

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

**Función de Netrina1 y Semaforinas
secretables en la guía neuronal y axonal en el
hipocampo y el cerebelo**

Patricia Guijarro Larraz
Programa de Doctorado de Biología Celular
Bienio 1998-2000

Barcelona, Abril de 2006

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

Memoria presentada por la licenciada en Biología **Patricia Guijarro Larraz** para optar al grado de Doctora en Biología.

Esta Tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biología Celular, bienio 1998-2000, de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección del Dr. Eduardo Soriano García y del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedráticos de Biología Celular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, Abril de 2006

Visto bueno de los directores de la Tesis:

Dr. Eduardo Soriano García

Dr. José Antonio del Río Fernández

La doctoranda

Patricia Guijarro Larraz

Quisiera agradecer:

**a la Universidad de Barcelona y a mis directores Eduardo Soriano y José Antonio del Río,
la oportunidad de poder realizar esta tesis doctoral;**

**a tots els que heu format part de la meva vida al laboratori, que hagueu compartit amb mi
èxits i fracassos de la vida rutinaria,
(i la pausa davant el tupperware),
riures i aquellarres,
sopars japonesos, casolans i calçotades,
cinema, música, política i literatura,
la copa nocturna i el cafè a mitja tarda,
o la conversa fins la matinada,**

**y a mi familia,
Antonio, Carmen, Miguel,
y Gerlac,**

**a vosotros,
la comprensión, la paciencia, el consejo, el apoyo,
y lo más valioso,
el cariño.**

Gracias a todos.

Ты течешь, как река. Странное
название!
И прозрачен асфальт, как в реке вода.
Ах, Арбат, мой Арбат,
ты - мое призвание.
Ты - и радость моя, и моя беда.

Пешеходы твои - люди невеликие,
каблуками стучат - по делам спешат.
Ах, Арбат, мой Арбат,
ты - моя религия,
мостовые твои подо мной лежат.

От любви твоей вовсе не
излечишься,
сорок тысяч других мостовых любя.
Ах, Арбат, мой Арбат,
ты - мое отечество,
никогда до конца не пройти тебя.

Песенка об Арбате
Слова и музыка Б. Окуджавы (1959)

Flueixes com un riu. Quin nom més
estrany!
I l'asfalt transparent és com l'aigua en el riu.
O! Arbat, el meu Arbat,
ets la meva vocació.
Tu ets la meva alegria, i la meva pena.

Els teus vianants són gent senzilla,
talonejant, van de pressa tot enfeinats.
O! Arbat, el meu Arbat,
ets la meva religió,
el teu empedrat jeu sota meu.

Del teu amor no te'n refàs del tot,
encara que estimis quaranta mil altres
empedrats,
O! Arbat, el meu Arbat
ets la meva pàtria,
Que mai acabes de recórrer.

Cançoneta de l'Arbat
lletra i música de Bulat Okudjava (1959)
Traducció: Alba Codina

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	9
I. FACTORES GUÍA Y SU FUNCIÓN EN NAVEGACIÓN NEURONAL DURANTE EL DESARROLLO	9
1. INTRODUCCIÓN	9
1.2.1. Definición de factor guía	9
1.2.2. Modos de actuación de factores guía	10
1.2.3. Comportamiento neuronal ante un factor guía	11
1.2.4. Tipos de factores guía según sus vías de señalización	12
1.2.5. Mediadores en la señal del factor guía	12
1.2.6. Modulación de la señal del factor guía	15
2. NETRINAS	17
2.1. Estructura	17
2.2. Función de Netrina1	18
2.3. Receptores de Netrina1	18
2.3.1. Dcc	18
2.3.2. Unc5	19
2.3.3. A2b	20
2.3.4. Integrinas	21
2.4. Señalización intracelular inducida por Netrina1	21
2.4.1. Adaptación del cono de crecimiento a Netrina1	21
2.4.2. Señalización de Netrina1 a través de Dcc	21
2.4.3. Señalización de Netrina1 a través de Unc5	24
2.5. Dcc y Unc5h como receptores de dependencia	25
3. SEMAFORINAS	27
3.1. Introducción	27
3.2. Semaforinas secretables	28
3.2.1. Estructura	28
3.2.2. Funciones	28
3.3. Receptores de Semaforinas secretables	30
3.3.1. Neuropilinas	30
3.3.2. Plexinas	34
3.3.3. Otros receptores de semaforinas secretables	36
3.4. Señalización intracelular inducida por semaforinas	38

4. OTRAS FAMILIAS DE FACTORES GUÍA	43
4.1. Slit	43
4.1.1. Guía axonal en la línea media	44
4.2. Efrinas-Eph	45
4.2.1. Formación de mapas topográficos	46
4.2.2. Señalización bidireccional Efrinas-Eph	47
4.3. Reelina	48
4.3.1. Mecanismo de acción de Reelina durante el desarrollo cerebral	50
II. FACTORES GUÍA Y SU FUNCIÓN EN REGENERACIÓN AXONAL ADULTA	51
1. INTRODUCCIÓN	51
1.1. La cicatriz glial	51
1.2. Astroglía reactiva	52
1.2.1. Inhibidores derivados de astroglía	53
1.3. Glía NG2-positiva	54
1.4. Oligodendroglía y mielina	54
1.4.1. Inhibidores asociados a mielina	55
1.4.2. Receptores para inhibidores asociados a mielina	56
1.4.3. Señalización intracelular asociada a inhibidores mielínicos	57
1.4.4. Otros inhibidores derivados de oligodendroglía	58
2. FACTORES GUÍA EN REGENERACIÓN AXONAL	59
2.1. Semaforinas como inhibidores de la regeneración axonal	59
III. EL HIPOCAMPO	61
1. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL EN EL ADULTO	61
1.1. El giro dentado	61
1.1.1. Histología del giro dentado	61
1.1.2. Tipos celulares en el giro dentado	62
1.1.3. Conexiones en el giro dentado	62
1.2. El hipocampo propio	63
1.2.1. Histología del hipocampo	63
1.2.2. Tipos celulares del hipocampo	64
1.2.3. Interneuronas del hipocampo	64
1.2.4. Región CA3 y sus conexiones	66
1.2.5. Región CA1 y sus conexiones	67
1.3. Región subicular	67
1.3.1. Subículum	67
1.3.2. Presubiculum	68
1.3.3. Parasubiculum	68
1.4. Corteza entorrinal	69
1.4.1. Histología y tipos celulares de la corteza entorrinal	69
1.4.2. Regiones de la corteza entorrinal y sus conexiones	69

1.4.3.	La proyección entorrino-hipocampal (vía perforante).	70
1.4.4.	Otras conexiones de la corteza entorrinal	71
2.	DESARROLLO DEL HIPOCAMPO	73
2.1.	Introducción	73
2.1.1.	Visión general del desarrollo de la corteza cerebral	73
2.1.2.	La migración radial	73
2.1.3.	La migración tangencial	73
2.1.4.	Células pioneras en el desarrollo de la corteza cerebral	75
2.2.	Neurogénesis y migración en la formación hipocampal	76
2.2.1.	Neurogénesis y migración en el hipocampo propio	76
2.2.2.	Neurogénesis y migración en el giro dentado	77
2.2.3.	Origen de las interneuronas de la formación hipocampal	78
2.3.	Desarrollo de las principales conexiones de la formación hipocampal	78
2.3.1.	Descripción general	78
2.3.2.	Mecanismos implicados	79
2.4.	Factores guía en el desarrollo de la formación hipocampal	80
2.4.1.	Netrinal	80
2.4.2.	Semaforinas	81
2.4.3.	Slits	82
2.4.4.	Efrinas/Eph	82
2.4.5.	Reelina	83
IV.	EL CEREBELO	85
1.	EL CEREBELO ADULTO	85
1.1.	Organización anatómica	85
1.2.	Organización funcional	86
1.3.	Histología y conexiones de la corteza cerebelar	87
1.3.1.	Neuronas y sus conexiones en la capa molecular	87
1.3.2.	Células de Purkinje y sus conexiones	87
1.3.3.	Neuronas y sus conexiones en la capa granular	87
1.3.4.	Células de la glia	89
1.4.	Histología de los núcleos profundos	90
1.5.	La compartimentalización del cerebelo	90
1.5.1.	Compartimientos sagitales	90
1.5.2.	Compartimientos transversales	91
2.	DESARROLLO DEL CEREBELO	93
2.1.	Especificación territorial del cerebelo en el tubo neural: el organizador ístmico	93
2.2.	Neurogénesis e histogénesis en el cerebelo	94
2.3.	Desarrollo de los núcleos profundos	95
2.4.	Desarrollo de las células de Purkinje	96
2.5.	Desarrollo de las células granulares	98
2.6.	Desarrollo de las interneuronas	101
2.7.	Desarrollo de la glía de Bergmann	102

2.3. Factores guía en la formación del cerebelo	103
2.3.1. Netrin1	103
2.3.2. Semaforinas	104
2.3.3. Slits	104
2.3.4. Efrinas	105
2.3.5. Reelina	105

OBJETIVOS **109**

OBJETIVO 1. Estudio de los mecanismos que intervienen en la migración de interneuronas inhibitoras durante el desarrollo postnatal del cerebelo **109**

OBJETIVO 2. Estudio de la función de las semaforinas Secretables Sema3A y Sema3F en la migración axonal de interneuronas inhibitoras de proyección local durante el desarrollo de la formación hipocampal. **109**

OBJETIVO 3. Estudio del efecto de la semaforina Secretable Sema3A en axones entorrino-hipocampales adultos axotomizados, a partir del modelo de axotomía in vitro de la conexión entorrino-hipocampal: cultivos organotípicos entorrino-hipocampales. **109**

RESULTADOS **113**

CAPÍTULO I **113**

NETRINA1 EJERCE UN EFECTO QUIMIOREPULSIVO INDEPENDIENTE DE DCC EN INTERNEURONAS CEREBELARES EN MIGRACIÓN **113**

1.1. Abstract	115
1.2. Introduction	116
1.3. Results	116
1.3.1. Netrin1 has a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons.	116
1.3.2. Migratory pathways of cerebellar interneurons	117
1.3.3. Expression of Netrin1 and its receptors in postnatal cerebellum	118
1.3.4. Anti-Dcc antibodies do not block the repulsive effect of Netrin1 on migrating interneurons	118
1.4. Discussion	119
1.4.1. Netrin1 acts simultaneously as a short- and long-range repulsive cue	119
1.4.2. Other guidance factors may affect interneuron migration	120
1.4.3. Dcc is not involved in the Netrin1-dependent response of cerebellar interneurons	120
1.4.4. Interneurons co-express <i>Netrin1</i> and its receptors <i>Dcc</i> and <i>Unc5h</i>	120
1.4.5. Bergmann glia and other supporting elements for interneuron migration	121
1.5. Materials and Methods	121
1.5.1. Animals and histology	121
1.5.2. Explant cultures	121
1.5.3. Immunohistochemistry	122
1.5.4. In situ hybridisation	122
1.5.5. Analysis and quantification	123
1.6. Acknowledgments	123
1.7. References	123
1.8. Figures	128

CAPÍTULO II	145
FUNCIÓN DE SEMA3A Y SEMA3F EN AXONES GABAÉRGICOS HIPOCAMPALES Y ENTORRINALES DURANTE EL DESARROLLO	145
2.1. Abstract	147
2.2. Introduction	148
2.3. Results	149
2.3.1. GABAergic hippocampal axons are repelled by Sema3A and Sema3F but GABAergic entorhinal axons are repelled only by Sema3F.	149
2.3.2. <i>Sema3A</i> , <i>Sema3F</i> and their receptors <i>Np1</i> and <i>Np2</i> are expressed in vivo in the embryonic hippocampal formation	149
2.3.3. Hippocampal interneurons express semaphorin receptors in vivo	150
2.4. Discussion	150
2.4.1. Sema3A and Sema3F may restrict initial GABAergic synaptic activity to the pyramidal apical dendrites in the stratum radiatum	151
2.4.2. Opposite action of Sema3A and Sema3F on principal neurons and interneurons of the entorhinal cortex	151
2.5. Material and Methods	152
2.5.1. Animals and histology	152
2.5.2. Explant cultures	152
2.5.3. Immunohistochemistry	152
2.5.4. In situ hybridisation	153
2.5.5. Analysis and quantification	153
2.6. References	153
2.7. Figures	156
CAPÍTULO III	167
LA FALTA DE SEMA3A PRODUCE UN AUMENTO DE LA REGENERACIÓN DE AXONES ENTORRINALES AXOTOMIZADOS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS ENTORRINO-HIPOCAMPALES	167
3.1. Abstract	169
3.2. Introduction	170
3.3. Results	170
3.3.1. Axotomy of the perforant pathway in vitro enhances the expression of <i>Sema3A</i> and <i>Np1</i>	170
3.3.2. Increased regrowth of entorhinal fibers in organotypic cultures from <i>Sema3A</i> knock-out mice	171
3.4. Discussion	171
3.4.1. The absence of <i>Sema3A</i> increases the regrowth of <i>Np1</i> -expressing entorhinal axons after lesion.	172
3.4.2. Sema3A together with other inhibitory cues blocks the in vitro regrowth of injured entorhinal axons.	172
3.5. Materials and Methods	173
3.5.1. Entorhino-hippocampal organotypic slice co-cultures and axotomy of the perforant pathway in vitro	173
3.5.2. In situ hybridization	173
3.5.3. Biocytin tracing, immunohistochemical method and quantification of entorhinal axons.	174
3.6. References	174

3.7. Figures	178
--------------	-----

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 185

1. INTRODUCCIÓN: RESUMEN DE RESULTADOS 185

2. NETRINA1, SEMA3A Y SEMA3F ACTÚAN COMO FACTORES QUIMIOREPUISIVOS EN LA MIGRACIÓN DE INTERNEURONAS INHIBIDORAS Y DE SUS AXONES DURANTE EL DESARROLLO 187

2.1. Netrina1 y la migración de interneuronas durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar 187

- 2.1.1. Netrina1 in vitro actúa como un factor quimiorepulsivo para interneuronas de la corteza cerebelar 188
- 2.1.2. Posible acción in vivo de Netrina1 en la migración de interneuronas de la corteza cerebelar 189
- 2.1.3. Dcc no transduce la señal quimiorepulsiva de Netrina1 en interneuronas de la corteza cerebelar 190
- 2.1.4. La glía de Bergmann como sustrato para la migración de interneuronas en la corteza cerebelar postnatal 192

2.2. Sema3A, Sema3F y la migración de axones GABAérgicos hipocampales durante el desarrollo de la formación hipocampal 193

- 2.2.1. Sema3A y Sema3F son factores quimiorepulsivos para axones GABAérgicos hipocampales y entorrinales in vitro 193
- 2.2.2. En el hipocampo, Sema3A y Sema3F actúan de forma similar sobre axones locales y de proyección 194
- 2.2.3. Sema3A y Sema3F pueden actuar en el hipocampo in vivo restringiendo la actividad sináptica inicial a los estratos radiado y lacunosum-moleculare 195
- 2.2.4. En el hipocampo, Sema3A y Sema3F actúan de forma opuesta sobre aferencias entorrinales excitatorias y GABAérgicas. 197

3. SEMA3A ES UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE AXONES REGENERANTES 198

3.1. La axotomía in vitro de la vía perforante altera la expresión de Sema3A y de su receptor Np1 199

3.2. La regeneración de axones entorrinales lesionados in vitro aumenta en cultivos organotípicos deficientes en *Sema3A* 200

3.3. Optimización de la regeneración de la vía perforante in vitro 200

- 3.3.1. Supresión funcional combinada de distintos factores inhibitorios de la regeneración axonal. 201
- 3.3.2. Estimulación de la capacidad intrínseca de regeneración en la neurona. 201

CONCLUSIONES 205

BIBLIOGRAFÍA 209

ABREVIATURAS 235