



*DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA*

**Caracterización de factores de
transcripción estriatales para su uso en
la diferenciación de células madre.**

**Tesis presentada por Noelia Urbán Avellaneda
para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona**

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de diferenciación de las neuronas de proyección estriatales, iniciamos una búsqueda de genes que se expresaran selectivamente en el primordio estriatal durante la neurogénesis. La lista es bastante amplia, e incluye genes con funciones muy distintas, desde enzimas citosólicos a receptores de membrana. El grupo más numeroso, sin embargo, es el de los factores de transcripción. La capacidad de estas proteínas de inducir o reprimir la expresión génica, les confiere la capacidad de cambiar el estado de la célula. Por eso, su estudio es de vital importancia para conocer los profundos cambios a que están sometidos los precursores neurales hasta su conversión en neuronas maduras.

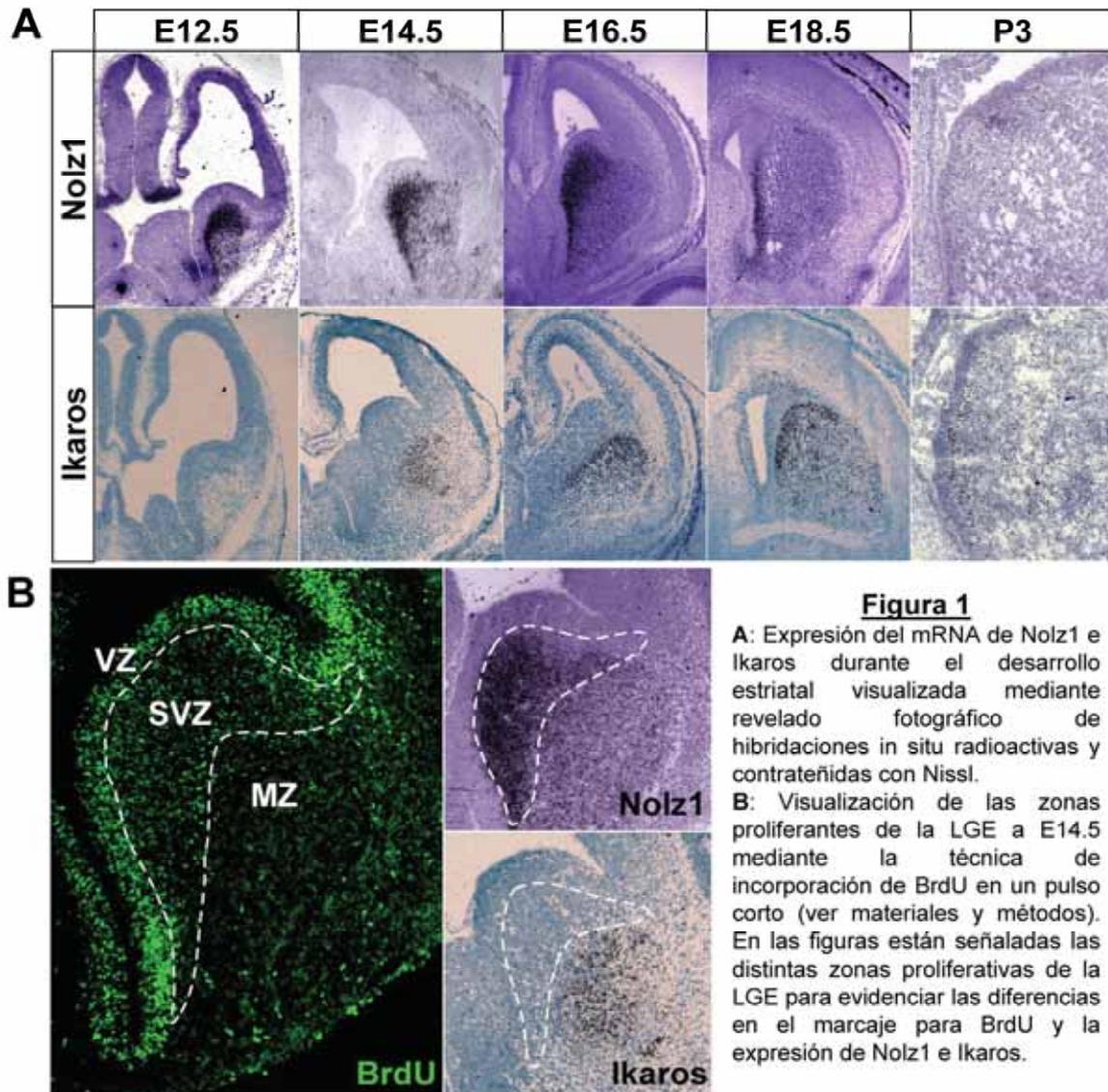
Entre todo el abanico de factores de transcripción, hay algunos que están ya descritos como fundamentales en ciertos aspectos del desarrollo estriatal, como *Islet1*, *Meis2* o *Ebf1* y otros de los que sabemos poco más que que su expresión está enriquecida en la LGE, como *Brn4*, *Nolz1*, *Ikaros1*, etc.,

En este trabajo, nos centramos en el estudio de dos de ellos: *Nolz1* e *Ikaros*.

En ambos trabajos nuestro primer objetivo ha sido la caracterización detallada de la expresión de estos genes durante el desarrollo estriatal. En ambos casos también, hemos utilizado el extraordinario potencial de las células madre para elucidar los cambios que estos factores de transcripción producen en las características y poder de diferenciación de las células madre.

1. Durante el desarrollo del núcleo estriado *Nolz1* se expresa en precursores neurales de la SVZ y el manto, mientras que la expresión de *Ikaros* está restringida a células postmitóticas en la zona del manto.

En primer lugar, quisimos saber cuáles son los dominios de expresión de *Nolz1* y de *Ikaros* en el estriado de ratón. Para ello, realizamos hibridaciones *in situ* en diferentes etapas del desarrollo con una sonda específica para el mRNA de cada uno de los genes.



La máxima expresión de *Nolz1* se da en la zona subventricular de la LGE a E14.5, aunque ésta comienza antes de E12.5 (figura 1A). La zona más indiferenciada, la VZ, aparece siempre limpia de expresión y el borde con la SVZ está perfectamente definido. A medida que avanza el desarrollo, la marca de *Nolz1* se va diluyendo, aunque sigue siendo intensa hasta E18.5. A edades

postnatales, coincidiendo con la desaparición de la SVZ, *Nolz1* pasa a expresarse sólo de forma débil en el estriado. Cabe destacar que desde el comienzo de su expresión, la zona del manto es también levemente positiva para *Nolz1*, aunque dicha expresión forma un gradiente con su nivel más alto en la SVZ.

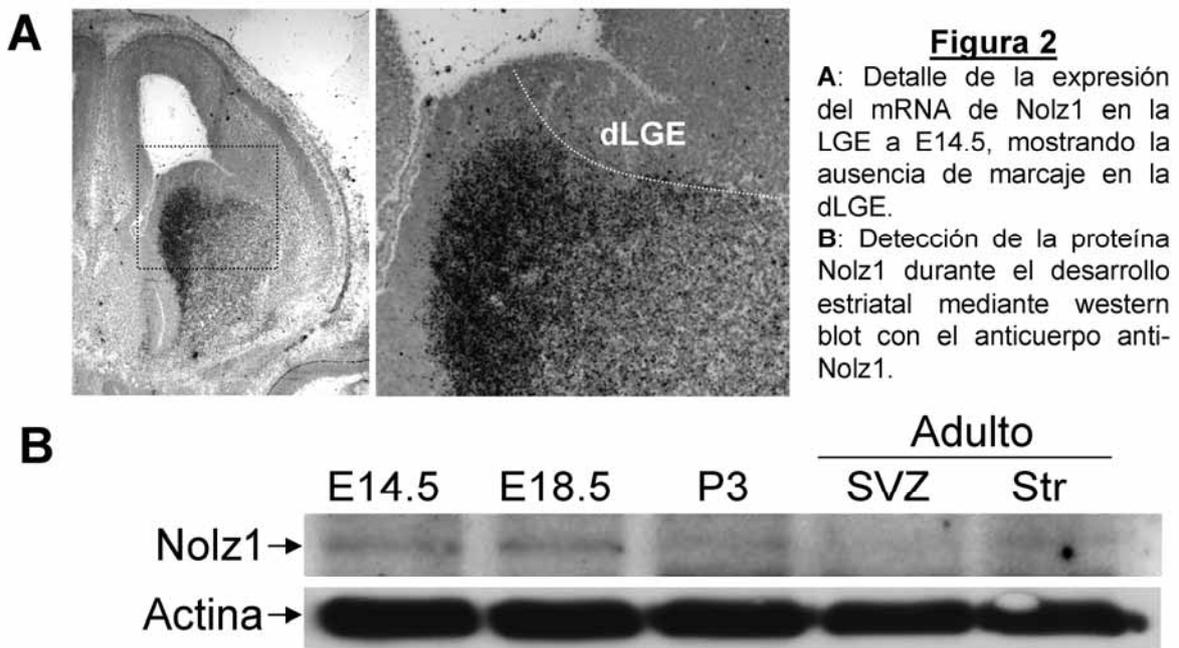
De la misma manera, se analizó el patrón de expresión de *Ikaros* durante el desarrollo del sistema nervioso central con una sonda que reconoce todas sus isoformas. Se observa que *Ikaros* se expresa exclusivamente en el núcleo estriado desde E14.5 hasta P3, presentando un pico de expresión a E18.5 (figura 1A). El mRNA de *Ikaros* se encuentra siempre en la zona del manto del núcleo estriado y muestra un gradiente de expresión dorsomedial a ventrolateral, de manera que la mayoría de las células que expresan *Ikaros* se encuentran en la transición entre la zona subventricular y el manto (figura 1B).

Para saber si las zonas de expresión de estos genes coinciden con las zonas de proliferación en el primordio estriatal, se realizó un estudio de incorporación de BrdU de las células de la LGE a E14.5. Como muestra la inmunohistoquímica de la figura 1B, la zona más marcada con BrdU es la VZ, seguida de la SVZ en que vemos abundantes células positivas pero en menor proporción. En el manto, en cambio, la presencia de células en división es prácticamente inexistente. Así, mientras que la SVZ, donde se expresa *Nolz1*, es una zona de precursores mitóticamente activos, en el manto, la zona de expresión de *Ikaros*, las células han salido ya del ciclo celular y comienzan su diferenciación. Ni la MGE ni la corteza presentan expresión de estos factores en ninguno de los puntos estudiados.

Dadas las claras diferencias en el estadio de desarrollo celular en que se expresan los factores que queremos analizar, se expondrán en primer lugar los resultados obtenidos del estudio de *Nolz1*, ya que aparece con anterioridad en el desarrollo, y a continuación los obtenidos del estudio de *Ikaros*.

2. Nolz1 se expresa en precursores neuronales que poblarán el núcleo estriado.

De manera similar a lo que ocurre entre VZ y SVZ, el borde entre pallium y subpallium queda marcado por la expresión de Nolz1, ya que la SVZ de la dLGE no expresa Nolz1 (figura 2A). En la dLGE se generan precursores que migrarán al bulbo olfatorio para diferenciarse a interneuronas. La falta de expresión en esta zona es, pues, un indicativo de que Nolz1 no interviene en la generación de las interneuronas del bulbo olfatorio, sino que las células que lo expresan forman parte del núcleo estriado.



Para comprobar que la expresión de la proteína se corresponde con la del mRNA, desarrollamos un anticuerpo policlonal de conejo contra el extremo N-terminal de Nolz1 (ver material y métodos, apartado 4). El western blot realizado a muestras estriatales extraídas en diferentes momentos del desarrollo, coincidió plenamente con los resultados de las hibridaciones *in situ*, siendo máxima la expresión de la proteína a edades tempranas, débil en el estriado adulto e inexistente en la SVZ adulta (figura 2B).

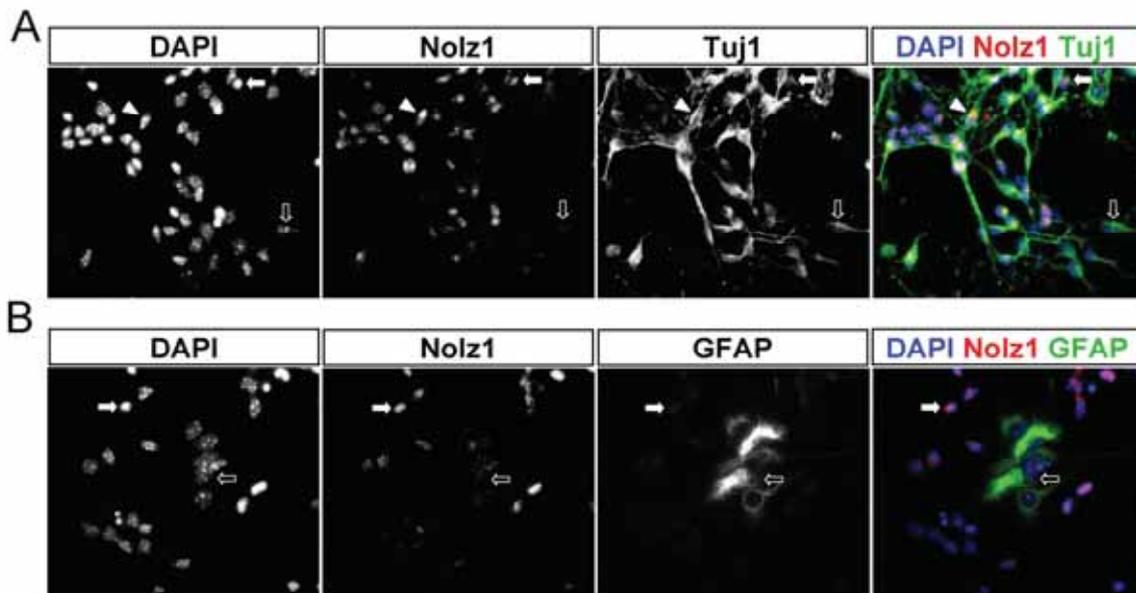
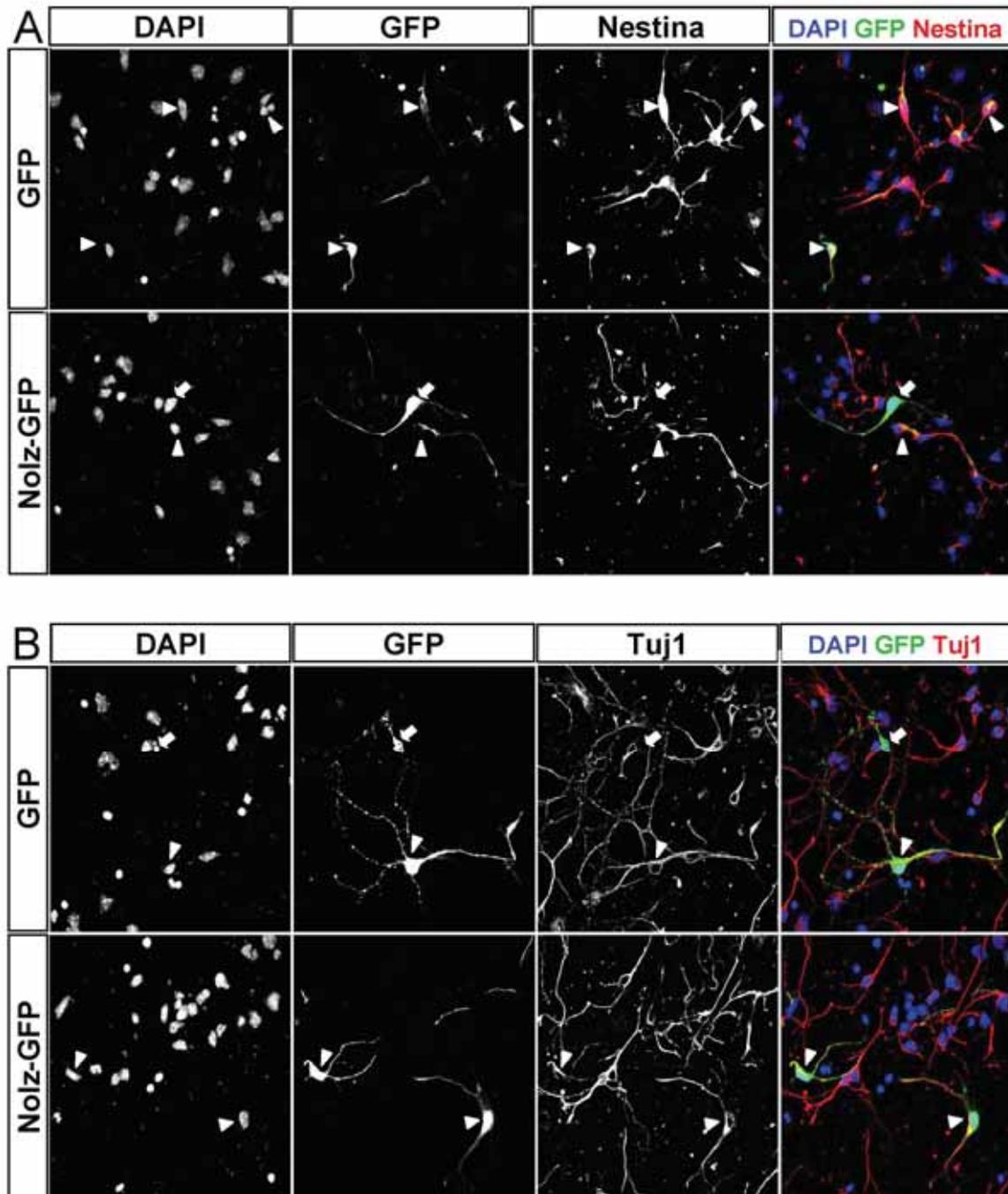


Figura 3

Colocalización en cultivos primarios de la LGE a E14.5 entre Nolz1 y marcadores neurales. Las flechas blancas indican células positivas para Nolz1 y negativas para el marcador neural. Las flechas negras señalan células positivas para el marcador neural pero negativas para Nolz1. Las puntas de flecha indican células positivas para los dos marcadores. **A:** Doble inmunocitoquímica Tuj1 y Nolz1, mostrando la colocalización entre ambos marcadores. **B:** Doble inmunohistoquímica GFAP y Nolz1 en cultivos primarios, en que es evidente la ausencia de doble marcaje.

Para caracterizar qué tipo de célula expresa Nolz1 analizamos si en cultivos primarios de la LGE de embriones de 14 días de gestación se conservaba la expresión de Nolz1. Además, mediante dobles inmunocitoquímicas, intentamos la colocalización de Nolz1 con distintos marcadores neurales. Como se observa en la figura 3, en los cultivos primarios diferenciados durante 5DIV, hay expresión de Nolz1 y ésta coincide con la expresión de tubulina (figura 3A), pero en ningún caso con GFAP (figura 3B). Para comprobar estos resultados, se transfectaron cultivos primarios con un plásmido que codifica para Nolz1 y GFP o un control sólo con GFP y se mantuvieron con FGF hasta los 5DIV, tras lo que se procesaron para realizar colocalizaciones entre GFP y diferentes marcadores neurales (figura 4). La doble inmunohistoquímica GFP-nestina reveló que mientras que se encuentran bastantes células control con doble marcaje, las células que sobreexpresan Nolz1 raramente son también positivas para nestina (figura 4A). De hecho, sólo encontramos doble marcaje en unas pocas células que eran justamente las menos positivas para GFP. Por el contrario, la gran mayoría de células transfectadas con Nolz1 colocalizaban con Tuj1 (figura 4B), y en menor medida, con Map2 (figura 4C), un marcador de neuronas más maduras. Coincidiendo con el resultado obtenido con el anticuerpo anti-Nolz1, no

encontramos ninguna célula transfectada con Nolz1 que fuera positiva para GFAP, a diferencia de las células control (figura 4D). El bajo porcentaje de oligodendrocitos en el cultivo ha hecho que no observemos colocación entre GFP y O4 ni en las células control ni en las que sobreexpresan Nolz1 (resultado no mostrado).



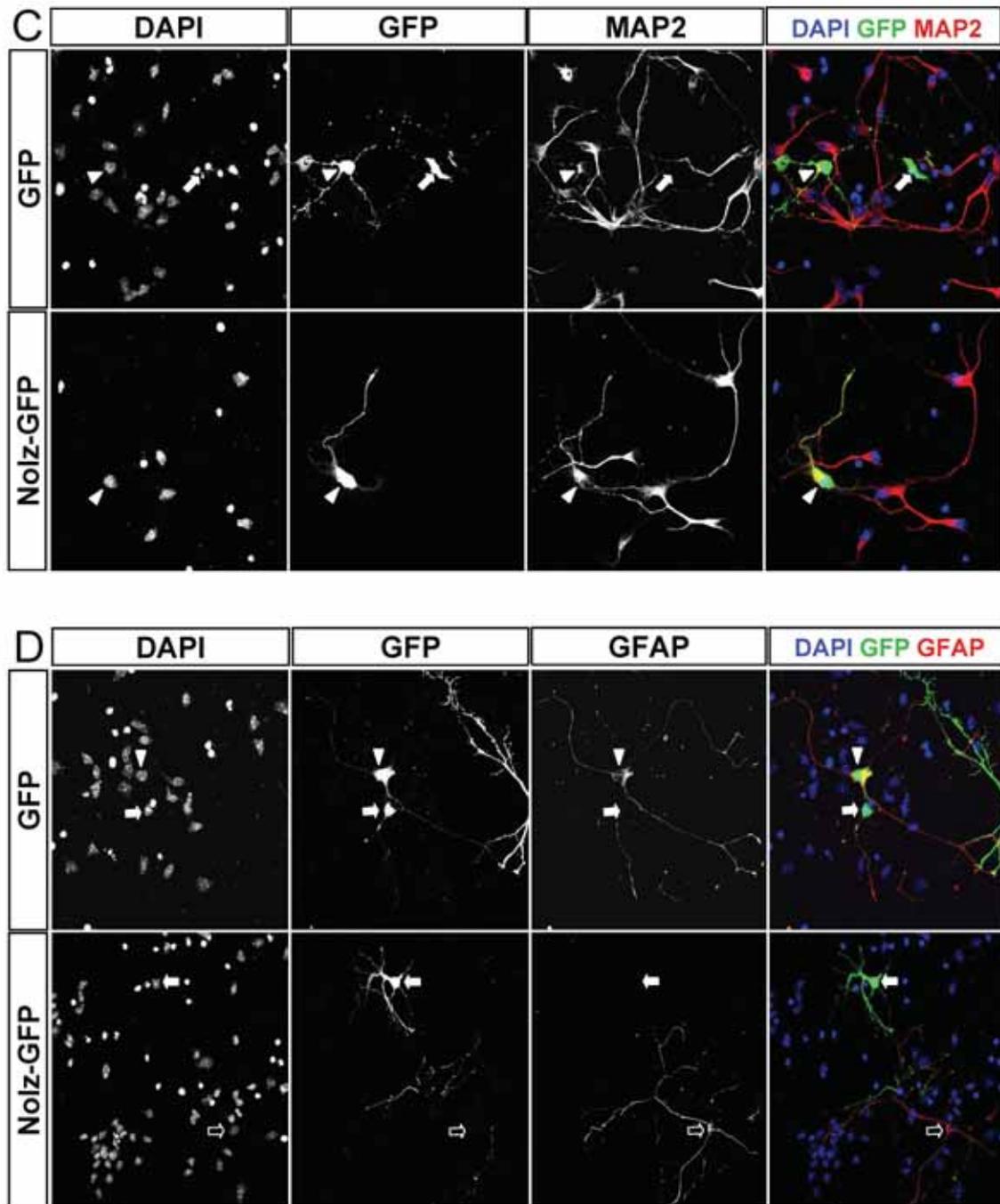
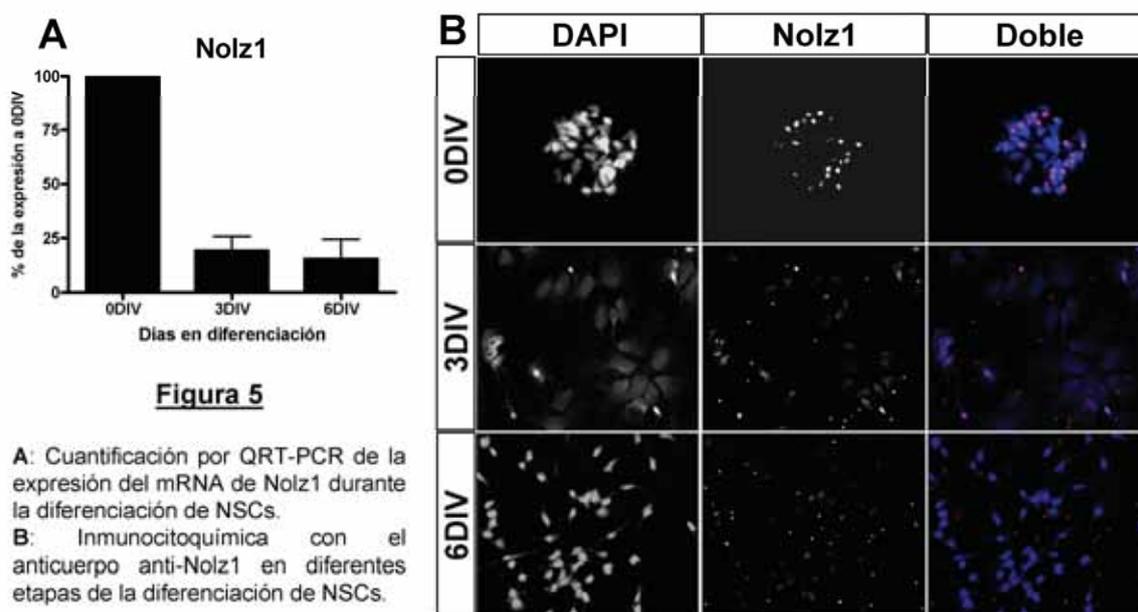


Figura 4

Colocalización entre GFP y marcadores neurales en cultivos primarios transfectados con un plásmido control GFP o uno GFP-Nolz1 . Las flechas blancas indican células positivas para GFP y negativas para el marcador neural. Las flechas negras señalan células positivas para el marcador neural pero negativas para GFP. Las puntas de flecha indican células positivas para los dos marcadores. **A:** Doble inmunocitoquímica Nestina y GFP **B:** Doble inmunocitoquímica Tuj1 y GFP. **C:** Doble inmunocitoquímica MAP2 y GFP. **D:** Doble inmunocitoquímica GFAP y GFP.

3. La sobre-expresión de Nolz1 en neuroesferas afecta negativamente a su capacidad proliferativa y autorenovadora.

Para conocer más sobre la posible regulación de Nolz1 de la diferenciación estriatal, usaremos como modelo la diferenciación de neuroesferas provenientes de la LGE de E14, por lo que es fundamental conocer el estado de la expresión de Nolz1 en las mismas. Para ello, neuroesferas de pase 4 a 8 de diferentes cultivos fueron diferenciadas con el protocolo descrito en materiales y métodos (apartado 2.2.1). Se recogieron muestras para RT-PCR y WB a 0, 3 y 6DIV de diferenciación.



Como vemos en la figura 5A, la expresión del mRNA de Nolz1 es máxima en las neuroesferas indiferenciadas y disminuye drásticamente desde los 3DIV de diferenciación. No se encuentran diferencias significativas entre los 3 y 6DIV. Este mismo resultado se obtuvo también a nivel de proteína por inmunocitoquímica (figura 5B). Estos resultados sugieren que Nolz1 puede tener un papel en el mantenimiento de las NSCs, por lo que a continuación se analizaron las características de células madre de las neuroesferas, su proliferación y capacidad de auto-renovación.

Para ello, se estudió el efecto de incrementar o disminuir la expresión de Nolz1 en neuroesferas obtenidas de LGEs de ratones a E14.5. Para la sobre-expresión, las células fueron transfectadas mediante nucleofección con el plásmido phNolz1-IRES-DsRED, que codifica para la secuencia codificante completa del gen humano correspondiente a Nolz1, o con el plásmido control

pIRES-DsRED (ver apartado 2.2.1 en materiales y métodos). En el caso del estudio de la reducción de Nolz1, se transfectó un cóctel de 3 siRNAs contra el mRNA de Nolz1 a una concentración de $2\mu\text{M}$, o esa misma concentración de un siRNA control que no reconoce ningún mRNA (figura 1 de materiales y métodos). Tras la transfección, las neuroesferas se dejaron en medio de proliferación durante 2 ó 5DIV y se recogieron muestras para el análisis de la expresión génica por RT-PCR. Como se puede observar en la figura 6A, la transfección de Nolz1 humano (hNolz1) en las neuroesferas es altamente efectiva y se mantiene su expresión al menos hasta los 5DIV; además, la expresión del Nolz1 endógeno (mNolz1), se reduce significativamente, sugiriendo que la concentración de esta proteína está fuertemente controlada en las NSCs. La transfección del cóctel de siRNAs, consigue disminuir el mRNA de Nolz1 en más del 50% (figura 6B).

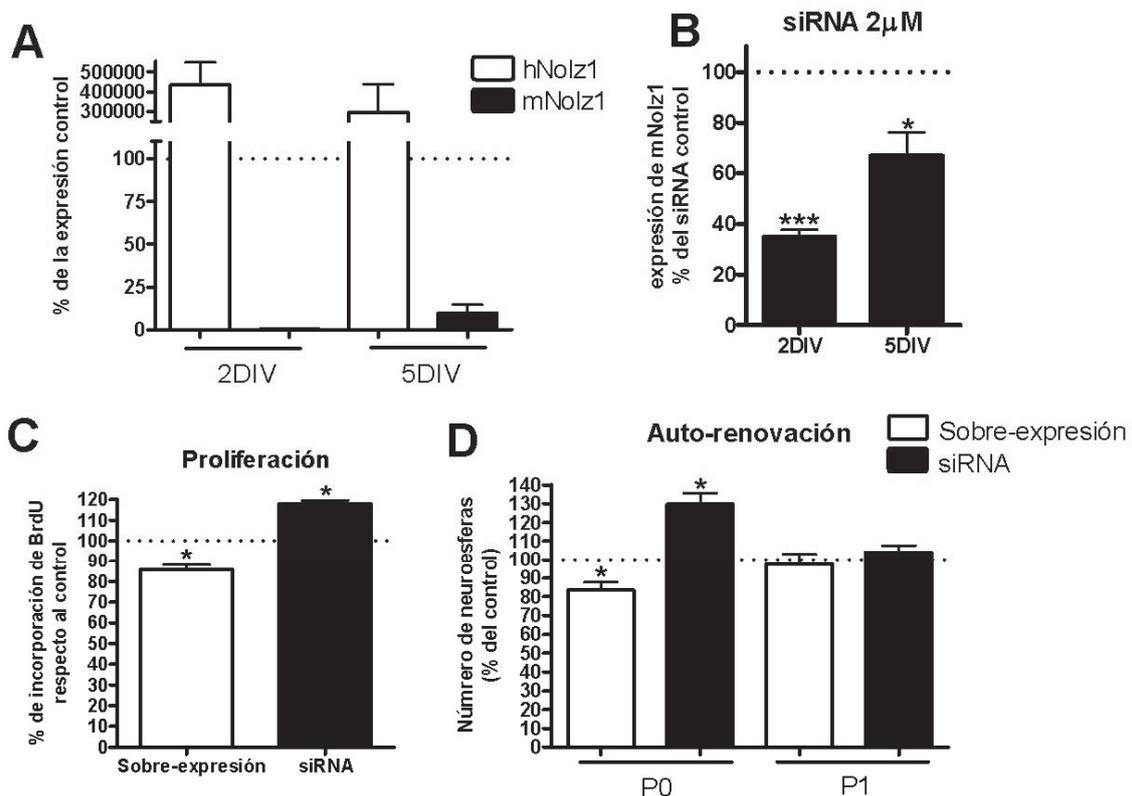


Figura 6

A: Expresión de hNolz1 y mNolz1 en neuroesferas transfectadas con el vector que codifica para hNolz1 2 y 5 días después de la transfección. **B:** Expresión de mNolz1 en neuroesferas transfectadas con un cóctel de 3 siRNAs contra el mRNA de Nolz1 2 y 5 días después de la transfección. **C:** Cuantificación de la incorporación de BrdU en neuroesferas 2 días después de ser transfectadas con hNolz1 o siRNA contra Nolz1. Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control. **D:** Contaje del número de neuroesferas obtenidas tras la transfección con hNolz1 o siRNA contra Nolz1. Se muestra el efecto a los 5 días de la transfección (P0) y a los 10 días, tras volver a disgregar las neuroesferas (P1). Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control.

Para analizar los efectos en proliferación, se transfectaron las NSCs, y se sembraron a concentración limitante en medio de proliferación. A los 2DIV, se dejó que las células se adherieran a placas tratadas con matrigel y se les realizó un pulso de BrdU de 10 minutos, tras el que fueron inmediatamente fijadas para su procesamiento inmunocitoquímico. El recuento de la incorporación de BrdU dio como resultado que la sobre-expresión de Nolz1 disminuye alrededor de un 20% la proliferación de las neuroesferas, mientras que su reducción la incrementa en un porcentaje similar (figura 6C). Por otra parte, a los 5DIV de la nucleofección, se contó el número de neuroesferas originadas a partir de un número determinado de células, parámetro que se utiliza como indicador de la capacidad de auto-renovación de las NSCs. De nuevo, la sobre-expresión de Nolz1 disminuye el número de nuevas neuroesferas, y su reducción lo incrementa (figura 6E). Al volver a disgregar estas neuroesferas y realizar el mismo procedimiento, ya no encontramos diferencias entre las condiciones, ya que la transfección es transitoria. Pese a que estos resultados pueden parecer contradictorios con el hecho de que la máxima expresión de Nolz1 esté en las neuroesferas más indiferenciadas (figura 5A), no debemos olvidar que no se trata de agrupaciones celulares homogéneas sino que constan de varios tipos de precursores junto a células más diferenciadas (Suslov et al., 2002). Además, estos resultados, junto al hecho de que no hay expresión *in vivo* en la zona donde residen los precursores estriatales más indiferenciados y proliferativos (la VZ), indican que Nolz1 se expresa en un progenitor intermedio.

Dado que la vía de Notch es la principal controladora de la auto-renovación y proliferación tanto de las neuroesferas como de los precursores neurales *in vivo*, estudiamos por RT-PCR lo que ocurre con algunos de los genes más importantes que forman parte de ella. Se realizó el análisis de sobre-expresión y silenciamiento de Nolz1 a 2 y 5DIV tras la nucleofección correspondiente (figura 7). Como se observa, la expresión de hNolz1 no produjo cambios significativos en ninguno de los genes estudiados ni a 2 ni a 5DIV (figura 7A). En el caso del siRNA, en cambio, vemos una disminución específica de Notch3, Delta1 y Deltex1 a 2DIV (figura 7B). A esta disminución se suma a 5DIV la de Notch1 y Mash1 (figura 7B). Pese a que, como hemos dicho, la sobre-expresión no da resultados estadísticamente significativos, cabe

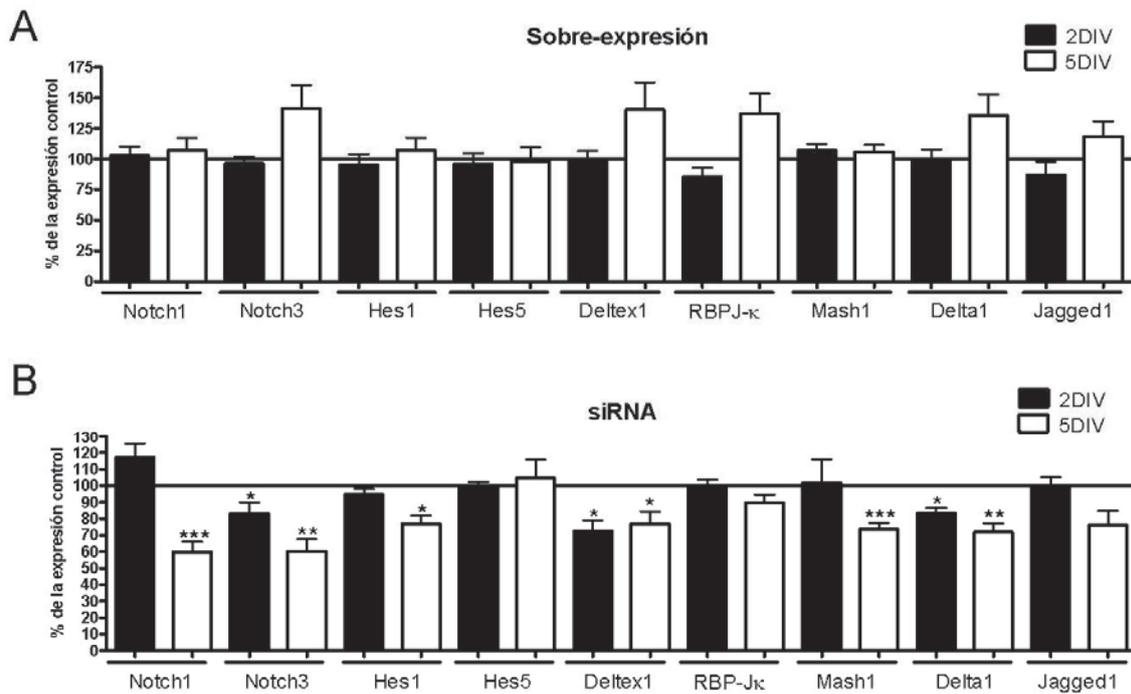


Figura 7

A: Efectos de la expresión de hNol1 (pIRES-DsRED-hNol1) sobre diversos genes de la vía de Notch 2 y 5 días tras la transfección. Los valores son relativos a la transfección control (pIRES-DsRED).

B: Efectos de la disminución de Nolz1 mediante siRNA sobre diversos genes de la vía de Notch 2 y 5 días tras la transfección. Los valores son relativos a la transfección con un siRNA control.

destacar que los genes que más incrementan a 5DIV coinciden con los primeros en disminuir en respuesta al siRNA.

Por tanto, podemos decir que la falta de Nolz1 produce una desregulación de algunos de los genes de la vía de Notch. Dada la complejidad del sistema, no es posible concretar el efecto que se puede derivar de esta desregulación, y sería necesario realizar muchos análisis complementarios para comprenderlo.

En condiciones normales, la vía de Notch no sólo regula la proliferación de los precursores neurales, sino que también interviene en la decisión del tipo neural en que se convertirá la célula. Por eso, a continuación estudiamos si incrementar Nolz1 tenía algún efecto sobre la diferenciación de las NSCs además de sobre su proliferación y auto-renovación.

4. La sobre-expresión de Nolz1 en neuroesferas induce la expresión de marcadores de precursores oligodendrogliales.

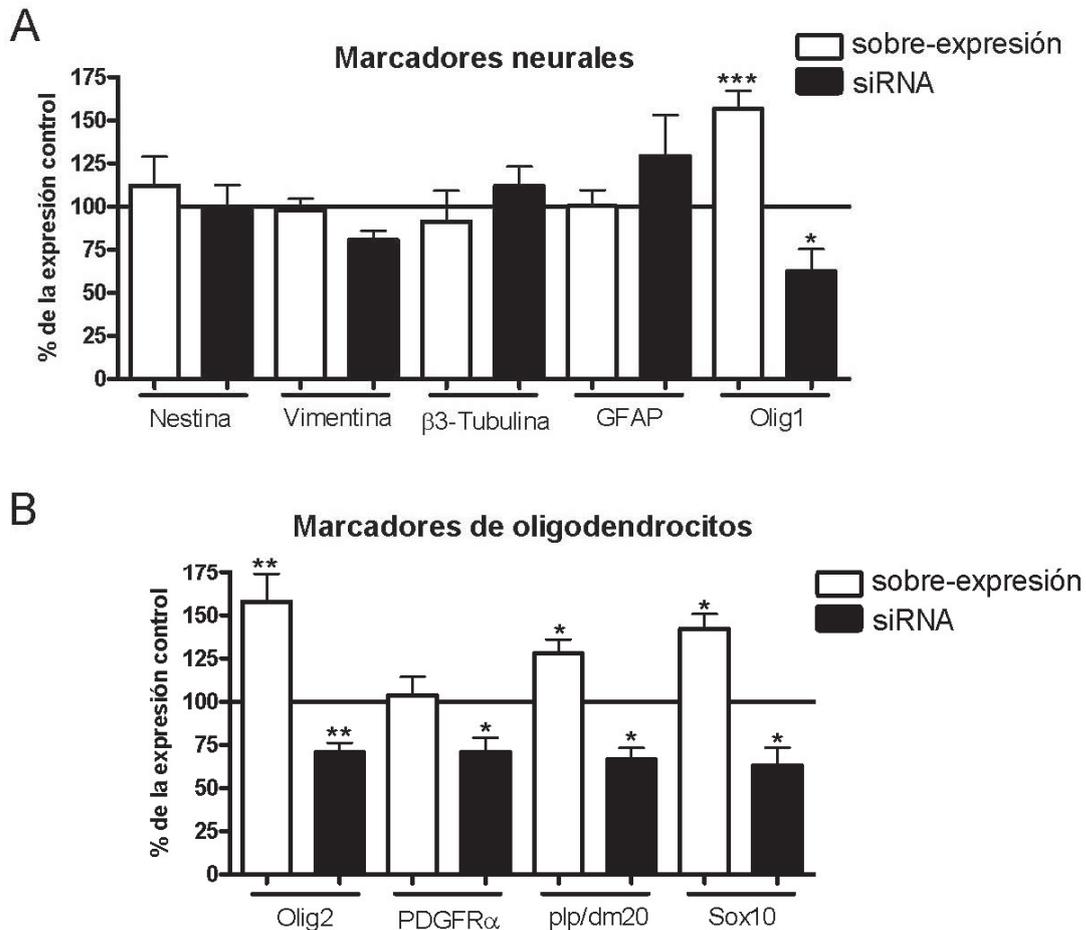


Figura 8

A: Efectos de la expresión de hNolz1 o siRNA contra Nolz1 sobre diversos genes implicados en la diferenciación neural a los 5 días de la transfección. Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control. **B:** Efectos de la expresión de hNolz1 siRNA contra Nolz1 sobre diversos genes relacionados con la diferenciación oligodendroglial a los 5 días de la transfección. Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control.

Para continuar con la caracterización de los efectos de Nolz1, se analizaron varios marcadores neurales por RT-PCR en las neuroesferas en proliferación (5DIV) nucleofectadas con hNolz1 o con siRNA. Como vemos en la figura 8A, el incremento o disminución de Nolz1 no afecta a la expresión de marcadores de precursores neurales como nestina o vimentina, ni a la del marcador de neuronas inmaduras β -III-tubulina ni al de astrocitos GFAP. El único gen afectado es Olig1, un factor de transcripción implicado en la generación de oligodendrocitos, que incrementa en respuesta al incremento de Nolz1 y disminuye en el experimento de siRNA.

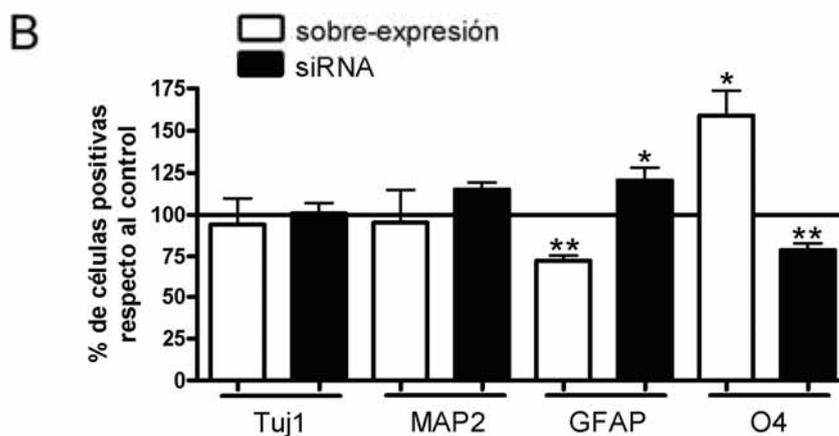
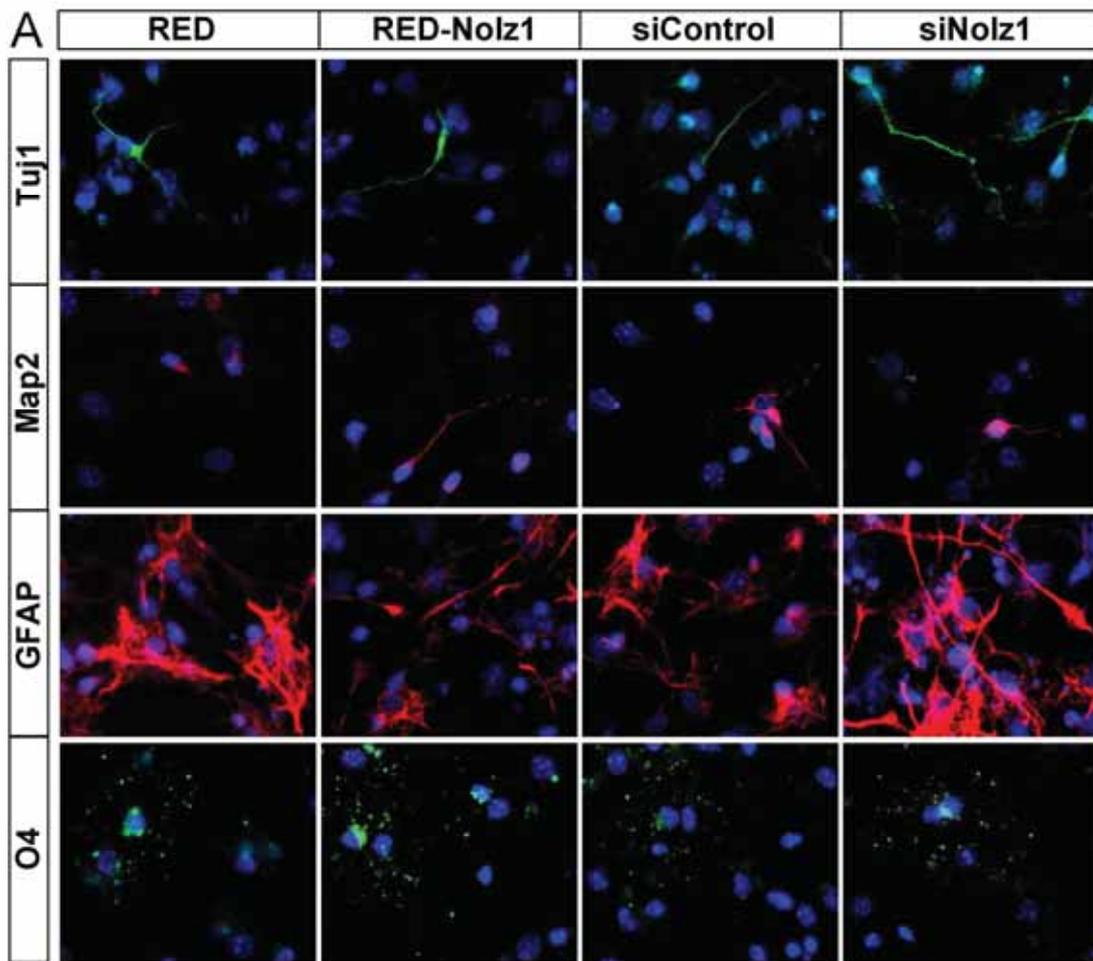


Figura 9

A: Inmunocitoquímicas para distintos tipos neurales, neuronas (tuj1 y MAP2), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos (O4) tras la transfección de pIRES-DsRED (RED), pIRES-DsRED-hNolz1 (RED-Nolz1), un siRNA que no reconoce ningún mRNA (siControl) o un cóctel de tres siRNAs contra Nolz1 (siNolz1)

B: Cuantificación del número de células positivas para los distintos marcadores de tipo neural. Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control.

intervienen en la diferenciación de los oligodendrocitos: Olig2, PDGFR α , plp/dm20 y Sox10. Todos estos factores, excepto PDGFR α , en el que no vimos variación en sobre-expresión, se encuentran significativamente incrementados

en el experimento de sobre-expresión y disminuidos en el de silenciamiento de Nolz1 (figura 8B).

Visto que Nolz1 podría estar favoreciendo la adquisición del fenotipo oligodendroglial de los precursores neurales, diferenciamos las neuroesferas tras la nucleofección mediante el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, y tras fijarlas a 6DIV se realizaron inmunocitoquímicas para los diferentes tipos neurales (figura 9). El recuento celular confirmó los resultados previos en proliferación, ya que se observa un incremento de oligodendrocitos, reconocidos mediante el marcador O4, en la sobre-expresión y una disminución en el silenciamiento de Nolz1 (figura 9B). Además, observamos diferencias en el número de astrocitos, marcados con GFAP. En este caso, parece que la presencia de Nolz1 evita la aparición de este marcador, y su ausencia la favorece.

Así, la expresión de Nolz1 en neuroesferas derivadas de la LGE de E14.5 promueve la diferenciación hacia precursores oligodendrogiales a la vez que evita la formación de astrocitos.

5. La expresión de Nolz1 no se mantiene en oligodendrocitos, pero es necesaria para la correcta aparición de los precursores oligodendrogiales plp/dm20 en la LGE.

A continuación, añadimos distintos factores (FGF, PDGF o FBS) durante la diferenciación de las NSCs para enriquecer los cultivos en los distintos tipos neurales. La presencia de FGF promueve la aparición de neuronas en cultivo a la vez que inhibe la diferenciación a astrocitos (Ito et al., 2003). El PDGF se ha implicado en la diferenciación oligodendroglial, y la presencia de suero en el medio promueve la diferenciación astrogial debido a la gran cantidad de citoquinas en el mismo. Tras 3 o 6DIV, se recogieron muestras para analizar la expresión de Nolz1 en cada una de las condiciones. Como se observa en la figura 10, en todos los casos la diferenciación provoca una reducción en la expresión de Nolz1 respecto a las células indiferenciadas. La expresión de Nolz1 sigue disminuyendo a los 6DIV respecto a los 3DIV de diferenciación en el caso de las condiciones en presencia de PDGF y FBS, pero no en la de FGF. Así pues, no observamos una conservación de la expresión de Nolz1 en los cultivos enriquecidos en oligodendrocitos.

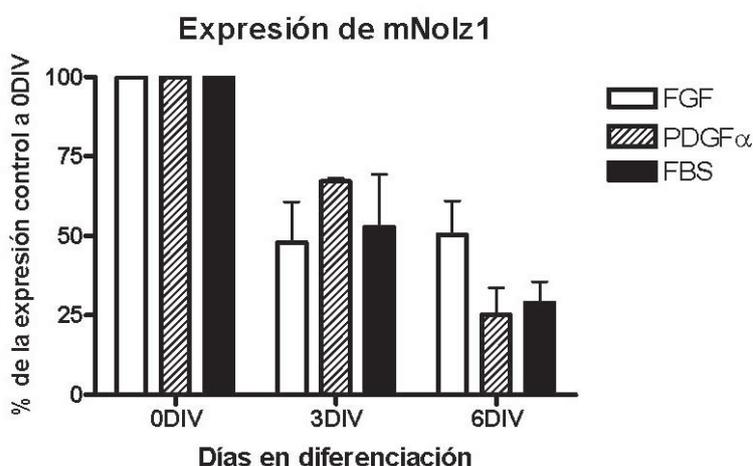


Figura 10

Expresión de Nolz1 durante la diferenciación de NSCs en cultivos enriquecidos en neuronas (FGF), oligodendrocitos (PDGF α) o astrocitos (FBS). Los valores están relativizados a la expresión en neuroesferas proliferantes.

A continuación, decidimos comprobar si los efectos de Nolz1 sobre el linaje oligodendroglial en NSCs se corresponden con su papel in vivo. Para ello realizamos estudios de sobreexpresión y disminución de Nolz1 en cultivos organotípicos de la LGE a E14.5, y los analizamos dos días después (a lo que equivaldría a E16.5, la edad en que se generan los oligodendrocitos de la LGE). En primer lugar, quisimos ver si el efecto sobre la proliferación se produce también en este sistema. La electroporación de hNolz1 en la VZ-SVZ

de la LGE produce una reducción en el marcaje del marcador proliferativo Ki67 respecto al lado control transfectado con el vector vacío (figura 11A).

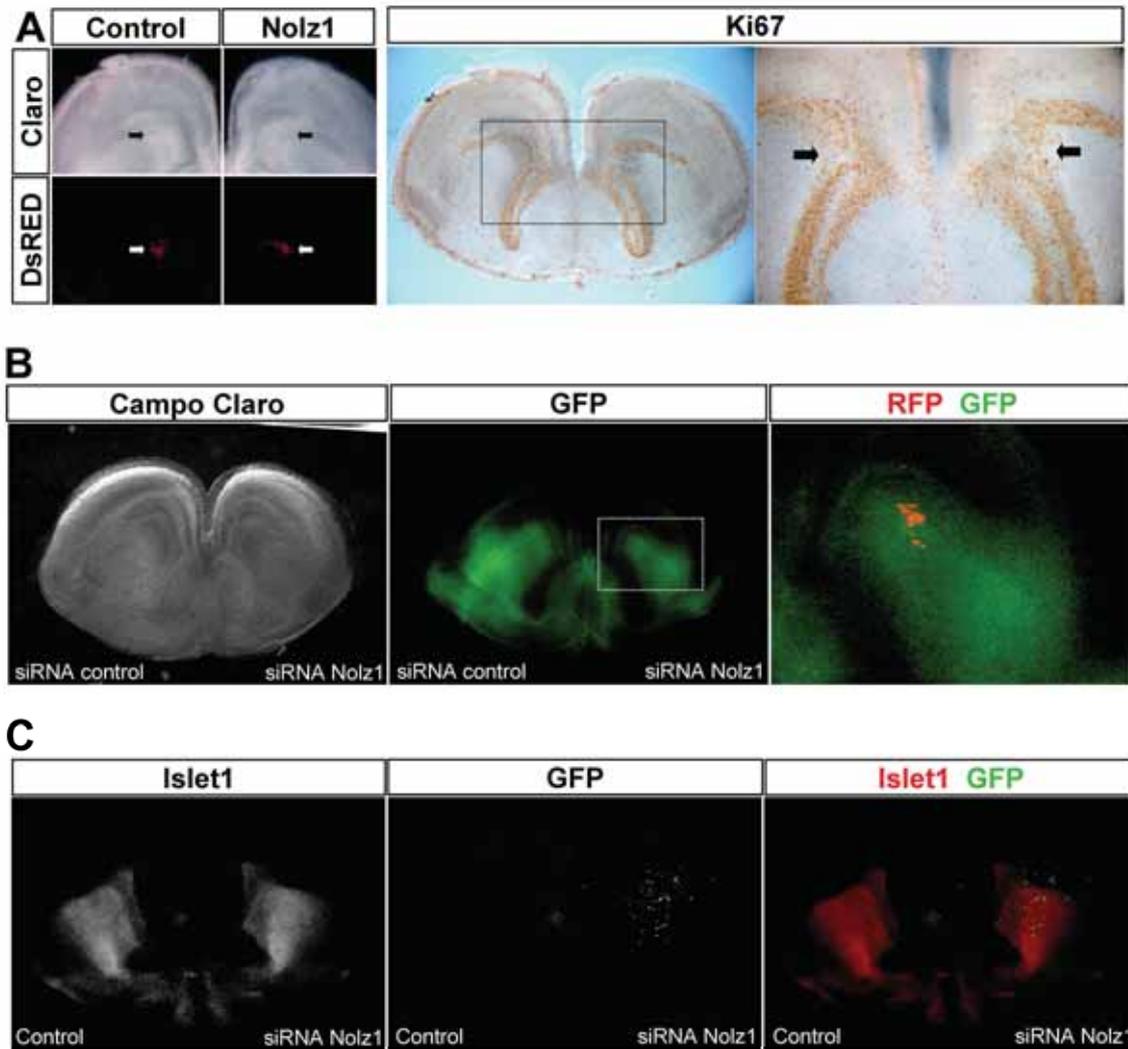


Figura 11

A: Efecto de la electroporación de hNolz1 en rodajas del telencéfalo a E16. Las flechas marcan la zona electroporada con el vector control (lado izquierdo) o el vector que codifica para hNolz1 (lado derecho), visualizada por la expresión de la proteína fluorescente roja DsRED. En la inmunohistoquímica para el marcador proliferativo Ki67 se observa una disminución de la marca en el lado transfectado con Nolz1. **B:** Electroporación de siRNA control y contra Nolz1 en ratones transgénicos plp/dm20-GFP. Se observa una disminución de la fluorescencia en la zona electroporada con el siRNA contra Nolz1 respecto a la zona electroporada con el siRNA control. El recuadro de la imagen central, se encuentra ampliado en la figura de la derecha, mostrando la zona de transfección gracias a la cotransfección con un plásmido que codifica para RFP (Red Fluorescent Protein). **C:** Inmunohistoquímica contra el marcador neuronal Islet1 tras la electroporación de siRNA contra Nolz1 en ratones salvajes. Se observa que la zona electroporada (marcada por la cotransfección de un vector que codifica para GFP) tiene una expresión normal de Islet1.

Para evaluar el efecto de Nolz1 sobre la especificación de oligodendrocitos, utilizamos ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor del gen plp/dm20, que se considera un marcador temprano de precursores oligodendrogiales (Timsit et al., 1992) y, como hemos visto, responde a Nolz1 en NSCs. Dado que la expresión de Nolz1 es elevada en la

LGE, electroparamos siRNA de Nolz1 o control en la VZ-SVZ para ver si su ausencia tiene algún efecto sobre la expresión de plp/dm20. Como se observa en la figura 11B, la LGE en que se había disminuido la expresión de Nolz1 mediante siRNA presentaba una reducción en el marcaje de GFP respecto al lado control. Cabe destacar que la electroporación de hNolz1 en los animales plp-dm20/GFP no produce un incremento en la expresión de GFP ni en el septum ni en la corteza (resultados no mostrados). Para comprobar que no se trata de un efecto general en la expresión génica, realizamos el mismo experimento en animales control y analizamos la expresión del marcador de neuronas estriatales inmaduras Islet1, sin encontrar diferencias entre el lado experimental y el lado control (figura 11C).

6. La expresión de Nolz1 en la LGE o en NSCs no está regulada por RA pero depende de Gsh2.

En la zona reguladora del promotor del gen que codifica para Nolz1, se ha identificado un elemento de respuesta a RA o RARE (del inglés Retinoic Acid Response Element). Además, la adición de RA a células PC12 consigue incrementar su expresión (Chang et al., 2004). Por este motivo, quisimos saber la posición que ocupa Nolz1 en esta cascada de regulación.

Dado que la principal fuente de RA a la edad en que comienza a expresarse Nolz1 en el estriado es el mesénquima de la cabeza y la propia

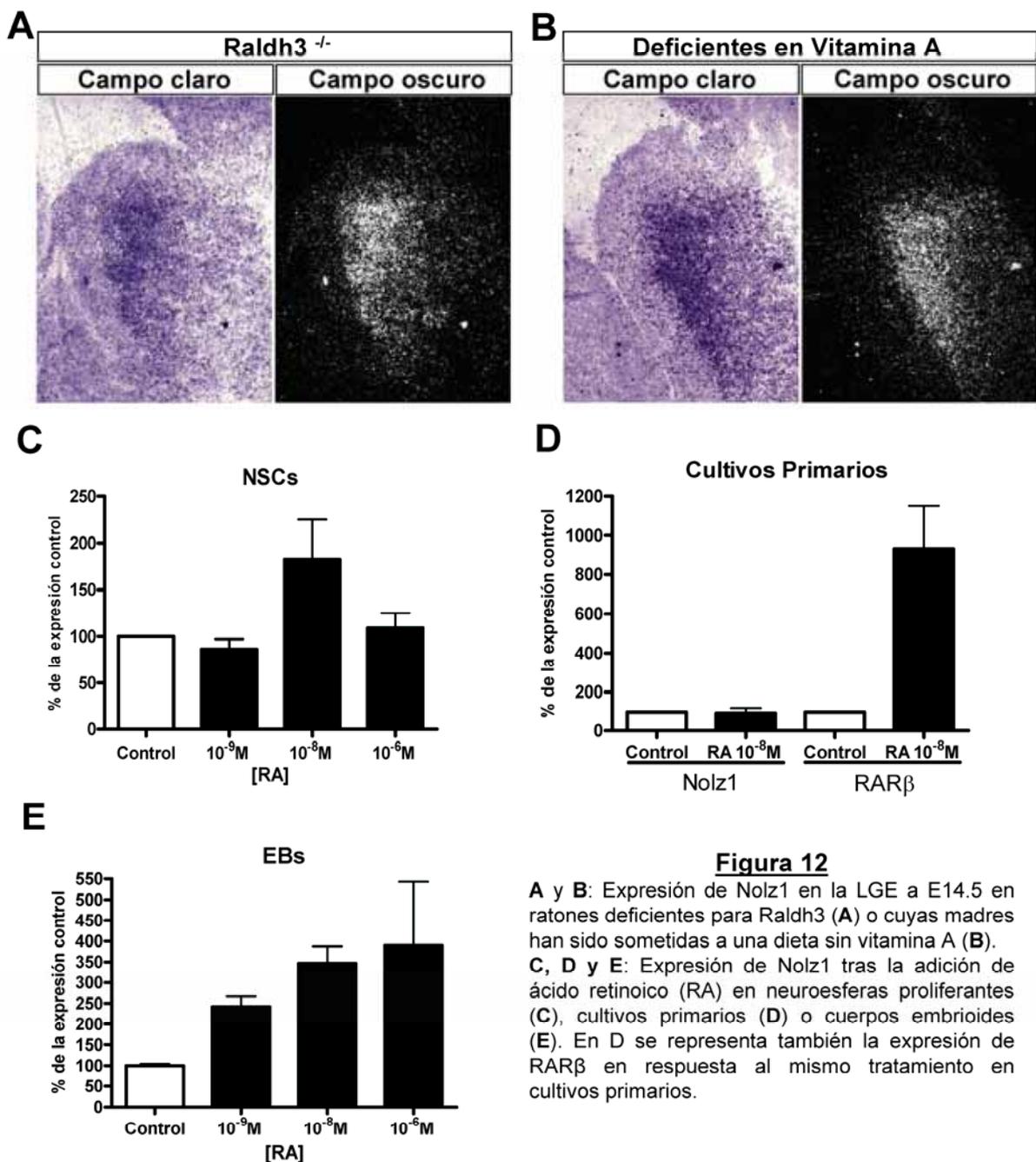


Figura 12

A y B: Expresión de Nolz1 en la LGE a E14.5 en ratones deficientes para Raldh3 (**A**) o cuyas madres han sido sometidas a una dieta sin vitamina A (**B**). **C, D y E:** Expresión de Nolz1 tras la adición de ácido retinoico (RA) en neuroesferas proliferantes (**C**), cultivos primarios (**D**) o cuerpos embrioides (**E**). En **D** se representa también la expresión de RARβ en respuesta al mismo tratamiento en cultivos primarios.

LGE gracias a la enzima sintetizante Raldh3, quisimos ver si la expresión de Nolz1 se veía afectada en ratones deficientes para dicha enzima. En muestras de cerebros de ratones E14.5, no vemos diferencias entre la expresión de Nolz1 en los ratones deficientes para Raldh3 y los WT (figura 12A). De la misma manera, en los cerebros de embriones cuyas madres han sido sometidas a una dieta deficiente en vitamina A (necesaria para la síntesis de RA), la expresión de Nolz1 en la LGE es totalmente normal (figura 12B). Así pues, la aparición de Nolz1 no parece depender del RA sintetizado por Raldh3, ni se ve afectada por la disminución de la concentración de retinoles durante el desarrollo del sistema nervioso.

Para comprobar si la inducción de Nolz1 por el RA se produce en la edad embrionaria que nos interesa, se trataron neuroesferas en diferenciación y cultivos primarios, ambos obtenidos de la LGE de embriones a E14, con RA. Como se observa en la figura 12C, la adición de RA en los cultivos de neuroesferas no tuvo un efecto claro sobre la expresión de Nolz1. El tratamiento con RA de cultivos primarios tampoco consiguió incrementar los niveles de Nolz1 mientras que otro gen que contiene una secuencia RARE, como RAR β , sí incrementó su expresión con el tratamiento (figura 12D).

Es posible, pues, que la competencia de este gen para responder al RA varíe según el estado de diferenciación de la célula. Nuestros propios resultados confirman esta hipótesis, ya que el tratamiento con RA de cuerpos embrioides derivados de células madre embrionarias sí resulta en un incremento dosis-dependiente de la expresión de Nolz1 (figura 12E).

Uno de los genes fundamentales en la formación estriatal que también se ha implicado en la señalización por RA es Gsh2. En el ratón deficiente para Gsh2 la expresión de varios genes relacionados con el RA y que responden al mismo, como Raldh3, RAR β y DARPP-32 está disminuida en el estriado (Corbin et al., 2000; Waclaw et al., 2004), por lo que quisimos saber si la expresión de Nolz1 se encontraba también afectada. Como vemos en la figura 13A, Nolz1 desaparece por completo en los mutantes con una doble sustitución del gen que codifica Gsh2 por GFP (Gsh2^{GFP/GFP}), al compararlo con el ratón heterocigoto (Gsh2^{+GFP}), en el que sí se expresa Nolz1 en la LGE, pero de forma más débil que en los animales normales.

Gsh2 se expresa en la VZ de la LGE desde edades muy tempranas, por lo que Nolz1 podría ser uno de los genes que regula. Para saber si Nolz1 es una diana directa de Gsh2, se infectaron neuroesferas obtenidas de la LGE de ratones a E14 con un virus que contiene dicho factor de transcripción o el vector vacío. El análisis de la expresión por RT-PCR a los 3DIV de la transducción (figura 13B) reveló que mientras que Nolz1 no se ve alterado respecto al control, Gsh2 es capaz de inducir la expresión de Raldh3 en las neuroesferas proliferantes. Este dato concuerda con que en el ratón deficiente para Gsh2 se vea una disminución de Raldh3 y nos indica que Gsh2 no induce la expresión de Nolz1 de forma directa.

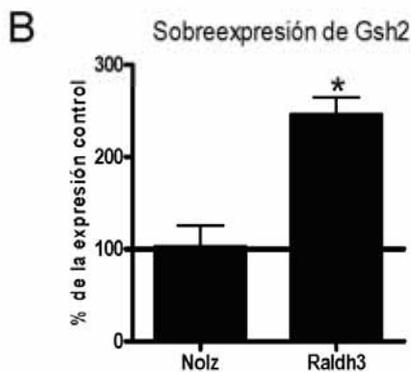
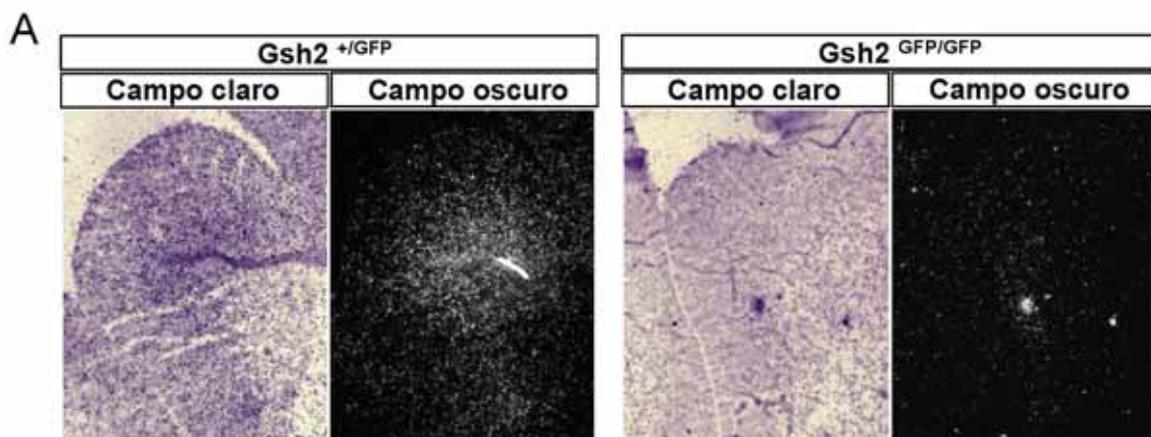


Figura 13

A: Expresión de Nolz1 en la LGE a E14.5 en ratones deficientes heterocigotos (Gsh2^{+/GFP}) o nulos (Gsh2^{GFP/GFP}) para Gsh2. En el campo claro se observa el tejido con una tinción de Nissl y en el campo oscuro, la hibridación in situ radioactiva de Nolz1 revelada fotográficamente. **B:** Efectos de la sobreexpresión de Gsh2 en neuroesferas proliferantes 3 días después de la infección. Mientras que Nolz1 no se ve alterado, la expresión de Raldh3 incrementa significativamente. Los valores son relativos a la infección con un plásmido control.

7. La expresión de Nolz1 activa la síntesis de RA en neuroesferas induciendo la expresión de Raldh3.

Dada la dependencia de Nolz1 de la expresión de Gsh2 durante el desarrollo, quisimos ver si Nolz1 puede estar implicado en la señalización del RA regulando alguno de los genes de la vía.

Para ello, se transfectaron neuroesferas con el mismo protocolo mencionado con anterioridad, y se realizó el análisis de la expresión de Raldh3, RAR α y RAR β , los principales genes de la vía del RA que encontramos en la LGE. Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo a 2 y 5DIV en proliferación, tanto incrementando, como disminuyendo la cantidad de Nolz1 (figura 14A). A 2DIV, mientras que los receptores de RA no se ven afectados, la expresión de Raldh3 está incrementada en los experimentos de sobreexpresión y disminuida en los de RNA de interferencia, sugiriendo que Raldh3 es una diana directa de la acción de Nolz1. A los 5DIV, en cambio, la expresión de Raldh3 está

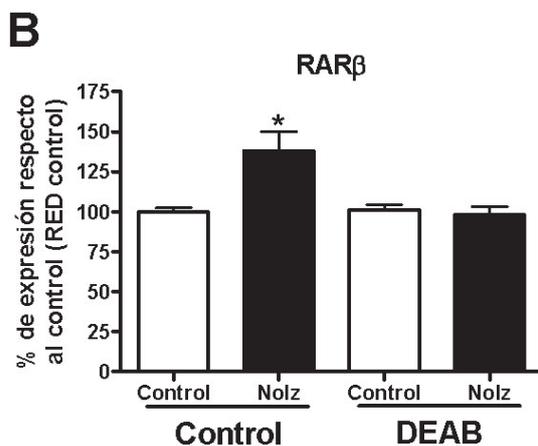
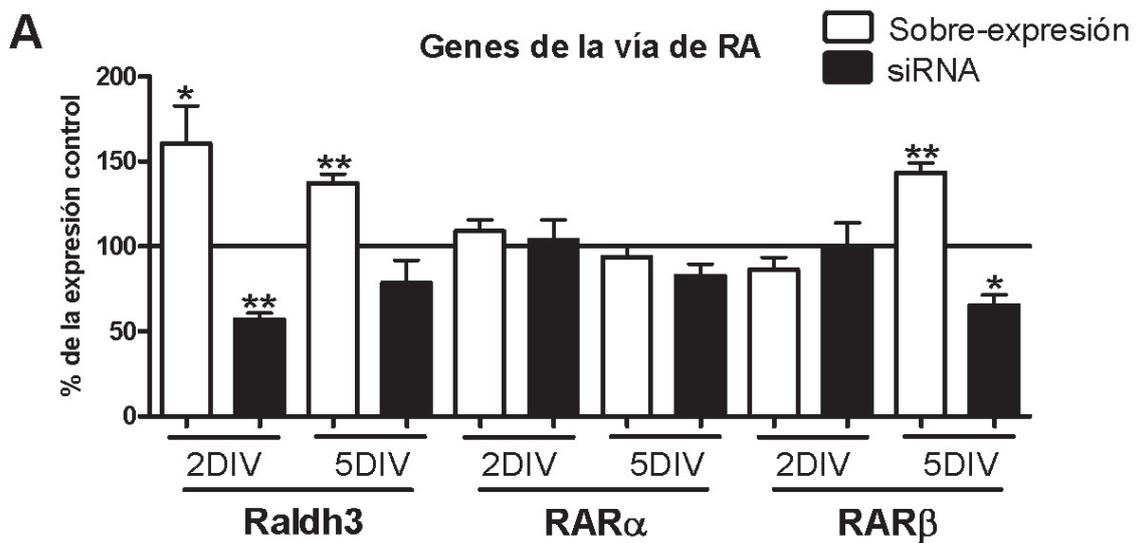


Figura 14

A: Efectos de la expresión de hNolz1 o siRNA contra Nolz1 sobre diversos genes implicados en la vía de ácido retinoico a los 2 y 5 días de la transfección. Los valores son relativos a las respectivas transfecciones control. **B:** Expresión de RAR β tras la nucleofección de Nolz1 en ausencia (control) o presencia (DEAB) de un inhibidor de las aldehído deshidrogenasas. Los valores son relativos a las transfección control en medio control.

afectada de forma más leve aunque significativa en la sobreexpresión y vuelve a niveles normales en el caso del siRNA. Esta diferencia puede explicarse por la pérdida de efectividad del siRNA entre 2 y 5DIV frente al relativo mantenimiento de la sobreexpresión (figuras 3D y E). De forma destacable, en este punto, mientras que la expresión de RAR α sigue sin verse afectada, vemos una regulación específica de RAR β .

Dado que RAR β es regulado por RA, es posible que estas variaciones se deban al incremento o disminución en la síntesis de RA causada por la variación de Raldh3 a los 2DIV. Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo el mismo experimento de sobreexpresión, pero en presencia de un inhibidor de las aldehído deshidrogenasas (y, por tanto, inhibidor de Raldh3), el DEAB. Como se observa en la figura 14B, la presencia de DEAB en el medio es capaz de inhibir el efecto de la transfección de Nolz1 sobre RAR β , confirmando que su incremento es debido a la inducción previa de Raldh3.

Estos experimentos sugieren que Nolz1 regula la expresión de Raldh3 y puede estar interviniendo en la diferenciación de los precursores neurales de la SVZ estriatal mediante la modulación de la concentración de RA en la LGE.

8. Nolz1 se expresa de forma similar al correpresor transcripcional Tle4 tanto *in vivo* como *in vitro*.

Aunque Nolz1 es un factor de transcripción, por su estructura se cree que no tiene capacidad de unirse directamente al DNA. Por eso, la búsqueda de proteínas que interaccionen con Nolz1 es de vital importancia para conocer su función. En ese sentido, en *Drosophila* y *Zebrafish*, se ha descrito que las proteínas homólogas a Nolz1 forman un complejo transcripcional con los

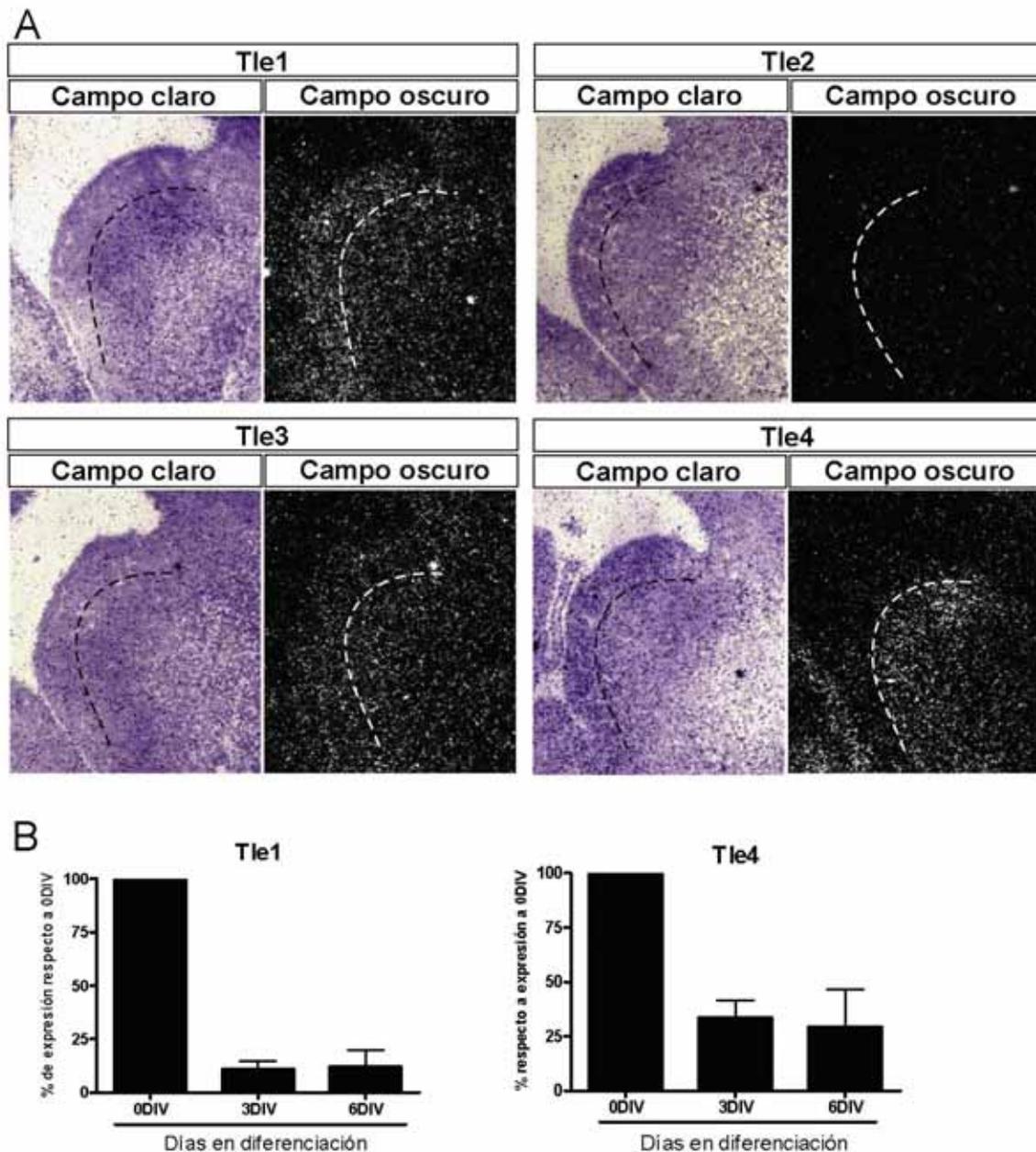


Figura 15

A: Expresión de los genes de la familia Groucho/Tle en la LGE a E14.5. En el campo claro se observa el tejido con una tinción de Nissl y en el campo oscuro, la hibridación *in situ* radioactiva de cada gen revelada fotográficamente.

B: Expresión de Tle1 y Tle4 durante la diferenciación de NSCs. Los valores son relativos a la expresión en NSCs proliferantes antes de la diferenciación.

represores llamados Groucho/Tles (Dorfman et al., 2002; Runko and Sagerstrom, 2003). En ratón hay seis genes de esta familia numerados del 1 al 6, y todos ellos han sido descritos como controladores de la diferenciación celular. Además Tle1, 2 y 4 se expresan en el cerebro en desarrollo y tienen papeles fundamentales en el control de la neurogénesis (Dehni et al., 1995; Koop et al., 1996). Por eso, a continuación estudiamos la posible interacción de Nolz1 con estas proteínas.

En primer lugar, se realizaron hibridaciones *in situ* para determinar las zonas de expresión de cada gen de la familia Tle. Como se observa en la figura 15A, Tle2 no parece expresarse en la LGE a E14.5 y Tle3 lo hace de forma débil y sin que se observen diferencias entre las diferentes zonas proliferativas. Tle1 se expresa de forma abundante, con su zona de máxima expresión en la VZ y extendiéndose hacia el manto. Tle4 empieza a expresarse en la SVZ y su expresión continúa en el manto, mostrando un patrón de expresión muy parecido al de Nolz1.

Dado que tanto Tle1 como Tle4 coinciden temporal y espacialmente con Nolz1 en la LGE, analizamos también lo que ocurre con estos dos genes en la diferenciación de neuroesferas (figura 15B). Los niveles de ambos son

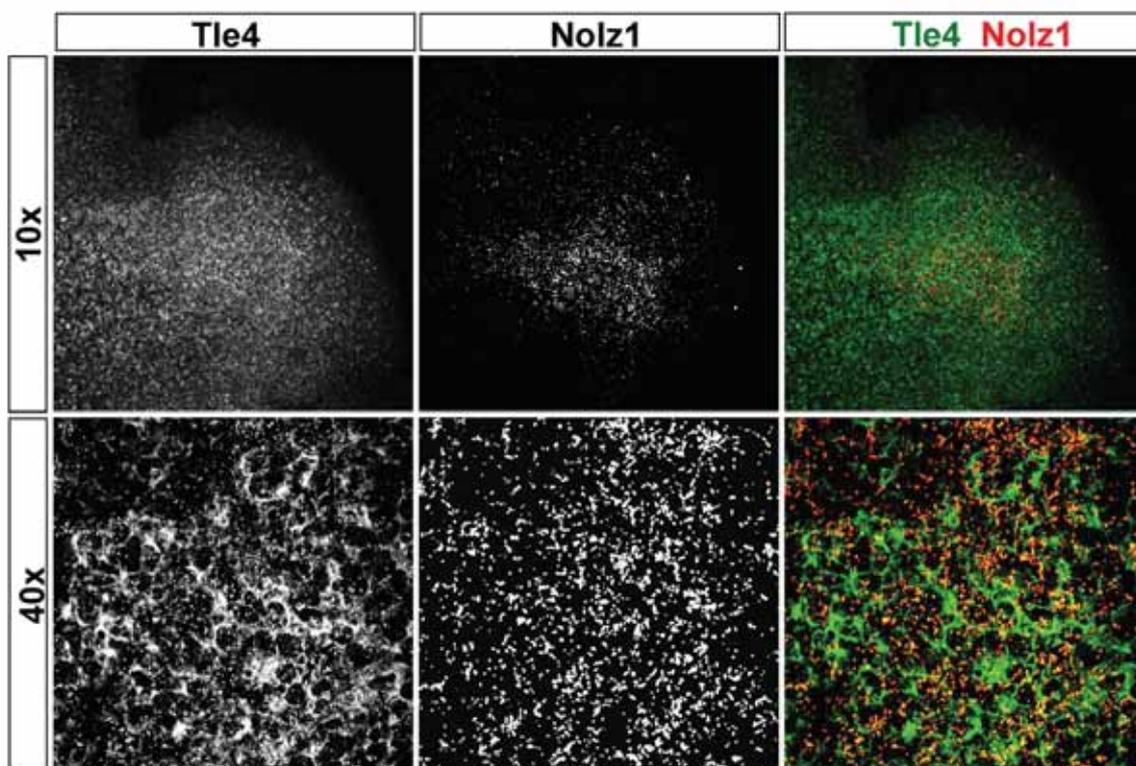


Figura 16

Colocalización entre la proteína Tle4 y el mRNA de Nolz1 mediante un marcaje doble de inmunohistoquímica para Tle4 e hibridación *in situ* para Nolz1.

máximos en neuroesferas proliferantes y caen al empezar la diferenciación, pero mientras que la expresión de Tle1 baja prácticamente a cero, la de Tle4 se mantiene algo más elevada. Esto nos recuerda, de nuevo, a lo que ocurre en la diferenciación con Nolz1 (figura 3A). Realizando una hibridación *in situ* seguida de una inmunohistoquímica para Tle4 (figura 16), confirmamos la colocalización del mRNA de Nolz1 con la proteína Tle4 en la SVZ de la LGE a E14.5.

9. Ikaros1 se expresa selectivamente en neuronas encefalinérgicas del núcleo estriado durante el desarrollo.

El gen Ikaros puede generar diferentes isoformas mediante splicing alternativo, que pueden estar reguladas diferencialmente durante el desarrollo del núcleo estriado. Por eso, se realizó un western blot utilizando un anticuerpo que reconoce las isoformas 1, 2/3, 4 y 8 de Ikaros en muestras estriatales a diferentes edades embrionarias (la figura 17A muestra bandas representativas a E18.5 y P15). Observamos que Ikaros1 (Ik1) es la isoforma que presenta una mayor expresión comparada con el resto de isoformas Ik2/3, Ik4 e Ik8 (ver bandas a E18.5). Asimismo, únicamente Ik1 está regulada durante el desarrollo estriatal, como muestra la desaparición total de esta banda (Ik1) a P15 y el mantenimiento de las bandas correspondientes a las otras isoformas.

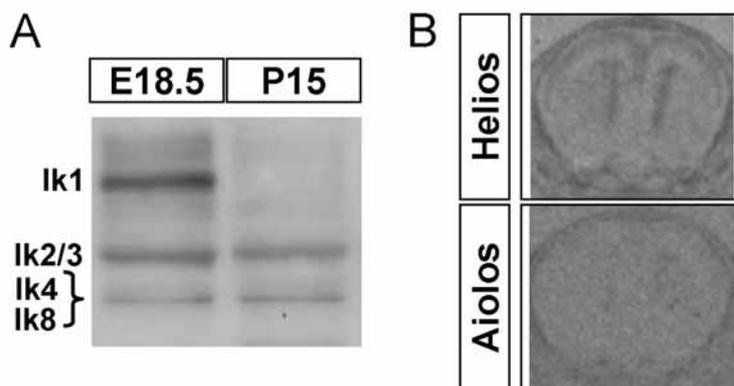


Figura 17

A: WB de muestras estriatales a E18.5 y P3 con un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de Ikaros
B: Film expuesto a la hibridación in situ radioactiva de Helios y Aiolos a E18.5.

Dado que Ikaros pertenece a una familia de factores de transcripción en la que hay otros cinco genes y se han descrito interacciones entre algunos de ellos, analizamos también la expresión de los dos genes más similares, Helios y Aiolos, a E18.5, es decir, en el momento en que la expresión de Ikaros es máxima. Como se observa en la figura 17B, no encontramos expresión significativa de estos genes en el manto estriatal. Sin embargo, mientras que Aiolos no parece estar presente en el sistema nervioso, Helios se expresa de forma específica en el estriado.

Para estudiar más en detalle el papel de Ikaros en el desarrollo del núcleo estriado analizamos el fenotipo de las células que expresan este factor de transcripción en cultivos primarios de LGE de E14.5 (figuras 18A, B y C). Ikaros no se expresa en precursores nestina positivos o astrocitos GFAP positivos (figuras 18A y 18B, respectivamente), sino en neuronas inmaduras β -III-tubulina positivas (figura 18C).

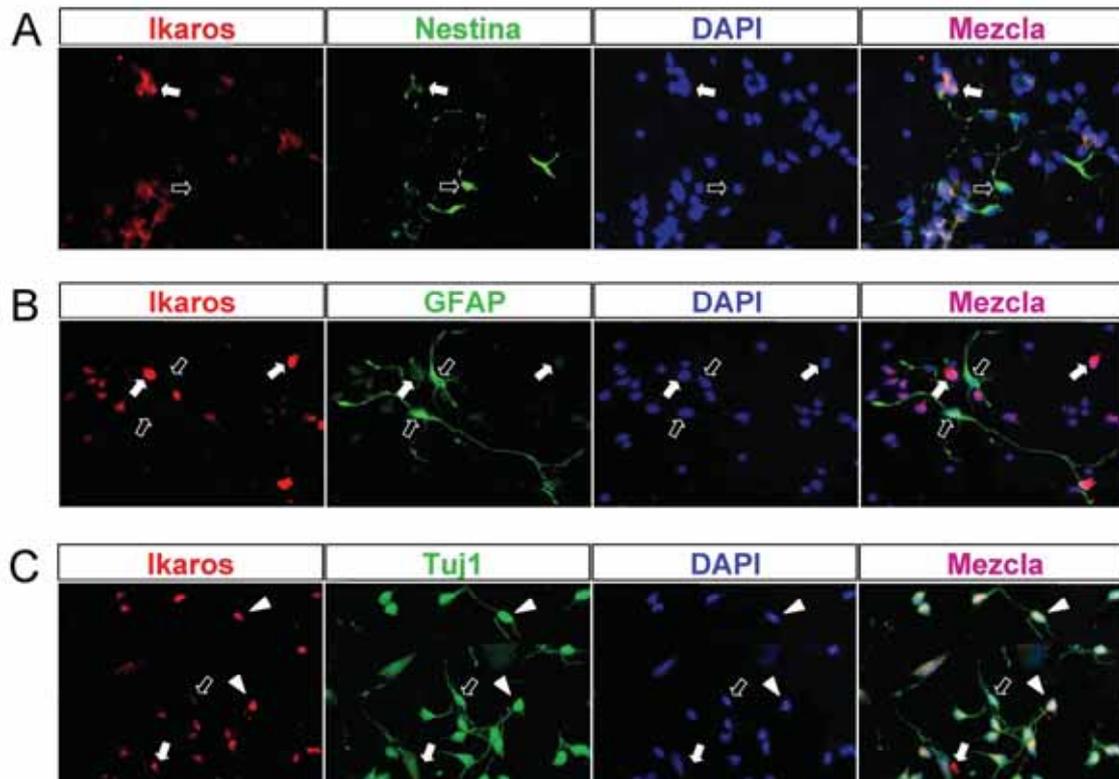


Figura 18

Colocalización en cultivos primarios de la LGE a E14.5 entre Ikaros y marcadores neurales. Las flechas blancas indican células positivas para Ikaros y negativas para el marcador neural. Las flechas negras señalan células positivas para el marcador neural pero negativas para Ikaros. Las puntas de flecha indican células positivas para los dos marcadores. **A:** Doble inmunocitoquímica Ikaros y nestina. **B:** Doble inmunohistoquímica Ikaros y GFAP en cultivos primarios, en que es evidente la ausencia de doble marcaje. **C:** Doble inmunocitoquímica Ikaros y Tuj1 que muestra la gran colocalización entre los dos marcadores.

La expresión de Ikaros, con sus niveles máximos en la zona más cercana a la SVZ y colocalizando con un marcador de neuronas postmitóticas inmaduras en cultivo, sugiere que puede estar jugando un papel en los primeros estadios del paso de precursores proliferantes a las células diferenciadas que residen en el manto. Por eso, a continuación se estudió la posible implicación de Ikaros en la salida del ciclo celular.

10. Ikaros regula los niveles del inhibidor de ciclinas p21, promoviendo así la salida de ciclo de los precursores neurales.

Dado que en los cultivos primarios los precursores neuronales se vuelven rápidamente postmitóticos, no es posible analizar en ellos de forma adecuada el posible papel de Ikaros en la diferenciación neuronal temprana. Por eso, utilizamos el modelo que ofrece el cultivo de los precursores en forma de neuroesferas. Para conocer el papel que juega Ikaros en este sistema, analizamos su expresión durante la diferenciación de neuroesferas de la LGE de E14.5 siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para el estudio de Nolz1. Como se observa en la figura 19A, en las neuroesferas proliferantes Ikaros no está presente, y aparece durante la diferenciación con un incremento espectacular a los 6DIV de diferenciación.

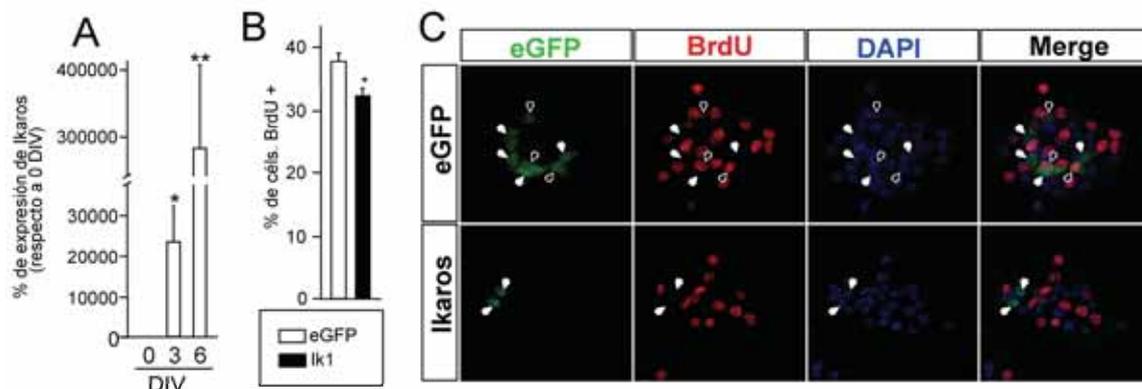
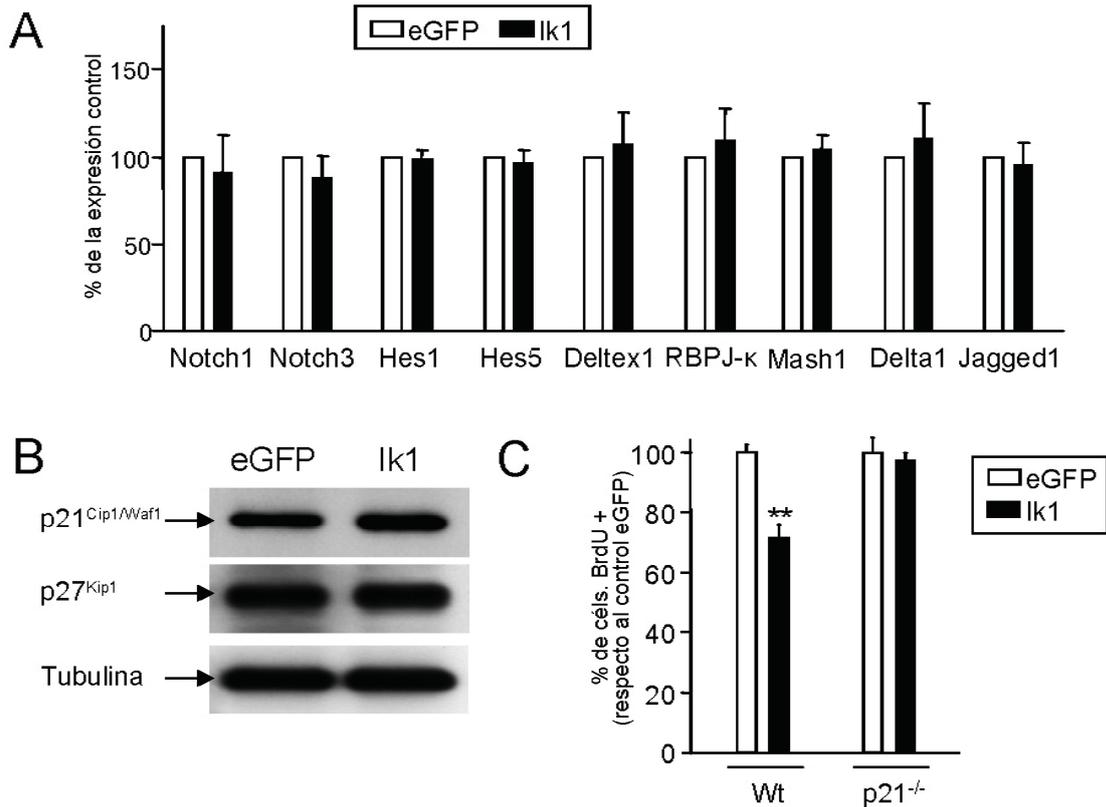


Figura 19

A: Expresión de Ikaros1 durante la diferenciación de NSCs. Los valores son relativos a las células proliferantes. **B:** Cuantificación del número de células positivas para BrdU en NSCs 2 días después de ser transfectadas con Ik1 o el plásmido control eGFP. **C:** Inmunohistoquímica para BrdU y eGFP en NSCs 2 días después de ser transfectadas con Ik1 o el plásmido control eGFP que muestra la ausencia de colocalización entre GFP y BrdU en el caso de la sobreexpresión de Ik1.

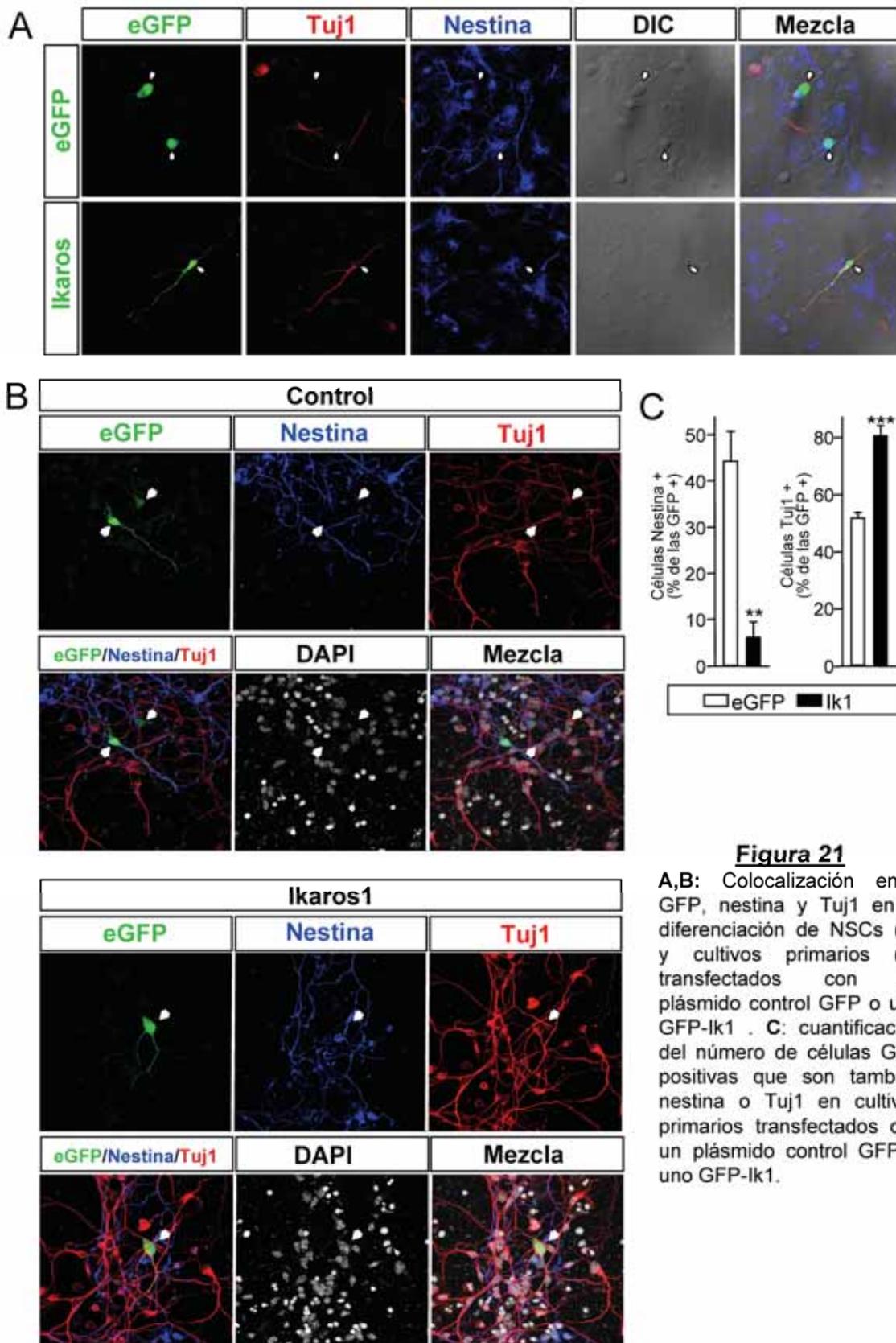
La sobre-expresión de Ikaros en neuroesferas proliferantes produce una disminución en la incorporación de BrdU (figura 19B), y no encontramos ninguna célula transfectada con Ikaros que colocalizara con BrdU (figura 19C), lo que concuerda con su papel en neuronas en diferenciación.

Uno de los sistemas más importantes implicados en el control proliferativo de los precursores neuronales es la vía de Notch, y además Ikaros ha sido extensamente relacionado con su regulación en precursores hematopoyéticos (Bellavia et al., 2007). El análisis de la expresión de diversos genes de la vía de Notch (figura 20A), reveló que la sobre-expresión de Ikaros no produce ningún efecto sobre la misma. Por otra parte, los inhibidores de ciclinas, p21Cip1/Waf1 (p21) y p27Kip1 (p27), se han implicado también en el

**Figura 20**

A: Efectos de la expresión de Ik1 sobre diversos genes de la vía de Notch 5 días tras la transfección. Los valores son relativos a la transfección control (GFP). **B:** WB de NSCs transfectadas con Ik1 o GFP que muestra un incremento en la expresión proteica de p21 en el experimento de sobreexpresión. **C:** Cuantificación de la incorporación de BrdU en neuroesferas salvajes (Wt) o deficientes para p21 (p21^{-/-}) tras la transfección de Ik1 o eGFP. Se muestran los valores relativizados al control en cada condición.

control de la proliferación neural durante el desarrollo, y, además se ha demostrado que Ikaros es capaz de inducirlos en células hematopoyéticas (Gomez-del-Arco et al., 2004). Así pues, decidimos analizar su expresión tras la transfección de Ik1 en neuroesferas. Como se observa en la figura 20B, la sobreexpresión de Ikaros se traduce en un incremento de los niveles proteicos de p21, sin afectar a los niveles de p27. Para confirmar que el mecanismo mediante el que Ikaros intervienen en el control del ciclo celular es el incremento de p21, se realizaron los mismos experimentos de incorporación de BrdU en neuroesferas obtenidas de un animal deficiente para p21. Los resultados mostraron que el efecto sobre proliferación desaparece totalmente en estas neuroesferas (figura 20C), confirmando que el control de los inhibidores de ciclinas es uno de los principales mecanismos de acción de Ikaros en estas células.

**Figura 21**

A,B: Colocalización entre GFP, nestina y Tuj1 en la diferenciación de NSCs (A) y cultivos primarios (B) transfectados con un plásmido control GFP o uno GFP-Ik1. **C:** cuantificación del número de células GFP positivas que son también nestina o Tuj1 en cultivos primarios transfectados con un plásmido control GFP o uno GFP-Ik1.

Dado que la salida de ciclo de los precursores neurales está unida a su diferenciación, decidimos estudiar a fondo el papel de Ikaros durante la diferenciación de precursores estriatales *in vitro*. Cuando diferenciamos NSCs transfectadas, las células que sobreexpresan Ikaros colocalizan con el

marcador neuronal temprano Tuj1, mientras que las que sólo expresan GFP colocalizan mayoritariamente con el marcador neural nestina figura 21A, sugiriendo que Ikaros es capaz de conferir fenotipo neuronal a los precursores, además de hacerles abandonar el ciclo celular. A continuación realizamos el mismo experimento en cultivos primarios estriatales. Como vemos en las figuras 21B y C, muchas de las células transfectadas sólo con GFP son positivas para nestina (21B), mientras que las transfectadas con Ikaros son en su gran mayoría positivas para Tuj1 (21C). La cuantificación del número de células positivas para GFP y cada uno de los dos marcadores demuestra que Ikaros produce también una drástica disminución de las células positivas para nestina y un claro incremento del porcentaje de células positivas para Tuj1 en los cultivos primarios (figura 21D), en consonancia con lo observado en la diferenciación de NSCs.

11. Ikaros es necesario durante el desarrollo estriatal para promover la salida de ciclo de los precursores estriatales que comienzan la neurogénesis a E14.5.

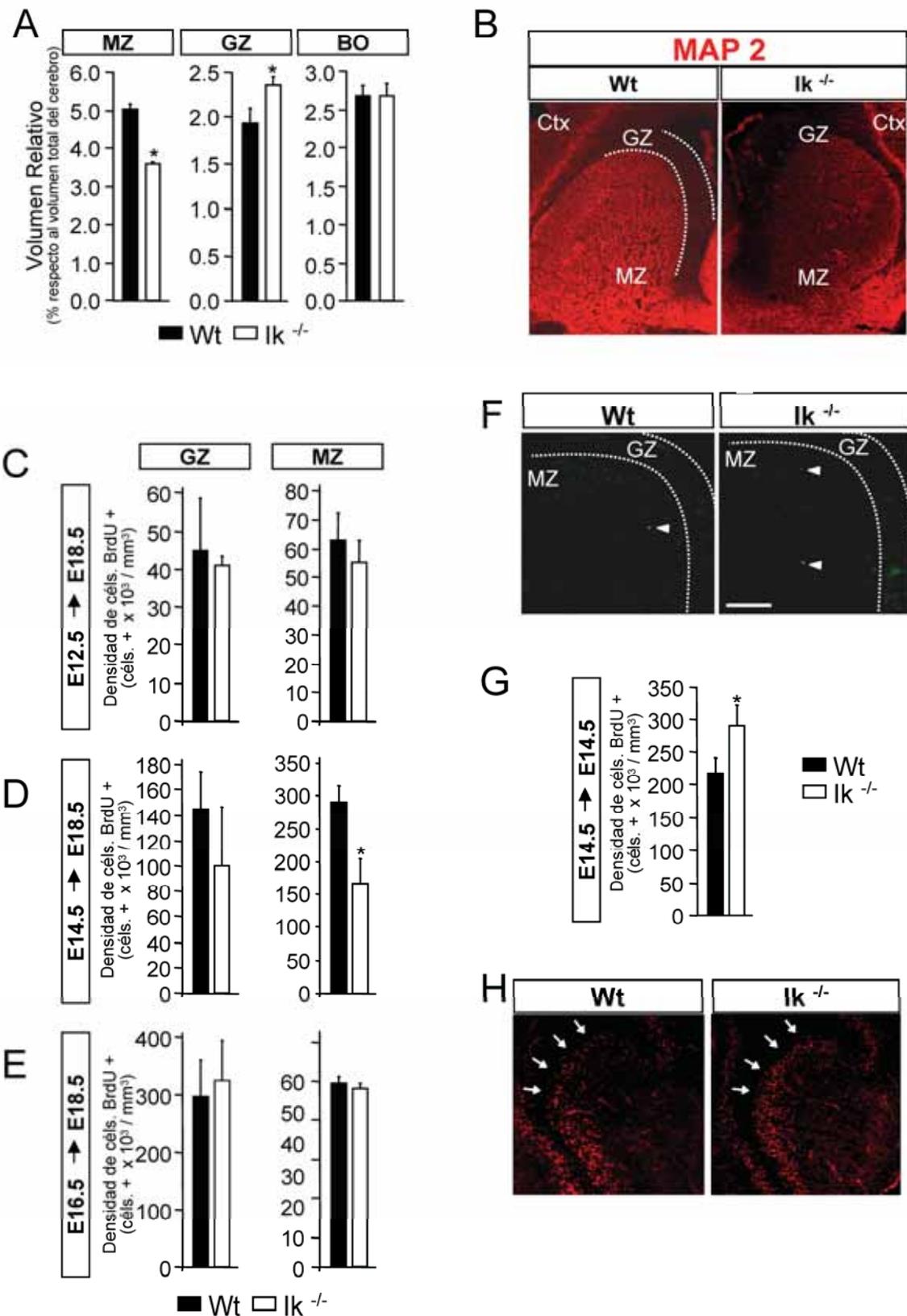
Ya que, como hemos visto, Ikaros tiene un papel en la especificación neuronal durante la salida de ciclo de los precursores neurales, decidimos estudiar si la ausencia de Ikaros afecta a la LGE durante el periodo de neurogénesis estriatal.

En primer lugar, analizamos el volumen del núcleo estriado, la zona germinal y el bulbo olfativo en el animal deficiente de Ikaros y en el animal normal en el estadio de desarrollo E18.5. El animal Ikaros^{-/-} presenta un fenotipo deficiente de hormona de crecimiento caracterizado por un retraso en el crecimiento postnatal (Ezzat et al., 2006). Teniendo en cuenta este hecho, los volúmenes de las diferentes estructuras se relativizaron al volumen total del cerebro. La falta de Ikaros produce una reducción significativa en el volumen de la zona del manto estriatal (figura 22A), tal y como podemos observar en la figura 22B donde se muestra una inmunohistoquímica contra MAP2 representativa de un animal normal y de un animal deficiente de Ikaros. Por el contrario, no se observan diferencias entre los dos genotipos en cuanto al volumen relativo del bulbo olfativo (figura 22A), otra estructura que tiene parte de su origen en la dLGE. Además, esta reducción en el volumen estriatal va acompañada de un incremento en el volumen de la zona germinal (figura 22A).

Esto sugiere que existe algún tipo de alteración en la cantidad de neuronas que se generan en la LGE, por lo que procedimos a realizar un estudio detallado de la neurogénesis a diferentes edades embrionarias. Estos

Figura 22

A: Volumen del manto estriatal (MZ), zona proliferativa del estriado (GZ) y bulbo olfativo (OB) en ratones normales (Wt) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}). **B:** Visualización del manto estriatal en ratones normales (Wt) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}) mediante inmunohistoquímica para el marcador neuronal MAP2. **C, D y E:** Cuantificación del número de células proliferantes en la zona proliferativa (GZ) y en el manto (MZ) estriatales a E18.5 tras una sola inyección de BrdU a las madres gestantes a E12.5 (**C**), E14.5 (**D**) o E16.5 (**E**). **F:** Marcaje con TUNEL del estriado a E18.5 en ratones normales (Wt) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}). **G:** Cuantificación del número de células proliferantes en la LGE a E14.5 tras una sola inyección de BrdU media hora antes de extraer los embriones. En **H** se muestra una inmunohistoquímica para BrdU representativa de dicho experimento.



experimentos se llevan a cabo administrando pulsos de BrdU a diferentes estadios del desarrollo, desde E12.5 hasta E16.5 y analizando los cerebros a E18.5 en todos los casos (esquema y fotografías representativas en figura 3 de materiales y métodos). Los precursores que en el momento de la

administración de BrdU estén proliferando y salgan de ciclo poco tiempo después, retendrán el BrdU y podrán ser detectados por inmunohistoquímica. Las células que sigan proliferando, en cambio, diluirán el BrdU entre el DNA de las célula hijas en el proceso de mitosis y no serán detectadas. Así, determinamos el número de neuronas generadas a cada edad en la que se había administrado BrdU. El número de células BrdU positivas se cuantificó por separado en la zona germinal y en la zona del manto a E18.5 para cada edad de inyección (figuras 22C, D y E). La generación temprana de neuronas estriatales no parece estar afectada por la falta de Ikaros ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los animales normales y deficientes de Ikaros en cuanto a la densidad de células BrdU positivas marcadas a E12.5 ni a nivel de la zona germinal ni a nivel del manto. El análisis del número total de células BrdU positivas a nivel del manto denota una cierta tendencia a descender en el ratón deficiente de Ikaros (figura 22C). El mismo resultado se observa para las células nacidas a E16.5, es decir, que la falta de Ikaros tampoco parece estar afectando a la generación de neuronas tardías (figura 22E). Por el contrario, la falta de Ikaros produce una reducción significativa en el número de células nacidas a E14.5 en el manto del núcleo estriado respecto al animal normal (figura 22D). A nivel de la zona germinal también se observa una tendencia a la disminución en la densidad de células BrdU positivas en el animal Ikaros^{-/-} (figura 22D). Así pues, la falta de Ikaros afecta específicamente a la segunda oleada de neurogénesis estriatal, que se da a E14-E15 en ratones (Mason et al., 2005).

La reducción en el número de células generadas a E14.5 puede ser debida a una mayor muerte celular o a un incremento en el número de células en proliferación que no han podido salir del ciclo celular. El incremento de muerte celular se descartó, ya no se observaron diferencias entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal en cuanto al marcaje por TUNEL en el núcleo estriado (figura 22F). Para ver si lo que se está dando es un aumento del número de células proliferantes a esa edad, se administró BrdU en el día de gestación E14.5 y 30 minutos después los cerebros fueron disecados para proceder a su análisis. De esta manera, las células que incorporaron BrdU durante esos 30 minutos serán aquellas que se encontraban proliferando en ese momento del desarrollo. La cuantificación del número de células BrdU

positivas de la zona germinal reveló un incremento significativo en el número de células proliferativas en el ratón deficiente de Ikaros respecto al animal normal (figuras 22G y H). Este resultado sugiere que Ikaros está implicado en la generación de neuronas estriatales a E14.5 ya que la falta de este factor de transcripción produce algún tipo de bloqueo en la diferenciación de los precursores neurales en ese estadio de desarrollo que las hace quedar retenidas en proliferación dentro de la zona germinal.

12. Ikaros1 promueve la diferenciación neuronal encefalinérgica tanto en neuroesferas como en cultivos primarios provenientes de la LGE a E14.5.

La localización de Ikaros durante el desarrollo sugiere que puede tener un papel importante en los primeros pasos de la diferenciación de las neuronas estriatales encefalinérgicas. Al examinar la expresión de Ikaros en cortes sagitales, se aprecia un claro gradiente caudo-rostral en el núcleo estriado durante estadios embrionarios, que se atenúa en las etapas postnatales (figura 23A), en las que Ikaros se expresa homogéneamente a lo largo del eje antero-

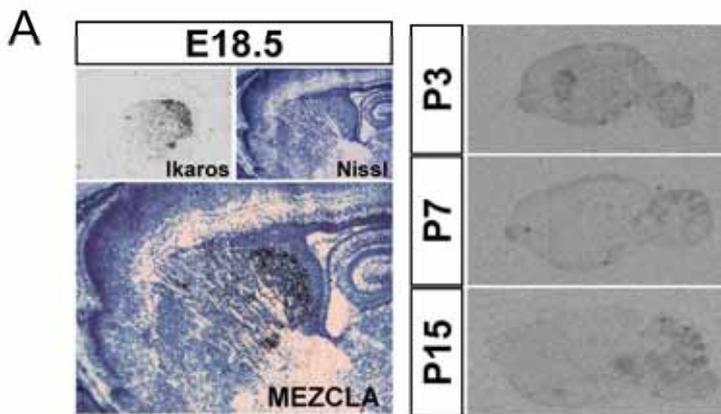
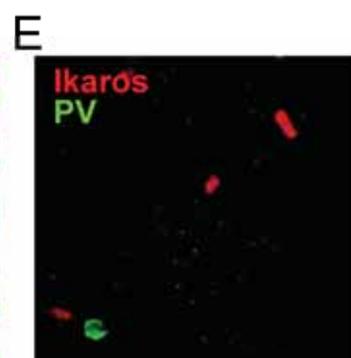
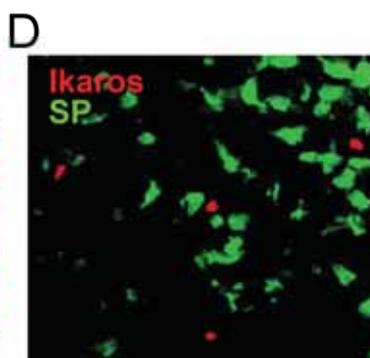
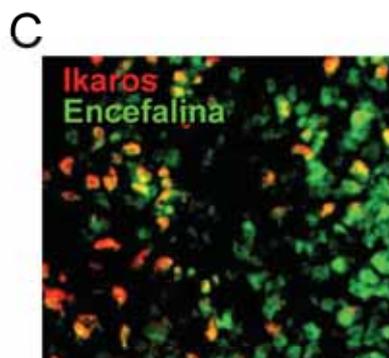
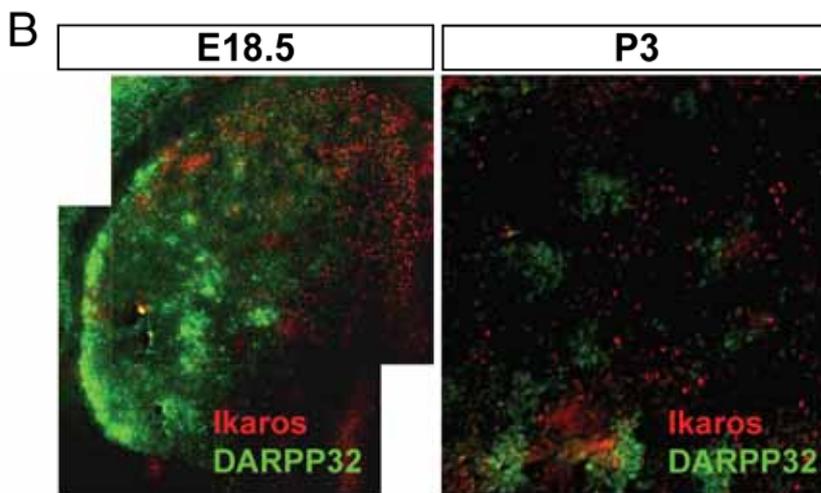


Figura 23

A: Hibridaciones *in situ* para Ikaros en cortes sagitales de cerebros a E18.5, P3, P7 y P15. En el caso de E18.5 se muestra también una contra-tinción con Nissl. **B:** Doble inmunohistoquímica para Ikaros1 y DARPP-32 en el estriado a E18.5 y P3. **C, D, E:** Doble inmunohistoquímica en el estriado a P3 para Ikaros1 y encefalina (C), Ikaros y sustancia P (D), e Ikaros y Parvalbúmina (E).



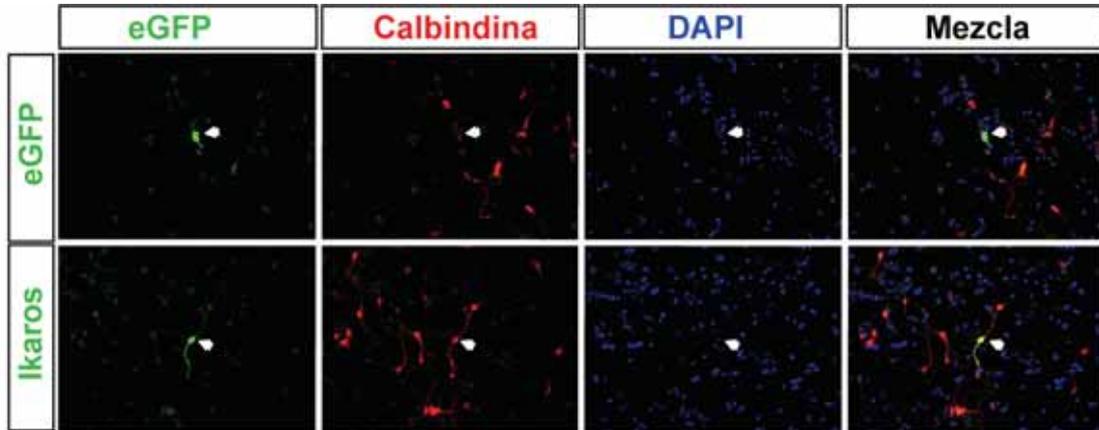
posterior. Dado que los diferentes tipos de neuronas estriatales aparecen durante el desarrollo formando gradientes para más tarde homogeneizarse, estudiamos si había alguna coincidencia entre el gradiente de alguno de los tipos neuronales y el de Ikaros. En primer lugar, se realizó una doble inmunohistoquímica para este factor de transcripción y DARPP-32 a E18.5, edad en que DARPP-32 marca el compartimento estriosomal del estriado (figura 23B). El doble marcaje muestra una distribución complementaria de estos dos marcadores, estando Ikaros mayoritariamente expresado en la parte dorsomedial, tal y como se ha descrito anteriormente, mientras que la expresión de DARPP-32 se encuentra localizada en la parte más ventrolateral del manto estriatal, probablemente marcando las neuronas de generación temprana. Al analizar la expresión de estos dos marcadores en el estadio postnatal P3 observamos que a pesar de que existen áreas donde se expresan ambos marcadores simultáneamente, éstos siguen presentando un patrón diferencial, de manera que DARPP-32 se encuentra marcando los estriosomas mientras que Ikaros está localizado en la matriz (figura 23B). Esta distribución indica que a esta edad Ikaros y DARPP-32 se encuentran en dos poblaciones neuronales distintas.

También se analizó la colocación entre Ikaros y marcadores específicos de las dos poblaciones de neuronas de proyección estriatales, encefalina y sustancia P, en el núcleo estriado de ratones a P3. Las dobles inmunohistoquímicas muestran un 100% de colocación entre Ikaros y encefalina, pues todas las células que expresan Ikaros son positivas para encefalina (figura 23C), aunque no al revés. Por el contrario, no se observa ningún tipo de colocación entre Ikaros y sustancia P (figura 23D) ya que la distribución de ambos marcadores vuelve a ser opuesta, es decir, que la expresión de sustancia P se encuentra mayoritariamente en la zona ventrolateral del manto mientras que Ikaros se expresa en la zona más dorsomedial. Tampoco vemos colocación con el marcador de interneuronas parvalbúmina (figura 23E).

Para averiguar si la presencia de Ikaros en precursores neurales tiene algo que ver con la adquisición del fenotipo encefalinérgico, se realizaron experimentos de sobre-expresión en cultivos primarios. Como se observa en la figura 24A, las células transfectadas con Ikaros, colocan con el marcador de

neuronas de proyección estriatales calbindina. Los recuentos celulares confirmaron que Ikaros promueve significativamente la aparición de células positivas para este marcador, así como para encefalina, respecto a la transfección control (figura 24B).

A



B

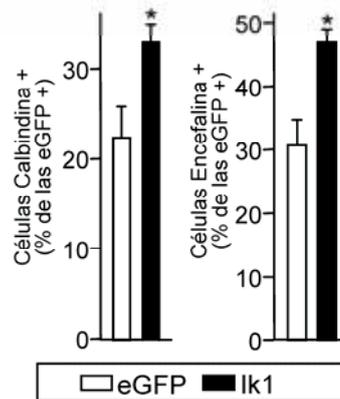


Figura 24

A: Colocalización entre eGFP y calbindina en cultivos primarios transfectados con un plásmido control eGFP o uno eGFP-Ik1. **B:** cuantificación del número de células eGFP positivas que son también calbindina o encefalina positivas en cultivos primarios transfectados con un plásmido control eGFP o uno eGFP-Ik1.

Una vez establecido el claro papel de Ikaros en la diferenciación de las neuronas encefalinérgicas y dado que este factor de transcripción ha sido descrito como uno de los reguladores de la expresión del gen de la encefalina, a continuación estudiamos si uno de los mecanismos por los que Ikaros interviene en la diferenciación de precursores neurales hacia este tipo de neuronas es a través de la inducción de la expresión del gen de la encefalina. Para ello se sobre-expresó la isoforma 1 de Ikaros en una línea inmortalizada de NSCs (C17.2), que se somete a diferenciación. A 1, 2, 3 y 5 DIV después de la transfección se tomaron muestras de las células en diferenciación que se analizaron por PCR cuantitativa. Ikaros indujo unos elevados niveles de expresión de encefalina en las NSCs desde el primer día de transfección (figura 25A), pero los niveles de otros marcadores estriatales como DARPP-32 o calbindina no se vieron afectados (resultados no mostrados). Esta expresión

disminuye con el paso de los días coincidiendo con la pérdida de expresión de Ikaros aunque a los 5 DIV, cuando Ikaros ya ha vuelto a niveles control (figura 25B), los niveles de encefalina son todavía casi mil veces superiores a los del experimento control (figura 25A).

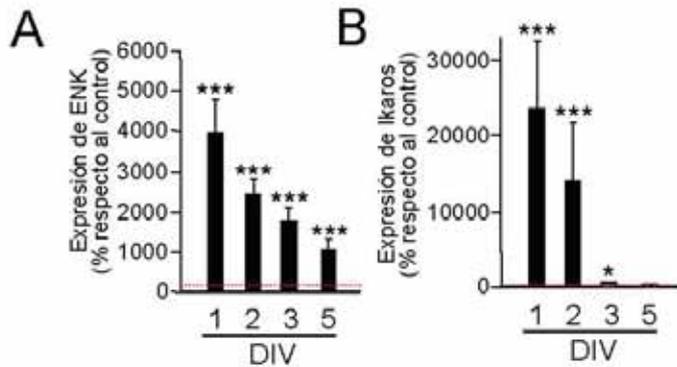


Figura 25

Patrón temporal de expresión de encefalina (A) e Ikaros (B) durante 5 días tras la transfección de Ikaros. Los valores son relativos a la transfección sólo con GFP para cada uno de los días.

Todas estas evidencias sugieren que Ikaros puede estar favoreciendo o promoviendo el paso de los precursores neurales proliferantes a neuronas postmitóticas inmaduras de fenotipo encefalinérgico.

13. La falta de Ikaros produce un déficit selectivo de neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas en el animal adulto.

Ikaros está implicado en el desarrollo de las neuronas generadas a E14.5 y promueve el fenotipo encefalinérgico, por lo que nos preguntamos si este hecho tendría algún efecto sobre las poblaciones neuronales estriatales en el adulto. Para comprobarlo, caracterizamos histológicamente el núcleo estriado del ratón deficiente de Ikaros. Primero se midió el volumen de dicho núcleo y observamos una reducción significativa del volumen del núcleo estriado en el ratón deficiente de Ikaros respecto al normal. A pesar de que el volumen del cerebro es menor en el ratón deficiente de Ikaros, como podemos observar en la reducción del volumen del hemisferio total (figuras 26A y B), el núcleo estriado presenta una reducción específica más importante. Con el fin de determinar si la reducción del volumen del núcleo estriado es debida a una reducción en el número de células, a continuación se cuantificó el número total de neuronas estriatales mediante el recuento de células NeuN positivas, tras lo que no se observaron diferencias en cuanto a la densidad neuronal (figura

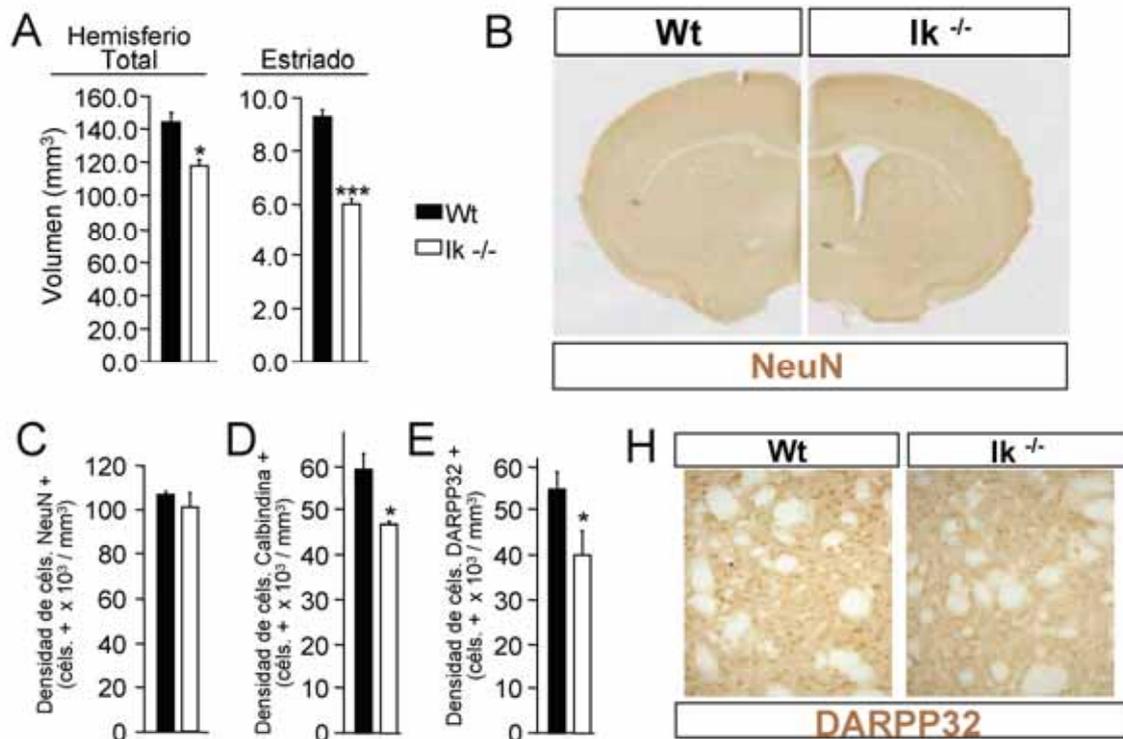


Figura 26

A: Volumen del hemisferio total y el estriado en ratones adultos normales (Wt) y deficientes para Ikaros (*Ik*^{-/-}). **B:** Inmunohistoquímica para NeuN en que es evidente la reducción específica del estriado en los animales *Ik*^{-/-}. **C, D, E:** Cuantificación de la densidad de neuronas NeuN (C), Calbindina (D) y DARPP-32 (E) positivas en el estriado de animales normales (Wt) y deficientes para Ikaros (*Ik*^{-/-}). En H se muestra una inmunohistoquímica representativa de DARPP-32.

26C). Sin embargo, el animal deficiente de Ikaros presenta una reducción significativa en la densidad de neuronas de proyección positivas para calbindina y DARPP-32 respecto al normal (figuras 26D y E, respectivamente). En la figura 26F se puede observar una fotografía representativa de la inmunohistoquímica contra DARPP-32 en un animal normal y uno deficiente de Ikaros, donde se observa que la expresión de DARPP-32 disminuye pero no desaparece totalmente en el animal deficiente.

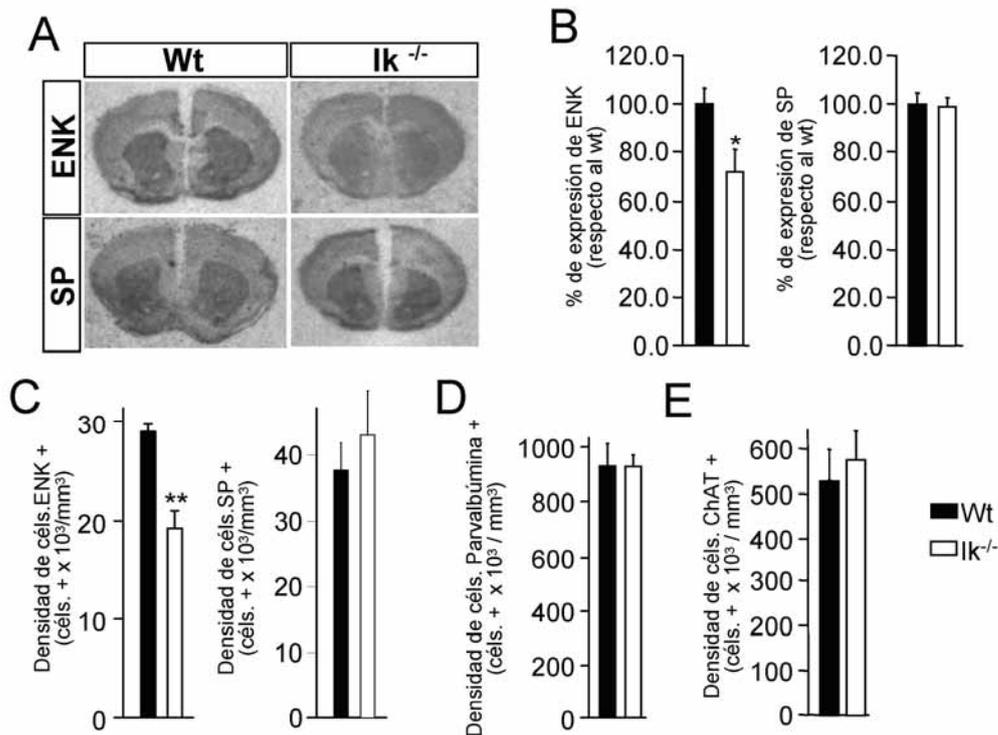


Figura 27

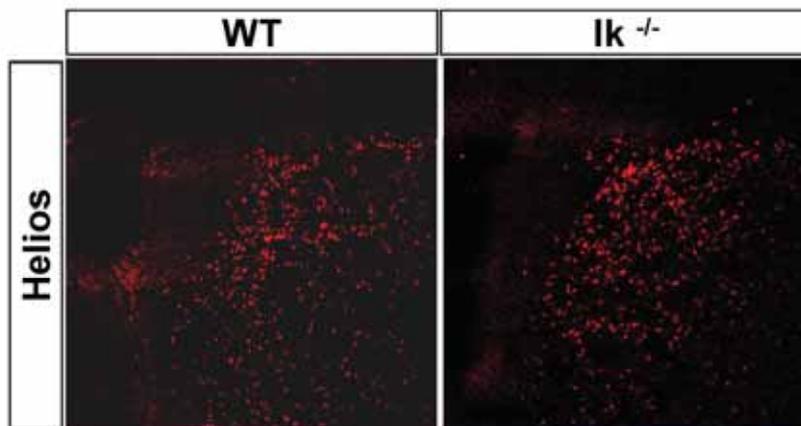
A, B, C: Fotos representativas de una hibridación *in situ* para encefalina (**A**) y cuantificación por densitometría (**B**) y por recuento de inmunohistoquímica (**C**) de la densidad de neuronas encefalinérgicas y positivas para sustancia P en animales normales (Wt) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}). **D, E:** Cuantificación por conteo celular de inmunohistoquímica de las interneuronas estriatales positivas para parvalbúmina (**D**) o ChAT (**E**) en animales normales (Wt) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}).

A continuación, estudiamos el estado de las dos poblaciones estriatales de proyección. Para ello, en primer lugar, se realizó una hibridación *in situ* en animales Ikaros^{-/-} y animales normales de 8 semanas de edad, con sondas que reconocen específicamente encefalina y sustancia P y se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de estos dos neuropéptidos por densitometría (ver fotografías representativas en figura 27A). Mientras que no se observan diferencias en los niveles de expresión de sustancia P entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal, el análisis de los niveles relativos de expresión de encefalina reveló una reducción significativa en el animal deficiente para Ikaros

respecto al animal que sí lo expresa (figura 27B). En consonancia con estos resultados, encontramos una reducción significativa en la densidad de neuronas positivas para encefalina en ratón deficiente de Ikaros, mientras que no observamos diferencias en la densidad de neuronas positivas para sustancia P (figura 27C).

Finalmente, para determinar si Ikaros afecta a la generación de interneuronas estriatales, se cuantificó el número de células parvalbúmina y ChAT positivas que corresponden a interneuronas GABAérgicas y colinérgicas, respectivamente (figuras 27D y E). No se observaron diferencias entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal en cuanto a la densidad de estos dos tipos de interneuronas, por lo que no parece que Ikaros intervenga en su generación.

Ikaros afecta sólo a una subpoblación encefalinérgica, ya que en su ausencia sigue habiendo neuronas positivas para encefalina, aunque en menor número. Esto puede deberse a que otros genes de la familia compensen la función de Ikaros en otras poblaciones. Dado que sólo Helios parece expresarse durante el desarrollo estriatal, analizamos si la falta de Ikaros tiene algún efecto sobre la expresión de Helios en los animales Ikaros^{-/-}. Como se



observa en la figura 28, la expresión de Helios no se ve afectada por la falta de Ikaros, por lo que no parece haber compensación entre los dos genes.

Figura 28

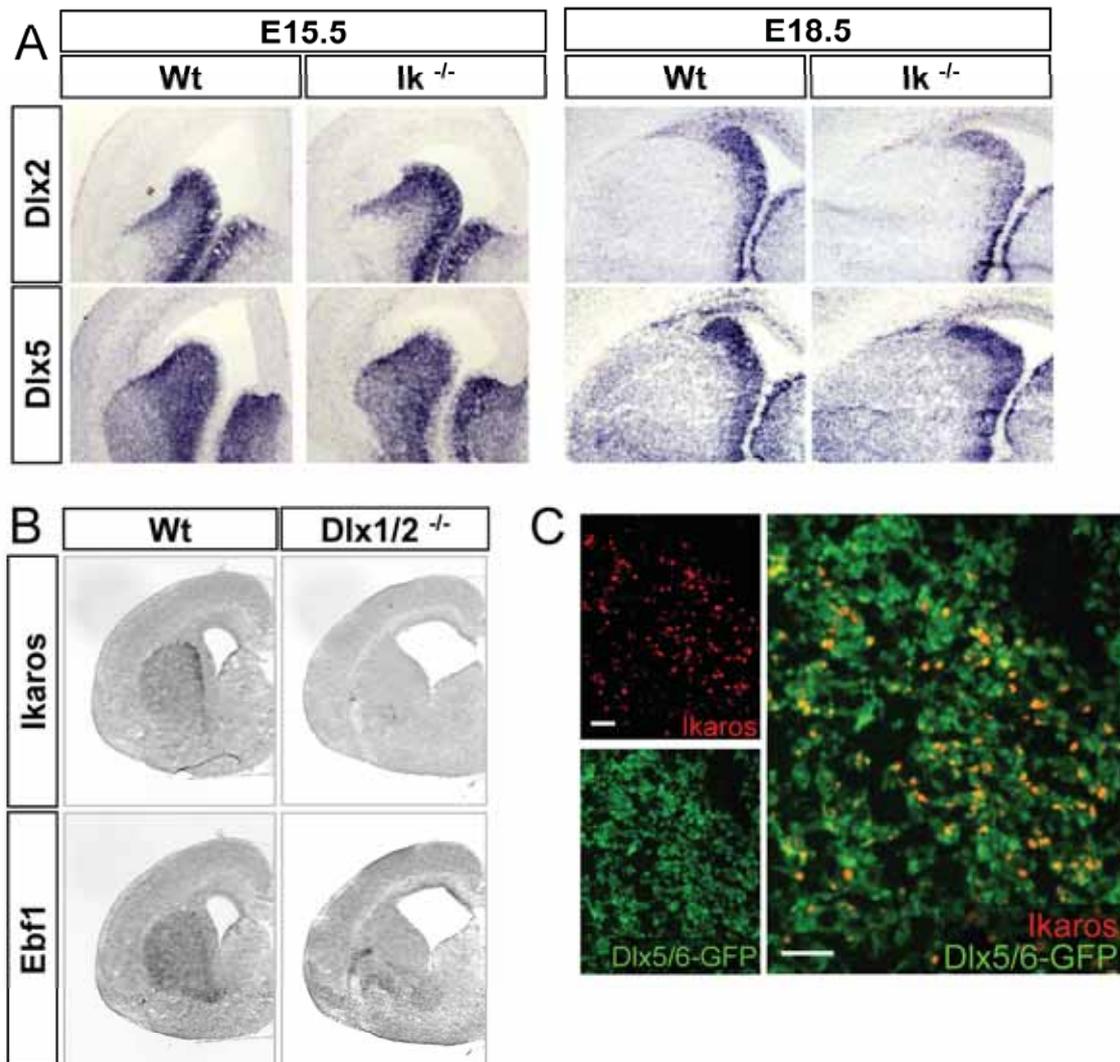
Immunohistoquímica para Helios en el estriado de ratones normales (WT) y defecientes para Ikaros (Ik^{-/-}) a E18.5.

14. Ikaros regula el desarrollo del manto estriatal por debajo de Dlx y de forma paralela e independiente a Ebf1.

Entre los diversos factores de transcripción que intervienen en el desarrollo del núcleo estriado y en concreto en la generación de las neuronas que lo forman, la familia Dlx es una de las más importantes. Esta familia está formada por seis miembros distintos organizados en pares de genes, de los que únicamente uno, el formado por Dlx3/4, no se expresa en el sistema nervioso central. Dlx1 y Dlx2 se detectan ya en precursores de la zona germinal del primordio estriatal, mientras que el marcaje con Dlx5 y Dlx6 corresponde a precursores más maduros de la zona subventricular y el manto (Eisenstat et al., 1999). Además, se ha demostrado que Dlx1/2 son imprescindibles para la segunda oleada de neurogénesis en el estriado (Anderson et al., 1997b).

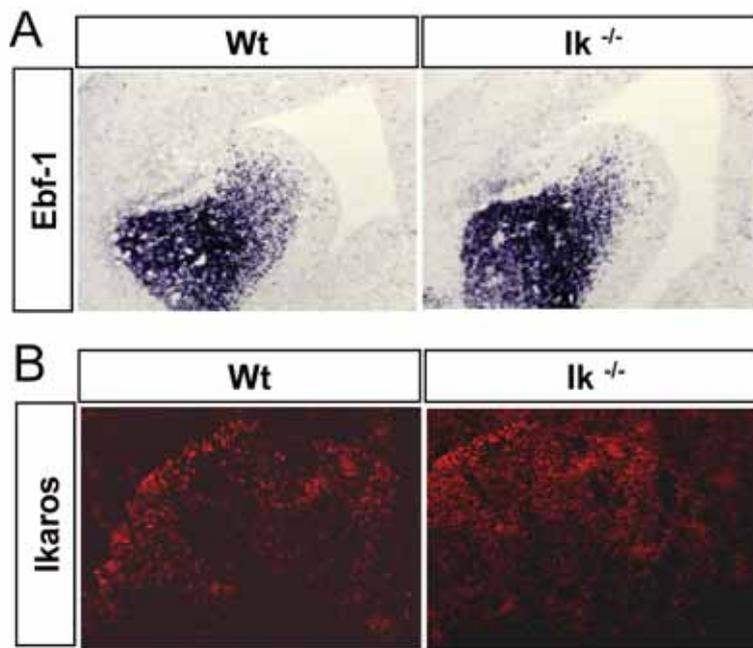
Debido a que la mayor parte de neuronas encefalinérgicas se generan durante esta segunda oleada, e Ikaros está controlando su diferenciación, quisimos saber en primer lugar si la falta de Ikaros afectaba a la expresión de los genes Dlx. Como se observa en la figura 29A, la LGE de los ratones nulos para Ikaros presenta una expresión totalmente normal de Dlx1 y de Dlx5 tanto a E15.5 como a E18.5. Este hecho no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que la expresión de Ikaros se produce en células que ya están diferenciándose, mientras que los genes Dlx marcan progenitores más indiferenciados. Así pues, estudiamos si la falta de Dlx tiene algún efecto sobre la expresión de Ikaros.

El análisis de la expresión de Ikaros en ratones nulos para Dlx1/2 reveló que ésta desaparece por completo en estos animales (figura 29B). Con el objetivo de corroborar que las células que expresan Ikaros derivan de precursores que expresan Dlx, utilizamos los ratones transgénicos Dlx5/6-GFP. En estos animales, los precursores que hayan expresado los factores de transcripción Dlx-5/6 expresarán GFP de manera permanente, lo cual permite el seguimiento de las neuronas que provienen de dichos precursores. La doble inmunohistoquímica contra Ikaros y GFP (figura 29C) en el cerebro del ratón Dlx5/6-GFP a E18.5 muestra un 100% de colocalización entre Ikaros y GFP (aunque, lógicamente, hay muchas células GFP positivas que no expresan Ikaros).

**Figura 29**

A: Hibridaciones in situ para *Dlx2* y *Dlx5* en el estriado de animales normales (WT) y deficientes para *Ikaros* (*Ik*^{-/-}) a E15.5 y E18.5. **B:** Hibridaciones in situ para *Ikaros* y *Ebf1* en el estriado de animales normales (WT) y deficientes para *Dlx1/2* (*Dlx1/2*^{-/-}) a E18.5. **C:** Doble inmunohistoquímica para *Ikaros* y GFP en animales transgénicos *Dlx5/6*-GFP a E18.5.

Ebf1 es otro factor de transcripción que se expresa en el manto del primordio estriado que interviene en la generación de las neuronas de proyección tempranas del núcleo estriado que expresan sustancia P (Garel et al., 1999; Lobo et al., 2008; Lobo et al., 2006). Como vemos en la figura 29B, *Ebf1* continúa expresándose en el cerebro *Dlx1/2*^{-/-} con relativa normalidad. Así, parece que los factores que controlan la aparición de *Ikaros* y *Ebf1* son independientes. Para confirmarlo, se analizó la expresión de *Ebf1* en el núcleo estriado de ratones deficientes de *Ikaros*. En la figura 30A podemos observar que *Ebf1* no se ve afectado por la falta de *Ikaros* a E15.5. La expresión de

**Figura 30**

Hibridaciones in situ para Ebf1 (A) e Ikaros (B) en el estriado de animales normales (WT) y deficientes para Ikaros (Ik^{-/-}) a E18.5

Ikaros en los ratones deficientes para Ebf1, tampoco se ve afectada (figura 30B), indicando que no hay dependencia entre los dos factores.

