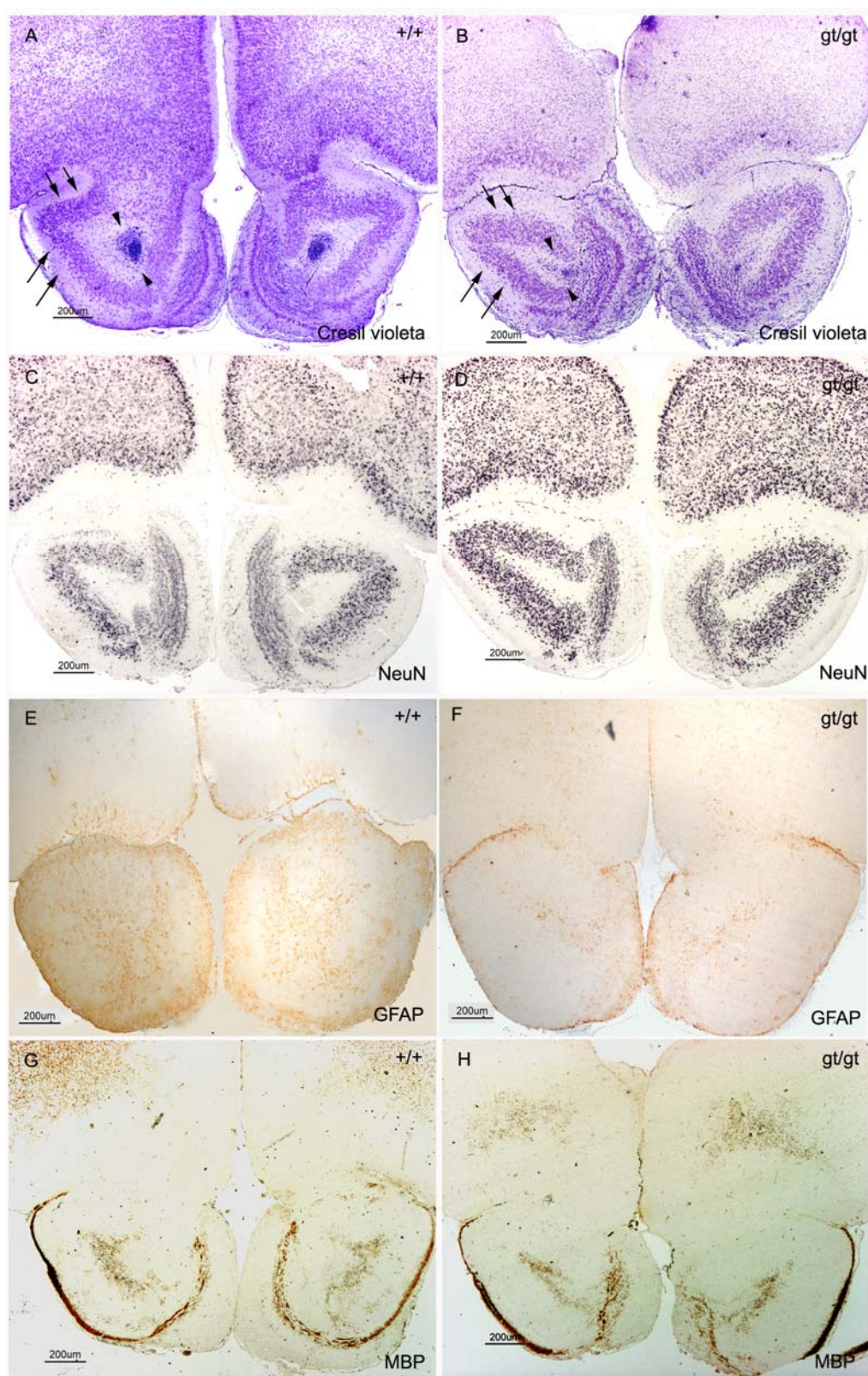
Seccionamos los encéfalos coronalmente de forma seriada para, por un lado, teñir secciones con cresil violeta para el estudio morfológico, y, por otro lado, para estudiar la expresión de marcadores moleculares que nos permitieran identificar posibles variaciones en las diferentes poblaciones celulares en el SNC de ratones mutantes. Como marcadores específicos utilizamos anticuerpos anti-NeuN (*neuron-specific nuclear protein*), que reconoce los núcleos de células neuronales (excepto las células de Purkinje) para identificar específicamente la población neuronal, anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para identificar astrocitos y anti-MBP (*myelin basic protein*) para localizar oligodendrocitos.

Como resultado de la observación de los tejidos encontramos importantes diferencias morfológicas en varias regiones del encéfalo. En el bulbo olfatorio (**Figura 10A, B**) observamos que la disposición de las capas celulares de los núcleos olfatorios estaba alterada en los ratones RhoE gt/gt. Además, aparentemente, los bulbos olfatorios mostraban una imagen de hipocelularidad en su centro (células endimarias y subendimarias que se corresponden con las que llegan por la CMR procedentes de la ZSV).

Analizando la expresión de los marcadores en las diferentes regiones del SNC, apreciamos que en el bulbo olfatorio el marcaje anti-NeuN sugería, de la misma manera que el cresil violeta, una distribución en cierta manera modificada de las capas de los núcleos olfatorios (**Figura 10C, D**). En el bulbo olfatorio no se apreciaron diferencias notables de GFAP (**Figura 10E, F**), ni de MBP (**Figura 10G, H**) entre los ratones control y los RhoE gt/gt.

Analizando partes más caudales del encéfalo y más concretamente la zona del estriado, (**Figura 11A, B**), descubrimos la presencia de un acúmulo de células en la zona subventricular en los cerebros de ratones deficientes en RhoE. Así, mientras que en los ratones de genotipo silvestre esta zona quedaba reducida a una fina capa de células (**Figura 11A**), en los ratones mutantes el área que ocupaban estas células en la parte dorsolateral de los ventrículos laterales, debajo del cuerpo caloso, era mucho mayor (**Figura 11B**). Como se ha indicado previamente, estas células constituyen el origen de la CMR, que llega hasta los bulbos olfatorios. Asimismo, otra alteración histológica sorprendente apreciada en los ratones RhoE gt/gt fue que, aparentemente, la rama anterior de la comisura anterior (que conecta ambos bulbos olfatorios) estaba ausente.

En esta región más caudal y analizando el marcaje anti-NeuN observamos una ligera desestructuración en las capas que forman la corteza cerebral y de forma más evidente una grave alteración en el estriado, producida por una disposición alterada de la relación entre las neuronas y las fibras que lo atraviesan. De esta manera, en los ratones control observamos una distribución homogénea de las neuronas, y por lo tanto de las fibras nerviosas que, con este marcador, se encuentran excluidas de marcaje. Por otro lado en los ratones RhoE gt/gt encontramos zonas más amplias donde no se observa marcaje y una distribución menos homogénea de las neuronas marcadas (**Figura 11C, D**). Sin embargo, el estudio del marcaje anti-MBP sí mostró resultados interesantes, en el estriado se observaba una disminución general de los niveles de MBP en los animales RhoE gt/gt, y confirmó la ausencia de la parte anterior de la comisura anterior y la enorme desestructuración de las fibras del estriado (**Figura 11G, H**). En cuanto al marcaje frente a GFAP, no se observaron grandes diferencias entre los ratones control y los deficientes en RhoE (**Figuras 11E, F**).



**Figura 10. Análisis histológico e inmunohistoquímico del bulbo olfatorio de ratones controles (RhoE +/+) y ratones RhoE gt/gt.**

**A, B.** Bulbos olfatorios teñidos con cresil violeta. Las flechas señalan los núcleos olfatorios, que muestran una cierta desestructuración. Las puntas de flecha indican el extremo rostral de la CMR, que en el ratón RhoE gt/gt muestra hipocelularidad. Detección inmunohistoquímica frente a NeuN (C, D), GFAP (E, F) y MBP (G, H).



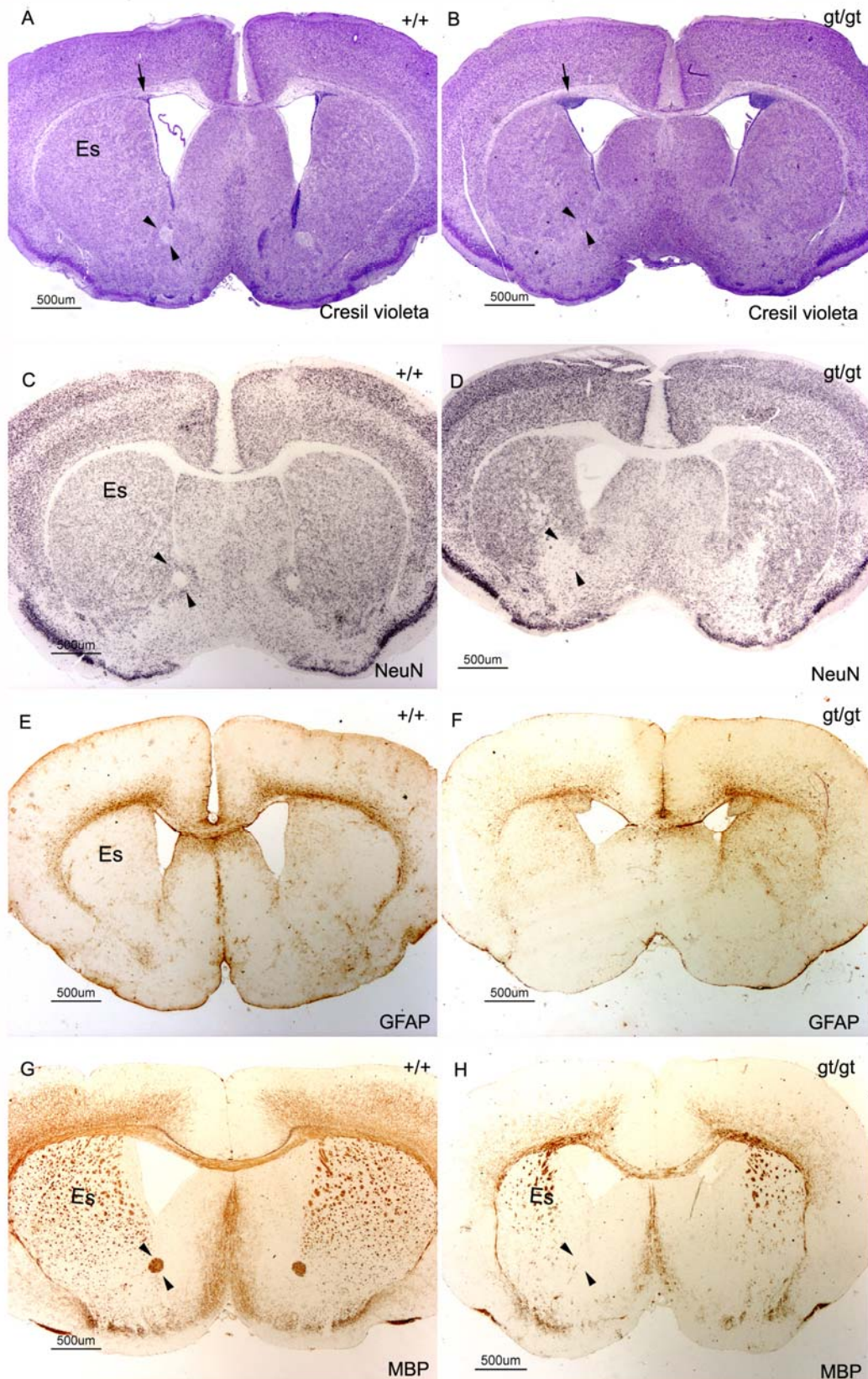
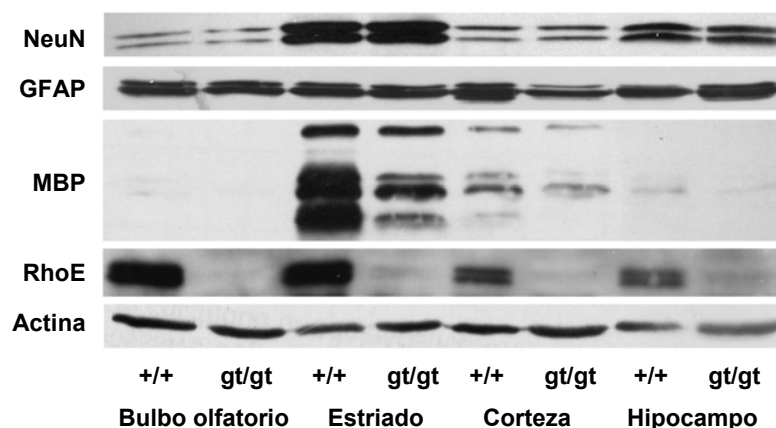


Figura 11. Análisis histológico e inmunohistoquímico de la zona del estriado (Es) y la corteza (Co) cerebral en animales RhoE +/+ y RhoE gt/gt. A, B. Tinción con cresil violeta. Detección inmunohistoquímica frente a NeuN (C, D), GFAP (E, F) y MBP (G, H). Las flechas señalan la ZSV, que se encuentra muy aumentada en los ratones RhoE gt/gt. Las puntas de flecha indican la

posición de la rama anterior de la comisura anterior, ausente en los RhoE *gt/gt*. Obsérvese la diferente disposición de las fibras en el estriado en ratones mutantes.

Como confirmación de los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos, analizamos por western blot los niveles de las proteínas de las regiones investigadas. Utilizamos extractos proteicos de bulbo olfatorio, estriado, corteza e hipocampo, de animales de 15 días de vida y analizamos los niveles de NeuN, GFAP y MBP en los animales controles y en los RhoE *gt/gt*. Nuestros resultados muestran que no existían diferencias aparentes entre genotipos con respecto a los niveles de NeuN y GFAP. Por el contrario, al incubar frente a MBP se observaron niveles de expresión menores en los ratones mutantes frente a los de genotipo silvestre. Las diferencias fueron especialmente marcadas en el estriado y corteza cerebral, confirmando la reducción en la cantidad de mielina presente en el SNC de los ratones *gt/gt* (**Figura 12**).



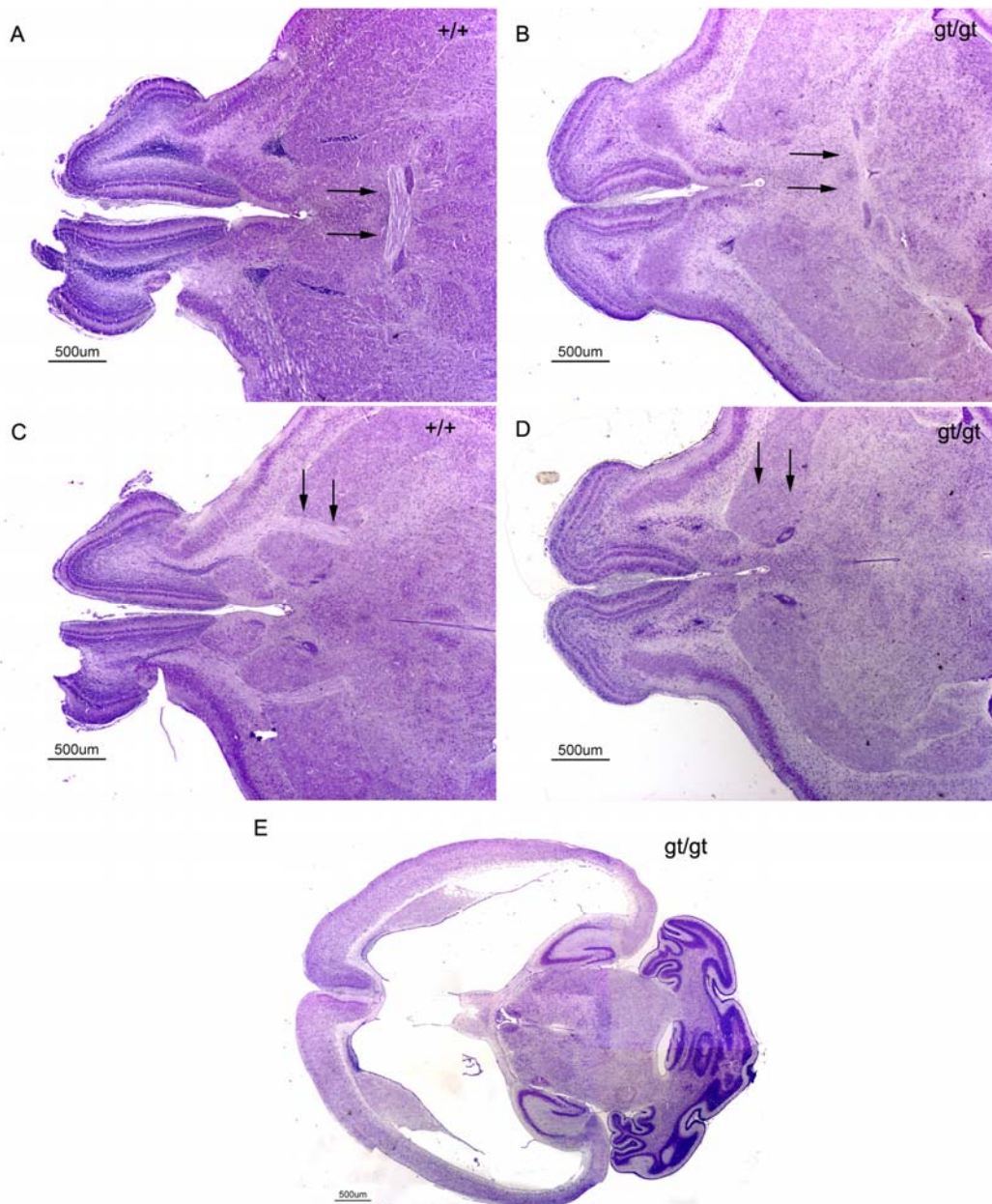
**Figura 12.** Niveles de NeuN, GFAP, MBP y RhoE analizados por western blot en bulbo olfatorio, estriado, corteza e hipocampo de ratones RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt*. No se aprecian diferencias en los niveles de NeuN y GFAP. Los niveles de MBP están reducidos en los cerebros de los ratones RhoE *gt/gt*. Se incubaron las membranas con anticuerpo anti-RhoE para demostrar la ausencia de la proteína en los ratones RhoE *gt/gt*, la actina se utilizó como control de carga.

Por otro lado, para comprobar el alcance de la alteración en las fibras que forman las comisuras, realizamos secciones horizontales de ratones de los dos genotipos. Observamos, tal y como se describe anteriormente, que la rama anterior de la comisura anterior estaba ausente, mientras que de la rama posterior, si bien era de un grosor considerablemente menor que en los ratones control, aparecía en todos los encéfalos analizados (**Figura 13A-D**).

Finalmente, otro hallazgo remarcable observado en las tinciones con cresil violeta fue la presencia de hidrocefalia en los ratones RhoE *gt/gt*, evidente en los

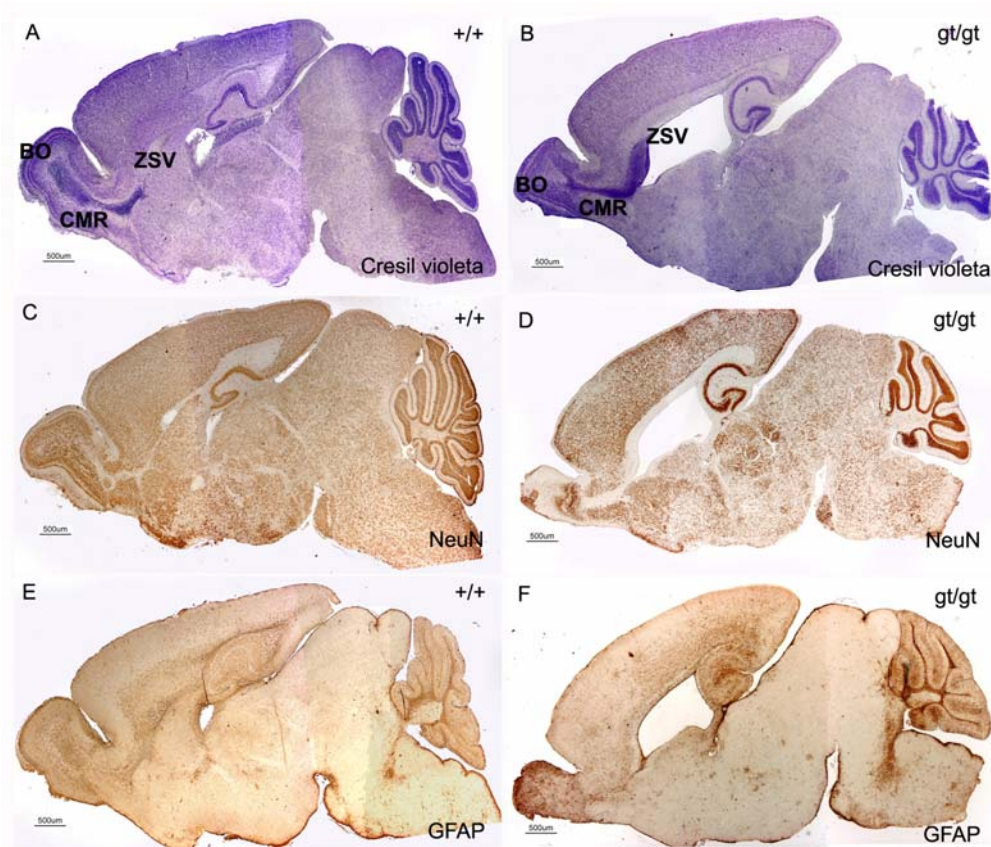


ventrículos laterales. El grado de hidrocefalia era muy variable siendo muy pronunciada en algunos ratones (**Figura 13E**) e inapreciable en otros.



**Figura 13.** Secciones histológicas horizontales de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt teñidos con cresil violeta. A. Sección de un ratón control (+/+). Las flechas indican las fibras nerviosas que forman la rama posterior de la comisura anterior. B. Sección equivalente de un ratón gt/gt en la que se aprecia que la rama posterior de la comisura anterior (flechas) es de menor tamaño que en el ratón control. C. Sección de un ratón RhoE +/+. Las flechas indican la rama anterior de la comisura anterior. D. Sección de un ratón RhoE gt/gt. Se observa la ausencia de la rama anterior de la comisura anterior (flechas). E. Composición de 4 imágenes para mostrar la hidrocefalia en un cerebro RhoE gt/gt.

Para completar estos resultados realizamos secciones sagitales de encéfalos de ratones de 15 días, que teñimos con cresil violeta, y analizamos con anticuerpos anti-NeuN y anti-GFAP. Los resultados más destacables obtenidos del estudio de estas secciones fueron las grandes diferencias apreciadas en el sistema ZSV-CMR-BO de los ratones RhoE *gt/gt* frente a los controles (**Figura 14**). Así, en los ratones de genotipo silvestre se observaba una ZSV fina y una CMR homogénea que claramente llegaba hasta el BO proporcionando células para la parte interna de este órgano. Sin embargo, en los animales RhoE *gt/gt* aparecía un evidente acúmulo de células en la zona subventricular, que se continuaba con una CMR ancha en su inicio y cada vez más fina rostralmente, que finalizaba en el bulbo olfatorio, donde apenas llegaban células. En el resto del encéfalo no aparecían diferencias destacables. Los marcajes con NeuN y GFAP no mostraron ninguna diferencia evidente entre los ratones RhoE *gt/gt* y los controles.



**Figura 14.** Secciones sagitales de encéfalos de ratones RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt*, cada imagen es la composición de dos fotografías. A, B. Tinción con cresil violeta. C, D. Inmunohistoquímica frente a NeuN. E, F. Detección inmunohistoquímica de GFAP. Mientras que en los ratones RhoE *+/+* la corriente migratoria rostral (CMR) es homogénea y llega claramente hasta el bulbo olfatorio (BO), en los ratones RhoE *gt/gt* existe un acúmulo de células en la zona subventricular (ZSV) y la CMR es ancha en su inicio y muy fina en la zona más rostral.

### **4.3. La ausencia de RhoE produce un retraso en la migración de las células del sistema ZSV-CMR-BO**

#### **4.3.1. Caracterización inmunohistoquímica de la corriente migratoria rostral y la zona subventricular de los ratones RhoE gt/gt**

Como acabamos de describir, el sistema ZSV-CMR-BO era uno de los más afectados por la ausencia de la expresión de RhoE. El estudio histológico de los cerebros de los ratones RhoE gt/gt mostraba un mayor número de células en la ZSV y una CMR reducida, especialmente en su parte más rostral, situada en el bulbo olfatorio. Además, el bulbo olfatorio parecía contener menos células en su parte interna. Por otra parte, habíamos comprobado también (ver apartado de expresión), que estas células expresaban RhoE con mucha intensidad.

La importancia de esta zona radica en que es una de las regiones con neurogénesis activa, que incluso se mantiene en el ratón adulto. En la zona subventricular existen células madre neurales que se dividen y dan lugar a neuroblastos que migran hasta llegar a su localización final en el bulbo olfatorio (Garcia-Verdugo et al., 1998; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Wichterle et al., 1997).

Por ello, debido a la importancia biológica de la zona, a la alta expresión de RhoE en sus células y a la aparente alteración que se observaba en los ratones que no expresaban RhoE, decidimos realizar un estudio más detallado de la misma en ratones RhoE gt/gt, con el fin de conocer la función de RhoE en su desarrollo.

El estudio del estado del sistema ZSV-CMR-BO se inició realizando un análisis histológico e histoquímico en secciones de encéfalos de animales de 15 días. Utilizamos inicialmente los siguientes anticuerpos como marcadores de los diferentes tipos celulares: NeuN como marcador de neuronas, GFAP para identificar astrocitos, doublecortin (Dcx) para el marcaje de células migrantes, PSA-NCAM (de *Poly-Sialic Acid - Neural Cell Adhesion Molecule*) para identificar neuroblastos, células postmitóticas pero inmaduras y PCNA ( de *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) que nos permitió identificar células mitóticas, es decir células que en ese momento se encontraban en división celular.

Como ya hemos comentado, lo primero que observamos fue un gran acúmulo de células en la zona subventricular del ratón deficiente de RhoE. Además, al analizar el bulbo olfatorio comprobamos que mientras que en animal de genotipo silvestre las células de la corriente llegaban normalmente, en el RhoE gt/gt el número de estas células observadas en el bulbo olfatorio era menor (**Figura 15A, B**). De manera



general también comprobamos que las células de la corriente no eran neuronas maduras, puesto que no eran inmunoreactivas para NeuN (**Figura 15C, D**) y que las células acumuladas en la zona subventricular y las que formaban parte de la CMR del animal RhoE gt/gt eran células migrantes, pues se marcaban con Dcx (**Figura 15E, F**). La inmunoreactividad frente a GFAP mostraba una distribución comparable en ambos genotipos, con los astrocitos envolviendo las células de la CMR (**Figura 15G, H**)

A continuación, analizamos las características de las células que se acumulaban en la ZSV. En esta zona se encuentran, en ratones control, células mitóticas y postmitóticas (Garcia-Verdugo et al., 1998). Las secciones coronales del encéfalo ilustraban que en el ratón RhoE gt/gt claramente se acumulaban gran cantidad de células en la parte dorsolateral al ventrículo lateral (**Figura 16A, B**). El grupo de células quedaba restringido a este área ya que, como se puede observar en las figuras, el resto de la zona ventricular-subventricular que rodea al ventrículo lateral presentaba un aspecto similar al del ratón control. El análisis inmunohistoquímico del acúmulo de células mostró que principalmente eran células inmaduras, puesto que no expresaban NeuN (**Figura 16C, D**). Además, la distribución de células GFAP positivas era aparentemente normal y se concentraba alrededor de las células acumuladas en el ratón RhoE gt/gt y no especialmente dentro del acúmulo (**Figura 16E, F**). La mayoría de esas células expresaban PSA-NCAM (**Figura 16G, H**) lo que indicaba que se trataba de células inmaduras (neuroblastos) y con capacidad migratoria puesto que la mayoría expresaba Dcx (**Figura 16I, J**). Finalmente, al realizar la tinción inmunohistoquímica frente a PCNA (**Figura 16K, L**) observamos que, aunque había un cierto número de células PCNA inmunoreactivas y, por tanto, mitóticas, en la periferia del acúmulo anormal del ratón RhoE gt/gt, la mayor parte de las células no expresaban PCNA. Esto sugería que el número de mitosis en el ratón mutante no era tan elevado como para explicar la gran cantidad de células acumuladas en esta zona subventricular.

Por ello, y por la baja cantidad de células que llegaba hasta el bulbo, era razonable pensar en un posible problema en la migración de las células de la ZSV por la CMR hacia el bulbo olfatorio.

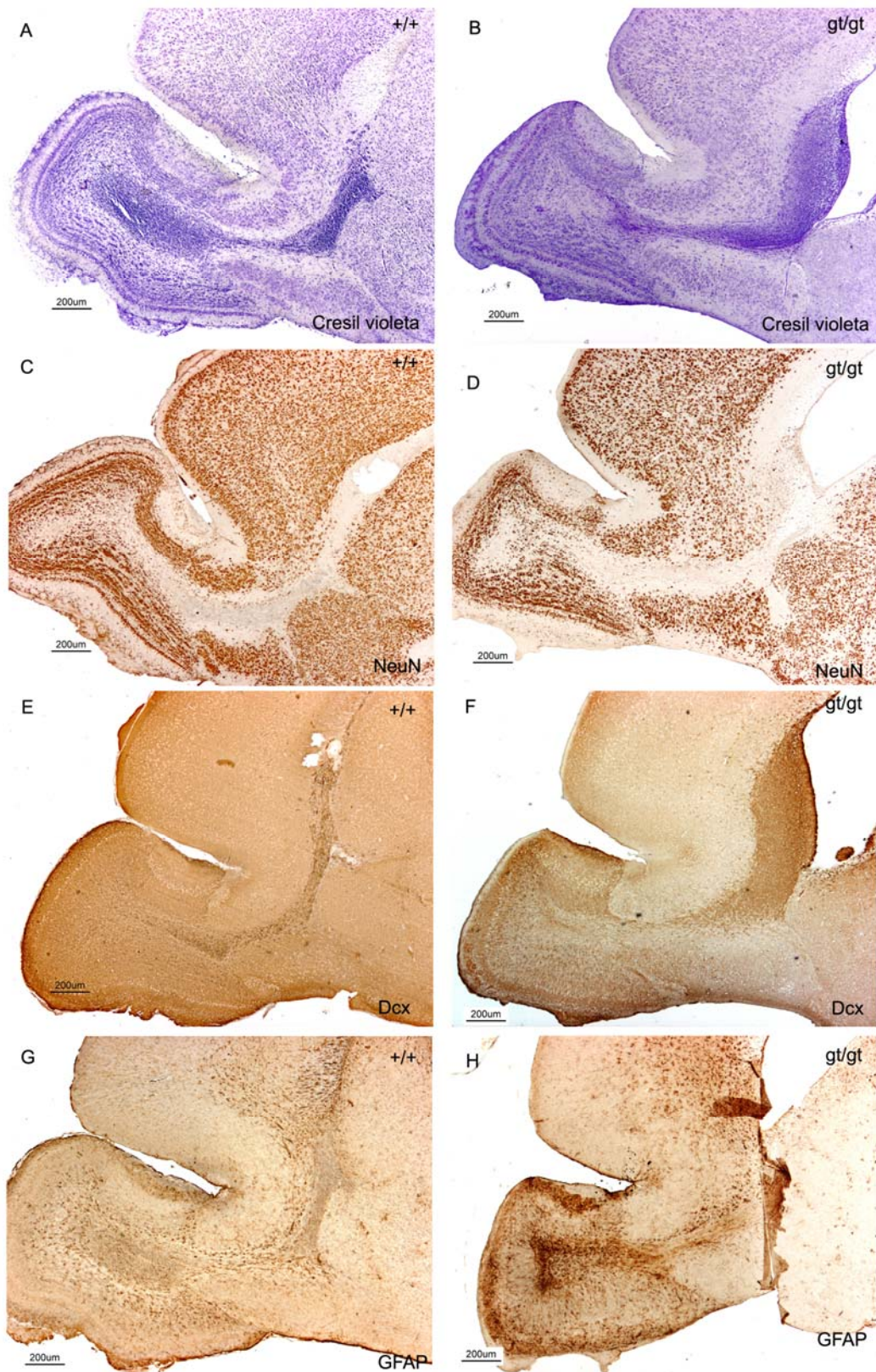
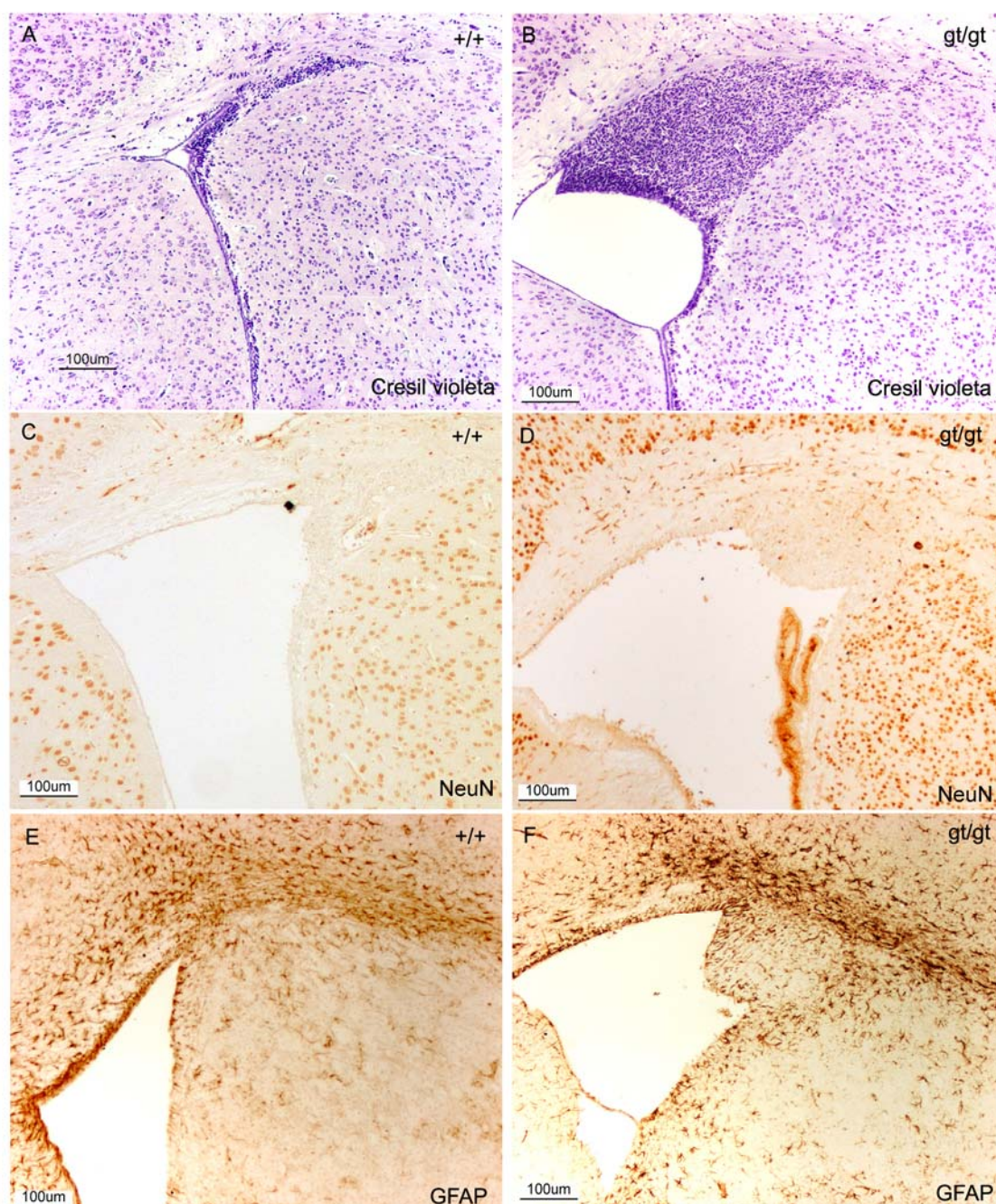


Figura 15. Estudio de la corriente migratoria rostral (CMR) en animales control y RhoE *gt/gt*. A, B. Tinciones con cresil violeta (aumento de la figura 10A y 10B). Se observa gran acúmulo de células en la ZSV de los mutantes. C, D. Detección inmunohistoquímica frente de NeuN que muestra que las células de la CMR no expresan este marcador por lo que se consideran neuroblastos. Detección inmunohistoquímica de Dcx (E, F) que indica que las células acumuladas en la zona subventricular son células migrantes, G, H. Detección inmunohistoquímica de GFAP.





**Figura 16.** Análisis inmunohistoquímico de la zona subventricular (ZSV) en ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt. A, B. Detalle de la ZSV teñida con cresil violeta. En el ratón RhoE gt/gt se aprecia una gran cantidad de células acumuladas en la zona dorsolateral al ventrículo. C, D. Detección inmunohistoquímica de NeuN. La ausencia de inmunoreactividad en las células de la ZSV indica que no son neuronas maduras. E, F. Detección inmunohistoquímica de GFAP.



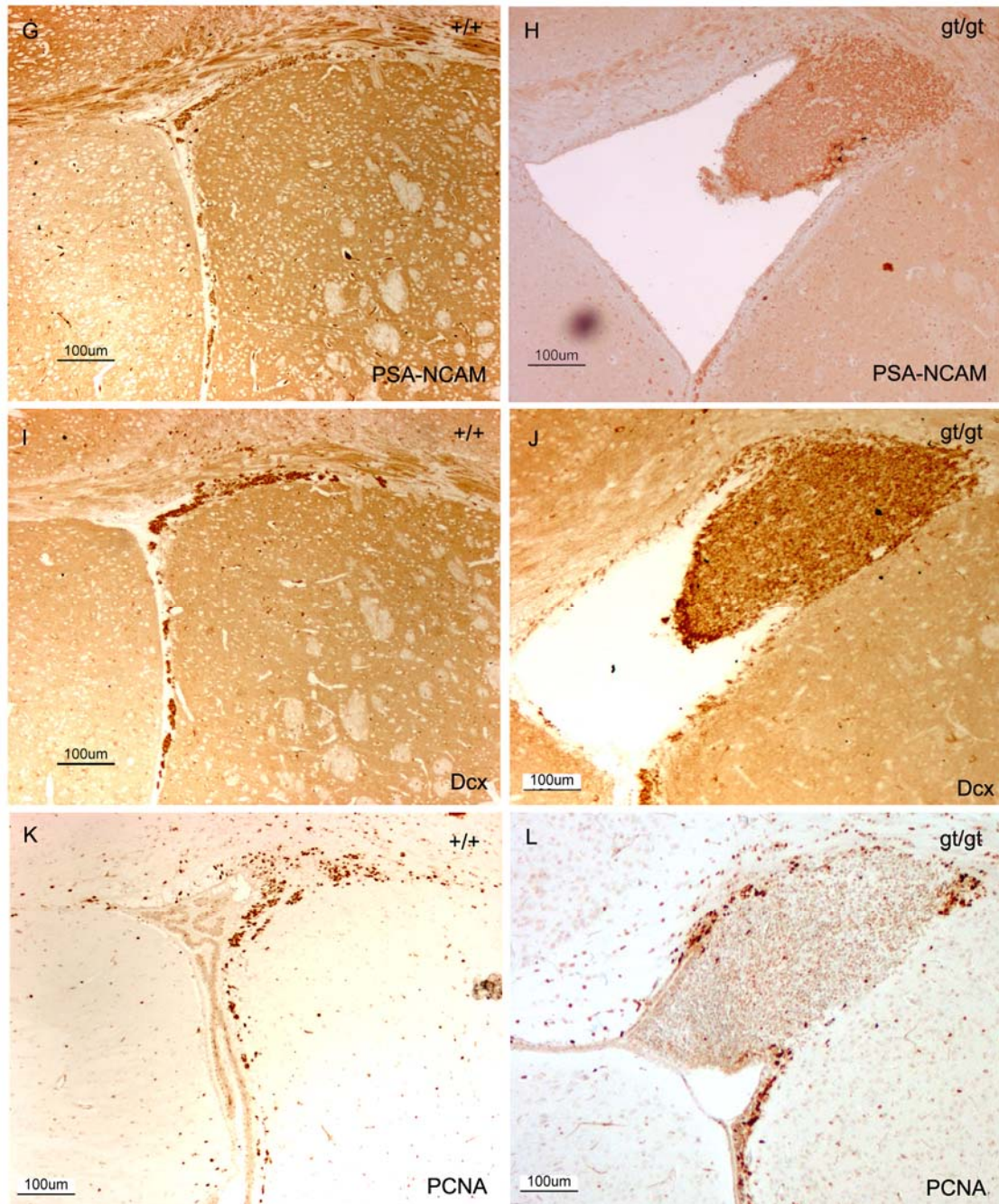


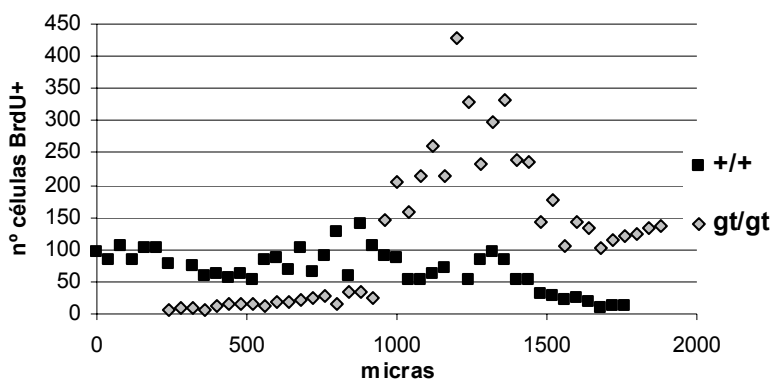
Figura 16 (continuación). Análisis inmunohistoquímico de la zona subventricular (ZSV) en ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt. G, H. Detección inmunohistoquímica de PSA-NCAM. La inmunoreactividad que se observa en las células acumuladas indica que las células de la ZSV son neuroblastos. I, J. Inmunoreactividad frente a doublecortin (Dcx). Las células de la ZSV son positivas lo que indica que son células migrantes. K, L. Inmunohistoquímica de PCNA que señala las células en división. La mayor parte de las células dentro del acúmulo son negativas a este marcador, lo que indica que no están en proliferación activa.

#### 4.3.2. Las células de la CMR presentan una migración alterada en ratones RhoE gt/gt

Los análisis realizados hasta ese momento indicaban que las células acumuladas en la zona subventricular eran mayoritariamente neuroblastos postmitóticos. A continuación decidimos avanzar en la caracterización del problema analizando si la alteración en la CMR presente en los ratones RhoE gt/gt, se encontraba en la migración de las células de la ZSV a través de la corriente.

Para conseguir este objetivo inyectamos BrdU en ratones de 9 días de edad, y se procedió a su sacrificio 6 días después. La BrdU es un análogo de la timina que se incorpora al ADN de las células en proliferación de manera que las células que la captan no se vuelven a dividir. La detección inmunohistoquímica de las células que han incorporado BrdU nos permite detectar aquellas células que, en el momento de la inyección estaban en división, conocer la distribución de las mismas y comparar posibles variaciones en su migración.

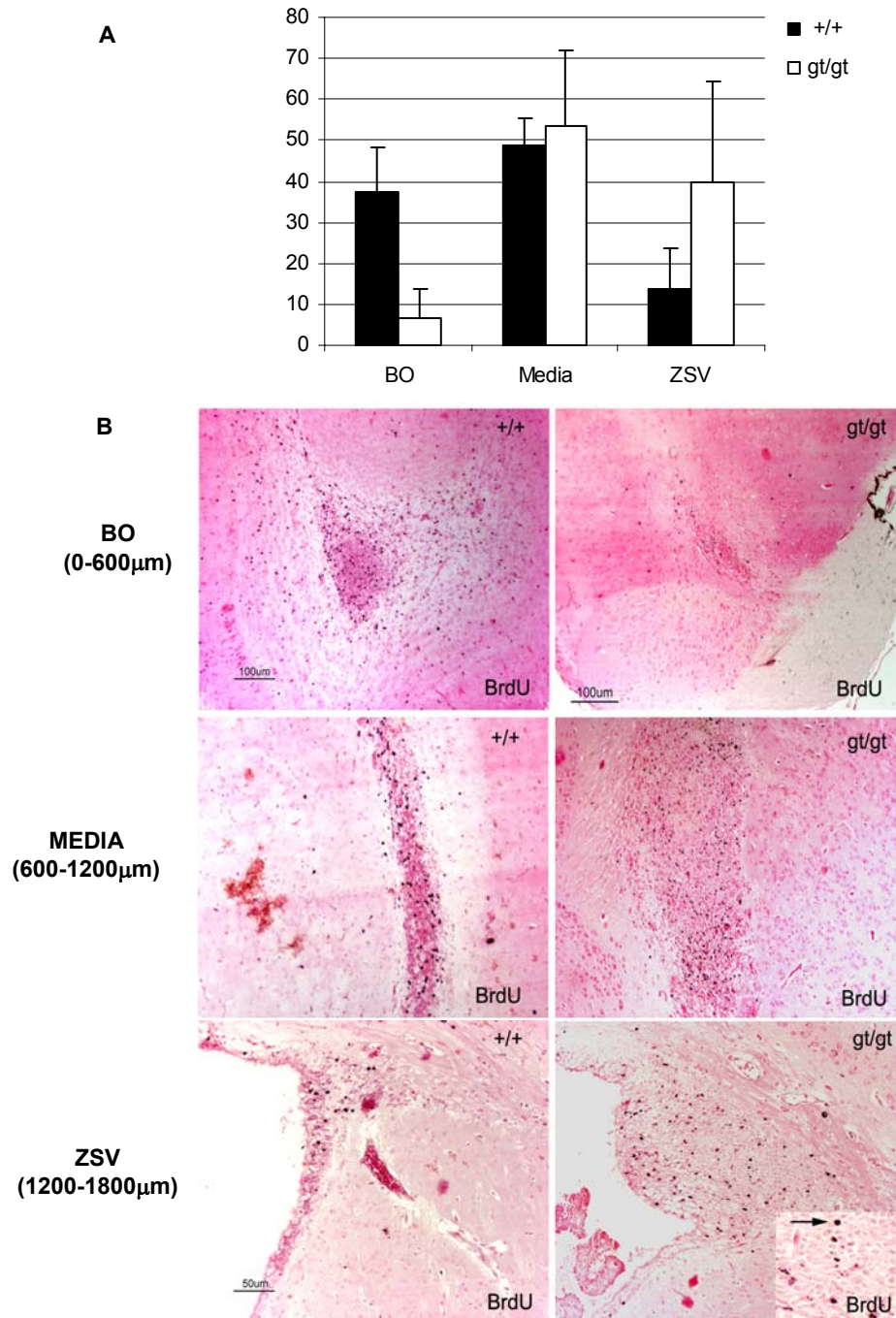
Extrajimos los encéfalos de los ratones RhoE gt/gt y controles tratados, y realizamos secciones coronales seriadas de los mismos desde la ZSV hasta el BO. Sobre estas secciones se realizó la detección inmunohistoquímica de BrdU y se contaron las células BrdU positivas a lo largo de la corriente (**Figura 17**)



**Figura 17.** Representación esquemática de la media de las células BrdU+ totales en la CMR de ratones controles y ratones gt/gt. 0 micras corresponden con el BO y 2000 micras con la ZSV. Como se puede observar la distribución de las células BrdU + en los animales RhoE gt/gt se concentra entre las entre las 1000 y 1500 micras, mientras que en las 1000 primeras micras apenas hay marcaje.

Para calcular la tasa de migración, se le otorgó un valor de 100 al número total de células BrdU positivas en cada cerebro y a continuación se calculó el porcentaje de células BrdU positivas en cada sección del sistema ZSV-CMR-BO. Una vez realizado este cálculo los datos obtenidos se distribuyeron en 3 grupos, formados al dividir en 3

la distancia global del sistema ZSV-CMR-BO. Así, el primer grupo correspondía a las 600 micras más rostrales de la corriente, el segundo grupo comprendía los recuentos obtenidos entre las 600 y las 1200 micras y el tercero a los obtenidos entre las 1200 y 1800 micras (por tanto, correspondía a las secciones más cercanas a la ZSV) (**Figura 18A**).



**Figura 18. A.** Gráfica representativa de la dispersión de las células BrdU positivas a lo largo de la CMR. En los controles la mayor concentración de células aparece en el BO, mientras que en el animal RhoE gt/gt se mantienen en la zona caudal y media, siendo su concentración muy baja en el BO. **B.** Imágenes representativas de cada región indicada en el gráfico anterior. Cada punto corresponde con una célula BrdU + (flecha).

Los resultados obtenidos mostraron que, mientras que en los animales control el porcentaje mayor de células BrdU positivas se localizaba en la zona intermedia y en la más rostral (correspondiente al bulbo olfatorio), las células de la CMR de los animales deficientes en RhoE se acumulaban principalmente en el grupo intermedio de la corriente y en el grupo caudal, que correspondía a la ZSV. En estos ratones la cantidad de células que llegaba al bulbo olfatorio era muy escasa (**Figura 18B**). Todo ello nos llevaba a pensar que el gran acúmulo de células de la zona subventricular se debía, efectivamente, a un problema en la migración de las células y no tanto un problema en la proliferación excesiva de las mismas.

#### **4.3.3. La ausencia de RhoE provoca alteraciones celulares en el bulbo olfatorio.**

Hasta este momento habíamos comprobado que los ratones RhoE<sup>gt/gt</sup> presentaban una citoarquitectura alterada de la ZSV, en la que se acumulaban células, fundamentalmente neuroblastos, con una tasa de migración reducida, lo que resultaba en una menor llegada hasta el bulbo olfatorio. Pero, ¿tenía esta migración alterada alguna consecuencia en el bulbo olfatorio? Para analizarlo realizamos un estudio histológico e inmunohistoquímico.

Como se ha indicado anteriormente, la tinción con cresil violeta nos permitió apreciar una aparente alteración en la morfología de las capas que se corresponden con los núcleos olfatorios. Además comprobamos que las células que provenían de la corriente, que en el bulbo se localizan en la parte central, eran menos numerosas en los ratones mutantes que en los controles (**Figura 19A, B**). La tinción inmunohistoquímica frente a NeuN mostró que estas células, tanto en el ratón de genotipo silvestre como en el mutante, continuaban siendo inmaduras, ya que eran NeuN negativas (**Figura 19C, D**). Sin embargo, estas células expresaban PSA-NCAM por lo que se trataba de neuroblastos (**Figura 19E, F**) y células que mantenían la capacidad de migrar, ya que se marcaban con doublecortin (**Figura 19G, H**). En resumen, las características de las células que llegan al bulbo olfatorio eran similares en ambos genotipos.

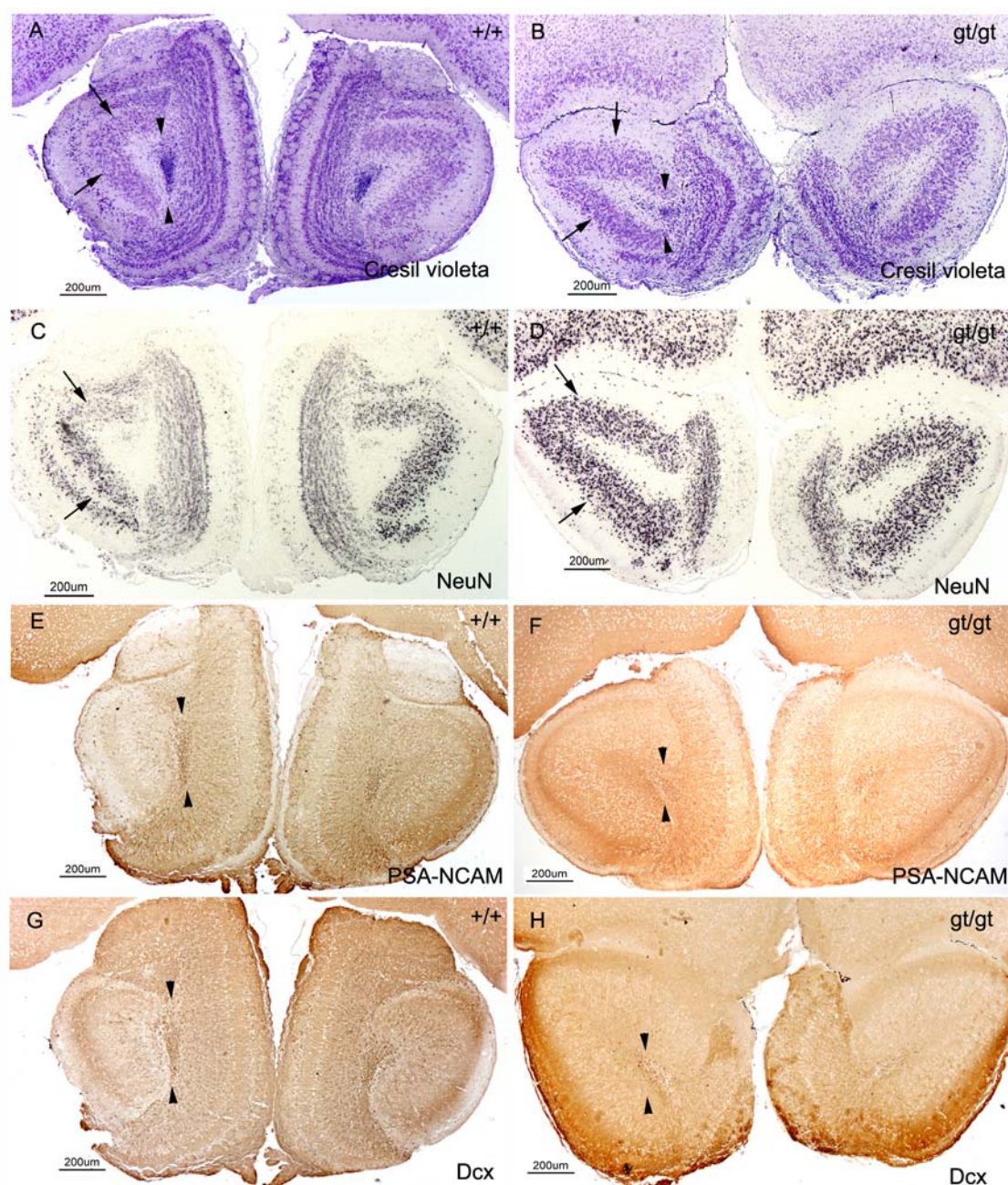
Para estudiar si los problemas en la migración modificaban la disposición de tipos celulares concretos del bulbo olfatorio, aparte de los marcadores previamente utilizados empleamos otros anticuerpos que nos permitieron identificar tipos celulares específicos de neuronas diferenciadas del bulbo olfatorio. En concreto se utilizaron anticuerpos frente a reelin, que sirve para identificar las células mitrales, frente a tirosina hidroxilasa (TH) para identificar células dopaminérgicas de la capa glomerular, y frente

a calbindina, proteína reguladora del metabolismo del calcio intracelular que comparte patrones espaciotemporales con GABA en las interneuronas del bulbo olfatorio.

El análisis inmunohistoquímico frente a estos marcadores mostró que, aparentemente, la capa mitral y las células dopaminérgicas de la glomerular no presentaban diferencias entre animales de ambos genotipos puesto que, tanto la distribución de la reelin como de la TH era similar en los bulbos olfatorios de los ratones control y RhoE gt/gt (**Figura 19 I-L**). En cambio la distribución de las células calbindina positivas, estaba completamente alterada (**Figura 19M-P**).

La detección de la calbindina en los bulbos olfatorios de los animales control se apreció en dos localizaciones: por una parte aparecía un punteado de células dispersas por los núcleos olfatorios y por otra, aparecían células calbindina positivas dispuestas de manera ordenada en la capa glomerular del bulbo olfatorio. En los ratones RhoE gt/gt, la expresión de calbindina en las células dispersas de los núcleos olfatorios no parecía variar de manera notable; sin embargo, había una gran diferencia en el marcaje observado en la capa glomerular, donde apenas se observaba alguna célula marcada (**Figura 19O, P**).





**Figura 19.** Análisis histoquímico e inmunohistoquímico del bulbo olfatorio de ratones RhoE +/+ (A, C, E, G) y RhoE gt/gt (B, D, F, H). A, B. Tinción con cresil violeta donde destaca el menor número de células que provienen de la CMR en el RhoE gt/gt (punta de flecha), y la desestructuración de los núcleos olfatorios (flechas). C, D. Detección inmunohistoquímica de NeuN. E, F. Detección inmunohistoquímica de PSA-NCAM. G, H. Detección inmunohistoquímica de Doublecortin (Dcx).



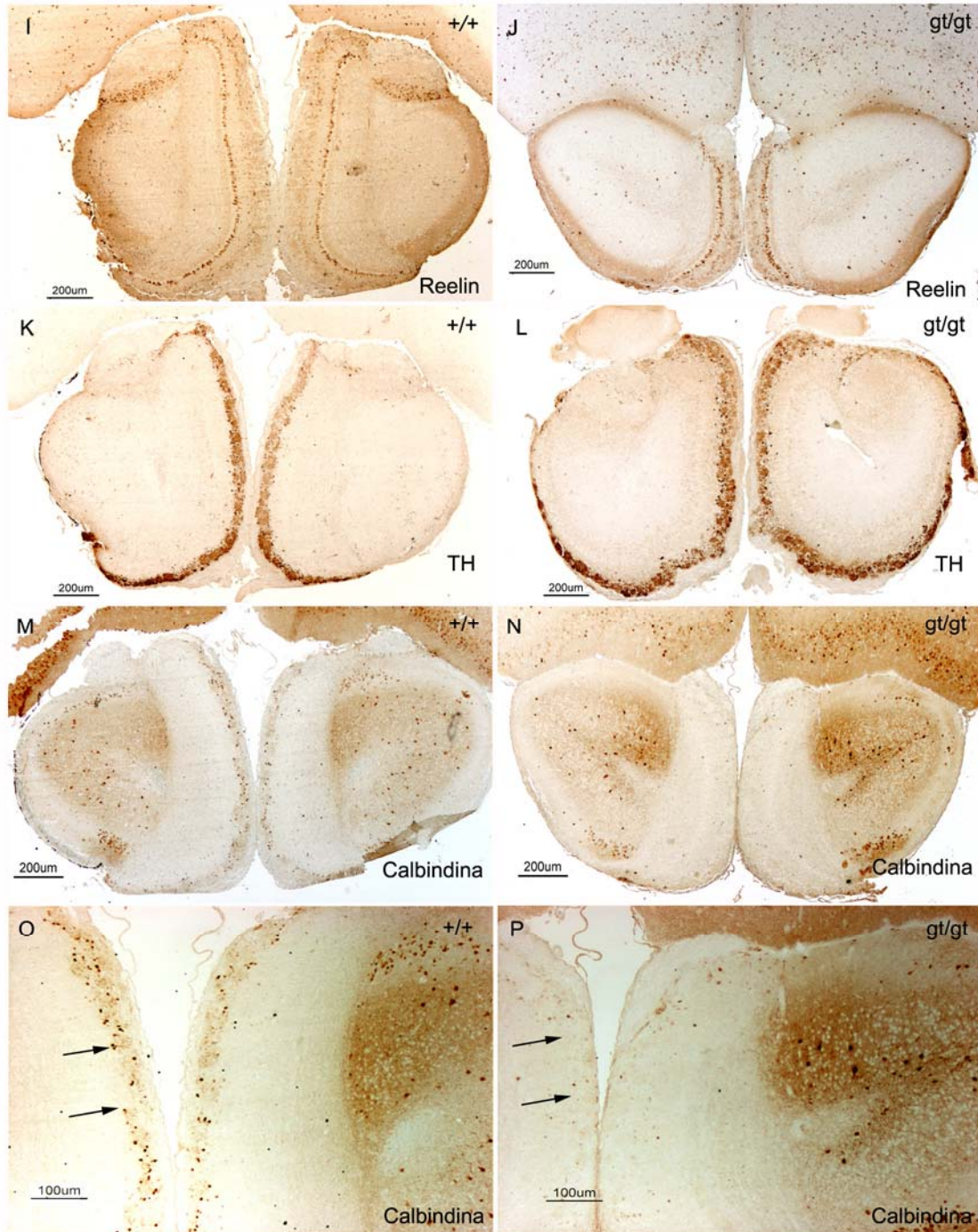


Figura 19. Continuación. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico del bulbo olfatorio de ratones RhoE +/+ (I, K, M, O) y RhoE gt/gt (J, L, N, P). I, J. Inmunodetección de reelin. K, L. Detección inmunohistoquímica de TH. M,N. Inmunohistoquímica frente a calbindina. O, P. Detalle de las imágenes anteriores donde se observa la ausencia casi total de células calbindina positiva en la capa glomerular (flechas) del ratón mutante.

#### 4.4. La ausencia de RhoE provoca alteraciones motoras

##### 4.4.1. Los ratones deficientes en RhoE presentan una marcha alterada

Como se ha indicado anteriormente, una de las características más marcadas de los ratones RhoE gt/gt era que mostraban alteraciones en la posición de las extremidades pelvianas y problemas que podrían deberse a alteraciones motoras.

Además, estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraban peores rendimientos de los animales RhoE gt/gt que los animales controles cuando eran sometidos a pruebas que valoraban sus capacidades motoras (resultados no mostrados).

Para comprobar el alcance de los problemas motores empezamos analizando la capacidad de los ratones para mantener una correcta marcha estudiando la marca que dejaban sus huellas al andar.

Utilizamos ratones de 21 días en los que se pintaron de color rojo la cara palmar de sus manos y de color azul la cara plantar de los pies, de manera que, andando sobre una superficie recta, dejaran impresas la marca de sus huellas.

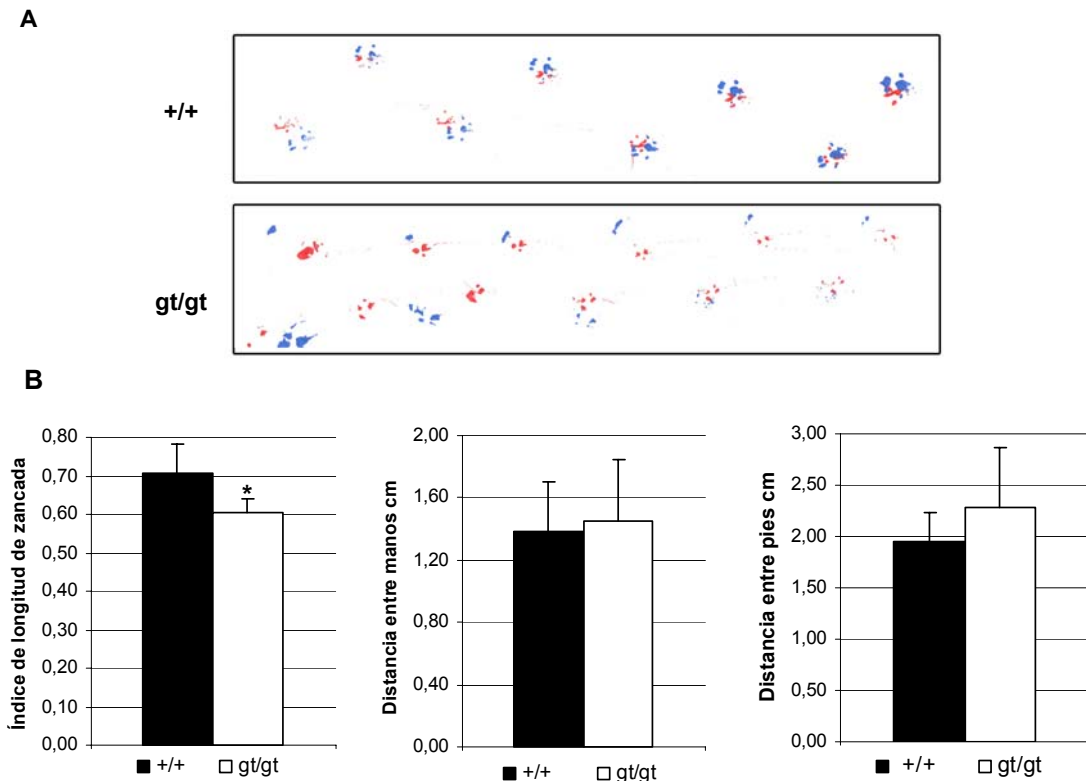
Al analizar las huellas de los ratones observamos que los animales control realizaban el test correctamente; sin embargo los ratones RhoE gt/gt presentaban una marcha más lenta, dificultosa e irregular y en muchas ocasiones, en lugar de marcar bien las huellas aparecían manchas de pintura azul debidas a la mala posición de los pies (**Figura 20A**). Estas manchas estaban, por lo tanto, producidas por los movimientos inadecuados de las extremidades pelvianas.

Con las imágenes obtenidas por la impresión de las huellas pudimos realizar la cuantificación de los siguientes parámetros: longitud de la zancada, distancia entre las manos y distancia entre los pies.

Para normalizar los resultados de los tamaños de la zancada, se calculó un índice relacionando las medidas obtenidas de cada animal en relación a la talla del animal, lo que en este caso era muy relevante dado el menor tamaño de los ratones RhoE gt/gt. A partir de estos datos se halló la media de los parámetros (longitud de la zancada, distancia entre las manos, y entre los pies) para cada animal y a continuación para el conjunto de animales, siendo este último valor el representado en las gráficas (**Figura 20B**).

Los valores obtenidos se analizaron estadísticamente obteniendo diferencias significativas en la longitud de la zancada, que era ligeramente inferior (15%) en los

ratones RhoE gt/gt. No encontramos diferencias significativas en las mediciones de las distancias entre las extremidades.



**Figura 20. Estudio de la marcha de los animales RhoE +/+ y RhoE gt/gt. A. Footprint de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt. Las marcas rojas indican huellas de las extremidades delanteras y las azules de las traseras. B. Representación gráfica del índice de la longitud de la zancada, distancia entre manos y distancia entre pies. Los animales RhoE gt/gt presentan una zancada más corta con respecto al RhoE +/+ (\* $p < 0,05$ ). En la distancia entre las manos y los pies no se observan diferencias significativas.**

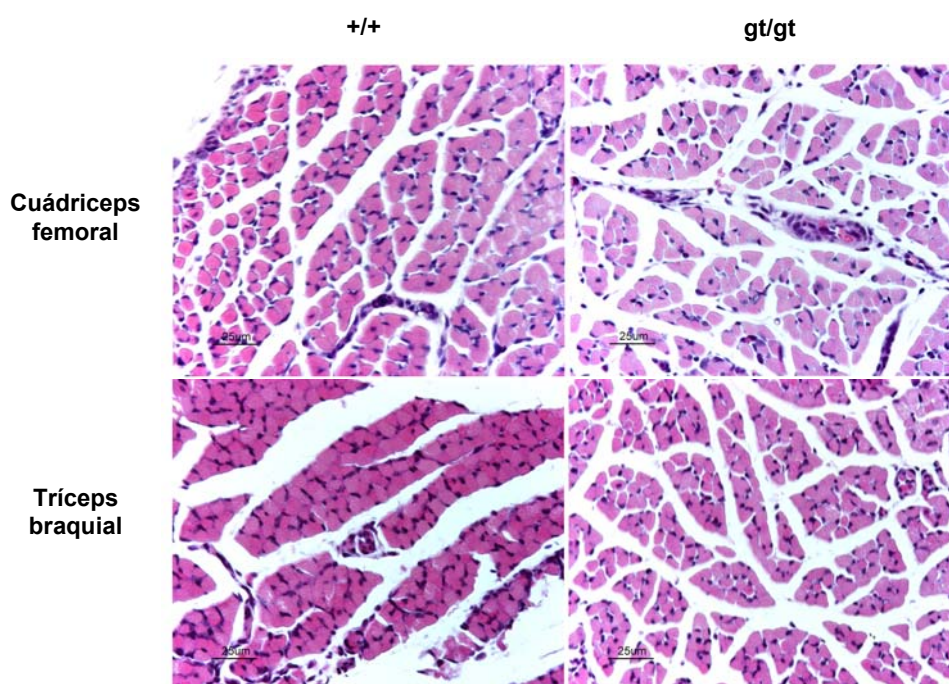
#### **4.4.2. El músculo esquelético de ratones RhoE gt/gt no presenta alteraciones histológicas evidentes**

Para determinar si las alteraciones motoras observadas en los animales RhoE gt/gt podrían tener un origen muscular decidimos realizar un estudio histológico de diferentes músculos.

Analizamos los músculos de ratones de 7 días, una edad suficientemente temprana para que los hallazgos obtenidos no se debieran a ninguna lesión consecuencia de la reducida movilidad del animal. Para este estudio se analizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina del músculo tríceps braquial y cuádriceps femoral (para tener muestras de ambas extremidades) de animales de ambos genotipos. El análisis histológico de los músculos no mostró diferencias



evidentes entre los diferentes genotipos, de manera que en los músculos de los ratones RhoE *gt/gt* no aparecían zonas de degeneración/regeneración ni núcleos centrales que sugirieran algún tipo de alteración muscular temprana (**Figura 21**).



**Figura 21.** Cortes histológicos de músculo tríceps braquial y cuádriceps femoral en animales RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt*. No se observan alteraciones en la estructura de los músculos en los animales mutantes.

Puesto que los resultados obtenidos no mostraron alteraciones histológicas en el músculo esquelético, el siguiente paso fue estudiar el estado de las placas motoras. Inicialmente analizamos el tamaño de las mismas en ratones de 7 días midiendo su área. Para ello teñimos las uniones neuromusculares con  $\alpha$ -bungarotoxina, que se une a los receptores de acetilcolina. Observamos un menor tamaño de la superficie postsináptica en los músculos tríceps braquial y cuádriceps femoral de los animales RhoE *gt/gt*, en los que se apreciaba una reducción del área del 22% y 17% respectivamente en comparación con los ratones de genotipo silvestre (**Tabla 3**).

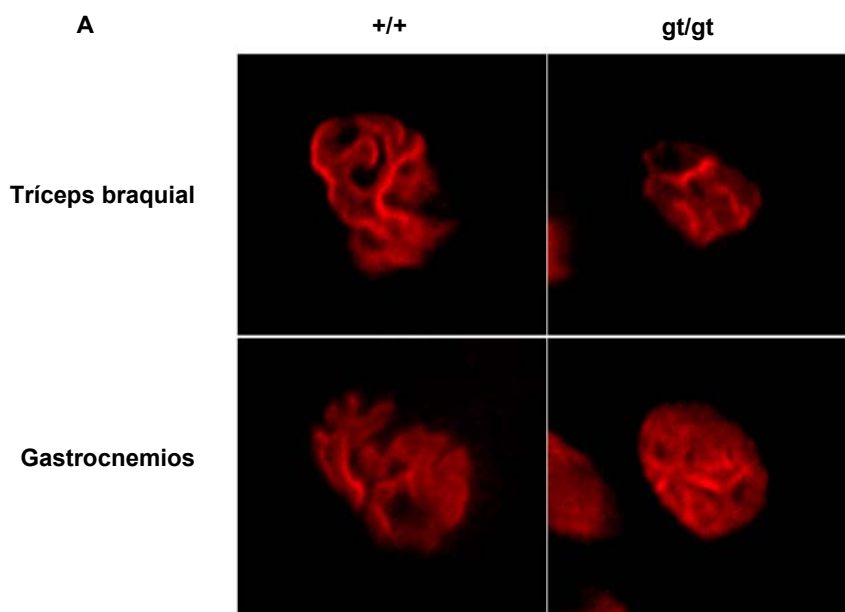
	<i>+/+</i>	<i>gt/gt</i>
Tríceps braquial	67,49 ± 10,95 (n= 6)	*52,66 ± 2,72 (n= 3)
Cuádriceps femoral	59,12 ± 5,67 (n= 5)	*49,01 ± 4,72 (n= 4)

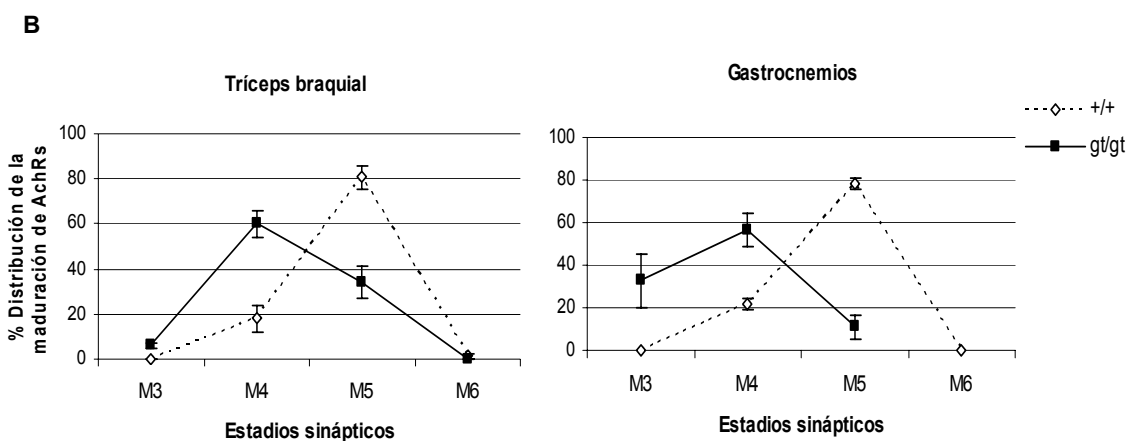
**Tabla 3.** Análisis del tamaño de las placas motoras, los valores están obtenidos en  $\mu\text{m}^2$  cuadrados, \*  $p < 0,05$ .

#### 4.4.3. La ausencia de RhoE provoca un retraso en la maduración de las placas motoras.

A continuación estudiamos el estado de maduración de las sinapsis. Utilizamos animales de 21 días, edad en la que los animales control tienen un grado de maduración de la sinapsis suficientemente avanzado como para poder detectar si la eliminación de RhoE producía posibles retrasos en el mismo. Teñimos las secciones de los músculos tríceps braquial y gastrocnemio con  $\alpha$ -bungarotoxina y analizamos su estado de maduración según la descripción de Lanuza y colaboradores que clasifica las placas motoras en 6 categorías en función del grado de maduración de las mismas (Lanuza et al., 2002).

Nuestros resultados muestran que las placas motoras de los músculos de los animales RhoE *gt/gt* tenían un grado de maduración menor que las de los animales controles: la mayoría de placas en los animales control eran de un nivel de maduración denominado M5, que corresponde a un patrón casi maduro (alternando zonas con alta densidad de receptores con otras de muy baja densidad o ausencia de receptores), mientras que en los animales RhoE *gt/gt* la mayoría de placas correspondían a un grado menor de maduración, M4, en el que las placas aparecen menos ramificadas y convolutas, con menos espacios en los que los receptores están ausentes (**Figura 23A, B**). Esta situación se producía tanto en el tríceps braquial como en el músculo gastrocnemio.





**Figura 23. A.** Tinción con  $\alpha$ -bungarotoxina de placas motoras representativas de los músculos triceps braquial y gastrocnemios de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt . Obsérvese el menor tamaño y la menor ramificación de las placas de los ratones RhoE gt/gt (correspondiente a un estadio M4), frente a las de los ratones RhoE +/+ (correspondiente a un estadio M5). **B.** Grado de maduración de la superficie postsináptica en animales de 21 días de vida. En los ratones RhoE gt/gt el grado de maduración predominante en ambos músculos es el M4, mientras que en los ratones control predomina el M5, indicativo de una maduración más avanzada.

#### **4.4.3. La falta de RhoE provoca la ausencia del nervio peroneo común en el ratón**

Aparte de la debilidad general de los ratones carentes de RhoE, una de las características más destacadas de estos animales era la posición que mostraba la parte distal de las extremidades pelvianas (**ver figura 5**). Como se ha indicado previamente, estos ratones mostraban una hiperextensión de los tarsos, acompañada de la incapacidad para flexionarlos.

Para comprobar la integridad anatómica de las extremidades realizamos una disección de las mismas. Los resultados de las disecciones mostraron una alteración sorprendente: todos los ratones RhoE gt/gt diseccionados (más de 30), independientemente de su edad (desde recién nacidos hasta de 21 días de edad) carecían completamente del nervio peroneo común y, consecuentemente, presentaban atrofia de los músculos craneolaterales de la pierna (flexores del pie y extensores de los dedos), normalmente por él inervados. En estos animales el nervio ciático, en lugar de dividirse en tibial y peroneo común, únicamente continuaba como nervio tibial (**Figura 24A-D**). Analizamos las raíces lumbares y sacras que normalmente originan el nervio ciático. Sin embargo, si bien eran de menor calibre en los animales RhoE gt/gt que en los controles, no apreciamos disposición alterada en las mismas en los animales (**Figura 24E-G**).



Hay que destacar que los ratones heterocigotos no mostraron ninguna alteración en la disposición del nervio peroneo común, así como ninguna alteración fenotípica similar a la descrita en los ratones RhoE *gt/gt*. Por otra parte, el resto de grandes nervios y grupos musculares, tanto de la extremidad pelviana como de la torácica, estaban normalmente dispuestos en los ratones RhoE *gt/gt*, de manera que la alteración anatómica únicamente afectaba al nervio peroneo y sus músculos diana.

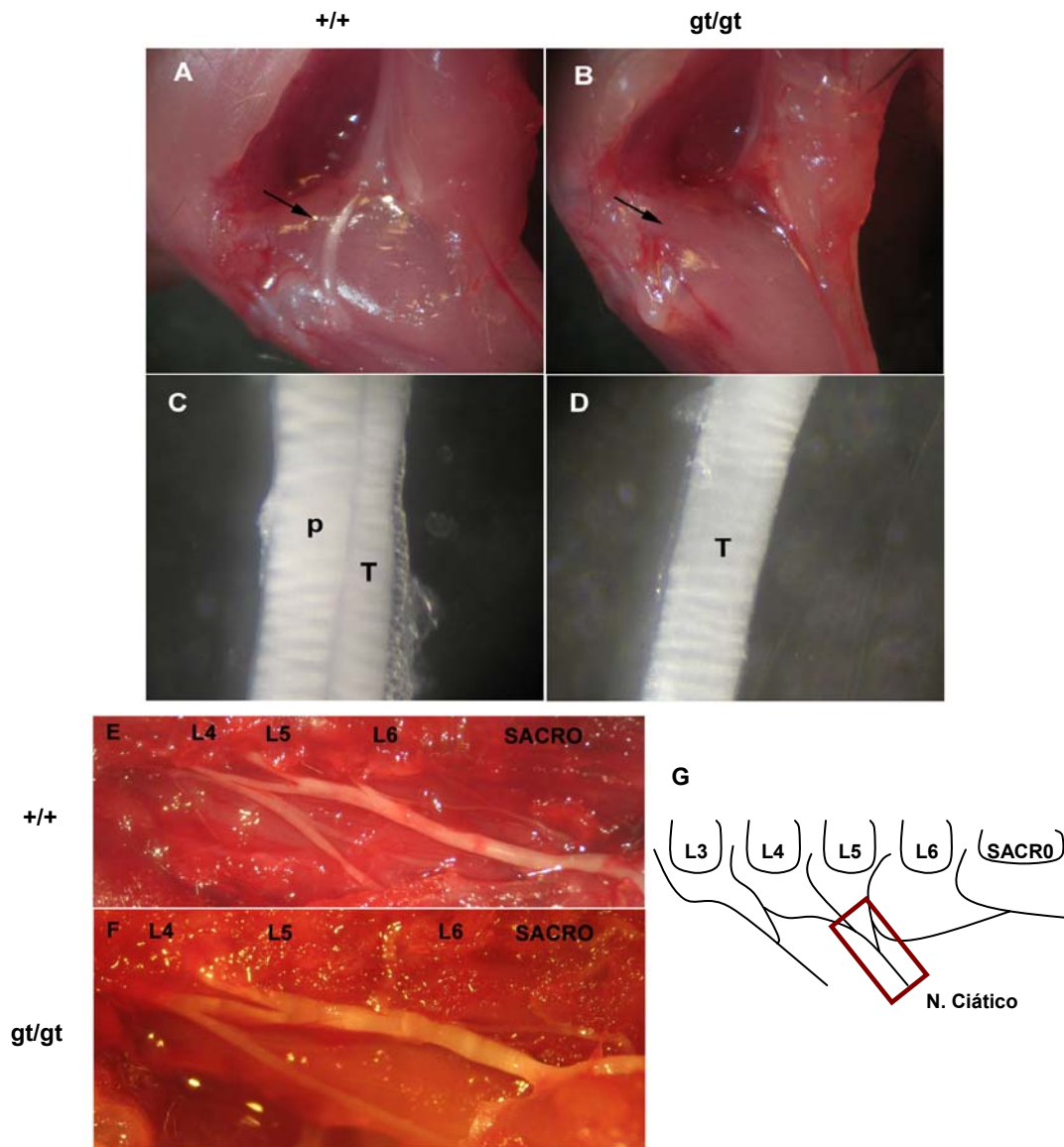
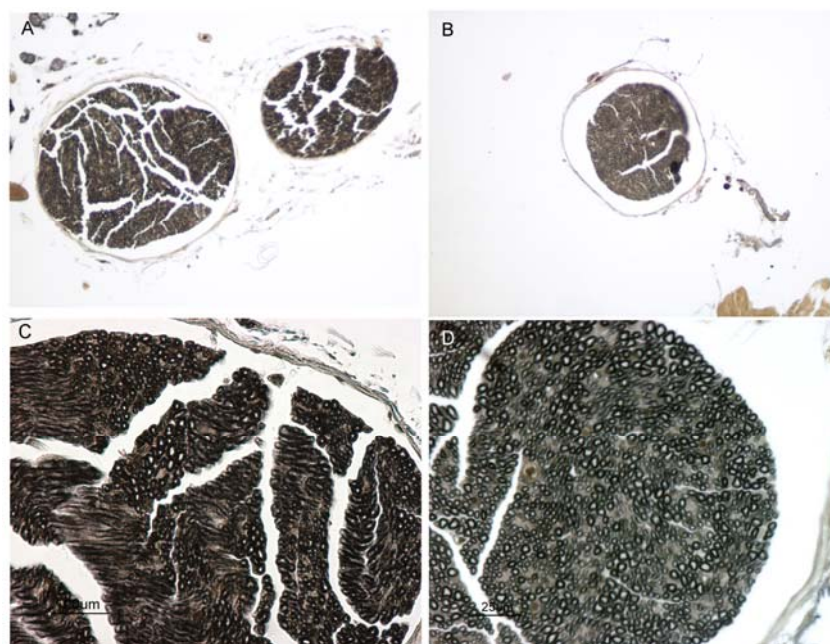


Figura 24. A. B Disección del miembro pelviano de un animal RhoE *+/+* (A) y de un animal RhoE *gt/gt* (B). La flecha señala la presencia del nervio peroneo común en el control y la ausencia del mismo en el ratón mutante. C, D. Ramas del nervio ciático en un ratón control (C) y en un ratón *gt/gt* (D). Se observa que mientras que en el control están presentes el nervio tibial (T) y el nervio peroneo común (P), en el ratón RhoE *gt/gt* solo está presente el nervio tibial (T). E, F, G. Raíces lumbares del nervio ciático en animales RhoE *+/+* (E), y RhoE *gt/gt* (F). Se observa que no existen diferencias en la disposición de las raíces. G. Representación esquemática de la formación del nervio ciático.

Finalmente, analizamos si existía alguna alteración que sugiriera algún problema de mielinización del sistema nervioso periférico similar a lo que previamente habíamos observado en el SNC. Sin embargo, el aspecto de las secciones transversales de los nervios periféricos no difería entre los ratones control y los deficientes en RhoE. Por ello y, aunque el examen se realizó únicamente por microscopía óptica, se podía considerar que la ausencia de RhoE no provocaba problemas aparentes de mielinización periférica (**Figura 25 A-D**).



**Figura 25.** A, B. Tinción con tetraóxido de osmio de una sección transversal un nervio ciático de un ratón RhoE +/+ (A) y un ratón gt/gt (B). Mientras que en el control aparece el componente tibial y peroneo, en el RhoE gt/gt únicamente aparece el tibial, sin embargo no se aprecian grandes diferencias en la mielinización del nervio entre el ratón de genotipo silvestre (C) y el mutante (D).



## **5. DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

De todos es conocido que los mecanismos implicados en el desarrollo del sistema nervioso son muy complejos, múltiples y variados. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la creciente importancia que tienen la familia de proteínas Rho en el correcto funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso (Linseman and Loucks, 2008; Nadif Kasri and Van Aelst, 2008; Newey et al., 2005; Ramakers, 2002). Dentro de esta familia, evidencias recientes muestran que los miembros de la subfamilia de las proteínas Rnd, a la que pertenece RhoE, pueden ser también esenciales en estos procesos (Heng et al., 2008).

En este trabajo estudiamos la expresión y localización de RhoE en el desarrollo del ratón y analizamos los efectos de la eliminación de su expresión *in vivo*. Nuestros resultados muestran que RhoE está ampliamente distribuido por el SNC desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario y que es esencial para una correcta formación de sistemas tan diferentes como el de las células del sistema ZSV-CMR-BO y el sistema motor, con la sorprendente ausencia del nervio peroneo en los ratones que no expresan RhoE.

### 5.1. La expresión de RhoE está regulada espacio-temporalmente

Mientras que la mayoría de los miembros de la familia Rho están regulados por su unión a GTP/GDP, las proteínas de la subfamilia Rnd (a la que se pertenece RhoE), se encuentran siempre unidas a GTP y por lo tanto permanecen constitutivamente activas (Chardin, 1999; Chardin, 2006; Guasch et al., 1998). Por esta razón se asume que la expresión, localización y modificación postraduccional de estas proteínas son los factores reguladores de su actividad (Chardin, 2006; Riento et al., 2005).

Desde que RhoE fue clonado por primera vez (Foster et al., 1996; Guasch et al., 1998), la mayoría de trabajos se han centrado en investigar su papel sobre el citoesqueleto y la proliferación celular en modelos *in vitro*; sin embargo, muy poco se sabe sobre los sitios de expresión de RhoE *in vivo* ni sobre su importancia durante el desarrollo. Por esta razón nos pareció interesante iniciar nuestros estudios analizando la presencia de RhoE en el desarrollo embrionario y postnatal y su distribución en el SNC.

Como acabamos de comentar, los datos sobre la expresión de RhoE son muy escasos y únicamente existen algunas referencias en sitios de Internet pertenecientes

a centros de investigación especializados en análisis de genes a gran escala, que describen de forma general por hibridación *in situ* la localización del ARNm de RhoE.

En el sitio web de Genepaint (<http://www.genepaint.org>) se muestra la presencia de RhoE en embriones de 14,5 días, destacando niveles de expresión en el SNC, además de en otras estructuras. En la página del Hospital Saint Jude (<http://www.stjudebgem.org>) se encuentra la descripción más completa de la expresión de RhoE en el SNC, que incluye imágenes de los días embrionarios 11 y 15 y de cerebros de ratones de 7 días y adultos. En las imágenes de embriones se observa expresión del ARNm de RhoE de manera generalizada, aunque, también, de forma destacable en el SNC. En resumen, las descripciones que se encuentran en estos sitios son limitadas y no lo suficientemente detalladas para reconocer núcleos concretos que expresan el gen.

Nosotros hemos descrito que la proteína RhoE se está expresando al menos desde el día 8,5 de gestación, momento en el que se observa en la membrana amniótica y en la notocorda, aunque también en el ectodermo y de forma más dispersa en el mesénquima. En 10,5 días de gestación ya observamos una destacada expresión de RhoE en el SNC en desarrollo y en zonas mesenquimatosas que se diferenciarán en musculatura y hueso con posterioridad.

Nuestros resultados muestran que la expresión de RhoE aumenta y se generaliza a partir de los 13,5 – 14, 5 días de gestación, tanto en el SNC (en donde comienza la expresión en núcleos que luego continúan produciendo RhoE en la fase postnatal), como en otras localizaciones, por ejemplo las células precursoras del tejido muscular o los revestimientos de las cavidades.

En comparación con otros miembros de la subfamilia Rnd, los escasos datos existentes sugieren que RhoE es el que presenta mayores niveles durante el desarrollo embrionario. Rnd1 se empieza a expresar de manera muy leve durante los días previos al nacimiento (Ishikawa et al., 2003), y, además, en los sitios web antes citados se observa que la expresión de Rnd1 es mínima, casi inexistente a E14. En cambio, Rnd2, aparece localizado exclusivamente a lo largo del tubo neural destacando en la corteza cerebral embrionaria.

Ya en animales postnatales y adultos, además de en otros órganos, se ha descrito que los tres miembros de la familia Rnd, se expresan en mayor o menor medida en el cerebro (Chardin, 2006). Rnd1 se localiza principalmente en el hígado y Rnd2 en los testículos, mientras que RhoE se describe como de expresión ubicua (Nobes et al., 1998).



Hay que señalar que, aunque Rnd1 y RhoE se expresan en altos niveles durante el desarrollo postnatal del SNC, los sitios de expresión de ambas proteínas varían en parte. Por ejemplo, Rnd1 se expresa en las células granulares del cerebelo y del giro dentado (Ishikawa et al., 2003; Nobes et al., 1998), células que no expresan RhoE. Además, la expresión más alta de Rnd1 se encuentra en la corteza cerebral (Nobes et al., 1998), mientras que nosotros hemos visto también altos niveles en los bulbos olfatorios.

Respecto a la localización concreta de RhoE en el SNC, en el sitio del Allen Institute for Brain Science (<http://www.brain-map.org>) se muestran secciones sagitales de cerebros adultos en los que se observa una ligera expresión de RhoE, especialmente destacada en zonas del bulbo olfatorio y del núcleo caudado. Nuestros resultados muestran que los niveles de la proteína, analizados por western blot, disminuyen a partir de la segunda semana postnatal, por lo que no es extraño que en las imágenes del Allen Institute, obtenidas de animales adultos, la expresión apenas destaque sobre el fondo.

En el trabajo que aquí presentamos se aprecia que RhoE se expresa a lo largo de todo el SNC postnatal, especialmente en neuronas con alta plasticidad, como las del hipocampo y la corteza cerebral, o en neuronas que proyectan largos axones, como las motoneuronas. Además, nuestros resultados muestran que RhoE es un nuevo marcador de la CMR y la capa granular externa del cerebelo. La importancia de este dato radica en que ambas poblaciones experimentan importantes migraciones durante el desarrollo embrionario y postnatal, lo que sugiere que RhoE puede jugar un papel importante en la migración y desarrollo de estas células en sus regiones diana.

Hay evidencias crecientes que indican papeles cruciales para las proteínas Rnd en el desarrollo del tejido nervioso. Rnd 2 se localiza en los tractos nerviosos mostrando un aumento progresivo de intensidad de expresión tras el nacimiento (Decourt et al., 2005) y es esencial para la migración radial de las neuronas corticales (Heng et al., 2008; Nakamura et al., 2006). Rnd1 es expresado en altos niveles durante la fase sinaptogénica, está implicado en la formación de espinas dendríticas (Ishikawa et al., 2003) y desempeña un papel crítico en el desarrollo dendrítico dependiente de la actividad neuronal en neuronas de hipocampo (Ishikawa et al., 2006).

Los altos niveles que hemos apreciado en el SNC pre y postnatal sugieren que también RhoE podría tener importantes funciones en el desarrollo y maduración del sistema nervioso, de una manera similar a otros miembros de la subfamilia Rnd.

De hecho, nuestro trabajo muestra que la migración de las células de la ZSV-CMR-BO y la comisura anterior está alterada en ratones que no expresan RhoE y no descartamos que un análisis más pormenorizado de otras regiones encefálicas muestre otras alteraciones aún por descubrir.

Nuestro trabajo muestra que esto es así, al menos para las células de la CMR. Recientemente se ha demostrado que otras Rho GTPasas están también implicadas en el desarrollo de estas neuronas. Así, se ha comprobado cómo proteínas que interaccionan con Cdc42 y Rac 1 son necesarias para que se produzca una adecuada migración de las células de la ZSV (Balenci et al., 2007). Se podría especular que algo similar a lo que realiza Rnd2 controlando la migración radial de neuronas corticales (Heng et al., 2008; Nakamura et al., 2006) lo podría realizar RhoE en la CMR. Nuestros resultados, que más adelante discutiremos, con el ratón RhoE<sup>gt/gt</sup> confirman el papel de RhoE en la migración de estas células.

La expresión de RhoE en la capa granular externa del cerebelo también sugiere un papel de esta proteína en el desarrollo del cerebelo. Es interesante el hecho de que la actividad del efector de RhoE, ROCK I, produce un aumento de la formación de axones en células granulares del cerebelo en cultivo, sugiriendo que la ruta RhoA/ROCK controla el crecimiento axonal y el desarrollo temprano de la axonogénesis en las células granulares del cerebelo (Bito et al., 2000). Teniendo en cuenta que RhoE inhibe a ROCK I (Riento et al., 2003), y que está presente en la capa granular externa pero no en la capa granular interna, podemos esperar que RhoE también regule el crecimiento axonal en estas neuronas.

## **5.2. La eliminación de la expresión de las proteínas Rho muestra su importancia en el desarrollo**

En este trabajo estudiamos algunos de los efectos que la eliminación de la expresión de RhoE produce en los ratones. Las proteínas Rho son reguladores de funciones esenciales, lo que en muchas ocasiones se ha demostrado gracias a la generación de ratones a los que se ha eliminado la expresión de un gen concreto (Heasman and Ridley, 2008), aunque el efecto preciso varía considerablemente dependiendo del gen eliminado.

Centrándonos en los miembros más importantes de la familia, el ratón KO de Rac1 es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario, mientras que las alteraciones más relevantes de los ratones Rac2-KO afectan a los neutrófilos. Sin embargo, el KO de Rac3 es normal y viable, aunque presenta algunos defectos en sus

capacidades motoras. Por otro lado la eliminación de Cdc42, igual que en el caso de Rac1, es letal durante la vida embrionaria. La eliminación de la expresión de RhoB da lugar a animales viables y con un desarrollo normal pero con mayor predisposición a desarrollar tumores de piel. Finalmente la eliminación de la expresión de RhoC no produce graves alteraciones aparentes, por el contrario en estos animales la movilidad de células tumorales se encuentra reducida y por tanto también las metástasis (Heasman and Ridley, 2008).

Por otro lado, la proteína p190-Rho-GAP, relacionada funcionalmente con RhoE (Fortier et al., 2008), parece ser esencial para el desarrollo, puesto que su ausencia da lugar a ratones con profundos defectos neuronales, que incluyen anomalías en la fusión de los hemisferios, la forma de los ventrículos, formación de los ojos, el cierre del tubo neural y la guía axonal (Brouns et al., 2000; Brouns et al., 2001).

También los ratones a los que se les ha deleccionado DH-GEF, una de las proteínas activadoras de Rho, tienen una elevada mortalidad embrionaria y al nacer muestran desorganización de las fibras musculares y alteraciones en la morfología del encéfalo (O'Brien et al., 2000).

Además se ha estudiado el fenotipo de ratones carentes de los efectores ROCK I y ROCK II. Mientras que los ratones con deficiencia de ROCK I presentan onfaloceles y fallos en el cierre de los ojos a nivel embrionario (Shimizu et al., 2005), los ratones deficientes en ROCK II tienen una mortalidad embrionaria del 90%, como consecuencia de problemas relacionados con la placentación, por otro lado los ratones que consiguen nacer no parecen alterados (Thumkeo et al., 2003). Finalmente, la eliminación de Cdc42-GAP (una proteína inactivadora de Cdc42) produce una reducción de la masa corporal, con pérdida de tejido adiposo, una severa lordocifosis, atrofia muscular, osteoporosis y una reducción en la reepitelización de las heridas (Wang et al., 2007).

En resumen, el análisis *in vivo* de la función de proteínas de la familia Rho mediante el silenciamiento total o parcial sugiere que las proteínas Rho están implicadas en diversos aspectos del desarrollo embrionario de los animales. Nosotros, en este trabajo, demostramos que los ratones que carecen de RhoE presentan graves defectos de desarrollo. Estos ratones, que tras el nacimiento sólo son capaces de sobrevivir hasta el destete, muestran graves alteraciones en diversos sistemas del SNC.

Nuestros resultados muestran que RhoE es necesario para una correcta formación del SNC. Los ratones que no expresan esta proteína, además de lo descrito previamente, presentan severas malformaciones entre las que destacan hidrocefalia, defectos en la mielinización, alteración del sistema ZSV-CMR-BO y del sistema motor, y la ausencia del nervio peroneo común con atrofia de sus músculos diana.

Como acabamos de indicar, el grado de hidrocefalia es muy variable y no todos los ratones la muestran, lo que nos sugiere que podría ser consecuencia de otras malformaciones que secundariamente alteran los mecanismos de drenaje del líquido cefalorraquídeo, ya que en ocasiones se ve afectado un solo ventrículo. No obstante tampoco podemos descartar que se produzca por un exceso de secreción de líquido. Aunque la hidrocefalia no es rara en ratones con genes cuya modificación afecta al SNC, es destacable que la ausencia de otro gen relacionado con la familia Rho provoca también esta alteración. Se trata de OPHN1, que codifica oligophrenin1, una proteína GAP de Rho que está relacionada directamente con los retrasos mentales ligados al cromosoma X (Billuart et al., 1998).

Otro hallazgo muy llamativo en el SNC del ratón RhoE *gt/gt* es la desmielinización de las fibras nerviosas centrales, llegando a desaparecer estructuras como la comisura anterior y apreciándose una disminución en la expresión de MBP en todo el SNC. La desmielinización generalmente está asociada con una reducción drástica de lípidos, hecho que se relaciona directamente con una disminución en la función de los oligodendrocitos. Parece que las proteínas Rho son importantes para la correcta mielinización, porque, aparte de RhoE, otros genes relacionados, como Cdc42 o Rac1 influyen en estos procesos. En ausencia de Cdc42 las vainas de mielina de los oligodendrocitos aparecen más delgadas (Heasman and Ridley, 2008). En el caso de Rac1, se ha visto que eliminando su expresión en células de Schwann, éstas pierden la capacidad de generar lamelipodios, esenciales para envolver los axones y mielinizarlos (Benninger et al., 2007; Nodari et al., 2007). Asimismo en ratones KO condicionales de Rac1 aparecen defectos en el cuerpo caloso y las comisuras, conllevando la desaparición de la comisura anterior (Chen et al., 2007). Finalmente, también Rnd2 podría estar implicado en el desarrollo de las fibras comisurales, ya que sus niveles están muy aumentados en ratones con defectos en estas fibras (incluyendo las de la comisura anterior) causados por la eliminación del factor de transcripción COUP-TFI (Armentano et al., 2006).

Por otra parte, aunque existen diversos genes implicados en la correcta formación de la comisura anterior, queremos destacar la implicación de los genes de la familia de las efrinas y semaforinas. Estas proteínas, controlan por medio de

atracciones y repulsiones selectivas, la extensión y guía axonal en numerosas regiones del SNC (Fiore and Puschel, 2003; Reber et al., 2007), entre otras en la comisura anterior. Concretamente se ha visto que Sema3F es necesaria para una correcta guía axonal y los ratones que carecen de ella muestran defectos en la formación de fibras, entre otras, de la comisura anterior (Sahay et al., 2003). Asimismo, se ha descrito la desaparición de la comisura anterior en ratones que no expresan el receptor A4 de las efrinas (EphA4), algo que, con grados diversos de severidad ocurre también en ratones mutantes de otros Eph (Dottori et al., 1998). El interés de este asunto es que, como más adelante comentaremos, los ratones EphA4-KO tampoco forman el nervio peroneo común (Helmbacher et al., 2000), por lo que presentan importantes similitudes con los RhoE gt/gt.

#### **5.4. RhoE está implicado en la migración de las células a través de la CMR hacia el bulbo olfatorio**

Como previamente se ha comentado, uno de los hallazgos más destacados en este trabajo es que el sistema ZSV-CMR-BO, que expresa altos niveles de RhoE, está alterado. En los cerebros de los ratones RhoE gt/gt se acumulan células en la zona ZSV, de manera que la CMR no se forma adecuadamente y, en consecuencia, los neuroblastos formados en la ZSV no llegan de manera correcta a su destino final en el bulbo olfatorio. El resultado final es una desestructuración de algunas capas del bulbo olfatorio.

Hemos comprobado que las células acumuladas son neuroblastos (o células A) y que el problema parece radicar en una incorrecta migración de los mismos, lo que se puede concluir de la acumulación de células BrdU positivas en las partes caudales del sistema. Si el problema está en la incapacidad de los propios neuroblastos para migrar o si depende del ambiente en que éstos se desenvuelven está aún por determinar.

Ya en el bulbo olfatorio, la población celular alterada por el defecto en la corriente corresponde a las interneuronas calbindina positivas periglomerulares, muy disminuida en los ratones RhoE gt/gt, mientras que en los controles son abundantes y rodean de manera ordenada los glomérulos.

Estos defectos estructurales podrían explicar resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que han mostrado problemas olfatorios en los ratones RhoE gt/gt. En efecto, los ratones que no producen RhoE necesitan 3 veces más de tiempo que los controles para encontrar un foco de olor materno.

Son numerosos los genes cuya eliminación produce acumulación de células en la ZSV con modificaciones en la CMR y alteraciones más o menos graves en la morfología del bulbo olfatorio de manera similar a lo que vemos en los ratones RhoE gt/gt. Alguno de ellos tiene relación con las proteínas Rho, lo que no es extraño por el papel de estas proteínas en el control del citoesqueleto y la implicación de éste en las migraciones celulares. Recientemente se ha demostrado que otras Rho GTPasas están también implicadas en el desarrollo de estas neuronas. Cdc42 y Rac1 son el andamiaje para la proteína IQGAP1 en el control del proceso migratorio de los progenitores neurales a través de la CMR (Balenci et al., 2007). Además el factor de transcripción SRF (serum response factor), diana de algunas vías de señalización mediadas por Rho (Hill et al., 1995), es esencial para la migración neuronal a través de la CMR, controlando la expresión de la estructura y dinámica de los microfilamentos de actina (Alberti et al., 2005).

Nuestros resultados con el ratón RhoE gt/gt sugieren un nuevo papel de RhoE en el control de la CMR, de manera similar a lo que realiza Rnd2 controlando la migración radial de neuronas corticales (Heng et al., 2008; Nakamura et al., 2006), como factor necesario para que los neuroblastos migren con éxito fuera de la ZSV a través de la CMR y evitar su acumulación.

### **5.5 RhoE gt/gt es esencial para la correcta maduración del sistema motor y para la formación del nervio peroneo.**

En este trabajo mostramos cómo los ratones que no expresan RhoE presentan alteraciones en la función motora y anormalidades estructurales, como la ausencia del nervio peroneo común y el retraso en la maduración de las uniones neuromusculares.

Los ratones que no producen RhoE, se aprecia una reducida capacidad de realizar una correcta marcha. Además, hemos observado que la ausencia de RhoE se traduce en una menor masa muscular, si bien la morfología de las secciones de músculo no difieren en exceso de las controles y, de manera aparente, la morfología de las secciones de los nervios tampoco presenta anormalidades. No obstante, sí que hemos encontrado diferencias en la maduración y tamaño de las uniones neuromusculares, probablemente consecuencia de una maduración retrasada en ausencia de RhoE.

Trabajos recientes muestran que RhoE tiene algún papel en la maduración muscular. Primero, se ha demostrado que RhoE es esencial para la formación de los somitos en *Xenopus* (Goda et al., 2009), y por otro lado que es esencial para la

elongación de mioblastos y su alineamiento previo a la fusión e inducción de la miogénesis (Fortier et al., 2008).

Nuestros resultados indican que RhoE no es estrictamente esencial para la formación de los somitos *in vivo* en el ratón, ya que los órganos de ellos derivados, como músculos o huesos, se forman. Sin embargo, sí puede tener un papel en el correcto desarrollo de sus derivados. Hemos observado un retraso en la maduración neuromuscular y otros resultados de nuestro laboratorio han mostrado que los ratones RhoE *gt/gt* tienen retrasados los procesos de osificación. A esto se añade el alto nivel de RhoE en las células precursoras de músculo, que es muy elevado en fases previas a la fusión de los mioblastos la cual empieza a los 14,5 días de vida embrionaria (Vasyutina et al., 2009). Por ello, podemos especular que la ausencia de RhoE podría tener como consecuencia un retraso en el desarrollo de los procesos de maduración muscular y neuromuscular.

La ausencia de nervio peroneo común es una de las observaciones más interesantes y sorprendentes en este trabajo. Esta ausencia viene acompañada de la atrofia consecuente en los músculos que inerva, en la zona craneolateral de las extremidades pelvianas. Es interesante hacer notar que, además de RhoE, otros genes son también responsables de este particular resultado.

El receptor A4 de efrinas (EphA4) (Helmbacher et al., 2000) y el locus HoxD (Tarchini and Duboule, 2006), son también necesarios para un correcto desarrollo del nervio peroneo común. De manera similar a RhoE, la ausencia de expresión de EphA4 en el ratón provoca la agenesia del nervio peroneo común y una atrofia en los músculos a los que inerva, pero lo hace con una penetrancia del 88%, frente un 100% en los ratones RhoE *gt/gt*. En cambio, mientras que alrededor del 30% de los animales EphA4<sup>+/-</sup> presentan alguna anomalía en este nervio, todos los ratones RhoE<sup>+/-</sup> son normales.

¿Existe alguna relación entre las rutas de las efrinas y RhoE? Evidencias recientes muestran que en las rutas de señalización del sistema efrinas/Eph se incluyen las proteínas Rho, siendo el objeto final de las mismas la reorganización del citoesqueleto de actina.

Diversos estudios han identificado rutas de señalización mediadas por la activación de efrinas, la mayoría de las cuales convergen en la regulación de GTPasas de pequeño tamaño que incluyen Rac, Cdc42, y RhoA. Por ejemplo la activación de EphA por sus ligandos genera una inhibición transitoria de Rac1, concomitante con una activación de RhoA (Jurney et al., 2002; Shamah et al., 2001). Además, varios



GEFs (reguladores positivos de las GTPasas Rho) han sido identificados como intermediarios que unen los receptores EphA con las proteínas Rho en los conos de crecimiento (Sahin et al., 2005; Shamah et al., 2001). Finalmente, proteínas GAP, que son reguladores negativos de Rho, también están implicadas en la señalización iniciada por las efrinas y sus receptores (Shi et al., 2007).

Hasta el momento no existen datos que relacionen directamente RhoE con el sistema efrinas/Eph, pero los fenotipos similares causados por la ausencia de estos genes, tanto en lo que respecta a la ausencia del nervio peroneo como a la de la comisura anterior, además de la relación entre el sistema efrinas/Eph y la familia Rho, sugiere que RhoE podría actuar como efector de Eph4A.

La pérdida de la función de Hoxd10, solo (Carpenter et al., 1997; Tarchini et al., 2005) o junto con Hoxc10 (Wu et al., 2008), también resulta en la ausencia del nervio peroneo común.

Hoy en día no se sabe que exista una relación entre la familia Rho y los genes Hox, cuya función general es la de regular la formación de patrones durante el desarrollo, pero de la misma manera que hemos comentado para los ratones deficientes en EphA4, sería interesante analizar los niveles de RhoE en los mutantes de Hox 10.

En resumen, la eliminación de la expresión de RhoE produce un fenotipo caracterizado por profundas alteraciones en la formación del sistema nervioso, tanto en la migración neuronal como en el desarrollo del sistema motor, en especial, en la formación del nervio peroneo. Recientemente se ha publicado que RhoE induce la formación de neuritas (Talens-Visconti et al., 2010) lo que podría ayudar a explicar la importancia de esta proteína y las alteraciones observadas en ratones que carecen de RhoE. No obstante, nuevos estudios son necesarios para investigar los mecanismos concretos por los que la ausencia de RhoE provoca estas importantes alteraciones.

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. RhoE se expresa en embriones de ratón al menos a partir de 8,5 días de gestación. Conforme avanza el desarrollo su expresión se generaliza y su intensidad aumenta.
2. Entre los órganos con niveles más altos de RhoE se encuentran los del SNC. En ellos, los niveles de RhoE disminuyen progresivamente a partir de las primeras semanas postnatales.
3. Dentro del SNC, RhoE tiene una expresión generalizada, predominantemente neuronal, con localización en células que experimentan migraciones como las de la corriente migratoria rostral y las de la capa externa del cerebelo o que envían largos axones, como las motoneuronas.
4. La eliminación de la expresión de RhoE en ratones produce graves alteraciones en el SNC, entre las que destacan un menor grado de mielinización con ausencia de la rama anterior de la comisura anterior, hidrocefalia en grado variable y acúmulo de células en la zona subventricular.
5. La ausencia de RhoE produce un retraso en la migración de las células que, partiendo de la zona subventricular y a través de la corriente migratoria rostral llegan al bulbo olfatorio. En consecuencia, se produce una alteración en la distribución de las células, especialmente en las células calbindina positivas de la zona periglomerular del bulbo olfatorio.
6. La ausencia de RhoE produce un déficit motor generalizado, caracterizado por un retraso en la maduración de las placas motoras.
7. RhoE es necesario para la formación del nervio peroneo común.
8. En conjunto, nuestros resultados muestran un nuevo papel de RhoE en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Además, sugieren que esta proteína podría estar implicada en numerosas patologías neurales.



## **7. RESUMEN**





## 7. RESUMEN

Las GTPasas de la familia Rho están adquiriendo un gran interés en los últimos años por su papel en el desarrollo y función del sistema nervioso central (SNC). RhoE es un miembro de esta gran familia cuyas funciones *in vivo* no están aún bien definidas. En este trabajo estudiamos la expresión de RhoE en el desarrollo embrionario y postnatal y su papel en el SNC analizando las características de ratones modificados genéticamente, que no expresan el gen RhoE. Nuestros resultados muestran que RhoE se expresa en diferentes órganos embrionarios, entre los que se encuentra el SNC, desde edades tempranas. En el SNC postnatal se expresa con altos niveles en las primeras etapas y se localiza en numerosos sitios, destacando su presencia en las células de la corriente migratoria rostral, la capa granular externa del cerebelo o en las motoneuronas. La eliminación de la expresión de RhoE se traduce en la aparición de graves alteraciones en el sistema nervioso. Los ratones que no expresan RhoE presentan un acúmulo anormal en la zona subventricular de células que hemos caracterizado como neuroblastos postmitóticos, que migran en una tasa mucho menor a través de la corriente migratoria rostral. En consecuencia, a los bulbos olfatorios llegan menos células, que, además, se disponen de forma alterada, de manera que las células calbindina positivas están en menor proporción y muy desorganizadas. Además, en los ratones que carecen de RhoE la rama anterior de la comisura anterior, que conecta ambos bulbos olfatorios, está ausente, y hay en todo su cerebro una reducción en la mielinización. Por otra parte, estos ratones tienen alterado el sistema motor, muestran un retraso en la maduración de las sinapsis neuromusculares y, sorprendentemente, no forman nervio peroneo común, que está ausente en todos los ratones analizados. Estos resultados muestran que RhoE es una proteína esencial en el desarrollo del sistema nervioso, que controla eventos tan diferentes como la migración neuronal y la formación de nervios periféricos.



## **8. SUMMARY**



## 8. SUMMARY

Rnd proteins are a subfamily of Rho GTPases involved in the control of actin cytoskeleton dynamics, which differently to the other Rho members are constitutively active. In this work we describe Rnd3/RhoE expression and we show the *in vivo* effect of RhoE gene ablation in the central nervous system (CNS). RhoE is widely expressed during the embryonic development, including the CNS. RhoE is found at high levels in the postnatal CNS and is extensively localized, including the cells of the rostral migratory stream, cerebral cortex and olfactory bulb and those of the external granule cell layer of the cerebellum and the motoneurons. Mice lacking RhoE expression (RhoE *gt/gt*) accumulate cells in the subventricular zone, which show a delayed migration through the rostral migratory stream to the olfactory bulb. As a consequence, the calbindin positive cells of this region are disorganized. Moreover, RhoE null mice have reduced central myelination, lack of the anterior branch of the anterior commissure and are occasionally hydrocephalic. Finally, these mice have an altered motor system, with a delayed maturation of the neuromuscular junctions and, strikingly, they do not form the common peroneal nerve. These results show that RhoE is an essential protein for the nervous system development controlling important event such as neuronal migration and peripheral nerve formation.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**





## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J. F., Prendergast, G. C. and Benjamin, L. E.** (2003). RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev* **17**, 2721-32.
- Alberti, S., Krause, S. M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F. F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G. et al.** (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6148-53.
- Armentano, M., Filosa, A., Andolfi, G. and Studer, M.** (2006). COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. *Development* **133**, 4151-62.
- Balenci, L., Saudi, Y., Grunwald, D., Deloulme, J. C., Bouron, A., Bernards, A. and Baudier, J.** (2007). IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J Neurosci* **27**, 4716-24.
- Bektic, J., Pfeil, K., Berger, A. P., Ramoner, R., Pelzer, A., Schafer, G., Kofler, K., Bartsch, G. and Klocker, H.** (2005). Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate*.
- Benninger, Y., Thurnherr, T., Pereira, J. A., Krause, S., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Herzog, D., Nave, K. A., Franklin, R. J., Meijer, D. et al.** (2007). Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol* **177**, 1051-61.
- Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M. C., Zemni, R., Carrie, A., Beldjord, C., Kahn, A., Moraine, C. et al.** (1998). Oligophrenin 1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Pathol Biol (Paris)* **46**, 678.
- Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T. and Narumiya, S.** (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* **26**, 431-41.
- Boda, B., Nikonenko, I., Alberi, S. and Muller, D.** (2006). Central Nervous System Functions of PAK Protein Family: From Spine Morphogenesis to Mental Retardation. *Mol Neurobiol* **34**, 67-80.
- Bowerman, M., Shafey, D. and Kothary, R.** (2007). Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci* **32**, 120-31.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T. and Settleman, J.** (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **127**, 4891-903.

- Brouns, M. R., Matheson, S. F. and Settleman, J.** (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* **3**, 361-7.
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjano, I. M.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356-370.
- Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Davis, A. P., Nguyen, T. P. and Capecchi, M. R.** (1997). Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. *Development* **124**, 4505-14.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B. and Morton, A. J.** (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* **19**, 3248-57.
- Coligan, J. E., M., D. B., L., P. H., W., S. D. and T., W. P.** (2000). Electrophoresis. In *Current protocols in protein science*, (ed. Wiley).
- Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G. and de Curtis, I.** (2005). Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol Cell Biol* **25**, 5763-76.
- Chardin, P.** (1999). Rnd proteins: a new family of Rho-related proteins that interfere with the assembly of filamentous actin structures and cell adhesion. *Prog Mol Subcell Biol* **22**, 39-50.
- Chardin, P.** (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 54-62.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T. et al.** (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* **10**, 758-65.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linnquist, D., Campbell, K., Zheng, Y. and Kuan, C. Y.** (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* **27**, 3884-93.
- Decourt, B., Bouleau, Y., Dulon, D. and Hafidi, A.** (2005). Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* **159**, 36-54.
- Di Scipio, F., Raimondo, S., Tos, P. and Geuna, S.** (2008). A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech* **71**, 497-502.
- Diekmann, D., Nobes, C. D., Burbelo, P. D., Abo, A. and Hall, A.** (1995). Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *Embo J* **14**, 5297-305.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-61.

- Dorn, T., Kuhn, U., Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Ellwart, J., Peters, T., Scharffetter-Dovas, A. and Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* **390**, 1-9.
- Kochanek, K., Semmrich, M., Laschinger, M. et al. (2007). RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling. *Blood* **109**, 2346-55.
- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P. F., Murphy, M., Kontgen, F. and Boyd, A. W. (1998). EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13248-53.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-7.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
- Fiore, R. and Puschel, A. W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci* **8**, s484-99.
- Fortier, M., Comunale, F., Kucharczak, J., Blangy, A., Charrasse, S. and Gauthier-Rouviere, C. (2008). RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ* **15**, 1221-31.
- Foster, R., Hu, K. Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J. and Settleman, J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* **16**, 2689-99.
- Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y. and Narumiya, S. (1996). Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 23022-8.
- Gallo, G. (2006). RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. *J Cell Sci* **119**, 3413-23.
- Garcia-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* **36**, 234-48.
- Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J. R. and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* **27**, 13117-29.
- Goda, T., Takagi, C. and Ueno, N. (2009). Xenopus Rnd1 and Rnd3 GTP-binding proteins are expressed under the control of segmentation clock and required for somite formation. *Dev Dyn* **238**, 2867-76.
- Gomez, J. C., Soltys, J., Okano, K., Dinauer, M. C. and Doerschuk, C. M. (2008). The role of Rac2 in regulating neutrophil production in the bone marrow and circulating neutrophil counts. *Am J Pathol* **173**, 507-17.
- Govek, E. E., Newey, S. E. and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* **19**, 1-49.

- Gu, Y., Chae, H. D., Siefiring, J. E., Jasti, A. C., Hildeman, D. A. and Williams, D. A.** (2006). RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat Immunol*.
- Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G. E. and Ridley, A. J.** (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* **18**, 4761-71.
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. and Mak, T. W.** (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* **19**, 1974-9.
- Hall, A. and Nobes, C. D.** (2000). Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 965-70.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Heeroma, J. H., Plomp, J. J., Roubos, E. W. and Verhage, M.** (2003). Development of the mouse neuromuscular junction in the absence of regulated secretion. *Neuroscience* **120**, 733-44.
- Helmbacher, F., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Tiret, L. and Charnay, P.** (2000). Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* **127**, 3313-24.
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R. et al.** (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* **455**, 114-8.
- Hill, C. S., Wynne, J. and Treisman, R.** (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-70.
- Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H. and Narumiya, S.** (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* **141**, 1625-36.
- Hughes, D. S., Schade, R. R. and Ontell, M.** (1992). Ablation of the fetal mouse spinal cord: the effect on soleus muscle cytoarchitecture. *Dev Dyn* **193**, 164-74.
- Ikeda, H., Nagashima, K., Yanase, M., Tomiya, T., Arai, M., Inoue, Y., Tejima, K., Nishikawa, T., Omata, M., Kimura, S. et al.** (2003). Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G880-6.
- Ishikawa, Y., Katoh, H. and Negishi, M.** (2003). A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *J Neurosci* **23**, 11065-72.
- Ishikawa, Y., Katoh, H. and Negishi, M.** (2006). Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci Lett* **400**, 218-23.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. et al.** (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to

and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J* **15**, 1885-93.

**Jacquier, A., Buhler, E., Schafer, M. K., Bohl, D., Blanchard, S., Beclin, C. and Haase, G.** (2006). Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. *Ann Neurol* **60**, 105-17.

**Jaffe, A. B. and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.

**Journey, W. M., Gallo, G., Letourneau, P. C. and McLoon, S. C.** (2002). Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J Neurosci* **22**, 6019-28.

**Kablar, B. and Rudnicki, M. A.** (1999). Development in the absence of skeletal muscle results in the sequential ablation of motor neurons from the spinal cord to the brain. *Dev Biol* **208**, 93-109.

**Kakimoto, T., Katoh, H. and Negishi, M.** (2004). Identification of splicing variants of Rapostlin, a novel RND2 effector that interacts with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein and induces neurite branching. *J Biol Chem* **279**, 14104-10.

**Kempermann, G. and Gage, F. H.** (1999). New nerve cells for the adult brain. *Sci Am* **280**, 48-53.

**Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N. and Kaibuchi, K.** (2004). Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci* **24**, 3480-8.

**Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**, 1942-52.

**Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S. and Lim, L.** (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* **17**, 1201-11.

**Lanuzza, M. A., Garcia, N., Santafe, M., Gonzalez, C. M., Alonso, I., Nelson, P. G. and Tomas, J.** (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res* **67**, 607-17.

**Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L.** (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* **270**, 29051-4.

**Linseman, D. A. and Loucks, F. A.** (2008). Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci* **13**, 657-76.

**Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. and Prendergast, G. C.** (2001). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* **21**, 6906-12.

- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A.** (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**, 1145-8.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-81.
- Luo, L.** (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 173-80.
- Luskin, M. B.** (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-89.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K.** (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J* **15**, 2208-16.
- Monnier, P. P., Sierra, A., Schwab, J. M., Henke-Fahle, S. and Mueller, B. K.** (2003). The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* **22**, 319-30.
- Mueller, B. K., Mack, H. and Teusch, N.** (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 387-98.
- Nadif Kasri, N. and Van Aelst, L.** (2008). Rho-linked genes and neurological disorders. *Pflugers Arch* **455**, 787-97.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. and Narumiya, S.** (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* **392**, 189-93.
- Nakamura, K., Yamashita, Y., Tamamaki, N., Katoh, H., Kaneko, T. and Negishi, M.** (2006). In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neurosci Res* **54**, 149-53.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B. and Luo, L.** (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**, 5329-38.
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E. and Van Aelst, L.** (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol* **64**, 58-74.
- Nikovits, W., Jr., Cann, G. M., Huang, R., Christ, B. and Stockdale, F. E.** (2001). Patterning of fast and slow fibers within embryonic muscles is established independently of signals from the surrounding mesenchyme. *Development* **128**, 2537-44.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**, 1235-44.
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A. and Chardin, P.** (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* **141**, 187-97.
- Nodari, A., Zambroni, D., Quattrini, A., Court, F. A., D'Urso, A., Recchia, A., Tybulewicz, V. L., Wrabetz, L. and Feltri, M. L.** (2007). Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. *J Cell Biol* **177**, 1063-75.

- O'Brien, S. P., Seipel, K., Medley, Q. G., Bronson, R., Segal, R. and Streuli, M. (2000). Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12074-8.
- Poch, E., Minambres, R., Mocholi, E., Ivorra, C., Perez-Arago, A., Guerri, C., Perez-Roger, I. and Guasch, R. M. (2006). RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res*.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A. S., McNamara, J. O. and Williams, S. M. (2004a). Construcción de los circuitos neurales. In *Neurociencia*, (ed. E. M. Panamericana), pp. 583-616. Madrid: Sinauer Associates.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A. S., McNamara, J. O. and Williams, S. M. (2004b). El encéfalo cambiante. In *Neurociencia*, (ed. E. M. Panamericana), pp. 553-681. Madrid: Sinauer Associates.
- Ramakers, G. J. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* **25**, 191-9.
- Reber, M., Hindges, R. and Lemke, G. (2007). Eph receptors and ephrin ligands in axon guidance. *Adv Exp Med Biol* **621**, 32-49.
- Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.
- Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-22.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**, 522-9.
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B. and Ridley, A. J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 4219-29.
- Riento, K., Totty, N., Villalonga, P., Garg, R., Guasch, R. and Ridley, A. J. (2005). RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *Embo J*.
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B. et al. (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* **10**, 183-96.
- Sahay, A., Molliver, M. E., Ginty, D. D. and Kolodkin, A. L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* **23**, 6671-80.
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O'Connell, S., Cowan, C. W. et al. (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* **46**, 191-204.
- Salpeter, M. M. and Loring, R. H. (1985). Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol* **25**, 297-325.
- Salpeter, M. M., Marchaterre, M. and Harris, R. (1988). Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J Cell Biol* **106**, 2087-93.

- Sanes, J. R. and Lichtman, J. W.** (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* **2**, 791-805.
- Semenova, M. M., Maki-Hokkonen, A. M., Cao, J., Komarovski, V., Forsberg, K. M., Koistinaho, M., Coffey, E. T. and Courtney, M. J.** (2007). Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat Neurosci* **10**, 436-43.
- Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L. C. and Weinberg, R. A.** (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* **69**, 539-49.
- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A. et al.** (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* **105**, 233-44.
- Shi, L., Fu, W. Y., Hung, K. W., Porchetta, C., Hall, C., Fu, A. K. and Ip, N. Y.** (2007). Alpha2-chimaerin interacts with EphA4 and regulates EphA4-dependent growth cone collapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16347-52.
- Shimizu, Y., Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Oshima, H., Oshima, M., Noda, Y., Matsumura, F., Taketo, M. M. and Narumiya, S.** (2005). ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol* **168**, 941-53.
- Small, J. V.** (1994). Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol* **5**, 157-63.
- Stossel, T. P.** (1993). On the crawling of animal cells. *Science* **260**, 1086-94.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. et al.** (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-33.
- Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C. and Guasch, R. M.** (2010). RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *J Neurochem* **112**, 1074-87.
- Tarchini, B. and Duboule, D.** (2006). Control of Hoxd genes' collinearity during early limb development. *Dev Cell* **10**, 93-103.
- Tarchini, B., Huynh, T. H., Cox, G. A. and Duboule, D.** (2005). HoxD cluster scanning deletions identify multiple defects leading to paralysis in the mouse mutant Ironside. *Genes Dev* **19**, 2862-76.
- Terrado, J., Burgess, R. W., DeChiara, T., Yancopoulos, G., Sanes, J. R. and Kato, A. C.** (2001). Motoneuron survival is enhanced in the absence of neuromuscular junction formation in embryos. *J Neurosci* **21**, 3144-50.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A.** (1997). Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* **19**, 625-34.
- Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Hirose, M., Nonomura, K., Oshima, H., Oshima, M., Taketo, M. M. and Narumiya, S.** (2003). Targeted disruption of the mouse rho-associated



- kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol* **23**, 5043-55.
- Topp, J. D., Gray, N. W., Gerard, R. D. and Horazdovsky, B. F.** (2004). Alsln is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **279**, 24612-23.
- Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A.** (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* **13**, 580-7.
- Trapp, T., Olah, L., Holker, I., Besselmann, M., Tiesler, C., Maeda, K. and Hossmann, K. A.** (2001). GTPase RhoB: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. *Mol Cell Neurosci* **17**, 883-94.
- van Galen, E. J. and Ramakers, G. J.** (2005). Rho proteins, mental retardation and the neurobiological basis of intelligence. *Prog Brain Res* **147**, 295-317.
- Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H. and Birchmeier, C.** (2009). The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8935-40.
- Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B. J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P. C., McKenzie, A. and Turner, M.** (2004). Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG. *Mol Cell Biol* **24**, 719-29.
- Villalonga, P., Guasch, R. M., Riento, K. and Ridley, A. J.** (2004). RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol* **24**, 7829-40.
- Villalonga, P. and Ridley, A. J.** (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* **24**, 159-64.
- Vincent, S. and Settleman, J.** (1999). Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol* **78**, 539-48.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R.** (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 778-90.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. and Mueller, B. K.** (2000). Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* **149**, 263-70.
- Wang, G., Woods, A., Agoston, H., Ulici, V., Glogauer, M. and Beier, F.** (2007). Genetic ablation of Rac1 in cartilage results in chondrodysplasia. *Dev Biol* **306**, 612-23.
- Wennerberg, K., Forget, M. A., Ellerbroek, S. M., Arthur, W. T., BurrIDGE, K., Settleman, J., Der, C. J. and Hansen, S. H.** (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol* **13**, 1106-15.
- Weston, C., Yee, B., Hod, E. and Prives, J.** (2000). Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* **150**, 205-12.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* **18**, 779-91.
- Witzemann, V.** (2006). Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* **326**, 263-71.

- Wu, Y., Wang, G., Scott, S. A. and Capecchi, M. R.** (2008). Hoxc10 and Hoxd10 regulate mouse columnar, divisional and motor pool identity of lumbar motoneurons. *Development* **135**, 171-82.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C. et al.** (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **29**, 160-5.
- Zambrowicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C. and Sands, A. T.** (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* **392**, 608-11.
- Zigmond, S. H.** (1996). Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 66-73.
- Zipkin, I. D., Kindt, R. M. and Kenyon, C. J.** (1997). Role of a new Rho family member in cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Cell* **90**, 883-94.