



*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**

III. Materiales y métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los animales han sido estabulados con acceso a comida y agua *ad libitum* en una habitación que se mantiene a temperatura (19–22°C) y humedad (40–50%) constantes siguiendo un ciclo de 12/12 horas de luz/oscuridad. Los tratamientos y procedimientos de manejo de animales fueron aprobados por el comité local (99/1 de la Universidad de Barcelona) y la Generalitat de Catalunya (1094/99), de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea (86/609/EU).

Ratones salvajes de la cepa B6CBA, (obtenidos de Charles River Laboratorios Inc. Willmington, MA) ratones transgénicos *Dlx5/6-Cre-IRES-GFP* y *plp/dm20-GFP* y ratones transgénicos deficientes de *Gsh2*, *Raldh3*, *Ikaros*, *Dlx1/2* y *Ebf1* se han utilizado en los estudios descritos a continuación.

Los cerebros provenientes de embriones de ratones de 14.5 días mutantes para *Raldh3* fueron aportados por el doctor Gregg Dueter, y la caracterización de su genotipo se realizó según lo descrito (Molotkov et al., 2006).

Las muestras de ratones transgénicos con una sustitución simple (heterocigotos) o doble (homocigotos, nulos) de la región codificante de *Gsh2* por la proteína fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein) fueron cedidas por el doctor Kenneth Campbell (resultados no publicados).

Los ratones transgénicos *plp/dm20-GFP* fueron cedidos por el Dr. Salvador Martínez de la Universidad Miguel Hernández de Alicante.

Muestras de cerebros de E18.5 de los ratones transgénicos *Dlx-5/6 cre-IRES-GFP* han sido amablemente cedidas por el doctor Kenneth Campbell.

La cepa de ratones mutantes con un alelo nulo para *Dlx1/2* (Anderson et al., 1997b; Qiu et al., 1997) ha sido utilizada en colaboración con el laboratorio de John L.R. Rubenstein del Nina Ireland Laboratory of Developmental Neurobiology, Center for Neurobiology and Psychiatry, University of California at San Francisco. El genotipo de los embriones se determina por PCR tal y como se describe en (Anderson et al., 1997b; Bulfone et al., 1993; Depew et al., 1999; Qiu et al., 1997).

Los ratones deficientes para p21 fueron cedidos por la doctora Isabel Fariñas del Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Universidad de Valencia.

La cepa de ratones deficientes para el factor de transcripción Ebf1 ha sido amablemente cedida por Dr. R. Grosschedl del Department of Cellular and Molecular Immunology, Max Planck Institute of Immunobiology, Germany.

Los ratones deficientes de Ikaros (Georgopoulos et al., 1994) han sido amablemente cedidos por la Dra. Katia Georgopoulos del Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

Los ratones deficientes de Ikaros y de Ebf1 son alimentados y mantenidos bajo condiciones estériles en una habitación libre de patógenos en el animalario de la facultad de medicina de la universidad de Barcelona para obtener genotipos nulos, heterocigotos y salvajes ya que son ratones inmunodeprimidos. El día postnatal 21 o en el estadio embrionario estudiado, DNA de la cola es extraído y analizado para detectar el genotipo del animal por PCR de acuerdo con el protocolo descrito por (Garel et al., 1999) para Ebf1 y (Georgopoulos et al., 1994) para Ikaros, con pequeñas modificaciones para éste último. Las sondas utilizadas son las siguientes:

Ikaros exón 7 reverse 5'-CATAGGGCATGTCTGACAGGCACTTGT-3';

Neo1 antisense primer, 5'-CCAGCCTCTGAGCCCAGAAAGCGA-3';

Ikaros null I-74 mutant allele forward primer, 5'-GGGCCTTTGGGGACATCGAAGGTC-3'.

Ebf1 forward: 5'-GGAAAAGTTGCCTTGAAGTTG-3'

Ebf1 reverse: 5'-TGTAGAGGAGCTGGAGCCG-3'

Ebf1 neo reverse: 5'-GCGATGCCTGCTTGCCGAA-3'

Los parámetros de la reacción de PCR son:

- Para Ikaros: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 66°C y 1 minuto a 72°C cada uno durante 32 ciclos.
- Para Ebf1: 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C cada uno durante 35 ciclos.

El resultado de la PCR se analiza en un gel de agarosa al 2%.

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivo primario de LGE de embriones de 14.5 días

Ratonas embarazadas en el día de gestación E14.5 (el día del tapón vaginal se considera E0.5) son profundamente anestesiadas y los fetos se extraen rápidamente del útero mediante sección cesárea. Los cerebros de los fetos se conservan en tampón fosfato salino estéril (PBS) de pH 7.4. Las LGEs se disecan bilateralmente, se mezclan y se disgregan suavemente con una pipeta Pasteur. Una vez dissociadas las células se siembran en placas de 24 pocillos con cubreobjetos pretratados con 0.1 mg/ml poly-D-lysine (Sigma) a una densidad de 150.000 cels/cm². Conseguimos un cultivo mixto de neuronas y glía mediante el cultivo de las células en Eagle's minimum essential medium MEM (Gibco-BRL) suplementado con 7.5% suero fetal bovino (Gibco-BRL), 0.6% D-(+)-glucosa (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomina (obtenidas de Gibco-BRL). Las células se cultivan en incubadores a 37°C en una atmósfera que contienen un 5% de CO₂.

2.2. Cultivo primario de neuroesferas embrionarias de E14.5

El aislamiento y cultivo de NSCs embrionarias se ha llevado a cabo utilizando ratones de la cepa B6CBA en el día E14.5 de gestación. Tras anestesiarse profundamente a las madres, los fetos se extraen rápidamente del útero mediante sección cesárea. El protocolo seguido es idéntico al de los cultivos primarios, hasta el momento de sembrar las células. Tras la disgregación del tejido con una pipeta Pasteur con la punta cerrada a la llama, se centrifugan y resuspenden las células, que se siembran a una concentración de 5x10⁴ céls/ml en medio consistente en: DMEM (Sigma) y F12 (Gibco-BRL) (1:1), glutamina 2 mM, Hepes 1M, suplementado con un 1.5% de glucosa, 50 U/ml penicilina/estreptomina, N2-supplement 1X (todos obtenidos de Gibco-BRL), EGF 10 ng/ml (Gibco), FGF 20 ng/ml (Sigma) y Heparina 0.2% (Sigma). Las neuroesferas crecen en suspensión y se pasan cada 5 días mediante disgregación mecánica, sembrándolas a una concentración de 10⁴ céls/ml en el medio antes mencionado.

Para analizar el efecto de la falta de expresión de Ikaros en la proliferación y auto-renovación de NSCs embrionarias, se utilizan embriones derivados de cruces entre animales heterocigotos para Ikaros. El proceso de extracción y cultivo es igual al descrito anteriormente pero en este caso, el cerebro de cada embrión se procesa independientemente a la espera de saber

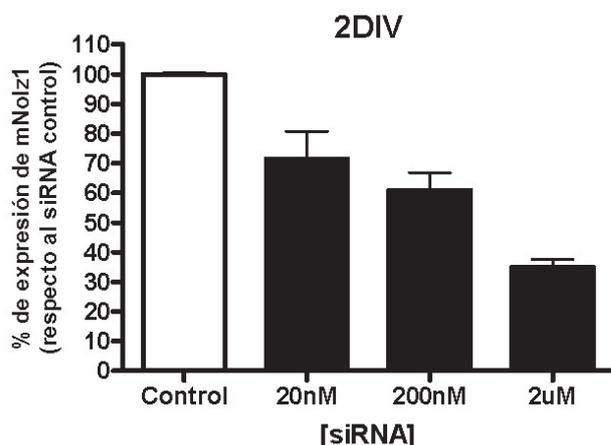
el genotipo de cada uno de ellos. Una vez disgregadas las células, se cuentan utilizando la cámara de Neubauer y se siembran las células correspondientes al cerebro de un embrión en un pocillo de una placa de 6 pocillos conteniendo 3 ml de medio. A las 24 horas se cambia el medio por un medio libre de suero y las neuroesferas se dejan crecer durante 5 días más, cambiando el medio cada tres días. Transcurrido este tiempo se cuenta el número de neuroesferas por pocillo utilizando la cámara de Neubauer. A continuación las neuroesferas se disgregan y se cuenta el número total de células contenidas en las neuroesferas utilizando la cámara de Neubauer. Refiriendo el número total de células al número de neuroesferas de partida conseguimos tener una medida aproximada de la proliferación de los precursores neurales.

2.2.1. Transfección

Para llevar a cabo los estudios de sobre-expresión de Nolz, se clonó el CDS de la proteína contenido en el plásmido pOTB ((MGC Full-length (IRAU) collection, clone ID 4053098, Invitrogen) en el plásmido p-IRES-DsRED-Express (BD Biosciences, Clontech) mediante los sitios de restricción EcoRI y SmaI del MCS (del inglés Multiple Cloning Site) de ambos vectores. Se transfectaron neuroesferas con el plásmido pNolz1-IRES-DsRED-Express que codifica para la expresión del CDS completo de esta proteína, seguida de un lugar interno de unión a ribosomas tras el que está codificada la proteína fluorescente roja DsRED. Como plásmido control se utiliza el plásmido vacío p-IRES-DsRED-Express.

A los cinco días de cultivo, neuroesferas de pase 4 a 7, se disgregan mecánicamente y se transfectan por nucleofección siguiendo las instrucciones del fabricante (AMAXA biosystems, Cologne, Germany) para la transfección de NSCs de ratón. Se transfectan 5×10^6 células con 12 μg de plásmido p-IRES-DsRED-Express o plásmido pNolz1-IRES-DsRED-Express utilizando el programa A33 del Nucleofector.

Para la disminución del mRNA de Nolz1, se utilizó un cocktail de 3 siRNAs contra Nolz1 (Silencer Pre-designed siRNA, IDs: 89661, 169777, 89565, Ambion) y como control negativo, un siRNA control que no reconoce ningún mRNA (Silencer Negative Control #1 siRNA, Ambion). La concentración

**Figura 1**

Expresión de Nolz1 en NSCs proliferantes 2 días después de la transfección de concentraciones crecientes de un cóctel de 3 siRNAs contra el mRNA de Nolz1. Los valores se relativizan a la transfección del siRNA control en cada concentración

utilizada de siRNA es de 2 μ M, ya que es la que da una mayor inhibición de la expresión de Nolz1 (figura 1).

Para el análisis de los cambios en la expresión génica en células proliferantes, se sembraron 5x10⁵ células en placas de 6 pocillos, que se recogieron mediante centrifugación a los 2 y 5 DIV (días in vitro) para su posterior análisis por RT-PCR.

Para llevar a cabo los estudios de sobre-expresión de Ikaros, se procede a la transfección de las neuroesferas con el plásmido pMX-Ik1-IRES-GFP que codifica para la expresión de la isoforma 1 de Ikaros unida a la proteína verde EGFP descrito previamente (Gomez-del-Arco et al., 2004) y amablemente cedido por la Dra. Katia Georgopoulos. Como plásmido control se utiliza pmax-EGFP que codifica para EGFP (AMAXA). A los siete días de cultivo de las neuroesferas, éstas son disgregadas con tripsina 0,05% (Gibco-BRL) y transfectadas por nucleofección siguiendo las instrucciones del protocolo de Amaxa para la transfección de NSCs de ratón. Se transfectan 5x10⁶ células con 12 μ g del plásmido de Ikaros1 ó 4 μ g de plásmido control EGFP utilizando el programa A33 del Nucleofector. Para el análisis de los cambios en la expresión génica en células proliferantes, se sembraron 5x10⁵ células en pocillos de P6, que se recogieron mediante centrifugación a los 2DIV para su posterior análisis por RT-PCR.

2.2.2. Diferenciación

Para la diferenciación tripotente de las neuroesferas embrionarias, éstas se disgregan mecánicamente y se siembran a una densidad de 50.000

células/ml en condiciones normales y 500.000 células/ml en el caso de las neuroesferas recién nucleofectadas, en medio completo.

Al día siguiente, la neuroesferas se enganchan en placas de 6 ó 24 pocillos previamente tratadas durante al menos 2 horas con matrigel diluido 1:100 en medio control (Matrigel, GF-Reduced, BD Biosciences) y lavadas tres veces con agua tridestilada estéril. Tras dejar las placas 10 minutos en el incubador para permitir que las neuroesferas se enganchen a la matriz, se cambia el medio a medio control con FGF 10ng/ml. Dos días después, las células se fijan, se hace “pellet” para extracción de RNA o se les cambia el medio para permitir que continúe la diferenciación. El medio que se añade en este punto (3DIV) es medio control con un 2% de FBS. Al cabo de tres días más, todos los pocillos se fijan y se recogen los “pellets”.

Para la diferenciación enriquecida en neuronas y astrocitos, el procedimiento es el mismo excepto en los cambios de medio. Para el cultivo enriquecido en neuronas, se utiliza medio control con 10 ng/ml de FGF para todos los cambios de medio; para el enriquecido en astrocitos, se utiliza medio control con un 2% de FBS en todos los cambios de medio. En el caso de las diferenciaciones enriquecidas en oligodendrocitos, el procedimiento básico es también el mismo pero las placas se tratan con fibronectina y laminina. La fibronectina 20 µg/ml diluida en agua estéril se añade a los pocillos y se deja la placa durante toda la noche en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Se lavan los pocillos 3 veces con agua estéril y se añade la laminina 5 µg/ml diluida en agua estéril y se dejan de nuevo las placas en el incubador durante 2 horas. Al sembrar las células, se hace sin lavar previamente los pocillos. Tras enganchar las células, se cambia el medio por medio control con PDGFα 10 ng/ml diluido en ácido acético 10mm y este mismo medio se utiliza para el resto de días de diferenciación.

Todos los medios son cambiados cada 2DIV.

2.3. Cultivo y transfección de la línea de células madre neurales C17.2

La línea de NSCs C17.2 utilizada para llevar a cabo los estudios de sobre-expresión del factor de transcripción Ikaros se cultivan tal y como se describe en: (Akerud et al., 2001). Las células se mantienen y expanden en medio de cultivo compuesto por DMEM suplementado con 10% suero fetal

bovino, 5% suero de caballo y 2 mM glutamina (todos obtenidos de Gibco-BRL) en condiciones estándar de temperatura y humedad (37°C/5%CO₂). El medio se cambia cada dos días y cuando las células alcanzan un 80-90% de confluencia se pasan realizando una dilución 1:10.

Para llevar a cabo el estudio de sobre-expresión de Ikaros se procede a la transfección de la línea C17.2 con el plásmido pMX-Ik1-IRES-GFP o el plásmido control pmax-EGFP que codifica para (EGFP). La transfección se lleva a cabo pasando las células el día antes a placas de 6 pocillos tratados con poly-D-lysine (Sigma) realizando una dilución celular 1:5. Cuando las células llegan a un 70-80% de confluencia se transfectan con lipofectamina (lipofectamina 2000 reagent, Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para transfectar un pocillo se utilizan 4 µg de plásmido (Ikaros o EGFP) y 20 µl de lipofectamina en un volumen final de 500 µl de medio N2 compuesto por: DMEM-F12 (1:1) (ambos de Gibco-BRL) suplementado con 10 ng/ml insulina, 100 µg/ml transferrina, 100 mM putrescina, 20 nM progesterona, 30 nM selenito, 6 mg/ml glucosa y 1 mg/ml albúmina de suero bovino, (todos obtenidos de Sigma). Estos 500 µl se añaden a los 1,5 ml de medio N2 que hay en los pocillos donde se encuentran las células y se incuba durante 5 horas. Pasado este tiempo se aspiran los pocillos, se realizan dos lavados con PBS y se añade medio nuevo N2 para permitir que las células se diferencien. 24, 48, 72 y 120 horas después de la transfección las células se tripsinizan, centrifugan y procesan para ser analizadas por PCR cuantitativa.

2.4. Cultivo y diferenciación de células madre embrionarias

La línea R1 de ESCs de ratón utilizada para llevar a cabo el estudio del efecto del RA sobre la expresión de Nolz1, ha sido desarrollada en el laboratorio de Nagy A. del Samuel Lunenfeld Research Institute, Canadá (Nagy et al., 1993).

El mantenimiento y diferenciación de las ESCs se ha llevado a cabo tal y como se ha descrito previamente (Martin-Ibanez et al., 2007). Estas células se mantienen en cultivo en estado indiferenciado sembrándolas sobre una monocapa de fibroblastos murinos primarios inactivados mitóticamente (mediante el tratamiento con mitomicina C a la concentración de 0,1 µg/ml durante dos horas) en presencia de 1000 U/ml de LIF (ESGRO. Millipore,

Bedford, MA). El medio de cultivo de ESCs utilizado consiste en “Knockout DMEM” (Dulbecco’s minimal essential medium; Gibco-BRL, Renfrewshire, Scotland, UK) suplementado con 15% “knockout serum replacement” (Gibco-BRL), 0,1 mM 2-βmercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, 0,1 mM aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (todos estos productos son obtenidos de Gibco-BRL).

Antes de iniciar la diferenciación de las ESCs eliminamos la monocapa de fibroblastos pasando las ESCs a placas tratadas con gelatina. Para evitar que las ESCs se diferencien en la ausencia de fibroblastos las cultivamos en presencia de 1.400 U/ml de LIF en el medio descrito anteriormente.

La diferenciación de ESCs la llevamos a cabo mediante la formación de cuerpos embrioides. Para inducir la formación de estos agregados celulares, las células son disociadas con tripsina/EDTA 0,05% (Gibco-BRL) hasta conseguir una suspensión de células individuales que se siembran en placas de cultivo no adherentes de grado bacteriológico a una densidad final de $1-2 \times 10^4$ células/cm² en medio de cultivo ESC. Los cuerpos embrioides se forman en suspensión durante 6 días y el medio de cultivo se cambia cada dos días. Estas condiciones corresponden a las de cultivo control sobre las que se introducen modificaciones. Durante los dos primeros días de la formación de cuerpos embrioides, 1000 U/ml de LIF están presentes en el medio de cultivo. A los dos días de formación de cuerpos embrioides, el medio es reemplazado y varias concentraciones de RA (all-trans-retinoic acid. Sigma, St Louis, MO, USA) son añadidas al medio (0 M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M y 10⁻⁶ M). El medio se reemplaza cada dos días con medio nuevo conteniendo las mismas concentraciones de RA hasta el final de la formación, en que se recogen las muestras para su análisis por RT-PCR.

3. Obtención y cultivo de rodajas telencefálicas embrionarias

Para la obtención de cultivos de rodajas telencefálicas, se han usado ratones salvajes o plp/dm20-GFP. Tras extraer los cerebros a E14.5, se incluyen en agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) y se cortan rodajas coronales de 250µm en un vibrátomo. Las rodajas se depositan en buffer KREBS suplementado con HEPES y penicilina-estreptomicina y se montan sobre membranas con medio (MEM con un 10% de suero bovino y penicilina-

estreptomycin). Tras una hora en el incubador, el medio se cambia por Neurobasal suplementado con B27, HEPES 1M, 50 U/ml de penicilina-estreptomycin y L-glutamina 2mM.

3.1. Eletroporación de rodajas telencefálicas embrionarias

Dos horas después del cambio de medio a Neurobasal, las rodajas se electroporan con 8µg de plásmido pNolz1-IRES-DsRED-Express o su control para los experimentos de sobreexpresión de Nolz1 o con una solución 2µM de un cóctel de 3 siRNAs o un siRNA control para los experimentos de disminución de la expresión de Nolz1. Para marcar la zona electroporada con siRNA se añadieron a la mezcla 500µg de un plásmido que codifica para GFP (pCAGS-GFP) o RFP (pCAGS-RFP). Dos días después de la electroporación las rodajas se fijaron durante dos horas con paraformaldehído al 4% en PBS. Tras deshidratarlas en concentraciones crecientes de etanol, se guardaron a 4°C hasta su procesamiento inmunohistoquímico. La expresión de GFP en las rodajas de los ratones plp/dm20-GFP se monitorizó cada 24 horas en el microscopio de fluorescencia.

4. Ensayos de RT-PCR cuantitativa

El RNA total se obtiene de diferentes muestras como:

- Neuroesferas proliferantes o en diferenciación
- Tejido estriatal a diferentes estadios del desarrollo (E14.5, E16.5, E19.5, P3, P7 y P15)
- C17.2 diferenciadas

La extracción se realiza utilizando el kit comercial: Total RNA Isolation Nucleospin[®] RNA II Kit (Macherey-Nagel. Düren, Germany). A partir de 500 ng de este RNA total se sintetiza cDNA utilizando primers aleatorios y el kit comercial: StrataScript[®] First Strand cDNA Synthesis System (Stratagene. Amsterdam, The Netherlands). La síntesis de cDNA se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante a 42°C durante 60 minutos en un volumen final de 20 µl. Una vez sintetizado el cDNA se analiza mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando los ensayos de expresión génica comerciales TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) que se detallan en la **tabla 1**. Para la detección específica de la expresión de Nolz1 de origen humano, se

diseñó una sonda Taqman específica tomando como molde la zona que rodea a la base número 659 de la secuencia codificante de la proteína (**tabla2**). Esta zona es la que presenta una mayor divergencia entre la secuencia humana y la de ratón, por lo que permite su discriminación por PCR. La RT-PCR se realiza en placas de 96 pocillos utilizando un volumen final de 25 μ l. La solución utilizada contiene 12,5 μ l Brilliant QPCR Master Mix (Stratagene), 1,25 μ l TaqMan Gene Expression Assays y 0,4 μ l de cDNA. La reacción se realiza con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial realizada a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de una PCR de dos pasos: 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 1 minuto.

El análisis de los datos obtenidos de las PCRs cuantitativas se lleva a cabo utilizando la versión 3.0 del software de análisis MxPro™ QPCR (Stratagene). Y la cuantificación se realiza mediante un análisis cuantitativo comparativo expresado como n veces la diferencia de expresión relativa respecto al control utilizado en cada caso, y siempre normalizado respecto al gen control, la subunidad 18s de rRNA.

Todos los ensayos de PCR cuantitativa se repiten un mínimo de 3 veces y únicamente las muestras que muestran resultados consistentes son utilizadas para análisis subsecuentes. Los controles negativos utilizados con el fin de excluir la contaminación por DNA genómico se obtienen omitiendo la transcriptasa reversa en el paso de la síntesis del cDNA, y estas muestras son sujetas a la reacción de PCR de la misma manera con cada una de las sondas TaqMan analizadas.

Gen	Sonda Taqmann
18S RNA	Hs99999901_s1 +
BF1 (Foxg1)	Mm02059886_s1 -
Delta1 (DII1)	Mm00432841_m1+
Deltex1 (Dtx1)	Mm00492297_m1+
GFAP	Mm00546086_m1 +
Gsh2	Mm00446650_m1 +
Hes1	Mm00468601_m1+
Hes5	Mm01266490_g1+
hNolz	Assay-by-design*
Ikaros1 (Zfpn1a1)	Mm01187878_m1
Islet1 (Isl1)	Mm00627860_m1 +
Jagged1 (Jag1)	Mm00496902_m1
Mash1 = Ascl1	Mm01228155_g1 -
Meis2 = Mrg1	Mm00487748_m1 +

Nestina	Mm00450205_m1 +
Nolz1 (Zfp503)	Mm00520908_m1 +
Notch1	Mm00435245_m1+
Notch3	Mm00435270_m1+
Olig1	Mm00497537_s1 +
Olig2	Mm01210556_m1
PDGFR α	Mm01211694_m1
Plp1	Mm00456892_m1
RALDH3 (Aldh1a1)	Mm00657317_m1 +
RAR α	Mm00436264_m1 +
RAR β	Mm01319674_m1 +
RAR γ	Mm00441083_m1 +
RBPJ- κ (Rbpsuh)	Mm00770450_m1+
Sox10	Mm01300162_m1
Sox2	Mm00488369_s1 +
Tle1	Mm00495643_m1 +
Tle4	Mm01195160_m1 -
Vimentina	Mm00449208_m1 -
β -III-tubulina	Mm00727586_s1 +

Tabla 1. Listado de sondas TaqMan utilizadas con el nombre del gen y la sonda a la que corresponde.

Primer	Secuencia
Forward	CCTCGCCCTCCTCCAAAC
Reverse	GCCCGATTTGGTGTCTTGT
Reporter	TCTCCTCGGTTGCCTCC

Tabla 2. Secuencia de los primers de la sonda TaqMan[®] diseñada para el reconocimiento de hNolz1

5. Obtención de un anticuerpo policlonal contra Nolz1

Dado que no existe ningún anticuerpo, ni comercial ni generado por otros laboratorios, para el reconocimiento de la proteína Nolz1, nos fijamos el objetivo de conseguir un anticuerpo policlonal contra dicha proteína.

Para ello, en primer lugar, se sintetizó un oligopéptido correspondiente a los aminoácidos 2 a 14 de la secuencia proteica de Nolz1 (TAPSLSALRSSKC). Esta zona fue analizada mediante un BLAST de proteínas (NCBI) para asegurarse de que no corresponde a ninguna otra proteína del transcriptoma de ratón, dando resultados negativos. Cabe destacar que sí tiene un 100% de coincidencia con los genes homólogos a Nolz1 en rata y humano. También se

analizaron las posibilidades de esta zona a estar fosforilada, metilada o glicosilada, lo que dificultaría su reconocimiento, mediante el programa Expasy-ProtScale. El análisis reveló únicamente cierta tendencia a la fosforilación. También se estudió de forma teórica su antigenicidad mediante las aplicaciones online de CVC-Bioinformatics y EMBOSS Explorer, en ambos casos con resultados positivos. Este péptido fue conjugado a KLH para potenciar su inmunogenicidad. La síntesis y conjugación fue llevada a cabo por el servicio de proteómica y síntesis de péptidos de la Universidad Pompeu Fabra (a cargo de Eva Borrás).

Se utilizaron dos conejos, a los que se extrajo sangre antes de comenzar el protocolo para su uso como control. La inmunización se realizó mediante la inyección de 500µg de péptido unido a KLH (del inglés Keyhole Limpet Hemocyanin, péptido que se usa para incrementar la inmunogenicidad de los péptidos) resuspendido en 500µl de PBS más 500µl de adyuvante completo (Sigma-Aldrich). Tres semanas después se administró la primera dosis de recuerdo, preparada de la misma forma que la primera inmunización pero usando adyuvante incompleto en vez de completo. Dos semanas después de este primer recuerdo, se extrajo la primera muestra de sangre (sangrado 1). Dos semanas más tarde, se administró la segunda dosis de recuerdo, preparada de la misma forma que la primera, de nuevo dos semanas después se extrajo la segunda muestra de sangre (sangrado 2). Una semana más tarde, se administró la tercera y última dosis de recuerdo. Tras 10 días, se procedió a la exanguinación completa de los animales.

La sangre obtenida en todos los puntos, fue dejada durante toda la noche a 4°C en posición vertical en tubos de 10ml para permitir la completa separación del suero. Tras esta separación, el suero se transfirió a tubos nuevos y se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue alicuotado y guardado a -20°C hasta su utilización.

Para caracterizar el anticuerpo, en primer lugar se realizó un DOT-BLOT contra el péptido usado para la inmunización, tanto puro como unido a KLH. Para ello se puso en una membrana 0.5µl de péptido, se dejó secar totalmente y se siguió el protocolo habitual de Western Blot (WB) (ver apartado 6). Como

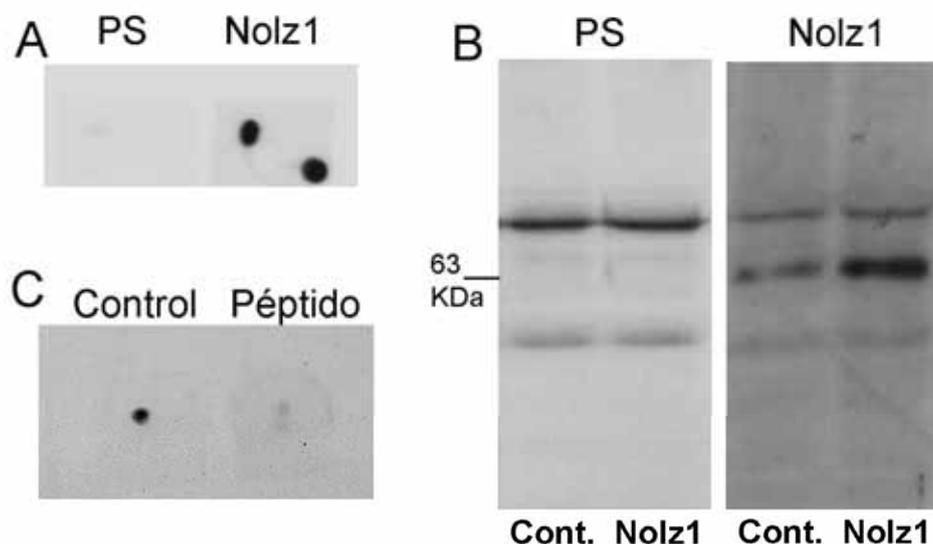


Figura 2

A: Dot-Blot contra el péptido de Nolz1 puro (gota superior) o unido a KLH (gota inferior) con el suero del conejo antes (PS) y después (Nolz1) de la inmunización. B: WB de NSCs proliferantes control (C) o transfectadas con hNolz1 (N) cinco días después de la transfección. C: Dot-Blot contra el péptido de Nolz1 tras incubarlo con el suero del conejo después de la inmunización con el mismo péptido (Péptido) o con el vehículo en que está disuelto (Control).

se observa en la figura 2A, la incubación con el suero antes de la inmunización (PS) no generó ninguna marca, mientras que el suero tras la inmunización (Nolz1) se unió específicamente al péptido. A continuación se realizó un WB de NSCs proliferantes control o transfectadas con hNolz1 para determinar si el anticuerpo se une a la proteína entera y no únicamente al péptido. En la figura 2B se puede observar que sólo únicamente el suero que contiene anticuerpos anti-Nolz1 reconoce la banda correspondiente a Nolz1, que tiene un peso de 63KDa. Además se puede ver que las NSCs expresan abundantemente Nolz1, y que sus niveles son más altos en las células transfectadas. Para comprobar la especificidad del anticuerpo, se procedió a bloquearlo con un exceso de péptido. Para ello, 1µl de anticuerpo con y sin 25µg de péptido, se diluyeron en 100µl de PBS y se incubaron durante 2 horas a 37°C en agitación suave. Tras este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 4°C y 12.000 rpm. El sobrenadante se diluyó en 5 ml de PBS-azida y se incubaron con esta

mezcla membranas de Dot-Blot como las mencionadas anteriormente. Si el anticuerpo reconoce específicamente el péptido, quedarán unidos durante la agitación a 37°C y al centrifugar las muestras, las IgGs quedarán en el pellet junto al péptido. En caso contrario, las IgGs quedarían libres en el sobrenadante. Como se observa en la figura 2C, este experimento demuestra que el suero obtenido reconoce específicamente el péptido de Nolz, ya que desaparece el marcaje al incubar el anticuerpo con el mismo.

6. Western blot e inmunoprecipitación

Dos tipos de muestras son sometidas al análisis de la cuantificación proteica mediante la técnica de western blot:

- Neuroesferas en diferentes estadios de diferenciación
- Muestras de tejido de diferentes edades embrionarias

Para la detección de Nolz1, las muestras se homogenizaron pasándolas entre 3 y 5 veces por una aguja de insulina en un tampón cuya composición es: 50mM Tris-Base pH7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP40 y un cóctel de inhibidores de proteasas 1x. Un vez lisadas, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se alicuotó y guardó a -80°C para su posterior utilización. Para su análisis, 30µg de lisado de tejido o 10µg de lisado celular se cargaron en un gel de acrilamida al 8%, en el cual se separaron por electroforesis a 30mA durante aproximadamente una hora y media. Tras ese tiempo, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (WhatMan, PROTMAN, Alemania) y se bloquearon una hora con TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05% tween-20) con un 10% de leche en polvo sin grasas. La incubación con el anticuerpo primario anti-Nolz1 1:50.000 en PBS-Azida 0,02% se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche. Tras varios lavados con TBST, las membranas se incubaron con una IgG anti-inmunoglobulina de conejo conjugada a HRP (1:3.000; Promega) durante una hora y se reveló el marcaje mediante ECL Western blotting analysis system (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Germany).

En el caso de la detección de Ikaros en el tejido estriatal, las muestras se homogenizan de la misma manera pero en tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% dodecil sulfato sódico, 0,5% deoxicolato de sodio, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 1

µg/ml leupeptina). Tras la homogenización, las muestras se centrifugan y una vez recuperado el sobrenadante se cuantifica. 30µg de proteínas del sobrenadante se cargan en un gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% y este gel se transfiere a membranas de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA). Las membranas se bloquean con una solución de TBST conteniendo un 3% de leche en polvo libre de grasas y una vez bloqueadas se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (Ikaros 1:2000; amablemente cedido por Dra. Katia Georgopoulos, Harvard Medica School, Massachusetts). Al día siguiente y tras varios lavados en TBST, las membranas se incuban con el anticuerpo secundario contra ratón IgG HRP-conjugado (Promega, Mannheim, Germany) en una dilución 1:1.000 durante una hora y después se procede al revelado mediante el sistema de análisis de WB ECL (Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Germany).

Para realizar el control de carga las membranas se reincuban con un anticuerpo monoclonal contra actina (1:10.000; MP Biomedicals, Inc. Illkirch, France).

Los geles de WB se escanean y cuantifican utilizando el programa Phoretix 1D Gel Analysis (Phoretix International Ltd., Newcastle, UK).

Para cada muestra se utilizó una “n” mínima de tres animales o cultivos.

7. Estudio de proliferación celular: tratamiento con BrdU

7.1. Estudio de proliferación durante el desarrollo del núcleo estriado

Con el fin de estudiar si la falta de expresión de Ikaros está afectando a la diferenciación de neuronas estriatales a diferentes estadios del desarrollo, ratonas gestantes heterocigotas para Ikaros son inyectadas intraperitonealmente a diferentes días de gestación: E12.5, E14.5 y E16.5 con 50 mg/kg de BrdU (Sigma) en una solución isotónica de NaCl 0,9%. Los embriones continúan su desarrollo hasta E18.5, momento en el cual son extraídos previa anestesia de las madres gestantes. De esta manera conseguimos que las células que experimenten su última división en el momento de la inyección de BrdU lo incorporen y lo mantengan indefinidamente, mientras que las células que continúen proliferando, lo diluirán. (figura 3)

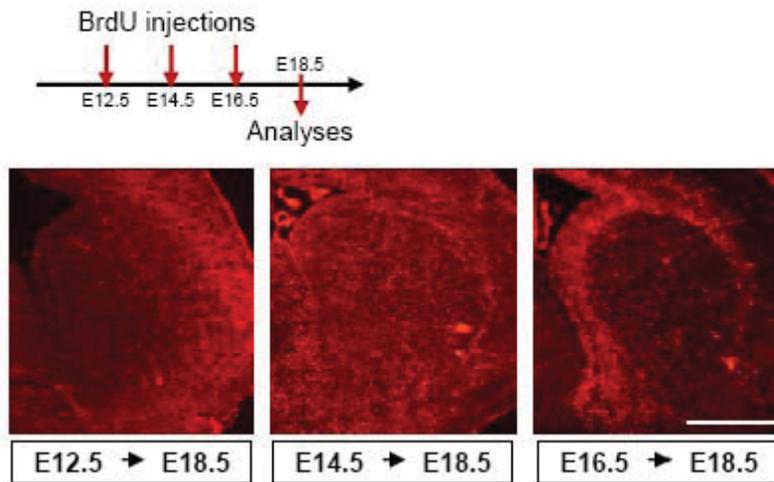


Figura 3

Esquema e inmunohistoquímicas para BrdU representativas del experimento de incorporación de BrdU diseñado para detectar la neurogénesis en distintos momentos del desarrollo estriatal.

De esta manera, las células que se encuentren proliferando en el momento de la inyección de BrdU, lo incorporarán y lo mantendrán, ya que media hora no es tiempo suficiente para diluirlo debido a diferentes rondas de replicación.

Los cerebros de los embriones son extraídos y fijados durante 24 horas en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, de pH 7.4. Una vez fijados son crioprottegidos en soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa en PBS (10-30% sacarosa/PBS) y congelados en isopentano enfriado en CO₂ sólido. Las secciones coronales obtenidas de dichos cerebros se incuban en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y se neutraliza la acción del HCl incubando las secciones durante 10 minutos en una solución de borato sódico 0,1M pH 8,5 a temperatura ambiente. A continuación son procesadas para la detección inmunohistoquímica de BrdU tal y como se describe previamente (Bosch et al., 2004). Como mínimo tres embriones normales y tres embriones deficientes de Ikaros fueron analizados para cada tiempo de administración de BrdU.

7.2. Estudio de proliferación de neuroesferas embrionarias

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión de Nolz1 e Ikaros1 en la proliferación de neuroesferas embrionarias, dos días después de la transfección las neuroesferas se adhieren a placas de 24 pocillos tratadas con

Por otro lado, con el fin de detectar las células que se encuentran proliferando en la LGE a E14.5, ratones heterocigotos de Ikaros gestantes son inyectados intraperitonealmente con BrdU en ese día gestacional y 30 minutos después son anestesiados terminalmente con el fin de

matrigel. Diez minutos después de la adhesión se realiza un pulso de diez minutos con BrdU (Sigma) a la concentración de 3µg/ml. A continuación las células se fijan con paraformaldehído al 4% en PB 0,1M pH 7,4 durante 15 minutos, se lavan tres veces con PB, se incuban en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y se neutraliza la acción del HCl incubando las células durante 10 minutos en una solución de borato sódico 0,1M pH 8,5 a temperatura ambiente y finalmente se lavan de nuevo cuatro veces más con PB. Una vez realizados estos tratamientos y lavados, las células son procesadas para la detección inmunocitoquímica de BrdU tal y como se describe en el apartado 7.

8. Procedimientos de detección inmunocito e inmunohistoquímica

8.1. Inmunocitoquímica

Los diferentes tipos de cultivos sometidos a detección inmunocitoquímica son los siguientes:

- Cultivos primarios de LGE a E14.5 a los 5 DIV en cultivo.
- Neuroesferas embrionarias proliferantes y diferenciadas.

Para la detección de antígenos específicos en las células en cultivo se procede de la siguiente forma, excepto para Nolz1. Los cultivos son fijados, en los días establecidos para cada tipo de cultivo, con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 durante 15 minutos. Después de una incubación de 1 hora en PBS con Tritón X-100 (0.2%) y suero fetal bovino (10%), los cultivos son incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios adecuados disueltos en PBS con Tritón X-100 (0.2%) y suero fetal bovino (5%). Seguidamente se someten a tres lavados con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario apropiado durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la inmunodetección por fluorescencia se ha usado el anticuerpo contra inmunoglobulina de conejo conjugado a Cy3 (1:400; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.), o bien el anticuerpo contra inmunoglobulina de ratón conjugado con Cy2 (1:100; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Tras varios lavados con PBS, se contratiñen los núcleos con DAPI 1:5000 durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavan de nuevo los cubres con PBS y se montan sobre portas con mowiol (Merck Chemicals Ltd., Nottingham).

Para la detección de Nolz1, el proceso de fijación es el mismo, pero antes de incubar con el anticuerpo primario se debe desnaturalizar el DNA para facilitar el acceso del anticuerpo al núcleo. Por eso, se incuban los cubres con HCl 2N a 37°C durante 20 minutos, tras lo que se neutraliza el ácido clorhídrico mediante una incubación con Borato Sódico 0.1M a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de lavar los cubres 2 veces con PBS durante 5 minutos, se procede al bloqueo de las muestras mediante la siguiente solución: PBS con un 0.2% de Tritón, Glicina 0,2M y un 15% de Horse Serum (HS). A continuación, se procede a la incubación con el anticuerpo anti-Nolz1 1:20.000 durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS con un 0.2% de Tritón y un 5% de HS. Tras cuatro lavados con PBS de cinco minutos cada uno, se aplica el anticuerpo fluorescente secundario conjugado a Cy3 que reconoce la inmunoglobulina de conejo, 1:400 en la misma solución que el primario durante toda la noche a 4°C. El protocolo a partir de este punto es el mismo que para el resto de las inmunocitoquímicas. En las detecciones de Nolz1 se usa siempre como control negativo la incubación con el suero de conejo antes de la inmunización.

8.2. Inmunohistoquímica

Para la detección de antígenos específicos en tejido cerebral por inmunohistoquímica se han procesado las siguientes muestras.

- Cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros a P3 y adultos (1 mes) para análisis del núcleo estriado
- Cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros a E14.5 y E18.5 así como animales deficientes de Ebf1 a la edad de E18.5

Para llevar a cabo la detección de antígenos específicos en los animales adultos o a P3, los ratones son perfundidos transcardíacamente con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M de pH 7.4 a los tiempos citados para cada muestra. Los cerebros son extraídos, postfijados durante 2 horas a 4°C en la misma solución y criopreservados en soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa en PBS (10-30% sacarosa/PBS). Se congelan en isopentano enfriado en CO₂ sólido y se cortan secciones de 30 µm de espesor en el criostato (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Germany) las cuales se recogen

en flotación en PBS. Para el bloqueo de la autofluorescencia se incuban las secciones con 50 mM de cloruro amónico. El tejido se permeabiliza y se bloquea con PBS + Tritón X-100 (0.3%) + suero normal de caballo (1.5%) + suero bovino de albúmina (1%) a temperatura ambiente durante 1 hora. La incubación con los anticuerpos primarios se lleva a cabo a 4°C durante toda la noche en la misma solución. Después de los lavados se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios fluorescentes adecuados durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montan con Mowiol. Alternativamente, para DARPP-32, NeuN y calbindina, se han usado anticuerpos secundarios biotinilados contra los mismos antígenos, en cuyo caso se han visualizado mediante el método del ABC (Pierce), y finalmente revelado con DAB. Los procedimientos inmunohistoquímicos se han realizado usando los mismos tiempos de revelado para todas las secciones para así realizar las comparaciones de forma adecuada.

También se ha llevado a cabo la detección de antígenos específicos en tejido cerebral embrionario de E14.5 y E18.5. Para ello se extraen los embriones de sus madres previa anestesia de éstas y se disecan sus cerebros para después fijarlos en paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M de pH 7.4 y criopreservarlos en soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa en PBS (10-30% sacarosa/PBS). Se congelan con isopentano enfriado en CO₂ sólido y se cortan secciones coronales de 14 µm en un criostato (Leica Microsystems GmbH) que son recogidas serialmente sobre portaobjetos previamente tratados con silane (Sigma). Las secciones son postfijadas durante 15 minutos con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M de pH 7.4, excepto en la detección inmunohistoquímica de BrdU, en la cual después de dos lavados se procede tal y como se describe en el apartado 7.3. A continuación, en ambos casos se realizan tres lavados con PBS, se permeabiliza y se bloquea con PBS con Tritón X-100 (0.3%) y albúmina de suero bovino (1%) a temperatura ambiente durante 1 hora y las secciones son incubadas con los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche. Después de dos lavados se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios (contra-conejo Cy2, 1:150 y contra-ratón Cy3, 1:200, (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se montaron con Mowiol (Merck).

Todos los cultivos y secciones de tejido, excepto los procesados con DAB, son contrateñidos con DAPI (Sigma) para visualizar y contar el número total de células. En las inmunocitoquímicas dobles ambos anticuerpos primarios y secundarios fueron incubados al mismo tiempo. No se ha observado ninguna señal en ensayos control en los que no se ha añadido el anticuerpo primario. Microscopia convencional o confocal se ha utilizado para tomar las fotomicrografías fluorescentes.

Anticuerpo	Hecho en	Dilución	Casa comercial
BrdU	ratón	1:50	DAKO
ChaT	conejo	1:4.000	Chemicon
DARPP-32	conejo	1:500	Chemicon
EGFP	conejo	1:1.000	Molecular Probes
Encefalina	conejo	1:2.000	Inmunostar
GFAP	ratón	1:500	Sigma
GFAP	conejo	1:500	DAKO
Islet1	ratón	1:25	Hybridoma Bank
Ki67	conejo	1:200	Thermo Scientific
MAP2	ratón	1:200	Sternberger
Nestina	ratón	1:40	Hybridoma Bank
NeuN	ratón	1:100	Chemicon
Nolz1	conejo	1:20.000	No comercial
O4	ratón	1:75	Chemicon
Parvalbúmina	conejo	1:1.250	Sigma
Sustancia P	conejo	1:1.000	Inmunostar
Tie4	conejo	1:200	Cedido por el Dr.Stefano Stifani (McGill University)
β -III-tubulina	ratón	1:200	Sigma
β -III-tubulina	conejo	1:500	Sigma

9. Ensayo de TUNEL para la detección de muerte celular

Para la detección de células en proceso de muerte celular, principalmente a través de apoptosis, se ha utilizado el Sistema de Detección de Apoptosis *in Situ* (Promega). La técnica del TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) permite la detección del DNA fragmentado mediante el marcaje con dUTP marcado con un fluorocromo que se une covalentemente a los extremos libres de DNA.

Los cerebros son disecados y congelados directamente en isopentano enfriado en CO₂ sólido. Secciones coronales de 14 μ m son recogidas

serialmente sobre portas previamente tratados con silane (Sigma) y procesadas tal y como indica el fabricante para la detección de muerte celular.

10. Hibridación *In situ*

10.1. Hibridación *In situ* radioactiva

Para analizar la expresión de diferentes factores de transcripción en el sistema nervioso central en desarrollo, los cerebros de animales de las siguientes edades: E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P3, P7 y P15 se diseccionaron y fueron congelados en isopentano a -80°C . Tras cubrirlos de tissue-tek, en el criostato se realizaron secciones de $14\ \mu\text{m}$ que fueron recogidas serialmente sobre portaobjetos tratados con silane (Sigma) y procesadas mediante hibridación *in situ* radioactiva. tal y como se describe en (Marco et al., 2002). Las sondas utilizadas se obtuvieron de la siguiente manera: La sonda de Ebf1 es complementaria a las bases 791 a 837 de la secuencia de Ebf1 (GenBank accession number NM_007897 [GenBank]). La sonda de ENK es complementaria a las bases 513-542 de la secuencia de ENK (GenBank accession number K02807 [GenBank]). La sonda de Ikaros es complementaria a las bases 93-137 de la secuencia de Ikaros (GenBank accession number NM_009578 [GenBank]). La sonda de Nolz1 es complementaria a las bases 3.226 a 3.266 de la secuencia de Nolz1 (GenBank accession number NM_145459 [GenBank]). La sonda de SP es complementaria a las bases 223-270 de la secuencia de SP (GenBank accession number NM_34183 [GenBank]). La sonda de Tle1 es complementaria a las bases 1.942 a 1.983 de la secuencia de Tle1 (GenBank accession number NM_011599 [GenBank]). La sonda de Tle2 es complementaria a las bases 1.351 a 1.389 de la secuencia de Tle2 (GenBank accession number NM_019725 [GenBank]). La sonda de Tle3 es complementaria a las bases 3.434 a 3.474 de la secuencia de Tle3 (GenBank accession number NM_001083927 [GenBank]). La sonda de Tle4 es complementaria a las bases 1.614 a 1.652 de la secuencia de Tle4 (GenBank accession number NM_011600 [GenBank]). Todas las sondas fueron sintetizadas comercialmente mediante el sintetizador de OPERON (OPERON Biotechnologies, Germany.)

10.1.1. Cuantificación de la expresión de encefalina y sustancia P.

Los niveles de expresión de encefalina y sustancia P se cuantifican sobre las películas de la hibridación *in situ* (n=4) como se describe previamente en (Pineda et al., 2005). Secciones consecutivas (23-29 secciones por animal) se escanean, y los niveles de mRNA se analizan utilizando el programa ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). La intensidad se cuantifica en un área cuadrada de 152.4 μm^2 y la señal de fondo de la misma área adyacente fuera del cerebro es sustraída. Los resultados son expresados como la media de varios animales, y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se hace utilizando el *test t de Student*.

10.2. Hibridación *In situ* no radioactiva

Los embriones fueron anestesiados mediante enfriamiento, diseccionados y fijados por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 4-12 horas. Las muestras son crioprotegidas mediante inmersión en un gradiente de sacarosa (10-30%), congeladas embebidas en OCT (Tissue-Tek) y cortadas en secciones de 20 μm utilizando un criostato. La hibridación *in situ* se realiza utilizando ribosondas de digoxigenina en secciones congeladas de 20 μm tal y como se describe previamente (Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser, 1993).

10.3. Sondas utilizadas para la hibridación *in situ*

Las sondas utilizadas se obtuvieron de la siguiente manera: la sonda de Ebf1 es complementaria a las bases 791 a 837 de la secuencia de Ebf1 (GenBank accession number NM_007897 [GenBank]). La sonda de ENK es complementaria a las bases 513 a 542 de la secuencia de ENK (GenBank accession number K02807 [GenBank]). La sonda de Ikaros es complementaria a las bases 93 a 137 de la secuencia de Ikaros (GenBank accession number NM_009578 [GenBank]). La sonda de Nolz1 es complementaria a las bases 3.226 a 3.266 de la secuencia de Nolz1 (GenBank accession number NM_145459 [GenBank]). La sonda de SP es complementaria a las bases 223 a 270 de la secuencia de SP (GenBank accession number NM_34183 [GenBank]). La sonda de Tle1 es complementaria a las bases 1.942 a 1.983 de la secuencia

de Tle1 (GenBank accession number NM_011599 [GenBank]). La sonda de Tle2 es complementaria a las bases 1.351 a 1.389 de la secuencia de Tle2 (GenBank accession number NM_019725 [GenBank]). La sonda de Tle3 es complementaria a las bases 3.434 a 3.474 de la secuencia de Tle3 (GenBank accession number NM_001083927 [GenBank]). La sonda de Tle4 es complementaria a las bases 1.614 a 1.652 de la secuencia de Tle4 (GenBank accession number NM_011600 [GenBank]). Todas estas sondas fueron sintetizadas comercialmente mediante el sintetizador de OPERON (OPERON Biotechnologies, Germany.). Las sondas para la detección de los genes Dlx fueron proporcionadas por el Dr. Óscar Marín.

10.4. Marcaje doble de Hibridación *In situ* y de inmunohistoquímica

Tras revelar la expresión del mRNA de Nolz, los portaobjetos con las muestras de cerebro fueron sometidos al siguiente protocolo de inmunohistoquímica: se lavaron en PBS y se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS con un 0,3% de tritón y un 1% de BSA durante toda la noche a 4°C. Se realizaron varios lavados con PBS y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente, en la misma solución durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo que se realizaron lavados con PBS y una incubación de 15 minutos con DAPI 1:5.000. Finalmente, tras lavar de nuevo con PBS, se montaron los cubres con mowiol.

11. Recuentos celulares

11.1. Recuentos para la evaluación de la capacidad de autorenovación y proliferación de neuroesferas embrionarias

Con el fin de evaluar la capacidad de auto-renovación de las NSCs embrionarias se cuenta el número de neuroesferas primarias formadas a partir del cerebro de animales normales, heterocigotos y deficientes de Ikaros a los 5 días después de haber realizado el cultivo primario por contraste de fases. El número de neuroesferas es expresado de dos maneras, como el número total de neuroesferas por cerebro para cada genotipo y como el número de neuroesferas formadas por cada 10^6 células para evitar un efecto debido al tamaño del cerebro (ya que los ratones deficientes de Ikaros son más pequeños). A partir de estos experimentos también se analiza la capacidad de

proliferación de las NSCs embrionarias. Para ello se cuenta el número de neuroesferas, éstas se disgregan y se procede a contar el número total de células que contenían dichas neuroesferas con la cámara de Neubauer. Relativizando el número total de células al número total de neuroesferas tendremos una estimación del número de células que hay por neuroesfera y esto se expresa como el porcentaje medio de cada genotipo respecto al control (considerado el 100%) de un mínimo de tres experimentos independientes.

Estos mismos parámetros se analizan en las neuroesferas embrionarias transfectadas. La auto-renovación se evalúa contando el número de neuroesferas cinco días después de la transfección y el resultado es expresado como el porcentaje medio de neuroesferas transfectadas respecto a sus respectivos controles (considerados el 100%). El estudio de proliferación en este caso se realiza mediante un ensayo de BrdU descrito anteriormente (ver punto 7.4). El recuento de las células BrdU positivas nos permite estimar el número de células que se encuentran en proliferación, respecto al número total de células que se determina por recuento de núcleos teñidos con DAPI. El resultado se expresa como el porcentaje medio de células BrdU respecto al total de células en el cultivo, de un mínimo de tres experimentos independientes.

11.2. Recuentos de tipos celulares en la diferenciación de neuroesferas

El recuento del número de células positivas para los diferentes marcadores neurales tras la diferenciación se realizó al menos de 4 cultivos distintos, y siempre con replicados para cada n. Se tomaron fotos de un mínimo de 15 campos a un aumento de 20X en un microscopio de fluorescencia para cada canal (DAPI, Cy2 y/o Cy3). Las fotos se montaron para su mejor visualización y se contaron tanto el número de células totales como las positivas para cada marcador.

11.3. Recuentos estereológicos

Volúmenes: Los volúmenes del cerebro, bulbo olfativo, zona germinal y núcleo estriado de animales normales y deficientes de Ikaros se determinan utilizando un programa con herramientas de imagen (The University of Texas Health Center, San Antonio, TX) que se encuentra acoplado a un microscopio

Olympus (Ballerup, Denmark). Secciones consecutivas (14-16 secciones por animal) son visualizadas, y los bordes de la estructura anatómica marcadas. Los volúmenes son calculados multiplicando la suma de todas las áreas de las diferentes secciones (milímetros cuadrados) por la distancia entre secciones sucesivas (0.3mm para adultos y 0.14mm para embriones o animales postnatales) tal y como ha descrito previamente (Canals et al., 2004).

Recuentos celulares: Recuentos estereológicos se han realizado para las inmunohistoquímicas contra NeuN, DARPP-32, Parvalbúmina y ChAT, y para hibridaciones *in situ* de encefalina y sustancia P en el núcleo estriado de animales normales y deficientes de Ikaros, así como para las células positivas para BrdU en la zona germinal y el primordio estriatal de embriones de animales normales y deficientes de Ikaros. Para realizar estos recuentos se ha utilizado un software con herramientas estereológicas asistidas por ordenador (Olympus). Este método de recuento se ha utilizado para analizar secciones coronales separadas 300µm entre ellas para adultos y 140µm para embriones. Los marcos de recuento son escogidos al azar. La metodología concreta se ha llevado a cabo tal y como se ha descrito previamente (Canals et al., 2004).

12. Estadística

Todos los resultados se expresan como la media de diferentes experimentos independientes \pm SEM. Para el análisis estadístico se ha realizado el test *t* de *Student* o una ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*.

