

COMPOSICIONES DE REELINA PARA
EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

CAMPO DE LA INVENCION

Se describen cambios en los niveles de Reelina así como la señalización de Reelina después de una función cognitiva. Esto se puede llevar a cabo al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento de repetición de Reelina, o una estructura formada a partir de las repeticiones del fragmento de Reelina a un paciente o sujeto. Los cambios a los niveles de Reelina se pueden utilizar para tratar diversas enfermedades neurodegenerativas, ataques neuronales o accidente cerebrovascular, tales como el síndrome X frágil, el síndrome de William, el síndrome de Rett, el síndrome de Down, el síndrome de Angelman, autismo, isquemia, hipoxia, la enfermedad de Alzheimer, y esquizofrenia. La Reelina también se puede utilizar para alterar la densidad de las espinas dendríticas, la potenciación disminuida a largo plazo, y la plasticidad sináptica disminuida y los déficits de aprendizaje asociativo. Se han encontrado particularmente útiles las estructuras formadas a partir de la región de repetición 3 de la Reelina de longitud total y la región de repetición 5 de la Reelina de longitud total, o la región de repetición 3 de la Reelina de longitud total y la región de repetición 6 de la Reelina de longitud total.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se sabe que el sistema de señalización del receptor de lipoproteínas desempeña una función significativa en el SNC de adultos, incluyendo la homeostasia de colesterol, el intercambio de proteínas extracelulares, y la modulación de la formación de memoria, la transmisión sináptica, la plasticidad y la maduración a través de la activación de muchas trayectorias de transducción de señales.

La proteína de matriz extracelular Reelina ha estado implicada en muchos trastornos neurológicos, entre los que se incluyen esquizofrenia (Guidotti, et al., Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. Arch. Gen Psychiatry. 2000; 57: 1061–1069; Chen, et al., Identification of a single nucleotide polymorphism at the 5' promoter region of human reelin gene and association study with schizophrenia. Mol. Psychiatry. 2002; 7: 447–448; Fatemi, et al., Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia. Int. Rev. Neurobiol. 2005; 71: 179–187, Torrey, et al., Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder and major depression in postmortem brains. Biol. Psychiatry. 2005; 57: 252–26), trastorno bipolar (Fatemi, et al., Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. Mol. Psychiatry. 2000; 5: 654–663; Torrey, et al., Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder and major

depression in postmortem brains. *Biol. Psychiatry*. 2005; 57: 252–260), depresión (Knable, et al., Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the stanley neuropathology consortium. *Mol. Psychiatry*. 2004; 9: 609–620; Lussier, et al., Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of Reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett*. 2009; 460: 170–174; Lussier, et al., Reelin as a putative vulnerability factor for depression: examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice. *Neuropharmacol*. 2011; 60: 1064–1074; Lussier, et al., The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. *Neuropharmacol*. 2013; 71C, 174–183; Lussier, et al., Altered GABAergic and glutamatergic activity within the rat hippocampus and amygdala in rats subjected to repeated corticosterone administration but not restraint stress. *Neurosci*. 2013; 231: 38–48; Fenton, et al., Imipramine protects against the deleterious effects of chronic corticosterone on depression-like behavior, hippocampal reelin expression and neuronal maturation. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2015; 60: 52–59.), autismo (Fatemi, et al., Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol*. 2005; 71: 179–187), y la enfermedad de Alzheimer (AD) (Hoe, et al., DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor2 trafficking and processing. *J. Biol Chem*. 2006; 281: 35176–35185; Hoareau, et al., Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes Reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol. Aging*. 2008; 29: 542–553). Actualmente, la señalización de Reelina implica la activación de un caso de cascada intracelular, como se observa en la figura 1.

La señalización de Reelina parece ser provocada por la proteólisis dirigida de la Reelina extracelular, de longitud total, secuestrada, en oposición a la producción y liberación simple de la Reelina proveniente de interneuronas, así como con los neuropéptidos de transmisores de molécula pequeña. Se ha mostrado que la Reelina tiene dos sitios principales de segmentación, entre las repeticiones 2-3 (R2-3) y las repeticiones 6-7 (R6-7) similares a EGF, como se observa en la figura 2 (Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci*. 2004; 24:514–521). Estos sitios de segmentación dan por resultado en cinco fragmentos principales que se pueden encontrar en el cerebro de adultos y el desarrollo, véase en la figura 3 (Jossin, et al., Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *J. Neurosci*. 2007; 27:4243–4252; Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. *PLoS One*. 2012; 7:e47793; Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience*. 2014; 274: 299–307). El fragmento R3-6 medio

interactúa con el VLDLR y el ApoER2 y se considera al fragmento que está implicado en el inicio de la señalización en la dirección 3' de la cascada de Reelina (Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. J. Neurosci. 2004; 24:514–521).

Se han realizado muchos intentos para identificar las enzimas para segmentación de Reelina, tales como el activador del plasminógeno de tejidos de la serina proteasa (tPA), las metaloproteinasas matriz (MMP), y una desintegrina y una metaloproteinasa con motivos de trombospondina (ADAMTS), y la labor funcional de este procesamiento proteolítico (Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. Neuroscience. 2014; 274: 299–307; Nagy, et al., Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. J. Neurosci. 2006; 26:1923–1934; Nogi, et al., Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by X-ray crystallography and electron tomography. EMBO J. 2006;25: 3675–3683; Nakano, et al., The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. J. Biol Chem. 2007; 282:20544–20552; Hisanaga, et al., A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. FEBS Lett. 2012; 586:3349–3353.; Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. PLoS One. 2012; 7:e47793). Un procedimiento de procesamiento endógeno para la Reelina para extracelular, es vía el activador de plasminógeno en tejidos con serina proteasa (tPA) en el cerebro, que se presenta entre la R6 y la R7 en la Reelina tipo silvestre (Trotter, et al., Extracellular proteolysis of Reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. Neuroscience. 2014; 274: 299–307). No se ha observado proteólisis en ratones KO con tPA, apoyando una función de esta proteasa en la segmentación inducida por LTP independiente del NMDAR de la Reelina (Trotter, et al., Extracellular proteolysis of Reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. Neuroscience. 2014; 274: 299–307) y se bloqueó mediante el inhibidor de serpina E1 (Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. PLoS One. 2012; 7:e47793). En apoyo adicional, la incubación *ex vivo* de tPA con Reelina durante 45 min produjo el fragmento N-R6 (370 kDa), que se bloqueó con el inhibidor del activador de plasminógenos PAI-1; serpina E1) y los fluorofosfatos de diisopropilo (un inhibidor de la serina proteasa), aunque no se bloqueó mediante la aprotinina o CR-50 (un anticuerpo que se une en la región N-terminal de la Reelina; D’Arcangelo, et al., Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. J. Neurosci. 1997; 17:23–31; Trotter, et al., Extracellular proteolysis of Reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. Neuroscience. 2014; 274: 299–307). Los estudios también

implican la meprina α y β de la metaloproteasas en la segmentación de Reelina entre las repeticiones R6 y R7 (Sato, et al., Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage. J. Biochem. 2016; 159:305–312). Sin embargo, ni los ratones anestesiados con tPA (Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. Neuroscience. 2014; 274: 299–307) ni los ratones anestesiados con la merpina β (Sato, et al., Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage. J. Biochem. 2016; 159:305–312) demuestran diferencias en los niveles basales de la Reelina de longitud total o los fragmentos de, lo que sugiere que las combinaciones de proteasas están implicadas en los niveles constitutivos de Reelina y la proteólisis.

En el hipocampo en adultos, la glucoproteína Reelina se expresa mediante interneuronas que residen principalmente en la región hiliar de la circunvolución dentada, y la capa *stratum lacunosum-moleculare* del hipocampo propio. Las células que expresan Reelina también se pueden encontrar en el *stratum oriens* y el *stratum radiatum* del área CA1 y CA3 y están asociadas con células piramidales del hipocampo. La potenciación a largo plazo (LTP), una forma de plasticidad sináptica que da por resultado en un aumento duradero de la eficacia sináptica, requiere la activación de los receptores de NMDA (NMDAR) y la posterior sobre-regulación de la expresión y función del receptor de AMPA. Los cambios en los receptores de AMPA (AMPA) se pueden alcanzar, ya sea mediante la fosforilación subunitaria aumentada o mediante la síntesis subunitaria aumentada y el tráfico hacia los sitios sinápticos específicos. Por el contrario, los NMDAR sirven como detectores de coincidencia y desempeñan una función principal en la inducción de la plasticidad sináptica. La abertura de los canales iónicos del NMDAR requiere tanto la unión a glutamato como la despolarización de membranas pos-sinápticas. Algunas subunidades del NMDAR, tales como NR1, NR2A y NR2B también están sometidas a la fosforilación moduladora en los residuos de serina/treonina o tirosina. La fosforilación de las subunidades del NMDAR modula tanto la cinética del canal como del tráfico hacia sitios sinápticos. Se desprende que, si la Reelina fuera importante para la modulación de la plasticidad sináptica, entonces los NMDAR como los AMPAR podrían ser objetivos lógicos debido a su importancia en la inducción y expresión de la plasticidad sináptica.

Recientemente se ha descubierto que las moléculas de Reelina forman complejos de orden mayor *in vitro* e *in vivo*, tales como Fc-RAP. Esta observación se refinó adicionalmente, al mostrar que la Reelina se secreta *in vivo* como un homodímero vinculado a disulfuro. La supresión de una región corta, denominada el epítipo CR-50, ubicado en el término N de la molécula anula oligomerización. Esta Reelina mutada fracasa al inducir eficientemente la fosforilación de Dab1 en neuronas primarias de ratón.

La Reelina desempeña una función activa en los procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje. La invención también incluye la identificación y el uso de mecanismos para el procesamiento de la proteína Reelina para intensificar y/o reparar la función cognitiva. Por ejemplo, se expone en la presente que: el aprendizaje contextual del miedo y la estimulación de ráfagas theta (tb-stim) provocan cambios en el procesamiento de la Reelina; las metaloproteinasas, tPA y MMP-9 están implicadas diferencialmente en el procesamiento de la Reelina durante la plasticidad sináptica y el aprendizaje; la suplementación del complemento del fragmento de Reelina pueden mejorar el aprendizaje asociativo y espacial y la memoria; y los fragmentos de Reelina se asocian con las placas A β , su expresión y procesamiento se altera mediante mutaciones relacionados con AD, y la suplementación de Reelina pueden superar los déficits de LTP encontrados en el modelo de ratón Tg2576 AD.

Una vez que la Reelina se secreta mediante las interneuronas GABA-érgicas en el espacio extracelular, se une a los receptores de lipoproteína, al receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) y al receptor 2 de apolipoproteína (ApoER2), los cuales se dimerizan (D'Arcangelo, et al., Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999; 24:471–479; Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol Chem*. 2002; 277:39944–39952; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev Neurosci*. 2006; 7, 850–859). Los receptores de tirosina dimerizados fosforilan la proteína deshabilitada-1 (Dab1) del adaptador intracelular seguida por la fosforilación de las tirosinas quinasas de la familia src (SFK) tirosinas, similares a Fyn, y la fosforilación del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) (D'Arcangelo, et al., Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci*. 1997; 17:23–31; D'Arcangelo, et al., Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999; 24:471–479; Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol Chem*. 2002; 277:39944–39952; Niu, et al., Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron*. 2004; 41: 71–84; Beffert, et al. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*. 2005; 47:567–579; Chen, et al., Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci*. 2005; 25, 8209–8216; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J. Neurosci*. 2006; 26:12943–12955; Qiu & Weeber, Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J. Neurophysiol*. 2007; 97:2312–2321; Burrell, et al., (2014). Fyn tyrosine kinase increases Apolipoprotein E receptor 2 levels and phosphorylation. *PLoS One* 9:e110845.; Divekar, et al., Ligand-induced homotypic and heterotypic clustering of Apolipoprotein E receptor 2. *J. Biol Chem*. 2014; 289:15894–15903).

Los aumentos en el influjo de calcio debidos a la fosforilación del NMDAR conduce a la

despolarización de la membrana pos-sináptica, la maduración de los receptores de NMDA provenientes del subtipo del receptor NR2B hasta NR2A, y la inserción del receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropiónico (AMPA) (Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol Chem.* 2002; 277:39944–39952; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 2006; 26:12943–12955; Qiu & Weeber, Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J. Neurophysiol.* 2007; 97:2312–2321). El aumento en el influjo de Ca^{2+} y la despolarización de la célula aumenta la fosforilación de CREB y la síntesis de la proteína, lo cual al final da por resultado en la inducción y mejora de la potenciación a largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica aumentada y el aprendizaje y la memoria (Niu, et al., The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 2008; 28:10339–10348.; Rogers, et al., Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity and dendritic spine density. *Learn. Mem.* 2011; 18:558–564; Rogers, et al. Reelin supplementation recovers sensorimotor gating, synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J. Psychopharmacol.* 2013; 27:386–395). Concurrentemente, la fosforilación de Dab1 da por resultado en la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (PKB/Akt), y la modulación de la glucógenosintasa quinasa 3 beta (GSK3 β), que inhibe la fosforilación de Tau (Beffert, et al., Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B /Akt and glycogen synthase kinase 3 beta. *J. Biol Chem.* 2007; 277: 49958–49964), así como la regulación de la conversión de p35 a p25 que es responsable de la activación de CDK5, otro procedimiento para la fosforilación Tau (Beffert, et al., Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J. Neurosci.* 2004; 24:1897–1906).

De esta forma, la señalización de Reelina es un blanco útil para terapias contra la pérdida sináptica y neuronal en una serie de condiciones. Por ejemplo, se ha mostrado que la Reelina se unen tanto a receptores de lipoproteínas como a la proteína precursora amiloide (APP) y se sabe que estará asociada con las placas A β en una serie de modelos de ratón con AD (Chin, et al. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2007, 27:2727-2733; Hoareau, et al. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol Aging* 2008, 29:542-553; Hoe, et al. DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem* 2006, 281:35176-35185; Miettinen, et al. Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. *J Chem Neuroanat.* 2005, 30:105-1180).

Los procedimientos para transducción de señales de Reelina parecen ser

particularmente vulnerables en la enfermedad de Alzheimer (AD), contribuyendo potencialmente a su patogénesis (Hoe, et al. DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem* 2006, 281:35176-35185; Hoareau, et al., Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes Reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol. Aging*. 2008; 29: 542–553).

Similarmente, la Reelina puede afectar la plasticidad sináptica en adultos. Los ratones con aneuploidía de Reelina, ApoER2 y VLDLR, o Deshabilitado-1 (Dab1) muestran déficits en la plasticidad sináptica ((Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol Chem*. 2002; 277: 39944–39952, Qui, et al., 2006, Beffert, et al., Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*. 2005; 47:567–579). La intervención terapéutica, tal como las inyecciones intraventriculares bilaterales (IVI) de Reelina, se puede utilizar como una terapia, y mejora el aprendizaje y la memoria y la plasticidad sináptica en ratones tipo silvestre (Rogers, et al., Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity and dendritic spine density. *Learn. Mem*. 2011; 18:558–564). La Reelina IVI también ha mostrado la recuperación del aprendizaje y la memoria y los déficits de LTP oxidados en ratones aspadores heterocigotos (Rogers, et al. Reelin supplementation recovers sensorimotor gating, synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J. Psychopharmacol*. 2013; 27:386–395), véase en la figura 4, y en un modelo de ratón con síndrome de Angelman (Hethorn et al., 2016). De esta forma, la suplementación de los niveles de Reelina mediante la administración de proteínas o mediante terapia génica con el gen de Reelina RELN puede ser una intervención terapéutica potencial en una variedad de enfermedades.

Una vez que la Reelina se secreta por las interneuronas GABA-érgicas en el espacio extracelular, se une a los receptores de lipoproteína, al receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) y al receptor 2 de apolipoproteína receptor 2 (ApoER2), como se muestra en la figura 1 (D’Arcangelo, et al., Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999; 24: 471–479; Weeber, et al. Reelin and Apo E receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol Chem*. 2002; 277: 39944–39952; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev Neurosci*. 2006; 7, 850–859; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J. Neurosci*. 2006; 26:12943–12955). Las interacciones en ligandos conducen a la dimerización de receptores y la fosforilación de tirosina de la proteína Dab1 del adaptador intracelular en la dirección 3’ (Howell, et al., Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J*. 1997;16: 121–132; D’Arcangelo, et al., Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999; 24: 471–479; Hiesberger, et al., Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of

disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. 1999; 24: 481–489; Strasser, et al., (2004). Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 1378–1386; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*. 2006;7, 850–859; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J. Neurosci*. 2006;26: 12943–12955; Trotter, et al., Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. *J. Neurosci*. 2013;33: 15652–15668; Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience*. 2014; 274: 299–307; Divekar, et al., Ligand-induced homotypic and heterotypic clustering of Apolipoprotein E receptor 2. *J. Biol Chem*. 2014; 289:15894–15903). La fosforilación de Dab1 activa las tirosinas quinasas de la familia Src (SFK), tales como Fyn, que fosforila los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), permitiendo aumentos en el influjo de Ca^{2+} (Chen, et al., Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci*. 2005; 25, 8209–8216). La mejora en el influjo de Ca^{2+} permite la maduración de los receptores de NMDA a partir del subtipo del receptor NR2B hasta NR2A, la inserción del receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), de membrana aumentada, y puede contribuir a la inducción y mejora de la potenciación a largo plazo (LTP; Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol.Chem*. 2002; 277, 39944–39952; Beffert, et al., Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*. 2005; 47:567–579; Chen, et al., Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci*. 2005; 25, 8209–8216; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev Neurosci*. 2006; 7, 850–859.; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J. Neurosci*. 2006; 26:12943–12955; Qiu & Weeber, Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J. Neurophysiol*. 2007; 97, 2312–2321). Además, la fosforilación inducida por Dab1 también puede activar la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB/Akt), que luego provoca la inducción de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β) (Beffert, et al., Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J. Biol Chem*. 2002; 277, 49958–49964), suprimiendo a su vez la hiperfosforilación Tau (Ohkubo, et al., Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an Apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3beta cascade. *FASEB J*. 2003; 17, 295–297).

Ya que las células de Reelina-positivas se encuentran en números más altos en el *stratum lacunosum* CA1 y el hilio, están en ubicaciones primordiales para influir en el aprendizaje y la memoria, y la neurogénesis, respectivamente. De hecho, se ha mostrado que la Reelina mejora la plasticidad sináptica y el aprendizaje y la memoria (Weeber, et al., Reelin

and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. J. Biol Chem. 2002; 277: 39944–39952; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. Nat. Rev Neurosci. 2006; 7, 850–859.; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. J. Neurosci. 2006; 26: 12943–12955; Rogers & Weeber, Reelin and ApoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. Neuron Glia Biol. 2008; 4:259–270), así como alterar la migración en las neuronas adultas emergentes (Zhao, et al., Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for Reelin. Dev. Neurosci. 2007; 29: 84–90; Pujadas, et al., Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. J. Neurosci. 2010;30: 4636–4649.doi; Teixeira, et al., Cell-autonomous inactivation of the Reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. J. Neurosci. 2012; 32:12051–12065). En el hipocampo, la Reelina extracelular se acumula en el *stratum lacunosum* (Pesold, et al., Cortical bitufted, horizontal and Martinotti cells preferentially express and secrete Reelin into perineuronal nets, non-synaptically modulating gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 3217–3222; Lussier, et al., Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of Reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. Neurosci. Lett. 2009; 460: 170–174) como lo hace en una ubicación primordial para influir en la actividad sináptica en la CA1 (Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. J. Biol Chem. 2002; 277: 39944–39952; Herz & Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. Nat. Rev. Neurosci. 2006;7, 850–859.; Qiu, et al., Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. J. Neurosci. 2006;26: 12943–12955; Rogers & Weeber, Reelin and ApoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. Neuron Glia Biol. 2008; 4:259–270). La segmentación endógena de la Reelina en estas regiones se puede utilizar para regular los efectos de la Reelina sobre estos procesos.

Además, se sabe que el sistema de señalización del receptor de lipoproteínas desempeña una función significativa en el SNC de adultos tal como la homeostasia de colesterol, el intercambio de proteínas extracelulares, la formación de la memoria, la transmisión sináptica, la plasticidad y maduración a través de la activación de muchos procedimientos para transducción de señales. De manera importante, la apolipoproteína E (apoE) del ligando del receptor de lipoproteínas es uno de los mejores factores de riesgo validados para la enfermedad de Alzheimer, (AD) esporádica de aparición tardía (Hoe HS, Harris DC, Rebeck GW. Multiple pathways of apolipoprotein E signaling in primary neurons. J Neurochem 2005; 93:145-155; Hoe HS, Freeman J, Rebeck GW. Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. Mol Neurodegener 2006, 1:18; Hoe HS, Pocivavsek A, Chakraborty G, et al. Apolipoprotein E

receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. J Biol Chem 2006, 281:3425-3431). Similarmente, la proteína Reelina de matriz extracelular se puede unir tanto a los receptores de lipoproteína como a la proteína precursora amiloide (APP) y se sabe que estará asociada con las placas A β en una serie de modelos de ratón con AD (Chin J, Massaro CM, Palop JJ, et al. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. J Neurosci 2007, 27:2727-2733; Hoareau C, Borrell V, Soriano E, Krebs MO, Prochiantz A, Allinquant B. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. Neurobiol Aging 2008, 29:542-553; Hoe HS, Tran TS, Matsuoka Y, Howell BW, Rebeck GW. DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. J Biol Chem 2006, 281:35176-35185; and Miettinen R, Riedel A, Kalesnykas G, et al. Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. J Chem Neuroanat 2005, 30:105-1180). La acumulación de A β puede influir en la señalización de Reelina y la función del receptor de lipoproteínas, estimulando con esto la patogénesis de la AD y afectando la función sináptica y cognitiva.

Por lo tanto, lo que se necesita son agonistas específicos que actúen sobre el sistema receptor de lipoproteínas de una forma similar a la Reelina para utilizarse como terapéuticos en la mejora de la función cognitiva, así como el tratamiento de una enfermedad neurológica, tal como la AD y otros trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad, enfermedades neurológicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las composiciones y métodos descritos en la presente se relacionan en general con métodos para influir, y mejorar, la función cognitiva, al aumentar, y/o prevenir la interferencia con, los niveles de Reelina, así como la transducción de señales celulares iniciada o mantenida con la Reelina o la señalización de Reelina.

La presente invención proporciona un método para tratar o corregir una enfermedad o trastorno del sistema nervioso a través de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento recombinante de Reelina o un fragmento de empalme de Reelina en un paciente que necesite del mismo. En algunas variaciones, el fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina es un fragmento de Reelina formado de la repetición R3 hasta R5 (R3-R5), la repetición R3 del fragmento de Reelina unida a la repetición R5 del fragmento de Reelina (R3 + R5), la repetición R3 del fragmento de Reelina, un fragmento de Reelina formado de la repetición R3 hasta R6 (R3-R6), la repetición R3 del fragmento de Reelina unida a la repetición R6 del fragmento de Reelina de (R3 + R6), en donde R3 es la región de repetición 3 de Reelina de longitud total, R4 es la región de repetición 4 de la Reelina de longitud total, R5 es la región de repetición 5 de la Reelina de

longitud total, y R6 es la región de repetición 6 de la Reelina de longitud total. Opcionalmente, cuando el fragmento de empalme de Reelina es R3 + R5, las dos regiones de repetición, es decir, R3 y R5, están unidas mediante el asa de la región de repetición 3, el asa de la región de repetición 5, o una combinación de las mismas. Alternativamente, cuando el fragmento de empalme de Reelina es R3 + R6, las dos regiones de repetición, es decir, R3 y R6, están unidas mediante el asa de la región de repetición 3, el asa de la región de repetición 6, o una combinación de las mismas. En versiones específicas, el fragmento recombinante de Reelina o fragmento de empalme de Reelina es una repetición de fragmento de Reelina R3, una repetición del fragmento de Reelina R4, una repetición del fragmento de Reelina R5, una repetición del fragmento de Reelina R6, una repetición del fragmento de Reelina R3 hasta R4, una repetición del fragmento de Reelina R3 hasta R5, una repetición del fragmento de Reelina R3 hasta la región de repetición R6, una repetición del fragmento de Reelina R4 hasta R5, una repetición del fragmento de Reelina R5 a R6, una repetición del fragmento de Reelina R3 unida a la repetición del fragmento de Reelina R5, una repetición del fragmento de Reelina R3 unida a la repetición del fragmento de Reelina R6, una repetición del fragmento de Reelina R4 unido a una repetición R6, o una combinación de los fragmento de Reelina o los fragmento de empalme de Reelina mencionados anteriormente. En algunas variaciones de la invención, la enfermedad o trastorno del sistema nervioso es una enfermedad neurodegenerativa, un ataque neuronal, un trastorno neuronal, o un accidente cerebrovascular. En variaciones específicas, el trastorno neuronal se selecciona del grupo que consiste de síndrome X frágil, el síndrome de William, el síndrome de Rett, el síndrome de Down, el síndrome de Angelman, autismo, deficiencia de Reelina, trastorno bipolar, depresión y esquizofrenia. Alternativamente, la enfermedad o trastorno del sistema nervioso es un ataque neuronal o la enfermedad de Alzheimer.

Opcionalmente, el fragmento de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina se administra mediante inyección parenteral. En variaciones específicas, el fragmento de Reelina el fragmento de empalme de Reelina se inyecta intraarterial, intravenosa, intracerebral, o intraventricularmente. En variaciones específicas de la invención, el fragmento de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina se inyecta bilateralmente en los ventrículos del paciente. En algunas variaciones, el fragmento de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina se administra para obtener una concentración de Reelina en el fluido del SNC entre aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 5 nM. Las concentraciones opcionales incluyen 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 3 μ M 40 μ M 45 μ M, 50 μ M, 55 μ M, 60 μ M, 65 μ M, 70 μ M, 75 μ M, 80 μ M, 85 μ M, 90 μ M, 100 μ M, 110 μ M, 120 μ M, 130 μ M, 140 μ M, 150 μ M, 160 μ M, 170 μ M, 180 μ M, 190 μ M, 200 μ M, 220 μ M, 225 μ M, 240 μ M, 250 μ M, 270 μ M, 275 μ M, 280 μ M, 300 μ M, 320 μ M, 325 μ M, 340 μ M, 350 μ M, 370 μ M, 375 μ M, 380 μ M, 400 μ M, 420 μ M, 425 μ M, 440 μ M, 450 μ M, 470 μ M, 475 μ M, 480 μ M, 500 μ M, 520 μ M, 525 μ M,

540 μ M, 550 μ M, 570 μ M, 575 μ M, 580 μ M, 600 μ M, 620 μ M, 625 μ M, 640 μ M, 650 μ M, 670 μ M, 675 μ M, 680 μ M, 700 μ M, 720 μ M, 725 μ M, 740 μ M, 750 μ M, 770 μ M, 775 μ M, 780 μ M, 800 μ M, 820 μ M, 825 μ M, 840 μ M, 850 μ M, 870 μ M, 875 μ M, 880 μ M, 900 μ M, 920 μ M, 925 μ M, 940 μ M, 950 μ M, 970 μ M, 975 μ M, 980 μ M, 1 nM, 1.1 nM, 1.2 nM, 1.3 nM, 1.4 nM, 1.5 nM, 1.6 nM, 1.7 nM, 1.8 nM, 1.9 nM, 2.0 nM, 2.1 nM, 2.2 nM, 2.3 nM, 2.4 nM, 2.5 nM, 2.6 nM, 2.7 nM, 2.8 nM, 2.9 nM, 3.0 nM, 3.1 nM, 3.2 nM, 3.3 nM, 3.4 nM, 3.5 nM, 3.6 nM, 3.7 nM, 3.8 nM, 3.9 nM, 4.0 nM, 4.1 nM, 4.2 nM, 4.3 nM, 4.4 nM, 4.5 nM, 4.6 nM, 4.7 nM, 4.8 nM, 4.9 nM, y 5.0 nM. Por ejemplo, la concentración terapéutica puede ser menor de 100 nM, menor de 50 nM, menor de 25 nM, menor de 10 nM, o aproximadamente de 5 nM. Las dosificaciones se pueden calcular con base en la distribución de la proteína en el cuerpo animal y el acceso a través de la barrera hematoencefálica. Un ejemplo no limitante es cuando la Reelina se administra a 1 μ L de una composición de 5 nM por cada 30-36 g de masa del paciente. Además, el tratamiento puede estar en curso, es decir, continuamente, o el régimen de tratamiento puede durar menos de 1 año, menos de 6 meses, menos de 3 meses, menos de 1 mes, menos de 1 semana, o aproximadamente 1 día.

En algunas variaciones de la invención, la estructura formada a partir del fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina se inserta en un vector viral para formar un vector de Reelina, y el vector de Reelina se inyecta en el sujeto. Los vectores opcionales incluyen AAV9, AAV5, AAV1 y AAV4. Sin embargo, otros vectores, en especial cualquier AAV adecuado conocido en la técnica, se podrían utilizar en la invención y se contemplan para este uso. En variaciones específicas, el fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina queda bajo el control de un promotor del CMV.

La invención también incluye una composición que comprende un fragmento recombinante de Reelina o un fragmento de empalme de Reelina, donde el fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina es un fragmento de Reelina formado de la repetición R3 hasta R5 (R3-R5), la repetición del fragmento de Reelina R3 unida al repetición del fragmento de Reelina R5 (R3 + R5), la repetición del fragmento de Reelina R3, un fragmento Reelina formado de la repetición R3 hasta R6 (R3-R6), la repetición del fragmento de Reelina R3 unida a la repetición del fragmento de Reelina R6 (R3 + R6), donde R3 es la región de repetición 3 de la Reelina de longitud total, R4 es la región de repetición 4 de la Reelina de longitud total, R5 es la región de repetición 5 de la Reelina de longitud total, y R6 es la región de repetición 6 de la Reelina de longitud total. Opcionalmente, cuando el fragmento de empalme de Reelina es R3 + R5, las dos regiones de repetición, es decir, R3 y R5, están unidas por el asa de la región de repetición 3, el asa de la región de repetición 5, o una combinación de las mismas. Alternativamente, cuando el fragmento de empalme de Reelina es R3 + R6, las dos regiones de repetición, es decir, R3 y R6, están unidas por el asa de la región de repetición 3, el asa de la región de repetición 6, o una combinación de las mismas.

En algunas variaciones de la composición, el fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina está integrado en una estructura formada a partir del fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina insertado en un vector viral para formar un vector de Reelina, y el vector de Reelina inyectado en el sujeto. Los vectores opcionales incluyen AAV9, AAV5, AAV1 y AAV4. Sin embargo, otros vectores, en especial cualquier AAV adecuado conocido en la técnica, se podrían utilizar en la invención y se contemplan para este uso. En variaciones específicas, el fragmento recombinante de Reelina o el fragmento de empalme de Reelina queda bajo el control de un promotor de CMV.

Las composiciones mencionadas anteriormente también se pueden utilizar para tratar un síntoma de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, ataques neuronales, y accidente cerebrovascular. Los ejemplos no limitantes incluyen síndrome X frágil, el síndrome de William, el síndrome de Rett, el síndrome de Down, el síndrome de Angelman, autismo, isquemia, hipoxia, enfermedad de Alzheimer, deficiencia de Reelina, trastorno bipolar, depresión, esquizofrenia y los accidentes cerebrovasculares. Los ejemplos específicos de síntomas de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso incluyen una deficiencia en la densidad de las espinas dendríticas, potenciación disminuida a largo plazo, plasticidad sináptica disminuida y déficits de aprendizaje asociativo. Las composiciones y cantidades terapéuticas útiles se describieron anteriormente.

Las composiciones mencionadas anteriormente también se pueden utilizar para aumentar la densidad de las espinas dendríticas en un sujeto. Las composiciones y cantidades terapéuticas útiles se describieron anteriormente.

Las composiciones descritas anteriormente también son útiles para aumentar la plasticidad sináptica, el aprendizaje o mejorar la función cognitiva. Las composiciones y cantidades que se pueden utilizar para aumentar la plasticidad sináptica, el aprendizaje o mejora la función cognitiva son las mismas que aquellas descritas anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una comprensión más completa de la invención, se debe hacer referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos anexos, en los cuales:

La figura 1 es una ilustración de la vía de Reelina en la plasticidad sináptica en adultos.

La figura 2 es una ilustración que muestra la proteólisis de Reelina en el cerebro adulto. La Reelina de longitud total se libera en el espacio extracelular mediante interneuronas GABAérgicas en el cerebro adulto. Esta Reelina de longitud total se segmenta enzimáticamente entre las repeticiones de 2-3 (R2-R3) y 6-7 (R6-R7) del factor de crecimiento epidérmico (EGF); indicadas mediante líneas de punteadas; mediante un número de enzimas diferentes, por ejemplo, el activador del plasminógeno en tejidos (tPA), meprina α y β han mostrado que segmentan la Reelina entre R6 y R7 (Kohno, et al., Mechanism and significance

of specific proteolytic cleavage of Reelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 380: 93–97.; Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. *PLoS One.* 2012; 7:e47793; Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience.* 2014; 274: 299–307; Sato, et al., Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage. *J. Biochem.* 2016; 159:305–312), mientras que las metaloproteinasas matriz (MMP)-9 segmentan la Reelina entre R2 y R3 (Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. *PLoS One.* 2012; 7:e47793). Los ADAMTS 4 y 5 han mostrado que segmentan la Reelina en ambos sitios (Hisanaga, et al., A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.* 2012; 586: 3349–3353.; Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5 and their modulators. *PLoS One.* 2012; 7:e47793). Otras proteasas, que todavía serán identificadas, también están implicadas potencialmente en el procesamiento de Reelina.

La figura 3 es una ilustración que muestra la Reelina de longitud total (450 kDa) y los fragmentos de Reelina formados mediante la segmentación por un número de enzimas que dan por resultar en la producción de cinco fragmentos que varían de 370-80 kDa. El fragmento de R3-R6 [incluido en la Reelina de longitud total (450 kDa), los fragmentos de 370 kDa, 190 kDa y 270 kDa] se ha mostrado que se unen a los receptores de lipoproteínas, ApoER2 y VLDLR (Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.* 2004; 24:514–521). El fragmento N-R2 (180 kDa) se ha mostrado que se unen a las $\alpha_3\beta_1$ integrinas (Dulabon, et al., Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron.* 2000; 27:33–44.) Y se ha mostrado que la migración neuronal se interrumpirá *in vivo* mediante el anticuerpo CR-50 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997; 94:8196–8201). La región C-terminal (R7-C; 80 kDa) se ha mostrado que está implicada en la secreción de Reelina, así como su plegamiento adecuado (de Bergcyck, et al., A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the ‘Orleans’ reeler mutation (ReIn[rl-Orl]). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;50:85–90; Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.* 2004;24: 514–521 de Bergcyck, et al., A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the ‘Orleans’ reeler mutation (ReIn[rl-Orl]). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;50:85–90; Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.* 2004; 24:514–521), y

para la eficacia de señalización en la dirección 3' (Nakano, et al., The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. J. Biol. Chem. 2007; 282:20544–20552).

La figura 4 es una gráfica que muestra la LTP con la estimulación por ráfagas theta.

La figura 5 es la secuencia de la Reelina de longitud total. Los sitios de reconocimiento para las endonucleasas se representan por encima de su secuencia respectiva. Las secuencias de repetición son marcas sobre el costado izquierdo y las regiones de repetición resaltadas. Entre cada región de repetición se encuentra un asa de fusión, que no está resaltada.

La figura 6 es una ilustración del receptor de ApoER2 dependiente de Reelina, que muestra el receptor inactivado y el receptor dimerizado, que es activo y emite fluorescencia. El sistema se utiliza en un ensayo de luciferasa para la activación de receptores.

La figura 7 es una ilustración que muestra los fragmentos Reelina de la Reelina formada mediante la segmentación por una serie de enzimas que dan por resultado en la producción de diversos fragmentos. El fragmento R3-R6, que se compara con los fragmentos de Reelina R3, que contiene únicamente la tercera región de empalme, R3-4, que contiene las regiones de empalme R3 y R4, empalmadas conjuntamente, la R3-R5, que contiene las regiones de repetición R3, R4, y R5 empalmadas conjuntamente, y el fragmento R5-R6, que incluye las regiones R5 empalmadas a la región R6. También se muestran los fragmentos R3 + R5 y R3 + R6, que contienen las regiones R3 empalmadas a la región R5 o la región R6, respectivamente.

La figura 8 es una secuencia del fragmento de Reelina 3 + 6. El fragmento se formó al unir el asa 3-4 al asa 5-6, uniendo con esto la repetición 3 a la repetición 6. La región del péptido señal se resalta en gris oscuro, seguido por la región de repetición 3, resaltada en gris claro. La región del asa de unión para 3-4 se encuentra en gris medio, seguida por la región de asa de unión para 5-6 y la región de repetición 6, en gris oscuro.

La figura 9 es la secuencia del fragmento de Reelina 3 + 5. El fragmento se formó al unir el asa 3-4 al asa 4-5, uniendo con esto la repetición 3 a la repetición 5. La región del péptido señal se resalta en gris oscuro, seguida por la región de repetición 3, resaltada en gris claro. La región del asa de unión para 3-4 está en gris medio, seguida por la región del asa de unión para 4-5 y la región de repetición 5, en gris oscuro.

La figura 10 es una gráfica que muestra el ensayo de luciferasa ApoER2 utilizando fragmentos de Reelina de ratón.

La figura 11 es una gráfica que muestra un ensayo de luciferasa ApoER2 utilizando fragmentos de Reelina de humanos.

La figura 12 es una gráfica que compara un ensayo de luciferasa ApoER2 de los fragmentos de Reelina de ratón y los fragmentos de Reelina de humano.

La figura 13(A) es una transferencia que muestra el cultivo neuronal primaria tratado

con 200 μ M de un fragmento purificado de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. Una transferencia Western representativa que muestra ApoER2 y la actividad y el estado de fosforilación de AKT y ERK. La fosforilación ERK es una detección directa de la actividad de ERK y representa la activación del procedimiento de señalización en la dirección 3'.

La figura 13(B) es una gráfica que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M y un fragmento purificado de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. La actividad de ApoER2 se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 5-6.

La figura 13(C) es una gráfica que muestra el cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M de un fragmento purificado de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. El nivel de fosforilación de AKT se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 5-6.

La figura 13(D) es una gráfica que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M del fragmento purificado de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. El nivel de AKT total se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 5-6.

La figura 13(E) es una gráfica que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M del fragmento purificado de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. La proporción de la fosforilación de quinasa regulada extracelular (ERK) fosforilada se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 5-6.

La figura 13(F) es una gráfica que muestra el cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M del fragmento de purificada de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisado en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. La proporción de la quinasa regulada extracelular (ERK) fosforilada se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizaron a la actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la media es de 5-6.

La figura 13(G) es una gráfica que muestra el cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M del fragmento de purificación de Reelina que representa las repeticiones 3-6 (R3-6) y lisados en momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento

Reelina. La proporción de la quinasa regulada extracelular (ERK) fosforilada a la quinasa regulada extracelular (ERK) se determinó y se estandarizó a ningún tratamiento (tiempo 0). El estado de fosforilación de la ERK es una detección directa de la actividad de la ERK y representa la activación del procedimiento de señalización en la dirección 5'. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 5-6.

La figura 14(A) es una transferencia que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M de fragmentos purificados de Reelina que representan la secuencia en humanos de repeticiones de Reelina R3 y R5 (hR3 + 5), las repeticiones en humano R3 hasta R6 (hR3-6) las repeticiones de Reelina en ratón R3 hasta 6 (R3-6) N-terminal de ratón hasta R2 (NR2) y la Reelina de longitud total que consiste de la secuencia de longitud total y todos los fragmentos que son de origen natural (FR). El control (ctrl) consistió de células no tratadas. La Reelina se incubó sobre las células durante 60 minutos, y las células se lisaron. Se realizó una transferencia Western representativa para la quinasa regulada extracelular total y fosforilada (ERK).

La figura 14(B) es una gráfica que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M de fragmentos purificados de Reelina que representan la secuencia en humanos de repeticiones de Reelina R3 y R5 (hR3 + 5), las repeticiones en humanos R3 hasta R6 (hR3-6) las repeticiones de Reelina en ratón R3 hasta 6 (R3-6) de la N-terminal en ratón hasta R2 (NR2) y la Reelina de longitud total que consiste de la secuencia de longitud total y la totalidad de los fragmentos de origen natural (FR). El control (ctrl) consistió de células no tratadas. La Reelina se incubó sobre las células durante 60 minutos, y las células se lisaron. El nivel de la quinasa regulada extracelular (ERK) fosforilada se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 4.

La figura 14(C) es una gráfica que muestra un cultivo neuronal primario tratado con 200 μ M de fragmentos purificados de Reelina que representan la secuencia en humanos de repeticiones de Reelina R3 y R5 (hR3 + 5), las repeticiones en humanos de R3 hasta R6 (hR3-6) las repeticiones de Reelina en ratón de R3 hasta 6 (R3-6) la N-terminal en ratones hasta R2 (NR2) y la Reelina de longitud total que consiste de la secuencia de longitud total y la totalidad de los fragmentos de origen natural (FR). El control (ctrl) consistió de células no tratadas. La Reelina se incubó sobre las células durante 60 minutos, y las células se lisaron. El nivel de la quinasa regulada extracelular (ERK) se midió en los diversos puntos de tiempo y se normalizó para actina. Todas las gráficas muestran la media $\pm$ SEM. El tamaño de la muestra es de 4.

La figura 15 es una gráfica que muestra los ensayos de fosforilación de Dab-1 utilizando Reelina de longitud total.

La figura 16 es una gráfica lineal que muestra la fosforilación de Dab-1 a través del tiempo después de la exposición a la Reelina de longitud total.

La figura 17 es una gráfica que muestra los análisis de fosforilación de Dab-1 utilizando el fragmento de Reelina R3-6.

La figura 18 es una gráfica lineal que muestra la fosforilación de Dab-1 a través del tiempo después de la exposición al fragmento de Reelina R3-6.

La figura 19 perfusión con Fc-RAP mejora la inducción de la LTP hipocámpica. Los cortes hipocámpicos se inundaron con Fc-RAP (10 $\mu\text{g/ml}$), Fc (10 $\mu\text{g/ml}$), o medio control. Se registraron las respuestas sinápticas de valores iniciales ($\dagger$) y la potenciación inmediatamente después de HFS ($\ddagger$) y hasta 60 minutos después de HFS ($\square$). La cabeza de flecha representa la LTP inducida con dos series de estimulación de 1-s-Largo, 100-Hz, separada por 20 s. La línea horizontal indica la aplicación de Fc-RAP, Fc, o medio control. Los resultados se muestran como las medias $\pm$ errores estándar de la media. fEPSP, potencial pos-sináptico excitatorio de campo Stresser et al 2004.

La figura 20(A) es un electrograma que muestra las corrientes de NMDAR con mejoras de Reelina a través de mecanismos pos-sinápticos. Ilustración de la medición de EPSC_{NMDA}. Las líneas representan ningún tratamiento, tratamiento simulado, y tratamiento con Reelina que muestra la función del receptor de NMDA con aumentos con el tratamiento de Reelina vía conductancia de calcio.

La figura 20(B) es un electrograma que muestra las corrientes de NMDAR con mejoras con Reelina a través de mecanismos pos-sinápticos. Ilustración de la medición de EPSC_{NMDA} con AP5. Las líneas representan ningún tratamiento, tratamiento simulado, y tratamiento con Reelina que muestran la función del receptor de NMDA con el tratamiento con Reelina vía conductancia de calcio.

La figura 21(A) es una gráfica que muestra la medición de EPSC_{NMDA}. El trazo en gris grueso representa el mEPSC_{NMDA}.

La figura 21(B) es una gráfica que muestra el tratamiento con Reelina aumentó significativamente la amplitud mEPSC_{NMDA} (círculo relleno, antes de Reelina; círculo vacío, después de Reelina; *** $p < 0,001$; $n = 18$; prueba t pareada). El tratamiento con simulado no tuvo efecto [cuadro relleno, antes del simulado; cuadro vacío, después de simulado; no significativo (NS), $p > 0.05$; $n = 13$; prueba t pareada].

La figura 21(C) es una gráfica que muestra la transmisión sináptica en tres puntos de tiempo, sin tratamiento con Reelina, tratamiento con Reelina y una gráfica compuesta que compara las dos.

La figura 21(D) es una gráfica que muestra que no hay correlación de las proporciones $1/\text{CV}^2$ y las proporciones de EPSC_{NMDA} media (antes/después de Reelina) se reveló con base en los registros a partir de nueve células ($r = 0.31$; $p = 0.4$; prueba de Spearman).

La figura 22(A) es una transferencia Western que muestra que la señalización de Reelina altera la expresión superficial y los niveles totales de las subunidades del receptor de

glutamato. Las transferencias representativas muestran los niveles tanto superficiales como totales de GluR1, NR1, NR2A, y NR2B.

La figura 22(B) Resultados cuantitativos de las subunidades receptoras de glutamato superficial reunidas a partir de 4 experimentos de transferencias Western. Comparadas con los grupos simulados, ambas superficies GluR1 y NR2A se aumentaron significativamente [GluR1, $F(2,11) = 15.56$, $***P < 0.001$; NR2A, $F(2,11) = 44.9$, $***P < 0.001$], y el nivel de NR2B superficial se redujo significativamente [$F(2,11) = 22.6$, $***P < 0.001$] después del tratamiento crónico con Reelina.

La figura 22(C) Resultados cuantitativos de los niveles totales de proteínas reunidos a partir de 4 experimentos de transferencias Western. El tratamiento con Reelina aumentó significativamente los niveles de GluR1 total [$F(2,11) = 11.2$, $**P < 0.01$], NR2A [$F(2,14) = 9.75$, $**P < 0.01$], y disminuyó el nivel de NR2B total de [$F(2,11) = 4.1$, $*P < 0.05$]. Por el contrario, no se observaron niveles de NR1 ni totales ni superficiales (en B).

La figura 23(A) es una gráfica que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas en una neurona WT se muestran en una fotografía ampliada de una dendrita primaria representativa.

La figura 23(B) es una imagen que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas se redujeron en el HRM en comparación con ratones WT, aunque después del tratamiento con Reelina, se rescató la densidad de las espinas. Las espinas dendríticas se definieron como cualquier protrusión a partir de una dendrita primaria excluyendo cualesquiera dendritas secundarias. Las espinas dendríticas se contaron y se midieron cada 50 μm de la dendrita. Existe un aumento significativo en las espinas en las células tratadas con Reelina ($n = 3$) contra las células tratadas en simulado ($n = 3$).

La figura 23(C) es una imagen que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas se redujeron en el HRM en comparación con ratones WT, aunque después del tratamiento con la Reelina, se rescató la densidad de las espinas. Las espinas dendríticas se definieron como cualquier protrusión a partir de una dendrita primaria excluyendo cualesquiera dendritas secundarias. Las espinas dendríticas se contaron y se midieron cada 50 μm de la dendrita. Existe un significativo en las espinas en células tratadas con Reelina ($n = 3$) contra las células tratadas en simulado ($n = 3$).

La figura 23(D) es una imagen que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad

de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas fueron muy escasas en ratones anestesiados con Reelina, aunque después del tratamiento con la Reelina, se rescataron los déficits de la densidad de las espinas. Las espinas dendríticas se definieron como cualquier protrusión a partir de una dendrita primaria excluyendo cualesquiera dendritas secundarias. Las espinas dendríticas se contaron y se midieron cada 50 μm de la dendrita. Existe un aumento significativo en las espinas en células tratadas con Reelina ($n = 3$) contra células tratadas en simulado ($n = 3$).

La figura 23(E) es una imagen que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas son muy escasas en los ratones anestesiados con Reelina, aunque después del tratamiento con la Reelina, se rescataron los déficits de la densidad de espinas. Las espinas dendríticas se definieron como cualquier protrusión a partir de una dendrita primaria excluyendo cualesquiera dendritas secundarias. Las espinas dendríticas se contaron y se midieron cada 50 μm de la dendrita. Existe un aumento significativo en las espinas en células tratadas con Reelina ($n = 3$) contra células tratadas en simulado ($n = 3$).

La figura 23(F) es una imagen que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas se cuantificaron utilizando un microscopio confocal. Las espinas dendríticas se definieron como cualquier protrusión a partir de una dendrita primaria excluyendo cualesquiera dendritas secundarias. Las espinas dendríticas se contaron y se midieron cada 50 μm de la dendrita. Existe un aumento significativo en las espinas en células tratadas con Reelina ($n = 3$) contra células tratadas en simulado ($n = 3$).

La figura 24(A) es una transferencia que muestra que MMP-9 modula el procesamiento de la Reelina. La capacidad de MMP-9 (activo; Calbiochem, PF140) para afectar el procesamiento de la Reelina se determinó al hacer reaccionar la Reelina (50 nM) con diferentes concentraciones de MMP -9 (1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en PBS a 37°C durante 3 horas. Se incluyó EDTA (10 mM) como un control negativo, ya que bloquea la actividad de MMP9. Las transferencias Western se ejecutaron en 1:10 de la reacción y se soldaron con anti-Reelina (G10).

La figura 24(B) es una transferencia que muestra que MMP-9 modula el procesamiento de la Reelina. La capacidad de MMP-9 (250 nM) para afectar el procesamiento de la Reelina en neuronas corticales primarias se determinó después de 24 horas en proteínas extraídas del sobrenadante. Los extractos proteínicos celulares se sometieron a análisis Western y detección con G10.

La figura 24(C) es una transferencia que muestra que MMP-9 modula el procesamiento de la Reelina. La capacidad de MMP-9 (250 nM) para afectar el procesamiento de la Reelina en neuronas corticales primarias se determinó después de 24 horas en proteínas extraídas del sobrenadante. Los extractos proteínicos de sobrenadantes se sometieron a análisis Western y detección con G10.

La figura 24(D) es una transferencia que muestra que MMP-9 modula el procesamiento de la Reelina. La capacidad del inhibidor de MMP-9 (25 nM; Calbiochem 444278) para afectar el procesamiento de la Reelina en neuronas corticales primarias se determinó después de 24 horas en la proteína extraída del sobrenadante. Los extractos proteínicos celulares se sometieron a análisis Western y detección con G10.

La figura 24(E) es una transferencia que muestra que MMP-9 modula procesamiento de la Reelina. La capacidad del inhibidor de MMP-9 (25 nM; Calbiochem 444278) para afectar el procesamiento de la Reelina en neuronas corticales primarias se determinó después de 24 horas en la proteína extraída del sobrenadante. Los extractos proteínicos del sobrenadante se sometieron a análisis Western y detección con G10.

La figura 25 es una transferencia que muestra los efectos de la Reelina sobre la densidad de las espinas dendríticas. La Reelina se aplicó crónicamente a cultivos neuronales hipocámpicos primarios para examinar su efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas. Se determinaron los niveles de la Reelina en cultivo mediante una Transferencia Western. Las muestras se extrajeron del cultivo a las 0, 6, 12, 24, 48, 72, y 96 horas para determinar los niveles de la degradación de la Reelina *in vitro*. La última columna de la Reelina representa lo natural en la concentración administrada al cultivo. La Reelina estuvo presente hasta 96 horas después de la introducción al cultivo y la degradación no inició hasta las 72 horas.

La figura 26(A) es una gráfica que muestra que la suplementación con Reelina puede mejorar del aprendizaje asociativo y el aprendizaje espacial. A ratones tipo silvestre se les administró ya sea 5 nM de RAP o 5 nM de Reelina mediante inyección bilateral en los ventrículos 3 horas antes de recibir acondicionamiento por temor. 24 horas después del entrenamiento, los ratones se colocaron en el contexto y la congelación medida. Se encontró que el RAP inhibe el aprendizaje y la memoria mientras que la Reelina condujo a una mejora (RAP n = 9, sin choque n = 5, sin tratamiento n = 7, Reelina n = 5; $p > 0.05$).

La figura 26(B) es una gráfica que muestra que la suplementación de Reelina puede mejorar el aprendizaje asociativo y el aprendizaje espacial. Se entrenaron ratones tipo silvestre para encontrar una plataforma escondida a través del laberinto Morris Water. A los ratones se les administró una sola inyección de ya sea 5 nM de Reelina (círculo rojo, n = 4) o vehículo (círculo vacío, n = 6). En el día 5, se proporcionó una prueba con sonda, luego los ratones se entrenaron para encontrar una nueva ubicación de la plataforma en el día 6. A los ratones se les administró una sola inyección de ya sea 5 nM de Reelina (n = 4) o vehículo (n =

6).

La figura 26(C) es una gráfica que muestra que la suplementación de Reelina puede mejorar el aprendizaje asociativo y el aprendizaje espacial. Se entrenaron ratones tipo silvestre para encontrar una plataforma escondida a través del Morris Water. A los ratones se les administró una sola inyección de ya sea 5 nM Reelina (círculo rojo, $n = 4$) o vehículo (círculo vacío, $n = 6$). Examen de latencias a partir de ensayos individuales en el día 1. (* = $p > 0.05$). A los ratones se les administró una sola inyección de ya sea 5 nM de Reelina ($n = 4$) o vehículo ($n = 6$).

La figura 27(A) es una transferencia que muestra que el acondicionamiento por temor contextual altera los niveles de Reelina. Se entrenaron ratones tipo silvestre con un protocolo de acondicionamiento de miedo contextual (CFC) con 3-choques. Los ratones sin choque (CS) se utilizaron como un control negativo y se sometieron a choques, los ratones expuestos al contexto (CS/US) tuvieron su hipocampo retirado a los 1, 5, 15, 30, y 180 minutos después del entrenamiento, así como 18 horas después de entrenamiento ($n = 4$, punto de tiempo). La Reelina se detectó en homogenados hipocámpicos utilizando anti-Reelina (G10).

La figura 27(B) es una gráfica que muestra que el acondicionamiento con miedo contextual altera los niveles Reelina. Se entrenaron ratones tipo silvestre con un protocolo de acondicionamiento con miedo contextual (CFC), con 3 choque. Los ratones sin choques (CS) se utilizaron como control negativo y se sometieron a choques, los ratones expuestos de contexto (CS/US) tuvieron su hipocampo retirado a 1, 5, 15, 30, y 180 minutos después del entrenamiento, así como 8 horas después de entrenamiento ($n = 4$, punto de tiempo). Se cuantificaron los niveles de Reelina de la Reelina de longitud total. Los asteriscos denotan la significancia estadística después de una prueba t bilateral, donde $p < 0.5$.

La figura 28(A) es una transferencia que muestra que la señalización de Reelina se altera en modelos de ratón con AD. Las transferencias Western de córtices aislados provenientes de Tg2576 (SweAPP), PS1-FAD (M146L) y 2X (SweAPP x M146L), tipo silvestre de 14 meses de edad, se sometieron a análisis ($n = 4$). No se detectaron diferencias significativas en los productos de Reelina 450, 190 y 180 kDa en Tg2576 contra el tipo silvestre, aunque las especies N-terminales no identificadas reconocidas por G10 se elevaron significativamente en ratones Tg2576 y 2X. Por el contrario, los productos de Reelina 450 y 180 kDa se elevaron significativamente en ratones PS1-FAD y 2X ($p < 0.05$).

La figura 28(B) es una transferencia que muestra que la señalización de Reelina se altera en modelos de ratón con AD. Las transferencias Western de córtices aislados provenientes de PS1-FAD (M146L) y 2X (SweAPP x M146L), tipo silvestre de 14 meses de edad, se sometieron a análisis ($n = 4$). Existieron reducciones significativas en ratones Dab1-pTyr220 y Tg2576, y elevaciones significativas en ratones tanto PS1-FAD como 2X.

La figura 28(C) es una gráfica que muestra que la señalización de Reelina se altera en

modelos de ratón con AD. La aplicación de Reelina (5 nM) antes de la estimulación fue capaz de rescatar déficits en la LTP estimulada con HFS en ratones del área CA1 de Tg2576.

La figura 29(A) es una imagen que muestra que la señalización de Reelina se altera en modelos de ratón AD. Se empleó la estrategia de 3 epítopes para mapear el procesamiento de Reelina *in vivo* en secciones horizontales de Tg2576 de 14 meses de edad. Fragmentos de Reelina detectados con Reelina-CT (G-20) que contienen R7-8, secuestrados en el núcleo de una placa de núcleo denso detectada con 6E10 (anti-A β).

La figura 29(B) es una imagen que muestra que la señalización de Reelina se altera en modelos de ratón AD. Se empleó la estrategia de 3 epítopes para mapear el procesamiento de Reelina *in vivo* en secciones horizontales de Tg2576 de 14 meses de edad. Fragmentos de Reelina detectados con Reelina-NT que contienen N-R2, secuestrados en el núcleo de una placa de núcleo denso detectada con 6E10 (anti-A β).

La figura 29(C) es una imagen que muestra que la señalización de Reelina se altera en modelos de ratón con AD. Se empleó la estrategia de 3 epítopes para mapear el procesamiento de Reelina *in vivo* en secciones horizontales de Tg2576 de 14 meses de edad. Fragmentos de Reelina detectados con Reelin-MT (AF3820) que contienen R3-6, secuestrados en el núcleo de una placa de núcleo denso detectada con 6E10 (anti-A β).

La figura 29(D) es una imagen que muestra la señalización de Reelina se altera en los modelos de ratón con AD. La imagen de inmunofluorescencia de las antiguas secciones horizontales Tg2576 de 14 meses para Reelin-CT (G20) y MT (AF3820) se combinaron secuestrados en el núcleo de una placa de núcleo denso detectada con 6E10 (anti-A β).

La figura 29(E) es una imagen que muestra la que señalización de Reelina se altera en modelos de ratón con AD. La imagen de inmunofluorescencia de Tg2576 de 14-meses de edad, aumentada, muestra los fragmentos de Reelin-NT (N-R2) que circundan el núcleo de la placa en el modelo de ratón Tg2576. Barra de escala = 15 m.

La figura 30 inducción de la LTP utilizando un estándar de 2 series, se administró HFS a 100 Hz a los cortes hipocámpicos provenientes de ratones Tg2576 de 12 meses de edad. Un conjunto de cortes se inundó con 5 nM de Reelina. Los cortes tratados con Reelina mostraron un aumento de la inducción de la LTP al de los niveles tipo silvestre.

La figura 31 es una gráfica que muestra que el tratamiento con Reelina ejerce la recuperación funcional en TBI crónica. Pruebas de oscilación corporal elevada que indican la desviación de oscilación para los valores iniciales después de una lesión cerebral traumática con un impactador cortical, que se mitigó con Reelina.

La figura 32 es una gráfica que muestra que el tratamiento con Reelina ejerce la recuperación funcional en TBI crónica. Acinesia de extremidades que indica la pérdida de movimientos voluntarios para los valores iniciales después de una lesión cerebral traumática con un impactador cortical, que se mitigó con Reelina.

La figura 33 es una gráfica que muestra que el tratamiento con Reelina ejerce una recuperación funcional en la TBI crónica. Agarre con las patas que indica la pérdida de fuerza de las extremidades para valores iniciales después de una lesión cerebral traumática con un impactador cortical.

La figura 34 es una ilustración de algunas estructuras utilizadas en SA2 y SA3 y los sitios de segmentación de Reelina. MMP-9 puede segmentarse entre las regiones 2 y 3, aunque también se ha mostrado que se segmenta en la región 7 durante las reacciones *in vitro* únicamente. tPA puede segmentarse entre las regiones 6 y 7. Las estructuras propuestas están constituidas sin el sitio de unión al MMP-9 *in vitro* con marcas terminales tanto C como N y. NLR-Res = resistente a la segmentación con Reelina; Rln-Lab = Reelina lábil.

La figura 35(A) es una transferencia que muestra el tPA modula el procesamiento de Reelina. La capacidad de tPA/plasminógeno para afectar el procesamiento de Reelina se determinó al hacer reaccionar la Reelina (50 nM) con el tPA (60 ug/ml), plasminógeno inactivo (18 ug/ml), tPA y plasminógeno, y plasmina (activa, 0.5 U/ml) en PBS durante 45 minutos a 37°C. Las reacciones se ejecutaron en Western (a 1:10) y sonda con anti-Reelina (G10, un anticuerpo de reconocimiento N-R2) y anti-Reelina (Ab14, un anticuerpo de reconocimiento R7-8).

La figura 35(B) es una transferencia que muestra que tPA modula el procesamiento de Reelina. La capacidad de tPA para afectar el metabolismo de Reelina en neuronas corticales primarias se determinó al incubar células en el sobrenadante recién preparado durante 24 horas con 70 nM tPA. Los extractos de proteínas celulares se sometieron a análisis Western y detección con G10.

La figura 35(C) es una transferencia que muestra que tPA modula el procesamiento de Reelina. La capacidad de tPA para afectar el metabolismo de Reelina en neuronas corticales primarias se determinó al incubar células en el sobrenadante recién preparado durante 24 horas con 70 nM tPA. Los extractos de proteínas sobrenadantes se sometieron a análisis de Western y detección con G10.

La figura 36(A) es una ilustración de mapeo con tres epítopes. La Reelina consiste en una región N-terminal seguida por el dominio electrostático CR-50 (gris claro), un dominio F-espondina (H), y 8 repeticiones consecutivas similares a EGF. Se muestran diversos anticuerpos, inyectando la región epitópica de la estructura de Reelina para el anticuerpo respectivo.

La figura 36(B) es una ilustración de mapeo con tres epítopes. Anticuerpos que reconocen distintamente las regiones N-R2, R3-R6, y R7-R8 de Reelina que se pueden utilizar para determinar la distribución de la Reelina de longitud total y sus fragmentos principales.

La figura 37 es una gráfica que muestra el efecto de la RAP sobre la Reelina y la expresión ApoER2. La expresión de ApoER2 disminuida está vinculada con la aplicación de

GST-RAP (proteína receptora asociada, que se une a todos los receptores de lipoproteína) en el hipocampo, la corteza prefrontal, y la corteza parietal.

La figura 38(A) es una transferencia que muestra que la aplicación de hR3-6 aumenta la expresión de ApoER2 en cultivos neuronales primarios. Neuronas (E17, DIV8) tratadas con hR3-6 durante 1 h y soldadas con el anticuerpo 3326 que reconoce ApoER2. N = 3-4.

La figura 38(B) es una gráfica que muestra que la aplicación de hR3-6 aumenta la expresión de ApoER2 en cultivos neuronales primarios. Los niveles de ApoER2 se normalizaron a actina y se cuantificaron a partir de la transferencia de Western.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el sentido como se utiliza en la presente, las formas singulares “uno”, “un” y “el” incluyen referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. De esta forma, por ejemplo, la referencia a “un polipéptido” incluye una mezcla de dos o más polipéptidos y lo semejante.

En el sentido como se utiliza en la presente, “aproximadamente” significa aproximadamente o casi y en el contexto de un valor numérico o variación establecida significa $\pm 15\%$ del valor numérico.

En el sentido como se utiliza en la presente, “administración” o “administrar” se utiliza para describir el proceso en el cual los compuestos de la presente invención, solos o en combinación con otros compuestos, se suministran a un paciente. La composición se puede administrar en diversas formas, entre las que se incluyen oral, parenteral (con referencia a intravenosa e intraarterial y otras rutas parenterales adecuadas), intratecal, intramuscular, subcutánea, colónica, rectal, y nasalmente, entre otras. Cada una de estas condiciones se puede tratar fácilmente utilizando otras rutas de administración de los compuestos de la presente invención para tratar una enfermedad o condición. La dosificación de los compuestos y composiciones de la presente invención para obtener un efecto terapéutico o profiláctico se determina por las circunstancias del paciente, como se sabe en la técnica. La dosificación de un paciente en la presente se puede llevar a cabo a través de dosis individuales o unitarias de los compuestos o composiciones de la presente o mediante una dosis combinada o preenvasada o pre-formulada de uno de los compuestos o composiciones. Un ratón de 40 g promedio tuvo un cerebro que pesó 0.416 g, y un ratón de 160 g tuvo un cerebro que pesó 1.02 g, un de ratón 250 g tuvo un cerebro que pesó 1.802 g. Un cerebro humano promedio pesa 1508 g, que se puede utilizar para indicar la cantidad del terapéutico necesario o útil para llevar a cabo el tratamiento descrito en la presente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Además, en el sentido como se utiliza en la presente, la frase “portador farmacéuticamente aceptable” significa cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables estándar. El

portador farmacéuticamente aceptable puede incluir diluyentes, adyuvantes y vehículos, así como portadores de implantes, y materiales de relleno sólidos o líquidos, no tóxicos, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccione con los ingredientes activos de la invención. Los ejemplos incluyen, de manera enunciativa, solución salina amortiguada con fosfato, solución salina fisiológica, agua y emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua. El portador puede ser un medio del solvente o dispersante que contenga, por ejemplo, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y lo semejante), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Las formulaciones se describen en una serie de fuentes que son bien conocidas y están disponibles fácilmente para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, *Remington’s Pharmaceutical Sciences* (Martin EW [1995] Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19^{ava} ed.) Describe formulaciones que se pueden utilizar junto con la invención expuesta.

En el sentido como se utiliza en la presente “animal” significa un organismo multicelular, eucariota clasificado en el reino de Animalia o Metazoa. El término incluye, de manera enunciativa, mamíferos. Los ejemplos no limitantes incluyen roedores, mamíferos acuáticos, animales domésticos tales como perros y gatos, animales de granja tales como ovejas, cerdos, vacas y caballos, y seres humanos. En donde se utiliza en los términos “animal” o “mamífero” o sus plurales, se contempla que también se aplica a cualesquiera animales.

En el sentido como se utiliza en la presente, la frase “sustitución conservadora” se refiere a una sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tengan propiedades similares (por ejemplo, ácidas, básicas, cargadas positiva o negativamente, polares o no polares). La siguiente Tabla 1 contiene los aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí.

La Tabla 1 muestra los aminoácidos, con base en la categoría de grupos funcionales, indicativos de sustituciones conservadoras. El código triplete redundante que codifica para cada aminoácido se muestra como referencia.

Categoría	Aminoácido de 3 letras	Aminoácido de 1 letra	Categoría	Aminoácido de 3 letras	Aminoácido de 1 letra
No polar, alifático	Gly	G	Polar, alifático	Ser	S
	Ala	A		Thr	T
	Val	V		Cys	C
	Leu	L		Pro	P
	Met	M		Asn	N
	Ile	I		Gln	Q
Aromático	Phe	F	Carga positiva	Lys	K
	Tyr	Y		His	H
	Trp	W		Arg	R
Carga negativa	Asp	D			
	Glu	E			

En el sentido como se utiliza en la presente “mutación conservadora”, se refiere a una sustitución de un nucleótido por uno que no dé por resultado en la alteración de la codificación para un aminoácido, es decir, un cambio a una secuencia redundante en los codones degenerados, o una sustitución que de por resultado en una sustitución conservadora. Un ejemplo de redundancia de codones se muestra en la Tabla 2.

La Tabla 2 muestra el código triplete redundante y los aminoácidos codificados correspondientes.

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	END	UGA	END
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	END	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	The	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

De esta forma, las mutaciones conservadoras al codón UUA incluyen UUG, CUU, CUC, CUA, y CUG.

En el sentido como se utiliza en la presente la frase “estructura formada a partir de repeticiones fragmentarias de Reelina” se refiere a una proteína artificial generada a partir de fragmentos obtenidos a partir de la combinación de regiones de repetición de Reelina. Como se observa en la especificación, la Reelina de longitud total está comprendida de regiones de ADN o aminoácidos (para la proteína) que se denominan repeticiones, tales como las regiones R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, y R8 como se observa en la secuencia de aminoácidos de la figura 3 y el párrafo [0061]. Las regiones de asa están ubicadas entre estas regiones de repetición, que se utilizan para unir dos regiones de repetición.

En el sentido como se utiliza en la presente “región de asa” significa una sección de una secuencia de ácido nucleico de Reelina que corresponde a una estructura de asa de ARN, y que está colocada entre dos regiones de repetición, y une las dos regiones de repetición. El término “región de repetición” significa una sección de una secuencia de ácido nucleico de Reelina que forma una unidad recurrente fundamental. Las “regiones de repetición” específicas se describen a todo lo largo de la especificación. En modalidades específicas, la “región de asa” es una estructura formada mediante una sola cadena de ácido nucleico que tenga regiones complementarias que flanquean una región de nucleótidos de cadena individual particular que se hibridan de tal forma que una sola región de nucleótidos encadenados entre las regiones complementarias se excluya de la formación dúplex o apareamiento de bases Watson-Crick.

En el sentido como se utiliza en la presente, el término “paciente” se debe entender que incluye un animal, en especial un mamífero, y de manera más especial un ser humano que esté recibiendo o esté destinado a recibir tratamiento.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” en el sentido como se utiliza en la presente, significa aquella cantidad de un compuesto activo o un agente farmacéutico que produzca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o humano que se busca por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico. Con referencia a una enfermedad neurodegenerativa o ataque neurológico, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para evitar una degeneración neuronal adicional o daño, para reducir los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa o ataque neurológico, o para mejorar la densidad de las dendritas. En algunas modalidades, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa. En algunas modalidades, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la presencia y/o recurrencia de una enfermedad neurodegenerativa. Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más dosis por separado en 2 o más semanas dependiendo de la necesidad o la velocidad individual del metabolismo de la Reelina.

En el sentido como se utiliza en la presente, “corregir” se refiere a la resolución de la enfermedad neurodegenerativa subyacente o daño. Por ejemplo, corregir la enfermedad de Alzheimer se refiere a la interrupción de muerte neuronal.

En el sentido como se utiliza en la presente, “tratamiento” o “tratar” se refiere a obtener resultados clínicos benéficos o deseados. Los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, de manera enunciativa, cualquiera de uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución del grado de la enfermedad o daño neurodegenerativo a partir de un ataque neurológico, estabilización (es decir, sin empeoramiento) del estado de la enfermedad neurodegenerativa o ataque neurológico, prevenir o retrasar la presencia o recurrencia de la enfermedad neurodegenerativa o ataque neurológico, retrasar o disminuir el progreso de la enfermedad y el alivio del estado de enfermedad. Los métodos de la invención contemplan cualquiera de uno o más de estos aspectos del tratamiento.

En el sentido como se utiliza en la presente, “ataque neuronal” significa un daño al tejido neuronal producido mediante una lesión física repentina resultante de alguna condición o condiciones externas. Los ejemplos no limitantes de estas condiciones externas incluyen violencia o accidente, una fractura, golpe o procedimiento quirúrgico.

Un componente “farmacéuticamente aceptable” es uno que sea adecuado para utilizarse con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación, y respuesta alérgica) de acuerdo con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

En el sentido como se utiliza en la presente, “cantidad segura y efectiva” se refiere a la cantidad de un componente que sea suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) de acuerdo con una proporción razonable de beneficio/riesgo cuando se utiliza en la forma de esta invención.

Un “portador farmacéuticamente aceptable” es un portador, tal como un solvente, agente de suspensión o vehículo, para suministrar el compuesto o los compuestos en cuestión al animal o ser humano. El portador puede ser líquido o sólido y se selecciona con la forma de administración planeada en mente. En el sentido como se utiliza en la presente, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualesquiera y todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y para retrasar la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides, y lo semejante. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en esta técnica. Salvo que cualesquiera medios o agente convencionales sean compatibles con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

Los compuestos de la invención expuesta se pueden formular como composiciones

farmacéuticas y se administran a un paciente, tal como un paciente humano, en una variedad de formas adaptadas a la ruta de administración seleccionada, por ejemplo, oral o intraperitonealmente, tal como intravenosa o intraarterialmente, o las rutas intracerebrales.

El compuesto activo también se puede administrar intracerebral o intraperitonealmente, tal como intravenosa o intraarterialmente, mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua u otro solvente adecuado, se pueden mezclar opcionalmente con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservador para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprendan el ingrediente activo que se adaptarán para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles. En todas las clases, la forma de dosificación última debe ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquida que comprenda, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y lo semejante), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes para retrasar la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente adecuado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización en filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y las técnicas de liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional que presente las soluciones filtradas estériles previamente.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos divididos finamente tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y lo semejante. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o combinaciones de agua-alcohol/glicol, en las cuales se puedan disolver o dispersar los compuestos de la presente a los niveles efectivos, opcionalmente con ayuda de tensioactivos no tóxicos.

Las dosificaciones útiles de los compuestos de la invención expuesta se pueden determinar al comparar su actividad *in vitro*, y su actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosificaciones efectivas en ratones, y otros animales, a seres humanos se conocen la técnica (patente de los Estados Unidos No. 4,938,949 (Borch et al.)).

Por consiguiente, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención expuesta como se describió anteriormente, con o sin un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración intraventricular, intracerebral, o parenteral, que comprenden una cantidad de uno o más compuestos efectivos para tratar una enfermedad neurodegenerativa o ataque neurológico, son una modalidad preferida de la invención.

Ejemplo 1

Se formaron fragmentos recombinantes de Reelina utilizando una secuencia humana de Reelina de longitud total (Gene ID: 5649, Nat'l Center for Biotechnology Information, U.S. Nat'l Library of Medicine, Bethesda, MD; Human Gene Nomenclature Committee, Cambridgeshire, UK, HGNC:HGNC:9957) para determinar las regiones específicas de repeticiones. Los fragmentos se produjeron comercialmente y se secuenciaron a la llegada, antes de la construcción de estructuras y producción de proteínas.

Reelina humana, de longitud total (SEQ ID No. 1)

```
CACGCGTGGGCTCGGCGGGGGCCCGCTCCCAGGCCCGCTCCCGAGCCCGTTCCGCTCCCGTCCGCCT
TCTTCTCGCCTTCTCTCCGCGTGGCTCCTCCGTCCCGGCGTCTCCAAACTGAATGAGCGAGCGGCGC
GTAGGGCGSCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCATGGAGCGCAGTGGCTGGGCCCGG
CAGACTTTCCTCCTAGCGCTGTTGCTGGGGGCGACGCTGAGGGCGCGCGCGGCGGCTGGCTATTACC
CCCGCTTTTCGCCCTTCTTTTCTGTGCACCCACCACGGGGAGCTGGAAGGGGATGGGGAGCAGGG
CGAGGTGCTCATTTCCCTGCATATTGCGGGCAACCCACCTACTACGTTCCGGGACAAGAATACCATG
TGACAATTTCAACAAGCACCTTTTTTGACGGCTTGCTGGTGACAGGACTATACACATCTACAAGTGTTT
AGGCATCACAGAGCATTGGAGGTTCCAGTGCTTTCGGATTTGGGATCATGTCTGACCACCAGTTTGGT
AACCAGTTTATGTGCAGTGTGGTAGCCTCTCACGTGAGTCACCTGCCCAACCAACCTCAGTTTCATC
TGGATTGCTCCACCTGCGGGCACAGGCTGTGTGAATTTTCATGGCTACAGCAACACACCGGGGCCAGG
TTATTTTCAAAGATGCTTTAGCCCAGCAGTTGTGTGAACAAGGAGCTCCAACAGATGTCACTGTGCAC
CCACATCTAGCTGAAATACATAGTGACAGCATTATCCTGAGAGATGACTTTGACTCCTACCACCAACT
GCAATTAAATCCAAATATATGGGTTGAATGTAACAACTGTGAGACTGGAGAACAGTGTGGCGCGATT
ATGCATGGCAATGCCGTCACCTTCTGTGAACCATATGGCCCACGAGAACTGATTACCACAGGCCTTAA
TACAACAACAGCTTCTGTCTCCAATTTTCATTGGGTCAGGTTTCATGTCGCTTTAGTTATTAGACCCC
AGCATCATCGTGTTATATGCCAAGAATAACTCTGCGGACTGGATTGAGCTAGAGAAAATTAGAGCCC
CTTCCAATGTCAGCACAATCATCCATATCCTCTACCTTCTGAGGACGCCAAAGGGGAGAATGTCCAA
TTTCAGTGGAAGCAGGAAAATCTTCGTGTAGGTGAAGTGTATGAAGCCTGCTGGGCCTTAGATAACA
```

TCTTGATCATCAATTCAGCTCACAGACAAGTCGTTTTAGAAAGATAGTCTCGACCCAGTGGACACAGGC
AACTGGCTTTTCTCCCAGGAGCTACAGTTAAGCATAGCTGTCAGTCAGATGGGAACTCCATTTATTTCC
CATGGAAATGAAGGCAGCGAGTTCAATTTTGCCACCACCAGGGATGTAGATCTTTCCACAGAAGATA
TTCAAGAGCAATGGTCAGAAGAATTTGAGAGCCAGCCTACAGGATGGGATGTCTTGGGAGCTGTCAT
TGGTACAGAATGTGGAACGATAGAATCAGGCTTATCAATGGTCTTCCTCAAAGATGGAGAGAGGAA
ATTATGCACTCCATCCATGGACACTACCGGTTATGGGAACCTGAGGTTTTACTTTGTGATGGGAGGAA
TTTGTGACCCTGGAAATTCTCATGAAAATGACATAATCCTGTATGCAAAAATTGAAGGAAGAAAAGA
GCATATAACACTGGATACCCTTTCCTATTCCTCATATAAGGTTCCGTCTTTGGTTTCTGTGGTCATCAAT
CCTGAACTTCAGACTCCTGCTACCAAATTTGTCTCAGGCAAAAGAACCATCAAGGACATAATAGGAA
TGTCTGGGCTGTAGACTTTTTCCATGTCTTGCCTGTTCTCCCTTCTACAATGTCTCACATGATACAGTTT
TCCATCAATCTGGGATGTGGAACGCATCAGCCTGGTAACAGTGTGAGCTTGGAAATTTCTACCAACCA
TGGGCGCTCCTGGTCCCTCCTTCACACTGAATGCTTACCTGAGATCTGTGCTGGACCCACCTCCCCCA
CAGCACTGTCTACTCCTCTGAAAACACTACAGTGGGTGGAACCGAATAACAATTCCCCTTCCTAACGCAG
CACTAACCCGGAACACCAGGATTCGCTGGAGACAAACAGGACCAATCCTTGGAAACATGTGGGCAAT
TGATAATGTTTATATTGGCCCGTCATGTCTCAAATTCTGTTCTGGCAGAGGACAGTGCCTAGACATG
GTTGCAAGTGTGACCCTGGATTTTCTGGCCAGCTTGTGAGATGGCATCCAGACATTCCCAATGTTT
ATTTCTGAAAGCTTTGGCAGTTCCAGGCTCTCCTCTTACCATAACTTTTACTCTATCCGTGGTGCTGAA
GTCAGCTTTGGTTGTGGTGTCTTGGCCAGTGGTAAGGCCCTGGTTTTCAACAAAGAAGGGCGGCGTC
AGCTAATTACATCTTTCCTTGACAGCTCACAATCCAGGTTTCTCCAGTTCACACTGAGACTGGGGAGC
AAATCTGTTCTGAGCACGTGCAGAGCCCCTGATCAGCCTGGTGAAGGAGTTTTGCTGCATTATTCTTA
TGATAATGGGATAACTTGGAAACTCCTGGAGCATTATTCATATCTCAGCTATCATGAGCCCAGAATAA
TCTCCGTAGAACTACCAGGTGATGCAAAGCAGTTTGGAATTCAGTTCAGATGGTGGCAACCGTATCAT
TCTTCCCAGAGAGAAGATGTATGGGCTATTGATGAGATTATCATGACATCTGTGCTTTTCAACAGCAT
TAGTCTTGACTTTACCAATCTTGTGGAGGTCACTCAGTCTCTGGGATTCTACCTTGGAAATGTTTACGCC
ATACTGTGGCCACGACTGGACCCTTTGTTTTACAGGAGATTCTAAACTTGCCTCAAGTATGCGCTATGT
GGAAACACAATCAATGCAGATAGGAGCATCCTATATGATTCAGTTCAGTTTGGTGATGGGATGTGGC
CAGAAATACACCCACACATGGACAACCAGGTGAAGCTGGAGTACTCAACCAACCACGGCCTTACCT
GGCACCTCGTCCAAGAAGAATGCCTTCCAAGTATGCCAAGTTGTCAGGAATTTACATCAGCAAGTATT
TACCATGCCAGTGAGTTTACACAGTGGAGGAGAGTCATAGTGCTTCTTCCCCAGAAAACCTTGGTCCAG
TGCTACCCGTTTCCGCTGGAGCCAGAGCTATTACACAGCTCAAGACGAGTGGGCTTTGGACAGCATTT
ACATTGGGCAGCAGTGCCCCAACATGTGCAGTGGGCATGGCTCATGCGATCATGGCATATGCAGGTG
TGACCAGGGGTACCAAGGCACTGAATGCCACCCAGAAGCTGCCCTTCCGTCCACAATTATGTCAGATT
TTGAGAACCAGAATGGCTGGGAGTCTGACTGGCAAGAAGTTATTGGGGGAGAAATTGTAAAACCAG
AACAAGGGTGTGGTGTCTCTTCTGGATCATCTCTGTACTTCAGCAAGGCTGGGAAAAGACAGCT
GGTGAGTTGGGACCTGGATACTTCTTGGGTGGACTTTGTCCAGTTCTACATCCAGATAGGCGGAGAG
AGTGCTTCATGCAACAAGCCTGACAGCAGAGAGGAGGGCGTCCTCCTTCAGTACAGCAACAATGGG
GGCATCCAGTGGCACCTGCTAGCAGAGATGTACTTTTCAGACTTCAGCAAACCCAGATTTGTCTATCT

GGAGCTTCCAGCTGCTGCCAAGACCCCTTGCACCAGGTTCCGCTGGTGGCAGCCCGTGTTCAGGG
GAGGACTATGACCAGTGGGCAGTCGATGACATCATCATTCTGTCCGAGAAGCAGAAGCAGATCATCC
CAGTTATCAATCCAACCTTTACCTCAGAACTTTTATGAGAAGCCAGCTTTTGATTACCCTATGAATCAGA
TGAGTGTGTGGTTGATGTTGGCTAATGAAGGAATGGTTAAAAATGAAACCTTCTGTGCTGCCACACC
ATCAGCAATGATATTTGGAAAATCAGATGGAGATCGATTTGCAGTAACTCGAGATTTGACCCTGAAA
CCTGGATATGTGCTACAGTTCAAGCTAAACATAGGTTGTGCCAATCAATTCAGCAGTACTGCTCCAGT
TCTTCTTCAGTACTCTCATGATGCTGGTATGTCCTGGTTTTCTGGTGAAAGAAGGCTGTTACCCGGCTTC
TGCAGGCCAAAGGATGCGAAGGAACTCCAGAGAACTAAGTGAGCCCACCATGTATCACACAGGGGA
CTTTGAAGAATGGACAAGAATCACCATTGTTATTCCAAGGTCTCTTGCATCCAGCAAGACCAGATTCC
GATGGATCCAGGAGAGCAGCTCACAGAAAAACGTGCCTCCATTTGTTTTAGATGGAGTGTACATATC
CGAGCCTTGTCCCAGTTACTGCAGTGGCCATGGGGACTGCATTTCAGGAGTGTGTTTCTGTGACCTGG
GATATACTGCTGCACAAGGAACCTGTGTGTCAAATGTCCCAATCACAATGAGATGTTGATAGGTTT
GAGGGGAAGCTCAGCCCTCTGTGGTACAAGATAACAGGTGCCCAGGTTGAACTGGCTGTGGAACA
CTTAACGATGGCAAATCTCTCTACTTCAATGGCCCTGGGAAAAGGGAAGCCCGGACGGTCCCTCTGG
ACACCAGGAATATCAGACTTGTTCAATTTTATATACAAATTGGAAGCAAACTTCAGGCATTACCTGC
ATCAAACCAAGAACTAGAAATGAAGGGCTTATTGTTCAGTATTCAAATGACAATGGGATACTCTGGC
ATTTGCTTCGAGAGTTGGACTTCATGTCCTTCCTGGAACCACAGATCATTTCCATTGACCTGCCACAGG
ACGCGAAGACACCTGCAACGGCATTTCGATGGTGGCAACCGCAACATGGGAAGCATTAGCCCAGT
GGGCTTTGGATGATGTTCTTATAGGAATGAATGACAGCTCTCAAACCTGGATTCAAGACAAATTTGAT
GGCTCTATAGATTTGCAAGCCAACCTGGTATCGAATCCAAGGAGGTCAAGTTGATATTGACTGTCTCTC
TATGGATACTGCTCTGATATTCACTGAAAACATAGGAAAACCTCGTTATGCTGAGACCTGGGATTTTC
ATGTGTCAGCATCTACCTTTTTGCAGTTTGAAATGAGCATGGGCTGTAGCAAGCCCTTCAGCAACTCC
CACAGTGTACAGCTCCAGTATTCTCTGAACAATGGCAAGGACTGGCATCTTGTACCGAAGAGTGTGT
TCCTCCAACCATTGGCTGTCTGCATTACACGGAAAGTTCAATTTACACCTCGGAAAGATTCCAGAATT
GGAAAGCGGATCACTGTCTACCTTCCACTCTCCACCATTTCCTCCAGGACCCGGTTCAGATGGATTICAG
GCCAACTACACTGTGGGGGGCTGATTCCCTGGGGCGATTGATAATGTTGTACTGGCCTCAGGGGTGCCCTT
GGATGTGCTCAGGACGAGGGGATTTGTGATGCTGGACGCTGTGTGTGTGACCGGGGGCTTTGGTGGAC
CCTATTGTGTTCCCTGTTGTTCCCTCTGCCCTCGATTCTTAAAGACGATTTCAATGGGAATTTACATCCTGA
CCCTTGGCCTGAAGTGTATGGTGCAGAGAGGGGGGAATCTGAATGGTGAAACCATCAAATCTGGAAC
ATCTCTAATTTTTAAAGGGGAAGGACTAAGGATGCTTATTTCAAGAGATCTAGATTGTACAAATACAA
TGTATGTCCAGTTTTCACTTAGATTTATAGCAAAAAGTACCCAGAGAGATCTCACTCTATTCTGTTAC
AATTCTCCATCAGTGGAGGAATCACTTGGCACCTGATGGATGAATTTTACTTTCTCAAACAACGAAT
ATACTTTTCATCAATGTTCCCTTGCCATACACTGCCCAAACCAATGCTACAAGATTCACTCTGGCAA
CCTTATAATAACGGTAAGAAAGAAGAAATCTGGATTGTTGATGACTTCATTATCGATGGAAATAATGT
AAACAACCCTGTGATGCTCTTGGATACATTTGATTTTGGGCCAGAGAAGACAATTGGTTTTTCTATCC
TGGTGGTAACATCGGTCTTTATTGTCCATATTCTTCAAAGGGGGCACCTGAAGAAGATTCAGCTATGG
TGTTTGTTTCAAATGAAGTTGGTGAGCATTCCATTACCACCCGTGACCTAAATGTGAATGAGAACACC

ATCATACAATTTGAGATCAACGTTGGCTGTTGACTGATAGCTCATCCGCGGATCCAGTGAGACTGGA
ATTTTCAAGGGACTTCGGGGCGACCTGGCACCTTCTGCTGCCCCTCTGCTACCACAGCAGCAGCCACG
TCAGCTCTTTATGCTCCACCGAGCACCACCCCAGCAGCACCTACTACGCAGGAACCATGCAGGGCTGG
AGGAGGGAGGTCTGTGCACTTTGGGAAGCTGCACCTTTGTGGATCTGTCCGTTTCAGATGGTACCAGG
GATTTTACCCTGCCGGCTCTCAGCCAGTGACATGGGCCATTGATAATGTCTACATCGGTCCCCAGTGT
GAGGAGATGTGTAATGGACAGGGGAGCTGTATCAATGGAACCAAATGTATATGTGACCCTGGCTAC
TCAGGTCCAACCTGTAAAATAAGCACCAAAAATCCTGATTTTCTCAAAGATGATTTTGAAGGTCAGCT
AGAATCTGATAGATTCTTATTAATGAGTGGTGGGAAACCATCTCGAAAGTGTGGAATCCTTTCTAGTG
GAAACAACCTCTTTTTCAATGAAGATGGCTTGC GCATGTTGATGACACGAGACCTGGATTTATCATAT
GCTAGATTTGTGCAGTTCTTCATGAGACTGGGATGTGGTAAAGGCGTTCCTGACCCCAGGAGTCAAC
CCGTGCTCCTACAGTATTCTCTCAACGGTGGCCTCTCGTGGAGTCTTCTTCAGGAGTTCCTTTTCAGCA
ATTCCAGCAATGTGGGCAGGTACATTGCCCTGGAGATACCCTTGAAAGCCCGTTCTGGTTCTACTCGC
CTTCGCTGGTGGCAACCGTCTGAGAATGGGCACTTCTACAGCCCCTGGGTATCGATCAGATTCTTAT
TGGAGGAAATATTTCTGGTAATACGGTCTTGGGAAGATGATTTACAACCCTTGATAGTAGGAAATGG
CTGCTTCAACCAGGAGGCACCAAGATGCCCGTGTGTGGCTCTACTGGTGATGCCCTGGTCTTCATTGA
AAAGGCCAGCACCCGTTACGTGGTCAGCACAGACGTTGCCGTGAATGAGGATTCCTTCCTACAGATA
GACTTCGCTGCCTCCTGCTCAGTCACAGACTCTTGTTATGCGATTGAATTGGAATACTCAGTAGATCTT
GGATTGTCATGGCACCCATTGGTAAGGGACTGTCTGCCTACCAATGTGGAATGCAGTCGCTATCATCT
GCAACGGATCCTGGTGTGAGACACTTTCAACAAGTGGACTAGAATCACTCTGCCTCTCCCTCCTTATAC
CAGGTCCCAAGCCACTCGTTTCCGTTGGCATCAACCAGCTCCTTTTGACAAGCAGCAGACATGGGGCAA
TAGATAATGTCTATATCGGGGATGGCTGCATAGACATGTGCAGTGGCCATGGGAGATGCATCCAGGG
AAACTGCGTCTGTGATGAACAGTGGGGTGGCCTGTACTGTGATGACCCCGAGACCTCTCTTCCAACCC
AACTCAAAGACAACCTCAATCGAGCTCCATCCAGTCAGAACTGGCTGACTGTGAACGGAGGGGAAATT
GAGTACAGTGTGTGGAGCCGTGGCGTCGGGAATGGCTCTCCATTTAGTGGGGGTTGTAGTCGATTA
TTAGTCACTGTGGATCTAAACCTCACTAATGCTGAGTTCATCCAATTTTACTTCATGTATGGGTGCCTG
ATTACACCAAACAACCGTAACCAAGGTGTTCTCTTGGGAATATTCTGTCAATGGAGGCATTACCTGGAA
CCTGCTCATGGAGATTTTCTATGACCAGTACAGTAAGCCCGGATTTGTGAATATCCTTCTCCCTCCTGA
TGCTAAAGAGATTGCCACTCGCTTCCGCTGGTGGCAGCCAAGACATGACGGCCTGGATCAGAACGAC
TGGGCCATTGACAATGTCCTCATCTCAGGCTCTGCTGACCAAAGGACCGTTATGCTGGACACCTTCAG
CAGCGCCCCAGTACCCAGCACGAGCGCTCCCCTGCAGATGCCGGCCCTGTCGGGAGGATCGCCTTT
GACATGTTTATGGAAGACAAAACCTTCAGTGAATGAGCACTGGCTATTCCATGATGATTGTACAGTAG
AAAGATTCTGTGACTCCCCTGATGGTGTGATGCTCTGTGGCAGTCATGATGGACGGGAGGTGTATGC
AGTGACCCATGACCTGACTCCCACTGAAGGCTGGATTATGCAATTCAAGATCTCAGTTGGATGTAAG
GTGTCTGAAAAAATTGCCAGAATCAAATTCATGTGCAGTATTCTACTGACTTCGGTGTGAGTTGGAA
TTATCTGGTCCCTCAGTGCTTGCCTGCTGACCCAAAATGCTCTGGAAGTGTTCCTCAGCCATCTGTATT
CTTTCCAATAAAGGGTGGAAAAGGATCACCTACCACTTCCTGAAAGCTTAGTGGGAAATCCGGTA
AGGTTTAGGTTCTATCAGAAGTACTCAGACATGCAGTGGGCAATCGATAATTTCTACCTGGGCCCTGG

ATGCTTGGACAACTGCAGGGGCCATGGAGATTGCTTAAGGGAACAGTGCATCTGTGATCCGGGATA
CTCAGGGCCAACTGCTACTTGACCCACACTCTGAAGACTTTCTGAAGGAACGCTTTGACAGTGAAG
AAATCAAACCTGACTTATGGATGTCCTTAGAAGGTGGAAGTACTTGCACTGAGTGTGGAATTCTTGCC
GAGGACACTGCACTCTATTTTGGGGGATCCACTGTGAGACAAGCGGTTACACAAGATTTGGATCTTC
GAGGTGCAAAGTTCCTGCAATACTGGGGGCGCATCGGTAGTGAGAACAACATGACCTCTTGCCATCG
TCCCATCTGCCGGAAGGAAGGCGTGCTGTTGGACTACTCTACCGATGGAGGAATTACCTGGACTTTG
CTCCATGAGATGGATTACCAGAAATACATTTCTGTTAGACACGACTACATACTTCTTCCTGAAGATGCC
CTCACCAACACAACCTCGACTTCGCTGGTGGCAGCCTTTTGTGATCAGCAATGGAATTGTGGTCTCTGG
GGTGGAGCGTGCTCAGTGGGCACTGGACAACATTTTGATTGGTGGAGCAGAAATCAATCCCAGCCA
ATTGGTGGACACTTTTGATGATGAAGGCACTTCCCATGAAGAAAACCTGGAGTTTTTACCCTAATGCTG
TAAGGACAGCAGGATTTTGTGGCAATCCATCCTTTCACCTCTATTGGCCAAATAAAAAGAAGGACAA
GACTCACAATGCTCTCTCCTCCCGAGAACTCATTATACAGCCAGGATACATGATGCAGTTTAAAATTGT
GGTGGGTTGTGAAGCCACTTCTTGTGGTGACCTTCATTCCGTAATGCTGGAATACACTAAGGATGCAA
GATCGGATTCTTGGCAGCTCGTACAGACCCAGTGCCTTCCTTCTTCTAACAGCATTGGCTGCTCCC
CTTTCCAGTTCCATGAAGCCACCATCTACAACCTCTGTCAACAGCTCAAGCTGGAAAAGAATCACCATC
CAGCTGCCTGACCATGTCTCCTCTAGTGCAACACAGTTCGCTGGATCCAGAAGGGAGAAGAACTG
AGAAGCAAAGCTGGGCAATTGACCACGTGTACATTGGAGAGGCTTGCCCCAAGCTCTGCAGCGGGC
ACGGATACTGCACGACCGGTGCCATCTGCATCTGCGACGAGAGCTTCCAAGGTGATGACTGCTCTGT
TTTCAGTCACGACCTTCCAGTTATATTAAGATAATTTTGAGTCCGCAAGAGTCACCGAGGCAAACCT
GGGAGACCATTCAAGGTGGAGTCATAGGAAGTGGCTGTGGGCAGCTGGCCCCCTACGCCCATGGAG
ACTCACTGTACTTTAATGGCTGTCAGATCAGGCAAGCAGCTACCAAGCCTCTGGATCTCACTCGAGCA
AGCAAAATCATGTTTGTGTTTGCAAATTGGGAGCATGTGCGACGACGACAGCTGCAACAGTGACCTGA
GTGGCCCCCACGCTGTGGACAAGGCGGTGCTGCTGCAATACAGCGTCAACAACGGGATCACCTGGC
ATGTCATCGCCCAGCACCCAGCCAAAGGACTTCACACAAGCTCAGAGAGTGTCTTACAATGTCCCCCTG
GAGGCACGGATGAAAGGAGTCTTACTGCGCTGGTGGCAACCACGCCACAATGGAACAGGTCATGAT
CAATGGGCTTTGGACCATGTGGAGGTCGTCTAGTAAGCACTCGCAACAAAATTACATGATGAATTT
TTCACGACAACATGGGCTCAGACATTTCTACAACAGAAGACGAAGGTCACTTAGGCGATACCCATGA
AGAATCAAAAAGTTTATTTTTTTCTTCCAACATGTGATGTGTTGCTCTCCATTCTTTTAAATCTCGCAC
TACATCTGATATCAGGAAATATCTGTGAAGGACTTGGTGATTACCTGAAAGCCCTTCTCAAGACCGAG
TGACACCACTTTCCACACTGTGAACTAATGACAAGTGACTTATTTGCTCATAAGTAAATGTCTTCAT
GTTGATGTGTCCGTGAAAGTTGTGATCTGTTGTAATATCAGTTACAGTGGCAGTATTGACAATAAGAA
ACAGTTTAAACAGAAAAATGAAATTTAAGCACAAAAATTTAAGAGATTTTATGTTTAAATGGCATT
AGCACAGTATTTAACATTCTTGGTCACAAAGCTATTTAAGTGGACTGTATTTAGCTATGTCTCATGTT
TTATATGATTAAATTATCATTGTTTGTCTTTATGTATTCTCTTCTACAATACAACACATTGAAACTGTAT
TTACTTGTTATGTTGTAATATTTTGTGCTGAATTTGGGGCTACTTATATTCTGCAGAAAAATTAATTGA
AATACCTATTCAAGAAGATAGTTGTAAAGATATTGTATCTCCTTTAATATACTCCTTAAAAATGTATGT
TGGTTTAGCGTTGTTTTGTGGATAAGAAAAATGCTTGACCCTGAAATATTTTCTACTTTAAATTGTGGA

TGAAGACCCTATCTCCCACAAATAAGTTCCCATTTCTTGTCTAAAGATCTTTTTTAAAGTGTCTGTGG
 CTGATTTACTAACAGTAACTGCCATTTTTGTCTGTGATAACAGAGTGATTTGTAAAACAGTGGTTGTT
 TTTTCATTGTGTTTTCTTCGTGGATTGTTTTCTGCGGGTCATATTCATACCTTCTGATGAAGTTGTAC
 AACACCAGCAACATTATAATGGCCCTGTAGCTCTGAATGCTATTTGTGTAAGTAAAGGTTGCACTCT
 AGGGTGAACCAAGCTATAAAAGCCCATGCTTAAATAAAAATTATGTCCAAAAGCC

Un mapa de secuencias, que incluye las regiones de repetición de Reelina y algunos sitios de segmentación enzimática, se muestra en la figura 5.

Se transfectaron establemente células HEK293 con el gen de Reelina de longitud total en un vector pCrl para producir fragmentos para la formación de Reelina recombinante. La Reelina de longitud total se insertó en las células HEK293, como se describió anteriormente (Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:39944–39952; Sinagra, et al., Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro. *J. Neurosci.* 2005; 25:6127–6136). Una vez confluente, las células se dejaron crecer en medio de Eagle modificado con Dulbecco de baja glucosa con el 0.2% de albúmina de suero bovino durante 2 días, seguido por recolección de medios, filtración estéril, y concentración mediante unidades de filtro de centrífuga Centricon Plus-80 (Millipore). La Reelina se segmentó extracelularmente en dos sitios, dando por resultando en la generación de tres fragmentos principales: N-término para repetición 2 (aproximadamente 180 kDa), el fragmento central para la repetición 3-6 (aproximadamente 190 kDa), y el fragmento C-terminal que consiste de las repeticiones 7 y 8 (aproximadamente 80 kDa) (Nakajima, et al., Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:8196–820; de Rouvroit, et al., (1999) Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp. Neurol.* 1999; 156:214–217; Utsunomiya-Tate, et al., Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97: 9729–9734; Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.* 2004; 24:514–521; Jossin, et al., Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *J. Neurosci.* 2007; 27:4243–4252; Koie, et al., Cleavage within Reelin repeat 3 regulates the duration and range of the signaling activity of Reelin protein. *J. Biol. Chem.* 2014; 289:12922–12930; Krstic, et al., Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS One.* 2012;7:e47793; Trotter, et al., Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience.* 2014; 274:299–307). Adicionalmente, se produjeron dos fragmentos intermedios: Uno que consistió del N-terminal hasta la

repetición 6 (aproximadamente 370 kDa), y uno que consistió de las repeticiones 6-8 (aproximadamente 270 kDa) (Jossin, et al., The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. J. Neurosci. 2004; 24:514–521).

Se realizó la segmentación de la Reelina de longitud total, como se analizó anteriormente, para formar extremos adherentes. Para la Reelina recombinante, se produjeron dos o más fragmentos de Reelina al ligar la secuenciación de ADN que representa las repeticiones específicas de Reelina. Las regiones de repetición de Reelina resultantes también se secuenciaron para confirmar que las regiones de codificación se mantuvieron y el marco de lectura estuvo en la orientación correcta. Las proteínas recombinantes de Reelina se produjeron utilizando técnicas estándar y se amplificaron en vectores que contuvieron Bluescript. El ADN recombinante se clonó en un vector de expresión y se expresó en un cultivo de células HEK293.

Repetición 3 de Reelina (SEQ ID No.2)

TTCAGCAGTACTGCTCCAGTTCTTCTTCAGTACTCTCATGATGCTGGTATGTCCTGGTTTCTGGTGAAA
GAAGGCTGTTACCCGGCTTCTGCAGGCAAAGGATGCGAAGGAACTCCAGAGAACTAAGTGAGCCC
ACCATGTATCACACAGGGGACTTTGAAGAATGGACAAGAATCACCATTGTTATTCCAAGGTCTCTTGC
ATCCAGCAAGACCAGATTCCGATGGATCCAGGAGAGCAGCTCACAGAAAAACGTGCCTCCATTTGGT
TTAGATGGAGTGTACATATCCGAGCCTTGTCCTCAGTTACTGCAGTGGCCATGGGGACTGCATTTAG
GAGTGTGTTTCTGTGACCTGGGATATACTGCTGCACAAGGAACCTGTGTGTCAAATGTCCCCAATCAC
AATGAGATGTTGATAGGTTTGAGGGGAAGCTCAGCCCTCTGTGGTACAAGATAACAGGTGCCAG
GTTGGAAGTGGCTGTGGAACACTTAACGATGGCAAATCTCTCTACTTCAATGGCCCTGGGAAAAGGG
AAGCCCGGACGGTCCCTCTGGACACCAGGAATATCAGACTTGTTCAATTTATATACAAATTGGAAGC
AAAACCTCAGGCATTACCTGCATCAAACCAAGAACTAGAAATGAAGGGCTTATTGTTCAGTATTCAA
TGACAATGGGATACTCTGGCATTGCTTCGAGAGTTGGACTTCATGTCCTTCCTG

Repetición 4 de Reelina (SEQ ID No. 3)

CCCTTCAGCAACTCCCACAGTGACAGCTCCAGTATTCTCTGAACAATGGCAAGGACTGGCAT
CTTGTCACCGAAGAGTGTGTTCTCCAACCATTGGCTGTCTGCATTACACGGAAAGTTCAATTTACACC
TCGGAAAGATTCCAGAATTGGAAGCGGATCACTGTCTACCTTCCACTCTCCACCATTCTCCCAGGACC
CGGTTCAAGTGGATTCAGGCCAACTACACTGTGGGGGCTGATTCCTGGGCGATTGATAATGTTGTAC
TGGCCTCAGGGTGCCCTTGATGTGCTCAGGACGAGGGATTTGTGATGCTGGACGCTGTGTGTGTGA
CCGGGGCTTTGGTGGACCCTATTGTGTTCTGTTGTTCTCTGCCCTCGATTCTTAAAGACGATTTCAA
TGGGAATTTACATCCTGACCTTTGGCCTGAAGTGTATGGTGCAGAGAGGGGGAATCTGAATGGTGAA
ACCATCAAATCTGGAACATCTCTAATTTTAAAGGGGAAGGACTAAGGATGCTTATTTCAAGAGATCT
AGATTGTACAAATACAATGTATGTCCAGTTTTCACTTAGATTTATAGCAAAAAGTACCCAGAGAGAT
CTCACTCTATTCTGTTACAATTCTCCATCAGTGGAGGAATCACTTGGCACCTGATGGATGAATTTACT
TTCCTCAAACAACG

Repetición 5 de Reelina (SEQ ID No. 4)

GATAGCTCATCCGCGGATCCAGTGAGACTGGAATTTTCAAGGGACTTCGGGGCGACCTGGC
ACCTTCTGCTGCCCCTCTGCTACCACAGCAGCAGCCACGTCAGCTCTTTATGCTCCACCGAGCACCACC
CCAGCAGCACCTACTACGCAGGAACCATGCAGGGCTGGAGGAGGGAGGTTCGTGCACTTTGGGAAGC
TGCACCTTTGTGGATCTGTCCGTTTCAGATGGTACCAGGGATTTTACCCTGCCGGCTCTCAGCCAGTG
ACATGGGCCATTGATAATGTCTACATCGGTCCCCAGTGTGAGGAGATGTGTAATGGACAGGGGAGCT
GTATCAATGGAACCAAATGTATATGTGACCCTGGCTACTCAGGTCCAACCTGTAAAATAAGCACCAAA
AATCCTGATTTTCTCAAAGATGATTTTGAAGGTCAGCTAGAATCTGATAGATTCTTATTAATGAGTGGT
GGGAAACCATCTCGAAAGTGTGGAATCCTTTCTAGTGGAACAACCTCTTTTTCAATGAAGATGGCTT
GCGCATGTTGATGACACGAGACCTGGATTTATCACATGCTAGATTTGTGCAGTTCTTCATGAGACTGG
GATGTGGTAAAGGCGTTCCTGACCCAGGAGTCAACCCGTGCTCCTACAGTATTCTCTCAACGGTGGC
CTCTCGTGGAGTCTTCTTCAGGAGTTCCTTTTCAGCAATTCCAGC

Repetición 6 de Reelina (SEQ ID No. 5)

GTCACAGACTCTTGTTATGCGATTGAATTGGAATACTCAGTAGATCTTGGATTGTCATGGCAC
CCATTGGTAAGGGACTGTCTGCCTACCAATGTGGAATGCAGTCGCTATCATCTGCAACGGATCCTGGT
GTCAGACACTTTCAACAAGTGGACTAGAATCACTCTGCCTCTCCCTCCTTATACCAGGTCCCAAGCCAC
TCGTTTCCGTTGGCATCAACCAGCTCCTTTTGACAAGCAGCAGACATGGGCAATAGATAATGTCTATA
TCGGGGATGGCTGCATAGACATGTGCAGTGGCCATGGGAGATGCATCCAGGGAAACTGCGTCTGTG
ATGAACAGTGGGGTGGCCTGTACTGTGATGACCCCGAGACCTCTCTTCCAACCCAACTCAAAGACAA
CTTCAATCGAGCTCCATCCAGTCAGAACTGGCTGACTGTGAACGGAGGGAAATTGAGTACAGTGTGT
GGAGCCGTGGCGTCGGGAATGGCTCTCCATTTAGTGGGGTGTAGTCGATTATTAGTCACTGTGG
ATCTAAACCTCACTAATGCTGAGTTCATCCAATTTTACTTCATGTATGGGTGCCTGATTACACCAAACA
ACCGTAACCAAGGTGTTCTCTTGAATATTCTGTCAATGGAGGCATTACCTGGAACCTGCTCATGGAG
ATTTTCTATGACCAGTACAGT

Región 3-4 del asa de repetición de Reelina (SEQ ID No. 6)

GAACCACAGATCATTTCATTGACCTGCCACAGGACGCGAAGACACCTGCAACGGCATTTCG
ATGGTGGCAACCGCAACATGGGAAGCATTGAGCCAGTGGGCTTTGGATGATGTTCTTATAGGAATG
AATGACAGCTCTCAAACCTGGATTTCAAGACAAATTTGATGGCTCTATAGATTTGCAAGCCAACTGGTA
TCGAATCCAAGGAGGTCAAGTTGATATTGACTGTCTCTATGGATACTGCTCTGATATTCACTGAAA
ACATAGGAAAACCTCGTTATGCTGAGACCTGGGATTTTCATGTGTCAGCATCTACCTTTTTGCAGTTTG
AAATGAGCATGGGCTGTAGCAAG

Región 4-5 del asa de repetición de Reelina (SEQ ID No. 7)

AATATACTTTTCATCAATGTTCCCTTGCCATACACTGCCCAAACCAATGCTACAAGATTCAGAC
TCTGGCAACCTTATAATAACGGTAAGAAAGAAGAAATCTGGATTGTTGATGACTTCATTATCGATGGA
AATAATGTAAACAACCCTGTGATGCTCTTGGATACATTTGATTTTGGGCCAGAGAAGACAATTGGTT
TTTCTATCCTGGTGGTAACATCGGTCTTTATTGTCCATATTCTTCAAAGGGGGCACCTGAAGAAGATTC
AGCTATGGTGTTTGTTCAAATGAAGTTGGTGAGCATTCCATTACCACCCGTGACCTAAATGTGAATG
AGAACACCATCATACAATTTGAGATCAACGTTGGCTGTTGACT

Región 5-6 del asa de repetición de Reelina (SEQ ID No. 8)

AATGTGGGCAGGTACATTGCCCTGGAGATACCCTTGAAAGCCCGTTCTGGTTCTACTCGCCTT
CGCTGGTGGCAACCGTCTGAGAATGGGCACTTCTACAGCCCCTGGGTTATCGATCAGATTCTTATTGG
AGGAAATATTTCTGGTAATACGGTCTTGGGAAGATGATTTACAACCCTTGATAGTAGGAAATGGCTGC
TTCACCCAGGAGGCACCAAGATGCCCCTGTGTGGCTCTACTGGTGATGCCCTGGTCTTCATTGAAAA
GGCCAGCACCCGTTACGTGGTCAGCACAGACGTTGCCGTGAATGAGGATTCCTTCCTACAGATAGAC
TTCGCTGCCTCCTGCTCA

Estructura del gel de Reelina humana, recombinante, fragmento R3 conjugado al fragmento R6, es decir, fragmento de Reelina R3 + R6 (SEQ ID No. 9)

AAGCTTCCACC**ATGGAGCGCAGTGGCTGGGCCCCGACACTTTCCTCCTAGCGCTGTTGCT**
GGGGGCGACGCTGAGGGCGCGCGG**TT**CAGCAGTACTGCTCCAGTTCTTCTTCAGTACTCTCATGAT

GCTGGTATGTCCTGGTTTCTGGTGAAAGAAGGCTGTTACCCGGCTTCTGCAGGCAAAGGATGCGAAG
GAAACTCCAGAGAACTAAGTGAGCCCACCATGTATCACACAGGGGACTTTGAAGAATGGACAAGAA
TCACCATTGTTATTCCAAGGTCTCTTGCATCCAGCAAGACCAGATTCCGATGGATCCAGGAGAGCAGC
TCACAGAAAAACGTGCCTCCATTTGGTTTAGATGGAGTGTACATATCCGAGCCTTGTCCCAGTTACTG
CAGTGGCCATGGGGACTGCATTTACAGGAGTGTGTTTCTGTGACCTGGGATATACTGCTGCACAAGGA
ACCTGTGTGTCAAATGTCCCCAATCACAATGAGATGTTTCGATAGGTTTGAGGGGAAGCTCAGCCCTCT
GTGGTACAAGATAACAGGTGCCAGGTTGGAACCTGGCTGTGGAACACTTAACGATGGCAAATCTCTC
TACTTCAATGGCCCTGGGAAAAGGGAAGCCCGACGGTCCCTCTGGACACCAGGAATATCAGACTTG
TTCAATTTTATATACAAATTGGAAGCAAACTTCAGGCATTACCTGCATCAAACCAAGAACTAGAAAT
GAAGGGCTTATTGTTCAGTATTCAAATGACAATGGGATACTCTGGCATTGCTTCGAGAGTTGGACTT
CATGTCCTTCCTGGAACCACAGATCATTTCATTGACCTGCCACAGGACGCGAAGACACCTGCAACGG
CATTTCGATGGTGGCAACCGCAACATGGGAAGCATTACAGCCCAGTGGGCTTTGGATGATGTTCTTAT
AGGAATGAATGACAGCTCTCAAACCTGGATTTCAGACAAATTTGATGGCTCTATAACCTTGATAGTA
GGAAATGGCTGCTTCACCCAGGAGGCACCAAGATGCCCGTGTGTGGCTCTACTGGTGATGCCCTGGT
CTTCATTGAAAAGGCCAGCACCCGTTACGTGGTCAGCACAGACGTTGCCGTGAATGAGGATTCTTCC
TACAGATAGACTTCGCTGCCTCCTGCTCAGTCACAGACTCTTGTTATGCGATTGAATTGGAATACTCAG
TAGATCTTGGATTGTCATGGCACCCATTGGTAAGGGACTGTCTGCCTACCAATGTGGAATGCAGTCGC
TATCATCTGCAACGGATCCTGGTGTGAGACACTTTCAACAAGTGGACTAGAATCACTCTGCCTCTCCCT
CCTTATACCAGGTCCCAAGCCACTCGTTTCCGTTGGCATCAACCAGCTCCTTTTGACAAGCAGCAGACA
TGGGCAATAGATAATGTCTATATCGGGGATGGCTGCATAGACATGTGCAGTGGCCATGGGAGATGC
ATCCAGGGAAACTGCGTCTGTGATGAACAGTGGGGTGGCCTGTACTGTGATGACCCCGAGACCTCTC
TTCCAACCCAACTCAAAGACAACTTCAATCGAGCTCCATCCAGTCAGAACTGGCTGACTGTGAACGGA
GGGAAATTGAGTACAGTGTGTGGAGCCGTGGCGTCGGGAATGGCTCTCCATTTTCACTGGGGGTTGT
AGTCGATTATTAGTCACTGTGGATCTAAACCTCACTAATGCTGAGTTCATCCAATTTTACTTCATGTATG
GGTGCCTGATTACACCAAACAACCGTAACCAAGGTGTTCTCTTGAATATTCTGTCAATGGAGGCATT
ACCTGGAACCTGCTCATGGAGATTTTCTATGACCAGTACAGTGATTACAAGGATGACGACGATAAGT
GACTCGAG

Proteína de Reelina humana, recombinante, fragmento R3 conjugado al fragmento R6, es decir, el fragmento de la proteína de Reelina R3 + R6 (SEQ ID No. 10)

MERSGWARQTFLLALLLGATLRARAFSSTAPVLLQYSHDAGMSWFLVKEGCYPASAGKGCEGN
SRELSEPTMYHTGDFEEWTRITIVIPRSLASSKTRFRWQIQUSSQKNVPPFGLDGVYISEPCPSYCSGHGDCI
SGVCFCDLGYTAAQGTCSNVPNHNEMFDRFEGKLSPLWYKITGAQVGTGCGTLNDGKSLYFNGPGKRE
ARTVPLDTRNIRLVQFYIQIGSKTSGITCIKPRTRNEGLIVQYSNDNGILWHLLRELD FMSFLEPQIISIDL PQD
AKTPATAFRWWQPQHGHKSAQWALDDVLIGMNDSSQTGFQDKFDGSITLDSRKWLLHPGGTKMPVC
GSTGDALVFIEKASTRYVVSTDVAVNEDSFLQIDFAASCSVTDSYAIELEYSVDLGLSWHPLVRDCLPTNV
ECSRYHLQRILVSDTFNKWTRITLPLPPYTRSQATFRFRWHQPAPFDKQQTW AIDNVYIGDGCIDMCSGH
GRCIQGNVCDEQWGGLYCDDPETS LPTQLKDNFN RAPSSQNWLT VNGGKLSTVCGAVASGMALHFS

GGCSRLLVTVDLNLTAEFIQFYFMYGCLITPNNRNQGVLEYSVNGGITWNLLMEIFYDQYS

*Regiones de codificación coloreadas anteriormente en la secuencia de DNA, las regiones en blanco (sin modificaciones de la fuente tales como subrayado, aplicación de cursivas) no se tradujeron en la proteína.

Estructura del gen de Reelina humana, recombinante, fragmento R3 conjugado al fragmento R5, es decir, el fragmento de Reelina R3 + R5 (SEQ ID No. 11)

AAGCTTCCACCATGGAGCGCAGTGGCTGGGCCCGCAGACTTTCCTCCTAGCGCTGTTGCT
GGGGCGACGCTGAGGGCGCGCGGTTCAGCAGTACTGCTCCAGTTCTTCTTCAGTACTCTCATGAT
GCTGGTATGTCCTGGTTTCTGGTGAAAGAAGGCTGTTACCCGGCTTCTGCAGGCAAAGGATGCGAAG
GAAACTCCAGAGAACTAAGTGAGCCCACCATGTATCACACAGGGGACTTTGAAGAATGGACAAGAA
TCACCATTTGTTATTCCAAGGTCTCTTGCATCCAGCAAGACCAGATTCCGATGGATCCAGGAGAGCAGC
TCACAGAAAAACGTGCCTCCATTTGGTTTAGATGGAGTGTACATATCCGAGCCTTGTCCTCAGTTACTG
CAGTGGCCATGGGGACTGCATTCAGGAGTGTGTTTCTGTGACCTGGGATATACTGCTGCACAAGGA
ACCTGTGTGTCAAATGTCCCAATCACAATGAGATGTTTCGATAGGTTTGAGGGGAAGCTCAGCCCTCT
GTGGTACAAGATAACAGGTGCCAGGTTGGAAGTGGCTGTGGAACACTTAACGATGGCAAATCTCTC
TACTTCAATGGCCCTGGGAAAAGGGAAGCCCGGACGGTCCCTCTGGACACCAGGAATATCAGACTTG
TTCAATTTTATATACAAATTGGAAGCAAACTTCAGGCATTACCTGCATCAAACCAAGAACTAGAAAT
GAAGGGCTTATTGTTTCAGTATTCAAATGACAATGGGATACTCTGGCATTGCTTCGAGAGTTGGACTT
CATGTCCTTCCTGGAACCACAGATCATTTCCATTGACCTGCCACAGGACGCGAAGACACCTGCAACGG
CATTTTCGATGGTGGAACCGCAACATGGGAAGCATTAGCCAGTGGGCTTTGGATGATGTTCTTAT
AGGAATGAATGACAGCTCTCAAAGTGGATTTCAGACAAATTTGATGGCTCTATAGATGACAATTGGT
TTTTCTATCCTGGTGGAACATCGGTCTTTATTGTCCATATTCTTCAAAGGGGGCACCTGAAGAAGATT
CAGCTATGGTGTTTGTTCAAATGAAGTTGGTGAGCATTCCATTACCACCCGTGACCTAAATGTGAAT
GAGAACACCATCATACAATTTGAGATCAACGTTGGCTGTTTCGACTGATAGCTCATCCGCGGATCCAGT
GAGACTGGAATTTTCAAGGGACTTCGGGGCGACCTGGCACCTTCTGCTGCCCCTCTGCTACCACAGCA
GCAGCCACGTCAGCTCTTTATGCTCCACCGAGCACCACCCAGCAGCACCTACTACGCAGGAACCATG
CAGGGCTGGAGGAGGGAGGTCGTGCACCTTTGGGAAGCTGCACCTTTGTGGATCTGTCCGTTTCAGAT
GGTACCAGGGATTTTACCCTGCCGGCTCTCAGCCAGTGACATGGGCCATTGATAATGTCTACATCGGT
CCCCAGTGTGAGGAGATGTGTAATGGACAGGGGAGCTGTATCAATGGAACCAAATGTATATGTGAC
CCTGGCTACTCAGGTCCAACCTGTAAATAAGCACCAAAAATCCTGATTTTCTCAAAGATGATTTCGA
AGGTCAGCTAGAATCTGATAGATTCTTATTAATGAGTGGTGGGAAACCATCTCGAAAGTGTGGAATC
CTTTCTAGTGGAACAACCTCTTTTTCAATGAAGATGGCTTGCGCATGTTGATGACACGAGACCTGGA
TTTATCACATGCTAGATTTGTGCAGTTCTTCATGAGACTGGGATGTGGTAAAGGCGTTCCTGACCCCA
GGAGTCAACCCGTGCTCCTACAGTATTCTCTCAACGGTGGCCTCTCGTGGAGTCTTCTTCAGGAGTTC
CTTTTCAGCAATTCCAGCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAAGTCTGAG

Proteína de Reelina humana, recombinante, fragmento R3 conjugado al fragmento R5, es decir, fragmento de la proteína de Reelina R3 + R5 (SEQ ID No. 12)

MERSGWARQTFLLALLLGATLRARAFSSTAPVLLQYSHDAGMSWFLVKEGCYPASAGKGCEGN
SRELSEPTMYHTGDFEEWTRITIVIPRSLASSKTRFRWIQESSQKNVPPFGLDGVYISEPCPSYCSGHGDCI
SGVCFCDLGYTAAQGTCVSNPNHNEMFDRFEGKLSPLWYKITGAQVGTGCGTLNDGKSLYFNGPGKRE
ARTVPLDTRNIRLVQFYIQIGSKTSGITCIKPRTRNEGLIVQYSNDNGILWHLLRELD FMSFLEPQIISIDL PQD

AKTPATAFRWWQPQHGKHSAQWALDDVLIGMNDSSQTGFQDKFDGSIDDNWFFYPGGNIGLYCPYSS
KGAPEEDSAMVSVNEVGEHSITTRDLNVNENTIIQFEINVCSTDSSSADPVRLEFSRDFGATWHLLLPLC
YHSSSHVSSLCSTEHPSTYYAGTMQGWRRREVVFHFGKLHLCGSVRFRWYQGFYPAGSQPVTWIDNV
YIGPQCEEMCNGQGSCINGTKCICDPGYSGPTCKISTKNPDFLKDDFEGQLESDRFLMSGGKPSRKCGILS
SGNNLFFNEDGLRMLMTRDLDSLHARFVQFFMRLGCGKGVDPQRSQPVLLQYSLNGGLSWSLQEFLLFS
NSS

*Regiones de codificación coloreadas anteriormente en la secuencia de ADN, regiones en blanco (sin modificaciones de la fuente tales como subrayado, aplicación de cursivas) no se tradujeron en la proteína.

Ejemplo 2

Se aislaron las regiones de repetición provenientes de Reelina, como se observa en el Ejemplo 1. La región R3 se extirpó para proporcionar extremos adherentes del ADN. El gen de Reelina se incubó con EcoRI y BatXI, y dio por resultado en la extirpación de un segmento de aproximadamente 6300 pb. El fragmento R3 extirpado luego se insertó en un vector viral AAV-9 o AAV-5. El vector viral se segmentó después del promotor de CMV, si el vector posee el promotor de CMV, tal como pMDLg/PPRE o pAD3000. Sin embargo, cuando el promotor de CMV no esté colocado en el vector en el momento de la transfección, tal como con pAdEasy-1, el promotor se agregó con el fragmento de Reelina. Se formó una estructura con los extremos complementarios para EcoRI y BatXI, con la estructura que contuvo el fragmento de Reelina y el promotor del CMV. La estructura se incubó con el vector en una enzima, tal como una ligasa, formando un nuevo vector que contuvo el fragmento de Reelina y el promotor de CMV. El vector se insertó en las células para la generación de virus que contengan los fragmentos Reelina.

Mientras que el ejemplo anterior analizó la R3 de Reelina, el método se utilizó para otras variantes de Reelina entre las que se incluyen el fragmento R3-5, el fragmento R3+5, y el fragmento R3+6, descritos en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Como se describió en el Ejemplo 1, se formaron fragmentos de Reelina. Las diferentes variaciones de Reelina, entre las que se incluyen los fragmentos R3-R6, R3+R5, y R3+R6, se examinaron utilizando ApoER2 como un reportero en un ensayo de luciferasa. Sin embargo, otras variantes de empalme alternativas, tales como R2 (NR2), R6 (NR6), R3-C y R7-C también se consideraron aspectos útiles de la invención.

Los ensayos de luciferasa se realizaron para determinar el receptor ApoER2 que se agrupa vía un aumento de la emisión de luz con los receptores que se agrupan, mostrados en la figura 6. El sustrato de luciferasa se disolvió en tampón de luciferasa (1:1) y la luciferasa N-terminal se conjugó a un primer conjunto de proteínas de las receptoras ApoER2 y la luciferasa C-terminal conjugada a un segundo conjunto de proteínas del receptor ApoER2. El

ApoER2 conjugado para luciferasa se agregó a cada placa de ensayo en proporciones 1:1 (es decir, 50 μ l de luciferasa C-terminal hasta 50 μ l de luciferasa N-terminal). Diferentes variaciones de Reelina humana, véanse en las figuras 3, 7, 8 y 9, se examinaron utilizando ApoER2 como un reportero. Después de la adición de 5 nM de la Reelina de prueba, la mezcla se agitó vigorosamente durante 10 min y se detecta generación de luz.

Todos los fragmentos de Reelina de ratón, excepto R5-6, dieron por resultado en un aumento de 2 veces hasta 4 veces en la emisión de luz, como se observa en la figura 10. El uso de los fragmentos de Reelina humana aumentaron la señal de emisión, con un máximo que muestra un aumento de 2.5 veces hasta 3 con respecto al control, como se observa en la figura 11. Además, la actividad de la mayoría de los fragmentos de Reelina humana fue comparable con la mayoría de Reelina efectiva a partir de la figura 10, como R3-5 humana, R3-4 humana, y R3+R6 humana que exhibieron una actividad de luciferasa que fue aproximadamente la misma o superior de R3-6. R3+R5 humana exhibieron aproximadamente el 50% de actividad de R3-6, o fue comparable con R3+R6, R3+R5 y R4+R6, véase en la figura 10. Como se observa en la figura 12, los fragmentos de ratón y humanos fueron ambos efectivos para inducir el agrupamiento de receptores como resulta evidente por el aumento en la señalización de luciferasa.

Ejemplo 4

Los efectos de la señalización y procesamiento de células con Reelina se analizaron al probar la activación del receptor ApoER. Un trabajo reciente ha resaltado la importancia de la señalización de Reelina en el aprendizaje normal en la memoria (Weeber, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002, 277:39944-39952), así como los casos patológicos donde se perturba esta señalización. Por ejemplo, los receptores de lipoproteínas tienen una función en los procesos cognitivos y esta familia de receptores está implicada en los procesos patológicos que sirven de base en el progreso de la enfermedad de Alzheimer (AD). Dos de los ligandos principales para estos receptores, apoE y Reelina, parecen tener capacidades de señalización que pueden impactar significativamente la función sináptica. APC actualmente es un modulador candidato de la señalización de Reelina, ya que parece tener las porciones estructurales para unirse a ApoER2 y activar los efectores en la dirección 3'. Es de inmensa relevancia científica y clínica que la modulación APC de la señalización de Reelina que será probada, ya que podría proporcionar posibilidades terapéuticas novedosas.

Se analizaron los efectos de la Reelina de la activación del receptor ApoER y los procedimientos de señalización. Un cultivo neuronal primario se produjo a partir de ratones embrionarios de 17 días y se dejó crecer en medio Neurobasal sin suero (Gibco BRL) suplementado con B27 (Gibco BRL) y L-glutamina a 37°C en CO₂ al 5%. Se dejó que las células maduraran en cultivos durante 8 días. Los cultivos se trataron con 200 μ M de un fragmento

de Reelina purificada que representa las repeticiones 3-6 (R3-6). Las células se lisaron en los momentos específicos (0, 10, 30, 60, 120 ó 240 minutos) después del tratamiento con Reelina. La transferencia Western para la expresión de ApoER2 total, AKT, la fosforilación de AKT, la quinasa regulada extracelular (ERK) fosforilada y la quinasa regulada extracelular (ERK) total se determinó y se estandarizó para no tratamiento (tiempo 0). El estado de fosforilación de la ERK es una detección directa de la actividad de la ERK y representa la activación del procedimiento de señalización en la dirección 5'.

Una transferencia Western representativa, observada en la figura 13(A) muestra una expresión de ApoER2 relativamente estable. Cuando se normalizó a actina, la expresión de ApoER2 se encontró que cae durante los primeros 30 minutos después de la exposición a Reelina, seguida por la estabilización de los niveles de expresión, como se observa en la figura 13(B). Los niveles de AKT disminuyeron durante 60 minutos después de la exposición a Reelina, mientras que aumentó la AKT fosforilada, como se observa en la figura 13(A). La normalización de AKT y pAKT a actina reflejó las tendencias de la transferencia, con los niveles de AKT que disminuyeron durante 60 minutos después de la exposición a la Reelina, seguida por un aumento de regreso a los niveles preexposición, como se observa en la figura 13(D). La AKT fosforilada aumentó dramáticamente a través de los 60 minutos después de la exposición, luego, disminuyó rápidamente a los niveles previos de exposición, como se observa en la figura 13(C). La ERK total pareció consistente a través del experimento, mientras que la ERK fosforilada 1 y 2 se observó a los 10 minutos y 240 minutos después de la exposición a Reelina, como se observa en la figura 13(A). La normalización de ERK y pERK1/2 a actina coincidió con las tendencias de la transferencia, mostrando una fuerte fosforilación a los 10 minutos después de la exposición a Reelina con un aumento ligero secundario a los 240 minutos después de la Reelina, como se observa en la figura 13(E) y 13(F). se encontró que la proporción de pERK a ERK total fue al máximo a los 10 minutos después de la Reelina, lo cual luego disminuyó lentamente a través de 120 minutos después de la Reelina, y un aumento ligero después de esto, como se observa en la figura 13(G).

Para confirmar que los resultados no fueron específicos para el fragmento de Reelina utilizado (R-3-6), el experimento de cultivo neuronal primario se repitió con otros fragmentos de Reelina, como se observa en la figura 14(A). Los cultivos neuronales primarios se trataron con 200 μ M de fragmentos de Reelina purificada representando la secuencia en humanos de repeticiones de Reelina R3 y R5 (hR3+5), repeticiones en humanos R3 y R6 (hR3+6) repeticiones de Reelina en ratones R3 hasta 6 (R3-6) N-terminal en ratón hasta la repetición R2 (NR2) y Reelina de longitud total que consistió de la secuencia de longitud total y todos los fragmentos de origen natural (FR). El control (ctrl) consistió de células no tratadas. La Reelina se incubó sobre las células durante 60 minutos. Las células se lisaron y se realizaron transferencias Western como se describió anteriormente para la ERK total y la ERK fosforilada.

Una transferencia Western representativa, observada en la figura 14(A) mostró que el tratamiento con Reelina no tuvo un efecto visible sobre los niveles totales de ERK. De hecho, normaliza los resultados a actina mostró que los fragmentos recombinantes de Reelina humana (hR3+5 y hR3+6) dio por resultado en una ligero caída en los niveles totales de ERK, como fue con la Reelina de longitud total, como se observa en la figura 14(C), mientras que el fragmento de ratón (R3-6 y NR2) tuvo un ligero aumento en la ERK total. Sin embargo, los fragmentos recombinantes de Reelina humana (hR3+5 y hR3+6) dieron por resultado en fuertes aumentos en la ERK1/2 fosforilada, similares al tratamiento con Reelina de longitud total, como se observa en la figura 14(B). El fragmento de Reelina de ratón formado de las repeticiones 3-6 (R3-6) mostró un ligero aumento en la ERK fosforilada, que se superpone con el control. Al contrario, el fragmento N-terminal de ratón (NR2) mostró una caída en la ERK fosforilada. Compara los niveles de la ERK fosforilada a la ERK total mostró que el fragmento de ratón R3-6 que mostró fosforilación fue aproximadamente el equivalente a la ERK total (1.15 para R3-6), lo cual se conforma a los resultados observados en la figura 13(G). Los cultivos control con tratamiento simulado tuvo una proporción de 1.09. El fragmento N-terminal de ratón no activó la fosforilación de ERK, ya que los niveles fueron de aproximadamente el 50% del control (0.53). Los fragmentos de Reelina humana (R3+5 y R3+6) dieron por resultado en la fosforilación de ERK (2.22 y 2, respectivamente), lo cual fue similar a la Reelina de longitud total (2.5). Estos resultados muestran que los fragmentos de Reelina humana exhiben efectos más fuertes sobre la señalización de ApoER2 de los fragmentos de ratón, y probablemente serán más eficaces en los tratamientos.

Ejemplo 5

Se realizaron los efectos de la Reelina sobre las vías celulares mediante la prueba para las modificaciones de la proteína de la vía de Reelina. Los cambios en el complemento del fragmento de Reelina parecen estar correlacionados con las alteraciones en la señalización de Reelina en la dirección 3', como se indica por la fosforilación del componente en la dirección 3' principal, Dab-1.

La fosforilación de DAB-1 se analizó utilizando un reportero de DAB-1 conjugado con VLDLR y ApoEr. El cultivo neuronal primario se preparó a partir de ratones embrionarios en el día 17 como se analizó anteriormente. Se dejó que las células maduraran en cultivo durante 8 días. Las placas (96 pocillos, 24 pocillos) se recubrieron con 0.1 mg/ml (0.01%) de solución de poli-L-lisina (diluida a partir de 1 mg/ml) con 50 µL o 100 µl de poli-L-lisina agregada a cada pocillo. El pocillo o los pocillos se incubaron 37°C durante un mínimo de 1 hora y la solución se retiró mediante aspiración al vacío u otros medios. Los pocillos se lavaron con 150 µl de agua. Las células se suspendieron 1:10 en medio de alta glucosa y se agregaron a placas hasta una confluencia de 80-90% (durante 20-24 horas).

Opti M (s/c suero aka no completo) y medio completo de alta glucosa se calentaron a

37°C. Se agregó Opti-M (500 µl) a cada uno de los dos tubos Eppendorf. Se agregó ADN (20 µl) al primero de los dos tubos Eppendorf y se agregó lipofectamina (20 µl) al segundo tubo Eppendorf. El contenido de cada tubo se mezcló y las dos soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El ADN para las dos proteínas de fusión ApoER2 y la lipofectamina se mezcló conjuntamente y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla de transfección se agregó a 10 µl por cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contuvo las células y la mezcla incubada.

Después de 48 horas, se midió la actividad de luciferasa. El fragmento de Reelina R3-6 se sometió a ebullición a 100°C durante 10 min para servir como un control. El sustrato de luciferasa se disolvió en tampón de luciferasa (1:1) y se agregó luciferasa a cada placa transfectada en proporciones de 1:1 (es decir, 50 µL de luciferasa a 50 µL de solución de transfección). La mezcla se agitó vigorosamente durante 10 min y se detectó la generación de luz.

Con la unión de Reelina, el tratamiento con Reelina de longitud total dio por resultado en efectos reproducibles sobre Dab-1, con poca alteración en el estado de fosforilación como se observa en las figuras 15 y 16. Por el contrario, en contacto con los cortes hipocámpicos con el fragmento R3-6 mostró un efecto dependiente del tiempo sobre la fosforilación de Dab-1, como se observa en las figuras 17 y 18. Los monocitos tratados con APC demostraron niveles activos aumentados de Dab1 (Tyr220-p), Akt Ser473-p, y GSK3β Ser9-p. el pre-tratamiento con RAP o el desmontaje de ApoER2 se encontró que atenúa estos efectos, mientras que los inhibidores de EPCR y PAR1 no tuvieron efecto. De manera interesante, se encontró que APC se unen a ApoER2 con 30 nM de afinidad, pero no a VLDLR soluble. Para relacionar los efectos de APC para la señalización de ApoER2, se encontró que la proteína receptor asociada (RAP) bloquea la inhibición mediada por APC de la actividad pro-coagulante del factor de tejidos inducido por endotoxina de las células U937.

Se ha descubierto recientemente que las moléculas de Reelina forman complejos de orden superior *in vitro* e *in vivo*, tales como Fc-RAP. Esta observación se definió adicionalmente, al mostrar que la Reelina se secreta *in vivo* como un homodímero enlazado a disulfuro. La supresión de una región corta, denominada el epítipo CR-50, ubicada en el término N de la molécula anula la oligomerización. Esta Reelina mutada fracasa en inducir eficientemente la fosforilación de Dab1 en neuronas primarias de ratón. Similarmente, el anticuerpo contra el epítipo CR-50 antagoniza con la función de Reelina *in vitro* e *in vivo*.

La RAP es una proteína intracelular que se puede unir con muy alta afinidad a la familia de receptores de lipoproteínas. La proteína de fusión Fc-RAP es una proteína diseñada por ingeniería consiste de dos moléculas de RAP conectadas para formar una configuración de “campana muda” en bruto utilizando la región Fc de un anticuerpo. En lugar de la unión y la inhibir a ApoER2 y VLDLR, la Fc-RAP puede provocar el agrupamiento de receptores y la

activación de ApoER2. La adición de Fc-RAP tiene el efecto idéntico de la aplicación de Reelina al aumentar la inducción de LTP, como se observa en la figura 19. La diferencia principal es que la Fc-RAP probablemente se unirá a todos los receptores de lipoproteína, pero únicamente a los agrupamientos de ApoER2 y VLDLR.

El agrupamiento de ApoER2 y/o VLDLR induce la fosforilación de Dab1 y los casos de la dirección 3' que incluyen la activación de las SFK y la modulación de PKB/Akt. Además, la modulación de la potenciación a largo plazo (LTP), uno de los efectos biológicos de la Reelina, también se imita por el agrupamiento del receptor independiente de Reelina. Estos hallazgos sugieren en gran medida que la dimerización u oligomerización inducida por receptores es suficiente para la fosforilación de la tirosina Dab1 y los casos de señalización en la dirección 3' sin la necesidad de un co-receptor adicional que proporcione una actividad de la tirosina quinasa. Sin estar unidos a ninguna teoría específica, esto sugiere que el potencial terapéutico de los fragmentos de Reelina es a través de la dimerización de receptores adecuados y la señalización en la dirección 3'.

Ejemplo 6

La Reelina tiene la capacidad de potenciar las respuestas glutamatérgicas de CA1. En neuronas hipocámpicas cultivadas, se requiere la señalización de Reelina para el desarrollo normal de estructuras dendríticas. En ausencia de Reelina o la proteína Dab1 adaptadora intracelular, las neuronas exhiben un crecimiento dendrítico atrofiado y una reducción en las ramificaciones dendríticas, un fenotipo análogo al que se observa en las neuronas que carecen de los receptores de Reelina ApoER2 y VLDLR (Niu, et al., Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron*. 2004; 41:71-84). El HRM exhibe un déficit en el aprendizaje acondicionado por miedo contextual dependiente del hipocampo y la plasticidad sináptica en el área CA1 del hipocampo. Se cree que estos fenotipos del comportamiento y fisiológicos del HRM son debidos en parte a una conectividad sináptica reducida o inhibida. Esto se apoya por la observación de que los HRM tienen una reducción en la densidad de las espinas.

Los cultivos neuronales hipocámpicos y corticales mezclados se obtuvieron a partir de embriones de ratones embrionarios en los días (E) 18-19. Las células se colocaron en placas a densidad alta (~ 750 células mm^{-2}), y crecieron en medio Neurobasal (Gibco BRL) suplementado con B27 (Gibco BRL). Las células se sub-cultivaron cuando la confluencia llegó al 80%.

ApoER2 está presente pos-sinápticamente y forma un complejo funcional con NMDAR en CA1. La derivación de mEPSC-NMDA se ilustra en las figuras 20(A), 20(B) y 21(A), 21(B), 21(C) y 21(D). Las células tratadas con simulador tuvieron una corriente pos-sináptica excitatoria en miniatura debido a que los receptores de NMDA (mEPSC_{NMDA}) no se cambiaron significativamente en comparación con el mismo antes del tratamiento simulado ($p > 0.05$). Se

encontró que el tratamiento con Reelina aumenta significativamente la amplitud de mEPSCNMDA ($p < 0.001$).

Para verificar adicionalmente que la respuesta de NMDAR sináptica se aumentó como resultado de los efectos pos-sinápticos de la Reelina, se analizó el coeficiente de variación (CV) de la corriente de células enteras de NMDAR evocadas sinápticamente. Cuando se graficaron las proporciones $1/CV^2$ contra las proporciones medias de EPSC_{NMDA} antes y después de una aplicación de Reelina por 30 minutos en nueve experimentos, no se estableció ninguna correlación, véase en las figuras 21(C) y 21(D). Sin embargo, las proporciones $1/CV^2$ permanecieron relativamente sin cambio a través de las proporciones medias de las de variación EPSC_{NMDA}, confirmando la activación de Reelina través de un mecanismo pos-sináptico en CA1 para mejorar la actividad de NMDAR.

El tratamiento crónico con Reelina puede aumentar el componente AMPA de la respuesta sináptica, alterando la cinética de EPSC_{NMDA} y la sensibilidad a ifenprodilo. Se probó el efecto de la Reelina en CA1 sobre los niveles de expresión de las subunidades AMPAR y NMDAR. Los niveles tanto totales como superficiales de GluR1, NR1, NR2A, y NR2B se soldaron mediante transferencia Western. GluR1, una subunidad AMPAR que se expresa cada vez más durante la maduración del desarrollo y sometida a tráfico regulado durante la plasticidad sináptica, se analizó sobre las superficies de células CA1.

Las figuras 22(A), 22(B) y 22(C) muestra que el tratamiento con Reelina aumentó significativamente los niveles de GluR1 superficial en comparación con grupos tratados simulados, indicando que la expresión regulada y la inserción superficial vía mEPSC_{AMPA} aumentado y la proporción de corriente AMPA/NMDA después de un tratamiento crónico con Reelina. No se observaron cambios de los niveles de NR1 ya sea superficiales o totales. En comparación, los niveles de expresión de NR2A tanto totales como superficiales se aumentaron significativamente después del tratamiento con Reelina versus el tratamiento simulado. Además, los niveles de la proteína NR2B tanto totales como superficiales disminuyeron significativamente después del tratamiento con Reelina. El tratamiento simulado no tuvo efecto sobre los diferentes niveles subunitarios del receptor de glutamato en comparación con los grupos control no tratados.

Se analizaron los efectos de la Reelina sobre dendritas hipocámpicas. Las células hipocámpicas se cultivaron a partir de embriones de HMR y se crearon a partir del tipo silvestre de 6-7 días de edad, HRM y ratones deficientes de Reelina y tratados con 5 nM de Reelina durante 21 días. El tratamiento de cultivos organotípicos consistió de una aplicación repetida de Reelina 5 nM cada 3 días durante 21 días o medios de células HEK no transfectadas. Las células se cultivaron como se describió anteriormente y se inyectó un tinte fluorescente en las células neuronales mediante la administración una corriente con pinza de parche de células completas y las células se visualizaron bajo el microscopio confocal después

de la fijación.

Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones que cubren la superficie de las dendritas y portan las estructuras pos-sinápticas que forman las sinapsis excitatorias. Configuraciones anormales o números reducidos de espinas dendríticas se encuentran en una serie de enfermedades cognitivas. Una reducción en el número de espinas dendríticas sugiere que un nivel constitutivo de señalización mediada por receptores de Reelina/lipoproteína se retire para el desarrollo de estructuras dendríticas, lo cual es decisivo para un procesamiento intensivo de información mediante las neuronas. Este concepto está de acuerdo con los estudios que muestran que los ratones aspadores heterocigotos (HRM) exhiben densidades reducidas de las espinas dendríticas y desempeño perjudicado en ciertos comportamientos de aprendizaje y memoria.

Las neuronas hipocámpicas cultivadas tuvieron espinas dendríticas significativamente menores, un fenotipo que se puede rescatar mediante la adición de Reelina recombinante exógena al cultivo. Las células de HRM tratadas con Reelina mostró un aumento en la densidad de las espinas dendríticas después de 21 días en comparación con neuronas que coincidieron en la edad provenientes de un cultivo tipo silvestre, como se observa en la figura 23(B). Por el contrario, la aplicación simulada (medios acondicionados a partir de células no transfectadas establemente) no mostró cambio en la densidad de espinas, como se observa en la figura 23(C). El mismo experimento en ratones anestesiados con Reelina mostró que la aplicación de Reelina también rescató la densidad de las espinas dendríticas en comparación con los controles simulados, como se observa en las figuras 23(C) y 23(F). Ambas células tratadas con Reelina se asemejan a la morfología de las espinas dendríticas observada en células WT, como se observa en la figura 23(D), y cuando se cuantificaron, las espinas dendríticas aumentaron significativamente en los cultivos de HRM tratados con Reelina en comparación con los controles tratados con simulado y fueron similares a los niveles de densidad de las espinas observados en cultivos tipo silvestre, como se observa en la figura 24(A).

Para verificar que este protocolo de aplicación representó una aplicación crónica de Reelina, y la Reelina no se degradará o se eliminará activamente de los medios, los inventores retiraron 15 µl de los medios provenientes de las placas de cultivo en los momentos 0, 6, 12, 24, 48, 72, y 96 horas después de la aplicación Reelina. Los análisis de transferencia Western de estas alícuotas no mostraron degradación o reducción en la Reelina, como se observa en la figura 25. De esta forma, el aumento en la densidad de las espinas es debido a la Reelina presente en los niveles fisiológicos relevantes para la aplicación total de 21 días.

Ejemplo 7

Los receptores de lipoproteínas tienen una función en los procesos cognitivos y está en la familia de receptores implicada en los procesos patológicos. Dos de los principales

ligandos para estos receptores, apoE y Reelina, parecen tener capacidades de señalización que pueden impactar significativamente la función sináptica. Los heterocigotos con Reelina muestran déficit en la función sináptica tanto de plasticidad como cognitiva. Reducción de aproximadamente el 50% de la expresión de Reelina da por resultado en déficit en la función sináptica tanto de plasticidad como cognitiva (Qiu, et al., Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in Reelin haploinsufficient mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 85:228-242). Un trabajo reciente ha resaltado la importancia de la señalización de Reelina en el aprendizaje normal y la memoria (Weeber, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002, 277:39944-39952), así como los casos patológicos donde se perturba esta señalización. El APC actualmente es un modulador candidato de la señalización de Reelina, ya que parece tener las porciones estructurales para unirse a ApoER2 y activar los efectores en la dirección 3'.

Para confirmar los efectos de aprendizaje y cognitivos de la Reelina, se infundieron bilateralmente ratones con la RAP (proteína asociada a receptor) antagonista de la lipoproteína, que bloquea efectivamente la unión de Reelina a sus receptores.

Ratones C57BL/6 de diez semanas de edad (n = 55, machos) se alojaron bajo condiciones normales (20°C, 50% de humedad relativa, y un ciclo de luz/oscuridad de 12-h) y se permitió la administración de agua y alimento *ad libitum*. Después de la normalización al ambiente, los ratones se separaron en grupos, tratamiento falso (sin inyección) sin choque, inyección de RAP con choque, tratamiento falso (sin inyección) con choque, y tratamiento con Reelina con choque. Los animales tratados con Reelina consistieron de una inyección de 2 µl con la proteína de Reelina purificada, recombinante de longitud total, a una concentración de 5 nM. 3 horas después del tratamiento, se realizó un acondicionamiento de temor contextual. Se tomaron las precauciones necesarias para reducir el dolor y el sufrimiento de los animales a todo lo largo del estudio. Todos los estudios se realizaron por personal sin conocimiento de la condición del tratamiento. En el momento del tratamiento, los ratones tuvieron un peso de 12-45 g.

Para una inyección bilateral, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se colocaron sobre un aparato para cirugía estereotáxica (Stoelting Co.). Se realizó una incisión sagital en la mitad del cráneo, y la piel se impulsó suavemente de regreso para agrandar la abertura. Se perforaron dos orificios a través del cráneo para permitir el paso de una aguja Hamilton a través del cerebro, en los ventrículos (AP-0.35 mm, L ± 0.75 mm, y V-2.5 mm a partir del bregma). Los ratones se inyectaron bilateralmente con 0.5 µl de control simulado o Reelina para proporcionar una concentración hemisférica total de 5 nm de Reelina a una velocidad de 1 µl/min, como se estableció anteriormente (Weeber, et al., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:39944–39952; Rogers, et al., Reelin supplementation recovers sensorimotor gating,

synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J. Psychopharmacol.* 2013; 27:389–395). La aguja luego se retiró, los orificios se sellaron con cemento dental, y se suturaron las incisiones. Los ratones se observaron posoperatoriamente durante 2 h en jaulas individuales sobre una almohadilla de calentamiento tibial. Se midió la temperatura rectal diariamente para monitorear las respuestas inflamatorias o infecciosas; cualquier ratón con una temperatura de 37.78°C (100.5°F) o mayor se sacrificó vía inhalación con CO₂. Se dejó que los animales se recuperaran durante 5 días. Se mostró anteriormente que el curso de tiempo es óptimo para una inyección pos-intraventricular para examen de comportamiento (Rogers, et al., Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learn. Memory.* 2011; 18:558–564; Rogers, et al., Reelin supplementation recovers sensorimotor gating, synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J. Psychopharmacol.* 2013; 27:389–395).

En entrenamiento para acondicionamiento de temor se condujo en una cámara para atenuación de sonidos cuadrada (25 x 25 cm) con un piso de rejilla de alambre. En el entrenamiento, los ratones se colocaron en la cámara con el ruido blanco antecedente y se dejaron explorar durante 3 min antes de que se presentara el estímulo acondicionado (tono de 90 dB) durante 30 s. A los 28 s, el estímulo no acondicionado [un choque leve en las patas (0.5 mA)] se administró durante un total de 2 s. Después de un período de 90 s, se condujo un segundo pareamiento de estímulo acondicionado/estímulo no acondicionado, seguido por otro período de 90 s, durante un total de 7 min. El acondicionamiento de temor contextual se condujo 24 h después del entrenamiento en la misma cámara, sin ningún tono, durante 3 min, y se evaluó la inmovilización.

El acondicionamiento al temor complementado se condujo después del ensayo contextual, en el cual la cámara se alteró mediante aroma, iluminación y textura del piso. Los ratones se colocaron en la cámara alterada y se les administró una fase de habituación de 3 min (sin tono) seguida por el estímulo acondicionado de 90 dB (tono) durante los últimos 3 min para la prueba. El comportamiento se monitoreó vía el software ANY-Maze (Stoelting Co.). La inmovilización se evaluó como la inmovilidad durante al menos 2 s.

Los ratones tratados en falso que no recibieron choque de entrenamiento exhibieron muy poca inmovilización, con sólo aproximadamente el 15% de inmovilización de los ratones con la audición del tono. Para los ratones sin inyecciones, pero que recibieron entrenamiento por choque, aproximadamente el 70% se inmovilizaron con la audición del tono, que se superó únicamente por los ratones tratados con Reelina, que exhibieron una tasa de inmovilización del 90%, como se observa en la figura 26(A). En comparación, la administración de RAP, que inhibe la unión del receptor de Reelina, redujo la respuesta al tono únicamente al 45%, aunque los ratones se entrenaron por choque. El análisis mostró que hubo una diferencia significativa en la respuesta entre los ratones no tratados, pero entrenados por

choque y los ratones tratados con RAP.

Los ratones también se expusieron a una prueba de laberinto Water.

El laberinto Water con plataforma escondida se utilizó para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria. Una plataforma de 10 cm de diámetro se sumergió justo por debajo de la superficie en una piscina de 1.2 m de diámetro sin agua opaca, suficientemente profunda para que los ratones no pudieran tocar el fondo. Se colocaron alrededor de la sala grandes señales visuales. Los ratones se colocaron en la piscina y se permitió que nadaran durante un máximo de 60 s para que encontraran la plataforma. El entrenamiento consistió de cinco días de entrenamiento con cuatro ensayos al día, separadas por un intervalo entre ensayos de 15 min. En los días seis y ocho, la plataforma se retiró y se utilizó el software de video-rastreo ANY-Maze (Stoelting Co.) para rastrear cada patrón de nado de ratón durante 60 s (ensayos con sonda).

Una inyección única de Reelina en los ventrículos mejoró el aprendizaje espacial en el laberinto Water con plataforma escondida, como se observa en la figura 26(B). Los ratones que se volvieron a entrenar para encontrar una ubicación diferente de la plataforma (opuesta) en el día 6 continuaron mostrando una capacidad aumentada de aprendizaje en comparación con los ratones inyectados con solución salina. Los ratones que recibieron una sola inyección de Reelina 5 días antes del entrenamiento mostraron una menor latencia para encontrar la plataforma en el día uno. La latencia para encontrar la plataforma se redujo significativamente después de una sola exposición al paradigma de entrenamiento, como se observa en la figura 26(C). Los ratones que se volvieron a entrenar para encontrar una ubicación diferente de la plataforma continuaron mostrando diferencias entre las inyecciones de Reelina y solución salina. Las velocidades de nado y otras mediciones de actividad entre los animales tratados y no tratados permanecieron iguales. Estos datos ilustran dramáticamente la capacidad de la Reelina para modular el aprendizaje y la formación de memoria *in vivo* y la importancia de la investigación destinada a identificar los mecanismos que controlan el procesamiento de las proteínas de Reelina y la forma en que los fragmentos modulan posteriormente la función cognitiva.

Las pruebas funcionales mostraron que los menores niveles de Reelina dieron por resultado en un aprendizaje asociativo reducido. El efecto de la deficiencia de Reelina sobre la función sináptica se compensa cuando se mejoran las concentraciones de Reelina. La infusión directa del ventrículo bilateral del fragmento recombinante de Reelina se complementa 3 horas antes del entrenamiento de acondicionamiento al temor asociativo con la formación mejorada de memoria cuando se probó 24 horas después del entrenamiento en ratones tipo silvestre de 3-4 meses de edad, como se observa en las figuras 26(A), 26(B) y 26(C). Estos resultados demuestran un requerimiento de Reelina para la formación normal de memoria y el surgimiento a la cuestión interesante de si el aumento de señalización de Reelina puede

mejorar la memoria.

Luego se analizó el efecto del condicionamiento al temor contextual sobre los niveles de Reelina. Los ratones tipo silvestre se entrenaron con un protocolo de acondicionamiento al temor contextual (CFC), de 3 choques como se analizó anteriormente. Se utilizaron ratones sin choque (CS) como un control negativo y los ratones expuestos al contexto, de control negativo y con choques (CS/US) tuvieron su hipocampo retirado a los 1, 5, 15, 30, y 180 minutos después del entrenamiento, así como a las 18 horas después del entrenamiento (n = 4, punto de tiempo), y los homogenados del hipocampo se analizaron utilizando anti-Reelina (G10).

El aprendizaje acondicionado al temor produce un cambio dramático en la expresión de Reelina y el complemento fragmentario durante las 18 horas después del acondicionamiento al temor contextual, en particular en los fragmentos de 450 y 180 kDa, como se observa en las figuras 27(A) y 27(B). Además, la estimulación por ráfagas theta suministrada a la vía colateral Schaffer condujo a aumentos significativos en la expresión de Reelina y la segmentación de fragmentos a los 15 minutos después de la estimulación, como se observa en la figura 27(A) y 27(B). Estos resultados muestran que la integración y control de la señalización de Reelina responsable de las alteraciones en la plasticidad sináptica y la modulación del aprendizaje y la memoria implica el procesamiento de la Reelina en fragmentos funcionalmente distintos.

Ejemplo 8

La señalización de Reelina está implicada en una variedad de cambios fisiológicos para la sinapsis excitatoria, así como la función cognitiva normal en mamíferos. Un trabajo reciente ha resaltado la importancia de la señalización de Reelina en el aprendizaje normal y la memoria (Weeber, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002, 277:39944-39952), así como los casos patológicos en donde se perturba esta señalización. El APC actualmente es un modulador candidato de la señalización de Reelina, ya que parece tener las porciones estructurales para unirse a ApoER2 y activar los efectores en la dirección 3'.

Los receptores de lipoproteínas tienen una función en los procesos cognitivos y esta familia de receptores está implicada en los procesos patológicos que sirven de base en el progreso de la enfermedad de Alzheimer (AD). Dos de los principales ligandos para estos receptores, apoE y Reelina, parecen tener capacidades de señalización que pueden impactar significativamente en la función sináptica, interactuar directamente con la APP y modulan su metabolismo, y son sensibles a la acumulación de A β . La acumulación de A β interrumpe la señalización del receptor de lipoproteína, dando por resultado en la interrupción concomitante de la función cognitiva. Además, la interferencia de señalización del receptor Reelina y/o lipoproteína da por resultado en un metabolismo aberrante de la APP y un

intercambio de A β que a su vez empeora la acumulación de A β y la deposición de placas. Por lo tanto, una señalización aumentada de Reelina a través de la aplicación directa de la proteína Reelina, o mediante terapia génica de ADN o estructuras de ARN, o el uso de otros agonistas del receptor de lipoproteínas se puede utilizar para mitigar la interrupción y progreso cognitivo dependiente de A β de la patología de placas.

Un apoyo para la función de la proteólisis de Reelina en una enfermedad humana se ha encontrado en trastornos tanto neuropsiquiátricos como neurodegenerativos. Por ejemplo, el fragmento N-R2 está aumentado en pacientes con AD y demencia frontotemporal, en comparación con pacientes no dementes (Sáez-Valero, et al., Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. J. Neurosci. Res. 2003; 72:132–136; Botella-López, et al. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103:5573–5578). En pacientes con diagnóstico confirmado de depresión y trastorno bipolar, se encuentra que el fragmento N-R2 se disminuirá en muestras sanguíneas, mientras que se aumenta en pacientes con esquizofrenia el fragmento N-R6 (Fatemi, et al., Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. Neuroreport. 2001; 12:3209–3215). La Reelina también puede desempeñar una función del control de convulsiones: modelos de epilepsia tuvieron un procesamiento alterado de Reelina (Tinnes, et al., Epileptiform activity interferes with proteolytic processing of Reelin required for dentate granule cell positioning. FASEBJ. 2011; 25:1002–1013; Tinnes, et al., TIMP-1 inhibits the proteolytic processing of Reelin in experimental epilepsy. FASEBJ. 2013; 27:2542–2552; Kaneko, et al., Kainic acid-induced golgi complex fragmentation/dispersal shifts the proteolysis of reelin in primary rat neuronal cells: an in vitro model of early stage epilepsy. Mol. Neurobiol. 2016; 53:1874–1883), lo cual puede ser dependiente de MMP. Estas diferencias en los niveles de fragmentos de Reelina señalan una importancia en los niveles de Reelina y la disfunción proteolítica en estados de enfermedad.

La prueba de Reelina indica que el metabolismo de la Reelina se altera en tres modelos de ratón para la AD (PS1-FAD, SweAPPxPS1, y Tg2576). Tg2576 (SweAPP), PS1-FAD (M146L) y 2X (SweAPP x M146L) tipo silvestre de catorce meses de edad (camadas no alteradas), se alojaron bajo condiciones normales (20°C, 50% de humedad relativa, y un ciclo de luz/oscuridad de 12-h) se les permitió beber agua y tomar alimentos *ad libitum*. Después de la normalización al ambiente, los córtices de los ratones se retiraron y los lisados se ejecutaron en transferencias Western para diferentes fragmentos de Reelina. El metabolismo de la Reelina se alteró en tres modelos de ratón para la AD (PS1-FAD, SweAPPxPS1, y Tg2576), como se observa en la figura 28(A). No se detectaron diferencias significativas en los productos de Reelina 450, 190 y 180 kDa en Tg2576 contra tipo silvestre, aunque las especies N-terminales no identificadas reconocidas por G10 se elevaron significativamente en los

ratones Tg2576 y 2X. Por el contrario, los productos de Reelina 450 y 180 kDa se elevaron significativamente en ratones PS1-FAD y 2X. Estos cambios en el complemento del fragmento de Reelina parecen estar correlacionados con las alteraciones en la señalización de Reelina en la dirección 3'. La prueba de los córtices para fosforilación del mayor componente en la dirección 3', Dab-1, mostró una fosforilación aumentada de DAB-1 y los SweAPPXPS1 y PS1-FAD, y disminuyeron significativamente en el ratón SweAPP individual (Tg2576), como se observa en la figura 28(B). Estos datos sugieren que el metabolismo de la Reelina es particularmente sensible a los cambios en el procesamiento de la APP y/o la acumulación de A β .

Las alteraciones en las composiciones del fragmento de Reelina y la fosforilación de Dab-1 en los ratones Tg2576 pueden representar un sistema comprometido de la señalización de Reelina, un fenómeno que si es verdadero podría ser responsable de los déficits de plasticidad sináptica reportados en estos ratones (Mitchell, et al., X11beta rescues memory and long-term potentiation deficits in Alzheimer's disease APPswe Tg2576 mice. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:4492-4500; Kotilinek, et al., Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain.* 2008; 131:651-664; Jacobsen, et al., Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:5161-5166).

Para determinar el efecto de la Reelina exógena, cortes hipocampales agudos provenientes de ratones Tg2576 de 8 meses de edad se perfundieron con 5 nM del complemento fragmentario de Reelina recombinante R3-6. La aplicación del fragmento de Reelina rescató el defecto de la LTP en ratones de Tg2576 envejecidos, como se observa en la figura 28(C), lo que sugiere que la maquinaria bioquímica y estructural implicada en la dirección 3' de la señalización de Reelina del procesamiento de la proteína de Reelina está intacta en estos ratones. Además, es importante observar que los niveles normales de la plasticidad sináptica se pueden obtener en este modelo de ratón. Los fragmentos de Reelina también están asociados con las placas de núcleo denso en ratones Tg2576 envejecidos (15 meses de edad), como se observa en las figuras 29(A), 29(B), 29(C), y 29(D). Además, los agonistas del receptor de lipoproteínas de Reelina y relacionados pueden rescatar los déficits en la plasticidad sináptica y la función cognitiva que resultan de la acumulación de A β y/o la patología de placas. La Reelina rescató el déficit de la LTP en ratones de 12 meses de edad modelado para la AD (Tg2576), como se observa en la figura 30.

Estos datos se apoyan en los hallazgos de la Reelina asociada con placas que contienen A β detectadas en el hipocampo de ratones tipo silvestre envejecidos (Madhusudan, et al., Accumulation of reelin-positive plaques is accompanied by a decline in basal forebrain projection neurons during normal aging. *Eur J Neurosci.* 2009; 30:1064-1076; Knuesel, et al., Age-related accumulation of Reelin in amyloidlike deposits. *Neurobiol Aging.* 2009; 30:697-

716). A la luz de la función establecida para la Reelina en la función sináptica, los cambios en la integridad del metabolismo de la Reelina y la señalización desempeña una función profunda en el aprendizaje de los cambios de memoria establecidos anteriormente en modelos de ratón con AD.

Sorprendentemente, una sola aplicación exógena de Reelina mejora el aprendizaje y la memoria durante al menos once días en ratones tipo silvestre adultos. La función de los receptores de lipoproteínas en el intercambio de A β , y la identificación de la asociación de Reelina con las placas A β en un modelo de ratón con AD, hace evidente el valor de enfocarse en la Reelina como un blanco terapéutico en la etiología y patogénesis de la AD como una intervención terapéutica para la AD destinada a la eliminación de A β y la mejora de la función cognitiva.

Por lo tanto, la señalización aumentada de Reelina a través de la aplicación directa de la proteína de Reelina, o mediante la terapia de ADN o estructuras de ARN, o el uso de otros agonistas del receptor de lipoproteínas se puede utilizar para mitigar la interrupción cognitiva dependiente de A β y el progreso de la patología en placas.

Ejemplo 9

Una lesión cerebral traumática (TBI) puede resultar a partir de diversos orígenes, tales como convulsiones, trauma en la cabeza, estado epiléptico (SE), e isquemia, (Shetty & Hattiangady, Prospects of Stem Cell therapy for Temporal Lobe Epilepsy. Stem Cells. 2007; 25:2396–2407; Ogawa, et al., Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. 2007; 9:573–587; Acharya, et al., Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. Prog Neurobiol. 2008:363–404; Pitkänen, et al., From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. Epilepsia. 2009; 50 (Suplemento 2):21–9). Durante la fase aguda de la lesión, las células troncales neurales (NSC) ubicadas en la zona subgranular (SGZ) aumentan la neurogénesis en un intento de curar el daño (Parent, et al., Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci. 1997; 17:3727–3738; Hattiangady, et al., Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. Neurobiol Dis. 2004; 17:473–490; Shetty, et al., Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. J Neurochem. 2003;87:147–159; Hattiangady, et al., Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. Exp Neurol. 2005; 195:353–371). Sin embargo, las respuestas fisiológicas a estas lesiones fracasan en mejorar la recuperación funcional, y da por resultado en déficits de aprendizaje y disfunción de la

memoria y el estado de ánimo (Jorge RE, Acion L, Starkstein SE, Magnotta V. Hippocampal volume and mood disorders after traumatic brain injury. *Biol Psychiatry*. 2007; 62:332–338; Potvin, et al., Performance on spatial working memory tasks after dorsal or ventral hippocampal lesions and adjacent damage to the subiculum. *Behav Neurosci*. 2006; 120:413–422). Muchos de los problemas crónicos a partir de la TBI se provocan por una deficiente diferenciación neuronal en los NSC, una migración inadecuada o la diferenciación de células neuronales a partir de los NSC, y una sinaptogénesis deficiente o inadecuada sobre las dendritas basales que se proyectan desde las células neuronales (Sanchez, et al., Synaptic connections of hilar basal dendrites of dentate granule cells in a neonatal hypoxia model of epilepsy. *Epilepsia*. 2012; 53 (Suplemento 1):98–108).

Para probar los efectos de la administración de Reelina con respecto a una lesión cerebral traumática (TBI), se condujeron una batería de pruebas de comportamiento motor, EBST, acinesia de extremidades anteriores, y pruebas de agarre de las anteriores.

Ratones C57BL/6 de diez semanas de edad (n = 55, machos) se alojaron bajo condiciones normales (20°C, 50% de humedad relativa, y un ciclo de luz/oscuridad de 12-h) y se les permitió el acceso a agua y alimento *ad libitum*. Después de la normalización al ambiente, los ratones se sometieron a TBI utilizando un impactador cortical controlado (CCI; Pittsburgh Precision Instruments, Inc, Pittsburgh, PA). Los procedimientos experimentales se aprobaron por un comité para cuidado y uso de animales. Los ratones se separaron en grupos, tratamiento falso (sin TBI) sin inyección, TBI sin inyección, TBI con tratamiento falso del grupo con solución salina, y TBI con Reelina. Los animales tratados con Reelina consistieron de una inyección de 2 µl con la proteína de Reelina purificada, recombinante de longitud total a una concentración 5 nM. Los animales tratados en falso se anestesiaron, y se sometieron al procedimiento quirúrgico, pero no experimentaron impacto cortical. La totalidad de las pruebas de comportamiento se realizó durante el ciclo de luz al mismo tiempo a través de los días de prueba. Se tomaron las precauciones necesarias para reducir el dolor y sufrimiento de los animales a todo lo largo del estudio. Todos los estudios se realizaron por personal sin conocimiento de la condición del tratamiento. En el momento del tratamiento, los ratones tuvieron un peso de 12-45 g.

La anestesia profunda se alcanzó utilizando isoflurano al 1-2% en óxido nitroso/oxígeno (69/30%) utilizando una mascarilla para la de nariz. Todos los animales se fijaron en un marco estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Las cirugías para lesión en TBI consistieron de animales sometidos a incisión del cuero cabelludo para exponer el cráneo, y se realizó una craniectomía. Se utilizó un taladro eléctrico para realizar la craniectomía con un radio de aproximadamente 2.5 mm con coordenadas calculadas de +0.2 anterior y -0.2 mm lateral derecho desde el bregma (Paxinos & Watson, (2005) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 5ª ed. San Diego, CA: Academic Press). Después de una

craneotomía, el cerebro se impactó en la corteza fronto-parietal con una velocidad de 6.0 m/s alcanzando una profundidad de 1.0 mm por debajo de la capa de materia dura y permaneció en el cerebro durante 150 milisegundos (ms). La barra impactadora tuvo un ángulo de 15° verticalmente para mantener una posición perpendicular con referencia al plano tangencial de la curvatura del cerebro en la superficie de impacto.

Un transductor de desplazamiento variable lineal (Macrosensors, Pennsauken NJ), que estuvo conectado al impactador, midió la velocidad y duración para verificar la consistencia. Se administró posoperatoriamente el analgésico ketoprofeno (5 mg kg⁻¹). Los ratones se mantuvieron bajo supervisión cercana.

La prueba de oscilación corporal elevada (EBST) implicó la manipulación del animal mediante su cola y registrando la dirección de la oscilación (Borlongan & Sanberg, (1995) Elevated body swing test: a new behavioral parameter for mice with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *The Journal of neuroscience* 15: 5372–5378). El aparato de prueba consistió de una caja clara de plexiglás (40 x 40 x 35.5 cm). El animal se tomó suavemente de la base de la cola, y se elevó mediante la cola hasta que la nariz del animal estuvo a una altura de 5 cm (2 pulgadas) por encima de la superficie. La dirección de oscilación, ya sea derecha o izquierda, se calculó una vez que la cabeza del animal se movió lateralmente aproximadamente 10 grados desde la posición de la línea media del cuerpo. Después de una sola oscilación, el animal se colocó de regreso en la caja de plexiglás y se le permitió moverse libremente durante 30 segundos antes probar nuevamente. Estos pasos se repitieron 20 veces para cada animal. Normalmente, los ratones intactos exhibieron una desviación de oscilación del 50%, es decir, el mismo número de oscilaciones a la izquierda y a la derecha. Una desviación de oscilación del 75% hacia una sola dirección se utilizó como el criterio del déficit motor la TBI.

La acinesia de extremidades anteriores se probó antes y después de la cirugía de la TBI, ratones jóvenes y envejecidos provenientes del control falso, TBI-sin inyección, TBI-con inyección simulada, o TBI con Reelina (Borlongan CV, Hida H, Nishino H (1998) Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuroreport* 9:3615–3621). Se marcaron por dos evaluadores experimentalmente sin conocimiento de las condiciones la fuerza de las extremidades delanteras ipsilaterales y contralaterales y la motilidad utilizando la siguiente escala de acinesia de las extremidades anteriores, el ratón de sin tratamiento previo, lesionado en falso, o hemiparkinsoniano se colocó individualmente en un cilindro de plexiglás en (20 cm de diámetro, 30 cm de altura) y se registró un video durante 5-15 min, mientras que exploró y tocó el vidrio con sus patas delanteras. Se observaron contactos de las patas delanteras por dos evaluadores experimentalmente sin conocimiento y por último se calcularon como (No. de contactos a la derecha/No. de contactos totales). Un valor del 50% se caracterizó como normal y una marca

de 1, un animal que tocó el 80% con su pata delantera derecha (ipsilateral) se consideró afectada y una marca 2, mientras que un animal que tocó el 90% o más con su pata derecha delantera (ipsilateral) se consideró gravemente dañado y se marcó como 3. Las marcas se contaron para cada animal individual, y luego se utilizaron para análisis marcas medias para los grupos de tratamiento.

El agarre de las patas implicó probar la fuerza de agarre antes y después de la cirugía de la TBI. Un agarre anormal es indicativo de una función neuromuscular dañada. En esta prueba, los ratones se mantuvieron por sus cuerpos contra un poste (Ibrahim AG, Raisman G, Li Y (2009) Permanent loss of fore-paw grasping requires complete deprivation of afferent input from a minimum of four dorsal roots of the mouse brachial plexus. *Exp Neurol* 215:142–145). Se marcaron la resistencia de agarre de las patas tanto ipsilaterales como contralaterales por dos evaluadores utilizando la siguiente escala de resistencia de agarre. En una escala de 1 a 3, 1 es normal, 2 es dañado, y 3 es gravemente dañado. Las marcas se contaron para cada animal individual, y luego se utilizaron para análisis las marcas medias para los grupos del tratamiento.

Las mediciones repetidas de ANOVA y las pruebas t de Bonferroni pos-hoc para cada punto de tiempo se utilizaron para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento. Las diferencias se consideraron significativas en $p < 0.05$. Todos los valores se expresaron como la media $\pm$ SEM.

El tratamiento con Reelina exhibió una recuperación mejorada del comportamiento en los animales con TBI. Los ratones tratados con Reelina exhibieron una ligera desviación de oscilación en el día 1, y se resolvió en el día 2, como se observa en la figura 31. En comparación, los ratones tratados con TBI e inyectados con el vehículo o sin inyección exhibieron una mayor desviación de oscilación a todo lo largo de la prueba. De esta forma, el tratamiento dio por resultado en una recuperación divergente en el día 2, con los ratones tratados con Reelina que mejoraron mientras que los ratones inyectados con vehículo y no inyectados mostraron poca mejora. El tratamiento con Reelina también dio por resultado en mejora para la acinesia de las extremidades en el día 3, como se observa en la figura 32. En el día 5, los ratones tratados con Reelina exhibieron una acinesia similar en las extremidades con los animales tratados en falso, mientras que los ratones tratados con TBI a los que se les administró el vehículo o no inyectados siguieron mostrando acinesia. El agarre de las patas mostró una mejora estable en los ratones tratados con Reelina, como se observa en la figura 33.

La pérdida crónica del hábito de vida de la lesión cerebral traumática es parcialmente debido a un reemplazo inadecuado de células neuronales durante la curación. Se ha encontrado que la Reelina protege de una subclase de interneuronas GABA-érgicas, que son neuronas que expresan una Reelina de glucoproteína extracelular, en el DG (Shetty,

Hippocampal Injury Induced Cognitive and Mood Dysfunction, Altered Neurogenesis and Epilepsy: Can Early Neural Stem Cell Grafting Intervention Provide Protection? *Epilepsy Behav.* 2014 Sep; 38:117-24). Estas interneuronas GABA-érgicas ayudan en la migración de células neuronales formadas a partir de los NCS en la capa de células granulares (Gong, et al., Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 2007; 27:1803–1811). Sin estar unidos por ninguna teoría específica, la administración de Reelina o fragmentos de Reelina puede funcionar a través de la formación de dendritas, la retención de interneuronas GABA-érgicas, o una combinación de vías.

Ejemplo 10

Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones que cubren la superficie de las dendritas y portan las estructuras pos-sinápticas que forman las sinapsis excitatorias. Las configuraciones anormales o números reducidos de espinas dendríticas se encuentran en una serie de enfermedades cognitivas, tales como el síndrome X frágil, el síndrome de William, el síndrome de Rett, el síndrome de Down, el síndrome de Angelman y autismo. Una reducción en el número de espinas dendríticas sugiere que se requiere un nivel constitutivo de señalización mediada por Reelina/receptor de lipoproteína para el desarrollo de estructuras dendríticas, lo cual es decisivo para el procesamiento intensivo de la información mediante las neuronas. Este concepto está de acuerdo con estudios que muestran que los ratones aspadores heterocigotos (HRM) exhiben densidades reducidas de las espinas dendríticas y un desempeño dañado en ciertos comportamientos de aprendizaje y memoria. Además, la suplementación con Reelina recupera los defectos de la densidad de las espinas y la interrupción cognitiva asociada. Además, la transducción de señales de Reelina inicia las vías implicadas en la activación de CREB, que es esencial para una transcripción génica de memoria temprana. Esta es una vía común que se interrumpe en los trastornos cognitivos en humanos mencionados anteriormente.

Ejemplo 11

Recientemente se mostró que el procesamiento de la Reelina mediante las metaloproteinasas es esencial para una formación de placas corticales normales (Jossin, et al., Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:7113-7124), aunque la enzima específica responsable sigue siendo todavía desconocida. Este descubrimiento sugiere que el procesamiento de la Reelina mediado por metaloproteinasas puede ser importante para la señalización dirigida de Reelina en el cerebro de adultos. Tanto tPA como MMP-9 son metaloproteinasas candidatas que demuestran claramente las funciones en la regulación de la plasticidad sináptica y la función cognitiva (Bozdagi, et al., In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol.* 2007; 98:334-344; Nagy, et al., Matrix metalloproteinase-9 is required for

hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci*. 2006; 26:1923-1934; Huang, et al., Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase longterm potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:8699-8704; Pang, P. T., and B. Lu. 2004. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 3:407-430; Zhuo, M., D. M. Holtzman, Y. Li, H. Osaka, J. DeMaro, M. Jacquin, and G. Bu. 2000. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long- term potentiation. *J Neurosci* 20:542-549; Baranes, et al., Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*. 1998; 21:813-825).

La eficacia para generar el producto de 370 kDa dependerá parcialmente de una enzima de segmentación de Reelina candidata, tPA. Este mecanismo de regulación potencial tiene implicaciones profundas sobre la forma en que se integra este sistema de señalización en mecanismos conocidos de regulación neuronal y coordinados para participar en los procesos fisiológicos tales como el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, la Reelina se segmenta en sitios específicos que dan por resultado en un patrón estable de fragmentos de Reelina cuantificados fácilmente mediante análisis de transferencia Western. Estos fragmentos representan las moléculas de señalización potencial con propiedades únicas a partir de la Reelina de longitud total. La Reelina recombinante purificada a partir de células HEK293 transfectadas establemente contiene fragmentos del mismo tamaño que los fragmentos mayores encontrados en el hipocampo.

Además, todo lo que se conoce con respecto a la localización de la Reelina en el cerebro adulto se ha generado utilizando un anticuerpo que reconoce la región N-R2. La región N-R2 está presente en los fragmentos de Reelina N-R2 y los fragmentos de Reelina N-R6 de longitud total (N-R8), pero no en los otros fragmentos mayores. Por lo tanto, el procedimiento de mapeo de 3 epítopes, como se observa en la Tabla 3, proporcionó una resolución espacial sin precedentes para monitorear los cambios en la producción y localización del producto de Reelina.

Tabla 3. Anticuerpos empleados en el procedimiento de 3 epítopes con propiedades, identificación de fuentes y reconocimiento del sitio de los epítopes.

Anticuerpo	Sitio de reconocimiento	Fuente animal	Fuente comercial
G10	164-496	Ms, mAb	Chemicon, MAB5364
G20	Término C	Gt, pAb	SCBT, sc-7741
CR-50	420-450	Ms, mAb	MBL, D223-3
H-221	3239-3460	Rb, pAb	SCBT, sc-5578
AF3820	1221-2661	Gt, pAb	R&D, AF3820
R4B	1810-1825	Ms, mAb	Jossen, et al., 2007
R5A	1985-2058	Ms, mAb	Jossen, et al., 2007
Ab12	3260-3428	Ms, mAb	de Berkgeyck, et al., 1998
Ab14	3260-3428	Ms, mAb	de Berkgeyck, et al., 1998
Ab17	3260-3428	Ms, mAb	de Berkgeyck, et al., 1998

Para evitar caracterizar los fragmentos específicos producidos mediante el procesamiento de Reelina dependiente del tPA- y MMP-9 en el contexto de la función sináptica normal y la formación de memoria, se generaron estructuras mutantes de Reelina resistentes a la segmentación utilizando mutagénesis sitio dirigida, como se observa en la figura 34. Los mutantes de Reelina incluyen las estructuras resistentes a la segmentación (Rln-Res) mediante tPA en R2-3, hasta MMP-9 en R6-7 y para ambas enzimas en R2-3 y R6-7. También se contemplan los fragmentos que imitan la segmentación mediante tPA o MMP-9 con, o sin un sitio resistente a la segmentación. Una estructura de Reelina complementaria única se marca en una forma idéntica como la proteína Rln-Res; sin embargo, no contiene los dos sitios alterados para la segmentación (segmentación lábil de Reelina; figura 34). Se incluye un fragmento marcado producido con ambos sitios mutados (estructura de control negativo) y un fragmento R3-6 marcado que muestra la unión de ApoER2 y VLDLR (control positivo potencial). Las estructuras de Reelina son sub-clonan en vectores de expresión en mamíferos que contienen marcas de polihistidina N-terminales y/o marcas Myc C-terminales para permitir un reconocimiento posterior de la Reelina exógena. Los sitios exactos de segmentación se pueden identificar al utilizar Reelina de longitud total purificada que se hizo reaccionar con ya sea tPA o MMP-9, por lo tanto, se pueden aislar los fragmentos resultantes.

La Reelina se procesa tanto mediante tPA como MMP-9 para generar los mayores productos del fragmento Reelina encontrados *in vivo*, como se observa en las figuras 35(A), 35(B) y 35(C). Como se puede observar, tPA aumenta los fragmentos de 370 kDa (N-R6) y 80 kDa (R7-8) bajo las condiciones sin células, como se observa en la figura 24(A), indicando que tPA segmenta la Reelina entre R6-R7, como se observa en las figuras 27(A) y 27(B). La segmentación de Reelina mediante plasmina da por resultado en un espectro de productos de identidad anteriormente desconocida y la retención específica del fragmento de 180 kDa. La aplicación de tPA recombinante de neuronas primarias da por resultado en una conversión

completa de Reelina extracelular a partir de la longitud total para las formas de 370 y 180 kDa, y una disminución en la Reelina intracelular de 180 kDa. Además, MMP-9 aumenta los fragmentos tanto de 370 kDa (N-R6) como de 180 kDa (N-R2) así como el fragmento encontrado justo por debajo del fragmento de 180 kDa bien conocido, como se observa en las figuras 24(B), y 24(C) y se confirmó mediante la inhibición de MMP9, como se observa en las figuras 24(D) y 24(E). Estos resultados bajo las condiciones libres de células apoyan que MMP-9 puede segmentar la Reelina en ambos sitios de segmentación, R2-3 y R6-7; sin embargo, la aplicación de MMP-9 a neuronas primarias conduce a una acumulación específica del fragmento de 180 kDa en las células y la inhibición de MMP-9 durante 24 horas conduce a un aumento dramático en la Reelina celular de longitud total y una disminución en la Reelina celular de 180 kDa. Estos resultados sugieren que, bajo condiciones normales, MMP-9 es responsable de la segmentación de la Reelina entre R2-R3, como se observa en el mapa de fragmentos de la figura 34. Tomados conjuntamente, estos datos preliminares sugieren que MMP-9 y tPA son suficientes para la generación de los mayores fragmentos de Reelina encontrados *in vivo*. Análisis de los anticuerpos identificados en las estructuras con capacidad para detectar los diversos fragmentos de Reelina, como se observa en las figuras 36(A) y 36(B). El procesamiento de la proteína de Reelina en el hipocampo es susceptible a una actividad sináptica *in vitro* e *in vivo*. También parece que MMP-9 y tPA están implicados en el procesamiento del metabolismo de la Reelina.

Ejemplo 12

La Reelina se segmenta en sitios específicos dando por resultado en patrón estable de fragmentos de Reelina cuantificados fácilmente mediante análisis de transferencia Western. Estos fragmentos representan las moléculas de señalización potenciales con propiedades únicas a partir de la Reelina de longitud total. La Reelina recombinante purificada a partir de células HEK293 transfectadas establemente contiene fragmentos del mismo tamaño que los fragmentos mayores encontrados en el hipocampo. La aplicación del complemento de fragmento recombinante de Reelina puede (1) aumentar la transmisión sináptica al facilitar la inserción del receptor AMPA y aumentar la función del receptor NMDA, (2) reducir la sinapsis silentes, (3) modificar la morfología sináptica y (4) mejorar la LTP (Qiu & Weeber, Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J Neurophysiol.* 2007; 97:2312-2321; Qiu, S., K. M. Korwek, A. R. Pratt-Davis, M. Peters, M. Y. Bergman, and E. J. Weeber. 2006. Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in Reelin haploinsufficient mice. *Neurobiol Learn Mem* 85:228-242).

La expresión de receptores de ApoER se analizó con la exposición a Reelina. Los cultivos neuronales y del hipocampo y corticales mezclados se obtuvieron a partir de embriones de ratones embrionarios en los días (E) 18-19. Las células se colocaron en placas a alta densidad (~ 750 células mm^{-2}), y se dejaron crecer en medio neurobasal (Gibco BRL)

suplementado con B27 (Gibco BRL). Las células se subcultivaron cuando confluyeron al 80%. Una vez que las células se subcultivaron por octava vez, se agregó al medio un fragmento de Reelina hR3-6 a una concentración de 5 nM y las células se incubaron con el fragmento de Reelina durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células se recolectaron mediante tripsinización, se lavaron con el medio y se lisaron utilizando un tampón de lisado a base de SDS-β-mercaptoetanol. Las proteínas se recolectaron de cada cultivo celular y 25 g se cargaron en un gel de SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nailon y se soldaron utilizando un anticuerpo anti-ApoER2 (Sigma-Aldrich, LRP8, anti-hApoER2 de conejo).

El tratamiento de las células con GST-RAP (proteína receptor asociada) mostró una caída sustancial en la expresión de receptores, como se observa en la figura 37. De esta forma, bloquear la capacidad de la Reelina para unirse a ApoER2 conduce a la disminución de la expresión de ApoER2. Sin embargo, la exposición de las células a la Reelina exógena dio por resultado en un aumento en la expresión del receptor ApoER2. Además, el tratamiento de células neuronales con el fragmento de Reelina aumenta la expresión de ApoER2 de una forma dependiente de la dosis, como se observa en las figuras 38(A) y 38(B).

En la especificación anterior, todos los documentos, acciones, o información descritos no constituyen una admisión de que el documento, acción o información de cualquier combinación de los mismos estuviera disponible al público, se conozca por el público, forme parte del conocimiento general en la técnica, o se sabe que sea relevante para resolver cualquier problema en el momento de la prioridad.

Las descripciones de todas las publicaciones citadas anteriormente se incorporan expresamente en la presente como referencia, cada una en su totalidad, al mismo grado como si cada una se incorporara como referencia individualmente.

Mientras que se han descrito e ilustrado modalidades específicas del método para tratar trastornos neurológicos, será evidente para aquellos expertos en la técnica que son posibles variaciones y modificaciones sin desviarse del amplio espíritu y principio de la presente invención. También se debe entender que las siguientes reivindicaciones están destinadas a cubrir la totalidad de las características genéricas y específicas de la invención descrita en la presente, y todas las declaraciones del alcance de la invención la cual, como materia de lenguaje, se podría decir que queda entre las mismas.

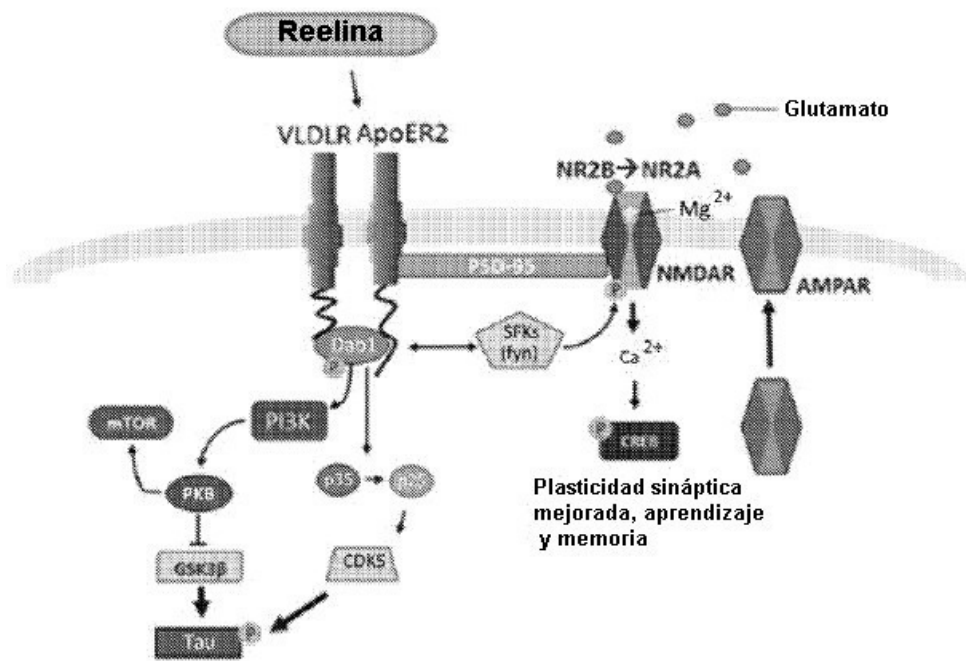


Figura 1

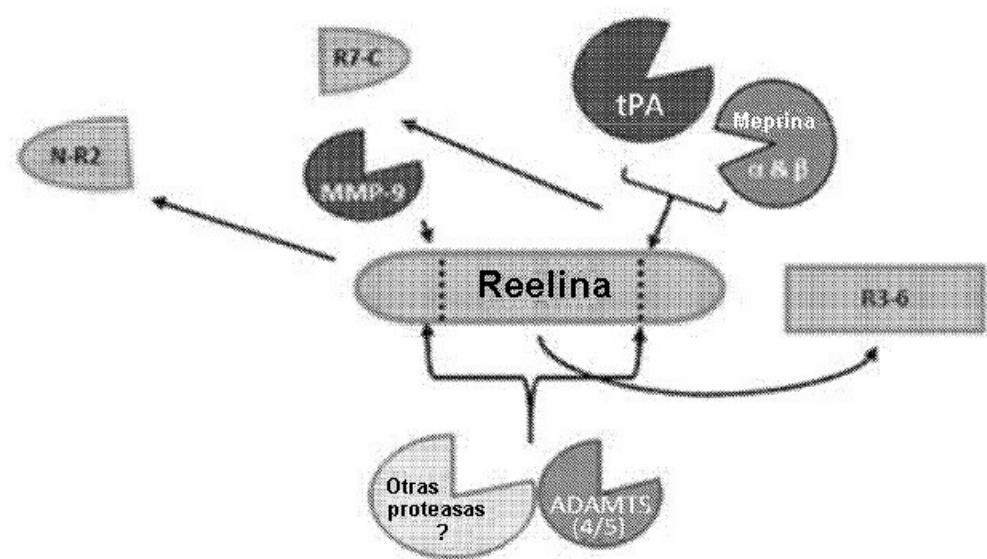


Figura 2

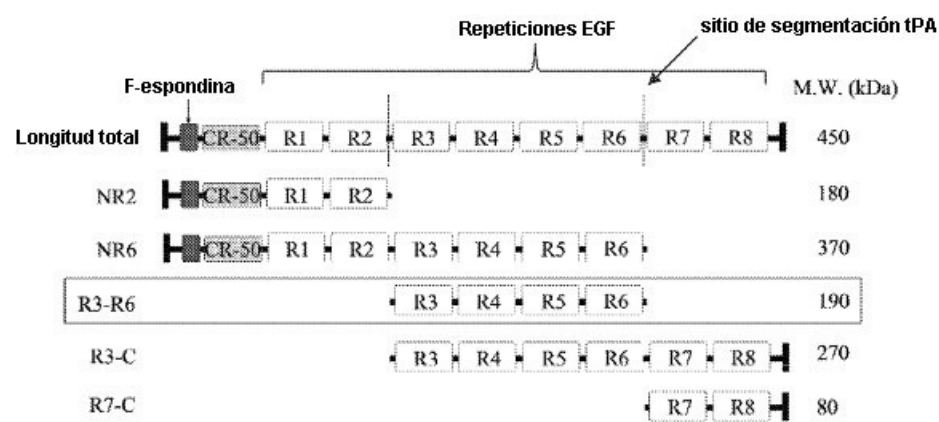


Figura 3

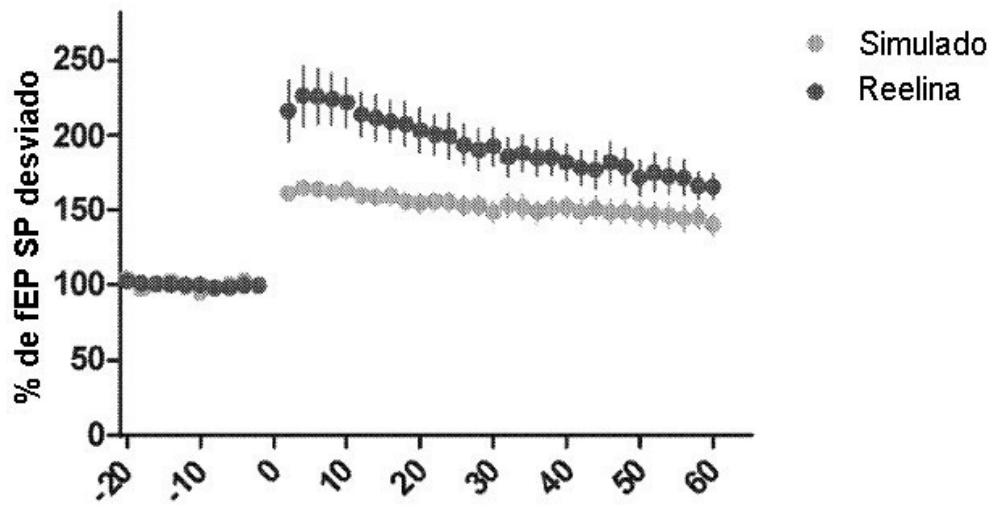


Figura 4

4

Repetición 4

Figura 5 (Continuación)

Repetición 5

Repetición 6

Figura 5 (Continuación)

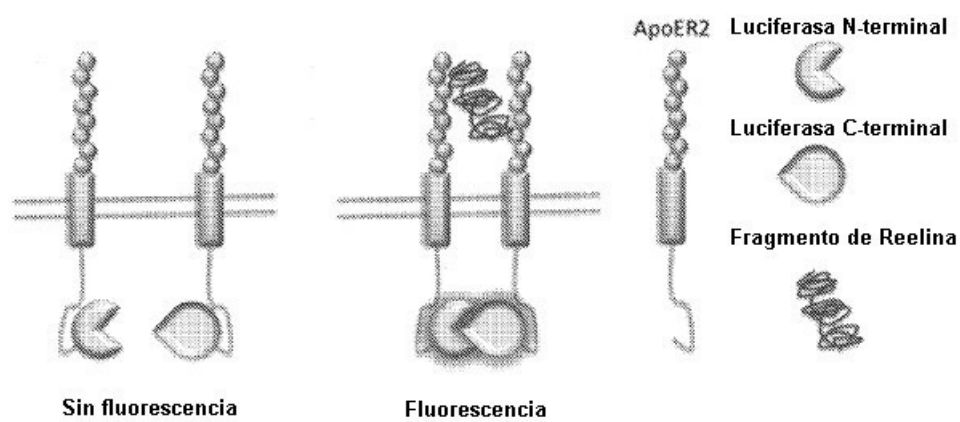


Figura 6

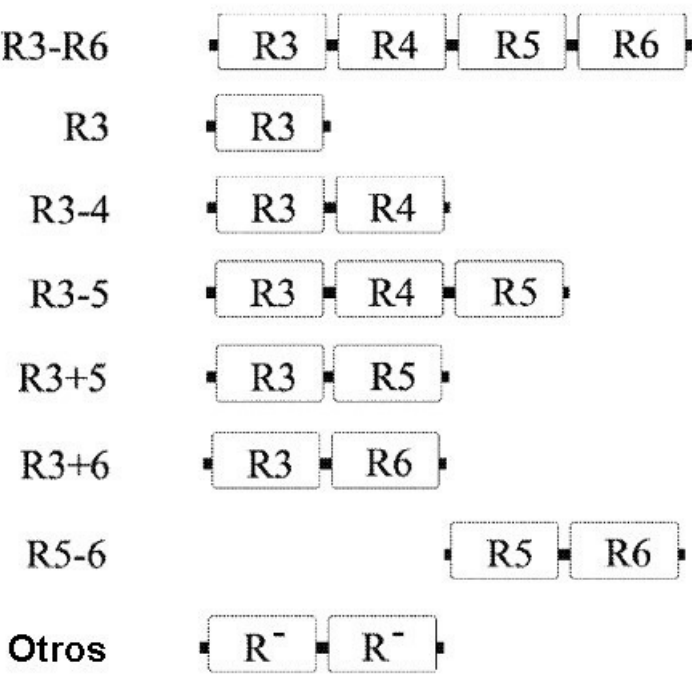


Figura 7

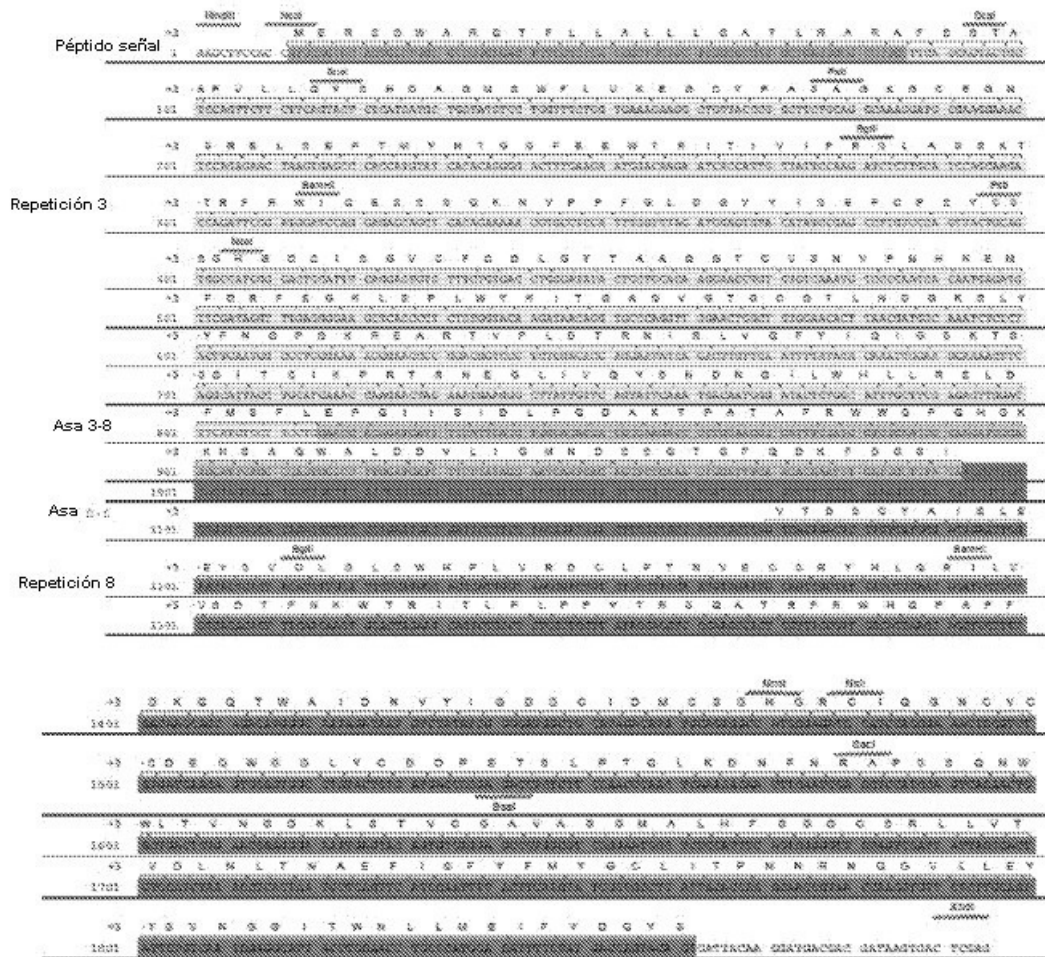
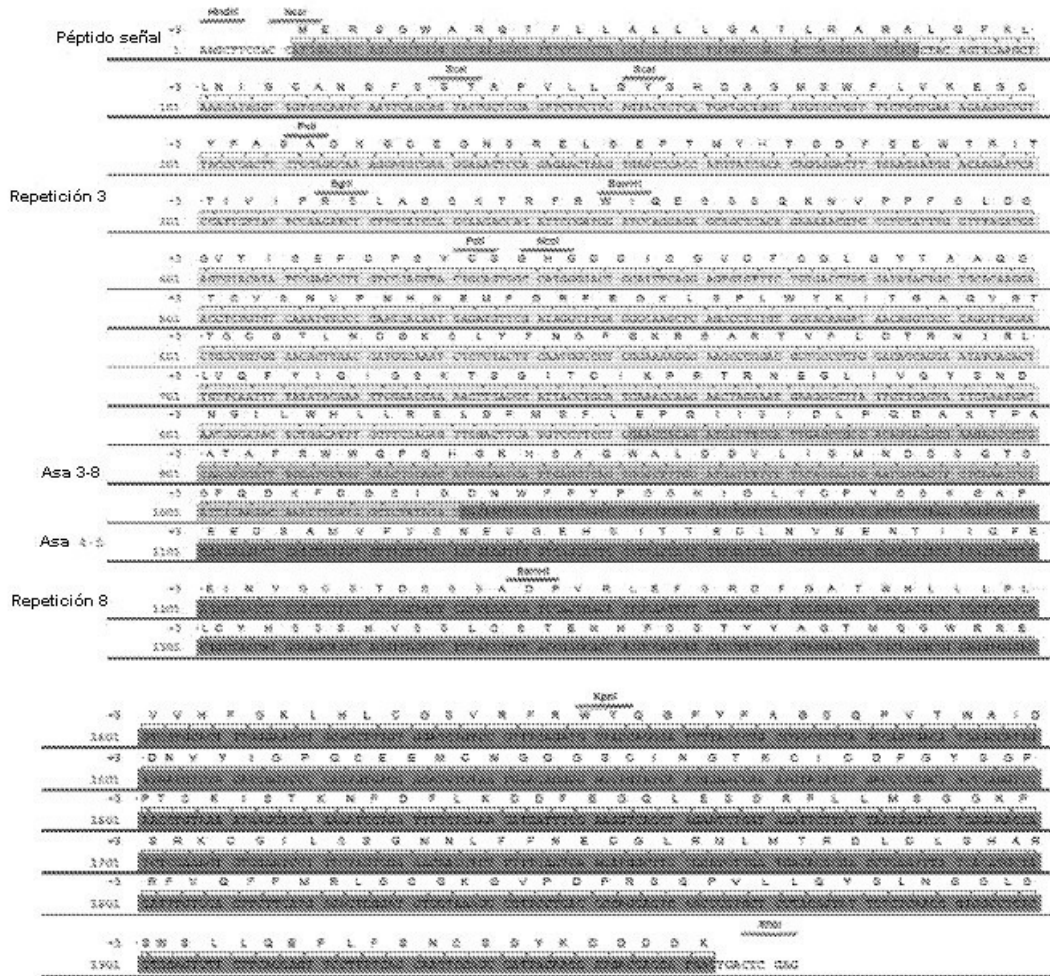


Figura 8



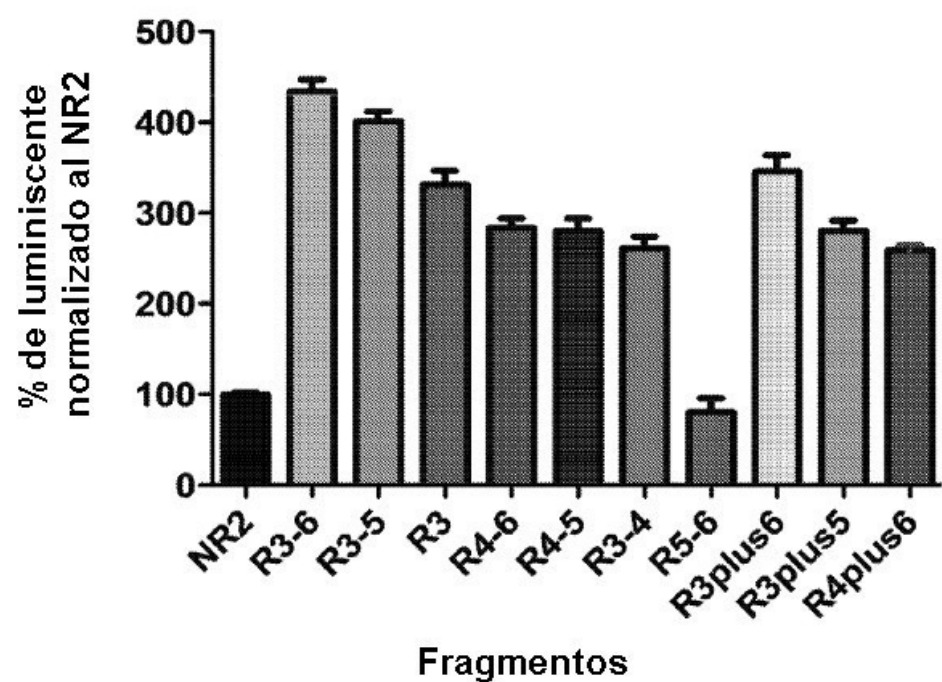


Figura 10

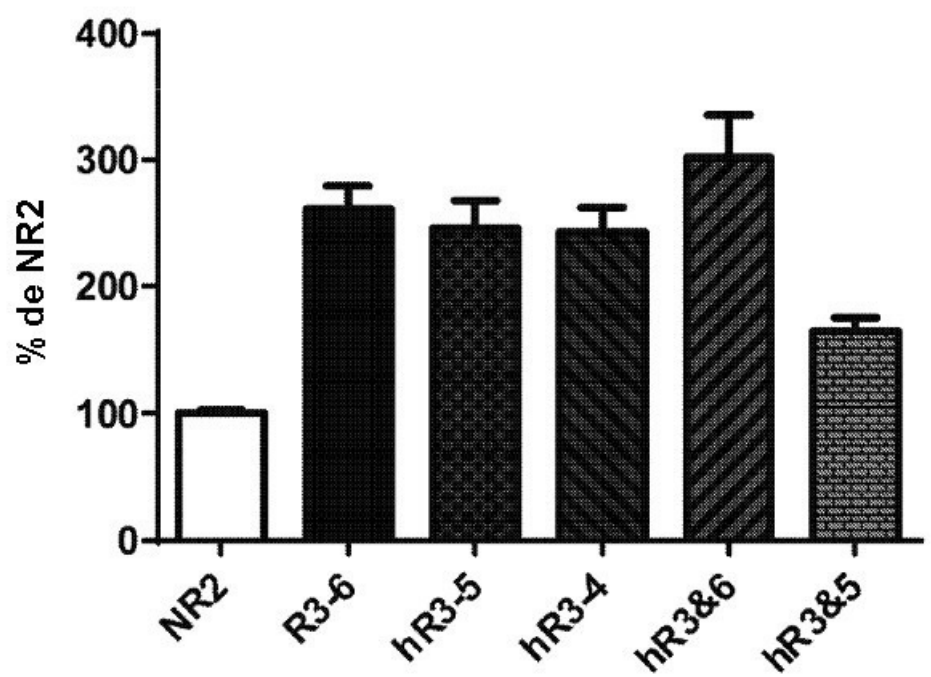


Figura 11

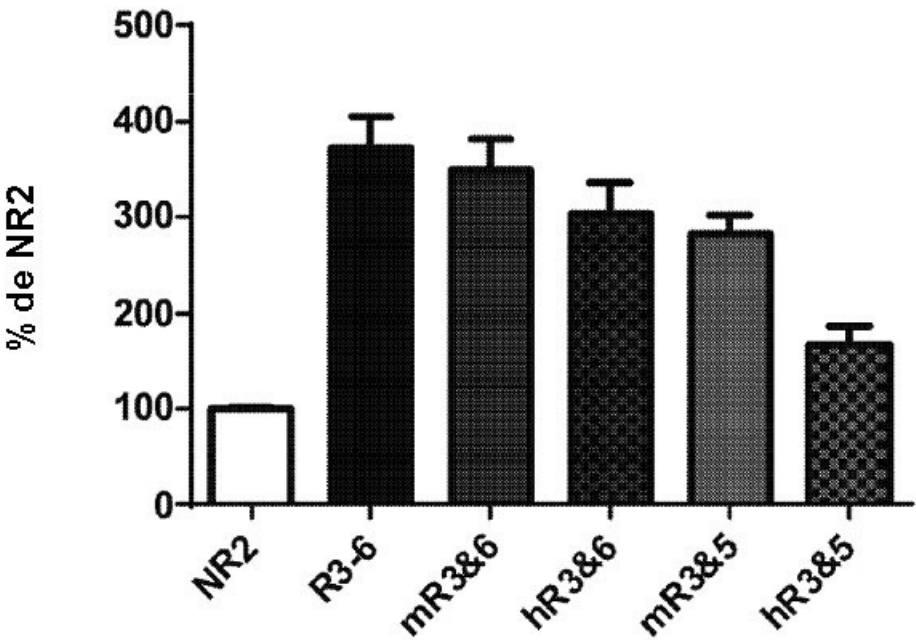


Figura 12

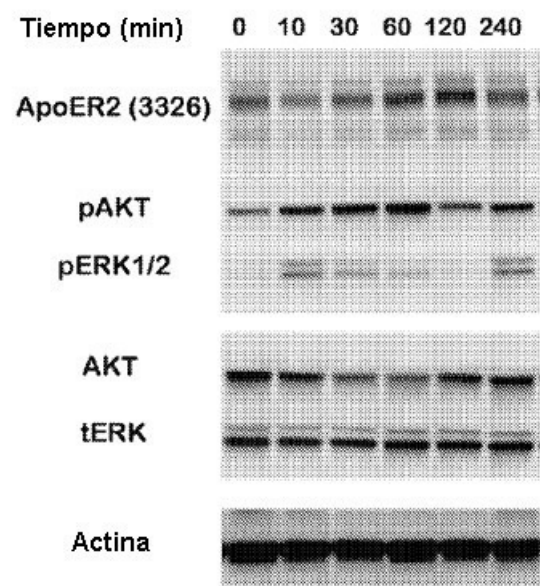


Figura 13(A)

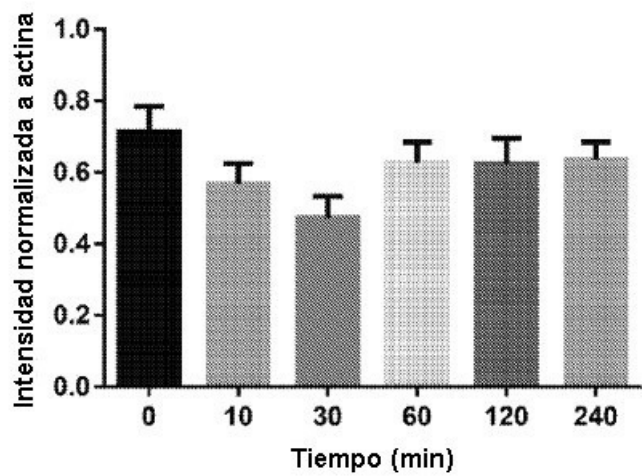


Figura 13(B)

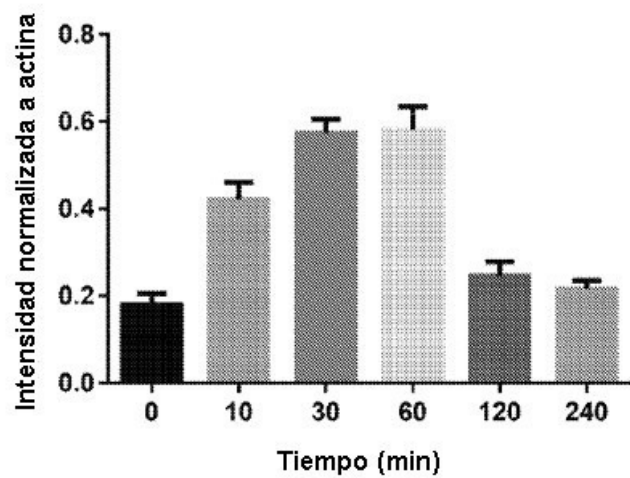


Figura 13(C)

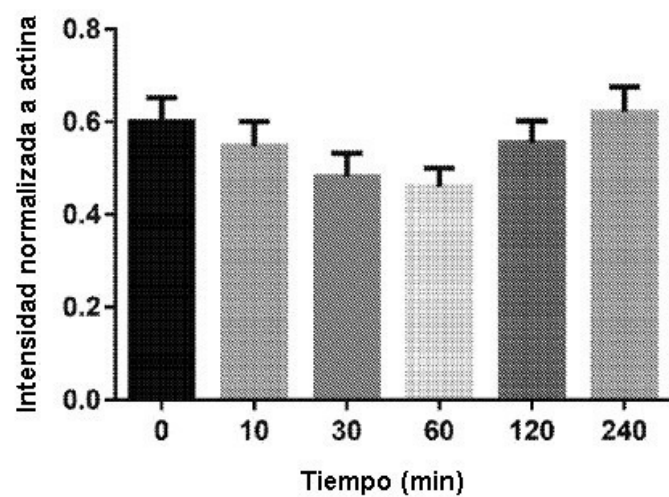


Figura 13(D)

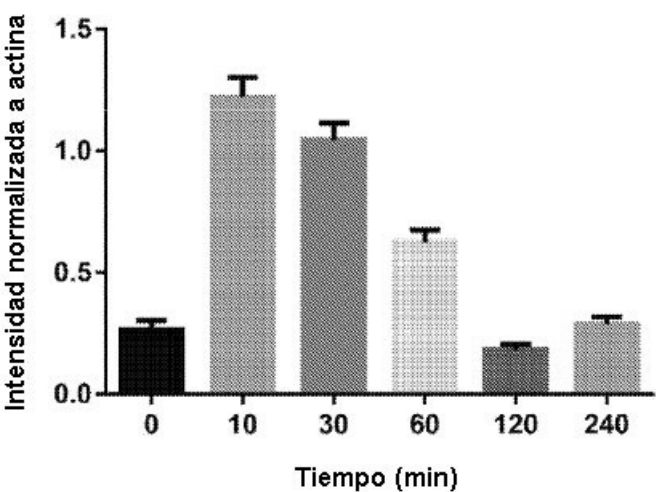


Figura 13(E)

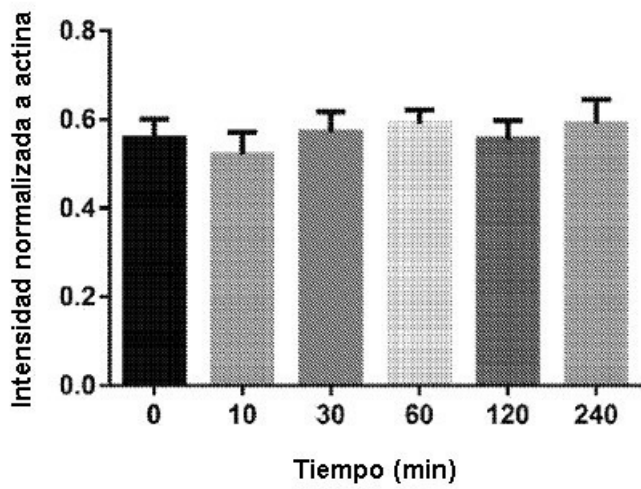


Figura 13(F)

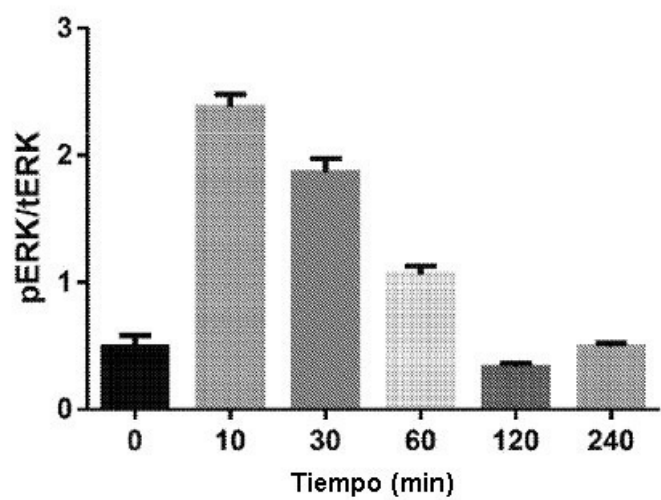


Figura 13(G)

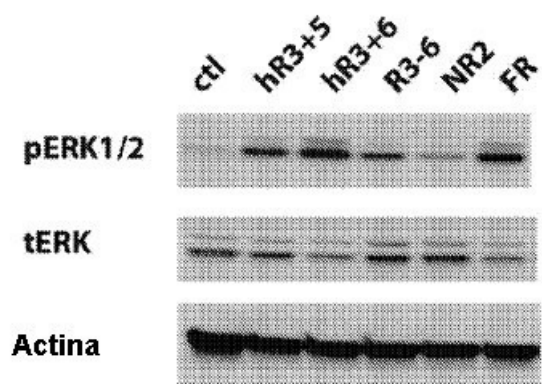


Figura 14(A)

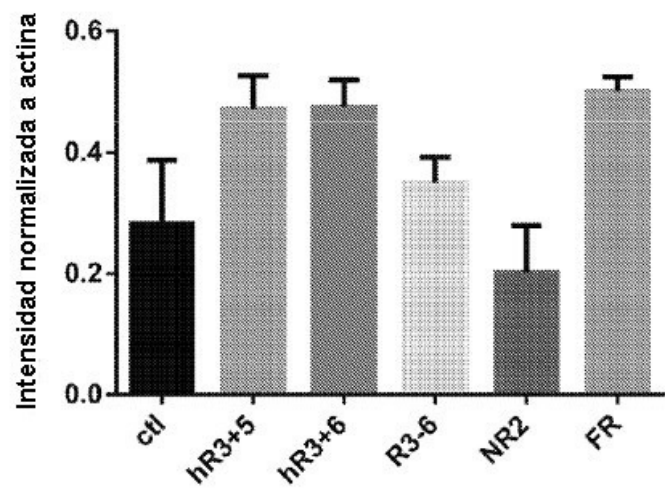


Figura 14(B)

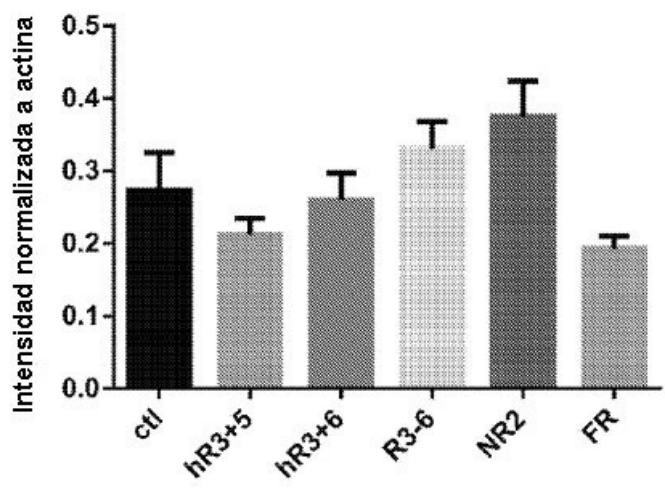


Figura 14(C)

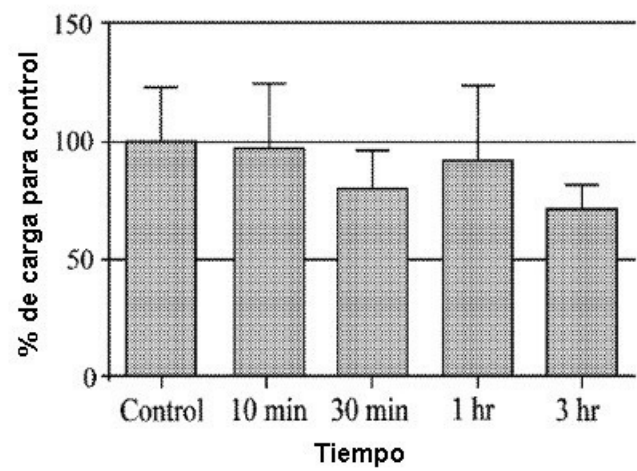


Figura 15

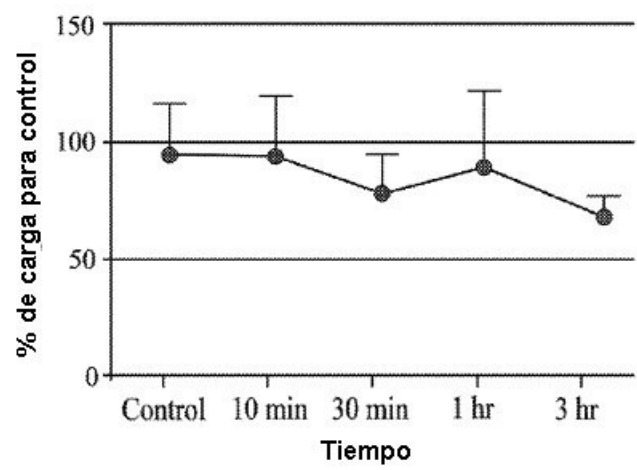


Figura 16

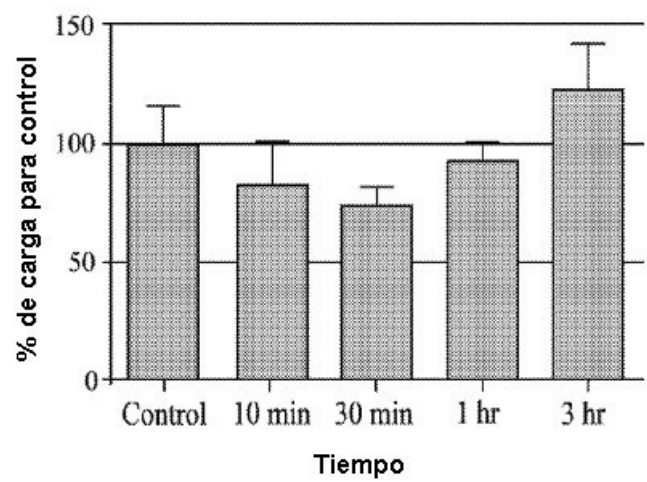


Figura 17

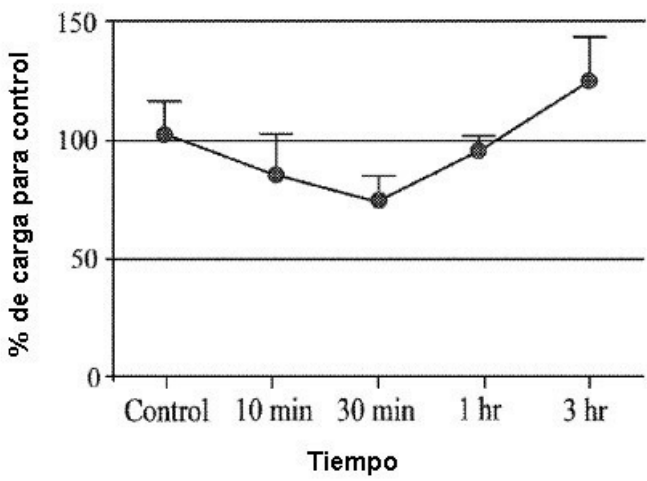


Figura 18

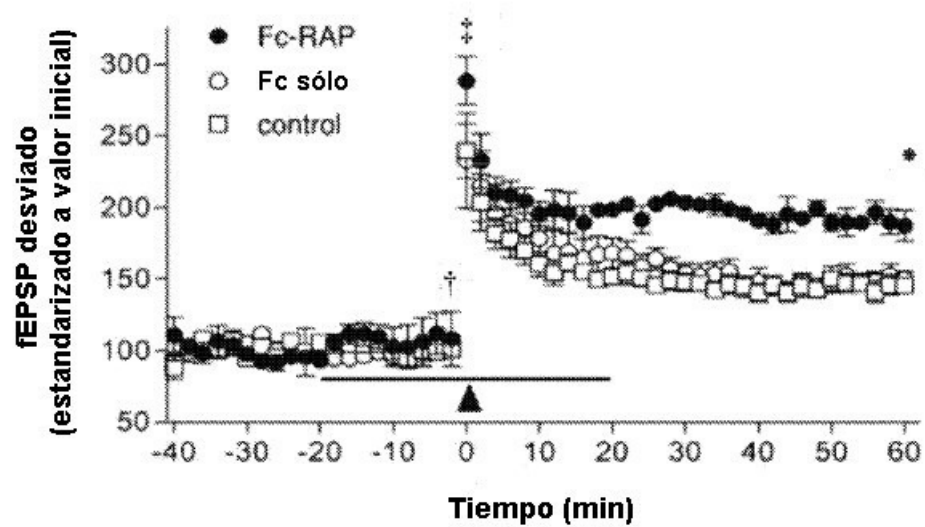


Figura 19

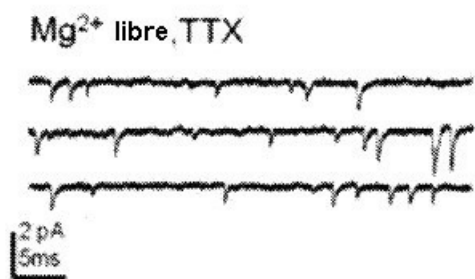


Figura 20(A)

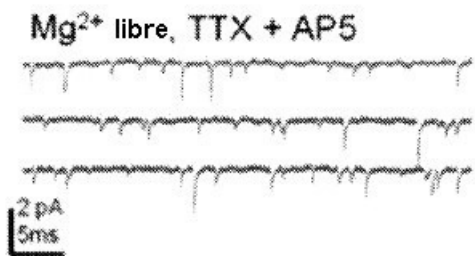


Figura 20(B)

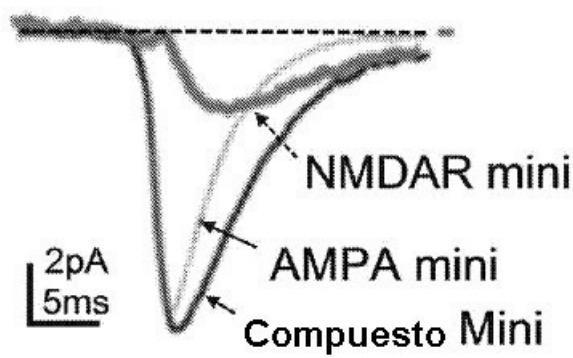


Figura 21(A)

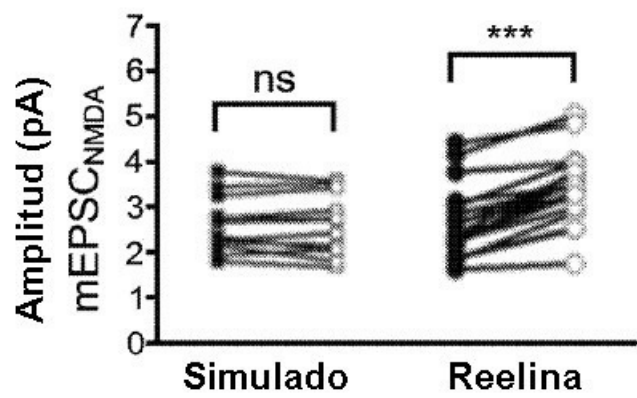


Figura 21(B)

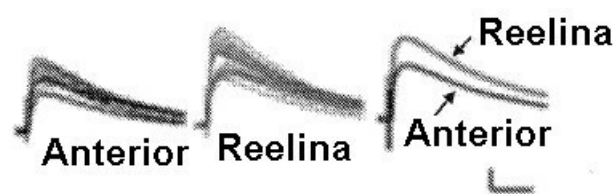


Figura 21(C)

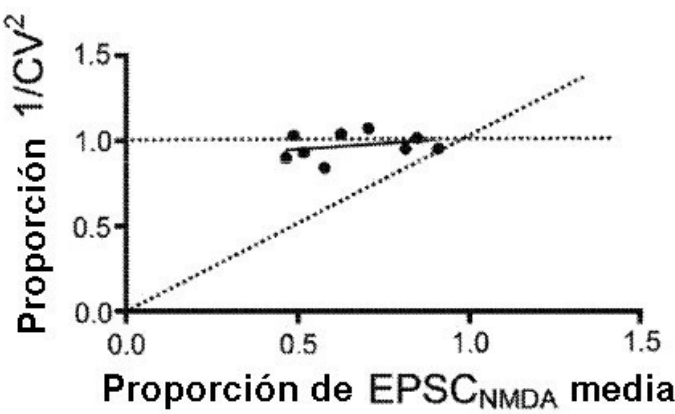


Figura 21 (D)

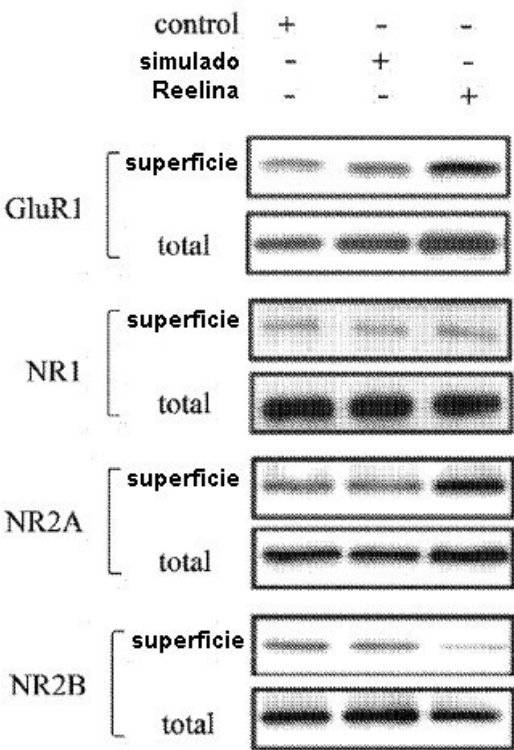


Figura 22 (A)

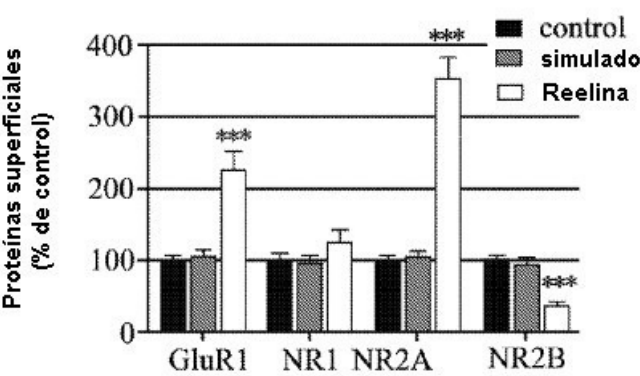


Figura 22(B)

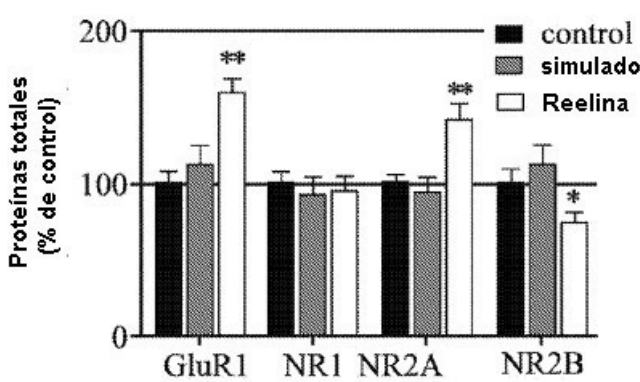


Figura 22(C)

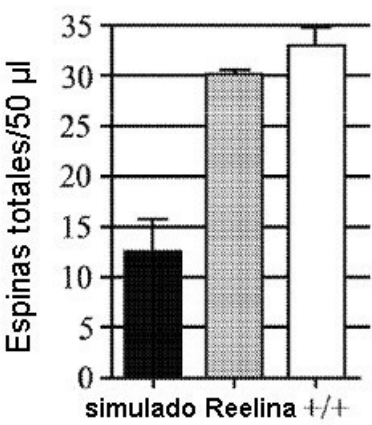


Figura 23(A)

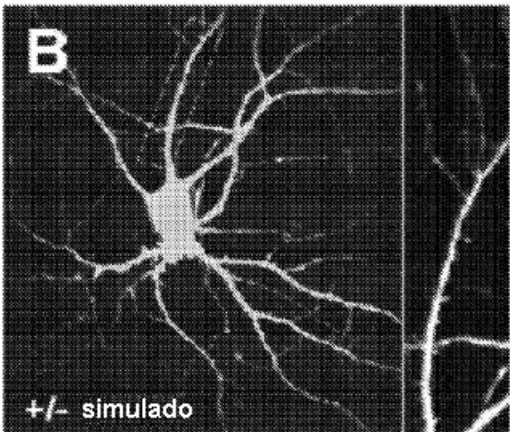


Figura 23(B)

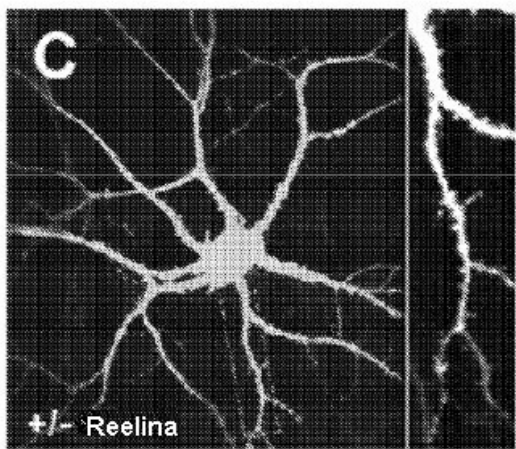


Figura 23(C)

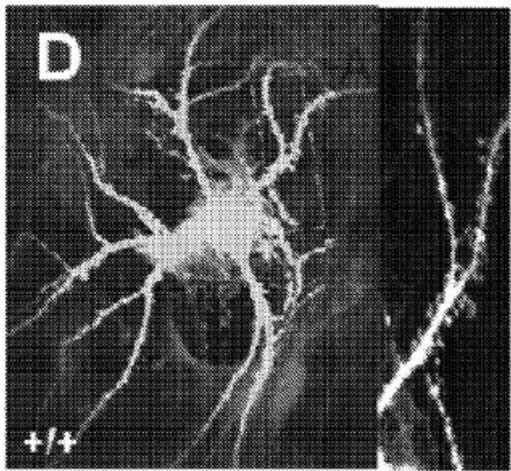


Figura 23(D)

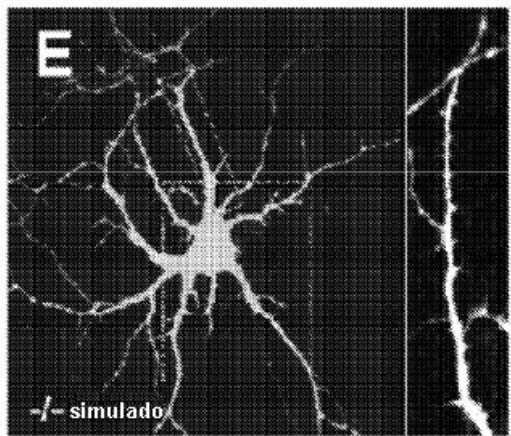


Figura 23(E)

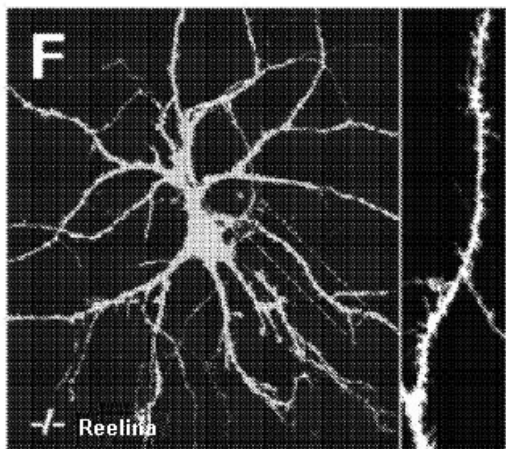


Figura 23(F)

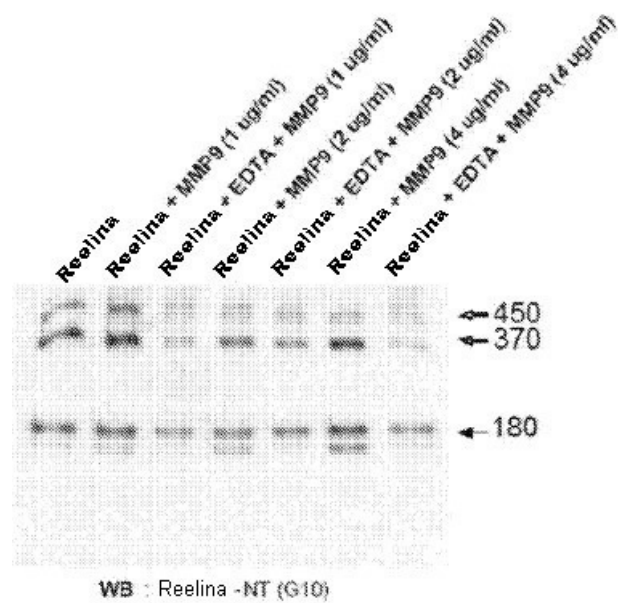


Figura 24(A)

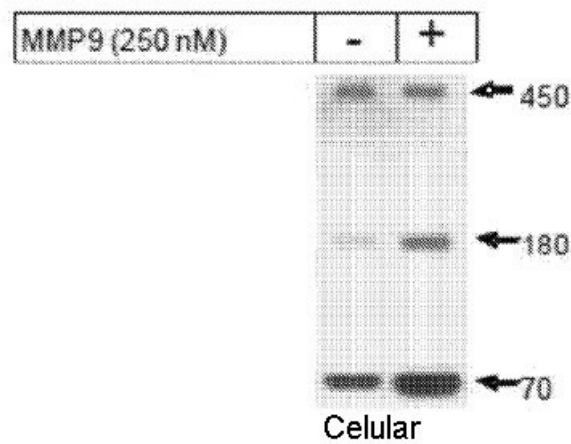


Figura 24(B)

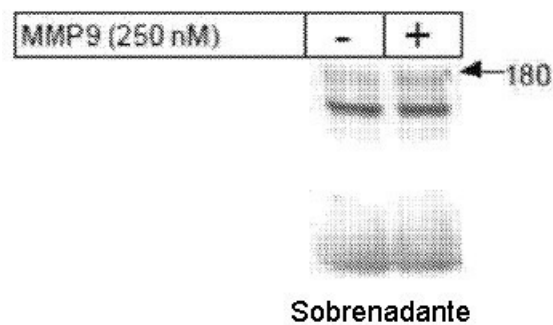


Figura 24(C)

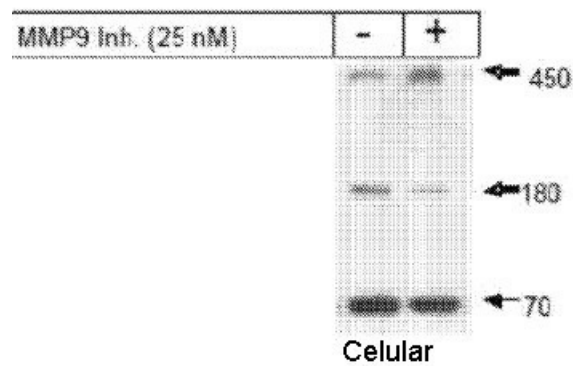


Figura 24(D)

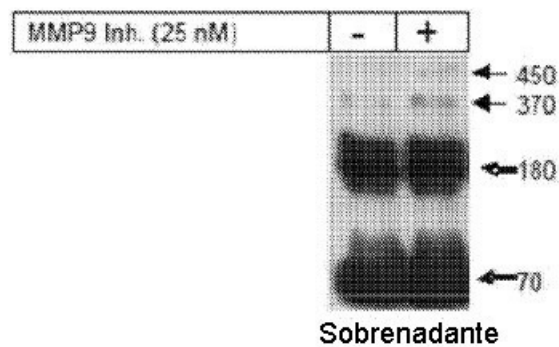


Figura 24(E)

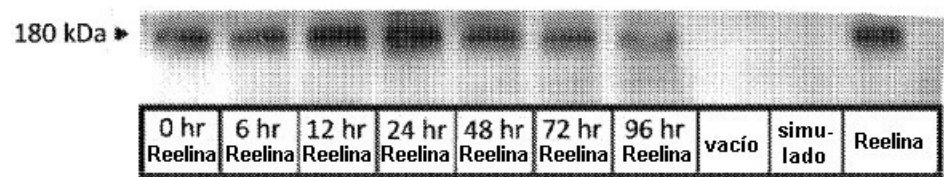


Figura 25

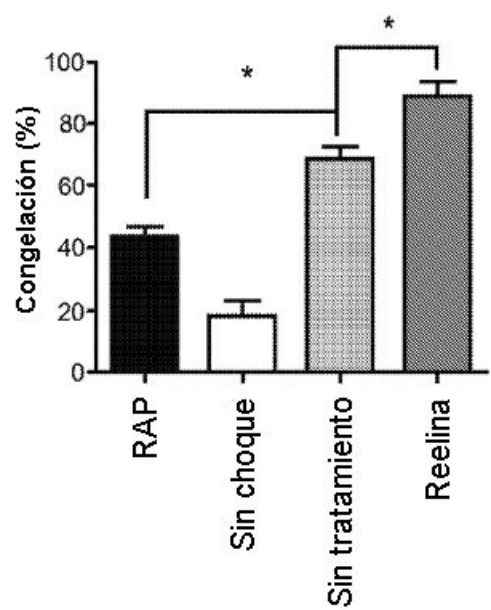


Figura 26(A)

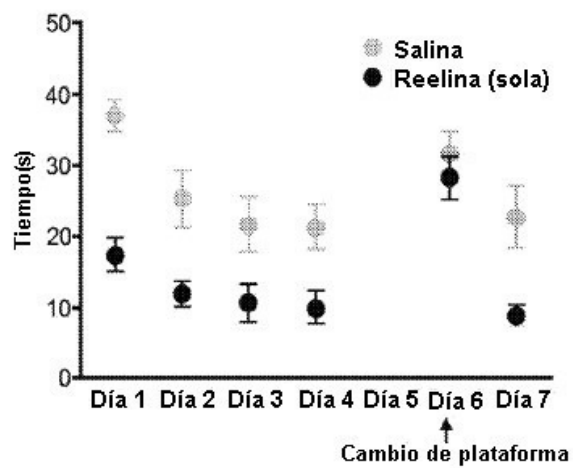


Figura 26(B)

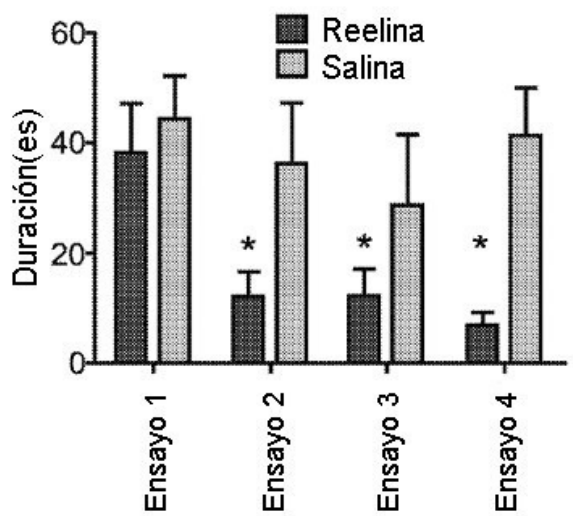


Figura 26(C)

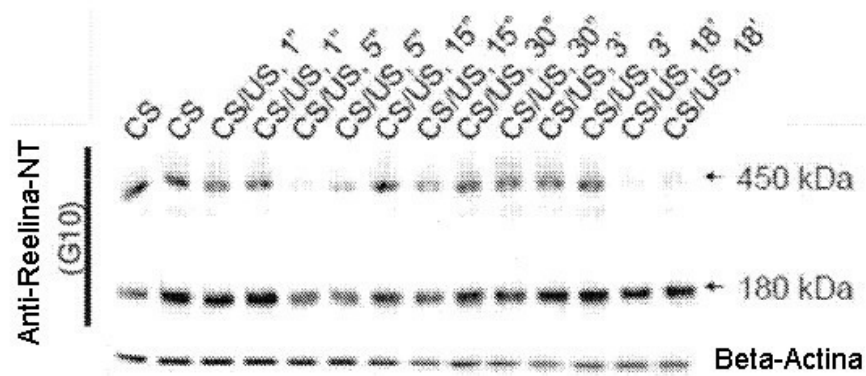


Figura 27(A)

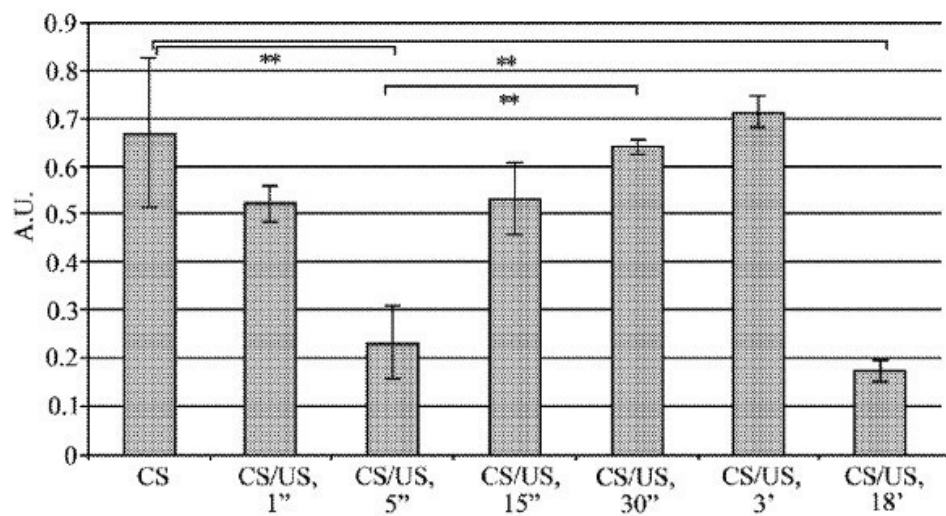


Figura 27(B)

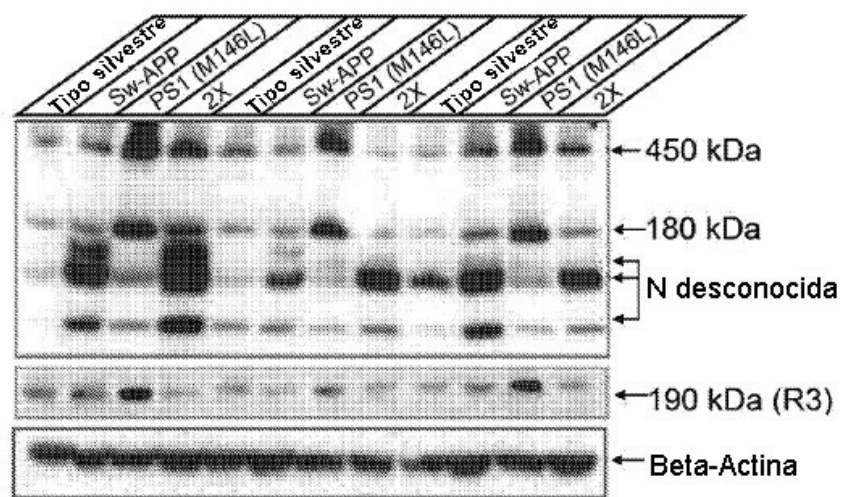


Figura 28(A)

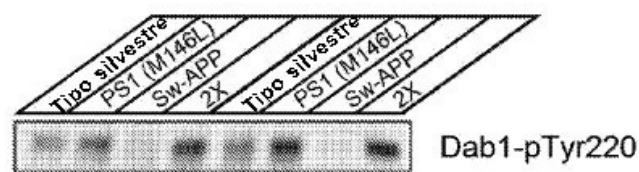


Figura 28(B)

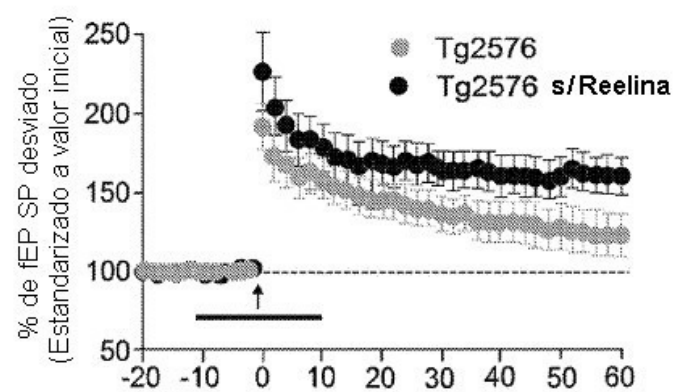


Figura 28(C)

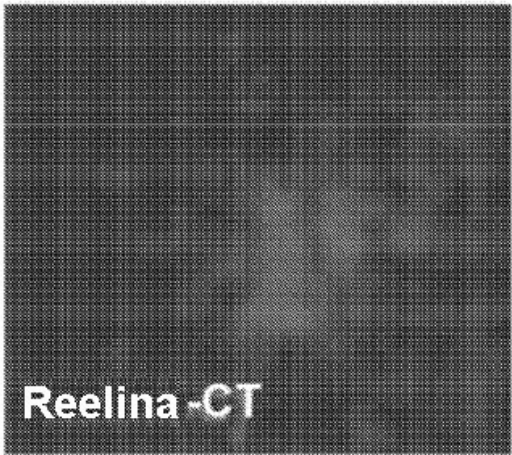


Figura 29(A)

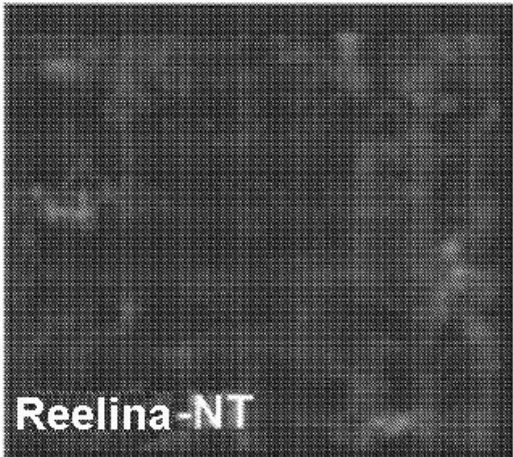


Figura 29(B)



Figura 29(C)

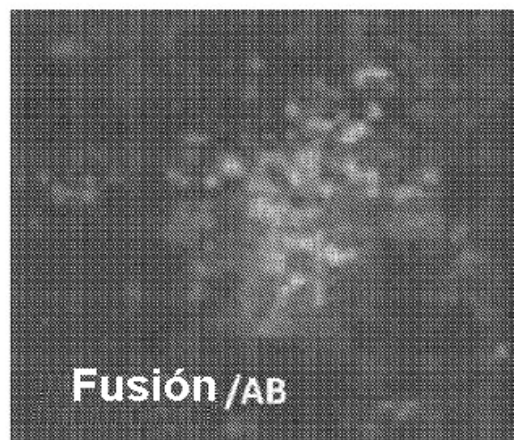


Figura 29(D)

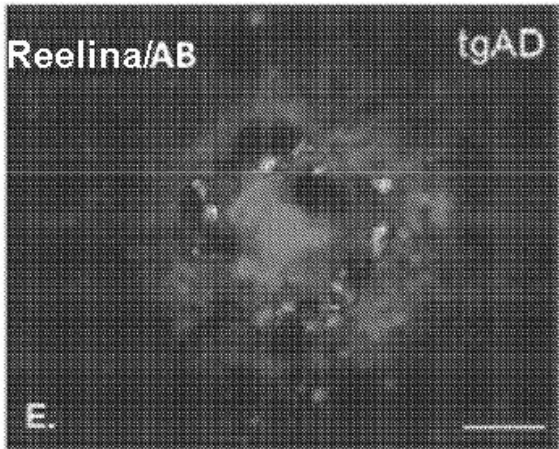


Figura 29(E)

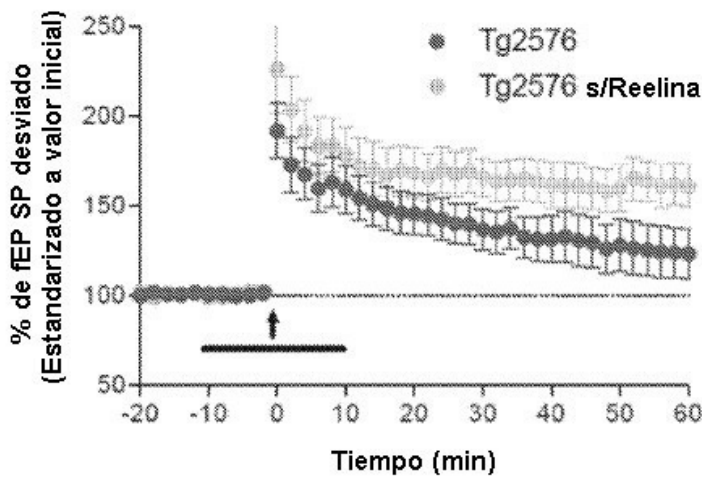


Figura 30

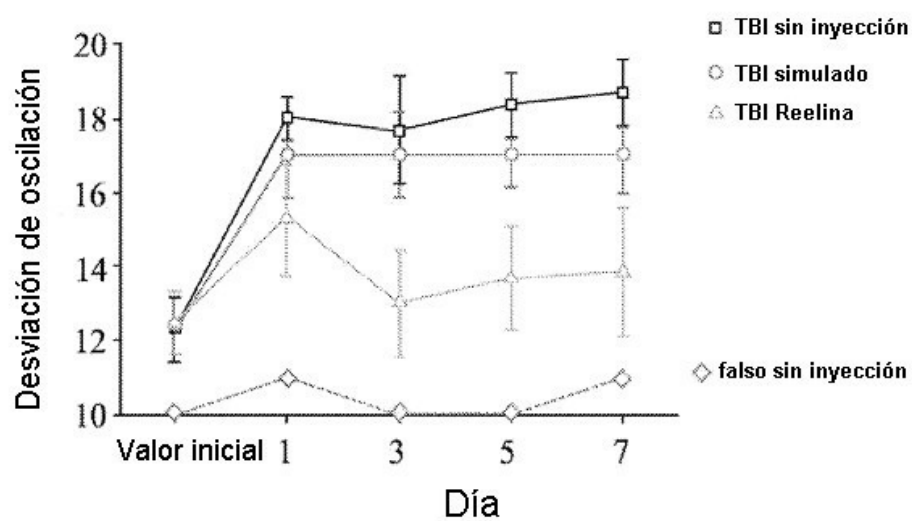


Figura 31

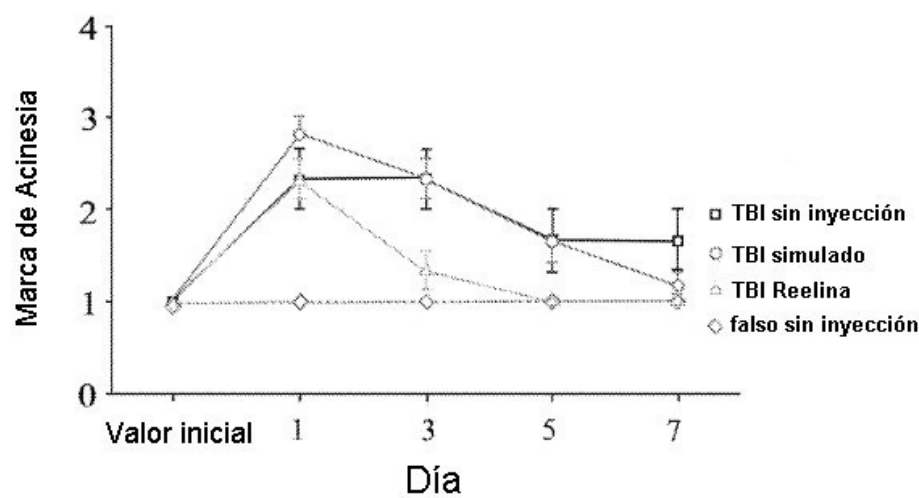


Figura 32

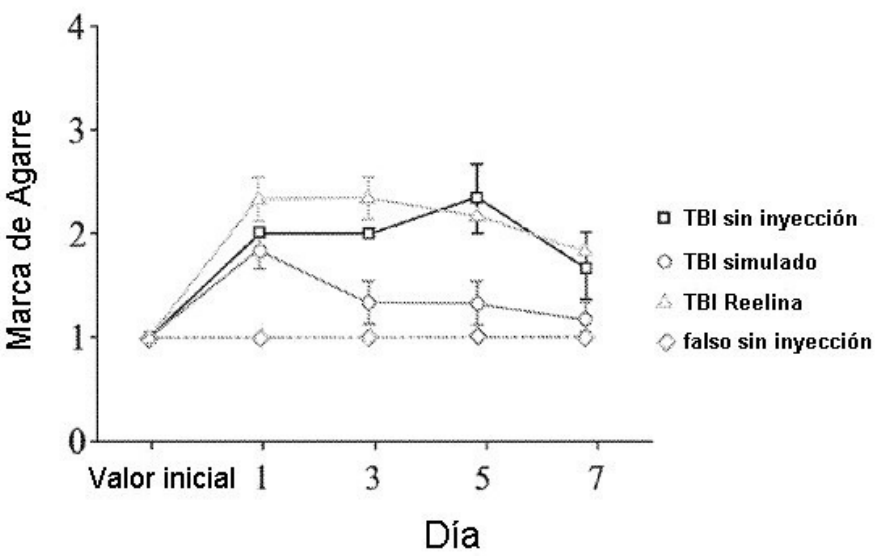


Figura 33

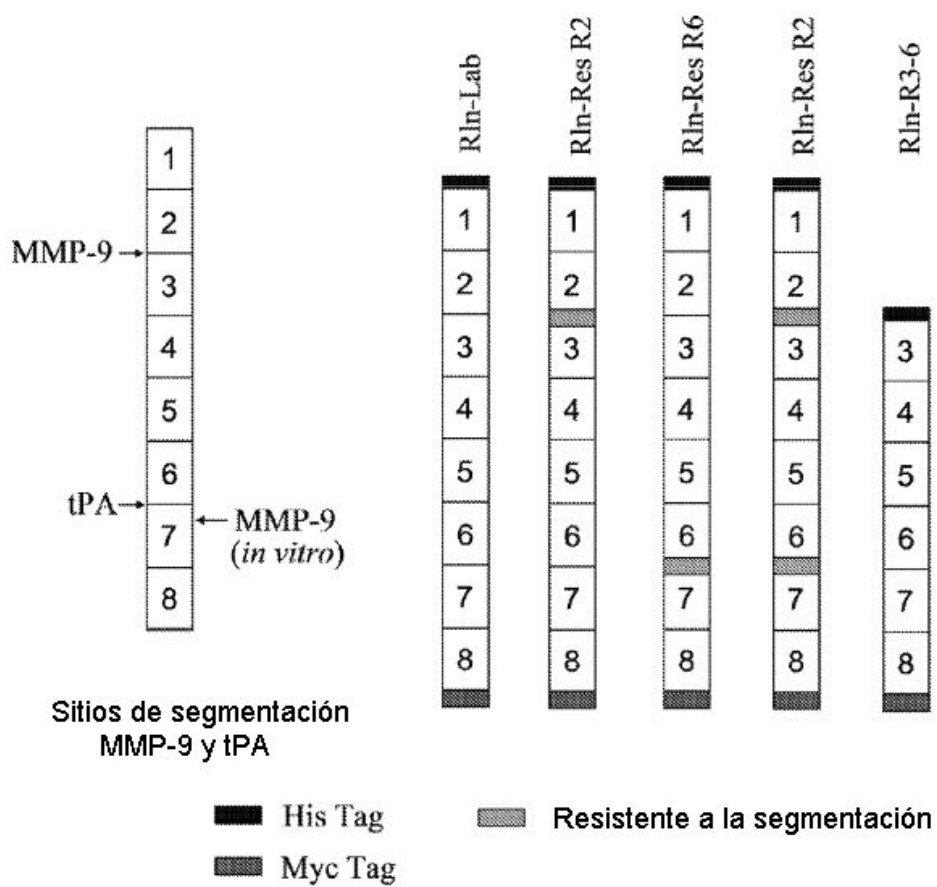


Figura 34

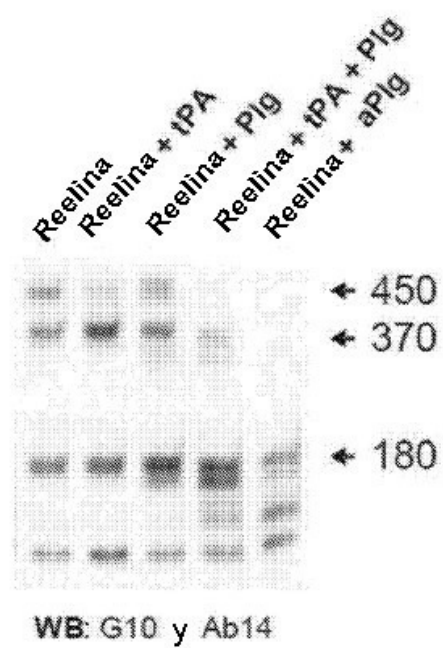


Figura 35(A)

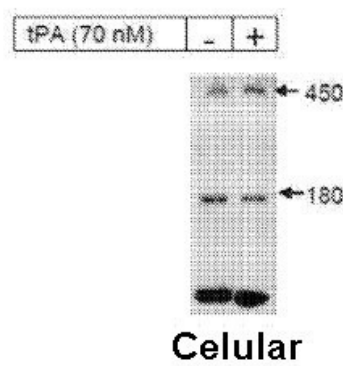


Figura 35(B)

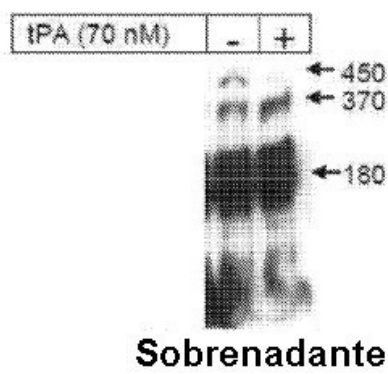


Figura 35(C)

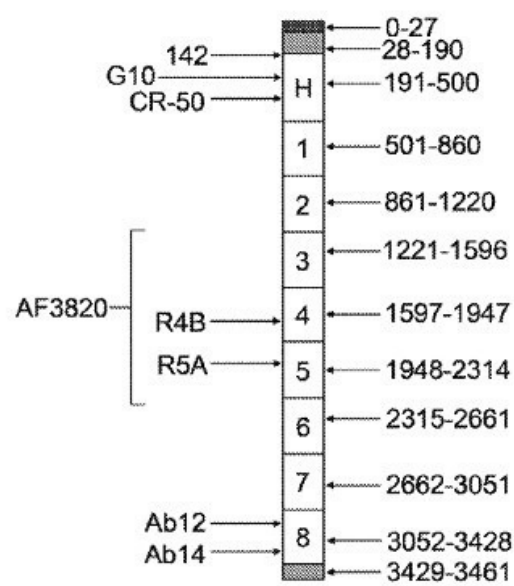


Figura 36(A)

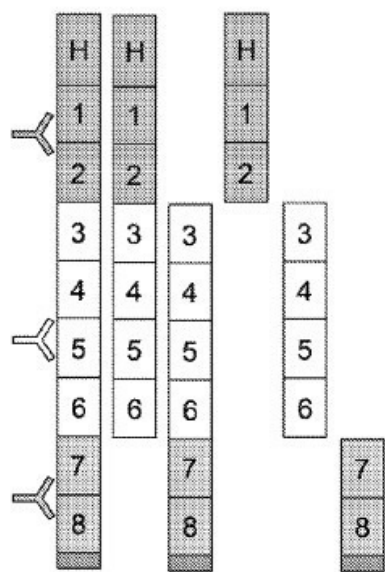


Figura 36(B)

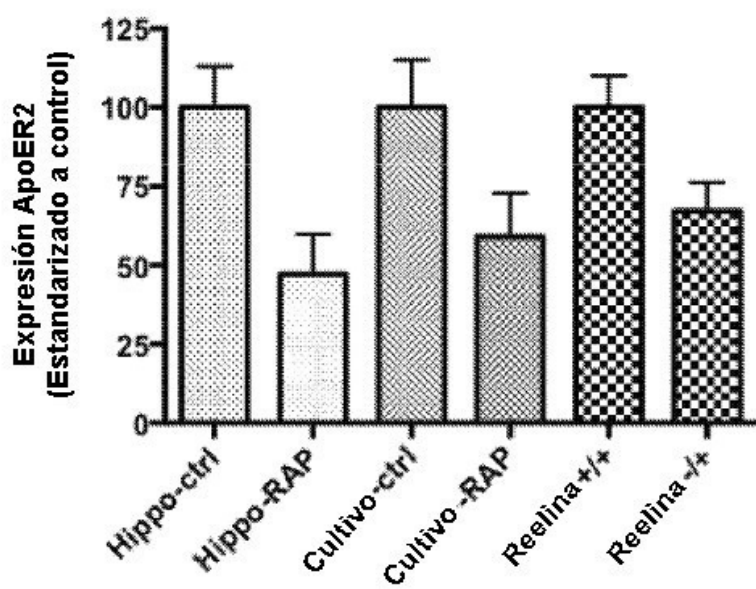


Figura 37

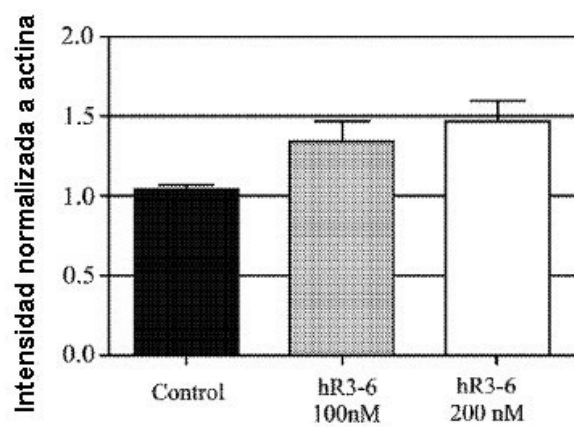


Figura 38(A)

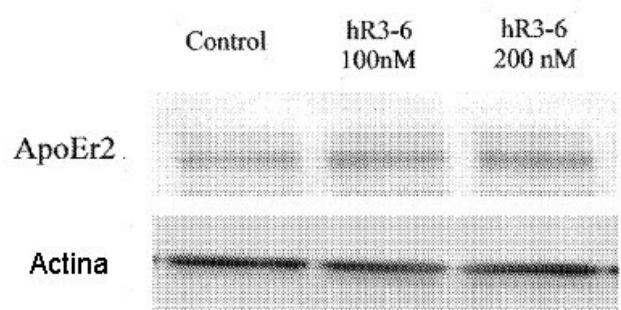


Figura 38(B)