



**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**

## **V. Discusión**



## V. DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha querido profundizar en el conocimiento sobre la formación y diferenciación de las neuronas estriatales de proyección. Para ello, nos hemos basado en el estudio de dos factores de transcripción que se expresan durante el desarrollo del núcleo estriado.

Uno de ellos, Nolz1, también llamado Zfp503, es un factor de transcripción de dedos de zinc que se expresa selectivamente en el estriado de rata desde E13 (Chang et al., 2004), y desde su identificación, ha sido considerado en numerosos trabajos como un marcador de neuronas estriatales de proyección inmaduras (Arlotta et al., 2008; Takahashi and Liu, 2006; Watanabe et al., 2005). Pese a esto, es poco lo que se conoce sobre sus mecanismos de regulación o sobre cómo interviene en la neurogénesis estriatal. Nolz1, ha resultado estar implicado en el control de la zona proliferativa de los precursores basales telencefálicos, la SVZ. En su estudio hemos utilizado diversos ensayos basados en el uso de precursores neurales y la observación de ratones deficientes para varios genes que podían estar relacionados con su función. Dos de las principales dificultades a que nos hemos enfrentado en este caso son, por una parte, la falta de marcadores específicos de las células que expresan Nolz1 y por otra, la heterogeneidad de los cultivos de neuroesferas. Para intentar solventar el primer problema, ha sido de gran ayuda la elaboración de un anticuerpo específico contra la proteína, ya que nos ha permitido corroborar los resultados de la expresión de mRNA mediante WB y realizar colocalizaciones con marcadores *in vitro*. El hecho de que el anticuerpo no funcione de forma adecuada para la detección inmunohistoquímica en cortes de cerebro, sin embargo, nos ha obligado a extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* con lo que ocurre *in vivo*, con las precauciones que eso supone. En el caso de las neuroesferas, el hecho de que en ellas convivan e interaccionen distintos tipos celulares, hace difícil la extracción de conclusiones sobre los efectos que provoca la modificación de sus características. Pese a esto, creemos que se trata del sistema más adecuado para este tipo de estudios, ya que mantienen muchas de las propiedades de las NSCs *in vivo*. A diferencia de las líneas celulares, no se trata de clones inmortalizados, sino de un sistema heterogéneo que consta de

varios tipos celulares que se regulan mutuamente. La variabilidad derivada de este hecho, puede ser minimizada mediante la utilización de múltiples cultivos derivados de distintos animales. Además, en estas células encontramos expresión de muchos factores de transcripción y receptores que en el caso de las líneas celulares se pierden debido a los profundos cambios morfológicos que se dan en el proceso de inmortalización. Como hemos visto, durante el desarrollo la capacidad de las células madre para responder a distintos estímulos varía según su estado, por lo que todavía es más importante la elección de un modelo de estudio lo más similar posible a las condiciones exactas que se dan *in vivo*.

El otro gen estudiado, Ikaros, es también un factor de transcripción de dedos de zinc, que ha sido ampliamente estudiado en la formación del sistema hematopoyético, ya que es esencial para la maduración linfocitaria. Este hecho ha facilitado la aparición de varios ratones mutantes para Ikaros, entre ellos uno en que se ha eliminado por completo la expresión del gen, del que disponemos para realizar nuestros análisis. Hemos demostrado la implicación de Ikaros en la diferenciación de neuronas estriatales encefalinérgicas. Además del animal deficiente, hemos usado cultivos primarios y de neuroesferas para el estudio de la función de Ikaros. La existencia de múltiples formas de este gen generadas mediante splicing alternativo de su mRNA, es lo que hace más complicado comprender las funciones de esta proteína (Molnar and Georgopoulos, 1994). Además de existir distintas isoformas, muchas funcionan como inhibidores de la acción de las otras. La formación de dímeros es imprescindible para su correcto funcionamiento, pero, para añadir complejidad a su modo de acción, los dímeros no sólo pueden formarse entre distintas isoformas de Ikaros, sino que éstas pueden unirse también a otras proteínas de su familia, especialmente Helios (Tabayashi et al., 2007; Winandy et al., 1995).

## **1. Nolz1 e Ikaros se expresan en momentos diferentes del desarrollo estriatal.**

Los dos genes cuyo papel hemos estudiado en el desarrollo estriatal, han resultado pertenecer a momentos distintos en la especificación neural. Mientras que Nolz1 se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo de ratón (antes de E12), la expresión de Ikaros no comienza hasta dos días y medio más tarde. Además, también difieren en la zona de la LGE en que se encuentran sus niveles más altos. Nolz1 se encuentra enriquecido en las células que forman la SVZ, y se extiende por el manto estriatal, mientras que Ikaros está restringido al manto, aunque su expresión es máxima en las zonas más cercanas a la SVZ.

Su expresión en NSCs también deja claro que Nolz1 e Ikaros pertenecen a momentos distintos de la diferenciación neural. Mientras que los niveles de Nolz1 son máximos cuando las NSCs se encuentran indiferenciadas, Ikaros no se expresa hasta que empieza la diferenciación.

Experimentos no mostrados en esta tesis, indican que no existe una relación directa entre Nolz1 e Ikaros. La sobreexpresión de Nolz1 en NSCs no afecta los niveles de Ikaros. Asimismo, en el ratón deficiente para Ikaros, la expresión de Nolz1 es completamente normal. Esto quiere decir que ambas proteínas juegan papeles independientes en la formación del núcleo estriado y con toda probabilidad no sólo se encargan de controlar diferentes momentos de la neurogénesis sino que se encuentran en linajes celulares independientes.

## **2. Nolz1 se expresa en progenitores basales indiferenciados de la SVZ y regula la proliferación y auto-renovación de las NSCs.**

Nolz1 pertenece a la familia de proteínas de dedos de zinc llamada NET (de Noc/Nlz, Elbow, Tlp), que está implicada en todas las especies estudiadas en mecanismos de diferenciación y especificación de zonas durante el desarrollo embrionario.

En *Drosophila*, el complejo Elbow-no ocelli, ha sido implicado en el desarrollo traqueal (Dorfman et al., 2002) y del sistema nervioso (Cheah et al., 1994). En Zebrafish se han identificado dos genes homólogos a este complejo: *nlz1* (también llamado *znf703*) y *nlz2* (también llamado *znf503*). Ambos desarrollan un papel importante en la especificación de los rombómeros en el sistema nervioso de este animal (Hoyle et al., 2004; Runko and Sagerstrom, 2003; Runko and Sagerstrom, 2004). *Nlz2*, además, se expresa en zonas del cerebro en que no lo hace *nlz1*, como el telencéfalo (Runko and Sagerstrom, 2004), donde desempeña funciones que no han sido descritas todavía, pero que se suponen muy similares a las que desempeña en la especificación del rombencéfalo. El homólogo a *nlz2* en rata corresponde al gen *Znf503*, llamado *Nolz1* por el grupo que lo identificó (Chang et al., 2004). En ese trabajo se describe que dentro del sistema nervioso *Nolz1* se expresa de forma evidente en la médula espinal y el hipotálamo, y sus niveles son máximos en el estriado. La corteza y el hipocampo, en cambio, no tienen niveles significativos de expresión de *Nolz1*. El primer trabajo que describe la expresión de este gen en ratones, *Zfp503*, confirmó, al igual que los presentes resultados, que su expresión está altamente regulada durante el desarrollo y es especialmente elevada en la SVZ de la LGE a todas las edades embrionarias estudiadas (McGlenn et al., 2008). En humanos, al igual que en roedores, se han identificado dos genes homólogos a *nlz1* y *nlz2*. El homólogo a *nlz2* y, por tanto a *Nolz1*, es *ZNF503*, y la secuencia de aminoácidos de la proteína para la que codifica tiene un 95% de coincidencia con el *Nolz1* de ratón, por lo que sus funciones deben estar altamente conservadas. Esto se pone en evidencia en nuestros experimentos de sobre-expresión, ya que la transfección de h*Nolz1* es capaz de regular los niveles endógenos de m*Nolz1*, indicando que la proteína humana es funcional al ser transfectada en células de ratón.

La SVZ, el lugar de máxima expresión de *Nolz1*, es donde residen los llamados progenitores basales, para los que no disponemos de marcadores específicos. Los progenitores basales, derivan de las células neuroepiteliales de la VZ o, en etapas algo posteriores, de la glía radial, cuyos núcleos están localizados también en la VZ (revisado en (Huttner and Kosodo, 2005)). La razón de que conozcamos poco sobre la regulación y características de los progenitores basales es que el sistema de neurogénesis telencefálica más estudiado en la literatura ha sido y es la corteza cerebral. En la corteza, la principal fuente de neuronas son las células neuroepiteliales y la glía radial, mientras que se cree que los progenitores basales no son más que precursores neurales intermedios. Estos, estarían restringidos en sus capacidades de proliferación y autorenovación, y su función sería la amplificación de los precursores neuronales por división simétrica antes de su salida del ciclo celular, tras la que se diferencian y migran por las vías de la glía radial hasta su posición final en una de las capas de la corteza cerebral (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Pero mientras que la SVZ de las partes dorsales es relativamente pequeña, en el telencéfalo ventral es una estructura prominente, que llega a conformar gran parte de las eminencias ganglionares, tanto de la LGE como de la MGE y la CGE. Así pues, se cree que muchas de las neuronas y gran parte de las células gliales originadas en las partes ventrales del telencéfalo, tienen su origen en esta zona proliferativa secundaria (Gotz and Huttner, 2005; Haubensak et al., 2004). La expresión de *Nolz1* se da de forma muy intensa en esta región, y además es específica de la LGE. Este hecho hace pensar puede tener una función especialmente importante en la especificación de estos progenitores a un fenotipo estriatal.

La persistencia de la expresión de *Nolz1* en el manto estriatal, tanto durante el desarrollo como en edades adultas, puede significar que es necesario para el correcto funcionamiento de alguno de los tipos neuronales propios del estriado. Algo parecido ocurre con otros factores de transcripción, que en edades embrionarias marcan células proliferantes pero su expresión se mantiene en las neuronas adultas postmitóticas durante toda la vida del individuo. Es el caso, por ejemplo, de *Meis2*. Este gen ha sido extensamente utilizado como marcador estriatal, y se expresa en este núcleo desde su aparición hasta la edad adulta (Marklund et al., 2004; Poitras et al., 2007;

Toresson et al., 2000a). A diferencia de *Nolz1*, *Meis2* está presente también en la zona ventricular de la LGE. El caso de *Islet1*, en cambio, es algo más complejo. Este factor de transcripción del tipo LIM-homeodominio, se expresa selectivamente en la SVZ de la LGE, como *Nolz1*, a edades embrionarias, y también se observa difusión hacia el manto estriatal (Stenman et al., 2003). En etapas postnatales, la expresión de *Islet1* está distribuida por todo el estriado maduro marcando un pequeño porcentaje de las neuronas. Esto se debe a que *Islet1* apaga su expresión en las neuronas estriatales de proyección cuando éstas se vuelven postmitóticas, pero en cambio las interneuronas colinérgicas del estriado la mantienen hasta la edad adulta (Elshatory and Gan, 2008; Wang and Liu, 2001). Así pues, sería muy aventurado asegurar que las células que vemos expresar *Nolz1* en la SVZ durante el desarrollo corresponden a las que más tarde mantienen una leve expresión de dicho gen en el núcleo estriado adulto.

En cultivos primarios, *Nolz1* colocaliza con el marcador de neuronas jóvenes *Tuj1*, mientras que en ningún caso observamos colocalización con el marcador astrogial GFAP. La falta de marcadores para precursores oligodendrogiales, y las bajísimas proporciones de oligodendrocitos que contienen los cultivos primarios nos han impedido evaluar si la expresión de *Nolz1* se da también en este tipo glial, ya que no hemos encontrado ninguna célula oligodendrogial que fuera también *Nolz1* positiva. En cualquier caso, parece claro que la máxima expresión de *Nolz1* se da en precursores neurales inmaduros, principalmente neuronales. Estas observaciones se ven reforzadas por los experimentos de sobreexpresión de *Nolz1* en cultivos primarios. Las dobles inmunocitoquímicas para GFP (que marca las células transfectadas), y los diferentes marcadores neurales revelaron también que la gran mayoría de las células que sobreexpresan *hNolz1* son neuronas, ya sea *Tuj1* o *Map2* positivas. La ausencia de células GFP positivas que colocalizaran con GFAP o el marcador oligodendrogial O4 indica que la expresión de *Nolz1* no promueve la diferenciación de los precursores neurales a fenotipos gliales. Por otra parte, la baja colocalización con *nestina* puede ser indicativo de que *Nolz1*, pese a expresarse de forma abundante en los precursores neurales de la SVZ, no evita su diferenciación.

En esta misma línea, los precursores neurales extraídos de la LGE de E14.5, cultivados en forma de neuroesferas, expresan altos niveles de Nolz1, que bajan en cuanto empieza la diferenciación de los mismos. La sobreexpresión de Nolz1 en neuroesferas proliferantes produce una disminución de su capacidad proliferativa y autorenovadora, mientras que su disminución mediante siRNA, las aumenta. Estos resultados pueden parecer contradictorios con el hecho de que la máxima expresión de Nolz1 se da en neuroesferas indiferenciadas. Pero queda claro que no lo son, si entendemos que Nolz1 se está expresando en precursores indiferenciados (de la SVZ) pero que no poseen una capacidad de proliferación y autorenovación tan elevada como los precursores de la VZ. Así, dado que las neuroesferas están formadas por una mezcla de progenitores con distintas características, Nolz1 puede estar promoviendo el paso de células con alta capacidad proliferativa y autorenovadora a otras más parecidas a las de la SVZ. Las células en la SVZ proliferan menos que las de la VZ (menor incorporación de BrdU *in vivo*, figura 1C) y, como demuestran diversos trabajos realizados en la corteza cerebral, tienen también un menor potencial de auto-renovación (revisado en (Gotz and Huttner, 2005)). El mecanismo mediante el que Nolz1 afecta a estos procesos podría ser la alteración de la vía Notch. Hemos demostrado que la ausencia de Nolz1 modifica varios de los genes de esta vía, lo que puede producir una desregulación de las proporciones de receptores y ligandos de Notch. Pequeñas desigualdades en la expresión de estas proteínas pueden llevar a la diferenciación de células distintas a partir del mismo precursor (Campos-Ortega, 1993; Kunisch et al., 1994). La forma exacta en que esta desregulación afecta a los progenitores es muy difícil de elucidar, ya que podemos observar efectos tanto de forma directa en las células transfectadas, como de forma indirecta en las no transfectadas debido a la variación de los receptores de Notch, por lo que son necesarios experimentos adicionales para aclarar la acción de Nolz1 sobre la vía de Notch. Por otra parte, el hecho de que la sobreexpresión no provoque cambios significativos mientras que el siRNA sí lo haga, puede deberse a que la expresión de Nolz1 es ya elevada en las NSCs, por lo que supone un cambio mucho más importante su disminución que su incremento. Además, en el caso de la sobre-expresión, sustituimos el Nolz1 endógeno por el humano, por lo que no podemos saber cuánto mayores son

los niveles finales de la proteína a los que se encuentran normalmente en las células, aunque por WB éstos parecen aumentar en las células transfectadas (figura 2B de materiales y métodos).

### **3. Nolz1 es necesario para la correcta especificación de precursores oligodendrogiales en la LGE.**

Hemos visto que Nolz1 promueve la expresión de varios genes oligodendrogiales en las neuroesferas provenientes la LGE de E14.5 (figura 5C), e incrementa el porcentaje de oligodendrocitos que aparecen durante la diferenciación de las mismas (figura 5F). Este hecho resulta sorprendente teniendo en cuenta que Nolz1 no parece expresarse en oligodendrocitos, sino en precursores neuronales tuj1 positivos (figura 2C) e incluso en neuronas que expresan Islet1 o DARPP-32 (Chang et al., 2004).

Los dos genes cuya expresión se encuentra más afectada por Nolz1 son Olig1 y Olig2. Ambos se expresan en precursores oligodendrogiales, pero mientras que Olig2 puede encontrarse también en precursores más indiferenciados con capacidad de formar los tres tipos neurales, Olig1 parece más restringido a los primeros pasos de la especificación oligodendrogial, aunque su expresión también disminuye con la diferenciación (Abematsu et al., 2006; Gong et al., 2008; Zhou and Anderson, 2002). La expresión de los otros marcadores de precursores oligodendrogiales no es tan elevada en las NSCs proliferantes, pero igualmente podemos observar cambios en ellos. Sox10 se ha implicado en diferentes aspectos de la generación de oligodendrocitos, desde la supervivencia a la inducción de otros genes propios de este tipo glial, como PDGFR $\alpha$  (Finzsch et al., 2008). PDGFR $\alpha$ , a su vez, se ha utilizado en numerosos trabajos para marcar la aparición de precursores oligodendrogiales muy tempranos, especialmente en la médula espinal y en la MGE (Tekki-Kessarlis et al., 2001). Trabajos realizados con animales que marcan las células que han expresado plp/dm20 sugieren que hay al menos dos poblaciones diferenciadas de precursores oligodendrogiales, los que expresan plp/dm20 y los que expresan PDGFR $\alpha$  (revisado en (Spassky et al., 2000)). Pese a esta expresión diferencial durante su formación, más adelante en su diferenciación, los oligodendrocitos acaban expresando los dos marcadores, lo que hace complicado establecer una separación entre ellos.

Resulta sorprendente que el incremento de Nolz1, que se expresa en precursores supuestamente neuronales induzca genes del linaje oligodendrogial. Una posible explicación es que los precursores Nolz1 puedan

formar tanto oligodendrocitos, que apagarán la expresión del gen, como neuronas de proyección, que lo mantendrán hasta la vida adulta. Alternativamente, las células que expresan *Nolz1* pueden afectar de alguna manera al resto de precursores, promoviendo su fenotipo oligodendroglial. Dado que, como hemos visto, la modificación de los niveles de *Nolz1* afecta a la vía de Notch, puede que esta alteración sea la causante del efecto sobre los oligodendrocitos. Al tratarse de experimentos de RT-PCR, no es posible saber si los efectos que vemos en los genes de la vía de Notch se dan en una misma célula o en varias. Además, las relaciones e interacciones entre los diferentes tipos de precursores que conviven en la zona proliferativa de la LGE no están bien definidas, por lo que disponemos de pocos datos para comprender lo que ocurre. Un trabajo reciente apunta que tanto las células neuropiteliales como la glía radial tienen activada la vía de Notch, que actuaría manteniendo su estado de célula madre (Basak and Taylor, 2007). Sin embargo, describen que los precursores marcados por *Tbr2* o *Islet1/2* (marcadores de los progenitores basales de la corteza y de la médula espinal, respectivamente), no tienen actividad Notch. Las primeras alteraciones que nosotros observamos en la vía de Notch en respuesta a la variación de *Nolz1* son en los genes *Delta1*, *Notch3* y *Deltex1*. La expresión de *Delta1*, puede concordar con la idea de que las células positivas para *Nolz1* sean neuronas inmaduras, ya que los precursores que abandonan la VZ durante la neurogénesis, lo hacen gracias a la sobreexpresión de este gen. *Notch3*, en cambio, se expresa fundamentalmente en las células de la VZ y recientemente se ha implicado en la generación de células de la glía radial (Mizutani et al., 2007). Sobre *Deltex1*, sabemos poco todavía, y la mayoría de trabajos que describen sus funciones se han realizado en el sistema hematopoyético. Se trata de una proteína intracelular, con capacidad de intervenir en la transcripción génica y que constituye un ligando alternativo para Notch-ICD, frente al clásico CSL/RBPJ (Kishi et al., 2001; Matsuno et al., 1995; Romain et al., 2001; Xu and Artavanis-Tsakonas, 1990). En precursores neurales, *Deltex1* se une a p300, un coactivador de *Mash1*, y de esta forma inhibe la síntesis de los genes dirigidos por *Mash* y, por tanto, bloquea la neurogénesis (Yamamoto et al., 2001). De esta manera, mantiene una reserva de precursores para su posterior diferenciación a células gliales. Curiosamente, en otro trabajo, el cambio de los efectores de Notch-ICD de

CSL/RBPJ- $\kappa$  a Deltex1 se asocia con la generación y diferenciación de oligodendrocitos (Hu et al., 2003). Así pues, los cambios en la vía de Notch generados por Nolz1 concuerdan, por un lado, con la formación de neuronas a través del incremento de Delta1 y por el otro con el mantenimiento y diferenciación de precursores oligodendrogiales con la inducción de Notch3 y Deltex1, aunque son necesarios más experimentos para poder extraer conclusiones de estos resultados. Otra forma en que la expresión de Nolz1 podría estar influenciando la diferenciación de oligodendrocitos sin expresarse en sus precursores, sería la secreción de factores que los afecten específicamente, aunque esta posibilidad no se ha estudiado en la presente tesis.

Cuando diferenciamos las NSCs, además de aumentar la proporción de oligodendrocitos, Nolz1 parece estar impidiendo la aparición de astrocitos. El seguimiento de la expresión de Nolz1 durante la diferenciación hacia neuronas, oligodendrocitos y astrocitos indica que Nolz1 no se mantiene en ninguno de los tipos neurales. Quizás el hecho más destacable sea que mientras que en la diferenciación con PDGFR $\alpha$  o FBS los niveles siguen bajando entre 3 y 6 DIV, en el caso de la condición de FGF, la expresión se mantiene. Esto sugiere de nuevo la expresión de Nolz1 se da en precursores neuronales, ya que el efecto del FGF es el mantenimiento de los precursores neuronales indiferenciados, lo que provoca un aumento de la diferenciación neuronal a costa de una reducción del número de astrocitos (Ito et al., 2003). Así pues, la influencia de Nolz1 sobre los marcadores oligodendrogiales se da probablemente de forma no autónoma.

Poco se sabe sobre los oligodendrocitos que se originan en la LGE, pero un estudio reciente describe que se generan hacia E16 (Kessar et al., 2006). Es difícil utilizar la expresión de marcadores como PDGFR $\alpha$  o Sox10 para monitorizarlos, ya que los oligodendrocitos derivados de la MGE expresan los mismos marcadores y a la edad en que empieza la especificación en la LGE, ya ha comenzado la migración de los derivados de la MGE (Pringle and Richardson, 1993; Tekki-Kessar et al., 2001). Así pues, los originados en la LGE, constituyen la segunda oleada de oligodendrocitos del telencéfalo, que poblarán la mayoría de las zonas ventrales y se distribuirán también por las

zonas dorsales (Kessar et al., 2006). Pese a esto, el momento exacto de su especificación y los factores que intervienen en ella no están del todo claros.

El gen *plp/dm20*, codifica para dos proteínas distintas, *plp* y *dm20*. Normalmente se utiliza *plp*, como marcador de precursores oligodendrogiales, pero la forma *dm20* se expresa desde bastante antes en el desarrollo (Le et al., 2005; Spassky et al., 2000). De hecho, la expresión de *plp/dm20* no está restringida al linaje oligodendrogial, sino que se encuentra en precursores neurales capaces de dar lugar a todos los tipos neurales, incluida la glía radial, pero únicamente los oligodendrocitos mantienen su expresión tras diferenciarse (Delaunay et al., 2008).

Nuestras observaciones en los explantes de los animales *plp/dm20*-GFP, indican que a E14.5 todavía no hay expresión del gen en la LGE. Ésta comienza más o menos a E15.5, cuando empezamos a observar fluorescencia para GFP en el primordio estriatal. La transfección de siRNA de *Nolz1* en la VZ-SVZ de la LGE en explantes a E14.5 demostró que dos días después la falta de *Nolz1* impide la correcta expresión del gen, sin afectar a la expresión del marcador neuronal *Islet1*. Así, la acción de *Nolz1* sobre precursores oligodendrogiales *in vivo*, coincide con lo observado en las NSCs, en que la transfección de siRNA de *Nolz1* disminuye la expresión de *plp/dm20* pero no afecta a la expresión de  $\beta$ -III-tubulina ni de *Islet1* (resultado no mostrado). Además, la observación de que la expresión ectópica de *Nolz1* no produce un incremento de *plp/dm20* en el septum ni en la corteza, nos indica que la acción de *Nolz1* depende del contexto celular en que se encuentra.

Mientras que en la médula espinal y en el caso de la primera oleada telencéfala (proviniente de la MGE), hay una clara relación entre la señalización de *Shh* y la especificación oligodendrogial, esto no está tan claro ni para los oligodendrocitos provenientes de la LGE ni para los que se especifican las partes dorsales del sistema nervioso (Cai et al., 2005; Fogarty et al., 2005). Se ha visto la necesidad de gran cantidad de genes para la aparición de estos oligodendrocitos, que en la mayoría de casos son necesarios también para la neurogénesis, como *Olig2*, *Mash1*, *Dlx1/2*, y *Gsh2* (Kessar et al., 2006; Lu et al., 2002; Parras et al., 2007; Petryniak et al., 2007; Zhou and Anderson, 2002). Recientemente se ha demostrado que los oligodendrocitos que se originan en la LGE provienen de los precursores que

han expresado Gsh2 en la zona ventricular de la eminencia (Kessarís et al., 2006). Gsh2 es necesario también para la formación de la primera oleada de neurogénesis estriatal, lo que indica que la formación de los distintos tipos neurales durante el desarrollo del sistema nervioso es un proceso mucho más integrado y dependiente de la interacción entre los diferentes precursores de lo que se pensaba.

#### 4. Nolz1 contribuye a la aparición de síntesis de RA en la propia LGE.

La presencia de un RARE en el promotor de Nolz1, sugiere que su expresión está regulada por RA. La concentración del mRNA de Nolz1 incrementa de forma dosis dependiente en respuesta a RA en la línea celular estriatal PC12 (Chang et al., 2004). Para confirmar esta regulación en el momento embrionario en que se expresa Nolz1, realizamos tratamientos de cultivos primarios y de neuroesferas de la LGE de E14.5 con distintas concentraciones de RA. Sorprendentemente, los tratamientos no consiguieron incrementar significativamente la expresión de Nolz1 en ninguna de las condiciones, mientras que sí observamos un claro aumento de la síntesis de RAR $\beta$ , otro gen que contiene un RARE en su promotor. La ausencia de respuesta de Nolz1 a la adición de RA en los cultivos podría deberse a cambios producidos por el mantenimiento *in vitro* de las células, por lo que decidimos analizar lo que ocurre *in vivo*. Para ello, por una parte, analizamos la expresión de Nolz1 en ratones deficientes para Raldh3, la principal fuente de RA en la LGE desde E12.5. Por otro lado, restringimos la vitamina A, el precursor del RA, de la dieta de madres gestantes y observamos si se producía alguna alteración de la expresión de Nolz1 en los embriones a E14.5. Al igual que ocurre con Meis2 (Molotkova et al., 2007), otro gen estriatal en el que se ha localizado un RARE en su promotor, no observamos ningún cambio en la expresión de Nolz1 en el animal deficiente de Raldh3. Tampoco la falta de vitamina A en las madres gestantes produce ningún efecto sobre Nolz1 en los embriones. Así pues, la expresión de Nolz1 no está regulada por el RA en la edad embrionaria a la que aparece en la LGE.

Pese a esto, no debemos descartar que el RA pueda inducir la síntesis de Nolz1 en otras etapas del desarrollo. Nuestros propios experimentos demuestran que en cuerpos embrioides derivados de células madre embrionarias, Nolz1 responde de forma concentración-dependiente a la adición de RA al medio. Las células que forman parte de estos agregados celulares corresponden a etapas mucho anteriores del desarrollo, en las que Nolz1 puede tener funciones totalmente independientes de su papel en la LGE. De hecho, en Zebrafish se ha detectado la expresión del homólogo a Nolz1, nlz2,

en todos los blastómeros en el estadio de blastocisto y en las células más posteriores en el estadio de gástrula tardía (Runko and Sagerstrom, 2003).

Raldh3, como los otros miembros de su familia Raldh1 y Raldh2 (Aldh1a3, Aldh1a1 y Aldh1a2, respectivamente) es una aldehído deshidrogenasa que se encarga del paso final en la conversión de retinoles a RA, la oxidación del retinaldehído (Mic et al., 2002; Niederreither et al., 1999; Reijntjes et al., 2005). El RA es uno de los principales candidatos a establecer el carácter intermedio telencefálico, que corresponde al fenotipo de la LGE. En ratones, las dos principales fuentes de RA durante el desarrollo del telencéfalo son, Raldh2 en las vesículas óticas y Raldh3 en el ectodermo frontonasal, empezando la expresión de ambas hacia E8.5 (Li et al., 2000; Mic et al., 2002). Sin embargo, ninguna de estas fuentes parece poder llegar hasta el telencéfalo intermedio, por lo que las posibles fuentes de RA que llegan al telencéfalo en edades tempranas no están claras todavía. Mucho más tarde, a partir de E12.5, empieza la síntesis en la propia LGE gracias a la aparición de Raldh3 en la SVZ (Li et al., 2000), con un dominio de expresión altamente coincidente con el de Nolz1 (Chang et al., 2004). Este hecho nos animó a explorar el posible efecto de Nolz1 sobre la vía de señalización de RA en las NSCs. La sobreexpresión de Nolz1 en neuroesferas provoca un rápido incremento de la síntesis de la enzima Raldh3, mientras que su disminución, provoca un descenso de la misma. Además, Nolz1 parece incrementar también la expresión de RAR $\beta$ . Esto puede deberse a la acción directa de Nolz1 en la especificación de los precursores, o a un efecto derivado del incremento de Raldh3 y, por tanto, de la concentración de RA en el medio. RAR $\beta$  contiene un elemento de respuesta a RA en su promotor y es capaz de responder a RA en los cultivos de NSCs (figura 7D), por lo que la teoría del efecto indirecto es plausible. De hecho, la adición de DEAB al medio de cultivo tras la transfección de Nolz1 consigue evitar el aumento de RAR $\beta$ , confirmando que se trata de un efecto debido a incremento de RA sintetizado por Raldh3. RAR $\beta$  no parece expresarse en las mismas células en que lo hace Nolz1, ya que se encuentra preferentemente en células más diferenciadas del manto estriatal, pero un incremento de Nolz1 podría dirigir las células que se diferencien hacia la expresión de este receptor (Toresson et al., 1999).

La glía radial ha sido identificada como el tipo celular encargado de la síntesis de RA en la LGE en base a que estas células expresan genes relacionados con la unión de retinoles. La expresión de estas proteínas, como los CRBPs (del inglés calcium and retinol binding proteins) está restringida a la VZ (Corbin et al., 2000; Toresson et al., 1999). En cambio, la expresión de Raldh3 se detecta únicamente en la SVZ (Molotkova et al., 2007; Waclaw et al., 2004). Dado que el último paso en la síntesis de RA es llevado a cabo por Raldh3, parece claro que no es la glía radial la que sintetiza RA en la LGE, sino que son las células de la SVZ las que la llevan a cabo. La naturaleza hidrofóbica de la molécula, hace posible su difusión por las membranas celulares, por lo que la colaboración entre varios tipos neurales, en este caso entre la glía radial de la VZ y los progenitores basales de la SVZ, en la síntesis de RA es muy probable.

La expresión de Raldh3 está gravemente disminuida en los mutantes de Gsh2, un gen fundamental para el desarrollo estriatal que se expresa en la VZ de la LGE desde E9.5 (Corbin et al., 2000; Waclaw et al., 2004). La expresión de Nolz1 también desaparece en el animal deficiente para Gsh2, sugiriendo que pertenecen al mismo linaje celular (figura 8F). La sobreexpresión de Gsh2 en neuroesferas incrementa significativamente la expresión de Raldh3, pero, sorprendentemente, no afecta a Nolz1. Esto nos indica que, a diferencia de lo que ocurre con Raldh3, Gsh2 es necesario pero no suficiente para promover la expresión de Nolz1. Así pues, la expresión de Nolz1 y Raldh3 se da en la misma zona durante el desarrollo estriatal, y ambas dependen de la anterior expresión de Gsh2. El hecho de que Nolz1 empiece a expresarse un poco antes que Raldh3, hacia E11.5 (McGlenn et al., 2008), hace verosímil que pueda contribuir a la aparición de la enzima en la SVZ de la LGE.

Por otra parte, en un trabajo reciente se describe que el RA produce un incremento de proliferación de las células telencefálicas (Rajaii et al., 2008). Esto puede entrar en conflicto con el hecho de que nosotros observamos que el incremento de Nolz1, y, como hipotetizamos, de RA, produce una disminución de la proliferación. El trabajo de Rajaii y colaboradores se basa en la completa eliminación de la señalización de RA en el telencéfalo, por lo que los efectos encontrados se deben con toda probabilidad a la falta de señalización mediante el receptor RAR $\alpha$ . RAR $\alpha$ , a diferencia de RAR $\beta$ , se encuentra distribuido por

todo el telencéfalo y se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo. Así pues, la señalización de RA mediante  $RAR\beta$  puede tener un efecto totalmente distinto al de  $RAR\alpha$ . En consonancia con nuestras observaciones, diversos trabajos publicados sobre el efecto del RA en precursores estriatales y neurales demuestran que este tiene un potente efecto diferenciador, incrementando la expresión de marcadores neurales maduros como DARPP-32 (Martin-Ibanez et al., 2007; Waclaw et al., 2004). Hace poco, se ha demostrado que en el ratón deficiente de  $RAR\beta$ , se da una disminución de proliferación de los progenitores estriosomales. Esta menor proliferación se atribuye a la acción del RA sobre unos pocos precursores en la SVZ que empiezan a expresar el receptor  $RAR\beta$  (Liao et al., 2008). Sin embargo, estos resultados no son conflictivos con los nuestros, ya que el efecto en la proliferación debida a  $RAR\beta$  se da sólo sobre un grupo específico de células (las neuronas estriosomales de generación tardía), y ellos mismos describen que al mismo tiempo el RA ejerce un papel diferenciador sobre el resto de células estriatales.

## **5. Nolz1 puede actuar como integrador de la multitud de señales que llegan a la zona intermedia telencefálica uniéndose al correpresor transcripcional Tle4.**

La estructura proteica de las proteínas de la familia NET es bastante similar en todas las especies estudiadas. Todas ellas contienen un dominio atípico de dedos de zinc, el cual no es suficiente para su unión al DNA, por lo que deben formar un complejo con otras proteínas para controlar la transcripción génica. A través de otro dominio altamente conservado, son capaces de unirse a las proteínas de la familia Groucho/Tle. La interacción se ha demostrado a nivel proteico en *Drosophila* (Dorfman et al., 2002) y en *Zebrafish* (Runko and Sagerstrom, 2003). La secuencia de aminoácidos que permite esta interacción, FKPY, está conservada en la proteína Nolz1 de rata (Chang et al., 2004) y en la de ratón (comprobación por nuestra parte). La familia Groucho/Tle fue pronto clasificada como importantes correpresores transcripcionales, debido, entre otras cosas, a su capacidad de reprimir grandes zonas de cromatina mediante el reclutamiento de HDACS (revisado por (Chen and Courey, 2000; Fisher and Caudy, 1998; Parkhurst, 1998)), y se han relacionado especialmente con la actividad de la vía de Notch (revisado en (Buscariet and Stifani, 2007; Gasperowicz and Otto, 2005)). Además, también el homólogo de Nolz en *Drosophila*, el complejo Elbow/nocA, ha sido recientemente implicado en la vía de Notch (Luque and Milan, 2007). En este trabajo se describe cómo, en ciertas condiciones, El/noc es capaz de reprimir la proliferación en respuesta a la activación de Notch de las células del primordio de la cabeza.

Los diferentes genes Tle, homólogos a Groucho en vertebrados, se expresan activamente durante la formación del sistema nervioso en ratones (Dehni et al., 1995; Koop et al., 1996; Yao et al., 1998). Como hemos visto en los resultados, durante la edad embrionaria en que se forma la LGE, se expresan Tle1, 3 y 4 en el primordio estriatal. Mientras que Tle3 no varía en las diferentes zonas estriatales, Tle1 forma un gradiente con su punto más alto de expresión en la VZ. Tle4, en cambio, tiene su expresión máxima en la SVZ, se sigue expresando en el manto y no se detectan niveles significativos en la VZ. Así pues, Tle4 es el candidato más idóneo para interactuar con Nolz1

durante el desarrollo estriatal. Tal como hemos demostrado, el patrón de expresión de los dos genes es similar tanto *in vivo* como en los cultivos de neuroesferas y además la zona de expresión del mRNA de Nolz1 coincide con la presencia de la proteína Tle4. Dado que la homología entre Tle1, 3 y 4 es muy elevada y todas ellas se expresan en la zona donde lo hace Nolz1, no podemos descartar que Nolz1 forme complejos también con los otros miembros de la familia Groucho/Tle.

Todos estos resultados nos indican que el modo de acción de Nolz1 está directamente relacionado con la capacidad para unirse a Groucho/Tle, lo que lo convierte en un modulador de la represión a gran escala que ejerce esta proteína durante el desarrollo del sistema nervioso. Además, por su localización en la SVZ y su posible unión a Tle4, puede estar interviniendo en la salida de los precursores de la LGE de la proliferación dependiente de Notch propia de la VZ, convirtiéndolas en los precursores algo más restringidos que proliferan de forma independiente a la vía de Notch en la SVZ. Esto coincide con la observación de que Tle4 se expresa en precursores neurales más diferenciados que el resto de Tles, y a diferencia de estos, no colocaliza con Hes1 o Notch1 (Koop et al., 1996).

Las diferentes formas de inhibición llevadas a cabo por los represores Groucho/Tle están modificadas tanto por su unión a diferentes correpresores como por la acción directa de otras vías sobre el estado de la proteína (revisado en (Hasson and Paroush, 2007)). Por ejemplo, se ha descrito que durante la formación de las venas del ala en *Drosophila*, la señalización mediante EGF es capaz de fosforilar a Groucho. La fosforilación hace que la inhibición ejercida por Groucho sea más débil, permitiendo la expresión de genes que normalmente están inhibidos por Hes en respuesta a la vía de Notch (Hasson et al., 2005). Groucho interviene también en la vía de Wnt, ya que su reclutamiento por parte del factor de transcripción TCF (del inglés T-Cell Factor) reprime genes que son desreprimidos por la señalización de Wnt (Cavallo et al., 1998).

Por otra parte, la presencia de la forma clivada de Gli3 en los primordios de las extremidades es necesaria y suficiente para inducir la expresión de Nolz1 (McGlinn et al., 2005; McGlinn et al., 2008). Así, en la regulación de la expresión de Nolz1 entra en juego también el sistema de Shh-Gli3, que, como

hemos visto, es uno de los más importantes en la especificación dorsoventral del telencéfalo. También las BMPs están implicadas en el control de su expresión, ya que en Zebrafish, *noggin* es capaz de inhibir la expresión de *Nolz1*, aunque la adición de BMPs no es suficiente para inducirla (McGlenn et al., 2008). Esto concuerda con una posible necesidad de los BMPs no por sí mismos, sino como reguladores de la expresión de *Gli3*.

Así pues, la regulación de *Nolz1* podría depender de la acción de muchos de los morfógenos que están implicados en la compartimentalización del sistema nervioso, lo cual concuerda con su posición en el telencéfalo intermedio, a donde llegan gran parte de dichas señales. El hecho de que se una a los correpresores *Groucho/Tle*, refuerza la idea de su modulación de la vía de Notch, y le permite actuar sobre un gran número de genes al mismo tiempo. Parte de la acción del complejo *Nolz1-Groucho/Tle* se basa en la represión transcripcional a gran escala mediante la unión a HDACs. Tanto *Groucho/Tle* como *nlz1* y *nlz2* en Zebrafish, tienen capacidad para unirse a estas proteínas (Chen et al., 1999; Runko and Sagerstrom, 2004). No obstante, recientemente se ha demostrado que *Groucho/Tle* puede reprimir la transcripción génica también de forma independiente a las HDACs (Sekiya and Zaret, 2007). Todo esto concuerda con un papel para *Nolz1* en la coordinación de las diferentes modificaciones epigenéticas que se dan en las primeras etapas de la conversión de una célula proliferante, a una totalmente diferenciada.

Aunque *Nolz1* se uniera a *Groucho/Tle* para ejercer sus efectos, ninguna de estas dos proteínas tiene habilidad para unirse a DNA, por lo que deben unirse al menos a otro factor de transcripción que sí tenga esa capacidad. El rango de proteínas a las que son capaces de unirse los correpresores *Groucho/Tle* no se limita a la familia *Hes*, e incluye a otros muchos genes implicados en el desarrollo neural como, *BF1 (Foxg1)* (Hanashima et al., 2004; Marcal et al., 2005; Tao and Lai, 1992; Yao et al., 2001), *Six3* (Kobayashi et al., 2001; Lopez-Rios et al., 2003; Zhu et al., 2002), *Otx2* y *Gbx2* (Heimbucher et al., 2007), *Ind* (el homólogo de *Gsh2* en *Drosophila*) (Von et al., 2007), algunos de la familia *Nkx2* (Choi et al., 1999; Muhr et al., 2001) y algunos de la familia *Pax* (Eberhard et al., 2000; Gasperowicz and Otto, 2005).

La mayor parte de estos genes no se expresan en la LGE. Entre los que sí lo hacen encontramos BF1 y Gsh2, cuya expresión es máxima en la VZ y casi inexistente en el manto, y Six3, que se expresa de forma abundante tanto en la VZ como en la SVZ a E14.5 (Oliver et al., 1995). Six3, sin embargo, parece promover el mantenimiento de los precursores neurales (Appolloni et al., 2008), y su expresión está enriquecida en la dLGE, donde Nolz1 no está presente (Yun et al., 2001). Así, o bien la unión entre Six3 y Nolz1 confiere unas propiedades distintas al complejo que le permite la diferenciación entre LGE y dLGE o, probablemente, Nolz1 se une en la LGE a otros factores de transcripción todavía desconocidos.

## **6. Ikaros<sup>1</sup> se expresa de forma específica y regulada durante el desarrollo en la zona del manto estriatal.**

Ikaros fue descrito inicialmente como un factor implicado en la hematopoyesis (Georgopoulos, 2002; Yoshida et al., 2006), aunque también se ha descrito su expresión en el sistema nervioso (Agoston et al., 2007; Georgopoulos et al., 1992; Molnar and Georgopoulos, 1994; Willett et al., 2001). Diversos estudios en ratones con mutaciones en este gen indican que sus efectos son especialmente importantes en la especificación de los diferentes linajes linfocitarios (Allman et al., 2003; Georgopoulos et al., 1994).

Ikaros es miembro del grupo de factores de transcripción llamada Kruppel, que se caracteriza por la presencia de varios motivos de dedos de zinc en sus extremos N- y C-terminal. El dominio N-terminal es importante para la unión a DNA, mientras que el extremo C-terminal es crucial para la dimerización y estabilización de la proteína. Existen 8 isoformas distintas de Ikaros, generadas a partir del mismo gen (ZNFN1A1), mediante splicing alternativo. Todas las isoformas conservan el extremo C-terminal, pero difieren en el número de motivos de dedos de zinc implicados en la unión con el DNA. Sólo las isoformas que conservan al menos 3 de estos motivos (Ik1, Ik2 e Ik3) tienen capacidad para unirse al DNA, y, por tanto, de controlar la expresión génica. El resto de isoformas no son capaces de unirse a DNA, pero pueden dimerizar con las formas largas, comportándose como dominantes negativos (Sun et al., 1996). Además de activar la transcripción génica de ciertos genes uniéndose directamente a sus promotores, Ikaros también es capaz de reclutar HDACs y CtBP (C-terminal Binding Protein), lo que lo convierte en un represor de amplio espectro, capaz de cambiar el estado de activación de la cromatina de una célula (Dumortier et al., 2006).

Nuestros resultados indican que durante el desarrollo estriatal se expresan distintas isoformas de Ikaros, pero sólo Ikaros<sup>1</sup> (Ik1) varía su expresión a lo largo del mismo. Su expresión es elevada durante las etapas embrionarias tardías en el estriado y disminuye en edades postnatales. Ik1 es una de las variantes largas, por lo que posee la capacidad de unirse a DNA, y es capaz de controlar la expresión génica. La expresión del resto de isoformas de Ikaros no varía con la edad, y, además, no se detecta su expresión a P15 ni

por hibridación *in situ* ni por inmunohistoquímica. Esto nos hace pensar que quizás las células que expresan estas isoformas no son neurales, sino que puede tratarse de vasos sanguíneos, tal y como se ha sugerido anteriormente (Agoston et al., 2007).

La familia génica a la que pertenece Ikaros, contiene otros 5 miembros: Helios, Aiolos, Eos, Pegasus y Dedalos (Nichogiannopoulou et al., 1998; Perdomo et al., 2000; Rebollo and Schmitt, 2003), siendo los dos primeros los más cercanos a Ikaros. Dado que se han demostrado efectos cruzados entre genes de esta familia, especialmente debidos a la formación de heterodímeros (Tabayashi et al., 2007), decidimos estudiar también la expresión de Helios y Aiolos, durante el desarrollo estriatal. Mientras que no observamos expresión de Aiolos a ninguna edad estudiada, Helios sí se expresa en el primordio estriatal a la misma edad en que lo hace Ikaros, por lo que también puede tener un papel importante durante el desarrollo estriatal.

## **7. Ikaros1 promueve la salida del ciclo celular de los precursores neurales a través del incremento de p21.**

La expresión de Ikaros en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario se encuentra en la zona del manto estriatal, con su expresión más alta limitando con la SVZ, donde residen precursores en proliferación ((Agoston et al., 2007; Tucker et al., 2008), Figura 14A). Las células Ikaros positivas en cultivos primarios estriatales colocalizan mayoritariamente con el marcador neuronal inmaduro Tuj1, que marca las neuronas que han llevado a cabo su último ciclo mitótico (Lee et al., 1990). Además, la expresión de Ikaros en NSCs proliferantes es prácticamente nula, e incrementa a medida que las células se diferencian. Todas estas evidencias sugieren que Ikaros puede tener un papel en el paso de células proliferantes indiferenciadas a precursores neuronales postmitóticos. En consonancia con estas observaciones, la sobre-expresión de Ikaros en NSCs es capaz de reducir la proliferación de las mismas (figura 11B), y aquellas células que sobre-expresan Ikaros tanto en la diferenciación de NSCs como en cultivos primarios estriatales, dejan de expresar nestina y pasan a ser positivas para Tuj1.

Estas observaciones no coinciden con la descripción de que Ikaros se expresa en células positivas para BrdU en la LGE (Agoston et al., 2007). Esta discrepancia se debe al protocolo utilizado, ya que en ese trabajo se analizaron los cerebros 18 horas después de la inyección de BrdU. Debido a que los progenitores en la LGE tienen una vida media de unas 10 horas (Bhide, 1996), a las 18 horas muchas células que incorporaron BrdU serán ya postmitóticas. De hecho, cuando realizamos un pulso corto de BrdU para detectar las células proliferantes, no encontramos colocalización con Ikaros, y la zona de células proliferantes se encuentra separada de la zona de expresión de Ikaros (Figura 1C). El marcaje coincidente de Ikaros y BrdU en un pulso largo, de hecho, apunta de nuevo a la idea de que este gen favorece la salida de ciclo celular y la diferenciación de los precursores neurales.

Pese a que numerosos trabajos relacionan Ikaros con el control de la proliferación en respuesta a la activación de la vía de Notch en el sistema hematopoyético (Bellavia et al., 2007; Beverly and Capobianco, 2003), nosotros no observamos ninguna afectación en los diferentes genes de la vía en

respuesta a la sobre-expresión de Ikaros (figura 11D). Además, las células que mantienen la vía de Notch activada en la LGE corresponden a precursores proliferantes, especialmente de la VZ (Tokunaga et al., 2004), mientras que Ikaros está restringido a la zona del manto, por lo que no parece que exista una relación directa entre Ikaros y Notch en la diferenciación neural en la LGE.

Diversos estudios sobre la función de Ikaros en células hematopoyéticas describen que este factor de transcripción actúa promoviendo la salida del ciclo celular mediante la modulación de la expresión de varios genes involucrados en el mismo (Gomez-del-Arco et al., 2004; Kathrein et al., 2005). En células madre hematopoyéticas, Ikaros incrementa la expresión del inhibidor de ciclinas p27, que se encarga de detener el ciclo celular en G1 (Kathrein et al., 2005). Los inhibidores de ciclinas, como p21 y p27, son imprescindibles para el control de la proliferación en precursores neurales (Doetsch et al., 2002; Kippin et al., 2005; van Lookeren and Gill, 1998) y hematopoyéticos (Ezoe et al., 2004). Nuestros resultados muestran que Ikaros es capaz de incrementar los niveles de p21, pero no afecta a los de p27, en NSCs (figura 11E). p21, de forma parecida a p27, bloquea la progresión del ciclo celular en G1, impidiendo que comience la síntesis de DNA (Sherr and Roberts, 1999). Además, p21 disminuye la proliferación de precursores neurales de la zona subgranular del hipocampo (Pechnick et al., 2008). El hecho de que Ikaros no ejerza ningún efecto sobre la proliferación de las NSCs derivadas de ratones deficientes en p21 (figura 11F), indica que el incremento de p21 es el principal mecanismo mediante el cual actúa Ikaros para controlar la salida de ciclo de los precursores neurales.

Cuando analizamos el animal deficiente para Ikaros en las etapas embrionarias en que se está llevando a cabo la salida de ciclo de las neuronas de proyección estriatales, encontramos alteraciones que coinciden plenamente con los resultados obtenidos *in vitro*. En ausencia de Ikaros, se produce un aumento del volumen de las zonas proliferativas de la LGE en detrimento de la zona del manto. Ya que no se da un incremento de la muerte celular, todo indica que la falta de Ikaros impide a los precursores neurales abandonar el ciclo celular y migrar hacia el manto para su diferenciación. Encontramos deficiencias en la producción neuronal específicamente a E14.5, y también los niveles de incorporación de BrdU en la SVZ de la LGE se encuentran

aumentados en esta edad. El patrón temporal de las alteraciones producidas por la ausencia de Ikaros concuerda con el comienzo de su expresión durante el desarrollo estriatal y sitúa su acción en la generación de la segunda oleada neurogénica estriatal, coincidente con las células que poblarán la matriz.

## **8. Ikaros promueve la diferenciación de la segunda oleada de neuronas estriatales hacia un fenotipo encefalinérgico de proyección.**

Los resultados anteriores indican que Ikaros ayuda a la diferenciación terminal de las neuronas de generación tardía en el estriado, que corresponden a las que formarán parte de la matriz estriatal. Mientras que el compartimento estriosomal está enriquecido en neuronas positivas para sustancia P, en la matriz encontramos tanto estas como neuronas encefalinérgicas. En células madre hematopoyéticas, Ikaros interviene en la diferenciación y especificación de fenotipos (Georgopoulos, 2002), por lo que nos preguntamos si ocurría lo mismo en el caso del sistema nervioso.

El patrón de expresión de Ikaros durante el desarrollo, con un claro gradiente caudo-rostral, indica también que debe estar interviniendo en la especificación de un subtipo de neuronas estriatales. La ausencia de colocalización en etapas embrionarias con DARPP-32 sitúa, al igual que los experimentos de neurogénesis, a las células Ikaros positivas como parte de la matriz estriatal. A P3, cuando las neuronas encefalinérgicas y las sustancia P ya expresan sus marcadores característicos, las inmunohistoquímicas para Ikaros y cada uno de estos marcadores dejan claro que las células Ikaros positivas constituyen una parte de las neuronas encefalinérgicas de la matriz estriatal. Esto queda confirmado con la observación de que en el animal adulto, en ausencia de Ikaros esta población está selectivamente disminuida, como se observa en los recuentos de los distintos tipos celulares estriatales en el animal Ikaros<sup>-/-</sup>.

La implicación de Ikaros en la diferenciación de las neuronas estriatales GABAérgicas se confirma *in vitro*, ya que las células que expresan Ikaros en cultivos primarios estriatales expresan Tuj1. Además, la sobre-expresión de Ikaros en estos cultivos aumenta específicamente los niveles de calbindina y encefalina, lo que indica que promueve un fenotipo de neuronas estriatopalidales.

El hecho de que Ikaros se exprese durante el desarrollo en las zonas donde aparecerán neuronas encefalinérgicas, como el propio estriado (Song and Harlan, 1994b; van der Kooy and Fishell, 1987) y el cerebelo (Osborne et al., 1993), apunta a la posibilidad de que Ikaros regule de forma directa la

expresión de encefalina. De hecho, la sobreexpresión de Ikaros en la línea de precursores cerebelares C17.2, es capaz de incrementar los niveles de expresión de encefalina sin inducir un fenotipo estriatal (no incrementa, por ejemplo, los niveles de calbindina o DARPP-32). Esto está en consonancia con el hecho de que ha sido demostrado que factores de transcripción de la familia Ikaros son capaces de unirse al promotor de la encefalina y promover su expresión (Dobi et al., 1997). Además de este efecto directo, Ikaros interacciona con muchos otros factores para dar una respuesta que es totalmente dependiente del entorno en que se encuentra la célula. Por ejemplo, la expresión de Ikaros en la retina parece estar controlando la salida de ciclo y la especificación de las células de generación temprana, mientras que no afecta a las de generación tardía (Elliott et al., 2008).

El ratón deficiente de Ikaros utilizado en este estudio (Ikaros<sup>-/-</sup>), a diferencia de otros, no genera formas de Ikaros truncadas que puedan actuar como dominantes negativos para la acción de los otros genes de la familia. Así, mientras que nosotros sólo observamos las consecuencias de la falta de Ikaros, en los ratones que generan estos dominantes negativos, a esta deficiencia se suman los efectos secundarios derivados de la interferencia con la acción del resto de genes de la familia Ikaros. Esto, junto a un posible papel de Helios en el desarrollo estriatal, explica las discrepancias en los resultados al analizar los distintos modelos (Agoston et al., 2007).

Ya que se han descrito efectos compensatorios entre Ikaros y Helios en el sistema hematopoyético (Zhang et al., 2007), analizamos la expresión de Helios en los animales deficientes de Ikaros. La expresión de Helios es completamente normal en los animales Ikaros<sup>-/-</sup> (figura 16K). Esto puede deberse a que los dos genes estén controlando distintas poblaciones estriatales, como sugiere el hecho de que no se de colocalización entre los dos genes. El efecto de Helios sobre el desarrollo estriatal se está estudiando actualmente en el laboratorio.

Ikaros, por tanto, puede tener un papel dual, especificando el fenotipo neuronal encefalinérgico de los precursores neurales y al mismo tiempo controlando el ciclo celular por medio de p21. Hay varios factores de transcripción que, como Ikaros, ejercen un efecto sobre la especificación neuronal y al mismo tiempo controlan la salida de ciclo celular de los

precursores en los que se expresan (Canzoniere et al., 2004; Nguyen et al., 2006; Paris et al., 2006; Tanabe et al., 1998). Por ejemplo, el factor de transcripción Phoxa2, coordina la salida de ciclo de los precursores neurales mediante la inducción de la expresión de p27 y al mismo tiempo promueve su fenotipo noradrenérgico (Paris et al., 2006). Algo parecido ocurre con el factor MNR2, que se expresa en progenitores neuronales y de forma transitoria en motoneuronas postmitóticas. MNR2 desencadena la expresión de toda una serie de factores relacionados con distintos aspectos de la diferenciación neuronal, que provocan la salida de ciclo de los precursores y dirigen su especificación hacia el fenotipo de motoneurona (Tanabe et al., 1998).

## **9. Las células Ikaros positivas requieren la expresión de Dlx1/2 en etapas anteriores y su especificación se produce de forma independiente a Ebf1.**

Ikaros está implicado en la generación de neuronas encefalinérgicas de la matriz, y éstas se generan en la segunda oleada neurogénica estriatal (van der Kooy and Fishell, 1987). Los genes Dlx1/2 se expresan en precursores de la zona proliferativa de la LGE durante el desarrollo y son fundamentales para la aparición de estas neuronas (Anderson et al., 1997b; Bulfone et al., 1993; Eisenstat et al., 1999). Así pues, analizamos su relación con la expresión de Ikaros.

Nuestros resultados indican que Ikaros depende de la expresión de los genes Dlx. Como era de esperar, la falta de Ikaros no afecta ni a Dlx1/2 ni a Dlx5/6, los siguientes en la cascada de diferenciación estriatal (Eisenstat et al., 1999), ya que los genes Dlx se expresan en precursores más indiferenciados que las células que expresan Ikaros. En cambio, el estudio de los animales deficientes para Dlx1/2 indica que Ikaros depende de la previa expresión de estos factores para poder expresarse en el manto estriatal. Como indica la colocalización con GFP en el animal Dlx5/6-GFP, las neuronas positivas para Ikaros provienen de precursores que han expresado los genes Dlx5/6. Hay muchas células GFP positivas que no son Ikaros, lo que concuerda con el hecho de que estos genes se han implicado también, entre otras, en la generación de las neuronas que migrarán al bulbo olfativo (Perera et al., 2004).

Otro gen relacionado con la generación de la matriz estriatal es Ebf1 (Garel et al., 1999), que al igual que Ikaros ha sido intensamente estudiado por su papel en la diferenciación y especificación hematopoyética (Hagman and Lukin, 2005; Lin and Grosschedl, 1995). Ebf1 también acopla la especificación de fenotipo neuronal a la salida del ciclo celular, pero a diferencia de Ikaros, regula la expresión de sustancia P (García-Domínguez et al., 2003; Lobo et al., 2006). Esto hace suponer que Ikaros y Ebf1 funcionan mediante mecanismos independientes. El hecho de que la expresión de cada uno de ellos no se encuentre afectada en los animales deficientes para el otro gen confirma la hipótesis de que no existe dependencia entre estos factores de transcripción. Además, también parecen provenir de linajes celulares diferentes, ya que la expresión de Ebf1 está preservada en los animales deficientes para Dlx1/2.

Pese a que se considera segunda oleada, Ebf1 comienza su expresión mucho antes que Ikaros, por lo que podría controlar también aspectos anteriores de la diferenciación neuronal.

## **10. Nolz1 e Ikaros controlan distintos aspectos de la diferenciación neural durante el desarrollo del núcleo estriado.**

Tras los resultados obtenidos, podemos establecer que Nolz1 e Ikaros actúan en momentos distintos del desarrollo estriatal. Tanto su momento como su lugar de expresión son diferentes, y además no parece haber relación directa entre ellos, ya que Nolz1 no induce la expresión de Ikaros ni se ve afectada su expresión en los animales deficientes para Ikaros.

Como hemos visto, Nolz1 se perfila como un gen fundamental para la correcta diferenciación de los precursores neurales estriatales de la SVZ, ya que es capaz de integrar las señales morfogenéticas que llegan a la LGE con la ayuda de Groucho/TLEs. La acción de Nolz1 es fundamental directa o indirectamente para la especificación de los precursores oligodendrogiales estriatales. Además, Nolz1 podría estar implicado en la aparición de Raldh3 en la LGE desde E12.5, por lo que contribuye al fenotipo estriatal mediante la constitución de un gradiente de RA, que puede controlar distintos aspectos de la diferenciación de las neuronas estriatales. Tanto el linaje oligodendroglial en la LGE como la expresión de Raldh3 se ha demostrado que dependen de la expresión del gen Gsh2 en la VZ. Nosotros hemos mostrado que Nolz1 depende también de la expresión de este gen, dando un punto común a los dos efectos más importantes de Nolz1 durante el desarrollo estriatal.

Ikaros, en cambio, está implicado en la generación de la segunda oleada neurogénica estriatal, coincidiendo con la aparición de las neuronas de proyección de la matriz del núcleo estriado. Ikaros favorece la diferenciación neuronal promoviendo la salida de ciclo de los precursores a través de la regulación de p21 y, además, les confiere un fenotipo encefalinérgico promoviendo directamente la expresión del gen de la encefalina. Este hecho pone en evidencia la capacidad de Ikaros para acoplar la diferenciación con la especificación neuronal, mediante el control de varios procesos celulares. En consonancia con su papel en la formación de la matriz estriatal, las células Ikaros positivas requieren la previa expresión de la familia de genes Dlx en las zonas proliferativas de la LGE. Además, Ikaros tiene un papel complementario e independiente a Ebf1, otro factor de transcripción específico de la matriz estriatal. Mientras Ikaros regula la diferenciación de las neuronas

estriatopallidales, Ebf1 hace lo propio con las estriatonigrales. Así pues, futuros estudios de la generación y posterior maduración de las dos poblaciones pueden ayudarnos a comprender las diferencias funcionales que existen entre ellas.

Una de las principales diferencias entre Nolz1 e Ikaros, a parte de las ya comentadas, está en que, a diferencia de Ikaros, Nolz1 no tiene capacidad de unirse directamente a DNA. En cambio, ambos factores tienen la capacidad de formar grandes complejos represores que incluyen entre sus componentes HDACs, por lo que los dos pueden estar implicados, aunque en diferentes momentos, en las complejas remodelaciones de cromatina que sufren los precursores neurales desde su estado más indiferenciado hasta su diferenciación y maduración terminal.

Así, tanto Nolz1 como Ikaros podrían estar regulando la formación de neuronas de proyección encefalinérgicas, pero con bastante probabilidad, se trata de subpoblaciones distintas de ellas.

