

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



“Papel de CoREST durante el desarrollo de la corteza cerebral in vivo”

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

PATRICIO ANDRES FUENTES BRAVO

Director de Tesis

Dr. Manuel Kukuljan

SANTIAGO - CHILE
2012

Financiamiento

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Neurobiología celular y molecular, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de las siguientes becas y proyectos:

1. Beca Conicyt de doctorado D-21070899

Año: 2007-2010

2. Beca Conicyt de apoyo a la realización de tesis doctoral N° 24081054

Año: 2008-2010

3. Beca Fondap

Financiamiento parcial de tesis doctoral

Año: 2006

4. Proyectos Fondecyt 1120483

5. Iniciativa científica milenio: lcm-P09-015-F

Becas

1. Beca Conicyt de doctorado D-21070899

Año: 2007-2010

2. Beca Conicyt de apoyo a la realización de tesis doctoral N° 24081054

Año: 2008-2010

3. Beca Fondap

Financiamiento parcial de tesis doctoral

Año: 2006

4. Beca Sociedad latinoamericana de Biología del desarrollo

Beca de asistencia al VI congreso de VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology, 26-29 de Abril de 2012, Montevideo, Uruguay

5. Beca Conicyt

Financiamiento para asistir a congresos en el extranjero

Congreso mundial de neurociencia, 14-18 de Julio de 2011, Florencia, Italia

6. Beca École des neurosciences de Paris (ENP); IBRO-LARC

Financiamiento para realizar pasantía en Europa, programa: "*Young Investigator Training Fellowship*" (Laboratorio Dra. Fiona Francis, UPMC, Francia), 2011

7. Beca Amsud/Pasteur, IBRO-LARC

Financiamiento para asistir al Curso y taller regional de microscopía de fluorescencia (Uruguay)

Año: 2010

8. Beca International Brain Research Organization (IBRO-LARC)

Financiamiento para realizar pasantía internacional

Año: 2009

9. Beca Vicerrectoría de asuntos académicos Universidad de Chile

Financiamiento para realizar pasantía internacional (Laboratorio Dr. Stephen Noctor, UC Davis, USA)

Año: 2009

10. Beca International Brain Research Organization (IBRO-LARC)

Financiamiento para asistir al Iº Congreso Latinoamericano de Neurociencia, Septiembre 1-4, 2008, Buzios, Brazil

11. Beca Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)

Financiamiento para asistir al XI Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), Mayo 17-20, 2008, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

Publicaciones y presentaciones a congresos

Publicaciones

1. CoREST/LSD1 is required for the migration and differentiation of pyramidal cortical neurons. Patricio Fuentes, José Cánovas, F. Andrés Berndt, Steven C. Noctor and Manuel Kukuljan. *Cerebral Cortex*, (2012) Vol. 22(6): 1431-1441, publicado primero en línea el 30 de Agosto del 2011, doi:10.1093/cercor/bhr218

2. RNA interference of Marlin-1/Jakmip1 results in abnormal morphogenesis and migration of cortical pyramidal neurons. René L. Vidal, Patricio Fuentes, José Ignacio Valenzuela, Carlos Alvarado, Omar A. Ramírez, Manuel Kukuljan and Andrés Couve. *Molecular and Cellular Neuroscience*. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.007>

Presentaciones a congresos nacionales

1. Fuentes, P., Martínez, X., Peña, D., Sierralta, J., Kukuljan, M. La función del represor transcripcional CoREST es necesaria para la diferenciación neuronal *in vivo*. Sociedad de Biología Celular. Octubre 2008, Pucón, Chile

2. José Cánovas, Patricio Fuentes, Manuel Kukuljan. Papel de REST/NRSF en el Desarrollo de la Corteza Cerebral. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. Octubre 2007, Pucón, Chile

Presentaciones a congresos internacionales

1. Fuentes P. and Kukuljan M. *In Utero* Rnai Reveals Corest/LSD1 Complex Regulate The Proper Differentiation And Migration Of Cortical Neurons During Development. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology, 26-29 de Abril, 2012, Montevideo, Uruguay
2. Fuentes P. and Kukuljan M. CoREST/LSD1 regulates the migration and differentiation of cortical neurons during development. P. 8th IBRO World Congress of Neuroscience. 14-18 de Julio, 2011. Florencia, Italia
3. Patricio Fuentes, José Cánovas, F. Andrés Berndt, Stephen C. Noctor, Manuel Kukuljan. CoREST, but not REST/NRSF is required for the development of cortical pyramidal neurons in vivo. Gordon Research Conferences of Neural Development. 15-20 de Agosto, 2010. Salve Regina University, Newport, Rode Island, USA
4. P. Fuentes; J. Cánovas; A. Berndt; Y. Fuentealba; P. Zamorano; M. Kukuljan. CoREST is required for the normal differentiation of cortical piramidal neurons. Society for Neuroscience. 17-21 de Octubre, 2009. Chicago, Illinois, USA
5. Fuentes P., Kukuljan M. Role of CoRest in Neuronal differentiation during the development of cerebral cortex. Iº Congreso Latinoamericano de Neurociencia. 1-4 de Septiembre, 2008, Buzios, Rio de Janeiro, Brasil
6. Fuentes, P., Canovas J., Berndt A., Kukuljan M. Role of Corest in Neuronal Differentiation during the Development of Cerebral Cortex *in vivo*. XI Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). 17-20 de Mayo, 2008, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Manuel Kukuljan por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, lo que permitió trabajar en este proyecto y expandir mi conocimiento en el maravilloso campo de la neurobiología.

Doy las gracias a los miembros que integran el comité evaluador de esta tesis, por el tiempo que dedicaron a este proyecto, por sus comentarios críticos y las discusiones valiosas que tuvimos durante nuestras reuniones.

Un agradecimiento muy especial para nuestro colaborador en UC Davis, el Dr. Stephen Noctor, por la ayuda brindada, excelente disposición, y por compartir sus conocimientos y experiencia.

Me gustaría también dar las gracias al personal de apoyo técnico del laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, quienes se preocupan de manera diligente de las necesidades, problemas, y los materiales básicos para llevar a cabo las tareas experimentales.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, en especial a los más cercanos, y a quienes en mayor o menor medida contribuyeron durante la ejecución de esta tesis con su asesoría, comentarios y sugerencias acertadas.

En particular, quiero agradecer a Claudia y Yerko, por compartir los "coffee break", apoyarme en los "momentos vitales complicados" y ser mis amigos.

Finalmente, estoy extremadamente agradecido de mi familia, motivo y fundamento, por apoyarme en cada salto al vacío..."esta páginas son para ustedes".

Índice de contenidos

	Página
Financiamiento	0
Becas	2
Publicaciones y presentaciones a congresos	3
Agradecimientos	5
Índice de contenidos	6
Índice de figuras	9
Índice de tablas	12
Abreviaturas	13
Resumen	15
Summary	17
1.- Introducción	19
1.1. Desarrollo y organización del sistema nervioso	19
1.1.1. Formación del telencéfalo de mamíferos	20
1.1.2. Determinación y formación de los territorios telencefálicos	22
1.1.3. Origen de las neuronas corticales	25
1.2. Neurogénesis en la neocorteza de mamíferos	26
1.2.1. Heterogeneidad celular cortical	26
1.2.2. Progenitores neurales	27
1.2.2.1. Células neuroepiteliales y glías radiales	27
1.2.2.2. Progenitores intermedios o basales	31
1.3. Migración neuronal	34
1.3.1. Migración radial	34
1.3.1.1. Translocación somal	35
1.3.1.2. Locomoción	36
1.3.1.3. Patrones de migración radial: distintos modos de locomoción	37
1.3.2. Migración tangencial	39
1.4. Organización de la corteza cerebral de mamíferos	41
1.4.1. Laminación y especificación de subclases neuronales	41
1.4.2. Arealización neocortical	44

1.5.	Control molecular de la neurogénesis	45
1.5.1.	Control epigenético: papel de REST/NRSF	47
1.5.2.	Mecanismo de silenciamiento: función de CoREST	49
1.6.	Electroporación <i>in utero</i>	54
1.6.1.	Problemas potenciales y limitaciones de la electroporación <i>in utero</i>	55
2.-	Hipótesis	57
3.-	Objetivos	58
4.-	Materiales y Métodos	59
4.1.	Reactivos químicos	59
4.1.1.	Reactivos y sistemas comerciales de biología molecular	59
4.1.2.	Soluciones para biología molecular	59
4.1.3.	Reactivos usados en inmunofluorescencia	60
4.1.4.	Reactivos usados para inmublot	60
4.1.5.	Reactivos usados para cultivos de bacterias	61
4.1.6.	Reactivos para cultivo de líneas celulares	61
4.1.7.	Reactivos para cultivos primarios neuronales	61
4.1.9.	Cepas bacterianas.	62
4.1.10.	Partidores	63
4.2.	Metodología	65
4.2.1.	RT-PCR.	65
4.2.2.	Diseño y clonamiento de los shRNAs.	65
4.2.3.	Generación de las variantes de CoREST	66
4.2.4.	Obtención, purificación y secuenciación del DNA plasmidial	66
4.2.5.	Obtención de vectores lentivirales.	67
4.2.6.	Transfección y transducción de líneas celulares NIH3T3 y Neuro2A.	67
4.2.7.	Cultivos primarios de neuronas corticales.	67
4.2.8.	Inmunocitoquímica e inmunoblot	68
4.2.9.	Animales y electroporación <i>in utero</i> .	69
4.2.10.	Inmunohistoquímica	71
4.2.11.	TUNEL	72
4.2.12.	Ensayo de BrdU.	73
4.2.13.	Análisis estadísticos	73

5.- Resultados	74
5.1. Determinación del patrón de expresión espacio temporal de CoREST en la corteza cerebral	74
5.1.2. Desarrollo de procedimientos para inducir la disminución en la expresión y/o función de CoREST <i>in vivo</i>	78
5.2. Evaluación de las consecuencias de la disminución en la expresión y/o pérdida de función de CoREST en el contexto histológico normal de la corteza cerebral	85
5.2.1. Determinación del efecto de la disminución de CoREST sobre el patrón de expresión de proteínas asociadas con distintos estados de diferenciación neuronal	92
5.2.2. Evaluación de las consecuencias de la disminución en la expresión de CoREST en la supervivencia y proliferación celular.	96
5.2.2.1. Determinación de la viabilidad celular	96
5.2.2.2. Análisis de proliferación celular	99
5.3. Análisis de los mecanismos moleculares por los cuales CoREST modula la generación de neuronas corticales	103
5.4. Determinar los efectos de la disminución de CoREST en la corteza postnatal	113
6.- Discusión	118
7.- Conclusión	130
8.- Proyecciones	131
9.- Referencias	133

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Esquema de la formación del tubo neural mediante neurulación	20
Figura 2. Visión esquemática del tubo neural	21
Figura 3. Principales centros de señalización en el telencéfalo	23
Figura 4. Sección coronal telencefálica de ratón en día embrionario 9.5 y la compartimentalización del neuroepitelio	24
Figura 5. Territorios y estructuras en los que se divide el telencéfalo de ratón en día embrionario 12.5 (E12.5)	25
Figura 7. Modos de divisiones celulares durante el desarrollo cortical	28
Figura 8. Esquema que ilustra la generación de neuronas de acuerdo al modelo “ <i>inside-out</i> ”	30 35
Figura 9. Esquema que muestra los dos modos de migración radial en la corteza en desarrollo	37
Figura 10. Esquema que representa las distintas fases morfológicas del proceso migratorio de las neuronas piramidales	39
Figura 11. Rutas migratorias de los subgrupos de interneuronas corticales desde el telencéfalo ventral	40
Figura 12. Generación de los subtipos de neuronas de proyección en la VZ/SVZ	42
Figura 13. Organización laminar de la neocorteza en términos de expresión de genes y proyecciones axonales dentro de la corteza	43
Figura 14. Estructura de CoREST	51
Figura 15. Esquema del método de electroporación <i>in utero</i>	55
Figura 16. Instalación básica de un sistema de electroporación <i>in utero</i>	70
Figura 17. Transcripción reversa acoplada a PCR para determinar la presencia del mRNA de los genes de la familia CoREST	75
Figura 18. Análisis temporal de la expresión de CoREST en la corteza cerebral	76
Figura 19. Patrón de expresión de CoREST durante el desarrollo	77
Figura 20. Selección <i>in vitro</i> de un shRNA contra CoREST eficiente	79

Figura 21. Transducción lentiviral de la línea celular NIH3T3 para determinar interferencia de CoREST	81
Figura 22. El sistema lentiviral para expresión de shRNA produce una reducción estable y eficiente de CoREST en neuronas corticales	82
Figura 23. RNAi de CoREST in vivo mediante electroporación <i>in utero</i> de plasmidios que codifican shRNA	84
Figura 24. Análisis temporal de la pérdida de función de CoREST durante la migración radial en la corteza cerebral en desarrollo	87
Figura 25. La pérdida de función de CoREST detiene las neuronas en la etapa multipolar de la migración en la interfase SVZ/IZ	89
Figura 26. Rescate del defecto migratorio por co-expresión de CoRESTr	91
Figura 27. Caracterización de la identidad neuronal de las células electroporadas con las construcciones control y shCoREST	94
Figura 28. Caracterización fenotípica de las células electroporadas con las construcciones control y shCoREST	95
Figura 29. La disminución en la expresión de CoREST no afecta la sobrevivencia de las neuronas corticales post mitóticas	97
Figura 30. CoREST no está involucrado la sobrevivencia de las neuronas corticales postmitóticas	98
Figura 31. La disminución en la expresión de CoREST no tiene efecto sobre la proliferación celular	100
Figura 32. La disminución en la expresión de CoREST incrementa el número de células que se encuentran en el ciclo celular	101
Figura 33. El silenciamiento de CoREST no perturba los procesos de la glia radial en la corteza	102
Figura 34. Expresión de variantes truncadas de CoREST	104
Figura 35. La función de CoREST no requiere su asociación con REST/NRSF, SUMO1 o SUMO2/3	106
Figura 36. Distribución de las células electroporadas con las distintas construcciones de CoREST junto con el shCoREST	107
Figura 37. Expresión temporal de LSD1	109
Figura 38. Expresión de LSD1 durante el desarrollo cortical	110

Figura 39. La pérdida de función de LSD1 retrasa el posicionamiento normal de las neuronas post mitóticas en E17.5	112
Figura 40. El shRNA contra CoREST produce una disminución sostenida en la expresión de CoREST in vivo	114
Figura 41. El silenciamiento de CoREST en neuronas post mitóticas conduce a un defecto en las ramificaciones en etapa post natal	115
Figura 42. Las células depletadas de CoREST alcanzan su posición apropiada en la corteza post natal	117
Figura 43. Diagrama esquemático que muestra la función de CoREST durante la neurogénesis	129

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Secuencias de partidores usados para la amplificación mediada por PCR de los genes de la familia CoREST (RCoR)	63
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos usados para la generación de las horquillas cortas de RNA (shRNA) contra CoREST	63
Tabla 3. Secuencias de los pares de partidores usados para la amplificación mediada por PCR de las variantes truncadas de CoREST	64

Abreviaturas

aa:	aminoácidos
APs:	Progenitores apicales
bHLH:	Hélice-bucle-hélice básica
BLBP:	Proteína de union a lípidos cerebrales
BMP:	Proteínas morfogénicas óseas
BrdU:	5-bromo-2-desoxy-uridine. 5-bromo-2-desoxiuridina
BSA:	Albúmina de suero bovino
cDNA:	DNA complementario
CP:	Cortical plate. Placa cortical
CR:	Células Cajal-Retzius
DG:	Dentate gyrus
DIV:	Días <i>in vitro</i>
DMEM:	Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxirribonucleótidos
E:	Día embrionario
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
GABA:	Aminobutyric acid
GFAP:	Proteína acidica fribilar glial
GFP:	Proteína fluorescente verde
h:	hora(s)
IPs:	Progenitores intermedios
IRES:	Sitio interno de entrada ribosomal
IUE:	Electroporacion <i>in utero</i>
IZ:	Zona intermedia
LME:	Eminencia gangliónica lateral
min:	minuto(s)
mM:	mili molar
MGE:	Eminencia gangliónica media
MZ:	Zona marginal
NP:	Progenitores neuroepiteliales

P:	Día post natal
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PBST:	PBS/Tween-20
PCR:	Reacción de polimerasa en cadena
RGCs:	Gliales radiales
RNA:	Ácido ribonucleico
RT:	Room temperature. Temperatura ambiente
SDS:	Dodecil sulfato sódico
shRNA:	Horquilla corta de ácido ribonucleico
SVZ:	Zona subventricular
TCA:	Aferencias tálamo corticales
TF:	Factor de transcripción
Tris:	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
µg:	micro gramos
µl:	micro litros
VZ:	Zona ventricular
WB:	Inmunoblot, Western blot

Resumen

En la neocorteza de mamíferos, la transición de progenitores neurales a neuronas de proyección y la mantención de la identidad neuronal recaen en la combinación de programas genéticos y epigenéticos que modulan eventos celulares como salida del ciclo celular, migración y diferenciación en neuronas funcionales. Estudios *in vitro* e *in silico* han mostrado que CoREST (REST Corepressor-1) es un factor importante en la coordinación de cambios de la estructura de la cromatina y actividad de genes durante la neurogénesis. CoREST es un componente fundamental de complejos de represión transcripcional y contribuye al ensamblaje de la maquinaria de remodelamiento de la cromatina en genes asociados con la identidad celular de progenitores neuronales y con la adquisición del fenotipo celular apropiado. CoREST puede formar complejos con diferentes proteínas como REST/NRSF, Nurr1, Tlx, Hsf1 y Znf198 (entre otras). Ejerce su función a través de enzimas que introducen modificaciones post traduccionales en las histonas, tales como la demetilasa de histonas específica de lisinas, LSD1 y las histonas desacetilasas, HDAC 1/2. Sin embargo, no existían estudios asociados al papel de CoREST sobre la neurogénesis durante el desarrollo.

En esta tesis, se realiza un análisis de la función *in vivo* de CoREST. Estudios de inmunofluorescencia revelaron que CoREST está ampliamente expresado en la corteza cerebral durante el desarrollo y en etapas postnatales. Se utilizó la estrategia de electroporación *in utero* para introducir plasmidios que codifican horquillas cortas de RNA (shRNA) contra CoREST y así disminuir su expresión en progenitores neuronales localizados en la zona ventricular telencefálica. Esta aproximación reveló que la disminución de CoREST produce una alteración en la migración radial neuronal y a la vez cambios en la morfología. La inmunodetección de proteínas asociadas con distintos estadios de diferenciación celular no evidenció alteraciones en la adquisición del fenotipo neuronal (neuronas Tuj1+ y Vglut+), ni cambios significativos sobre la proliferación o supervivencia celular. En contraste, se observó un aumento en la proporción de progenitores neuronales Sox2+ y Tbr2+. Para profundizar en estos hallazgos, se realizaron experimentos de rescate utilizando variantes truncadas de CoREST para explorar cual dominio era relevante para recuperar la posición normal de las neuronas en la corteza. En estos experimentos el shRNA contra CoREST fue co-electroporado con el vector que codifica cada versión truncada de CoREST. La pérdida de función de

CoREST fue revertida por una construcción desprovista del dominio de interacción con REST/NRSF (región N-terminal). Al mismo tiempo, la disminución en la expresión de REST/NRSF no generó perturbaciones significativas del desarrollo de las neuronas de proyección. Por otra parte, la variante de CoREST carente del dominio de interacción con LSD1 (región C-terminal) no rescató el defecto en el posicionamiento neuronal causado por la disminución de CoREST.

En estas condiciones experimentales, los datos presentados muestran que la función de CoREST en asociación con LSD1, pero no con REST/NRSF es requerida durante la ejecución del programa de desarrollo de las neuronas de proyección.

Summary

In the developing mammalian neocortex, the transition from proliferating neural progenitors to projection neurons and the maintenance of neuronal identity relies on genetic and epigenetic programs that combine to establish the cell cycle exit, migration and differentiation into mature neurons. The *in vitro* evidence and biochemical data show that a key factor in the coordination of changes of chromatin structure and gene activity during neurogenesis is REST Corepressor-1 (CoREST). CoREST is a component of transcriptional repression complexes, contributing to the assembly of chromatin remodeling machinery at genes related with neural progenitors identity and cell fate decisions. CoREST can form complexes with different partners as REST/NRSF, Nurr1, Tlx, HSF1 and Znf198, and exerts its function through chromatin modifying enzymes, such as HDAC1/2 and LSD1. However, to date, no data had reported an effect of CoREST on neurogenesis during embryonic development.

Here, the first functional *in-vivo* study of CoREST, it was detected that CoREST is widely expressed in the cerebral cortex during development and adulthood. It was used in utero electroporation of short hairpin RNA (shRNA) constructs into neuronal progenitors located in the cortical ventricular zone to knockdown CoREST. This approach revealed that radial migration of CoREST-deficient neurons is altered as well as their morphology. The neuronal identity of CoREST-knocked-down cells was unchanged (Tuj1⁺, Vglut⁺). By contrast, it was observed an increase of Sox2⁺ and Tbr2⁺ neural progenitor proportion without noticeable effect on cell proliferation and cell survival. To extend these findings, it was performed rescue experiments to examine the ability of distinct CoREST truncated versions to recover the normal neuronal position into the cortex. In these experiments, the plasmids encoding the CoREST truncated versions were co-electroporated with the shRNA vector targeting CoREST. CoREST loss of function was rescued by a construct lacking the characterized domain of interaction with REST/NRSF (N-terminal region). In addition, the loss of expression of REST/NRSF did not associate to significant perturbations of projection neuron development. On the other hand, CoREST truncated form which lacks the LSD1 interacting domain (C-terminal region) failed to rescue the migratory defects caused by CoREST knockdown.

Under this experimental approach, the data presented here show that CoREST function in association with LSD1, but not with REST/NRSF is required for the expression of the physiological developmental program of projection neurons.

1.- Introducción

1.1. Desarrollo y organización del sistema nervioso

La corteza cerebral es el componente más complejo del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Recibe información de los órganos sensoriales, procesándolos y transformándolos en actividad motora controlada, o formulando y efectuando comportamientos específicos [O' Leary y cols., 2007]. Así, en humanos, el telencéfalo es el sitio donde se originan las funciones cognitivas superiores, tales como aprendizaje, lenguaje y memoria. Daños en esta estructura resultan en demencia, deterioro sensorial y motor específicos, alteraciones en el movimiento y del lenguaje, cambios en la personalidad y estados de ánimo.

La corteza cerebral se origina a partir del telencéfalo dorsal, el cual se desarrolla en la parte anterior del SNC. La corteza cerebral (pallio) se forma a partir de la parte dorsal del telencéfalo, la vesícula más rostral formada después del cierre del tubo neural tempranamente en el desarrollo embrionario. La corteza comprende: la neocorteza, que es la región más grande y está posicionada entre dos regiones de la corteza cerebral, la allocorteza (corteza entorrina, hipocampo), parte evolutiva más antigua y la paleocorteza (corteza piriforme olfativa). La neocorteza es la región que ha experimentado los cambios más notorios durante la evolución. Se caracteriza por una expansión de las seis capas neuronales radialmente organizadas que forman pliegues y surcos. Estos cambios están relacionados directamente con un incremento en la complejidad, reflejada por la gran diversidad celular que resulta de variados procesos coordinados del desarrollo que incluyen: inducción del neuroectodermo, proliferación, especificación neuronal, diferenciación, migración, maduración, crecimiento y guía axonal. Un desafío en el campo de la neurobiología del desarrollo es especificar los actores moleculares detrás de los mecanismos moleculares que participan en la generación y funcionamiento de esta compleja estructura, la corteza de los mamíferos [O'Leary y cols., 2007].

1.1.1. Formación del telencéfalo de mamíferos

El SNC surge tempranamente durante el desarrollo a partir de una capa citológicamente homogénea de células neuroepiteliales (NEP), la placa neural (Figura 1.1). Este proceso se basa en la inhibición de la señalización por la proteína BMP (proteína morfogenética ósea). El plegamiento de la placa neural para producir el surco neural es desencadenado por la formación de una bisagra en la región ventral (el piso de la placa; Figura 1.2). Al final de la neurulación, los extremos de la placa neural se fusionan (Figura 1.3) y segregan desde el epitelio no-neural para formar el tubo neural (Figura 1.4). El techo y el piso de la placa se forman en la línea media dorsal y ventral del tubo neural, respectivamente. El techo de la placa se convierte en un centro organizador nuevo que produce BMP, el que proporciona información de modelamiento dorsal. Las crestas neurales derivan del tubo neural dorsal y migran para formar el sistema nervioso periférico, melanocitos, y cartílagos en la cabeza [Liu y Niswander, 2005].

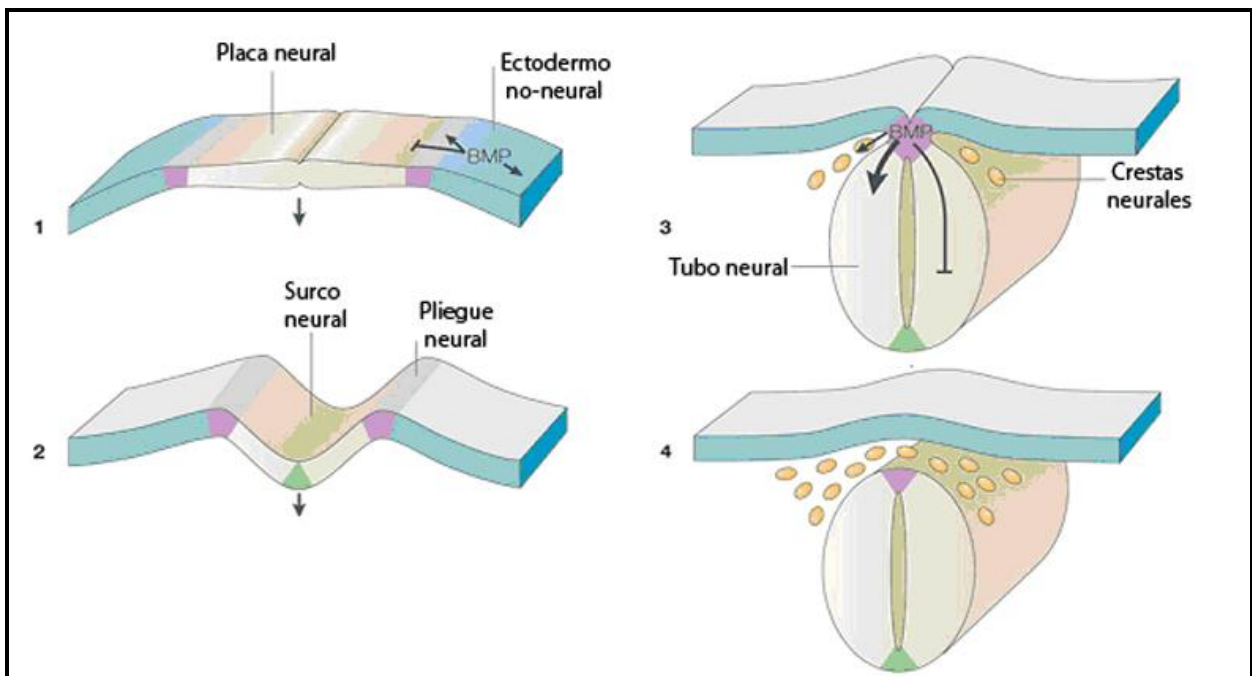


Figura 1. Esquema de la formación del tubo neural mediante neurulación. El CNS deriva de un epitelio especializado, la placa neural (1). La placa neural se induce a partir del mesodermo subyacente. Durante la neurulación, la placa neural se pliega en los márgenes para formar el tubo neural (2). Al final de la neurulación, los extremos de la placa neural se fusionan (3) y segregan desde el epitelio no-neural para formar el tubo neural (4). Adaptado de Liu y Niswander, 2005.

Antes del cierre del tubo neural, la placa neural se subdivide a lo largo del eje antero-posterior en tres dominios distintos, que corresponden a las tres vesículas primarias: el prosencéfalo (cerebro anterior), el mesencéfalo (cerebro medio), y el romboencéfalo (cerebro posterior) (Figura 2a).

Estas regiones, son subdivididas a medida que transcurre el desarrollo: el prosencéfalo dará origen al diencefalo y telencéfalo; el romboencéfalo a metencéfalo y mielencéfalo (Figura 2b). Esto ocurre aproximadamente en día embrionario 8.5 (E8.5) en ratones, cuando se inicia la expresión del gen *Foxg1*. En esta etapa el telencéfalo es todavía neuroepitelio mono celular. Inmediatamente después de la expresión de *Foxg1*, el telencéfalo se divide en territorios diferentes, los que se indican primeramente mediante la expresión de marcadores moleculares específicos y poco después se pueden distinguir sobre la base de las diferencias regionales en sus niveles de proliferación celular.

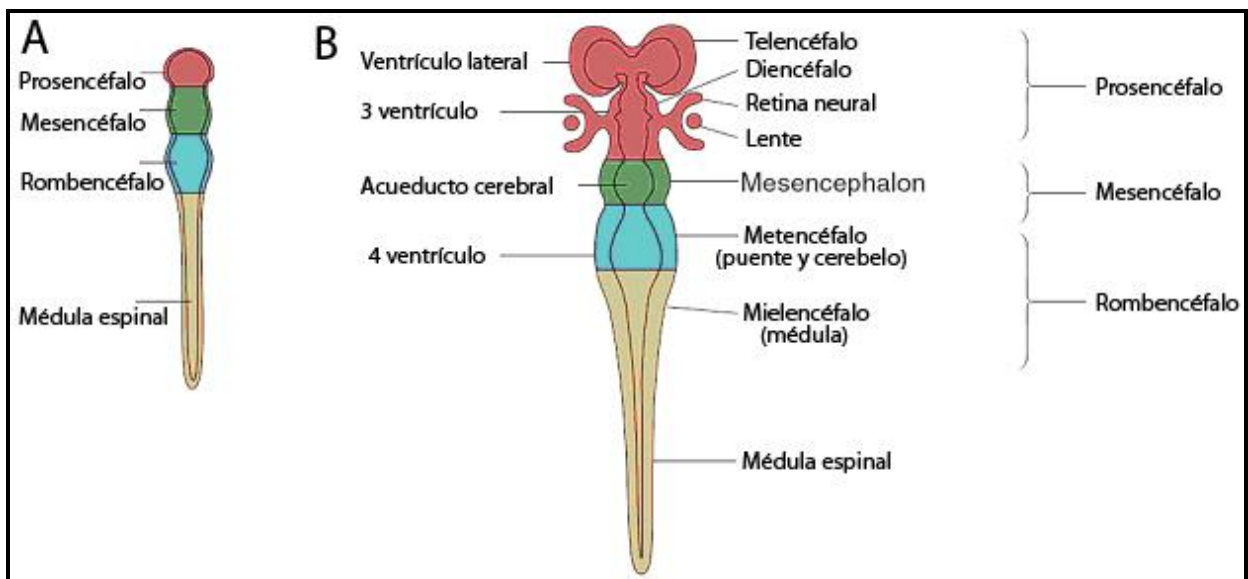


Figura 2. Vista esquemática del tubo neural. Las tres vesículas telencefálicas primarias (a) se subdividen en cinco vesículas secundarias a medida que transcurre el desarrollo (b). Gilbert, 2010.

1.1.2. Determinación y formación de los territorios telencefálicos

El tamaño y complejidad de la corteza cerebral han experimentado una expansión significativa durante la evolución, caracterizada por un aumento en el número de células, y una organización radial y horizontal progresivamente más compleja, donde la aparición de uno de sus dominios, la neocorteza, es un evento nuevo y propio de los mamíferos. El control coordinado y preciso del ciclo celular, de la diferenciación, y el control espacio-temporal del destino celular a lo largo de la dimensión radial así como tangencial de la corteza cerebral en desarrollo son etapas cruciales y necesarias para el modelado de los primeros territorios corticales (regionalización) y de las áreas corticales postnatales (arealización) [Grove y Fukuchi-Shimogori, 2003]. La especificación y diferenciación de las áreas corticales son controladas por una interacción entre factores genéticos regulatorios intrínsecos de la neocorteza (factores de transcripción expresados por progenitores corticales y morfógenos expresados por centros de modelado telencefálico) e influencias extrínsecas tales como axones talamocorticales (TCA) que transmiten información sensorial, de un modo área-específico, desde los núcleos sensoriales principales del tálamo dorsal hacia las áreas corticales primarias.

La información posicional inicial a lo largo del eje antero-posterior (AP) y dorso-ventral (DV) del telencefalo en desarrollo (E8.5-E10.5) está dada por morfógenos y ligandos secretados desde centros inductivos: the ANR/CoP (cresta neural anterior/placa comisural) en la línea media rostral (Fgf8), el mesodermo precordial ventral (Shh), placa tectal dorsal (BMP4, Wnt3), el hem (Wnts, BMPs) en la línea media dorso-caudal y territorios inmediatamente adyacentes. A medida que avanza el crecimiento y la distancia entre centros de los patrones aumenta (E11.0-E13.5), aparece un centro de señalización adicional, el anti hem. Se localiza en el límite entre el palio dorsal y ventral ("*lateral palial subpalial boundary*"), y secreta antagonistas de Wnt como sFRP2 (proteína secretada relacionada con frizzled 2) [O'Leary y Sahara, 2008; Borello y Pierani, 2010] (Figura 3).

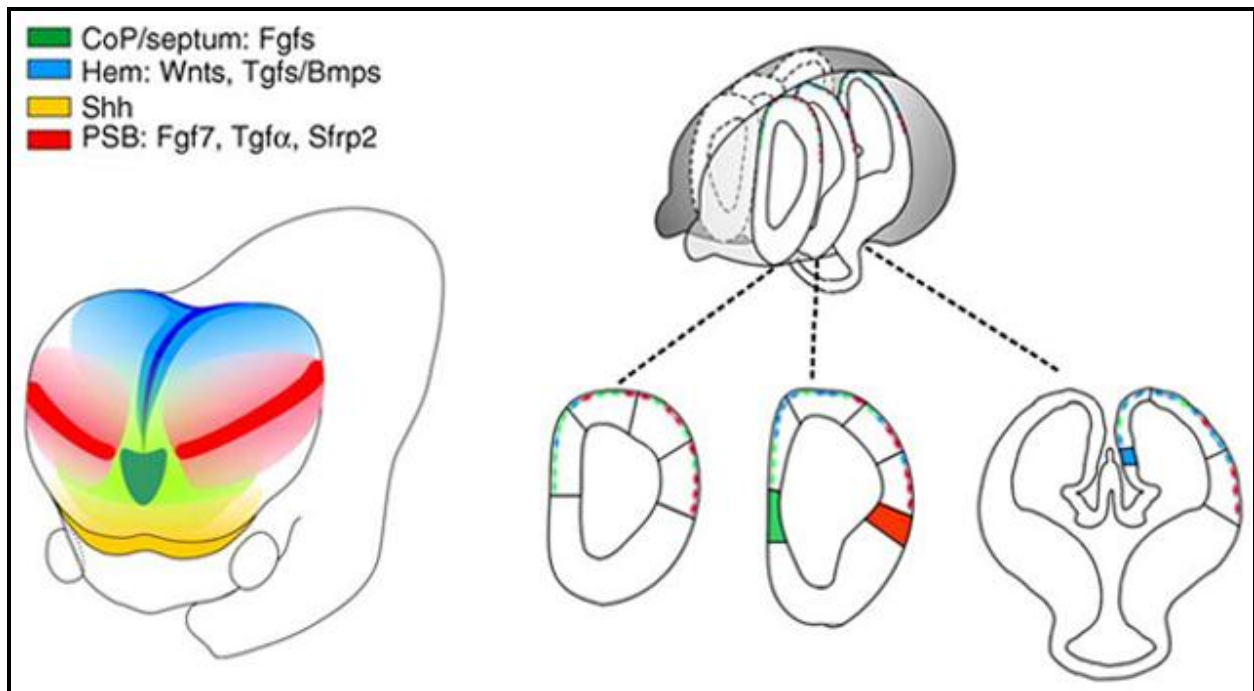


Figura 3. Principales centros de señalización en el telencéfalo. Múltiples centros de señalización u “organizadores” están involucrados en la inducción y modelamiento de los territorios telencefálicos tempranos (E8.5-E12.5). Fgfs (Fgf8, Fgf15, Fgf17, Fgf18) son expresados en dominios de la placa comisural y septum. Wnts y Bmps se localizan en la línea media dorso/caudal en la placa tectal dorsal y hem cortical. Shh es expresado en el telencéfalo ventral además de la placa precordial. La frontera pallial–subpallial (PSB o anti-hem) se localiza en el borde lateral del palio y expresa Fgf7, Sfrp2 y Tgfa. Borello y Pierani, 2010.

El código combinatorio de tales señales posicionales resulta en la expresión graduada de genes, que especifican compartimentos tipo cuadrícula en el neuroepitelio proliferativo telencefálico [Borello y Pierani, 2010]. De este modo la parte dorsal (palio) y ventral (subpalio) del telencéfalo son especificadas por distintos factores de transcripción (FT) conservados evolutivamente y restringidos regionalmente, con funciones importantes para proliferación de progenitores neurales, diferenciación y adquisición de distintos destinos celulares [Sur y Rubenstein, 2005].

Durante el desarrollo, el primordio de la neocorteza prospectiva está marcado en la etapa de E9.5 por la expresión de Pax6, mientras que la región prospectiva de los ganglios basales (eminencia ganglionar medial y lateral) se caracteriza por la expresión de Gsh2 y Nkx2.1 [Rallu y cols., 2002] (Figura 4). Estos genes pertenecen a dos clases diferentes de FT que reprimen de manera recíproca su expresión, estableciendo así un límite claro entre los dominios pallial y subpallial de progenitores (llamado también frontera cortico-estriatal). Dos FT de la familia bHLH, Ngn2 y Mash1 muestran un

patrón de expresión similar, restringida a los progenitores presentes en la zona ventricular (VZ) del palio y subpalio, respectivamente. Cabe destacar que el FT Ngn2 se actúa como un blanco río abajo de Pax6, capaz de reprimir y restringir la expresión regionalizada de Mash1 al subpalio [Fode y cols., 2000]. Por lo tanto, Pax6 juega un papel crucial en la regulación del establecimiento de la frontera cortico-estriatal, incluso antes del inicio de la neurogénesis en el telencéfalo en desarrollo (Figura 4).

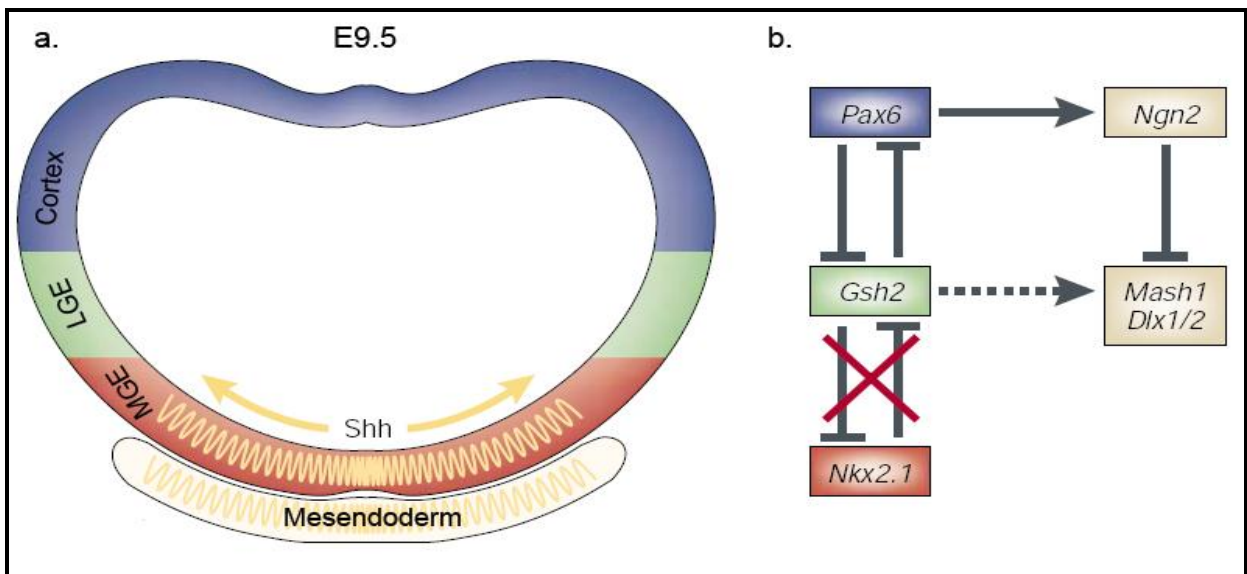


Figura 4. Esquema de una sección coronal telencefálica de ratón en día embrionario 9.5 y la compartimentalización del neuroepitelio. A lo largo del eje dorso-ventral, el telencéfalo está subdividido en la corteza (palio) y ganglios basales (subpalio), compuesto de las eminencias ganglionares lateral y media (LGE, MGE) (a). Los compartimentos del neuroepitelio son especificados por la expresión restringida de factores de transcripción (FTs), que reprimen recíprocamente su expresión, y las de otros genes para establecer de manera cooperativa el límite palial-subpalial. Se muestra el patrón de expresión de los factores de transcripción Nkx2.1, Gsh2 and Pax6. Se incluyen las fuentes telencefálicas ventrales y mesodérmicas de Shh (sonic hedgehog). Pax6 y Gsh2 actúan reprimiendo su expresión de manera recíproca. Al mismo tiempo, Pax6 regula la función de los factores de transcripción Ngn2, el que a su vez regula la función de los genes *Mash1* y *Dlx1/Dlx2* (b). Rallu y Fishell, 2002.

1.1.3. Origen de las neuronas corticales

En todos los vertebrados, el telencéfalo en desarrollo está subdividido en territorio dorsal (pallio) y ventral (subpallio) (Figura 5). En los mamíferos, el telencéfalo dorsal puede ser dividido en dos regiones principales: una región antero-lateral que origina la neocorteza, y un área postero-medial que desarrolla el hipocampo, el hemi cortical y el plexo coroideo. Durante el desarrollo embrionario, los progenitores neurales presentes en el pallio generan primariamente neuronas piramidales o de proyección. Éstas, constituyen el 75-85% de la población neuronal total en diversas especies de mamíferos. Se caracterizan por sus árboles dendríticos que presentan dos dominios distintos (apicales y basales), y por la forma piramidal de su soma. Las neuronas de proyección son excitatorias y utilizan glutamato como su principal neurotransmisor. Ellas proyectan una única dendrita apical hacia la superficie pial desde el apex del soma y varias dendritas de la base de éste. Estas células extienden sus proyecciones axonales hacia blancos intracorticales (dentro de la corteza, a través del cuerpo calloso), subcorticales (estriado, tálamo) y subcerebrales (tronco cerebral, médula espinal) [Spruston, 2008].

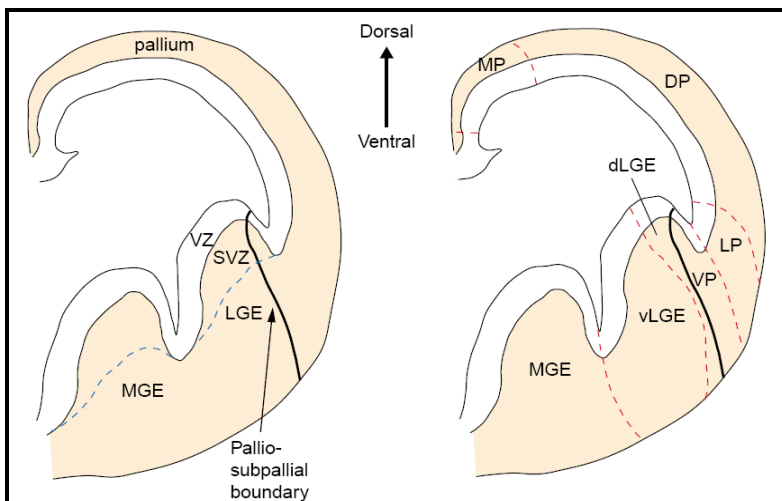


Figura 5. Representación esquemática de los territorios y estructuras en los que se divide el telencéfalo de ratón en día embrionario 12.5 (E12.5). Se muestran estructuras morfológicamente definidas y los subdominios de progenitores neurales. DP, pallio dorsal; LGE, eminencia ganglionar lateral; LP, pallio lateral; MGE, eminencia ganglionar media; MP, pallio medio; SVZ, zona subventricular; VP, pallio ventral; VZ, zona ventricular. Campbell, 2003.

El telencéfalo ventral (subpalio) está conformado por la eminencia ganglionar media (MGE), la lateral (LGE), y la caudal (CGE) [Campbell, 2003]. Estas regiones contribuyen con interneuronas GABAérgicas inhibitorias (15-25% de la población neuronal total), que establecen conexiones locales, y constituyen poblaciones discretas en los ganglios basales, y en estructuras límbicas asociadas, incluyendo amígdala y el núcleo acumbens. La MGE produce subclases de interneuronas que expresan somatostatina, parvalbúmina, (así como también una población que expresa neuropéptido-Y) que residen en los ganglios basales y la corteza. La CGE produce principalmente interneuronas que expresan calretinina o péptido vasoactivo intestinal. Por otra parte, la LGE produce una población de interneuronas que residen en el bulbo olfatorio así como en regiones ventrales que incluyen el estriado y áreas límbicas [Wonders y Anderson, 2006].

Para una mayor claridad, las neuronas de proyección (neuronas corticales piramidales) recibirán una atención especial en las secciones posteriores, ya que esta tesis tuvo como objetivo el estudio de la generación de estas células.

1.2. Neurogénesis en la neocorteza de mamíferos

1.2.1. Heterogeneidad celular cortical

La mayoría de las células neuronales y gliales de la neocorteza emergen de una zona proliferativa que rodea el lumen del tubo neural, la zona ventricular (VZ, ventricular zone), y zona subventricular (SVZ, subventricular zone).

En el modelo murino, todas las neuronas de la corteza son generadas entre el día embrionario 11 (E11) y E18, alcanzado un máximo de actividad neurogénica en E14.5.

Después del inicio de la neurogénesis cortical, las glías radiales localizadas en la VZ generan secuencialmente neuronas y progenitores basales (intermedios), astrocitos y oligodendrocitos, de acuerdo a un programa intrínseco recapitulado aún en cultivos primarios corticales in vitro [Qian y cols., 2000]. Los tres tipos celulares se producen en un patrón temporalmente distinto, aunque superpuesto [Sauvageot y cols., 2002]. Poco antes del nacimiento (E18.5-E19.5), las glías radiales se transforman en astrocitos. Los oligodendrocitos son generados en dos oleadas. Durante el desarrollo (alrededor de

E13.5), progenitores en la eminencia ganglionar media comienzan a generar oligodendrocitos que migran tangencialmente hacia la corteza. Adicionalmente, comenzando en día postnatal 1 (P1), los progenitores localizados en la SVZ producen oligodendrocitos con un máximo alrededor de P14 [Miyata y cols., 2010].

1.2.2. Progenitores neurales

1.2.2.1. Células neuroepiteliales y glias radiales

El gran número de células neuronales y gliales que componen la corteza de los mamíferos derivan de una monocapa pseudo estratificada que consiste de progenitores neuroepiteliales (NP) que residen en la pared ventricular del tubo neural luego de su cierre. Antes del comienzo de la neurogénesis (E8-E10), los NP llevan a cabo varias rondas de divisiones celulares simétricas que expanden la cantidad inicial de progenitores multipotentes [Gotz y Huttner, 2005; Guillemot y cols., 2006]. La primera mitad de la histogénesis cortical es marcada así por divisiones celulares proliferativas que producen una expansión tangencial de la superficie ventricular [Fietz y Huttner, 2011], mientras que las divisiones neurogénicas expanden radialmente el espesor de la corteza [Rakic, 1972]. En estas etapas tempranas sólo una pequeña porción de NP se divide asimétricamente para generar las primeras neuronas que forman la preplaca (PP). Después de iniciarse la generación de neuronas de la placa cortical, ellas se intercalan en la PP y la subdividen en la zona marginal (marginal zone, MZ), constituida por interneuronas y células Cajal-Retzius, y la subplaca, localizada bajo la placa cortical.

Las células Cajal-Retzius (CR) son las neuronas primeramente generadas, secretan Reelina, una proteína de la matriz extracelular que juega un rol fundamental para la formación de las capas corticales durante el desarrollo y su mantención en la adultez [Frotscher y cols., 2009]. Las neuronas CR emergen de lugares restringidos en los límites del palio, el hem, el anti hem y el septum.

Al comienzo de la neurogénesis, los NP comienzan a expresar marcadores gliales transformándose en células gliales radiales (RGC). Junto con los NP y los

precursores neurales cortos (SNP) constituyen el tipo de progenitores denominados apicales (AP). Aunque difieren en ciertos aspectos moleculares y celulares, todos estos tipos celulares comparten características de células epiteliales, incluyendo polaridad apico-basal, complejos de unión apicales y morfología bipolar radial (la presencia de procesos apicales y basales alargados). En los tres tipos de AP, los procesos contactan el lumen ventricular (“*apical end foot*”). Por el contrario, sólo los procesos basales (“*basal end foot*”) de las células neuroepiteliales y glias radiales, se extienden en toda su dimensión cortical hasta alcanzar la superficie pial (lámina basal) [Noctor y cols., 2002; Hartfuss y cols., 2003; Gal y cols., 2006]. Una característica importante de los APs es que ellos llevan a cabo migración nuclear interkinética (“*interkinetic nuclear migration*”, INM), en la cual, el núcleo se mueve a lo largo del eje celular apico-basal conjuntamente con el ciclo celular. La dispersión nuclear de los APs que resulta de la INM es la responsable de la apariencia pseudoestratificada de la capa de células progenitoras que es conocida como zona ventricular (Figura 6) [Boulder Committee, 1970; Salomoni y Calegari, 2010]. Esta organización parece ocurrir en vertebrados como un sistema para maximizar el número de precursores por área de superficie ventricular (se compactan las células en formas alargadas al tiempo que distribuyen sus núcleos voluminosos). Durante la fase G1 el núcleo está localizado a lo largo de la VZ. Progresivamente, se mueve hacia la superficie basal de la VZ donde replica su DNA (fase S). Durante G2, el núcleo retorna a la superficie apical (ventricular) de la VZ, y cuando la alcanza, la célula entra en mitosis (fase M) y la glia radial se divide.

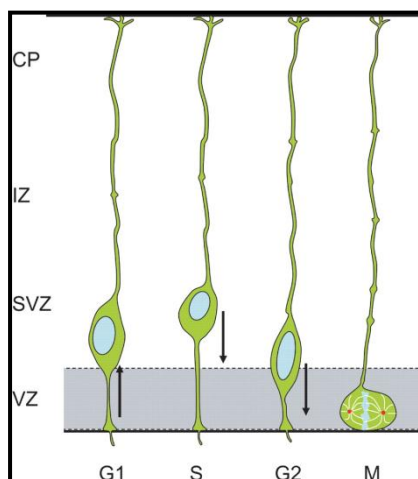


Figura 6. Migración nuclear interkinética y pseudoestratificación. Los progenitores apicales (APs) llevan a cabo migración nuclear interkinética, en la cual el núcleo se mueve a lo largo del eje apico-basal de la célula en concordancia con el ciclo celular. La dispersión resultante de los núcleos de los APs es responsable de la apariencia pseudoestratificada de la zona ventricular (VZ). Vallee y Tsai, 2006.

Las RGC y NP comparten la expresión de Nestina, perteneciente a la familia de proteínas de los filamentos intermedios, así como de RC2 y el factor de transcripción *Pax6*. Sin embargo, las RGC expresan adicionalmente marcadores astrogliales tales como la proteína acidíca fibrilar glial (GFAP), el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), vimentina y la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP) [Noctor y cols., 2004; Götz y Huttner 2005; Pinto y Gotz, 2007].

Debido a sus características gliales y al hecho de que ellas son capaces de transformarse en astrocitos alrededor del nacimiento, se propuso originalmente, que las RGCs eran progenitores sólo del linaje glial. Actualmente, la evidencia indica que ellas son progenitores multipotentes, originando neuronas, astrocitos y oligodendrocitos sucesivamente durante el desarrollo cerebral. Sin embargo, análisis de trazamiento de linajes in vitro e in vivo han revelado que la mayoría de las RGCs están restringidas a la generación de neuronas o células gliales, indicando que las RGCs neurogénicas y gliogénicas representan poblaciones temporalmente distintas durante el desarrollo.

Al inicio de la corticogénesis, las RGCs comprenden la población progenitora predominante dentro de la VZ. Estudios de imagen han mostrado que para producir neuronas, las RGCs llevan a cabo tres tipos diferentes de divisiones [Noctor y cols., 2004; Marín y Kriegstein, 2009] (Figura 7). Divisiones simétricas que dan origen a dos células idénticas, correspondiendo ambas a RGCs (auto renovación); divisiones asimétricas que generan una RGC y una neurona post mitótica (modo directo de neurogénesis), y divisiones asimétricas que generan una RGC y un tipo adicional de progenitores, como precursores neuronales cortos (SNP) o progenitores intermedios (IP), denominados también como progenitores basales.

Los SNP son progenitores neuronales que poseen un proceso basal corto (que no alcanza la lámina basal), se localizan en la VZ y SVZ, se dividen en la superficie apical de la VZ y se identifican molecularmente por la actividad del promotor de $\alpha 1$ -tubulina (células pT $\alpha 1^+$) [Gal y cols., 2006].

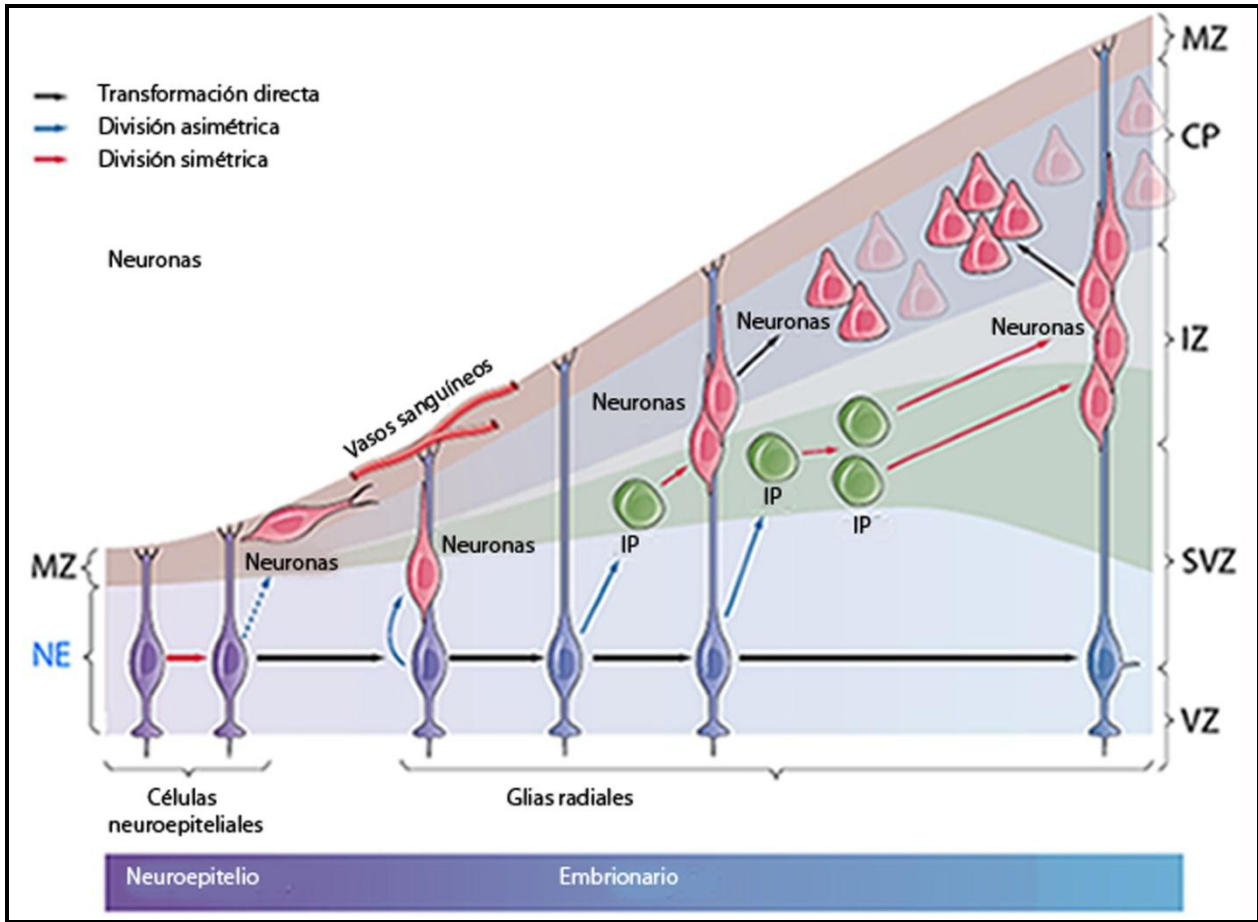


Figura 7. Tres modos de divisiones celulares durante el desarrollo cortical. Las glia radiales en la corteza generan neuronas directamente a través de divisiones asimétricas; indirectamente por la generación de progenitores intermedios (IPs) y una ronda de amplificación; o indirectamente a través de IPs, pero con dos rondas de divisiones y amplificación adicional. MZ, zona marginal; CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular; NE, neuroepitelio; RG, glia radial; nIPC, progenitor intermedio neurogénico. Adaptado de Marín y Kriegstein, 2009.

1.2.2.2. Progenitores intermedios o basales

Los IP constituyen el otro grupo grande de progenitores neurales. Son células de amplificación que llevan a cabo mitosis en el lado basal de la VZ para generar neuronas (mediante un modo indirecto de neurogénesis). Después de E13.5 en el embrión de ratón, su acumulación histológica forma la segunda zona proliferativa, la zona subventricular (SVZ) [Götz y Sommer, 2005].

A nivel molecular, los IP se pueden diferenciar de las glías radiales por la expresión de los factores de transcripción Tbr2 [Englund y cols., 2005], el transcrito 1 de expresión subventricular (Svet1) y Cux2 (“*cut-like 2*”) [Nieto y cols., 2004; Zimmer y cols., 2004]. A diferencia de las glías radiales (RGC), los IP no expresan *Pax6* ni miembros de la familia de factores de transcripción pro proliferativa Hes [Englund y cols., 2005; Capello y cols., 2006]. Los IP no exhiben migración nuclear interkinética, pues carecen de polaridad apico-basal; se cree que esto restringe a los IPs al modo de división simétrico y podría explicar por qué tales divisiones pueden ocurrir con un plano de clivaje aleatorio [Attardo y cols., 2008].

Utilizando ratones transgénicos (“*knock-in*”) que expresan proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de Tis21, se demostró que la mayor parte de los IP son exclusivamente neurogénicos a través de la generación de dos células hijas neuronales; mientras que una fracción más pequeña de ellos lleva a cabo una a tres rondas de divisiones proliferativas en la SVZ para producir dos células IPs hijas, las que subsecuentemente darán origen a dos neuronas (Figura 10) [Haubensak y cols., 2004; Noctor y cols., 2004]. De esta manera, los IP amplifican la producción de diferentes subtipos neuronales después de las divisiones asimétricas de las RGC en una etapa del desarrollo determinada (neurogénesis indirecta). Cabe destacar, que la proporción de IP y por consiguiente la SVZ, se hace muy grande en la corteza cerebral de los primates. En la medianía de la neurogénesis, aquella zona contiene más del 90% de la reserva de progenitores [Rakic, 2002].

Las hipótesis relacionadas al rol de los progenitores intermedios y el significado de tener dos vías distintas para la neurogénesis cortical sostienen la idea de que rutas indirectas podrían proporcionar un mecanismo para incrementar el número de

neuronas generadas a partir de una glia radial única, contribuyendo así, a la expansión lateral de la corteza cerebral [Kriegstein y cols., 2006; Martínez-Cerdeño y cols., 2006].

La tendencia durante la corticogénesis es amplificar la producción neuronal por un incremento en la proporción de neuronas generadas por célula progenitora neural, y no por un incremento en la frecuencia de divisiones diferenciativas [Polleux y cols., 1997].

Además, la desaceleración en la producción de neuronas durante las fases más tardías de la corticogénesis no se debe al enlentecimiento en la progresión del ciclo celular sino que refleja el consumo del acúmulo de progenitores [Dehay y Kennedy, 2007]. Por lo tanto, ha sido propuesto un modelo neurogénico de dos pasos: en el primer paso, las divisiones asimétricas por parte de las glias radiales generan diversidad neuronal; en el segundo paso, divisiones simétricas llevadas a cabo por progenitores intermedios producen gran cantidad de neuronas de algunos subtipos.

Se han observado cambios temporalmente ordenados en patrones de expresión de genes en RGC y en su progenie durante las etapas de la formación cortical. Las RGC e IP establecen el compromiso neurogénico durante la fase G1 [Haubensak y cols., 2004] y los destinos laminares son seleccionados alrededor de la transición S/G2 [McConnell y cols., 1991]. La división asimétrica de las RGC permite a los genes relacionados con el control de la identidad celular, ser heredados diferencialmente en los progenitores basales generados en diferentes ciclos celulares. La división simétrica de los IP producida en un ciclo celular dado permite una herencia estable de genes de identidad celular por ambas células de su progenie, produciendo gran número de neuronas de un subtipo similar apropiado para una etapa del desarrollo específica, pero diferente de aquellos producidos por progenitores intermedios que fueron generados en ciclos celulares previos o subsecuentes.

Un gran número de factores de transcripción regulan la elección entre proliferación y diferenciación, inhibiendo o promoviendo la salida del ciclo celular. En particular, *Emx2* y *Tlx* favorecen la proliferación de progenitores, *Pax6* promueve la mantención de la reserva de progenitores [Quinn y cols., 2007]. Los genes proneurales (*Ngn1* y *Ngn2*) promueven el compromiso neuronal, mientras que componentes de la familia *Hes* son inhibidores importantes de la neurogénesis. Las RGCs se mantienen en estado proliferativo por la acción simultánea de diferentes genes (tales como *Emx2*,

Hes1, Hes5). La transición directa de RGC a neurona post mitótica es regulada por los genes *Ngn1* y *Hes5* y se correlaciona con disminución en la expresión del marcador *Pax6* y aumento en la expresión de los marcadores neuronales post mitóticos *Tbr1*, *Math2* y *NeuroD2* [Englund y cols., 2005].

En el caso de la neurogénesis indirecta, la transición de glia radial a progenitor intermedio involucra el aumento en la expresión de *Tbr2* y disminución de *Pax6* [Englund y cols., 2005]. La transición subsecuente de IP a neurona se correlaciona con la disminución de *Tbr2* y aumento en *Tbr1*, *Math2*, *NeuroD2*, y *NeuroD* (todos son expresados al menos de manera transitoria por las neuronas corticales de proyección recién generadas). Así, la siguiente secuencia de factores de transcripción *Pax6-Tbr2-Tbr1* puede ser establecida en la transición de RGC-IP-neurona post mitótica [Englund y cols., 2005].

En ratones *Pax6*^{-/-}, las RGC presentan defectos en sus ciclos mitótico, fenotipo y morfología [Götz y cols., 1998]. Además, se puede distinguir la pérdida de células *Tbr2*⁺, correspondiente a IP, indicando que *Pax6* es necesario para la activación de la expresión de *Tbr2* [Quinn y cols., 2007]. La expresión de *Pax6* en los progenitores corticales determina también la expresión del gen pro neural *Ngn2*, proporcionando evidencia de un vínculo regulatorio directo entre el establecimiento del patrón neural y la neurogénesis [Scardigli y cols., 2003].

1.3. Migración neuronal

Durante el desarrollo del telencéfalo mamífero, las células se mueven a través de diversas vías para alcanzar sus posiciones finales. Las neuronas de proyección de la corteza cerebral en desarrollo son generadas en la capas proliferativas (VZ, SVZ) y subsecuentemente se mueven hacia la placa cortical en desarrollo mediante migración radial. Por el contrario, la gran mayoría de las interneuronas inhibitorias se originan en el telencéfalo ventral (casi por completo, en el caso de los roedores), e invaden la corteza mediante migración tangencial.

1.3.1. Migración radial

Una vez que las neuronas de proyección han sido generadas en las zonas proliferativas telencefálicas, ellas migran radialmente hacia la corteza cerebral en desarrollo, estableciéndose de acuerdo al modelo “*inside-out*”. Esto significa que cada neurona post mitótica tiene que migrar hacia la superficie pial, pasar a través de sus predecesores y entonces detenerse, llevar a cabo la diferenciación terminal y establecer sus conexiones sinápticas (Figura 8). Así, las neuronas generadas tempranamente ocupan las posiciones más profundas dentro de la corteza, mientras que las células que emergen más tarde migran a través de sus antecesores, para ocupar las posiciones más superficiales. Por lo tanto, en la corteza madura, las neuronas de la capa VI se generan primero y las de la capa II/III nacen al final. Las neuronas corticales que migran radialmente a la placa cortical lo hacen principalmente a través de uno de los dos modos posibles: translocación somal o locomoción [Nadarajah y cols., 2001; Bielas y cols., 2004].

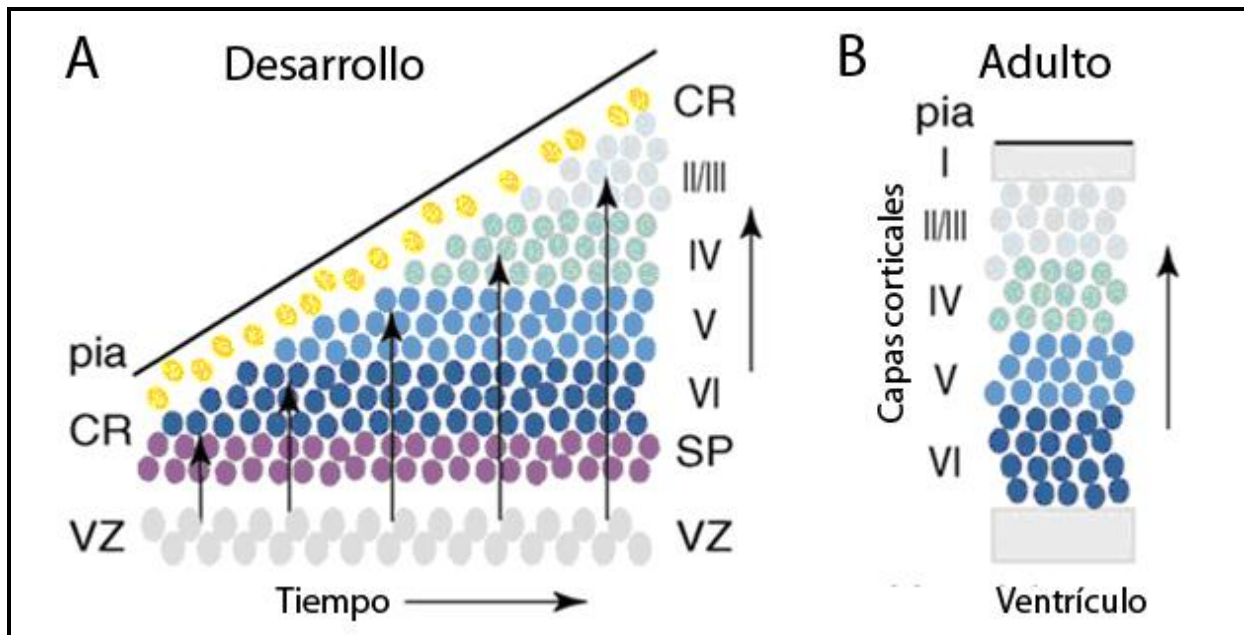


Figura 8. Esquema que ilustra como los progenitores producen neuronas de acuerdo al modelo "inside-out". La placa cortical, la cual origina la neocorteza definitiva constituida por seis capas, se forma de acuerdo al gradiente migratorio "inside-out", donde las neuronas generadas en etapas tardías pasan a través de las neuronas generadas durante las etapas tempranas para posicionarse en la parte alta de la placa cortical formando las capas más externas (a). La neocorteza normal está dividida en capas, desde la I a la VI, numeradas desde el exterior (superficie pial) hacia el interior (superficie ventricular) (b). VZ, zona subventricular; CR, neuronas Cajal-Retzius; SP, subplaca. Adaptado de Cooper, 2008.

1.3.1.1. Translocación somal

La translocación somal es más rápida que la locomoción (60 $\mu\text{m}/\text{h}$ vs 35 $\mu\text{m}/\text{h}$). El proceso guía ("*leading process*") o proceso basal, se extiende a la zona marginal y contacta con la superficie pial. Dicho proceso es altamente ramificado y parece estar anclado a la membrana basal o a la matriz extracelular en la zona marginal. El proceso guía se acorta a medida que el soma se mueve hacia arriba rápidamente. Este es un proceso que no está asociado a la glia radial. Sobre la base de imágenes en tiempo real, la translocación somal parece ser un proceso de nucleokinesis, en el cual el proceso guía se extiende radialmente desde la VZ hacia la superficie pial, seguido por nucleokinesis junto con una reorganización rápida de microtúbulos, que resulta en el acortamiento de tal proceso, sin extensión de procesos adicionales. Miyata y colaboradores (2001) mostraron que las neuronas corticales generadas

tempranamente (a partir de glias radiales), que se presume llevan a cabo translocación somal, heredan el proceso basal que está conectado con la superficie pial, y pueden por lo tanto comenzar a translocar inmediatamente después de convertirse en neuronas post mitóticas (Figura 9a). Alternativamente, una neurona recién generada podría extender un proceso radial a la pia antes de comenzar a translocar.

La translocación somal ha sido propuesta como el modo principal de migración durante las etapas más tempranas del desarrollo cortical (E11-E13). Esto implica que las neuronas de la preplaca o neuronas de las capas profundas comienzan la migración desde la VZ con un proceso guía adherido a la superficie pial. Esto puede ocurrir en etapas tempranas del desarrollo cortical cuando la longitud del proceso guía de una neurona en migración se aproxima al ancho del manto cortical en desarrollo [Kriegstein y Noctor, 2004].

1.3.1.2. Locomoción

Más tarde en la corticogénesis (E14-E18), la preplaca se ha dividido y la placa cortical se expande rápidamente. En esta etapa, el proceso de locomoción predomina; sin embargo, el proceso de translocación somal continúa en la mitad superior de la neocorteza. Como la pared cerebral se ha ampliado, las neuronas no pueden translocar a través de la extensión completa de la neocorteza. En lugar de ello, las neuronas usan inicialmente la fibra orientada radialmente de la glia como soporte para moverse por locomoción (migración gliofílica). Luego, cambian a translocación nuclear cuando ellas han recorrido la neocorteza lo suficiente para anclar sus procesos guías a la superficie pial [Nadarajah y cols., 2001; Nadarajah y Parnavelas 2002; Noctor y cols., 2004].

A diferencia de la translocación somal, el proceso de locomoción es saltatorio, con arranques cortos de movimiento hacia adelante intercalados con fases estacionarias, resultando en una velocidad promedio más baja que en la translocación somal. La célula se mueve por repetidos ciclos de eventos celulares en los que se extiende el proceso guía (longitud constante), el núcleo se mueve hacia adelante, se retrae la parte trasera y entonces se repite el ciclo. La adhesión a la glia radial, involucra integrinas o uniones comunicantes. De hecho, heterodímeros de integrina $\alpha\beta 1$ son expresados específicamente por neuronas migratorias y la pérdida del gen de

la integrina- $\alpha 3$ resulta en una dinámica aberrante del citoesqueleto y retraso en la migración radial en la corteza temprana.

A pesar de su función como canal para comunicación célula-célula, la evidencia indica que proteínas de uniones estrechas de la familia de las conexinas participan en la mediación de las interacciones adhesivas dinámicas entre neuronas migratorias y glías radiales [Fushiki y cols., 2003; Elias y cols., 2007; Cooper 2008] (Figura 9b).

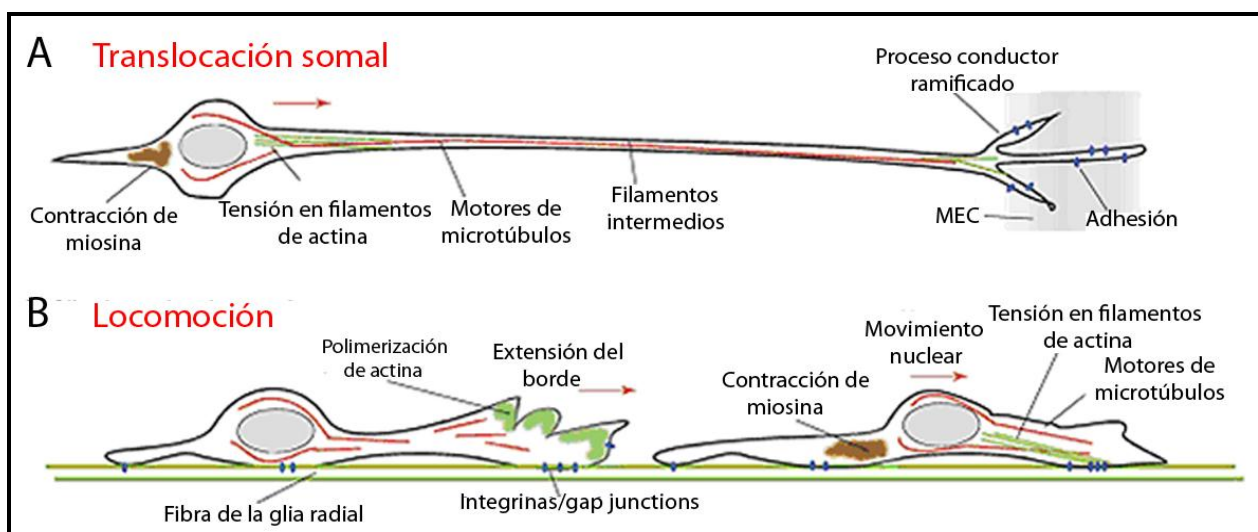


Figura 9. Esquema que muestra los dos modos de migración radial en la corteza en desarrollo. Las neuronas que emergen desde las zonas proliferativas del telencéfalo dorsal realizan dos tipos principales de migración radial. **A)** translocación somal, en la que las neuronas mueven sus somas a través de sus propios procesos orientados radialmente y **B)** locomoción, en la que las neuronas utilizan la fibra glial orientada radialmente como soporte migratorio para alcanzar la placa cortical. MEC, matriz extracelular. Adaptado de Cooper, 2008

1.3.1.3. Patrones de migración radial: distintos modos de locomoción

Las neuronas migratorias están altamente polarizadas en la dirección del movimiento. Esto se logra mediante la generación, mantención, y remodelamiento de un proceso guía que marca la dirección seguida por la célula. Los procesos guías están cubiertos por estructuras que son similares a los conos de crecimiento axonales, y tal como ellos se piensa que poseen un rol importante en la detección del microambiente circundante y de ese modo contribuir a la guía de las neuronas.

Estudios recientes usando imágenes en tiempo real de secciones cerebrales en cultivo han demostrado que las neuronas generadas en las zonas proliferativas del telencéfalo dorsal en etapas tardías del desarrollo experimentan una serie de fases migratorias. Estas se caracterizan por cambios abruptos en la forma celular, dirección del movimiento, y velocidad de migración a medida que se desplazan hacia la placa cortical [Noctor y cols., 2004]. Estas observaciones han conducido a un esquema que divide la migración radial en cuatro fases distintas (Figura 10). En la fase uno, las neuronas generadas en la superficie ventricular se mueven radialmente lejos del ventrículo hacia la SVZ (zona subventricular). En la fase dos, ellas se detienen en la interfase entre la IZ (zona intermedia) y la SVZ durante 24 horas y se convierten en multipolares. Imágenes de tiempo real de las células en fase dos demostraron que células multipolares son altamente dinámicas, extendiendo y retrayendo procesos, y moviéndose dentro de la SVZ. En esta etapa, las neuronas no parecen estar adheridas a la fibra de la glia radial, y son capaces de moverse tangencialmente. Debido a que esta modalidad migratoria difiere claramente de los modos migratorios anteriormente descritos, algunos autores se refieren a esta fase migratoria como un nuevo tipo de migración, “migración multipolar” [Tabata y Nakajima, 2003].

Muchas neuronas, aunque no todas, pasan a una tercera fase. En ésta, ellas extienden un proceso hacia el ventrículo y a menudo también translocan el cuerpo celular en la misma dirección. Al llegar al ventrículo, las neuronas entran en la fase cuatro de la migración. Las neuronas revierten su polaridad y extienden un proceso guía orientado hacia la pía, adoptan la morfología bipolar de las neuronas migratorias, y comienzan la migración radial a la placa cortical [Noctor y cols., 2004]. Esta fase es gliofílica y las neuronas asumen las características de una neurona que se mueve por locomoción. Algunas neuronas, comienzan su proceso migratorio radial luego de una pausa en la SVZ pero sin movimiento retrógrado hacia el ventrículo. De acuerdo al esquema propuesto para las fases migratorias, estas neuronas no pasan a la fase tres, en lugar de ello, avanzan directamente de la fase dos a la cuatro (Figura 10). Esto indica que subconjuntos de neuronas de proyección llevan a cabo distintas rutas de migración a la placa cortical.

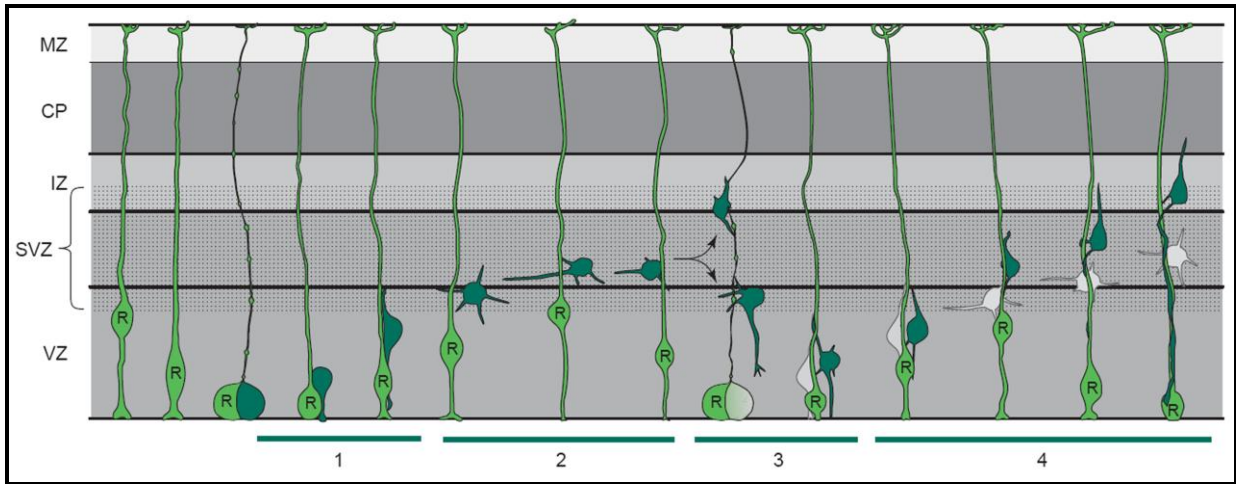


Figura 10. Esquema que representa las distintas fases morfológicas del proceso migratorio de las neuronas piramidales. La fase uno involucra el movimiento radial de la neurona piramidal (verde oscuro) desde el sitio de origen en la superficie ventricular a la zona subventricular (SVZ). En la fase dos, ellas adquieren la morfología multipolar y detienen su migración en la parte baja de la zona intermedia (IZ) y la zona subventricular (SVZ). Algunas neuronas se mueven hacia el ventrículo (fase tres). La fase cuatro es la migración radial final hacia la placa cortical (CP) guiada por la fibra de la glia radial. MZ, zona marginal; R, glia radial; VZ, zona ventricular. Kriegstein y Noctor, 2004.

1.3.2. Migración tangencial

Las interneuronas gabaérgicas y algunos oligodendrocitos corticales son generados a partir de progenitores en el subpallio y alcanzan la corteza cerebral migrando tangencialmente a través de trayectorias que son paralelas a la superficie ventricular, y ortogonales a la fibra de la glia radial. Se han identificado dos rutas tangenciales: (1) desde la eminencia ganglionar media (MGE) a la neocorteza e hipocampo, y (2) desde la eminencia ganglionar lateral (LGE) hacia el bulbo olfativo [Kriegstein y Noctor, 2004; Marin y Rubenstein, 2001]. Esta última ruta migratoria persiste en la adultez y se denomina corriente migratoria rostral (“*rostral migratory stream*”, RMS) (Figura 11).

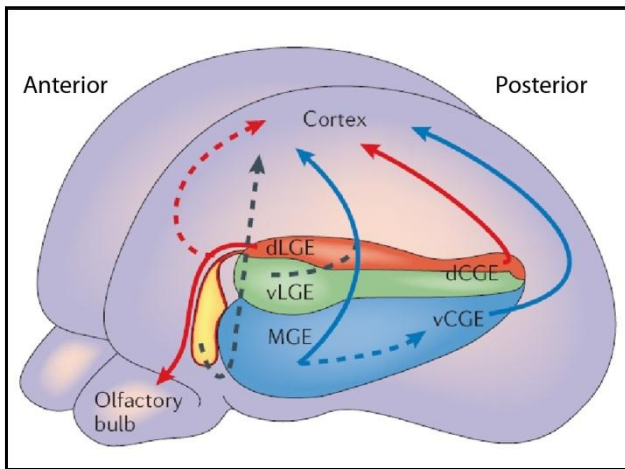


Figura 11. Rutas migratorias de los subgrupos de interneuronas corticales desde el telencéfalo ventral. Ilustración que muestra las rutas establecidas (flechas continuas) y propuestas (línea discontinua) de la migración de las interneuronas corticales. Wonders y Anderson, 2006

Las trayectorias migratorias que desarrollan las interneuronas son temporal y espacialmente distintas. En etapas embrionarias tempranas, las interneuronas que se originan de la MGE migran centralmente, pasando a través del estriado en desarrollo, para entrar en la zona marginal y subplaca cortical. En la mitad del desarrollo embrionario (E12.5-E14.5 en ratón), las interneuronas provenientes de la MGE evaden el manto estriatal e invaden la zona subventricular (SVZ), la zona intermedia (IZ) y la subplaca. Finalmente, en etapas tardías, tanto la LGE y la MGE contribuyen a la generación de interneuronas corticales. Un gran número de factores de transcripción han sido identificados tanto para el control de la diferenciación de las interneuronas subpaliales (Dlx1, Dlx2, y Mash1) o para regular la regionalización del subpalio (Nkx2.1, Pax6, y Gsh2). La comprensión del origen de las diversas rutas de la migración tangencial se ha facilitado mediante el análisis de las alteraciones de los patrones de migración en los ratones mutantes desprovistos de estos factores de transcripción [Marin y Rubenstein, 2001].

1.4. Organización de la corteza cerebral de mamíferos

1.4.1. Laminación y especificación de subclases neuronales

Las neuronas de la neocorteza están organizadas en seis capas y son generadas en un orden temporal específico. Uno de los aspectos más interesantes de la corticogénesis es la estrecha correlación entre identidad laminar y la temporalidad de aparición de las neuronas, que se determina en las células progenitoras durante su ciclo mitótico final.

La VZ parece utilizar señales temporales para producir secuencialmente diferentes subclases de neuronas, más que generar simultáneamente múltiples conjuntos de progenitores que a su vez den origen a tipos celulares particulares. Estudios que examinan el origen de distintos subtipos neuronales indican que poblaciones neuronales específicas emergen en tiempos muy precisos durante el desarrollo, presumiblemente en respuesta a cambios en determinantes temporales. La primera evidencia de que el tiempo de aparición era un predictor del destino neuronal en la corteza cerebral proviene de estudios con [³H]-timidina en ratones, los que revelaron que la administración de una inyección de timidina tritiada en distintos tiempos durante la neurogénesis resultó en el marcaje neuronal dentro de una lámina cortical particular.

Así, los progenitores tempranos (en ratón entre E10 y E14) generan las neuronas de las capas inferiores VI y V, mientras que los progenitores presentes en E14.5 producen exclusivamente neuronas de las capas supragranulares corticales IV, III, II [Guillemot y cols., 2006] (Figura 12).

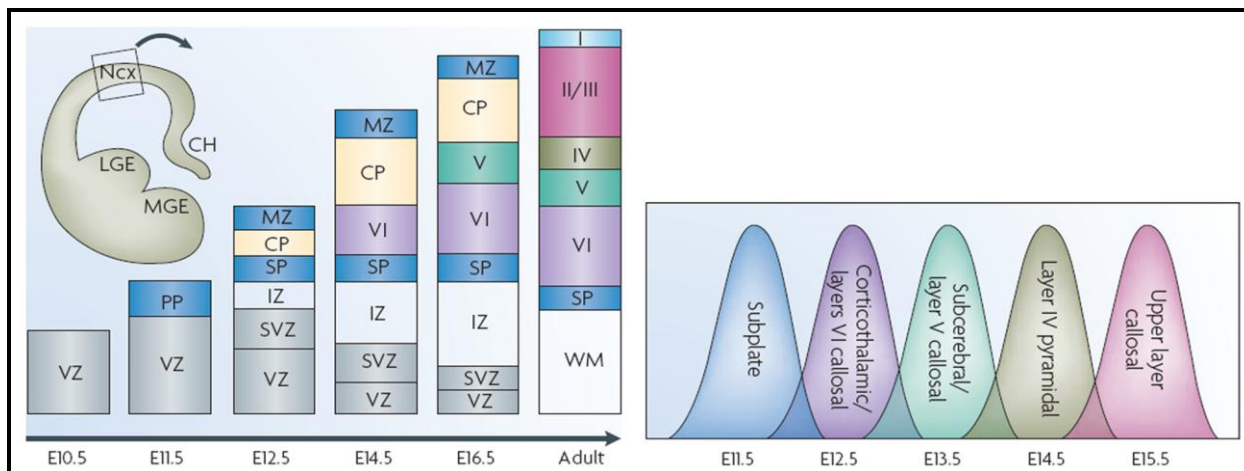


Figura 12. Generación de los subtipos de neuronas de proyección en la VZ/SVZ. Los progenitores residentes en la VZ y SVZ dan origen a las neuronas piramidales de las diferentes capas neocorticales en un orden temporal estrechamente controlado desde el día embrionario (E) 10.5 al E17.5 en el ratón. Molyneaux y cols., 2007.

El patrón de extensión axonal de las neuronas de proyección es específico de cada capa. Las capas II y III contienen neuronas que forman conexiones cortico-corticales, incluyendo la proyección hacia el hemisferio contralateral a través del cuerpo calloso (comisurales o callosales). Las neuronas de la capa V proyectan principalmente hacia objetivos subcorticales, incluyendo médula espinal, puente y colículo superior; un subconjunto de neuronas de la capa V contribuye a las conexiones cortico-corticales. Los axones tálamocorticales hacen contacto sináptico directo con las neuronas de la capa IV. Las neuronas de la capa VI proyectan hacia el tálamo [Molyneaux y cols., 2007].

Se ha descrito una variedad de genes, en particular factores de transcripción, expresados por subconjuntos de neuronas en capas corticales específicas, así como por precursores neuronales durante el período preciso donde aquellas neuronas son generadas. Por ejemplo, *Otx1* y *Fezf2* son expresados tempranamente en el desarrollo por precursores neuronales presentes en la VZ y SVZ, y más tarde por subpoblaciones de neuronas corticales profundas [Molineaux y cols., 2007], mientras *Cux2*, *Satb2*, *Nex* y el RNA no codificante *Svet1* son selectivamente expresados en neuronas de las capas superiores y progenitores de la SVZ [Zimmer y cols., 2004]. Recientemente se han identificado marcadores moleculares para neuronas de las distintas capas corticales (Figura 13) que representan una herramienta útil para elaborar una

clasificación comprensiva de las neuronas corticales. Muchos de estos genes no son expresados uniformemente dentro de una capa determinada, y a menudo su expresión demarca fronteras entre áreas corticales diferentes.

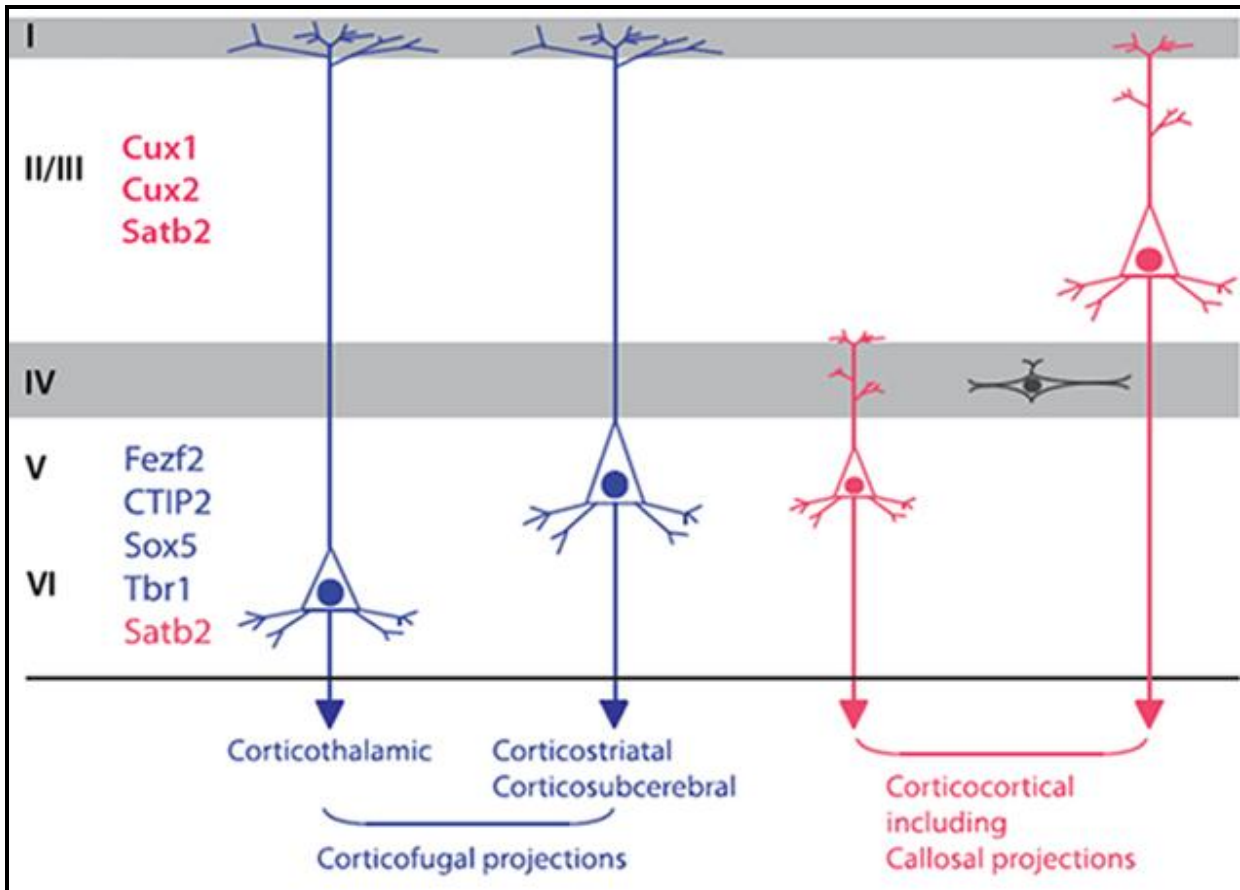


Figura 13. Esquema simplificado de la organización laminar de la neocorteza en términos de expresión de genes y proyecciones axonales dentro de la corteza. La neuronas que envían proyecciones corticofugales (en azul) residen exclusivamente en las capas inferiores V y VI, mientras que aquellas que envían proyecciones dentro de la corteza (en rojo), incluyendo proyecciones callosales al lado contralateral, residen principalmente en las capas superiores, con un contingente reducido de neuronas de proyección callosales en la capa V. Cada subtipo expresa combinaciones de factores de transcripción (en azul y rojo). Gaspard y Vanderhaeghen, 2011.

1.4.2. Arealización neocortical

Además de presentar una organización en capas horizontales, la neocorteza, en su dimensión tangencial, está dividida en áreas. Estas áreas poseen una composición molecular, celular, organización laminar y patrón de conectividad específica que determina su especialización funcional. Estos territorios tienen un tamaño específico y están situadas en coordenadas espaciales precisas respecto a las otras. Se distinguen cuatro áreas “primarias” en la neocorteza de mamíferos. Tres de las áreas primarias son sensoriales: área visual (V1), somatosensorial (S1), y auditiva (A1), las cuales procesan información recibida del ojo/retina, cuerpo, y oído interno/cóclea respectivamente. La cuarta área primaria es motora (M1), la que controla los movimientos voluntarios del cuerpo [O’Leary y cols., 2007]. Así, la neocorteza madura del ratón queda subdividida en las regiones rostrales regulan las funciones motoras y ejecutivas, mientras que las regiones caudales procesan estímulos somatosensoriales, auditivos y visuales

Dos modelos han sido propuestos para la arealización de la neocorteza: el “protomapa” [Rakic, 1988] que asume que toda la información para el establecimiento de las áreas corticales es codificada por programas genéticos intrínsecos de los progenitores neurales en las zonas proliferativas, y la teoría de la “protocorteza” [Van der Loos y Woolsey 1973; O’Leary, 1989], que propone que el patrón de áreas en la neocorteza en desarrollo es especificado extrínsecamente por axones tálamo-corticales (TCA), proyectados desde distintos núcleos sensoriales del tálamo hacia áreas corticales específicas durante el desarrollo embrionario. Actualmente, es aceptado que la interacción de estos dos modelos controla la especificación y diferenciación de las áreas corticales. Previo al arribo de proyecciones talamo-corticales, la regionalización molecular del primordio cortical ocurriría sobre la base de información intrínseca a éste, como en el modelo del “protomapa”. Más tarde, después de la aparición de proyecciones, la arealización cortical sería refinada y mantenida en base a la información transportada por fibras tálamo-corticales (modelo de la “protocorteza”) [Mallamaci y Stoykova, 2006; Dehay y Kennedy, 2007].

1.5. Control molecular de la neurogénesis

Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), los progenitores neurales generan neuronas que migran radial o tangencialmente desde las zonas germinales iniciando el proceso de diferenciación neuronal. Este proceso implica la adquisición y mantención de la identidad neuronal dentro del sistema nervioso, y de las características no-neurales fuera del mismo.

La diferenciación de precursores multipotentes en neuronas ocurre básicamente en cuatro etapas coordinadas, caracterizadas por la expresión y acción de productos génicos específicos. De esta manera, los progenitores neurales que pueden proliferar y diferenciarse dependiendo de las condiciones, expresan Pax6, Nestina, Sox2. El paso de determinación neuronal se caracteriza por la acción de proteínas de la familia bHLH, tales como MASH, MATH, y Neurogenina. Se ha sugerido que estos factores además de promover la adquisición del fenotipo neuronal controlan la adquisición de fenotipos neuronales específicos o particulares. En ausencia de estos factores, los progenitores corticales son especificados de manera incorrecta, expresando genes típicos de progenitores telencefálicos ventrales [Guillemot y cols., 2006]. Luego sigue el paso de compromiso, en el que se expresan genes que codifican NeuroD1/2, Myt1, y NF150. Finalmente, el paso de diferenciación terminal se caracteriza por la expresión de genes que determinan características neuronales estructurales y funcionales, como SCG10, canal de sodio tipo II, sinapsina, receptores de glutamato y acetilcolina, L1CAM. Por otra parte, es necesario que durante el proceso de diferenciación, sólo las neuronas post mitóticas expresen dichos genes, mientras la población de células troncales o progenitores continúa sin comprometerse con el linaje neuronal [Su y cols., 2004]. Estos eventos celulares y sus respectivas vías señalización, complementarias entre sí, son controladas de manera muy precisa mediante el balance entre reguladores transcripcionales negativos (represores) y positivos (activadores), que resultan fundamentales para asegurar el control continuo de la expresión génica durante el desarrollo y función del SNC [Lunyak y Rosenfeld, 2005].

A pesar de los avances, cómo las señales son activadas secuencialmente para dar lugar a diferentes efectos moleculares, y cómo se establece un determinado programa de diferenciación en las células hijas generadas a partir de los progenitores neurales sigue siendo un asunto desconocido.

Es sabido que más allá de los factores de transcripción y sus vías de señalización, el cambio dinámico en la expresión de genes está controlado en gran medida por la accesibilidad a éstos, que se cree que está determinada por diversos mecanismos epigenéticos [Wu y Sun, 2006].

Los mecanismos epigenéticos incluyen modificaciones covalentes del ADN y la cromatina que son hereditarios con la división celular, y actúan para determinar la accesibilidad del sitio de unión. Los principales mecanismos epigenéticos son la metilación del ADN, modificaciones de las histonas por acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinylation y RNAs no codificantes reguladoras [Hsieh y Gage, 2004, 2005, Kondo, 2006].

Se ha encontrado que la incidencia global de las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN se altera con la transición de la determinación del destino celular [Mikkelsen y cols., 2007]. Esta programación epigenética y la reprogramación es particularmente importante en el desarrollo embrionario, ya que prepara un camino para activar y reprimir de forma coordinada las baterías de genes en etapas determinadas del desarrollo [Hsieh y Gage, 2004]. Los cambios de metilación del ADN y las modificaciones de las histonas en diferentes áreas de la cromatina son específicos. Para comprender mejor los mecanismos que contribuyen a la determinación del destino celular, se requieren estudios detallados para averiguar cómo las modificaciones epigenéticas ocurren en sitios individuales, especialmente en los genes asociados con la adquisición de destinos celulares específicos.

Hay muchos sitios susceptibles de modificación en el extremo amino de las histonas, donde la interacción y combinación entre diferentes modificaciones, resultan en el establecimiento y mantenimiento de largo plazo de estados de regulación transcripcional. Las enzimas que regulan los programas epigenéticos a menudo interactúan con factores de transcripción para formar un complejo para controlar la expresión génica. Un ejemplo de lo anterior está dado por el complejo represor transcripcional que forman el factor de silenciamiento restrictivo neuronal (REST/NRSF), histonas desacetilasas (HDAC), H3K9 metiltransferasa y desmetilasa H3K4 para reprimir la expresión de genes vinculados con la determinación del fenotipo neuronal [Ballas y cols., 2005; Ballas y Mandel, 2005; Greenway y cols., 2007]. En este contexto, el conocimiento detallado de la importancia de la epigenética en la determinación del

destino celular neuronal podría dar indicios luz sobre el mecanismo molecular del desarrollo del SNC.

1.5.1. Control epigenético: papel de REST/NRSF

La transición de las células presentes en el neuroepitelio germinativo, desde un estado pluripotente a uno más restringido, está asociada con cambios globales rápidos en la expresión génica. Genes activos en progenitores tempranos son gradualmente silenciados en etapas tardías del desarrollo, y grupos de genes célula-específicos son encendidos. Esta progresión es el resultado de la expresión selectiva de factores transcripcionales, además del remodelamiento y modificación de la estructura cromatínica [Hsieh y Gage, 2005; Kondo, 2006]. Estas modificaciones incluyen modificación covalente de histonas, metilación del DNA en dinucleótidos de CpG, localización de la cromatina en dominios nucleares específicos, poliADP-ribosilación, RNAs no-codificantes regulatorios [Hsieh y Gage, 2005; Lessard y cols., 2007]. Esta “marca” o memoria epigenética, permite a las células mantener su identidad aún si son expuestas a ambientes que induzcan la aparición de otras características, lo que resulta importante para mantener una población de células pluripotentes a lo largo del tiempo y para prevenir el crecimiento tumoral [Cheng y cols., 2005; Su y cols., 2006]. Ahora bien, para el establecimiento de cambios o modificaciones epigenéticas, modificadores de la cromatina tales como DNA metil transferasas (DNMTs), histona metiltransferasas (HMTs), histona acetil transferasas (HATs) y desacetilasas (HDACs), son reclutados a loci genómicos específicos mediante proteínas de unión al DNA, como represores o activadores transcripcionales [Ballas y Mandel, 2005; Kiefer, 2007]. En este contexto el factor silenciador restrictivo neuronal (REST/NRSF) ha recibido atención considerable debido a su rol como represor “maestro” de genes neuronales.

REST/NRSF, es una proteína perteneciente a la familia de represores transcripcionales Gli-Krüppel. REST se une a una secuencia consenso presente en numerosos genes que son necesarios para la diferenciación terminal y función neuronal como aquellos que codifican proteínas involucradas en tráfico vesicular (SNAP25, sinaptotagmina, Rab3), canales iónicos (NaV1.3, Cav1.3), guía axonal (SCG10, semaforina5A, L1CAM) silenciando la expresión de éstos en linajes celulares no

neuronales y en progenitores neurales [Bruce y cols., 2004]. Dicha secuencia se denomina elemento represor 1/elemento silenciador neuronal restrictivo (RE1/NRSE). RE1 es una secuencia de 21-23 pb que se encuentra en el promotor de unos mil genes de expresión neural [Roopra y cols., 2001; Shimojo y Hersh, 2004, Wu y Xie, 2006].

La presencia de REST resulta imprescindible para el desarrollo correcto de los vertebrados, ya que la perturbación o pérdida de su función durante el desarrollo embrionario produce tanto la expresión de genes neuronales en tejidos no neuronales, como la degeneración temprana de los embriones [Chen y cols., 1998].

Estudios realizados en embriones de *Xenopus laevis*, muestran que la interferencia de la función de REST mediante oligonucleótidos antisentido y un dominante negativo, produce defectos en el patrón de diferenciación ectodérmico en la etapa gastrular, expansión de la placa neural concomitante con la disminución de keratina y de marcadores de cretas neuronales. Además la neurogénesis presento diversas anomalías que se manifestaron por la pérdida de expresión de genes pro-neuronales, neurogénicos y neuronales [Armisen y cols., 2002; Olguín y cols., 2006].

Usando embriones de pollo electroporados con el cDNA de REST, se mostró la disminución en la expresión de los genes N-tubulina y NgCam junto con un significativo aumento en la frecuencia de errores en la proyección y guía axonal [Paquette y cols., 2000].

REST parece regular la transición de célula troncal pluripotente a célula progenitora, y de ésta a neurona madura. En estudios *in vitro* se muestra que durante estas transiciones REST es degradado a niveles suficientemente bajos para mantener a la cromatina de los genes neuronales en un estado inactivo, pero latente, para su activación potencial. Cuando los progenitores se diferencian, REST y su maquinaria co-represora se disocia de los sitios RE1, permitiendo la activación de los genes neuronales [Ballas y cols., 2005]. Adicionalmente, se ha proporcionado evidencia respecto al papel de REST como “protector” del estado pluripotente y de auto-renovación en células troncales embrionarias de ratón, mediante la represión transcripcional de un miRNA específico, miR-21, el cual suprime la expresión de Oct4, Nanog, Sox2 y c-Myc, reguladores de auto-renovación [Singh y cols., 2008].

Para llevar acabo su función represora, REST está provisto de cuatro dominios funcionales: un dominio de unión al DNA que contiene 8 dominios de dedos de zinc que

se unen a los motivos RE1 y tres dominios represores independientes, uno localizado en el extremo amino, otro en el extremo carboxilo terminal [Tapia-Ramírez y cols., 1997], y un dominio de represión interno, descrito recientemente por su interacción con MED12/Mediator, que abarca los aa 141-600 [Ding y cols., 2008].

1.5.2. Mecanismo de silenciamiento: función de CoREST

El dominio represor amino terminal de REST/NRSF interactúa con mSin3, un co-represor encontrado en todos los eucariontes que recluta histona deacetilasas (HDACs). Sin embargo, el complejo mSin3-HDACs esta asociado con una alternancia dinamica entre represión y activación transcripcional. Esto último resultaría inadecuado para el silenciamiento a largo plazo o permanente que se requiere para los genes neuronales en el caso de linajes celulares no-neuronales, y para genes relacionados con el estado proliferativo y de diferenciación en el caso de progenitores neurales asi como de neuronas postmitoticas. Esto fue resuelto con el descubrimiento del co-represor 1 de REST o CoREST (RCoR1), el cual interactúa directamente con el dominio carboxilo terminal de REST y de manera similar a mSin3, forma complejos estables con HDACs de la clase 1 y 2. La interacción de CoREST con REST se determinó usando el sistema de doble híbrido. Los resultados de este estudio mostraron que la función de REST era dependiente de CoREST, ya que la introducción de mutaciones que suprimían la interacción entre ambas proteínas resultaba en inhibición de la función represora de REST [Andrés y cols., 1999]. CoREST consiste de dos dominios SANT (SWI13/ADA2/NcoR/TFIIB) y un dominio ELM2 (Egl27/MTA1). Estos dominios proporcionan la base estructural por la cual CoREST puede localizar la maquinaria represiva transcripcional en lugares discretos en la cromatina. El primer dominio SANT está involucrado en su interacción con REST/NRSF, y con el reclutamiento de HDAC1. El segundo dominio posee una función doble, es el sitio de unión al DNA (interacción con nucleosomas) [Yang y cols., 2005], además de ser un dominio represor que recluta a HDAC2. Las HDACs remueven grupos acetilo introducidos por histonas acetil transferasas (HAT). La remoción de estos grupos incrementa la carga positiva en el extremo de las histonas fomentando la unión de alta

afinidad entre las histonas y el DNA. Este aumento en la afinidad por el DNA condensa su estructura, previniendo la transcripción. Adicionalmente, el segundo dominio SANT recluta a la demetilasa 1 específica de lisinas, LSD1.

LSD1 es una monoaminoxidasa dependiente de la coenzima flavina-adenina dinucleótido (FAD), que remueve grupos metilos en residuos de lisina o arginina en el extremo amino de la histona 3 (H3) mono o dimetilada. LSD1 está asociada estrechamente con CoREST a través del dominio SANT2, formando el núcleo estable de un subcomplejo reclutado por muchos complejos multiproteicos represores. Además de su función como adaptador, la unión entre CoREST y LSD1 es requerida para catalizar la demetilación de H3K4 sobre la partícula nucleosomal intacta. La estructura tridimensional del complejo CoREST-LSD1 muestra que residuos aminoacídicos de CoREST están muy próximos a (aunque sin interactuar directamente) los residuos peptídicos de la H3. Esto indica que CoREST estabiliza la conformación activa de LSD1 y/o promueve el acoplamiento del extremo de la H3 en el sitio activo de LSD1 [Forneris y col., 2008].

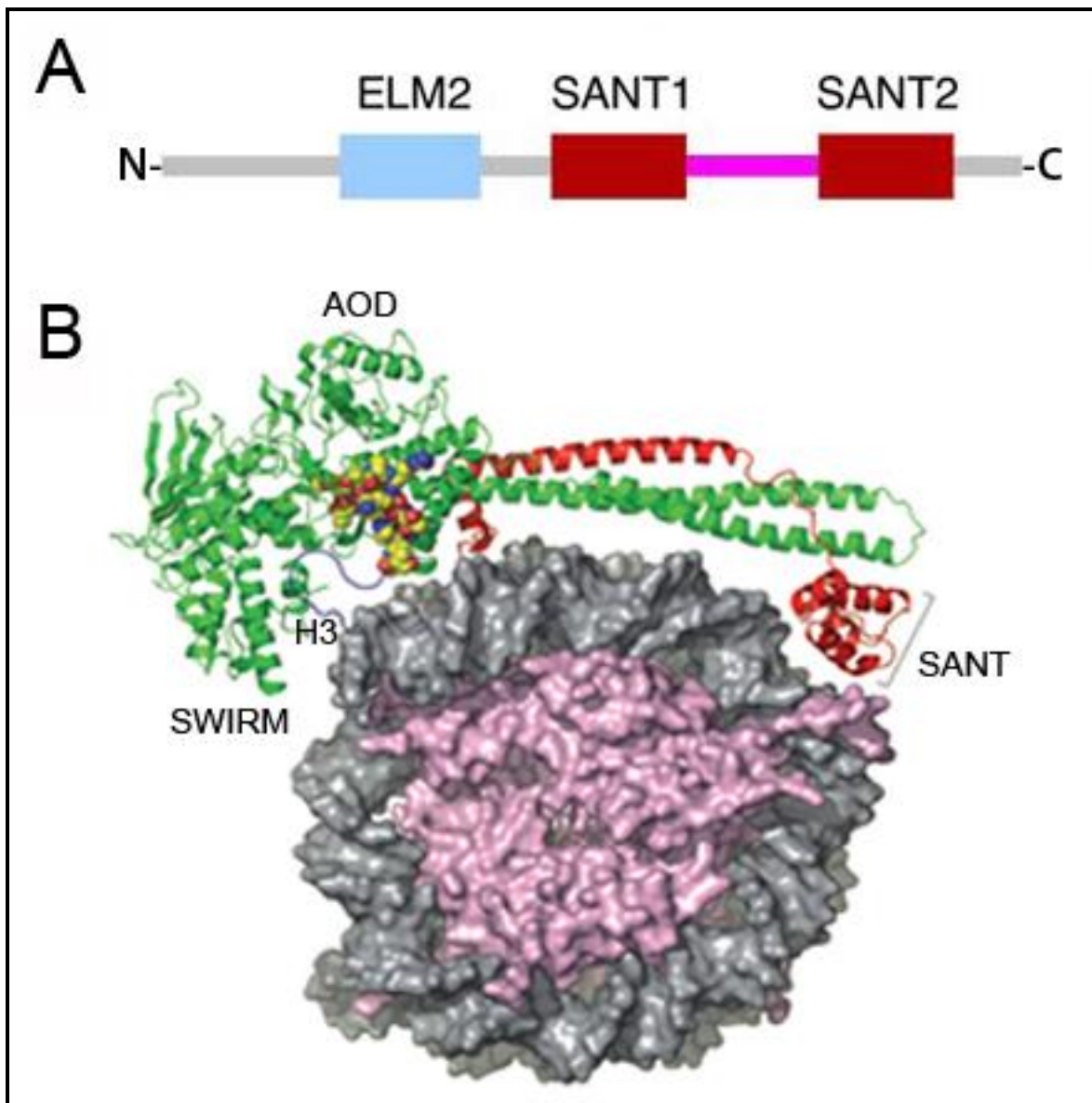


Figura 14. Estructura de CoREST. **A)** Diagrama esquemático de CoREST destacando la organización de sus dominios. **B)** Un modelo del complejo CoREST-LSD1 acoplado con el nucleosoma de una manera bipartita, con el segundo dominio SANT unido al DNA y los dominios AOD y SWIRM interactuando con un extremo de H3. CoREST se muestra en rojo, LSD1 se muestra en verde. Adaptado de Ruthenburg, 2007.

Por otra parte, se ha observado que cuando CoREST esta ausente o significativamente reducido, LSD1 se hace propenso a degradacion proteosomal, lo que sugiere que CoREST es requerido además para la estabilidad de LSD1 [Shi y cols., 2005].

Ortólogos de CoREST han sido descritos en *D. melanogaster* [Dallman y cols., 2004], *Xenopus laevis* [de la Calle-Mustienes y cols., 2002], *C. elegans* [Jarriault y Greenwald, 2002], y ratón [Tontsch y cols., 2001] compartiendo una gran conservación estructural, además de su especialización evolutiva como co-represor. Diversos estudios indican que el complejo REST-CoREST recluta enzimas adicionales para silenciar genes neuronales. Específicamente, CoREST puede formar complejos con la H3 metil transferasa (HMT) específica de lisina 9, G9a y con la proteína heterocromática 1 (HP1), que causa compactación de la cromatina y por tanto silenciamiento transcripcional [Roopra y cols., 2004].

Se ha visto que CoREST recluta a los sitios RE1 otra maquinaria de silenciamiento, que incluye a la HMT, SuV39H1 y la proteína de unión a DNA metilado, MeCP2, lo que permitiría a CoREST reclutar la maquinaria de silenciamiento génico a secuencias cromatínicas que contienen genes neuronales pero desprovistos del elemento canónico RE1 [Lunyak y cols., 2002].

Es relevante que el complejo represor formado por CoREST pueda ser purificado en ausencia de REST/NRSF, sugiriendo la asociación con otros factores transcripcionales y la formación de complejos represores en otros elementos de respuesta genómicos. En neuronas, donde REST está ausente, CoREST se expresa en niveles altos y se encuentra en asociación con HDAC1 y HDAC2 [Ballas y cols., 2005]. Es interesante que CoREST pueda mediar el silenciamiento génico en ausencia de REST, como se ha podido corroborar para los promotores de los genes de BDNF y calbindina [Ballas y cols., 2005]. Además, se ha visto que la depleción de CoREST en cultivos celulares produce la activación de los genes que responden a REST y un aumento en la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) [Lee, 2005]. De esta manera la persistencia de CoREST aún después de la salida de REST, podría proporcionar una plataforma para el ensamblaje y desensamblaje de complejos represores, requeridos para la diferenciación de progenitores neurales y plasticidad en neuronas maduras, en sitios que no poseen el elemento RE1.

Mediante el sistema de doble híbrido se demostró que CoREST interactúa con la proteína Hsp70 controlando a nivel transcripcional la respuesta de choque térmico. Esta respuesta está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa, en el cual, la acumulación de Hsp70 regula su propio elemento de respuesta a choque

térmico (HSE) mediante interacción directa con el factor transcripcional HSF1. Este trabajo demuestra que para funcionar como co-represor de su propia transcripción, Hsp70 requiere de CoREST [Gómez y cols., 2008]. Al mismo tiempo, existen trabajos que muestran que la expresión constitutiva de Hsp70 en ausencia de estrés produce una disminución en la viabilidad celular en células PC12 [Arispe y cols., 2004] y una disminución en el crecimiento, a temperaturas normales, en *Drosophila melanogaster* [Feder y cols., 1992]. Estos antecedentes muestran que CoREST es una proteína cuya función celular podría ir más allá del control de la expresión de genes neuronales en poblaciones celulares no neuronales.

Los estudios *in vitro* sugieren que CoREST podría tener un papel importante en etapas específicas de la diferenciación neuronal. En este contexto, estudios recientes han demostrado que CoREST, en comparación con REST, se localiza en un número mayor de genes especialmente en aquellos que promueven la mantención de pluripotencia y determinación del destino celular en progenitores neurales [Abrajano y cols., 2010]. Por otra parte, la utilización diferencial de REST y CoREST constituye un mecanismo regulatorio importante en la especificación de subtipos neuronales a través de la modulación de genes responsables de la inducción y mantención de la identidad neuronal [Abrajano y cols., 2009]. Sin embargo, estudios acerca de la función de CoREST en la determinación de la identidad celular neural temprana durante el desarrollo no han sido descritos. Para entender el mecanismo y los procesos subyacentes a la diferenciación neuronal, su fisiología y función es esencial monitorear y manipular el comportamiento celular en el tiempo, modificar la expresión génica en células viables, en el contexto general de un tejido y del organismo. Considerando la inexistencia de modelos manipulados genéticamente carentes de CoREST, así como de modelos condicionales de pérdida de función, otra técnica debe ser empleada para manipular su expresión *in vivo*.

En los últimos años la electroporación *in utero* ha emergido como un eficiente método para transfectar y manipular progenitores neurales y neuronas [Fukuchi-Shimogori y Grove 2001; Saito y Nakatsuji 2001; Tabata y Nakajima 2001]. Esta técnica es un método valioso como alternativa a los animales genéticamente diseñados, debido a lo costoso de su producción, y mantención. Por consiguiente, mediante la combinación de la técnica de electroporación *in utero* (IUE) para introducir horquillas

cortas de RNA (short hairpin RNA, shRNA) contra CoREST en la zona ventricular telencefálica dorsal del cerebro murino, se explorará su función durante la neurogénesis cortical en el contexto fisiológico *in vivo*.

1.6. Electroporación *in utero*

La electroporación *in utero* (IUE, “*in utero* electroporation”), introducida por Saito y colaboradores (2001), es una manera efectiva para transfectar regiones discretas (parches) de células en la superficie de la zona ventricular (VZ) en la neocorteza en desarrollo (Figura 16). Las ventajas de este método están determinadas por el control espacial y temporal de la transfección. El sitio de transfección a lo largo de la superficie ventricular puede ser dirigido espacialmente mediante la orientación del campo eléctrico del pulso de corriente para marcar la corteza dorsal, lateral, la eminencia ganglionar (interneuronas) o el primordio hipocampal.

La transfección puede llevarse a cabo en etapas tempranas o tardías de la neurogénesis. Transfecciones tempranas (E12-E13 en ratón) marcan células de las capas bajas y transfecciones tardías (E14-E15) marcan células superficiales de la corteza, indicando que esta técnica es un método para restringir espacialmente el momento de generación de neuronas.

Aproximaciones experimentales de pérdida y ganancia de función han sido adaptadas para usarse con EIU. Una elevada tasa de co-transfección (cerca del 90%), permite la transfección efectiva de múltiples plasmidios para marcar células simultáneamente con proteínas reporteras fluorescentes, para sobreexpresar genes de interés, o para disminuir la expresión de un gen blanco usando RNA de interferencia (RNAi) mediado por vectores que codifican horquillas cortas de RNA (shRNA). La transfección simultánea permite analizar la función combinada de genes. Por otra parte, aun cuando la transfección es alta, la citotoxicidad se mantiene baja. No se han detectado incrementos significativos en muerte celular después de la electroporación [Mizutani t Saito, 2005]. La pérdida de función usando plasmidios que codifican shRNA ha sido una aproximación poderosa para estudiar el rol de genes en la migración radial. La disminución efectiva de doblecortina (Dcx), Flip, Lis1, Dcdc2, Dclk, y Ndel1, usando

IUE mostró alteraciones en el proceso migratorio radial en la corteza en desarrollo. Esta aproximación experimental puede ser aplicable a cualquier especie de mamífero. Así es como diferentes investigadores, usando IUE, generaron un modelo del síndrome de doble-corteza en rata, el que no pudo ser producido en ratón mediante shRNA o usando una aproximación genética [Corbo y cols., 2002; Bai y cols., 2003; Ramos y cols., 2005]. El modelo creado por RNAi contra Dcx desarrolla una banda heterotópica subcortical y neuronas dismórficas dispersas.

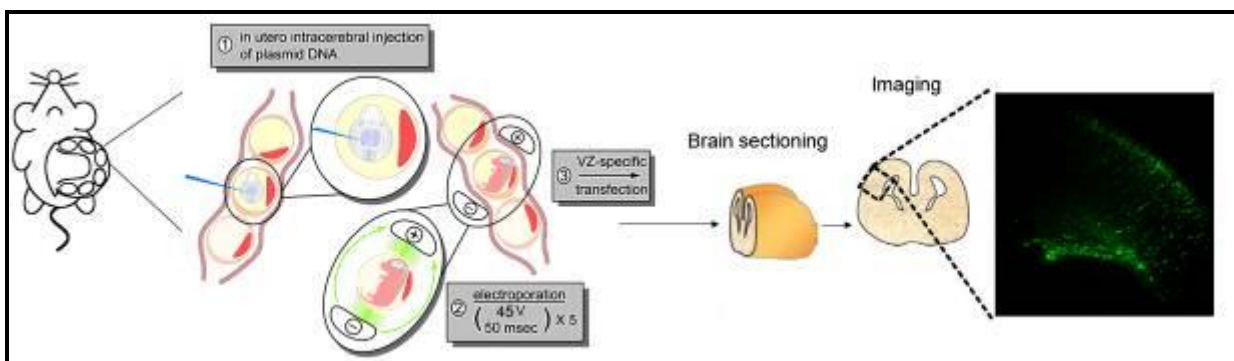


Figura 15. Los embriones son visualizados a través de la pared uterine, se inyecta DNA plasmidial en los ventrículos cerebrales mediante un micro capilar de vidrio. Un electrodo negativo y un electrodo positivo de titanio son posicionados en los hemisferios izquierdo y derecho respectivamente y una serie de pulsos eléctricos son enviados, resultando en la transfección de genes en la pared telencefálica dorsolateral derecha. Después de la transfección la expresión de la construcción plasmidial se identifica por la expresión del reportero GFP. Adaptado de Fukushi, 2001 y Tsai, 2010.

1.6.1. Problemas potenciales y limitaciones de la electroporación *in utero*

Existen varias limitaciones, precauciones y controles que tienen que ser considerados en cualquier experimento de RNAi. La utilización de shRNA no es una delección genética, y por lo tanto se tiene que asumir la presencia de proteína residual, aún después del efecto completo del RNAi. Tal disminución (“*knockdown*”) a diferencia del “*knockout*” (eliminación) podría dificultar la determinación de la función absoluta de una proteína, si el efecto del RNAi carece de fenotipo. De manera alternativa, en algunos casos la disminución podría revelar una función al prevenir la aparición de mecanismos compensatorios. El uso de RNAi es conocida por tener efectos no específicos (“*off-target*”) [Jackson y cols., 2004; Scacheri y cols., 2004]. En diversos

estudios usando microarreglos y perfiles proteicos, ha sido demostrado que el método de RNAi siempre disminuye el nivel de los transcritos y proteínas que no son blancos directos del RNAi codificado por un vector determinado. Por consiguiente, resulta crucial tener controles de rescate en los cuales la expresión de la proteína blanco es reconstituida por un sistema de expresión exógeno. Otro importante control, es que más de una secuencia de RNAi dirigida contra el mismo blanco, genere el mismo fenotipo. Otra diferencia importante entre la IUE y la eliminación de un gen en la línea germinal, es que usando RNAi in utero se alcanzan sólo algunas células en lugares y tiempos discretos del desarrollo. Esto podría resultar en la ausencia de fenotipo en experimentos de RNAi; por ejemplo si se requieren interacciones celulares, entonces la IUE podría no revelar el fenotipo o la función de un gen. Como alternativa, el mosaico producido por la interferencia in útero podría revelar funciones autónomas celulares de un gen que serían difíciles de evaluar en animales con ausencia de un gen particular. En términos técnicos, una desventaja de la técnica es que los pulsos eléctricos pueden afectar el ritmo cardíaco, lo cual podría conducir a la muerte de los embriones. Por lo tanto, es importante minimizar el golpe eléctrico en el corazón. El uso de electrodos apropiados, que abarcan una superficie pequeña ha ayudado a superar este inconveniente.

2.- Hipótesis

Considerando la evidencia *in vitro* e *in silico*, el corepresor transcripcional CoREST (RCoR1), identificado inicialmente como cofactor de REST/NRSF, podría desempeñar un papel durante el desarrollo de la corteza cerebral. Sin embargo, más allá de la evidencia existente, análisis funcionales de CoREST no han sido realizados. El objetivo de este estudio es caracterizar la expresión de CoREST en el cerebro del ratón y examinar su papel en la regulación de corticogénesis de mamíferos. Para esto, se ha elegido la estrategia de pérdida de función *in vivo* como enfoque experimental para examinar el efecto del desbalance en la expresión de CoREST en los diferentes aspectos de la corticogénesis embrionaria y postnatal.

En función del estado del arte y los antecedentes presentados, en esta tesis se presenta la siguiente hipótesis:

La función de CoREST es necesaria para la diferenciación de progenitores neurales corticales durante el desarrollo embrionario de ratón.

3.- Objetivos

Los objetivos planteados para demostrar esta hipótesis son:

1. Determinar el patrón de expresión espacio temporal de CoREST en la corteza cerebral
 - 1.1. Desarrollar procedimientos para inducir la disminución en la expresión de CoREST *in utero* en embriones de ratón
2. Evaluar las consecuencias de la disminución en la expresión y/o pérdida de función de CoREST en el contexto histológico de la corteza cerebral.
 - 2.1. Determinar el patrón de expresión de proteínas asociadas con distintos estados de diferenciación neuronal.
 - 2.2. Evaluar las consecuencias en la viabilidad celular y proliferación al disminuir la expresión de CoREST.
3. Analizar los mecanismos moleculares por los cuales CoREST modula la generación de neuronas corticales.
4. Evaluar las consecuencias de la pérdida de función de CoREST en la corteza postnatal.

4.- Materiales y Métodos

4.1. Reactivos químicos

4.1.1. Reactivos y sistemas comerciales de biología molecular

Aceite mineral (Sigma, St Louis, EE.UU)

Agarosa para biología molecular (Winkler, Santiago, Chile)

Alcohol Isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemania)

Bromuro de etidio (Gibco BRL, California, EE.UU)

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100 mM cada uno (Boehringer, Mannheim, Alemania)

Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)

Estádar de peso molecular 1 kb ladder Gene Ruler (Fermentas, Ontario, Canadá)

Endonucleasas de restricción: EcoRI, NotI, AflII (Promega, Madison, EE.UU)

Inhibidor de RNAasa, RNAasa Out (Invitrogen, California, EE.UU)

Oligo (dt)₁₂₋₁₈ 500 µg/ml (Invitrogen, California, EE.UU)

Sistema comercial de purificación de DNA plasmidial Miniprep (Qiagen, California, EE.UU)

Sistema comercial de purificación de DNA plasmidial para inyecciones in utero Maxiprep (Qiagen, California, EE.UU)

Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, California, EE.UU)

Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, California, EE.UU)

Trzol (Invitrogen, California, EE.UU)

4.1.2. Soluciones para biología molecular

Solución tampón de electroforesis TAE 1X (Tris-acetato/EDTA)

Tampón TE (Tris-EDTA)

4.1.3. Reactivos usados en inmunofluorescencia

Paraformaldehido

Suero de burro (Millipore, Massachusetts, EE.UU)

Medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, EE.UU)

Tritón X-100 (Sigma, St Louis, EE.UU)

Portaobjetos (Yancheng, China)

Cubreobjetos (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania)

4.1.4. Reactivos usados para inmublot

Mezcla de inhibidores de proteasas 10X (Boehringer, Mannheim, Alemania)

PMSF 0,5 mM (Boehringer, Mannheim, Alemania)

Solución tampón para lisis celular (SDS 10%, EDTA 100mM, Tris 500mM, dH₂O)

Solución tampón de carga 5X (Tris-HCl 125 mM pH:6,8; SDS 6%; glicerol 20%; β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,07%)

Acilamida/Bisacilamida 40% (29/1) (Sigma, St Louis, EE.UU)

Solución tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 80 mM, SDS 1,7 mM, pH 8,3)

Estándar de peso molecular rango amplio Page Ruler (Fermentas, Maryland, EE.UU)

Solución tampón PBST (PBS/Tween-20)

Papel filtro para transferencia (Fiber pads, BioRad, California, EE.UU)

Solución de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.04% SDS, 20% metanol)

Membrana de nitrocelulosa (BioRad, California, EE.UU)

Metanol técnico (TCL, Santiago, Chile)

Solución de bloqueo: leche descremada Svelty 5% en PBST

Sistema comercial para detección quimioluminiscente Super signal West Pico (Pierce, Illinois, EE.UU)

Persulfato de amonio (Winkler, Santiago, Chile)

Temed (Sigma, St Louis, EE.UU)

Tween-20 (Sigma, St Louis, EE.UU)

Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU)

4.1.5. Reactivos usados para cultivos de bacterias

LB 10 mg/ml

10mg/ml Bacto-Tryptona (Difco, Maryland, EE.UU)

5mg/ml Bacto-extracto de levadura (Difco, Maryland, EE.UU)

Agar-LB 15mg/ml Bacto-Agar en LB (Difco, Maryland, EE.UU)

4.1.6. Reactivos para cultivo de líneas celulares

DMEM/F12 (Invitrogen, California, EE.UU)

Suero fetal bovino Fetal clone (Hyclone, Austin, EE.UU)

Penicilina/Streptomycin (100X) 10.000U/ml Penicillina/10.000U/ml Streptomycin en PBS (Gibco, California, EE.UU)

4.1.7. Reactivos para cultivos primarios neuronales

Suplemento B-27 (Gibco, Auckland, Nueva Zelanda)

Medio Neurobasal (Gibco, Auckland, Nueva Zelanda)

Poli Lisina (Invitrogen, California, EE.UU)

L-glutamina (Invitrogen, California, EE.UU)

Tripsina (Invitrogen, California, EE.UU)

4.1.8. Vectores

i) pZOff: el vector pZOff fue construido a partir de la estructura del vector pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Inc.) al que se introdujeron ciertas modificaciones. Se eliminó el sitio de multiple clonamiento por digestión con BglII y BamHI y re ligación del vector. Se insertaron los sitios de restricción Sall, PvuI, y BamHI entre los sitios MluI y DraIII usando oligos (5'-CGCGGTCGACGCGATCGCGGATCCTAC-3' y 5'-GGATCCGCGATCGCGTCGAC-3') que al mismo tiempo destruyeron ambos sitios. El promotor H1 fue obtenido del plasmidio pSuper (OligoEngine) e insertado en los sitios Sall y BamHI del vector pEGFP, creando así el vector pZOff. Este vector fue usado para clonar los oligos que dan origen a las horquillas cortas de RNA (shRNA). Posee GFP como gen reportero cuya expresión depende del promotor de Ubiquitina C.

ii) pFuxH1: El vector de expresión eucarionte, y de generación lentiviral, pFuxH1 se origina a partir del vector FUGW [Lois y cols., 2002] y requirió varias etapas. Brevemente, el sitio EcoRI fue eliminado del vector FUGW. Se introdujo un oligonucleotido en el sitio PacI, creando un sitio de clonamiento múltiple con las siguientes enzimas de restricción: 5'- PvuI, BsiwI, EcoRI, BstBI, y PacI. La region del promoter H1 de pZOff fue insertada en los sitios EcoRI and BstBI sites, creating FuxH1.

iii) pCAGIG: El vector pCAGIG-GFP (Addgene, 11159) posee un sitio interno de entrada ribosomal (IRES) que permite la expresión de diversos reporteros fluorescentes, posibilitando la expresión elevada de cDNAs codificantes para diversas variantes de una proteína a partir del promotor CAG, una combinación del promotor de β actina de pollo, y el potenciador del promotor de citomegalovirus (CMV). Fue desarrollado por Matzuda y Cepko [2004].

4.1.9. Cepas bacterianas

Para la propagación de las construcciones plasmidiales de interés se utilizó la cepa Top10 de *Escherichia coli* químicamente competente [Invitrogen, F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15

galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻]. Esta cepa fue crecida en placas de LB/agar o LB líquido suplementado con ampicilina (50 mg/ml) bajo condiciones estándar de cultivo.

4.1.10. Partidores

Tabla 1. Nombre y secuencias de los pares de partidores usados para la amplificación mediada por reacción de polimerasa en cadena (PCR) de los genes de la familia CoREST (RCoR).

Par de partidores	Secuencia 5' – 3'	Aplicación
CoREST1 (RCoR1)	Fw: TGCTTCTGTCCTCGACGTAA Rv: TGTGATGCAGATGGCTAGGT	Detectar el mRNA de CoREST1 (RCoR1)
CoREST2 (RCoR2)	Fw: ACCCCTTTGGCTGGATCTCT Rv: TGCCAGGAACACATGCAGAA	Detectar el mRNA de CoREST2 (RCoR2)
CoREST3 (RCoR3)	Fw: CAGGCTCGTAACTAGCCAA Rv: CAGCGTTACCCTCTCTTTTG	Detectar el mRNA de CoREST3 (RCoR3)

Tabla 2. Nombre y secuencias de los pares de oligonucleótidos usados para la generación de las horquillas cortas de RNA (shRNA) contra CoREST. En negrita se muestra la secuencia que dará origen al shRNA.

shRNA-CoREST 1
Fw: GATCCCC GGCGCAGTCAAGAACGAGA ttcaagaga TCTCGTTCTTGACTGCGCCTTTTTGGAAA Rv: AGCTTTTCCAAAA GGCGCAGTCAAGAACGAGA tctcttgaa TCTCGTTCTTGACTGCGCCGGG
shRNA-CoREST 2
Fw: GATCCCC AGGCATGTTTCTTTCTCAA ttcaagaga TTGAGAAAGAAACATGCCTTTTTGGAAA Rv: AGCTTTTCCAAAA AGGCATGTTTCTTTCTCAA tctcttgaa TTGAGAAAGAAACATGCCTGGG
sh3RNA-CoREST 3
Fw: GATCCCC GACAAAGTCTTATTTGAGC ttcaagaga GCTCAAATAAGACTTTGTCTTTTTGGAAA Rv: AGCTTTTCCAAAA GACAAAGTCTTATTTGAGC tctcttgaa GCTCAAATAAGACTTTGTCCGGG

Tabla 3. Nombre y secuencias de los pares de partidores usados para la amplificación mediada por PCR de las variantes truncadas de CoREST.

Par de partidores	Secuencia 5' – 3'	Aplicación
mCoR1-Nter-F CoR1 R2-2	Fw: GTTCGAATTCATGgaggaagtgaggatgaactggaagaacaaacgg Rv: CCTTGCGGCCGCTCATTAAGCGTaatctggaagatcgtatgggt	Clonación CoREST Δ N-terminal
CoREST1 F1m mCoR1-Cter-R	Fw: GTTCGAATTCatgcggtgggacccagtac Rv: AATCTGGAAGATCGTATGGGTActgaggaactgtctgtagg Rv2: CCTTGCGGCCGCTCATTAAGCGTaatctggaagatcgtatgggt	Clonación CoREST Δ C-terminal
CoREST1 F1m mCoR1-S2/3-R mCoR1-S2/3-F CoR1 R2-2	Fw: GTTCGAATTCatgcggtgggacccagtac Rv: CCGCTCCCGCTTCTGTTCCGAGCAT Fw: CCAAACAAGGAAAGCAAAAAGGAGGTGCCCCCTACAG Rv: CCTTGCGGCCGCTCATTAAGCGTaatctggaagatcgtatgggt	Clonación CoREST1 Δ Sumo2/3.
CoREST1 F1m mCoR1-S1-R mCoR1-S1-F CoR1 R2-2	Fw: GTTCGAATTCatgcggtgggacccagtac Rv: GACCTGAGGAACTGTCTCTGTAGGGGGCAC Fw: AAAGAAAAGCACAGCACACAAGCTAAAAATAGAGCAAAAAGGAAACCTCCGAAAG Rv: CCTTGCGGCCGCTCATTAAGCGTaatctggaagatcgtatgggt	Clonación CoREST1 Δ Sumo1

4.2. Metodología

4.2.1. RT-PCR.

Se extrajo RNA total de cultivos neuronales corticales obtenidos de cortezas embrionarias murinas de E14 mantenidos 1 y 3 DIV, y de células NIH3T3 usando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA fue llevada a cabo a partir de 2 µg de RNA, utilizando la transcriptasa reversa Improm II (Promega) y oligo dT siguiendo el protocolo del fabricante. El PCR fue realizado usando los pares de oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Condiciones para la reacción de PCR: 94°C, 2 min.; 94°C, 1min.; 60°C, 1 min.; 72°C, 5 min. (25 ciclos); 72°C, 5 min extensión final.

4.2.2. Diseño y clonamiento de los shRNAs.

Los shRNAs fueron diseñados contra diferentes regiones del mRNA de CoREST que presentaban homología entre ratón y rata. Se seleccionaron los 3 mejores candidatos de 21 pb en base a diferentes criterios para diseñar shRNAs (Tabla2). Una descripción detallada del proceso de diseño y selección puede ser encontrada en <http://www.cs.hku.hk/~sirna/>. Para generar el “cassette” de expresión del shRNA de 19 nucleótidos, dos deoxioligonucleótidos (sentido y anti-sentido) fueron sintetizados químicamente, alineados, y luego, cada dúplex de oligonucleótidos fue insertado en el plasmidio pZoff-eGFP entre los sitios de restricción *Bgl II* y *Hind III*. El producto de ligación resultante (pZoff-shRNA) se usó para transformar bacterias competentes *E. coli* Top10. La confirmación de los clones se realizó mediante PCR de colonias usando partidores específicos que generan amplicones de 383 pb para los clones negativos, o 447 pb para los positivos (con inserto), los cuales fueron visualizados por electroforesis en agarosa al 1.5%. Para la expresión del shRNA en el plasmidio pFUX-H1, se sub-clonó el fragmento que contiene la secuencia codificante del shRNA mediante digestión de las construcciones pZoff-shRNA con las enzimas *Cla I* y *EcoR I*. Se realizó una electroforesis en agarosa al 2% y posteriormente, la banda correspondiente al

fragmento resultante de la digestión enzimática, fue escindida del gel y purificada. Luego el fragmento se ligó en los sitios *EcoR I* y *Bsp1191* del vector pFUX-H1. El producto de ligación resultante fue usado para transformar bacterias competentes *E. coli* Top10 y los clones positivos se confirmaron mediante PCR de colonias usando partidores específicos que generan amplicones de 369 pb para los clones negativos, o 433 pb para los positivos (con inserto), los cuales fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa al 1.5%.

4.2.3. Generación de las variantes de CoREST

El cDNA de la forma de CoREST insensible al shRNA se obtuvo por mutagénesis silente mediada por PCR con el partidador:

gGGaATGTTctTaagcCAgGAAGATGTGGAGGCTGTGTCT. Los nucleótido mutados están en minúscula. Esta construcción fue clonada en el plasmidio de expresión pCAGIG, y es denotado como CoREST^r. La mutagénesis subsecuente sobre este fondo molecular fue realizada por PCR, y generó las variantes truncadas de CoREST N-terminal: aa 1-153 (interacción con REST/NRSF); C-terminal: aa. 243-382 (interacción con LSD1); Sumo1: K193 y Sumo2/3: aa 154-174 (Tabla 3).

4.2.4. Obtención, purificación y secuenciación del DNA plasmidial

Los plasmidios correspondientes a las distintas construcciones utilizadas en este estudio, se purificaron con el sistema Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), con el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), y para electroporación *in utero* se usó el sistema de purificación Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Los plasmidios fueron secuenciados para confirmar la integridad de las secuencias nucleotídicas en las construcciones shRNA.

4.2.5. Obtención de vectores lentivirales

Las partículas lentivirales fueron preparados mediante co-transfección usando fosfato de calcio de células HEK293T de acuerdo a como esta descrito por Moffat y cols., 2006. Los plasmidios utilizados fueron el pFUXH1-eGFP, el plasmidio pVSV-g que expresa la proteína de la envoltura; el plasmidio p Δ 8.9 que expresa los genes gag/pol/rev y es necesario para el empaquetamiento viral. Después de 48 horas de transfección, el medio que contiene los lentivirus es filtrado, concentrado mediante ultracentrifugación. Luego, células HEK293T son transducidas con distintas diluciones de este sobrenadante para determinar la multiplicidad de infección (MOI). Luego se determina la efectividad de los shRNA diseñados.

4.2.6. Transfección y transducción de líneas celulares NIH3T3 y Neuro2A

Las células Hek293T, NIH3T3 (fibroblastos) y Neuro2A (N2A, neuroblastoma) crecieron de acuerdo a las condiciones estándar de cultivo; luego fueron transfectadas de manera transiente usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante; también fueron transducidos con vectores lentivirales, con el objeto de verificar mediante aproximaciones bioquímicas la eficiencia de los siRNA contra CoREST producidos a partir de los plasmidios correspondientes (control e interferente).

4.2.7. Cultivos primarios de neuronas corticales

La metodología para preparar neuronas corticales primarias se estandarizó de acuerdo a como esta descrito por Vidal y cols., 2007.

4.2.8. Inmunocitoquímica e inmunoblot

La eficiencia de la disminución en la expresión de CoRest fue determinada mediante inmunofluorescencia (IF) e inmunoblot (IB).

IF, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min a T⁰, lavadas con PBS, permeabilizadas con metanol a -20°C por 5 min, y tratadas con solución de bloqueo (BSA al 1%) por 1 hora (h) a temperatura ambiente (RT). Los anticuerpos primarios son diluidos en solución de bloqueo (1:500, Upstate, 07-455) e incubados a 4°C por 24 h en condiciones húmedas. Los anticuerpos secundarios acoplados a Cy3 fueron diluidos en la misma solución de bloqueo (1:700, Jackson Immunoresearch Laboratories) e incubados por 1 h a RT. Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio Nikon de epifluorescencia.

IB, luego de la transducción lentiviral los cultivos neuronales y de líneas celulares extractos totales fueron preparados a partir de la lisis en 0.2 ml de la siguiente solución: SDS 10%, EDTA 100mM, Tris 500mM, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasa 1X (Sigma). Las células fueron raspadas, recolectadas y transferidas mediante una jeringa de insulina (1 ml, aguja 25G) a un tubo eppendorf. Los tubos fueron incubados a 95°C por 5 minutos (min), el lisado fue pasado 10 veces a través de la jeringa (substituye la sonicación), y luego centrifugado a 10000 rpm por 10 min para limpiar el lisado del debris celular. 40-50 µg de proteínas fueron resueltas sobre mini geles de SDS-PAGE al 12% y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La membrana fue bloqueada en leche Svelty 5% en PBS-tween (PBST) por 1 h a temperatura ambiente, para ser incubada posteriormente con el anticuerpo policlonal anti-CoREST (1:10000, Upstate, 07-455); anti-LSD1; 1:1000 (Abcam, AB17721) y anti-TFIIB; 1:1000 (Sta. Cruz, SC-225) utilizado como control de carga. Las membranas fueron lavadas dos veces en PBST por 5 min con un lavado final en PBS por 5 min, y entonces incubadas con un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidada; 1:5000 (Jackson Immunoresearch Laboratories). Las membranas fueron lavadas nuevamente, y se llevó a cabo la detección quimioluminiscente con el kit ECL (Pierce).

4.2.9. Animales y electroporación *in utero*

Todas las cirugías se llevaron a cabo en ratonas preñadas CF1, y la manipulación de los embriones fue realizada como se ha descrito previamente, y conforme a los protocolos éticos para trabajo con animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se realizó siempre el máximo esfuerzo para minimizar tanto el número de animales usados como su sufrimiento. Brevemente, ratonas preñadas en E14.5 son anestesiadas con isoflurano al 2% utilizando un vaporizador. Mediante laparotomía, los cuernos uterinos son expuestos. DNA plasmidial purificado (5 µg/µl) se mezcla con Fast Green (1:50) para monitorear el sitio de la inyección. Aproximadamente 1-2 µl de solución se inyecta en la región telencefálica ventricular derecha o izquierda utilizando una micropipeta de vidrio fabricada a partir de un microcapilar (Thomas Scientific, 7690F22). La cabeza de los embriones es puesta cuidadosamente entre un electrodo tipo pinza (BTX, 45-0489). Se aplican 5 pulsos electrónicos de 35-40 V, con una duración de 50 ms, a intervalos de 1 s, generados con un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad). Luego, los cuernos uterinos son devueltos a la cavidad abdominal, la que es sellada con suturas quirúrgicas (Figura 16). A la madre se le suministra Ketoprofeno y luego es puesta en una jaula post-operatoria a 37°C. Los embriones continúan su desarrollo normal hasta E14.5, E17.5, P0 o P7, tiempo en que se procede con su recolección y sacrificio.

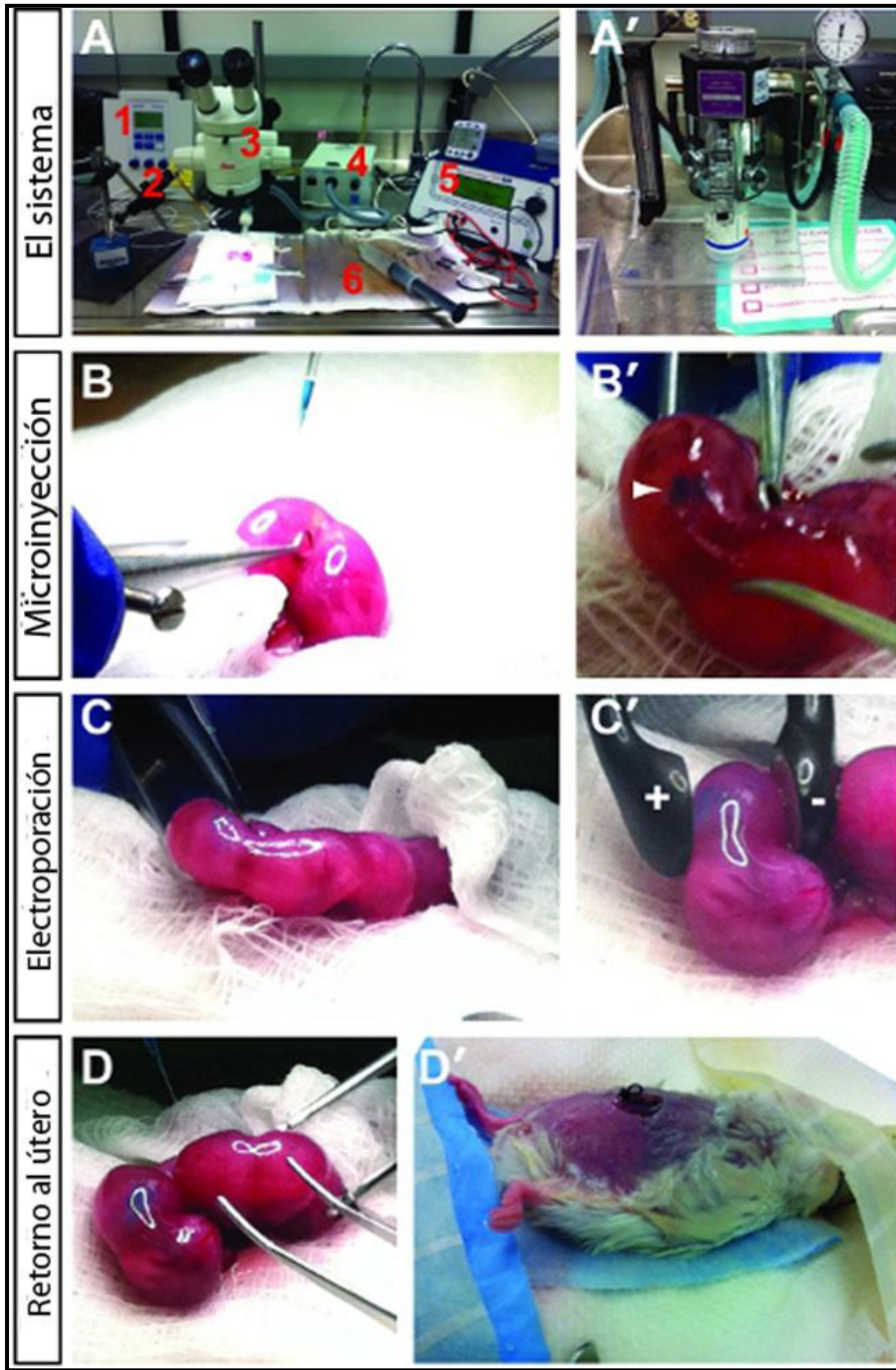


Figura 16. Instalación básica de un sistema de electroporación *in utero*. A) Los componentes básicos incluyen un sistema de inyección (1), micromanipulador (2), estereomicroscopio (3), sistema de iluminación con fibra óptica (4), sistema de electroporación con electrodos tipo pinza (5), placa térmica (6). A') El animal es anestesiado usando un vaporizador con isoflurano como anestésico. B,B') Después de la anestesia, los cuernos uterinos son expuestos y DNA mezclado con fast green es inyectado en las vesículas cerebrales. La inyección se visualiza por el seguimiento del colorante "fast green" (B', C, C') Luego de la inyección del DNA, los electrodos de paleta son puestos a cada lado del útero, posicionando al embrión de tal modo que el DNA sea direccionado hacia el polo positivo de acuerdo a la región cerebral de elección. D, D') Una vez que todos los embriones deseados son inyectados, el útero es devuelto a la cavidad abdominal (D), el peritoneo suturado y luego la piel es corcheteada (D'). La hembra preñada se deja en una jaula de recuperación. Dixit y cols., 2011.

4.2.10. Inmunohistoquímica

Los efectos en la migración, morfología y fenotipo son evaluados mediante electroporación de embriones murinos en E14.5 con el plasmidio shRNA contra CoREST, el plasmidio shRNA control (GFP). Los embriones son retirados de la madre en distintos días embrionarios y postnatales que abarcan la época neurogénica (E11-18) y de diferenciación neuronal postmigratoria (P7). Los cerebros son obtenidos luego de la perfusión intra cardíaca de los embriones utilizando paraformaldehído al 4%. Luego, los cerebros fijados son disectados, lavados con PBS, embebidos en agarosa al 2%, y seccionados en el plano coronal utilizando un vibrátomo (60-100 μm). Se realizan cortes coronales seriados de los cerebros en distintos etapas del desarrollo posteriores a la electroporación *in utero* de los distintos vectores utilizados. Las secciones son incubadas en solución de bloqueo (suero de burro 3%, Tritón X-100 0.25% en PBS) por ≥ 1 h. Las secciones son incubadas con diluciones apropiadas de anticuerpos [anti-CoREST, 1:500 (Upstate, 07-455); anti-Tuj1, 1:500 (Chemicon, CBL412); anti-Sox2, 1:500 (Chemicon, AB5603); anti-Vglut, 1:250 (Chemicon, MAB5502); anti-vimentin, 1:500 (Chemicon, AB5733); anti-caspasa 3 activa, 1:250 (Cell Signalling, 9661S); anti-LSD1, 1:500 (Abcam, AB17721); anti-Cux1, 1:250 (Santa Cruz, SC-13024); anti-Tbr2, 1:500 (Abcam, AB23343), anti-Tbr1, 1:500 (Abcam, AB31940)] por 24 h a 4°C seguido de dos lavados con PBS y uno con solución de bloqueo por 15 min. Las secciones son incubadas entonces con anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 o Cy5 (1:500, Jackson Immunoresearch Laboratories) por 2 h seguido de tres lavados con PBS. Las secciones son incubadas con la contratinción nuclear Hoechst (1:1000, Invitrogen, 33258) por 10 min. Seguido de tres lavados con PBS. Las secciones son puestas sobre portaobjetos de vidrio usando el medio de montaje Vectashield (Vector). Las imágenes son obtenidas mediante microscopía confocal (BX-DSU, Disk Scanning Unit, Olympus).

4.2.11. TUNEL

La degradación extensa del DNA es un evento característico que ocurre en las etapas tardías de la apoptosis. La ruptura del DNA puede producir fragmentos de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas), así como quiebres de hebra única (“nicks”) en DNA de alto peso molecular. Estas rupturas o quiebres en el DNA pueden ser detectados por marcaje de los extremos 3'-OH libres con nucleótidos modificados (X-dUTP, X=biotina, fluorosceína, Texas Red) en una reacción enzimática.

Para descartar que la ausencia de células apoptóticas se deba a un evento tardío de muerte celular no detectable usando inmunofluorescencia contra caspasa 3 activa, se realizó el ensayo de TUNEL de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche). Brevemente, embriones de E17.5 electroporados con el shCoREST y con el shRNA control fueron removidos, fijados, y el cerebro seccionado como se describe arriba. Secciones fueron lavadas en PBS por 10 min y permeabilizadas usando suero de mono 4%, Tritón X-100 0.25% en PBS por 2 h. Las secciones fueron entonces incubadas en la mezcla de reacción para TUNEL que contiene la enzima transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT) y los nucleótidos conjugados a TMR Red por 1 h a 37°C. Para los controles negativos, la enzima TdT fue omitida. Para los controles positivos y previo al tratamiento con la mezcla de reacción para TUNEL, las secciones se incubaron con DNase I (Roche) 10 U/ml (en 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, BSA 1 mg/ml) por 10 min a temperatura ambiente, para inducir la aparición de extremos 3'OH libres característicos de apoptosis. Las secciones fueron lavadas, montadas, cubiertas y fotografiadas con el sistema óptico descrito arriba

4.2.12. Ensayo de BrdU

Para el marcaje utilizando el análogo de timidina, bromo deoxiuridina (BrdU), ratonas preñadas en E16.5 fueron inyectadas intraperitonealmente con BrdU (Sigma-Aldrich 50 mg/kg). Los animales se sacrificaron 4 h después de la inyección. Los embriones fueron disectados como se describió anteriormente. Las secciones de cerebros se bloquearon con suero de mono 4%, Tritón X-100 0.25% en PBS por 2 h a temperatura ambiente, incubadas 16 h con anti-GFP (1:500; Invitrogen, AB6455), lavadas e incubadas con anti-rabbit FITC (1:250; Jackson Immunoresearch Laboratories, 711-095-152). Luego pretratadas en 0.1 N HCl por 6 min a 37°C, seguido por neutralización en PBS por 10 min, después de lo cual se procedió con la inmunohistoquímica usando rat anti-BrdU (1:500; Abcam, AB6326) y luego anti-rat Cy3 (1:500; Jackson Immunoresearch Laboratories, 712-165-153). La inmunofluorescencia contra BrdU fue observada mediante microscopía confocal (BX-DSU, Disk Scanning Unit, Olympus), analizadas usando el programa ImageJ, y ensambladas usando el programa PhotoShop CS3. El número de células BrdU+ fue contado en tres campos diferentes de la zona ventricular lateral de los cerebros E16.5 en dos secciones por embrión, de 5 embriones electroporados tanto con el shControl y como el shCoREST. El porcentaje de células se calculó dividiendo las células GFP+/BrdU+ por el total de células GFP+. Se utilizó t-student para determinar el valor p para la significancia estadística. La comparación fue hecha entre una misma camada.

4.2.13. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad InStat 3 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, EE UU). Los datos corresponden a valores de media \pm error estándar medio (EE). La comparación entre dos grupos experimentales se realizó con t student. Cuando se compararon más de dos grupos se realizó un ANOVA no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) y luego como post-test, una prueba de Dunnett. Se consideró una significancia estadística cuando al menos $p < 0,05$.

5.- Resultados

5.1. Determinación del patrón de expresión espacio temporal de CoREST en la corteza cerebral.

Inicialmente, se examinó la presencia del mRNA de los parálogos de la familia CoREST (conocidos como RCoR 1; 2; 3). Se aislo tejido cortical de embriones en E14.5, luego se realizó cultivo primario y se extrajo mRNA. Paralelamente, se obtuvo mRNA de la línea celular de fibroblastos de raton NIH3T3. El RT-PCR, usando partidores específicos (Tabla 1), mostró señales similares para los tres componentes de la familia CoREST en ambos sistemas celulares. Por lo tanto, se determinó la presencia de los parálogos de CoREST, al menos, a nivel de mRNA (Figura 17).

Trabajos previos han utilizado hibridación *in situ* para evaluar la expresión del mRNA de CoREST en la corteza y otras estructuras cerebrales durante el desarrollo del embrión murino [Tontsch y cols., 2001]. Para investigar el papel de CoREST en el desarrollo de la corteza cerebral de ratón se examinó primeramente su nivel de expresión y distribución a través de la corteza cerebral. Se prepararon extractos totales de corteza en difrentes edades que fueron procesados para análisis de inmuno blot. CoREST fue detectado como una banda de 66 kDa (Figura 18). Esta banda alcanza su mayor intensidad entre P0 y P15, y declina posteriormente, aunque sin desaparecer. Cortezas de ratón en distintas edades fueron seccionadas coronalmente y procesadas mediante inmunofluorescencia contra CoREST [Andrés y cols., 1999]. Para examinar el patrón de distribución de CoREST en la corteza en desarrollo, se procesaron mediante inmunofluorescencia contra CoREST, secciones coroneles en diferentes estadios del desarrollo. La tinción contra CoREST reveló un patrón nuclear en toda la extensión de la corteza cerebral, a excepción de la zona intermedia, en la que se observa una atenuación en la fluorescencia debido a una menor densidad celular (Figura 19 A). La señal de CoREST fue detectada en neuronas Tuj1⁺ de la placa cortical embrionaria (Figura 19 B). Además la señal se detecta en los nichos proliferativos (VZ, SVZ) donde la marca de Tuj1 esta ausente. En el cerebro murino adulto, CoREST es expresado en todas las neuronas de la corteza (Figura 19 C). Estos resultado indican que CoREST está expresado fuertemente en progenitores neuronales, en neuronas corticales post mitóticas tempranas (desarrollo) y en neuronas corticales maduras (animal adulto).

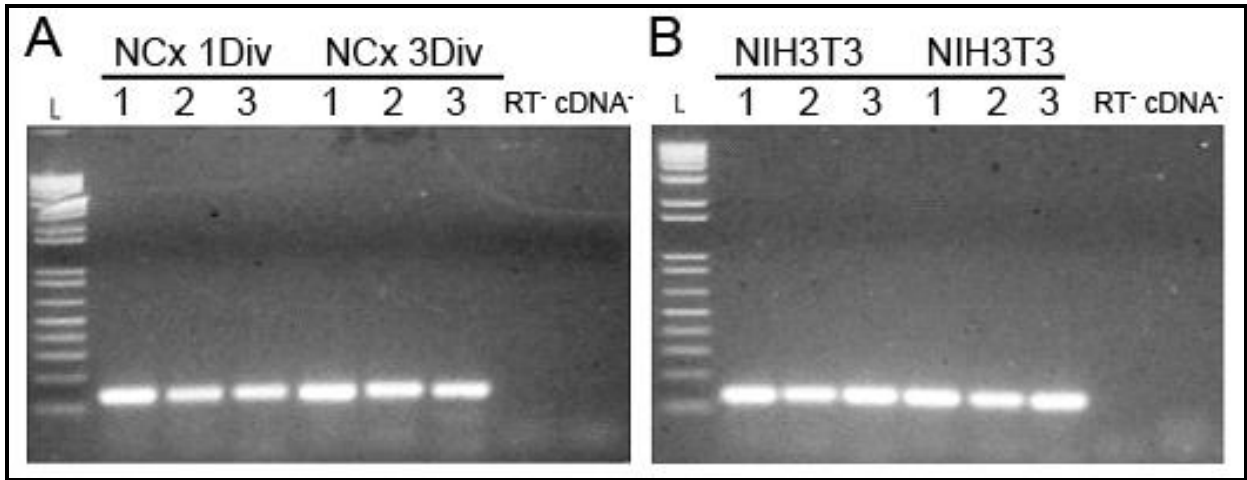


Figura 17. Transcripción reversa acoplada a PCR para determinar la presencia del mRNA de los genes de la familia CoREST. A) Determinación de mRNA de los miembros de la familia CoREST (RCoR) en cultivos primarios de neuronas corticales mantenidas 1 y 3 días in vitro (Div) y **B)** en la línea celular NIH3T3. 1: CoREST/RCoR1 (este estudio); 2: CoREST/RCoR2; 3: CoREST/RCoR3.

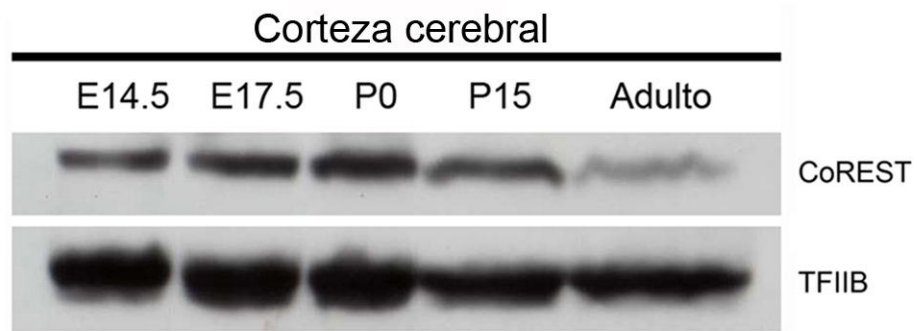
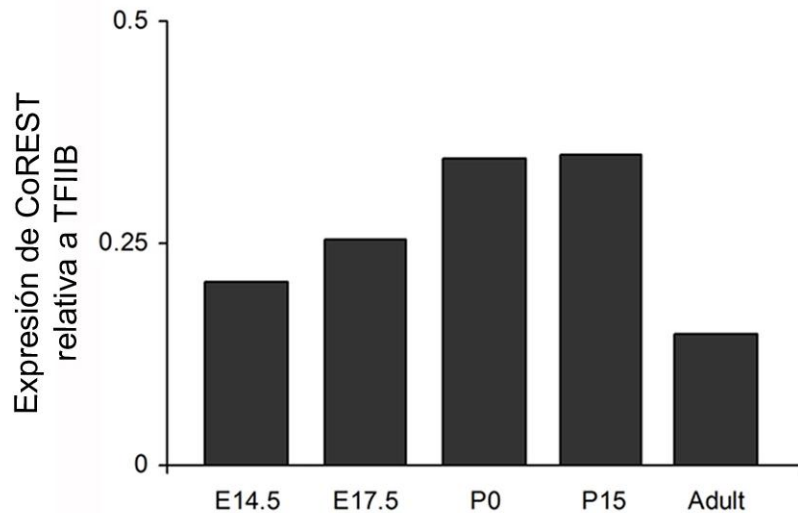
A**B**

Figura 18. Análisis temporal de la expresión de CoREST en la corteza cerebral.

A) El análisis de Western blot en extractos totales de corteza cerebral muestra que CoREST está presente a lo largo del desarrollo. **B)** Análisis densitométrico de la proteína total expresado como razón con TFIIIB. El gráfico muestra que CoREST se expresa en la corteza cerebral durante el periodo neurogénico y a lo largo del desarrollo.

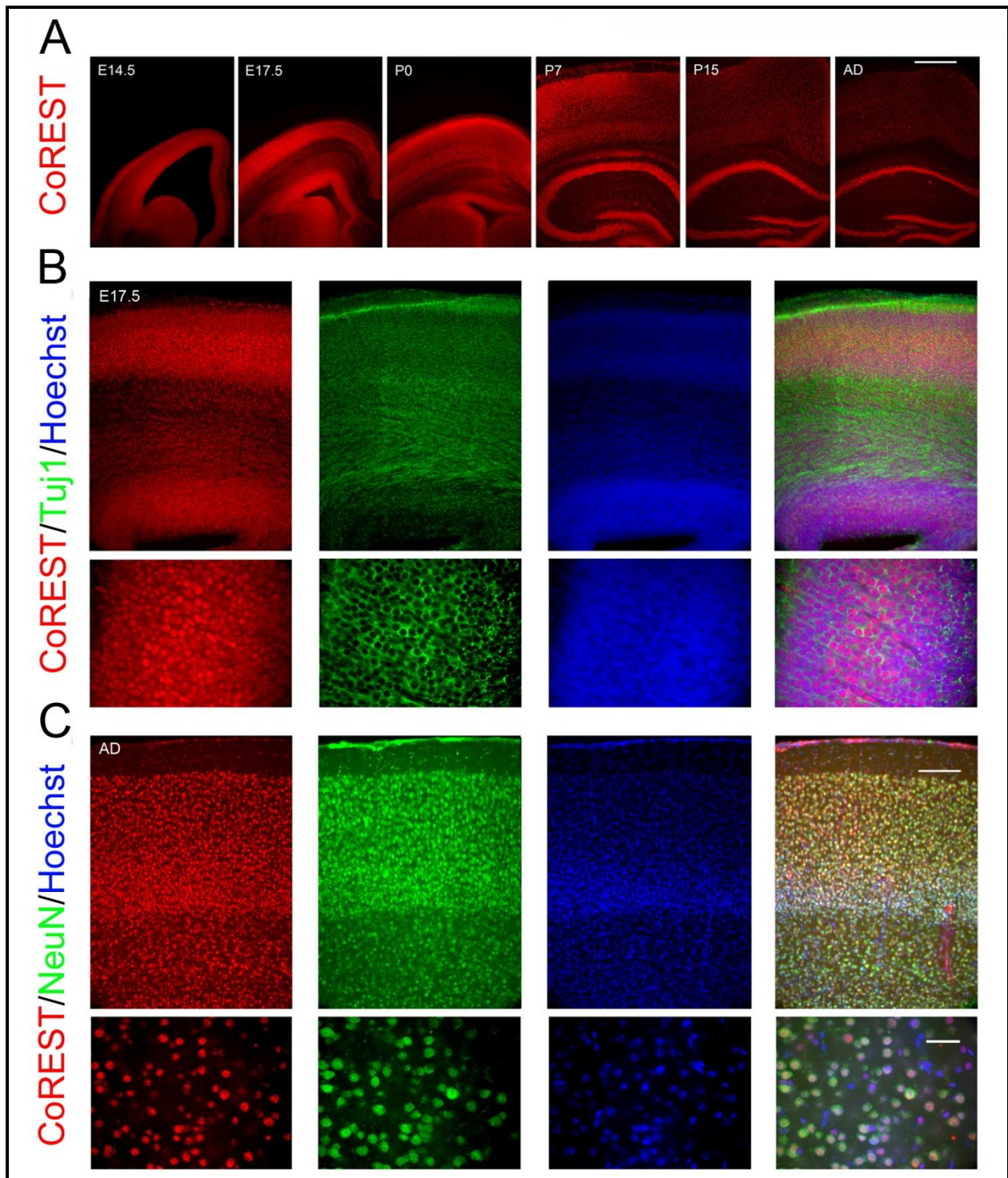


Figura 19. Patrón de expresión de CoREST durante el desarrollo cortical. A) Secciones cerebrales de diferentes estadios del desarrollo sometidas a inmunofluorescencia contra CoREST (rojo). **B)** Co-expresión de CoREST y el marcador de neuronas post mitóticas inmaduras Tuj1 (verde) en E17.5. **C)** CoREST es co-expresado con el marcador panneuronal NeuN (verde) en la corteza cerebral adulta (2 meses). Contra tinción nuclear Hoechst, se muestra en azul, y la superposición de los tres colores se muestra en el panel extremo de la derecha en cada caso. Escala, A: 500 μ m; B, C: 200 μ m; B, C paneles inferiores: 50 μ m.

5.1.2. Desarrollo de procedimientos para inducir la disminución en la expresión y/o función de CoREST *in vivo*.

El desarrollo de procedimientos para inducir la pérdida de expresión y/o función de CoREST (RCoR1) *in vivo* contempló el diseño, generación y electroporación *in utero* de RNAs interferentes (siRNAs) contra CoREST (Tabla 2). Se usó la metodología de horquillas cortas de RNA (shRNAs) para disminuir la expresión de CoREST. Esta estrategia consiste en la transfección de un vector que dirige la expresión de shRNAs mediante promotores de la RNA polimerasa III (H1, en este caso particular). Los shRNAs generados por esta vía son procesados y reconocidos por la maquinaria de RNAi (Risc y Dicer, respectivamente) convirtiéndose en los correspondientes siRNAs.

Los oligonucleótidos que codifican los shRNA candidatos fueron clonados en dos vectores de expresión. pZOFF-GFP fue el vector de expresión utilizado para los experimentos iniciales a corto plazo (transitorios) y pFUXH1-GFP, que además de ser uno de los tres vectores utilizados para producir lentivirus (expresión estable), también puede expresarse de manera independiente y autónoma como plasmidio. Ambos vectores incorporan proteína fluorescente verde (GFP) como gen reportero, lo que permite identificar las células transfectadas y analizar el efecto celular de la disminución en los niveles endógenos de CoREST mediante RNAi.

Para probar la efectividad de los tres shRNAs desarrollados contra CoREST se transfectaron, mediante lipofectamina 2000, los plasmidios que codifican los shRNAs contra CoREST en cultivos de células NIH 3T3. Se realizó inmunofluorescencia para evaluar la disminución en la expresión de CoREST usando el anticuerpo primario apropiado seguido de un secundario acoplado a Cy3 (Figura 20). El análisis cualitativo de la inmunofluorescencia muestra que la expresión de CoREST disminuye fuertemente en células transfectadas con el shRNA-2. Por el contrario, en las células transfectadas con los shRNAs 1 y 3 la expresión de CoREST es similar a la condición control (shRNA inespecífico). Entonces, a partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar el shRNA número 2, designado como shCoREST.

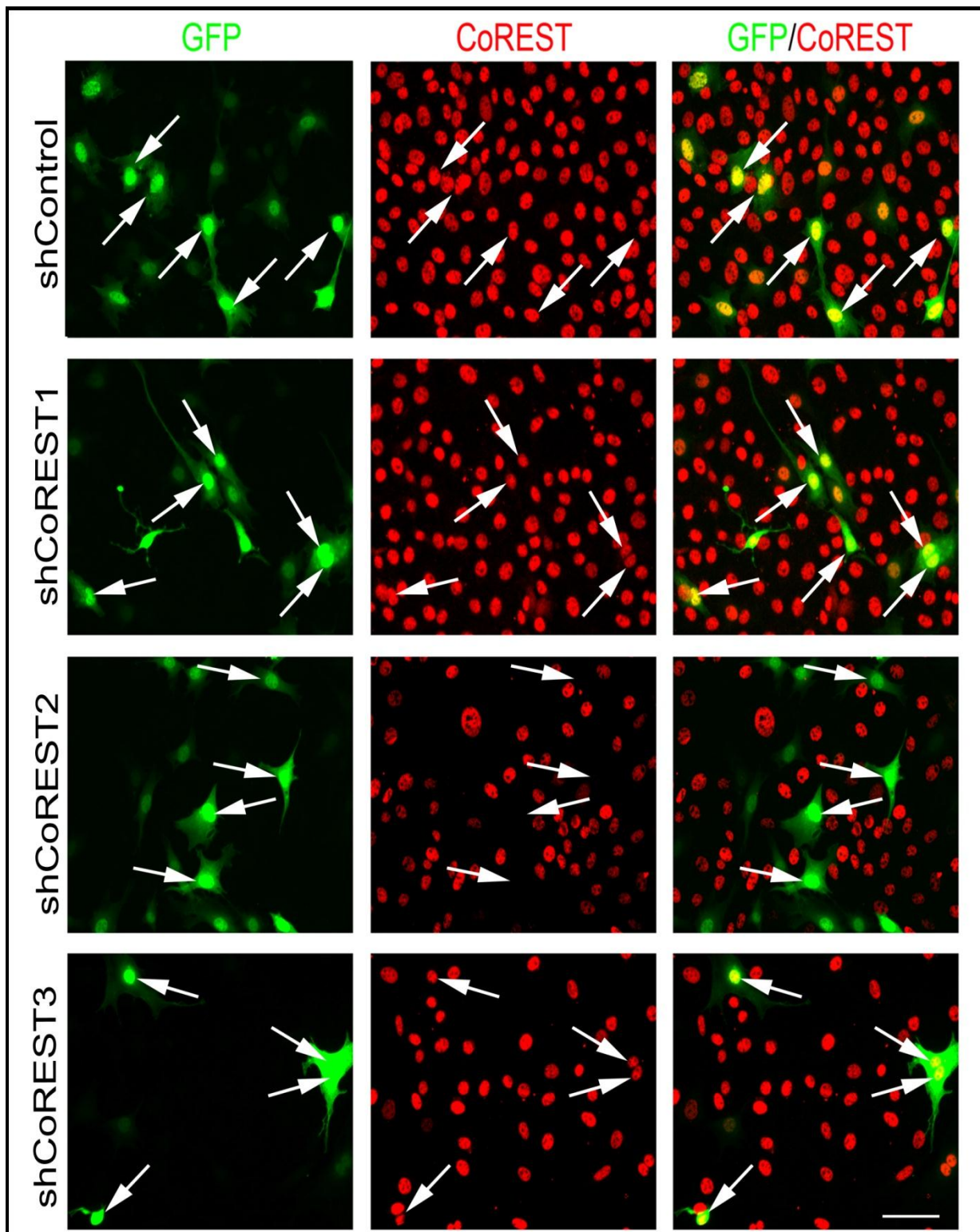


Figura 20. Selección *in vitro* de un shRNA contra CoREST eficiente. La expresión de CoREST fue detectada mediante inmunofluorescencia en la línea celular NIH3T3 72 horas post transfección usando lipofectamina 2000. Tres diferentes construcciones de shRNA contra CoREST fueron probados y el más eficiente, shCoREST2, fue seleccionado para ser usado en los experimentos posteriores. Escala, 200 μ m.

Para confirmar y cuantificar los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia respecto de la especificidad y eficiencia del shCoREST se generó una construcción lentiviral que coexpresa GFP y el shCoREST, para la transducción de cultivos celulares además de cultivos primarios neuronales. Esto permitió realizar experimentos prolongados debido a la inducción estable del proceso de RNAi. Además, dado el porcentaje elevado de células GFP⁺, fue posible analizar por inmunofluorescencia (Figura 21) e inmunoblot la reducción eficiente en la expresión de CoREST en las líneas celulares NIH3T3, Neuro2A (neuroblastoma de ratón). La cuantificación de la densidad relativa de las bandas para CoREST se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el programa Image J. Los resultados mostraron que la transducción del shCoREST en la línea celular NIH3T3 produjo una disminución aproximada del 80% en la relación CoREST/TFIIB con respecto al shRNA control transcurridos 3 días de la infección con el vector lentiviral (Figura 22A). En la línea celular Neuro2A, la relación CoREST/TFIIB se redujo a niveles prácticamente indetectables transcurridos 5 días luego de la transducción con el shCoREST comparado con el shRNA control (Figura 22B).

Adicionalmente, se analizó la temporalidad de la expresión de CoREST en cultivos neuronales corticales (Figura 22C) para luego determinar, cual sería la ventana de tiempo en la que se produciría la disminución en su expresión luego de transducir los cultivos con los vectores lentivirales. Se procedió con la transducción lentiviral de cultivos primarios corticales, los que fueron mantenidos durante 6 días in vitro (DIV), luego se prepararon lisados celulares para ser analizados por inmunoblot. Los resultados obtenidos muestran que el shCoREST reduce en un 98% la expresión de CoREST en neuronas corticales in vitro (Figura 22D).

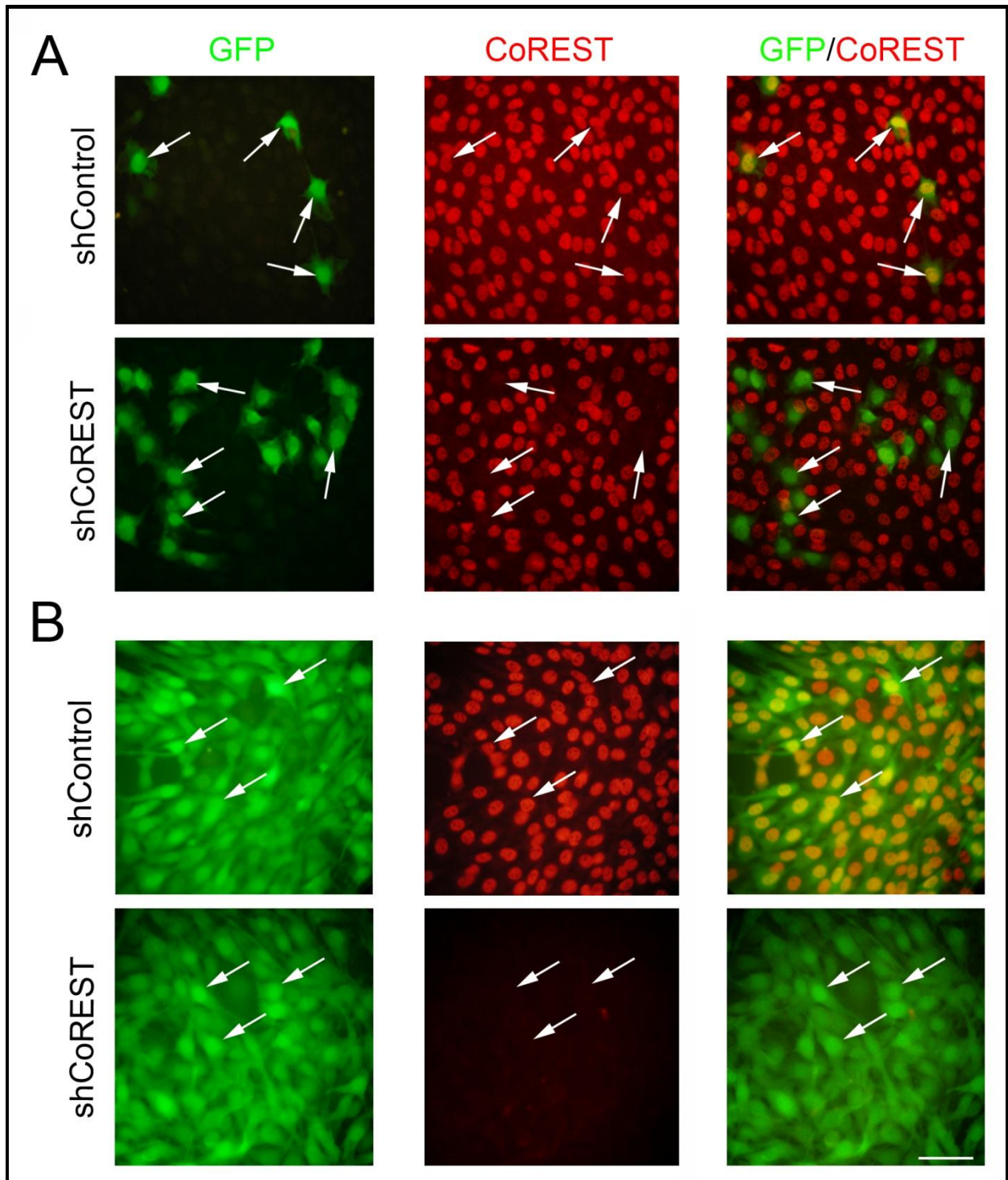


Figura 21. Transducción lentiviral de la línea celular NIH3T3 para determinar interferencia de CoREST. La eficiencia del shCoREST se realizó mediante inmunofluorescencia contra CoREST en cultivos celulares mantenidos 5 días post infección. **A)** Transducción lentiviral usando un título viral bajo. **B)** Transducción lentiviral usando un título viral alto. Escala, 200 μ m.

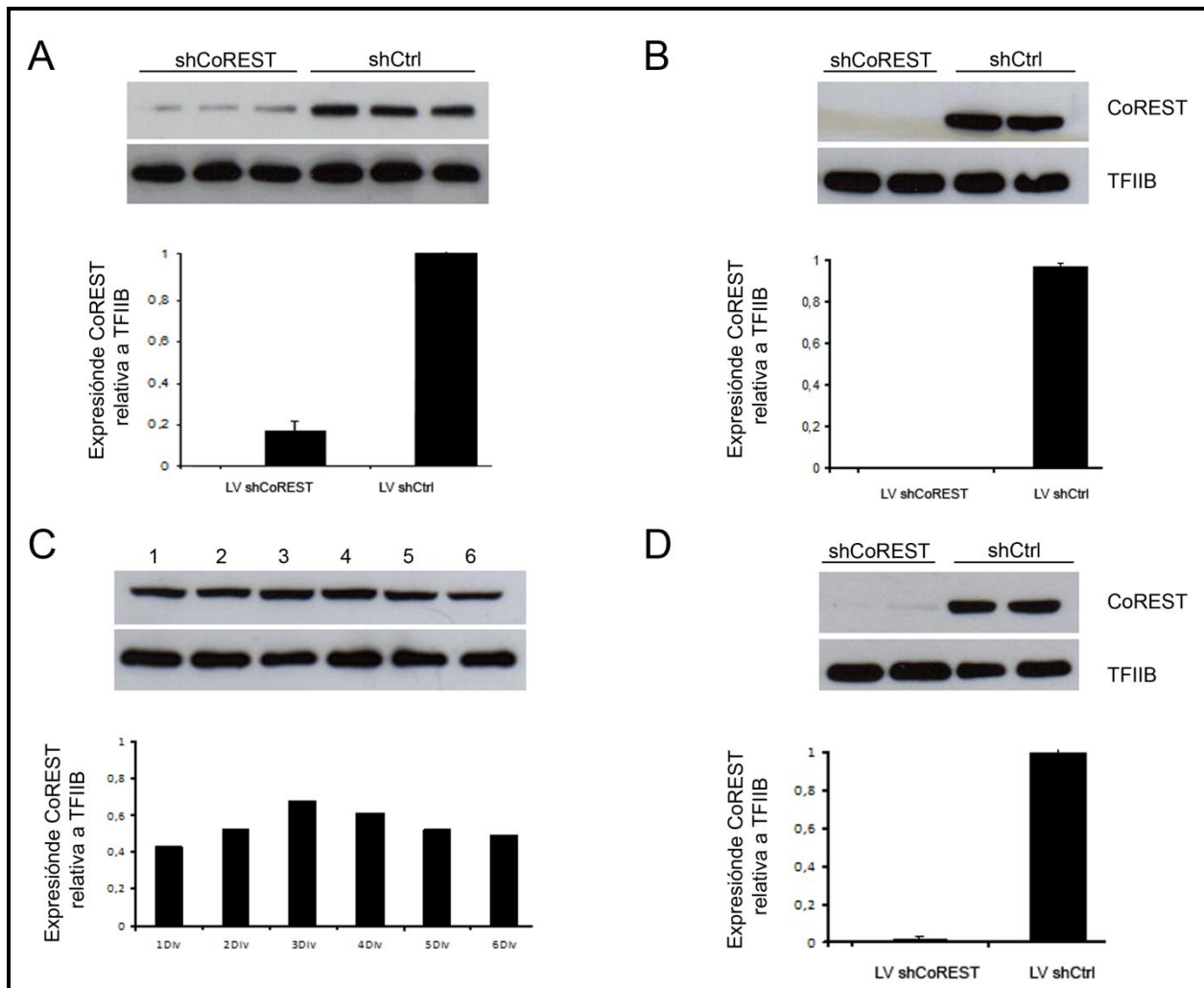


Figura 22. El sistema lentiviral para expresión de shRNA produce una reducción estable y eficiente de CoREST en neuronas corticales. A) shRNA contra CoREST en cultivos celulares NIH3T3 (3d post transducción). **B)** Cultivos de células Neuro2A (5d post transducción). El análisis de western blot muestra una reducción eficiente en la expresión de CoREST. **C)** Se determinó la expresión de CoREST en neuronas corticales mantenidas en cultivo por 1-6 días. **D)** Se verificó la eficiencia del shRNA en la población neuronal cortical (6d post transducción). shCoREST, shRNA contra CoREST; shCtrl, shRNA inespecífico.

La función de CoREST durante el desarrollo o post natal no ha sido estudiada directamente; la mayor parte de la información existente proviene de estudios realizados en sistemas *in vitro* e *in silico*. Por lo tanto, para analizar la función *in vivo* de CoREST, se desarrolló la estrategia de RNAi *in utero* (Figura 16) para manipular la expresión de CoREST en una región cortical específica del cerebro murino en desarrollo (corteza somatosensorial) [Saito, 2006]. Se transfectaron *in utero* vectores que codifican GFP junto con los shRNA-CoREST y shRNA-control en el día embrionario 14.5 (E14.5) en la zona ventricular telencefálica dorsal, correspondiente a la población de progenitores neurales que da origen a las neuronas de piramidales corticales de las capas II/III de la corteza post natal. Luego de la electroporación, los embriones continuaron su desarrollo normalmente; 3 días después, se prepararon secciones coronales (60 μm) de los cerebros electroporados (GFP⁺), que fueron sometidas a inmunohistoquímica para determinar la eficiencia *in utero* del RNAi. Las secciones obtenidas de cerebros transfectados con el shRNA-2 muestran una disminución en la inmunoreactividad de CoREST coextensiva con las células GFP⁺, demostrando que el proceso de RNAi por electroporación *in utero* (EIU) es un medio efectivo para disminuir los niveles de proteínas blanco *in vivo* (Figura 23).

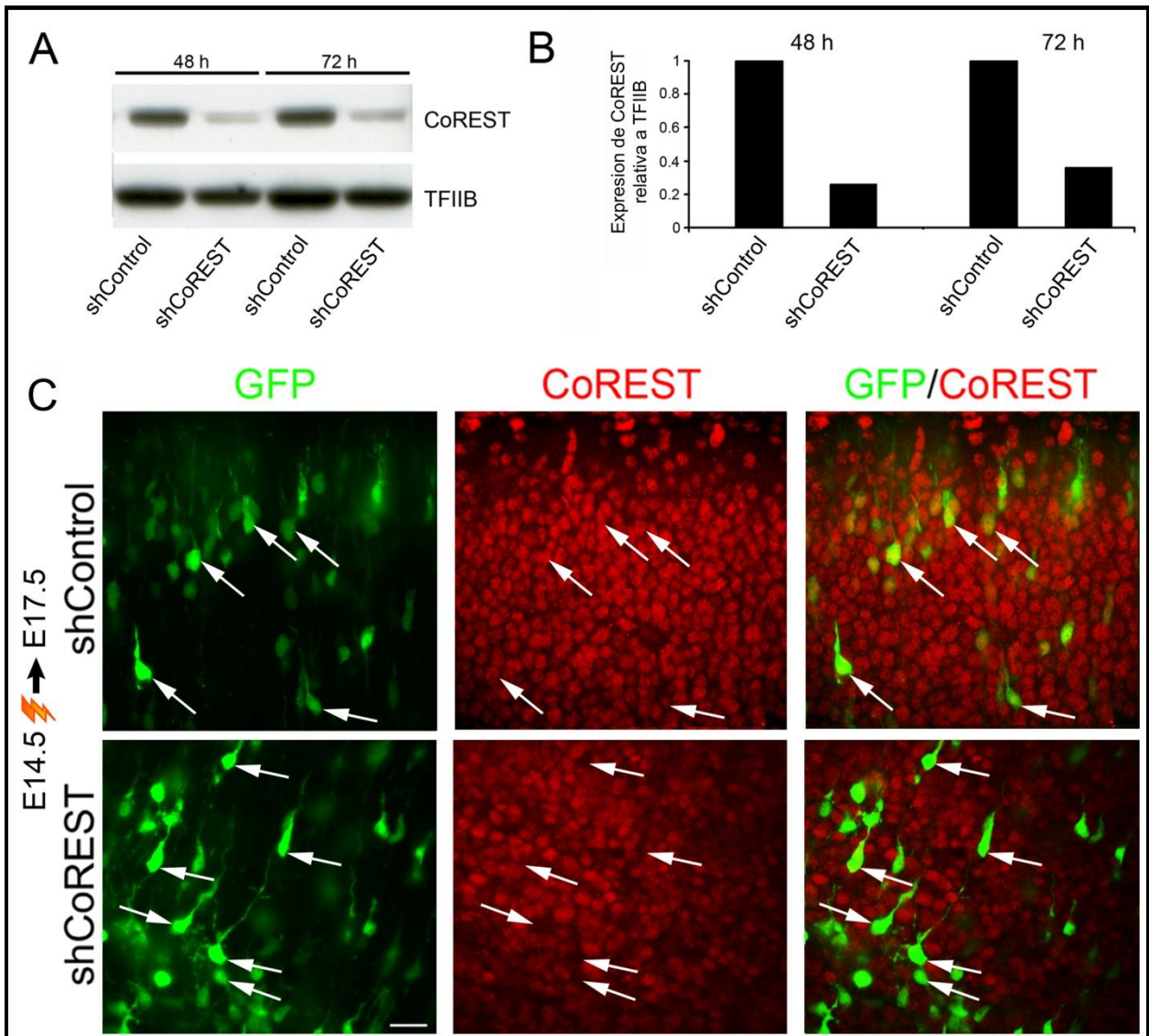


Figura 23. RNAi de CoREST in vivo mediante electroporación *in utero* de plasmidios que codifican shRNA. A, Prueba de la eficiencia de shCoREST mediante lipofección en la línea celular Neuro2a 48 y 72 horas post transfección. B, Las secciones obtenidas de cerebros transfectados con el shCoREST muestran una menor inmunoreactividad de CoREST en las células eGFP⁺. Escala, 50 μ m.

5.2....Evaluación de las consecuencias de la disminución en la expresión y/o pérdida de función de CoREST en el contexto histológico normal de la corteza cerebral.

Si la función de CoREST normalmente reprime la expresión de genes neuronales en tejidos no-neuronales, en progenitores neurales y neuronas inmaduras, la disminución y/o pérdida prematura en la función de CoREST podría iniciar prematuramente el proceso de diferenciación neuronal, generar cambios en el patrón migratorio o en la morfología celular; de manera alternativa, la pérdida de función de CoREST, podría mantener la población de progenitores neurales en un estado de diferenciación intermedio, en el que aún mantengan su capacidad proliferativa pero con un potencial de diferenciación más restringido.

Debido a la existencia de múltiples posibilidades, en una primera instancia se evaluó la migración y morfología de las células transfectadas, considerando los siguientes aspectos: (i) posición y distribución celular, (ii) morfología dendrítica/axonal, considerando criterios como longitud axonal, número de dendritas y de ramificaciones. Estos parámetros fueron evaluados en secciones corticales coronales de embriones electroporados *in utero*, mediante inmunofluorescencia del marcador general eGFP (plasmidial) [Tsai y cols., 2005; Yokota y cols., 2007].

Para estudiar el efecto *in vivo* de la pérdida de función de CoREST durante la diferenciación neuronal cortical, se utilizó EIU con el propósito de introducir las construcciones plasmidiales shCoREST y el shRNA control en la pared dorso-lateral telencefálica de embriones murinos en E14.5. El efecto sobre la migración neuronal se determine analizando la posición de células en la pared cortical de la corteza somatosensorial en desarrollo (Figura 16) regionalmente dividida en distintas zonas de acuerdo al estadio del desarrollo en que se recolectaron los animales (CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular). Cuando se compararon con las células electroporadas con el shControl (shRNA no específico), se observó que las células electroporadas con el shCoREST desarrollaron un defecto en su capacidad para salir de la VZ (shControl, $14.3 \pm 2.2\%$ y shCoREST, $33.2 \pm 4.3\%$) y alcanzar la CP (shControl, $36.2 \pm 3.3\%$ y shCoREST, $14.03 \pm 1.7\%$) (Figura 24A).

El análisis realizado de E14.5 a día post natal 0 (P0), edad en la que las neuronas de proyección han completado el proceso migratorio radial, y en concordancia con la literatura existente, mostró que la electroporación de la construcción control no afectó el

patrón normal de migración de las células GFP⁺ desde la VZ hacia la CP. En contraste, las células transfectadas con el shRNA dirigido contra CoREST aún evidencian un comportamiento migratorio anormal, manifestado por el número de células que alcanza la CP comparado con el shControl (CP: shCoREST, 52.5 ± 6.8% y shControl, 94.2 ± 1.6); en lugar de ello, las células permanecieron dentro de la IZ, SVZ, y VZ de la neocorteza (Figura 24B) [Bai y cols., 2003; Tsai y cols., 2005; Nguyen y cols., 2006; Wang y cols., 2006; Ohshima y cols., 2007; Young-Pearce y cols., 2007].

Mientras se desplazan hacia la CP, las neuronas están sujetas a cambios morfológicos. Las neuronas inmaduras adquieren de manera transitoria un fenotipo multipolar, con múltiples procesos, quedando confinadas dentro de la SVZ y la parte baja de la IZ, la que se conoce también como zona pre-migratoria. Luego, las neuronas cambian su forma multipolar re-estableciendo su morfología uni/bipolar antes de comenzar su proceso migratorio radial desde la zona pre-migratoria a la CP. Esta transición “dentro y fuera” de la etapa multipolar constituye un “punto crítico” a las interrupciones en la migración de las neuronas de la neocorteza [Kriegstein y Noctor, 2004; Lo Turco, 2006; Wang y cols., 2006]. Por lo tanto, la morfología multipolar se podría asociar con “inmovilidad”, por lo que se relaciona con la distribución en zonas proliferativas (VZ/SVZ) y la zona intermedia; y la morfología bipolar está asociada con el proceso de migración radial, por lo que, se le relaciona con las capas corticales superiores (no proliferativas).

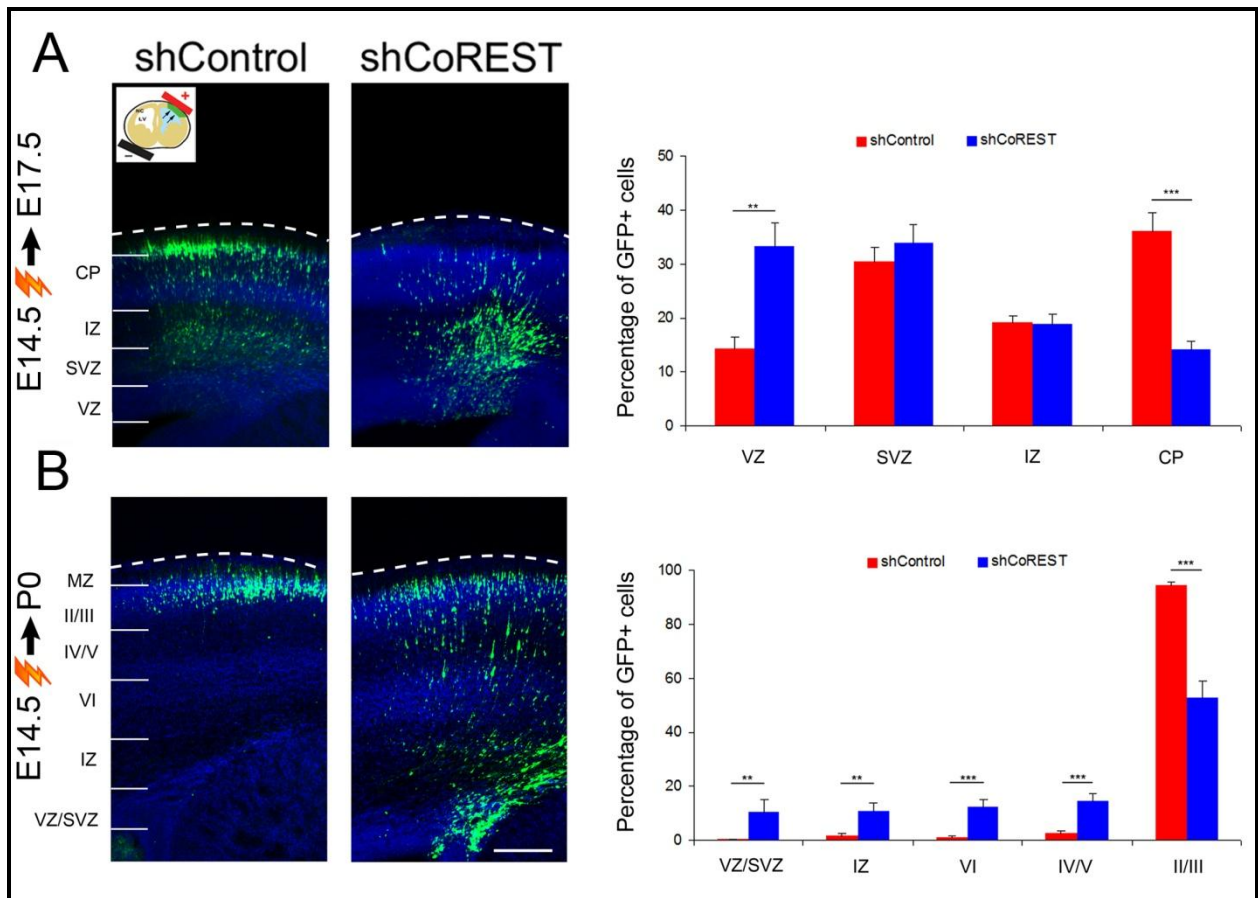


Figura 24. Análisis temporal de la pérdida de función de CoREST durante la migración radial en la corteza cerebral en desarrollo. La interferencia de CoREST retrasa la migración fuera de las capas VZ, SVZ de la corteza en desarrollo. Secciones coronales del telencéfalo dorsal de ratón que fueron electroporadas en E14.5 con los plasmidios shControl y shCoREST y luego continuaron el desarrollo hasta la edad indicada. Los límites entre las regions de la corteza en desarrollo (VZ, SVZ, IZ, CP) y las capas corticales (MZ, II-VI) se indican a la izquierda de cada imagen. Los gráficos representan la media \pm error estandar (EE). Se analizaron entre 7 y 10 embriones. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; análisis mediante prueba "t" de *student*. Escala, 500 μ m.

Además del defecto migratorio, las neuronas con disminución de CoREST también presentan anomalías morfológicas. Transcurridos 3 días luego de la electroporación en E14.5, la mayoría de las células transfectadas con la construcción control habían re-establecido su morfología bipolar (uni/bipolares: $64.6 \pm 4.3\%$). En contraste, la mayoría de las células tratadas con el shCoREST persisten en su morfología o fase multipolar de la migración radial (uni/bipolar: $33.8 \pm 4.5\%$), resultando en el desarrollo anormal de procesos primarios (Figura 25). Para categorizar las células dentro de la VZ/SVZ, e IZ, las células GFP⁺ presentes en éstas capas fueron consideradas como uni o bipolares si tienen un único proceso conductor y rezagado (“*leading y trailing process*”, respectivamente) o ambos, como multipolares si ellas poseen dos o más procesos con al menos un proceso orientado de manera “no-radial” [Marteau y cols., 2010].

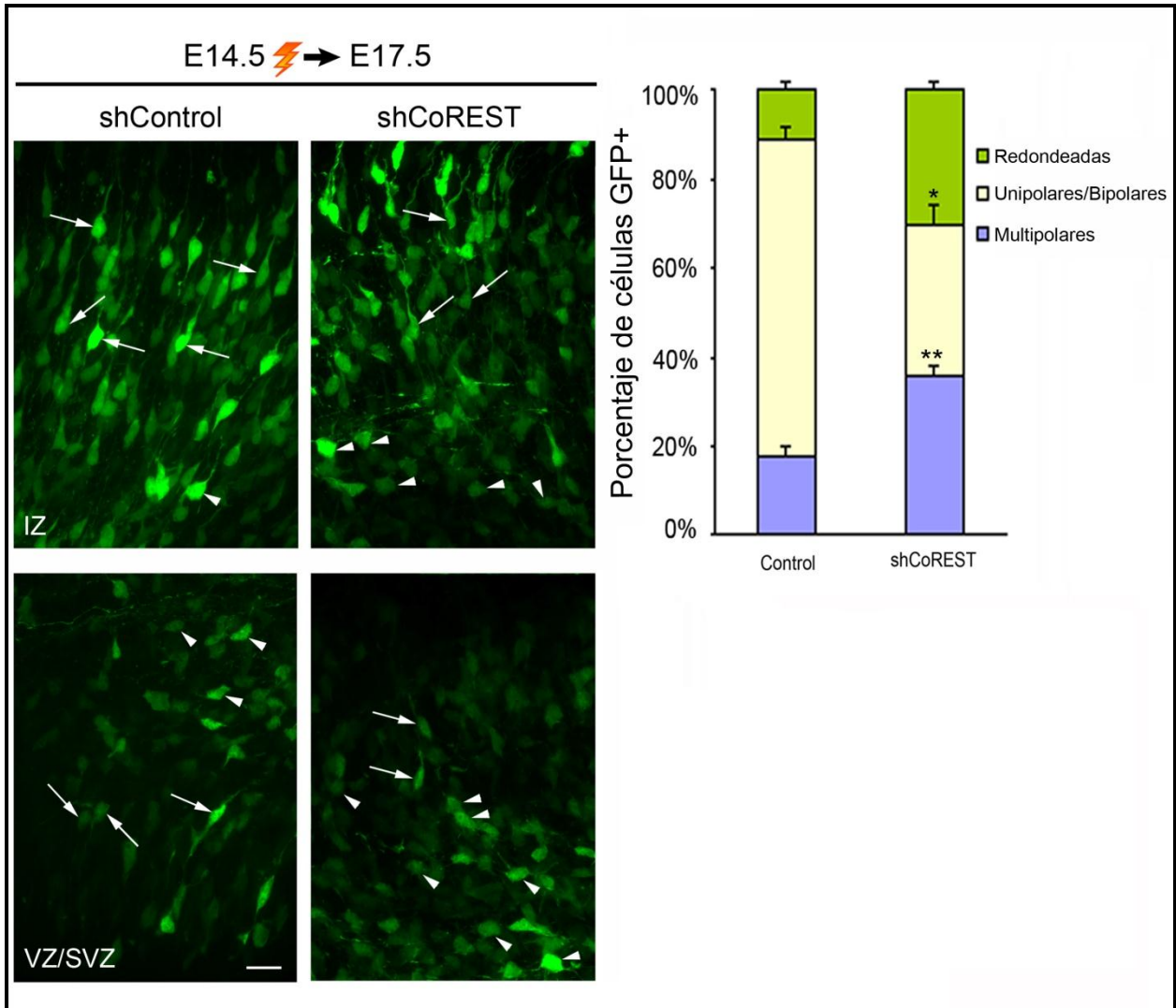


Figura 25. La pérdida de función de CoREST detiene las neuronas en la etapa multipolar de la migración en la interfase SVZ/IZ. Morfología representativa de las células GFP+ en la VZ/SVZ; IZ (zona pre migratoria) de secciones cerebrales electroporadas con el shControl o el shCoREST. Luego de 3 días las neuronas en la condición control se desplazan hacia la CP adoptando la forma unipolar/bipolar típica. En contraste, las neuronas tratadas con el shCoREST presentan procesos neuríticos en múltiples direcciones, presentando una morfología multipolar. A la derecha se observa la cuantificación de la proporción de células GFP+ unipolares/bipolares y multipolares a través de la zona pre migratoria. El gráfico representa la media \pm EE. Se analizaron 4 embriones en cada condición. Un promedio de 30 células fue contado por campo en cada sección. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; análisis mediante prueba "t" de student. Escala, 50 μ m.

Con el propósito de verificar que este resultado no se debió a un efecto inespecífico (“*off-target*”) del shRNA contra CoREST, se intentó recuperar el defecto en el posicionamiento neuronal con la sobreexpresión de CoREST. Para esto se co-electroporaron el shCoREST con una construcción plasmidial (pCoREST^f) que posee 9 mutaciones puntuales silentes en la secuencia blanco del shRNA resultando en una forma de CoREST insensible a la interferencia. El defecto en la migración radial inducido por el shCoREST (VZ: $33.2 \pm 4.3\%$; CP: $14.03 \pm 1.7\%$) fue revertido por la sobre expresión de CoREST (VZ: $16.4 \pm 3.8\%$; CP: $28.7 \pm 4.9\%$) demostrando que estos efectos son producto de la disminución específica de la expresión de CoREST (Figura 26).

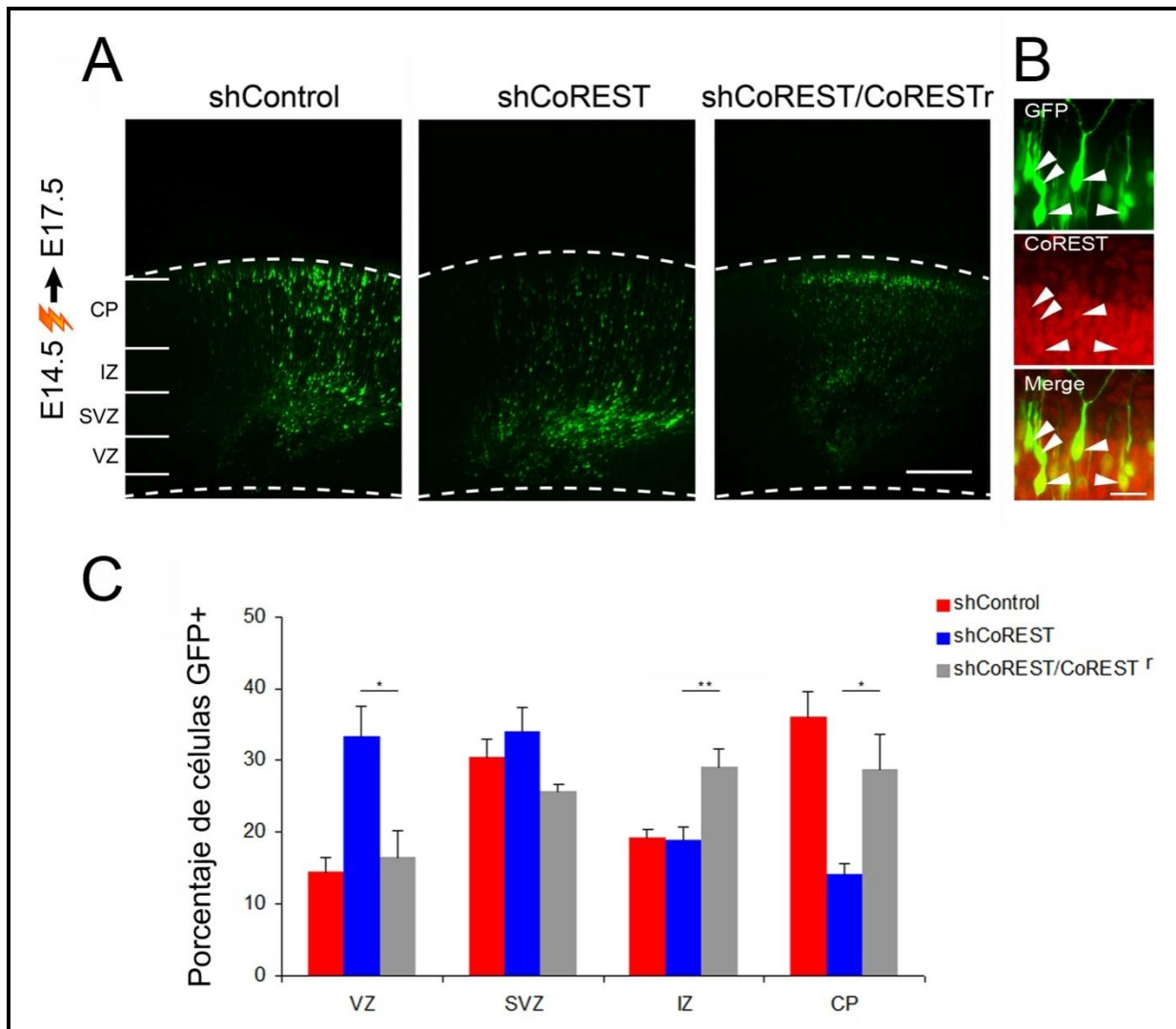


Figura 26. La interferencia de CoREST afecta la migración de las neuronas post mitóticas de proyección, defecto que es rescatado por la co-expresión de la forma CoRESTr en estas neuronas. A) Distribución representativa de células GFP+ en E17 tres días después de la electroporación. **C)** Cuantificación de la distribución de las neuronas GFP+. La electroporación del plasmidio control produce un fenotipo migratorio normal. El shCoREST resulta en un defecto en la posición celular. La co-electroporación de la forma de CoREST insensible a la interferencia junto con el shCoREST recupera el fenotipo migratorio que resulta de la interferencia de CoREST. Los gráficos representan la media \pm EE. Se analizaron 5 embriones de dos experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; análisis mediante prueba "t" de *student*. Escala, A: 500 μ m; B: 50 μ m

5.2.1. Determinación del efecto de la disminución de CoREST sobre el patrón de expresión de proteínas asociadas con distintos estados de diferenciación neuronal.

CoREST fue descrito inicialmente como un co-represor del factor de transcripción REST/NRSF [Andres y cols., 1999], propuesto como un elemento regulador fundamental de la vía de señalización neurogénica, y cuya función es controlar la expresión de un grupo amplio de genes neuronales [Ballas y cols., 2001, 2005]. Diversos estudios han mostrado que la activación de los genes blanco del sistema represor REST-CoREST resulta suficiente para convertir progenitores neurales al fenotipo neuronal [Su y cols., 2004; Abrajano y cols., 2009; Abrajano y cols., 2010]. Como se mencionó anteriormente, la generación de neuronas a partir de progenitores neurales involucra una serie de eventos celulares coordinados estrechamente, como salida del ciclo celular, inicio de la diferenciación neuronal, y migración celular. Sin embargo, los mecanismos que modulan la integración entre estos eventos durante el programa de desarrollo cortical no han sido dilucidados.

Puesto que CoREST parece estar involucrado en el proceso de diferenciación neuronal, es posible que los defectos observados durante la migración radial, y en la polaridad celular de las neuronas corticales fueran consecuencias secundarias de un proceso de diferenciación neuronal defectuoso. Entonces, las células retenidas en las zonas proliferativas, VZ/SVZ e IZ, (i) podrían persistir en su estado proliferativo indiferenciado, (ii) eventualmente podrían corresponder a células con expresión temprana de genes neuronales y de esta manera alterar el proceso migratorio, (iii) podrían expresar proteínas asociadas normalmente con otros linajes celulares (astrocitos), (iv) o podrían migrar masivamente hacia las zonas superiores de la corteza conservando su potencial proliferativo.

Para determinar si los defectos en el proceso de migración tras la pérdida de función de CoREST se deben a una alteración en el estado de diferenciación de los linajes celulares presentes en la corteza cerebral, se analizó la expresión de proteínas asociadas con distintos estadios de diferenciación en las poblaciones celulares presentes en las distintas zonas de la corteza en desarrollo, como el marcador neuronal temprano Tuj1 (β -tubulina III), Vglut (marcador de neuronas piramidales

glutamatérgicas), Sox2 (células neuroepiteliales y glia radial), y Tbr2, expresado por la población de progenitores intermedios.

La función de CoREST ha sido vinculada con la especificación de linajes celulares neurales [Qureshi y cols., 2010]. De acuerdo a lo anterior se investigó la adquisición del destino celular final de las células electroporadas con el shCoREST que salen de la VZ/SVZ, entran a la zona premigratoria (IZ), y alcanzan luego la CP. Los resultados muestran que todas las células depletadas de CoREST en estas etapas expresan Tuj1 (Figura 27 A y B, paneles superiores) y Map2 (dato no mostrado), mientras que ninguna expresó marcadores gliales, como GFAP (dato no mostrado). Esto indica que CoREST en nuestras condiciones experimentales no influencia la adquisición del fenotipo neuronal. Al mismo tiempo, se evaluó la expresión del transportador vesicular de glutamato, Vglut, y se encontró un patrón de expresión indistinguible de aquel observado en las células control (Figura 27 C y D, paneles inferiores), y correspondiente con los reportes realizados mediante hibridación in situ [Ina y cols., 2007].

Se examinaron entonces las células depletadas de CoREST que permanecían en la VZ/SVZ en E17.5, ya que este fue el defecto que se podía apreciar más tempranamente tras la interferencia de CoREST, y surgió la interrogante respecto a si estas células retenían la identidad de precursores neurales, definida por la expresión de los factores de transcripción Sox2 y Tbr2. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación muestran que 32.4 ± 2.4 % de las células electroporadas con el shRNA contra CoREST expresaban Sox2 en E17.5 en comparación con el 14 ± 2.9 % de la población control ($n=5$, $p<0.005$) (Figura 28 A, B, E).

Adicionalmente, 36.1 ± 2.8 % de las células electroporadas con el shCoREST expresaron Tbr2, mientras que un 15.0 ± 2.7 % de los controles expresa dicho marcador controls ($n=5$, $p<0.05$) (Figura 28 C, D, F). Estos resultados sugieren que la disminución de CoREST altera etapas tempranas del desarrollo neuronal, incluyendo las transiciones entre poblaciones de precursores neurales.

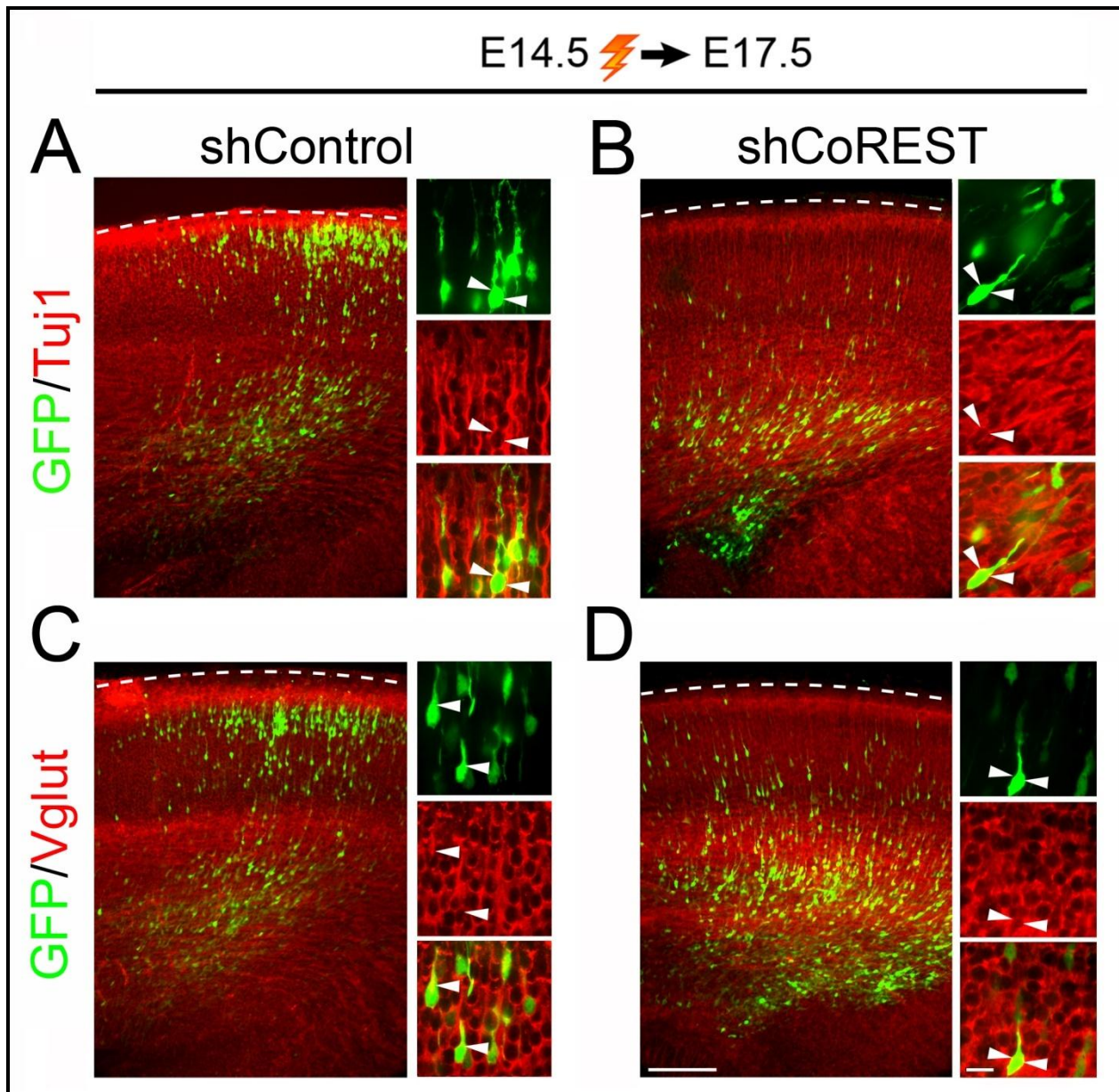


Figura 27. Caracterización de la identidad neuronal de las células electroporadas con las construcciones control y shCoREST. **A, B)** Tres días después de la electroporación en E14.5 la disminución de CoREST no altera la identidad de las neuronas de proyección, siendo ésta similar al control como se muestra por el patrón normal de expresión del marcador de neuronas post mitóticas tempranas, β -tubulina III (Tuj1), y **C, D)** el marcador glutamatérgico Vglut. La co-expresión de los marcadores y GFP fue determinada a mayor magnificación. Cuadros representativos se muestran a la derecha de cada figura principal. Escala, A-D: 200 μ m. Cuadros representativos A-D: 50 μ m

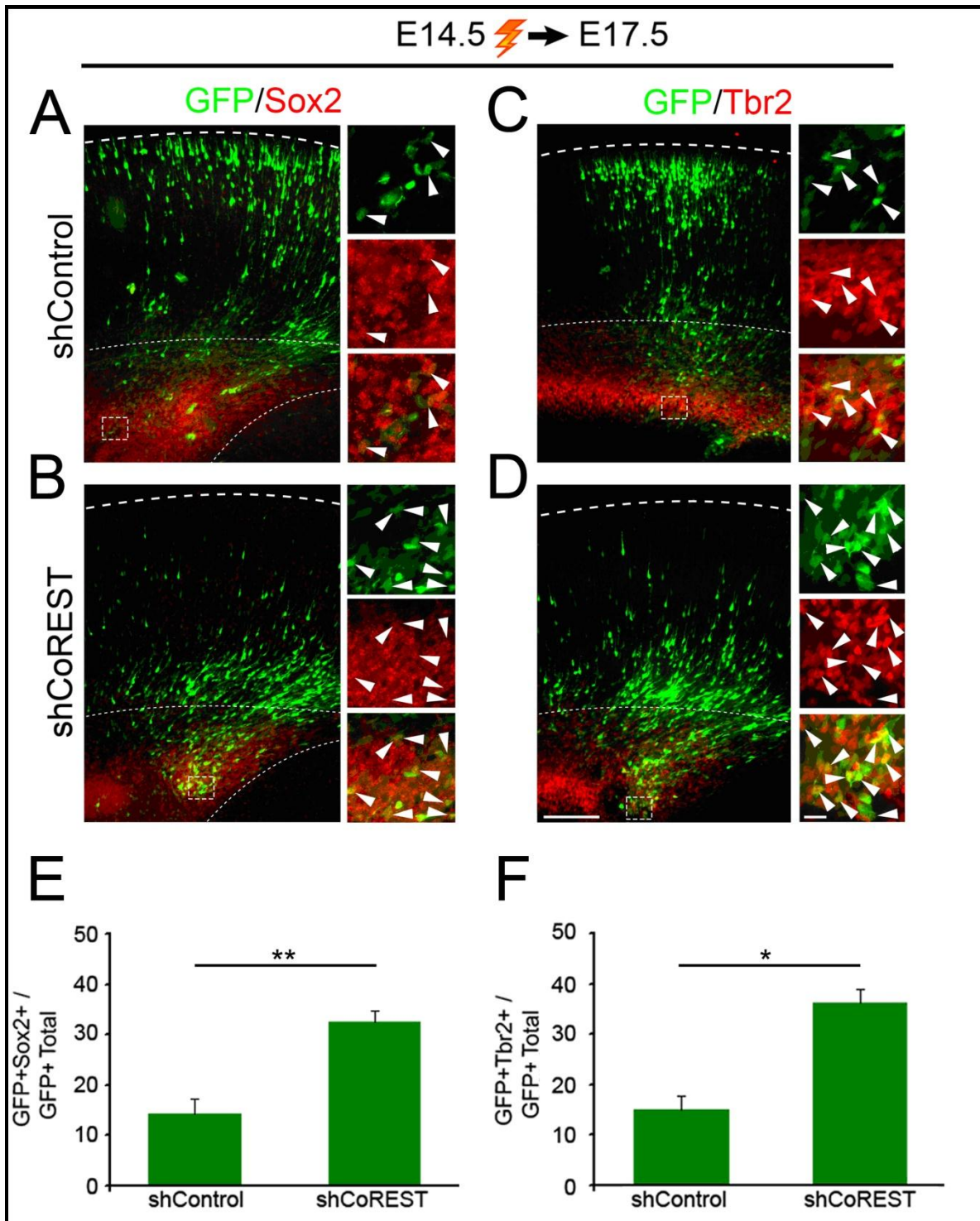


Figura 28. Caracterización fenotípica de las células electroporadas con las construcciones control y shCoREST. A, B) Inmunofluorescencia de Sox2. C, D) Inmunofluorescencia de Tbr2 en E17.5. Co-expresión de los marcadores y GFP fue determinada a mayor magnificación. Cuadros representativos se muestran a la derecha de cada figura principal. Los gráficos representan la media \pm EE. Se analizaron 5 embriones en cada condición experimental. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; análisis mediante prueba "t" de *student*. Escala, A-D: 200 μ m. Cuadros representativos A-D: 50 μ m.

5.2.2. Evaluación de las consecuencias de la disminución en la expresión de CoREST en la sobrevida y proliferación celular.

5.2.2.1. Determinación de la viabilidad celular

La muerte celular programada (apoptosis) ocurre normalmente durante el desarrollo del SNC [Kuan y cols., 2000]. Para determinar si la disminución de neuronas post mitóticas presentes en la placa cortical tras la interferencia de CoREST, así como las alteraciones morfológicas que presentan las células estancadas en las capas inferiores de la corteza son el resultado de anomalías en el proceso de muerte celular, se analizó la expresión de caspasa 3 activa (C3a) mediante inmunofluorescencia. No se observó un incremento en la tinción contra C3a posterior a la interferencia de CoREST (Figura 29).

Para descartar que la ausencia de células apoptóticas se deba a un evento tardío de muerte celular no detectable usando inmunofluorescencia contra caspasa 3 activa, se realizó el ensayo de TUNEL (*“terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick and labelling”*). Este ensayo detecta etapas iniciales de fragmentación en el DNA en células apoptóticas. Esto se llevó a cabo en secciones de cerebros de E17.5 electroporados in utero en E14.5, con el shRNA-control y shRNA-CoREST. Como control positivo se utilizó un cerebro de E17.5 tratado con DNasal.

De igual manera, el número de células TUNEL⁺ no presentó diferencias entre la población control y la población tratada con el shCoREST. De esta manera, se excluye la apoptosis como una explicación para el fenotipo observado (Figura. 30).

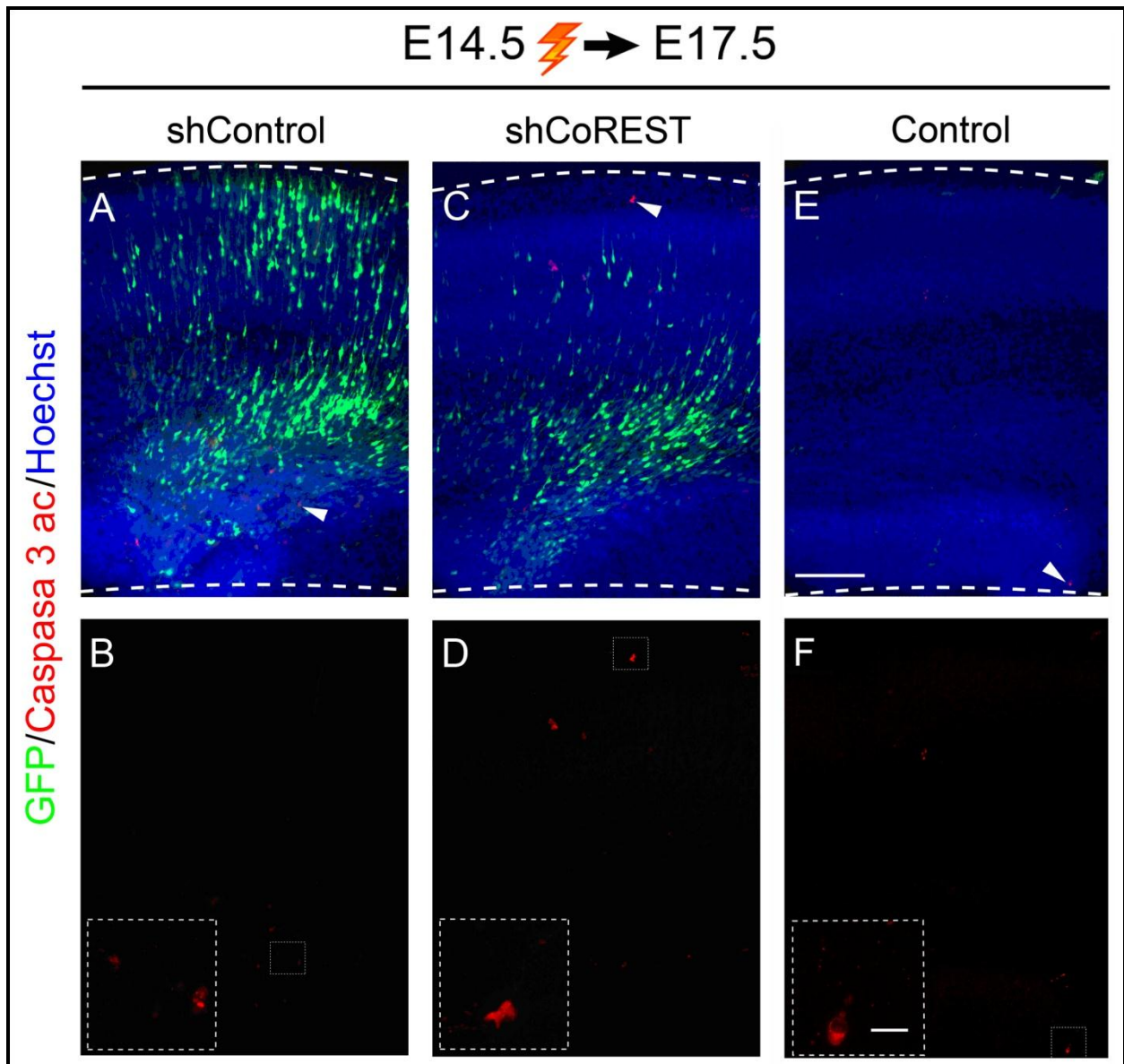


Figura 29. La disminución en la expresión de CoREST no afecta la sobrevivencia de las neuronas corticales postmitóticas. A-D, inmunofluorescencia con anticuerpos anti-caspasa 3 activa sobre secciones cerebrales de E17.5 electroporadas en E14.5 con el shControl y el shCoREST. E-F, sección cerebral sin electroporar mostrando una célula apoptótica como parte de un proceso homeostático. Escala, A-F: 200 μ m. Insertos representativos B, D, F: 50 μ m.

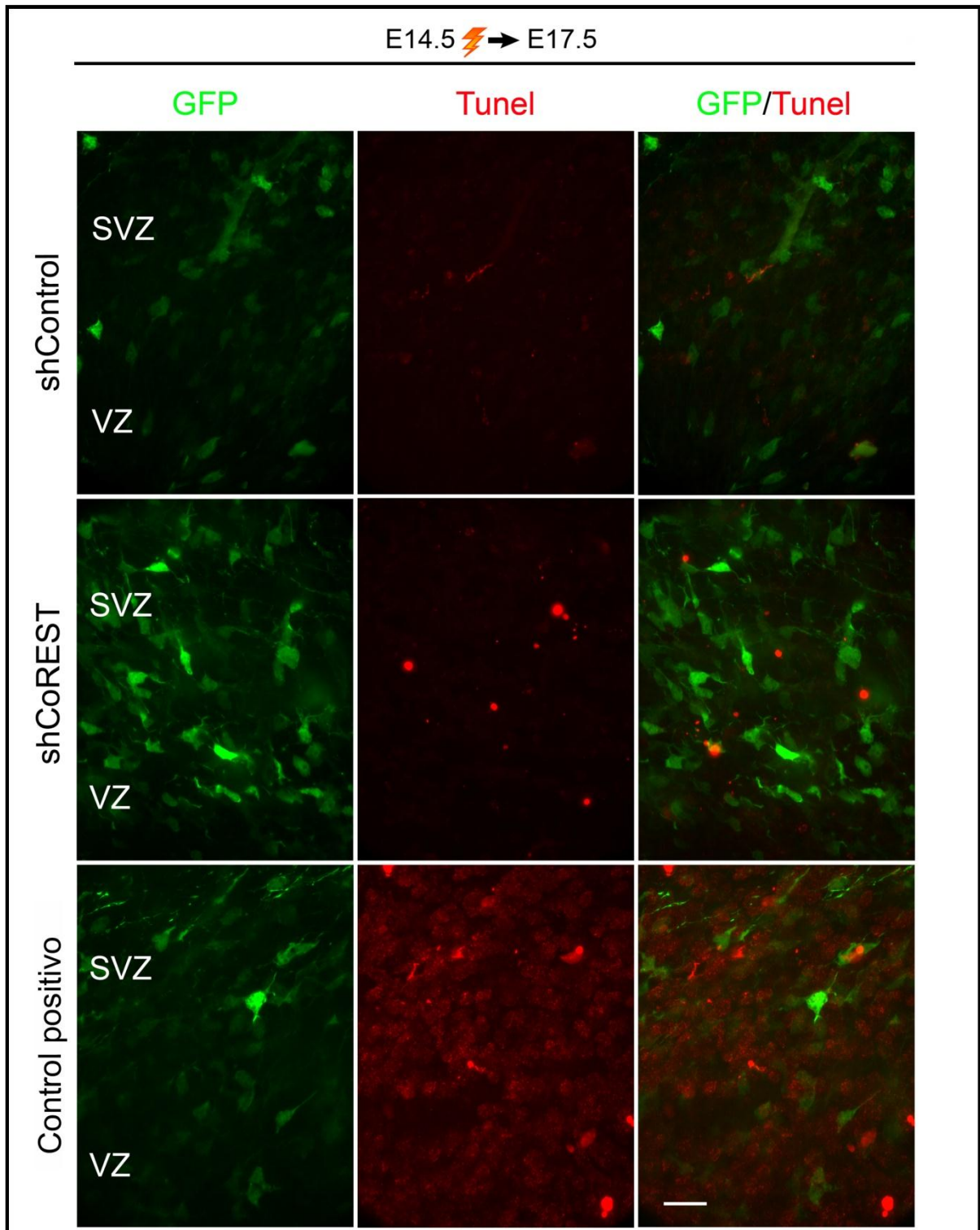


Figura 30. CoREST no está involucrado la sobrevida de las neuronas corticales post mitóticas. A-F) La muerte celular apoptótica fue evaluada usando un ensayo TUNEL fluorescente sobre secciones cerebrales control y electroporadas con el shCoREST. No se observan células GFP+/TUNEL+ en la condición control ni en la shCoREST. Escala, A-F: 200 μ m. Insertos representativos B, D, F: 50 μ m.

5.2.2.2. Análisis de proliferación celular

Para evaluar si CoREST regula la proliferación de los progenitores corticales *in vivo*, embriones de E14.5 fueron electroporados *in utero* utilizando las construcciones control y shCoREST. Posteriormente, en E16.5 se inyectó bromodeoxiuridina (BrdU). BrdU marca células que están en fase S del ciclo celular, de esta forma se permite la identificación de células que están proliferando activamente en esta etapa. Cuatro horas después de inyectar BrdU en la madre, los embriones fueron disectados, y los cerebros procesados para inmunofluorescencia para detectar BrdU en las células electroporadas (GFP⁺). Bajo las condiciones experimentales expuestas, se observó un $21.5 \pm 2.5\%$ de células GFP⁺/BrdU⁺ en la condición control. Mientras que en la condición experimental un $18.9 \pm 1.8\%$ de la población presentó el doble marcaje GFP⁺/BrdU⁺. El análisis estadístico mostró que las diferencias observadas no fueron significativas ($p=0.42$), lo que indica que la pérdida de función de CoREST *in vivo* no regula la proliferación de los progenitores corticales (Figura 31).

Para determinar si la población mayor de progenitores observada en E17.5 tras la pérdida de función de CoREST, corresponde a una población celular activa en relación al ciclo celular, se evaluó la expresión de Ki67 en secciones corticales embrionarias de E17.5. Ki67 es una proteína expresada en todas las etapas del ciclo celular (S, G1/G2, M) a diferencia de BrdU (fase S). Se cuantificó la proporción de células GFP⁺/Ki67⁺ doble positivas en los cerebros electroporados con el shCoREST y se comparó con la proporción en los cerebros controles. Los resultados mostraron que en la condición control hay un $26.6 \pm 2.7\%$ de células GFP⁺/Ki67⁺, mientras que en los cerebros tratados con el shRNA contra CoREST un $37,3 \pm 2.1\%$ de las células GFP⁺ co-expresan Ki67 (Figura 32). Estos resultados muestran una concordancia con la proporción mayor de progenitores Sox2⁺ y Tbr2⁺ encontrados en la condición experimental e indican que aquellos son progenitores que permanecen en el ciclo celular.

Por otra parte, la disminución en la expresión de CoREST llevada a cabo en E14.5, no afectó la morfología de los procesos de las glías radiales marcados con vimentina en E17.5 (Figura 33). Por lo tanto, se descarta que el fenotipo migratorio de las neuronas electroporadas con shRNA-CoREST sea una consecuencia indirecta de

defectos en las glías radiales, los que sirven como sustrato para el proceso de locomoción de las neuronas corticales de proyección.

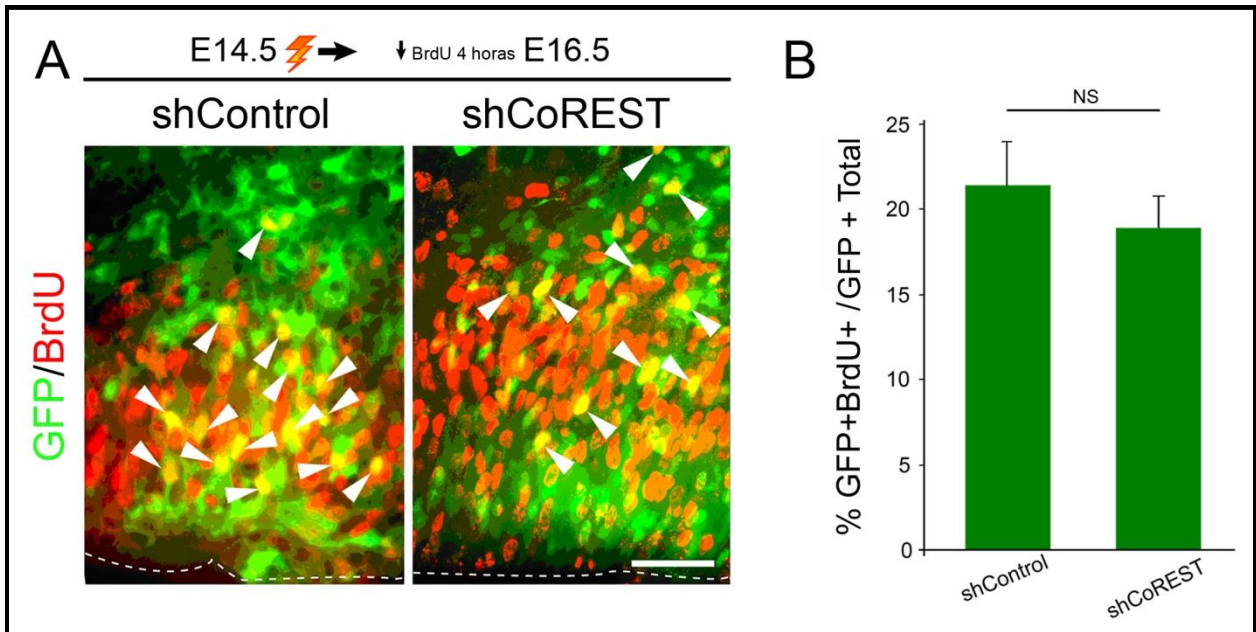


Figura 31. La disminución en la expresión de CoREST no tiene efecto sobre la proliferación celular. A) La inmunofluorescencia para GFP y BrdU en E16.5, dos días después de la electroporación. **B)** Cuantificación de las neuronas GFP+/BrdU+. El gráfico representa la media \pm EE. 8 secciones fueron analizadas de 4 embriones obtenidos de dos camadas en experimentos paralelos. NS, no significativo; análisis mediante prueba "t" de *student*. Escala, 50 μ m.

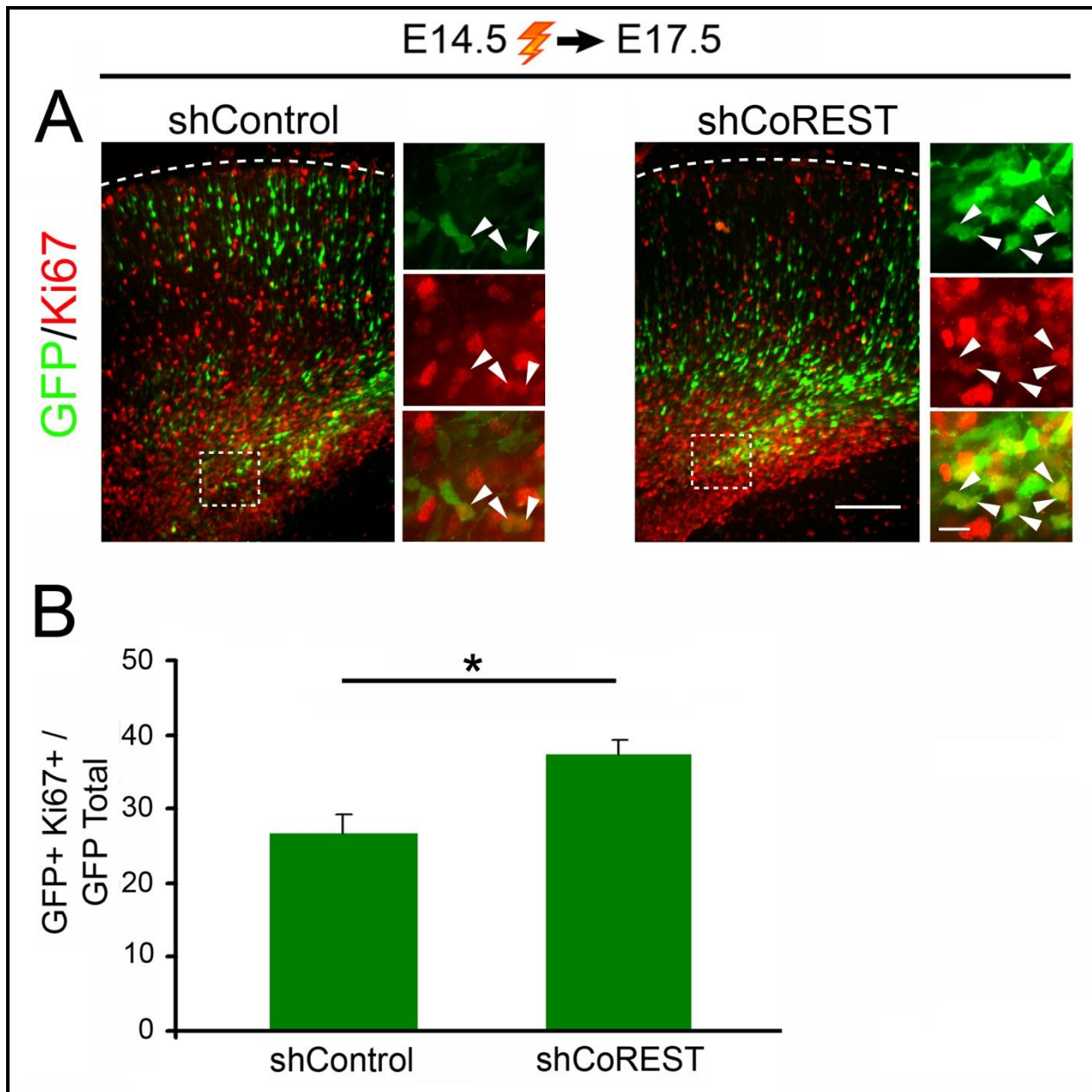


Figura 32. La disminución en la expresión de CoREST incrementa el número de células que se encuentran en el ciclo celular. **A)** Tinción inmunofluorescente contra Ki67 tres días después de la electroporación en E14.5. **B)** Cuantificación de las neuronas GFP+/Ki67+. Se analizaron 4 cerebros. El gráfico representa la media ± EE. * $p < 0.05$; análisis mediante prueba “t” de *student*. Escala, 200 μm .

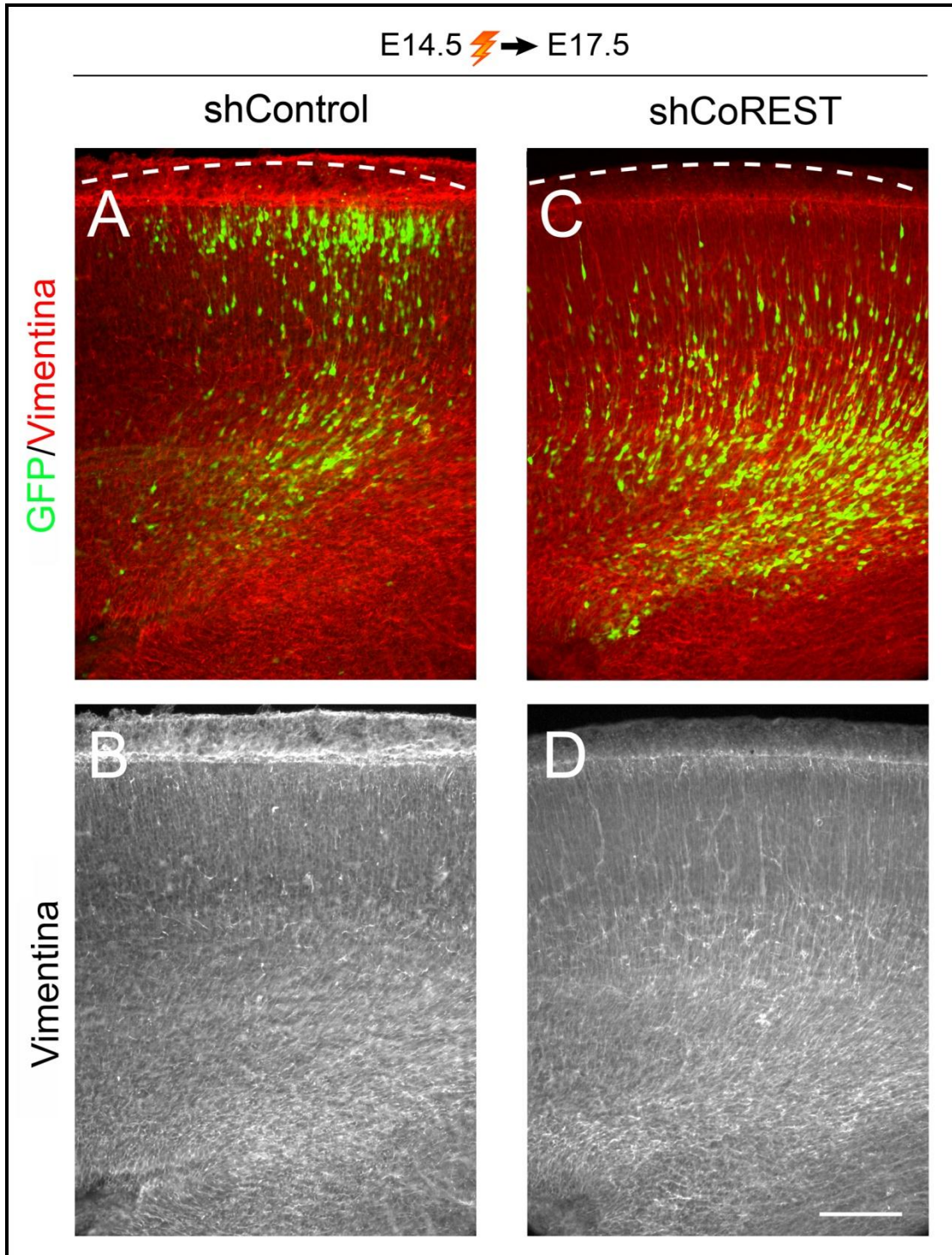


Figura 33. El silenciamiento de CoREST no perturba los procesos de la glia radial en la corteza. A-D) La interferencia de CoREST realizada en E14.5 no afecta la morfología de los procesos radiales gliales marcador con Vimentina (**B** y **D**) en E17.5, descartando así que el fenotipo migratorio de las neuronas deficientes de CoREST (comparar **A** con **C**, células GFP+) sea una consecuencia indirecta de defectos en los procesos gliales, los que sirven como sustrato para la locomoción radial de las neuronas corticales. Escala, 200 μ m.

5.3. Análisis de los mecanismos moleculares por los cuales CoREST modula la generación de neuronas corticales.

Para explorar el mecanismo por el cual CoREST ejerce su efecto sobre la generación de neuronas de proyección durante el desarrollo de la corteza cerebral e identificar los dominios e interactores de CoREST que son necesarios para su función, se llevaron a cabo una serie de experimentos de rescate utilizando versiones truncadas de CoREST desprovistas de dominios importantes para la unión a sus interactores y su función bioquímica (Figura 34). En cada experimento se examinó el parámetro más aparente, la posición de las células GFP⁺ en la corteza. Se cuantificó el número de éstas retenidas en las capas proliferativas (VZ/SVZ), midiendo así la capacidad de las variantes truncadas para rescatar la alteración migratoria causada por la interferencia de CoREST.

La función de CoREST ha sido relacionada a REST/NRSF, propuesto como regulador negativo del proceso de adquisición del fenotipo neuronal. Se co-electroporó en E14.5, el plasmidio que codifica el shRNA contra CoREST junto con una forma truncada de CoREST desprovista del dominio de interacción con REST/NRSF (CoREST Δ N-term) [Ballas y cols., 2001], para probar su capacidad en la recuperación del defecto migratorio (Figura 35 ii). Esta maniobra produjo un fenotipo migratorio normal en E17.5, sugiriendo que CoREST participa en la regulación del desarrollo de las neuronas piramidales a través de mecanismos independientes de la función de REST/NRSF durante el período gestacional estudiado (Figura 35 iii). Adicionalmente, en estudios realizados por el laboratorio, en paralelo a los estudios de esta Tesis, se analizó el papel de REST/NRSF durante el proceso migratorio cortical. Se disminuyó su expresión mediante IUE de un plasmidio codificante para un shRNA contra REST (pshRNA-REST), y no se observaron perturbaciones significativas durante la generación de las neuronas de proyección.

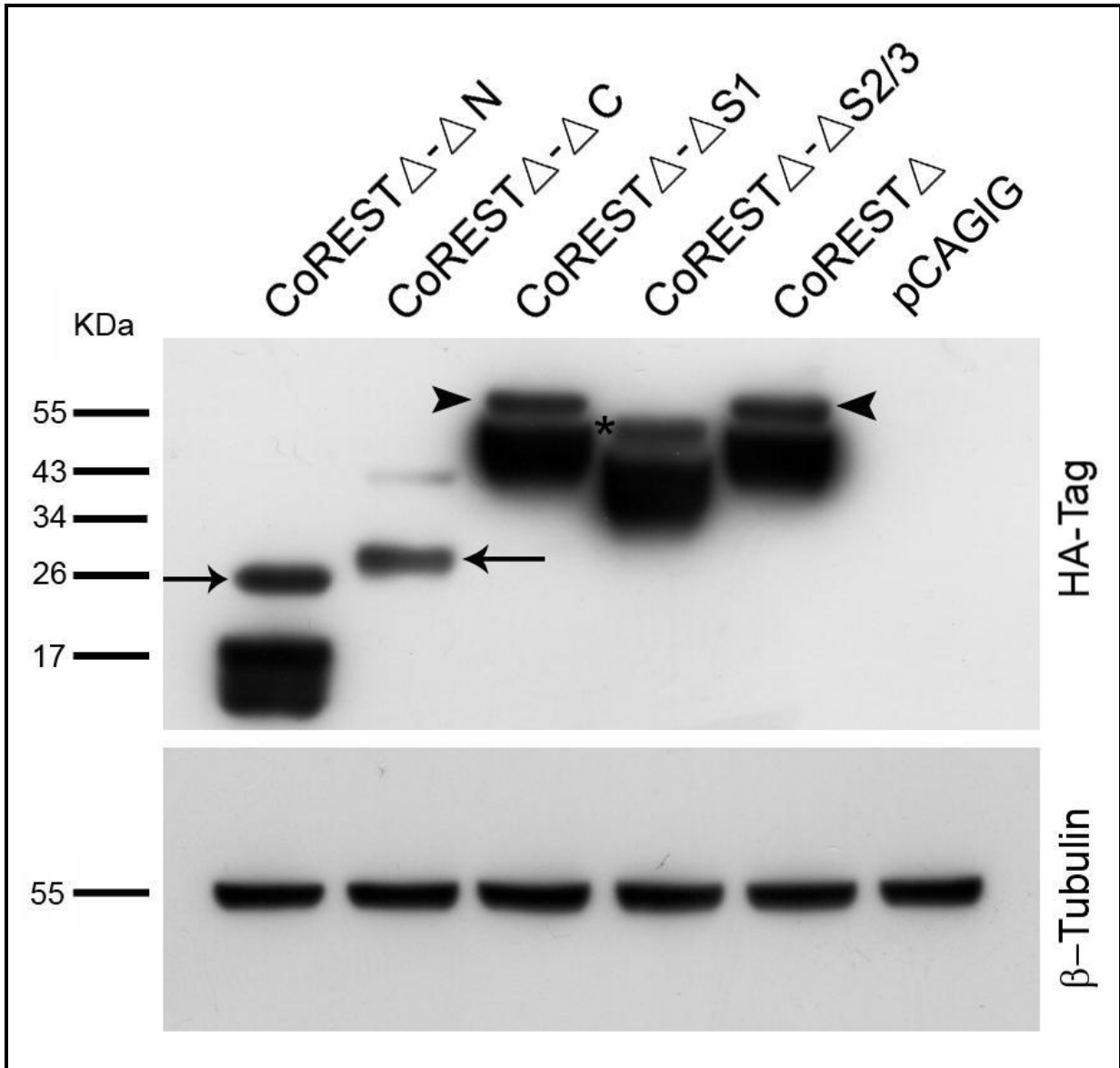


Figura 34. Expresión de variantes truncadas de CoREST. Inmunoblot que representa la expresión de las cinco variantes truncadas de CoREST marcadas con hemaglutinina (HA-Tag) en la línea celular Hek293T. Las variantes fueron detectadas usando un anticuerpo contra HA.

CoREST asocia factores de unión a DNA con proteínas capaces de realizar modificaciones post traduccionales en histonas, regulando entonces, la estructura de la cromatina y la expresión de genes. LSD1, es un componente de varios complejos multiproteicos, donde se ha encontrado en estrecha asociación con CoREST y HDAC1/2. La represión transcripcional mediada por LSD1 esta correlacionada con la remoción de grupos “mono” y “di-metilo” de la lisina 4-histona 3 (H3K4). CoREST se une directamente a LSD1, y es requerida para la demetilación mediada por LSD1 de los sustratos nucleosomales [Shi y cols., 2005]. Entonces, se analizó la capacidad de una forma truncada de CoREST, carente del dominio de asociación con LSD1 (CoREST Δ C-term), para revertir el defecto migratorio causado por el shRNA-CoREST. Interesantemente, la expresión de CoREST Δ C-term fue incapaz de revertir el defecto migratorio causado por shRNA-CoREST, lo cual es compatible con la idea de que los complejos formados por CoREST y LSD1 son relevantes para el control de la migración/desarrollo cortical (Figura 35 A-iv).

Existe evidencia que demuestra que el reclutamiento y actividad del complejo co-represor formado por CoREST está modulada por modificaciones post traduccionales como la sumoilación, específicamente por Sumo1, descrita como una modificación necesaria para la función co-represora ligada a REST/NRSF [Muraoka y cols., 2008] y Sumo2/3 [Ouyang y cols., 2009]. Ésta última promovería la interacción con otros factores de transcripción como ZNF198 y CtBP, desfavoreciendo la interacción con REST/NRSF. Basado en lo anterior, y con el propósito de entender si estas modificaciones post traduccionales son relevantes en la función de CoREST in vivo, se expresaron mediante EIU versiones truncadas de CoREST con deleciones en los motivos de interacción con Sumo1, CoREST Δ lys288 (Figura 35 v) y Sumo2/3, CoREST Δ 2/3 (a.a. 154-174, Figura 35vi) junto con el shRNA contra CoREST. Los resultados indican que las mutaciones introducidas en CoREST en los sitios susceptibles de sumoilacion no interfieren en su capacidad para restaurar el defecto en la posición neuronal causado por la pérdida de función de CoREST. El análisis cuantitativo de la capacidad de las variantes mutantes de CoREST desprovistas de dominios importantes para su función indica que el dominio C-terminal es particularmente relevante para la salida de las neuronas desde los nichos proliferativos (Figura 36).

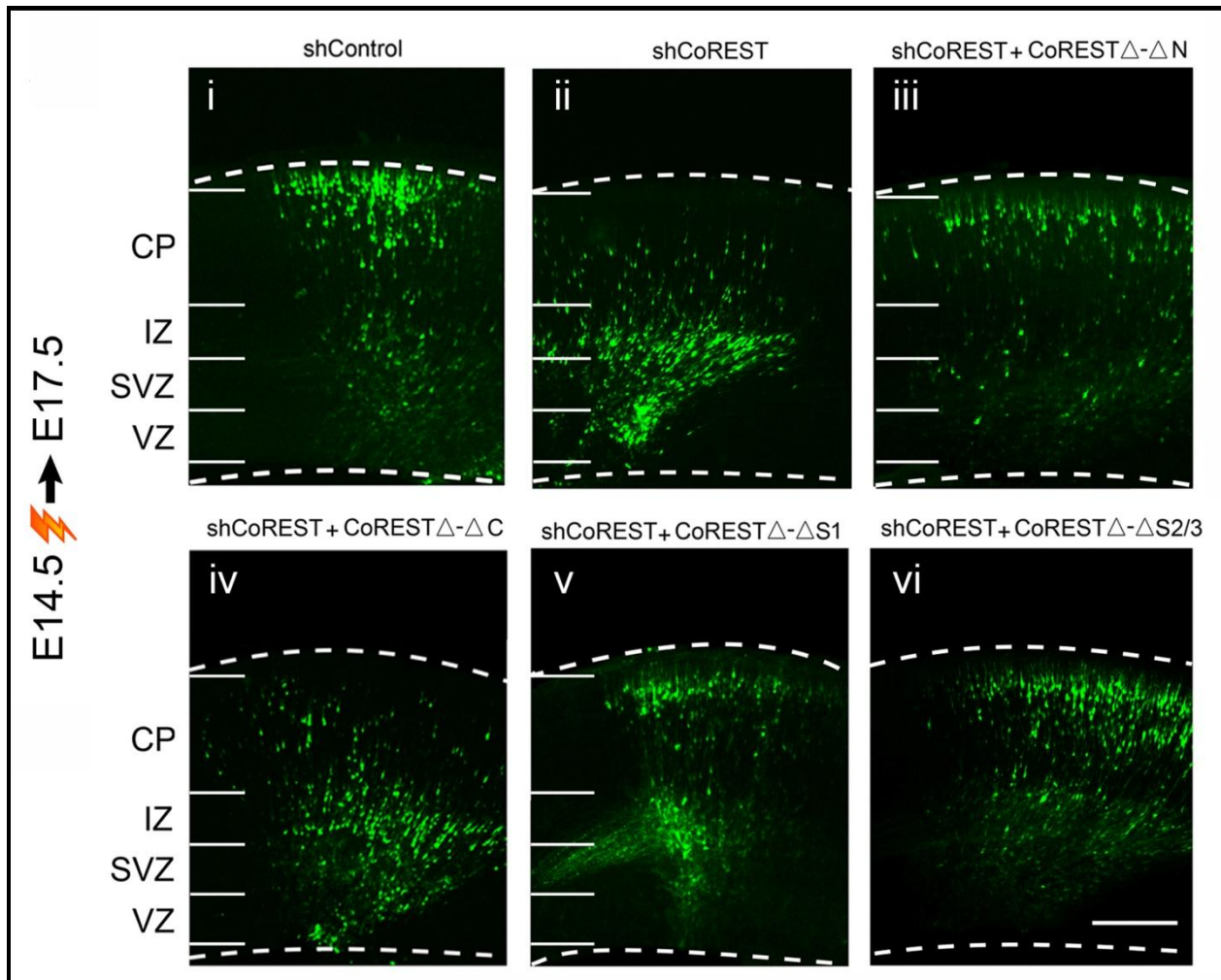


Figura 35. La regulación de la migración neuronal por CoREST no requiere su asociación con REST/NRSF, SUMO1 o SUMO2/3, y depende de su asociación con LSD1. Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros electroporados en E14.5 y procesados en E17.5. Las construcciones electroporadas se mencionan sobre cada panel. **i)** control. **ii)** shCoREST, causa un retraso en la salida de las células desde la VZ en E17.5. **iii)** La delección del extremo N-terminal de CoREST, el cual se une a REST/NRSF, no alteró la capacidad para sostener el rescate de la migración de las neuronas post mitóticas. **iv)** La delección del extremo C-terminal de CoREST no rescata el proceso migratorio. **v)** La eliminación del aminoácido blanco de sumoilación por SUMO1 no altera el patrón migratorio normal. **vi)** El dominio de CoREST que es modificado por SUMO2/3 no es requerido durante el proceso de migración normal de las neuronas corticales post mitóticas. Escala, 500 μm .

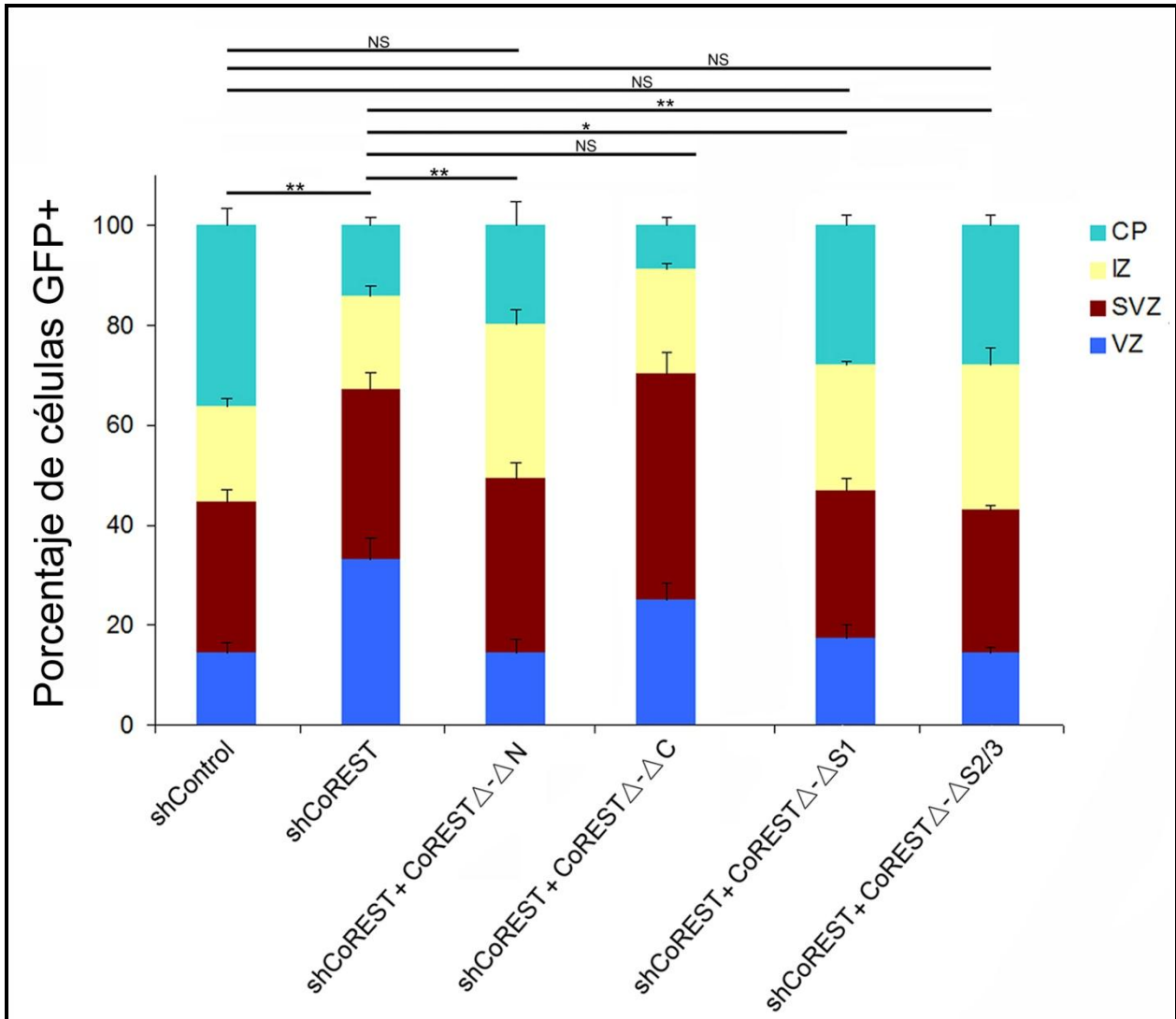


Figura 36. Análisis de la distribución de las células electroporadas (GFP⁺) entre las 4 regiones definidas en la corteza cerebral, expresado como porcentaje del total de células GFP⁺. Los histogramas resumen los resultados obtenidos a partir del procesamiento y análisis de al menos 4 cerebros. La significancia estadística de las diferencias entre los porcentajes de células presentes en la región correspondiente a la zona ventricular (VZ) se muestra sobre el histograma que representa la media \pm EE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, NS: no significativo. Análisis mediante Anova no paramétrico (Kruskal-Wallis).

Sobre la base de los resultados obtenidos usando la variante CoREST Δ C-term y para profundizar en los mismos, se buscó una posible interacción funcional entre CoREST y LSD1 en el contexto de la neurogenesis cortical. Como primera aproximación, se evaluó por inmunoblot el curso temporal y la distribución espacial de LSD1 en la corteza cerebral durante el desarrollo. Como se demuestra en el inmunoblot LSD1 se expresa en la corteza cerebral de ratón desde E14.5 hasta la etapa adulta (Figura 37).

Para examinar el patrón de expresión espacial de LSD1 en la corteza en desarrollo, secciones coronales en diferentes etapas del desarrollo se procesaron mediante inmunofluorescencia doble contra LSD1. La tinción contra LSD1 reveló un patrón nuclear en toda la extensión de la corteza cerebral (Figura 38 A). Para determinar la identidad de células LSD1⁺, se realizó también inmunofluorescencia contra Tuj1 y NeuN. Las células LSD1⁺ presentes en las zonas proliferativas (VZ, SVZ) no presentaron reactividad contra Tuj1, consistente con la ausencia de Tuj1 en estas zonas, mientras que las células en la placa cortical embrionaria son doble positivas para LSD1 y Tuj1 (Figura 38 B). En el cerebro murino adulto, LSD1 es expresado en todas las neuronas de la corteza (Figura 38 C).

Estos resultados indican que la expresión temporal y espacial de LSD1 se superpone con la expresión de CoREST en los nichos proliferativos, en las zonas migratorias y en la placa cortical, tanto en el desarrollo como en la adultez.

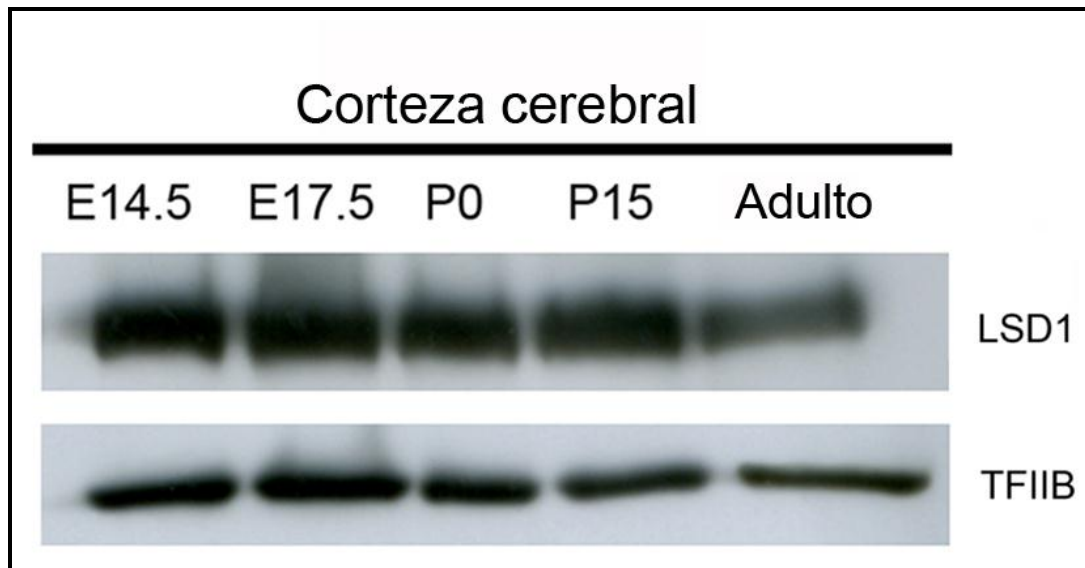


Figura 37. Expresión temporal de LSD1. El análisis de inmuno blot en extractos totales de corteza cerebral muestra que LSD1 es expresado en la corteza cerebral de ratón a lo largo del desarrollo.

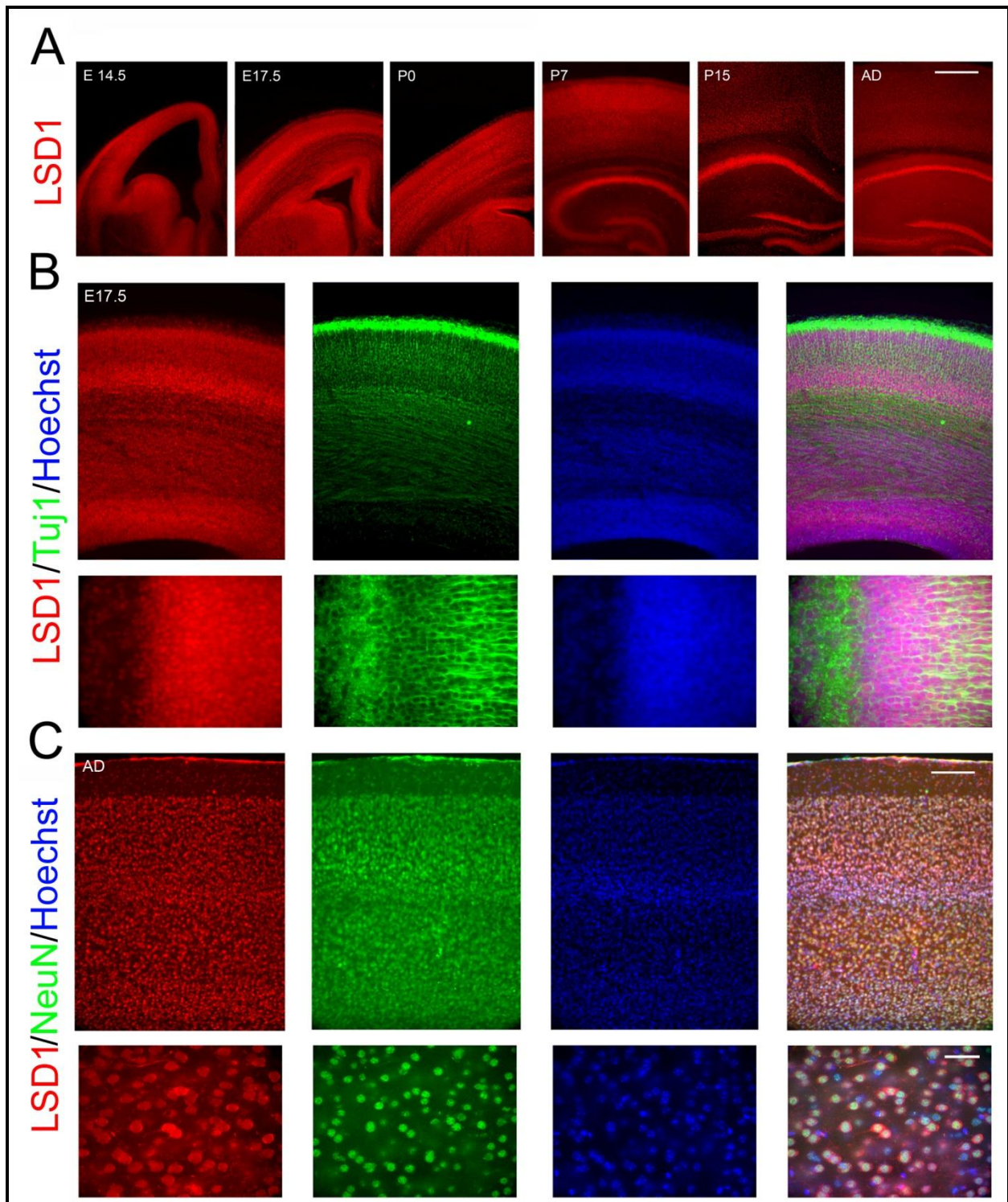


Figura 38. Expresión de LSD1 durante el desarrollo cortical. **A)** Secciones cerebrales de diferentes etapas del desarrollo sometidas a inmunofluorescencia contra LSD1 (rojo). **B)** Co-expresión de LSD1 y el marcador de neuronas post mitóticas Tuj1 (verde) en E17.5. **C)** LSD1 es co-expresado con el marcador panneuronal NeuN (verde) en la corteza cerebral adulta. En azul, tinción nuclear Hoechst. Lsuperposición de los tres colores se muestra en el panel extremo de la derecha en cada caso. Escala, A: 500 μ m; B, C: 200 μ m; B, C paneles inferiores: 50 μ m.

Luego se determinó mediante transfección en la línea celular Neuro2a la eficiencia del shRNA contra LSD1 (Figura 39 A). Posteriormente, se evaluó si la disminución de LSD1 *in vivo*, podría resultar en cambios migratorios similares a los observados tras la pérdida de función de CoREST. Mediante EIU en E14.5 se analizó el efecto de la pérdida de función de LSD1 sobre el posicionamiento neuronal en E17.5. La utilización del shRNA-control, resultó en que las células migraron de manera normal hacia la placa cortical (E17.5). Por el contrario, las células electroporadas con el shRNA-LSD1 presentaron un posicionamiento aberrante, permaneciendo en las capas proliferativas. Así, la pérdida de función de LSD1 imita el fenotipo causado por la disminución en la expresión de CoREST (Figura 39 B, C).

Estos resultados sugieren que la actividad atribuida a LSD1 en estudios *in vitro* puede ser un mecanismo importante por el cual CoREST regula, al menos, el proceso de migración radial y morfogénesis dendrítica de las neuronas de proyección en la corteza cerebral en desarrollo.

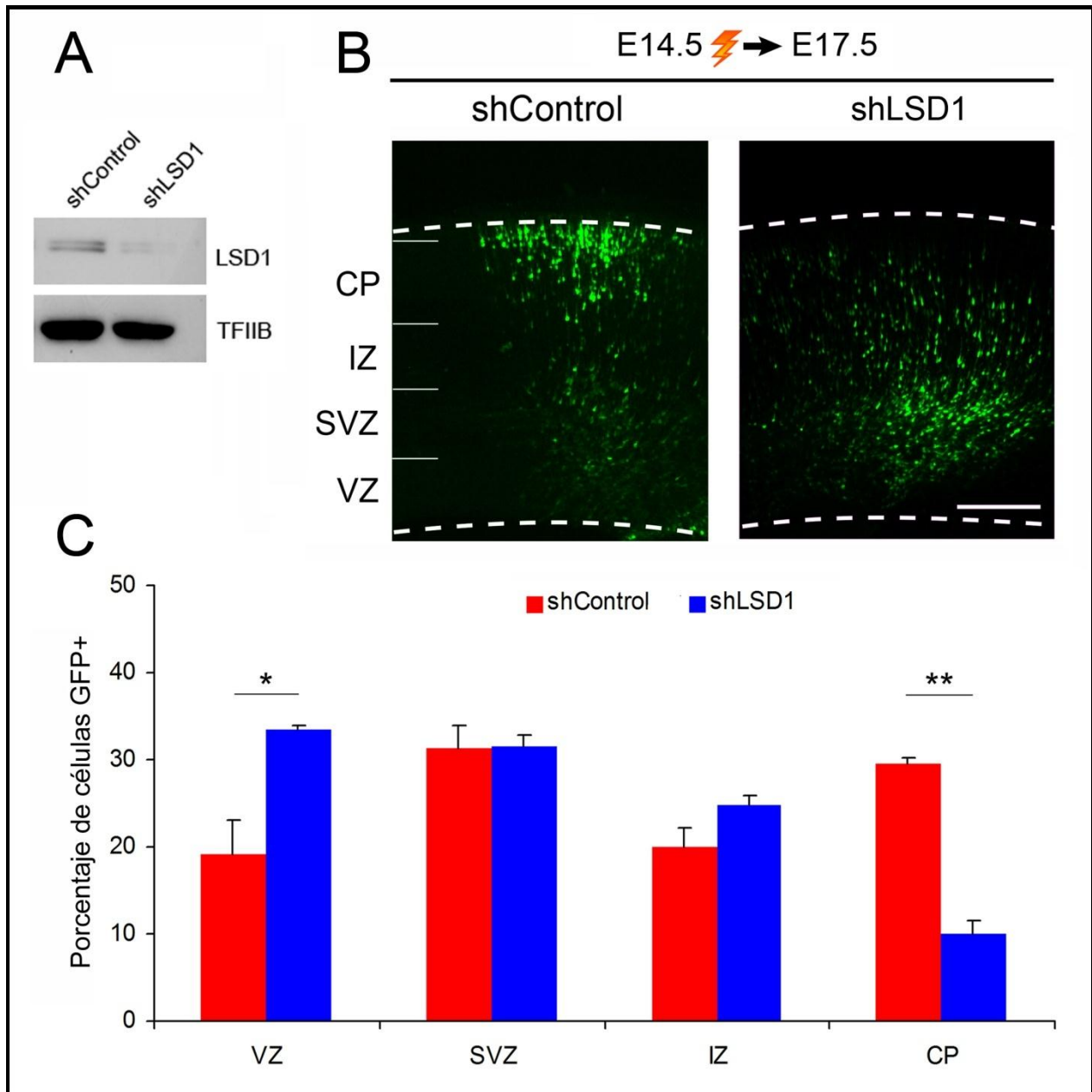


Figura 39. La pérdida de función de LSD1 retrasa el desplazamiento normal de las neuronas post mitóticas en E17.5. **A)** Prueba de la eficiencia de shLSD1 mediante lipofección en la línea celular Neuro2a 72 horas post transfección. **B)** La interferencia de LSD1 imita el fenotipo migratorio de las células tratadas con el shRNA contra CoREST. **C)** Análisis de la distribución de las células GFP⁺ entre las 4 regiones definidas a lo largo de la corteza cerebral, expresado como porcentaje del total de células GFP⁺ por cada condición experimental. Los histogramas resumen los resultados obtenidos a partir del procesamiento y análisis de al menos 6 cerebros. La significancia estadística de las diferencias entre porcentajes de células en las regiones corticales se muestra sobre el histograma. *p<0.05; **: p<0.01; análisis mediante prueba "t" de *student*. Escala, 500 μ m.

5.4. Determinar los efectos de la disminución de CoREST en la corteza postnatal

Las neuronas generadas en E14.5 migran hacia la corteza en desarrollo y forman las capas corticales superiores II/III. La alteración migratoria observada en las células electroporadas con el shRNA-CoREST en E17.5 y P0, llevó a determinar si estas células podían migrar e ingresar normalmente a la placa cortical y expresar proteínas asociadas normalmente con la etapa postnatal del desarrollo. Inicialmente, se analizó mediante inmunofluorescencia contra CoREST si la eficacia del shRNA se mantenía en edades posteriores al nacimiento (Figura 40).

Luego se analizó la localización de células GFP⁺ en día postnatal 7 (P7), tiempo en que la formación de las capas neocorticales está completada. Los experimentos indicaron que las células shRNA-control y shRNA-CoREST se localizan de manera similar dentro de las capas superiores II/III, y se excluyen de las capas profundas V/VI (Figura 41 A). Sin embargo, el silenciamiento de CoREST afectó la morfología de las células en la capa II/III, lo que es evidenciado por la alteración en el crecimiento en los árboles dendríticos apicales y la presencia de protuberancias en los procesos conductores (*“leading processes”*). Para evaluar la morfología dendrítica de las neuronas de proyección (Figura 41 B), se cuantificó el número de procesos basales que emergían del soma y el perímetro del mismo. La disminución de CoREST resultó en menor número de dendritas basales comparado con las células electroporadas con el shControl (Figura 41 C). Mientras que el perímetro del soma, se mantuvo constante después de la interferencia de CoREST, sugiriendo que los defectos en las ramificaciones no son atribuibles a una reducción global en el tamaño celular, sin embargo, (Figura 41 D).

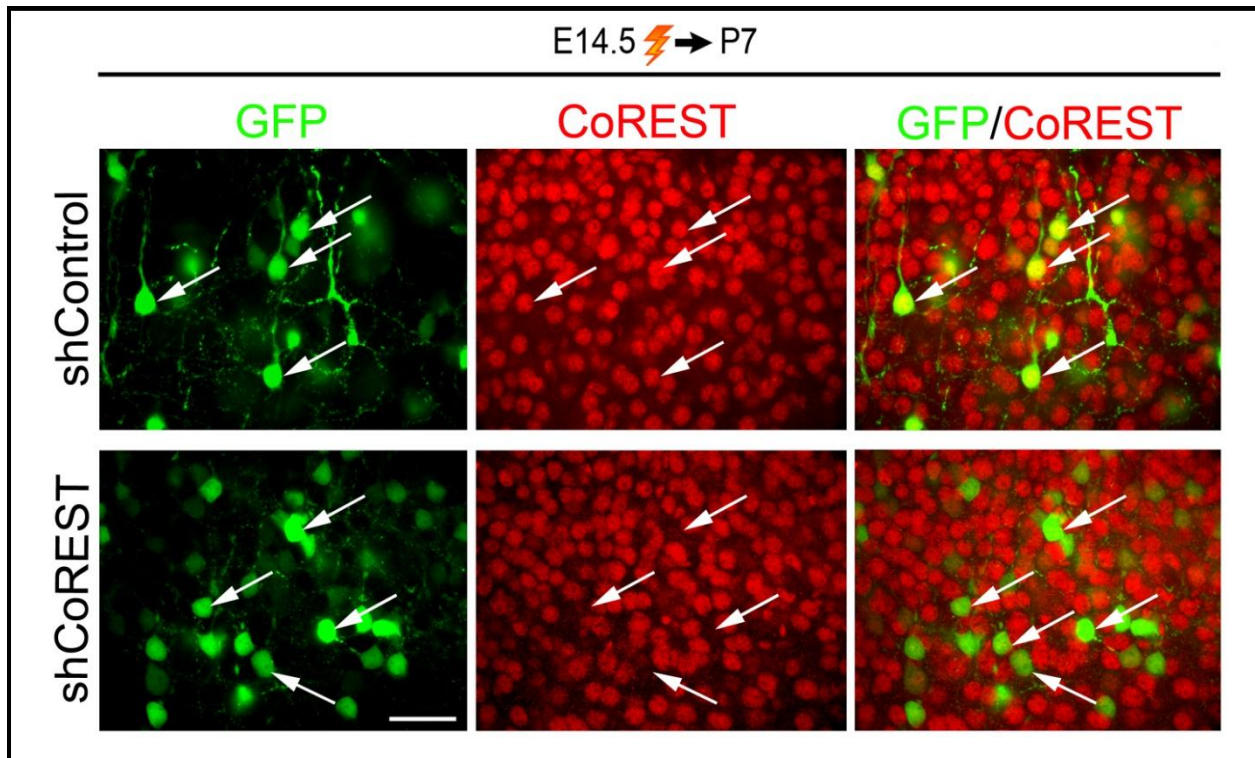


Figura 40. El shRNA contra CoREST produce una disminución sostenida en la expresión de CoREST *in vivo*. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de CoREST en neuronas de la placa cortical en día post natal 7 (P7) después de la electroporación del plasmidio control o shCoREST en E14.5. Algunas células muestran sus bordes delimitados por una línea punteada para facilitar la identificación de la misma célula en diferentes visiones. Escala, 20 μm.

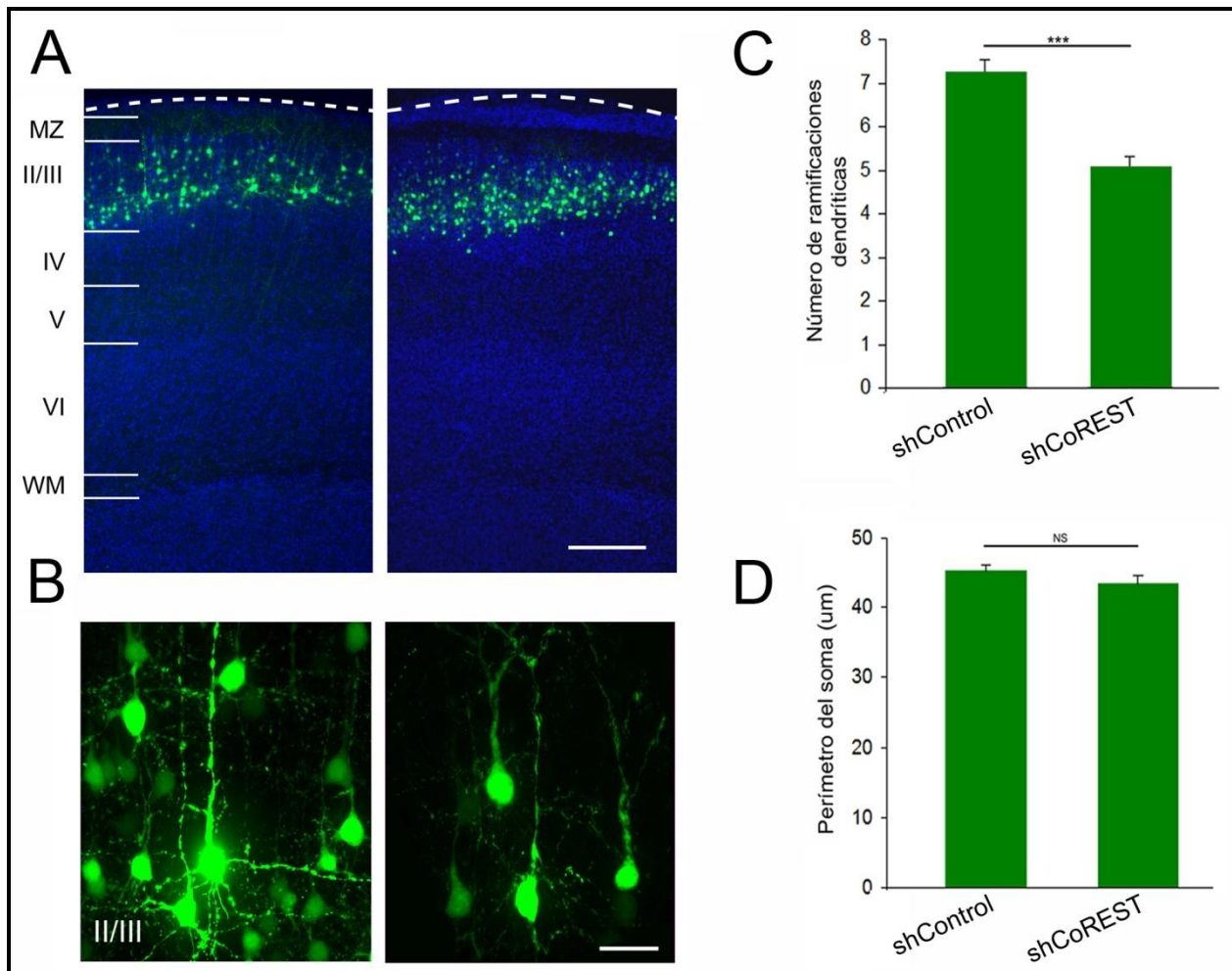


Figura 41. El silencimiento de CoREST en neuronas post mitóticas conduce a un defecto en las ramificaciones en etapa post natal. A) Secciones coronales de cerebros en día post natal 7 (P7) electroporados en E14.5 con el shControl (panel izquierdo) y shCoREST (panel derecho). Las células en ambas condiciones están posicionadas correctamente en la neocorteza. **B)** Imágenes de neuronas corticales en las capas II/III de cortezas P7. **C)** Cuantificación del número de ramificaciones basales en cada condición ($n \geq 20$ neuronas \pm EE; $p < 0.001$, análisis mediante prueba “t” de *student*). Las neuronas piramidales depletadas de CoREST presentaron una reducción en el número de dendritas basales en P7. **D)** Cuantificación del perímetro somático de las neuronas GFP+ ($n \geq 20$ neuronas \pm EE). No se observaron diferencias en el perímetro somático. Escala, A: 500 μ m; B: 50 μ m

Posteriormente, se llevó a cabo inmunofluorescencia contra Cux1 y Tbr1. Cux1, es expresado por neuronas que poblan las capas II-IV de la corteza [Nieto y cols., 2004], mientras que Tbr1 es expresado fuertemente por células presentes en la capa cortical profunda VI. Los resultados obtenidos mostraron que la mayor parte de las células se localizaron similarmente dentro de las capas corticales superiores, Cux1+ y se excluyeron de las capas inferiores Tbr1+ (Figura 42 A, C). Imágenes con una magnificación mayor revelaron que las células GFP+ electroporadas con el shRNA control así como con el shRNA contra CoREST expresaron niveles elevados de Cux1 (Figura 42 B), a diferencia de la expresión de Tbr1, cuya expresión fue baja (Figura 42 D).

Los resultados demostraron que aún cuando la interferencia de CoREST no altera el programa normal de diferenciación y especificación en la corteza en desarrollo, la reducción en la expresión de CoREST es suficiente para perturbar los procesos o ramificaciones dendríticas basales en neuronas en etapas de diferenciación terminal.

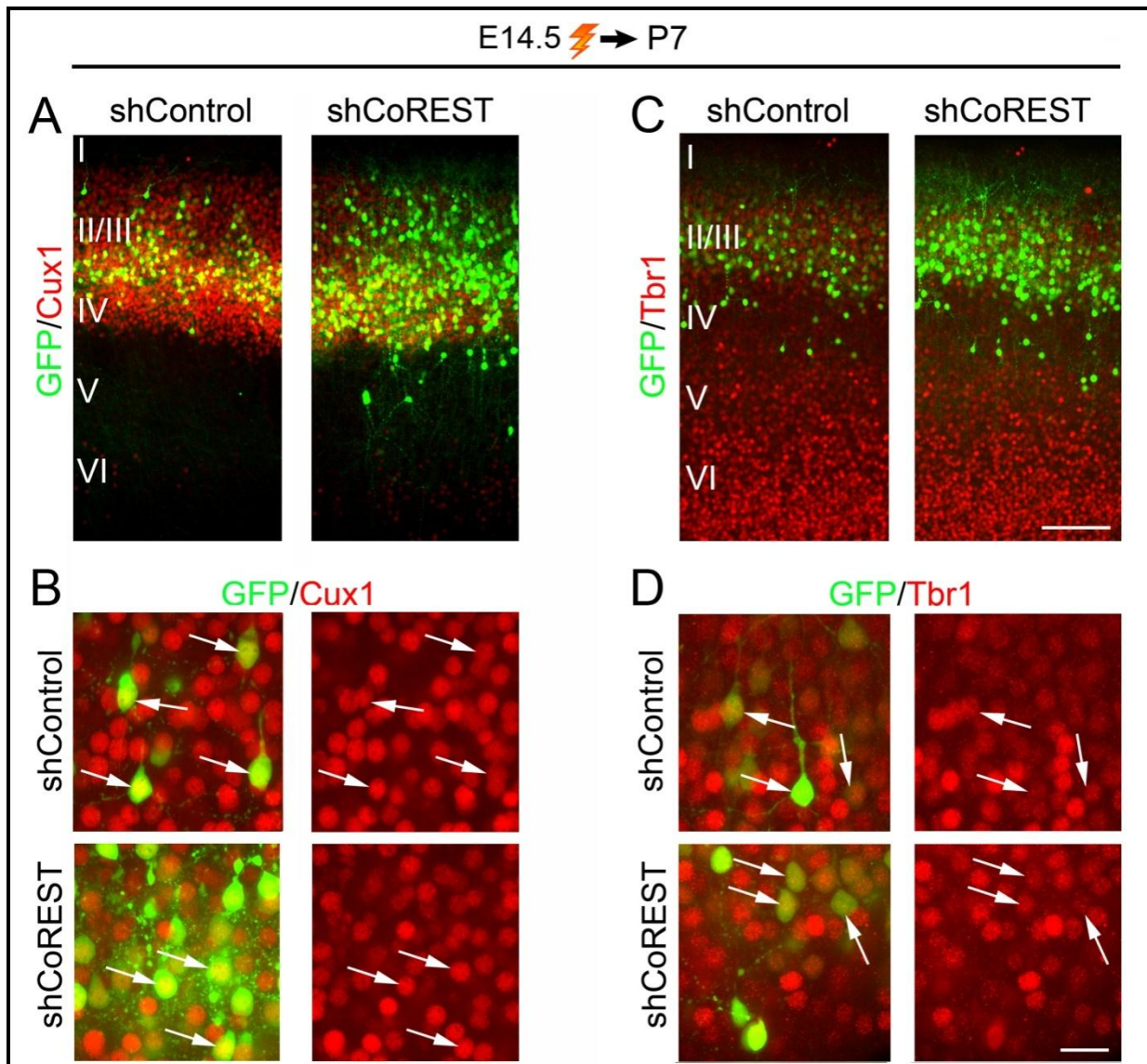


Figura 42. Las células depletadas de CoREST alcanzan su posición apropiada en la corteza post natal (P). Cerebros en P7 fueron obtenidos de embriones electroporados en E14.5 con plasmidios que codifican el shControl y el shCoREST. **A–D.** Secciones coronales del telencéfalo dorsal fueron sometidos a inmunofluorescencia contra el marcador de capas superiores Cux1 (**A, B**) y Tbr1, marcador expresado altamente en las capas inferiores (**C, D**). Proyecciones Z de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran que tanto las células tratadas con el shCoREST como las células control, se encuentran posicionadas en las capas superiores y expresan Cux1, con algunas células que expresan niveles bajos de Tbr1. Escala, A, C: 200 μ m; B, D: 50 μ m.

6.- Discusión

La función de CoREST en el contexto fisiológico no había sido determinada. Sobre la base de estudios realizados en células troncales embrionarias, cultivos primarios corticales, y a la determinación bioquímica de las proteínas que interactúan con CoREST, se había propuesto su participación en la mantención del estado indiferenciado de progenitores neurales y en el proceso de diferenciación neuronal terminal [Ballas y cols., 2001, Lunyak y cols., 2002; Ballas y cols., 2005].

Mediante RT-PCR se detectó la presencia de los mRNA de los tres miembros de la familia CoREST (RCoR) en neuronas corticales y en la línea celular de fibroblastos NIH3T3 (Figura 17). Sin embargo, los análisis realizados en esta tesis están orientados al estudio de CoREST1 (RCoR1), identificado como interactor de REST/NRSF. CoREST1 es el componente más estudiado de la familia de estos co-represores, a diferencia de sus parálogos CoREST2 y CoREST3 cuya función recién comienza a dilucidarse [Yang y cols., 2011].

Los resultados presentados muestran que CoREST está distribuida ampliamente en la corteza durante el desarrollo embrionario, confirmando los datos de reportes previos obtenidos mediante hibridación *in situ* [Tontsch y cols., 2001]. En el adulto la expresión está presente en todas las poblaciones neuronales. Aunque su abundancia decae ligeramente, su distribución celular y su patrón se mantienen (Figura 18, 19). Esto sugiere que CoREST podría participar en el proceso de migración y diferenciación terminal de las neuronas post mitóticas para ser integradas funcionalmente.

Con el propósito de analizar la función de CoREST, se diseñaron tres horquillas cortas de RNA (shRNAs) dirigidas específicamente contra el mRNA de CoREST1. Sólo una de éstas mostró ser eficiente para interferir o disminuir la expresión de CoREST tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 20). El proceso de RNAi es temporalmente restringido y es determinado en gran medida por el tiempo de transfección, por la estabilidad y recambio del mRNA, por la porción de células en el tejido que son objeto de la interferencia. De esta manera es probable que cierta cantidad de mRNA y proteína estara presente en las células objeto del RNAi. Lo anterior podría contribuir a la falta de respuestas o mecanismos compensatorios usando la aproximación experimental de RNAi *in utero*.

Ante la inexistencia de estudios *in vivo* respecto a la función de CoREST, se usó la técnica de electroporación *in utero* para específicamente silenciar mediante shRNA la expresión de CoREST en progenitores neurales que recubren la superficie de los ventrículos laterales del cerebro embrionario y así, determinar la función de esta proteína en el contexto fisiológico del desarrollo de la corteza cerebral la diferenciación neuronal en el contexto del desarrollo de la corteza cerebral (Figura 23).

La pérdida de función de CoREST en la corteza cerebral en desarrollo condujo a defectos severos en el posicionamiento y morfología de la neuronas generadas a partir de progenitores neurales 3 y 5 días después de la electroporación en 14.5, mostrando que CoREST, descrito previamente como un co-represor transcripcional, fundamental en procesos que implican remodelamiento de cromatina y silenciamiento de la expresión génica, está involucrado en la neurogénesis embrionaria cortical (Figura 24). Además de los defectos migratorios, las neuronas con interferencia de CoREST presentaron anomalías morfológicas. Durante el desarrollo cortical, las neuronas de proyección generadas adoptan normalmente una morfología multipolar transitoria mientras migran a través de la SVZ y parte inferior de la IZ, restableciendo más tarde la morfología bipolar dentro de la IZ [Tabata y Nakajima, 2003; Noctor y cols., 2004]. La mayor parte de las neuronas tratadas con el shCoREST y mal posicionadas dentro de la VZ, SVZ e IZ presentan un aumento en los procesos dendríticos (≥ 2 procesos), exhibiendo morfología multipolar con dendritas apicales ectópicas y presencia de dendritas basales.

Aún cuando se visualizaron neuronas bipolares con presencia de uno o dos procesos (identificados como "*leading*" y "*trailing*"), la proporción de células que alcanzan la CP transcurridos 3 y 5 días de la electroporación, es menor a la observada en la condición control (Figura 25).

Estos resultados sugieren que la interferencia de CoREST en progenitores corticales conduce a una alteración en la transición morfológica de las neuronas que migran radialmente, resultando en su acumulación en la SVZ/IZ e incapacidad para llegar y establecerse en la CP. Adicionalmente, se demostró que la sobreexpresión de CoREST recupera el defecto en el desplazamiento neuronal causado por la pérdida de función de CoREST y se confirmó que esta alteración es causada por el shRNA contra

CoREST y debido a la disminución en sus niveles y no a efectos inespecíficos asociados al shRNA (Figura 26).

La adquisición del fenotipo neuronal ocurre a través de la estrecha coordinación del ciclo celular, el proceso de migración, y de diferenciación. La disminución de CoREST podría provocar un aumento en la proliferación celular, lo que daría cuenta de la mayor cantidad de células GFP⁺ presentes en las zonas proliferativas; por el contrario, precipitar la activación de genes neuronales que debería ocurrir a medida que las neuronas migran hacia la CP. La adquisición temprana de características neuronales aún cuando no ha ocurrido la salida de ciclo celular, podría resultar en un proceso de muerte celular, considerando que los procesos de proliferación y diferenciación son estados celulares incompatibles en el SNC, donde células que inician la neurogénesis.

A través de ensayos *in vitro*, se ha descrito que CoREST regula genes involucrados en la especificación de la identidad neuronal [Abrajano y cols., 2010]. Sin embargo, la pérdida de función de CoREST en la transición desde progenitor neural a neurona madura no parece afectar la identidad neuronal *in vivo*, ya que las células depletadas de CoREST adquieren el destino celular esperado tanto como neuronas post mitóticas (Tuj1⁺), así como neuronas del subtipo glutamatérgico (Vglut⁺) (Figura 27).

La participación de CoREST en la represión de genes neuronales y en la mantención del estado indiferenciado de los progenitores, hacía pensar que la interferencia de CoREST podría inducir la adquisición de características neuronales de manera temprana. Sobre la base del rol de CoREST en la posición de las neuronas GFP⁺ en la neocorteza, se evaluó si la pérdida de función de CoREST inducía prematuramente la diferenciación a neurona por parte de los progenitores neurales o si promovía su permanencia en estado indiferenciado. Para esto se llevo a cabo inmunofluorescencia usando los marcadores Sox2 (progenitores apicales) y Tbr2 (progenitores basales).

El retardo en el desplazamiento radial de las neuronas electroporadas con el shCoREST desde las zonas proliferativas hacia la placa cortical de la neocorteza, sugirió en un comienzo que la pérdida de función de CoREST conduciría prematuramente a las células hacia el linaje neuronal. Normalmente, las neuronas

postmitóticas son producidas tanto por divisiones celulares asimétricas de glias radiales (Sox2⁺) [Hutton y Pevny, 2011] o divisiones celulares simétricas de progenitores intermedios (Tbr2⁺), [Sessa y cols., 2008]. Los experimentos realizados en la ventana temporal E14.5 a E17.5, revelaron un aumento en la proporción de progenitores Sox2⁺ y Tbr2⁺ (Figura 28). Aunque los dos tipos de divisiones celulares antes mencionados tienen lugar en embriones de E16.5, como se demuestra por la presencia de células GFP⁺/BrdU⁺ en la VZ y también en la SVZ, no se observaron cambios significativos en la proporción de células GFP⁺/BrdU⁺ en la condición de pérdida de función de CoREST, respecto de la condición control. Por lo tanto, se puede descartar que la proporción mayor de progenitores sea consecuencia de alteraciones en la tasa proliferativa de los mismos, ya que no se observan incrementos en este parámetro evaluado mediante la incorporación de BrdU durante la fase S del ciclo celular (Figura 31). Sin embargo, en experimentos realizados en E14.5 y analizados tres días después, se observó un aumento significativo en la proporción de células GFP⁺/Ki67⁺ en secciones de cerebros electroporados con el shCoREST en contraste con la condición control (Figura 32). Este resultado es consistente con la proporción mayor de células Sox2⁺ y Tbr2⁺ encontrada en la misma ventana temporal (E14.5-E17.5). Es posible entonces, que la función de CoREST sea necesaria durante la adquisición del destino celular que adopta la progenie de las glias radiales después de la división celular, y cambios en su expresión tengan una influencia fuerte sobre la fracción de glias radiales que se divide para originar progenitores intermedios.

Este efecto podría relacionarse con antecedentes obtenidos de estudios *in vitro* donde se describen los genes Tlx, Fgfr2 y Zic1 como blancos de CoREST. Estos genes participan en la mantención del potencial de los progenitores neurales para generar linajes celulares múltiples. En mamíferos, Tlx es homólogo del gen de *Drosophila* “*tailless*”, codifica un receptor nuclear que controla la auto renovación de progenitores neurales a través del reclutamiento de histonas deacetilasas (HDACs) en los promotores de sus genes blanco, p21 y pten. Fgfr2 y Zic1 promueven la propagación de células progenitoras y la mantención del estado indiferenciado inhibiendo la salida del ciclo celular [Abrajano y cols., 2010]. Estos hallazgos sugieren que CoREST podría situar la maquinaria represora sobre los promotores de estos genes para disminuir su actividad transcripcional a medida que los progenitores transitan desde un estado de

auto renovación a uno de compromiso con el linaje neuronal. Los resultados obtenidos al usar los marcadores de progenitores Sox2⁺ y Tbr2⁺, muestran un aumento en la proporción de los mismos tras la pérdida de función de CoREST. Esto sería consistente con que la prevención de la unión de CoREST a sus genes objetivos perjudica la diferenciación neuronal, lo que indica que este evento molecular es esencial para la transición desde célula progenitora hacia neurona post mitótica.

En relación a esto último se ha descrito que cambios en la extensión o duración de las etapas del ciclo celular producen efectos sobre las poblaciones celulares, específicamente una disminución en G1, por sobre expresión de Cdk4/CiclinaD1, produce un retraso en neurogénesis evidenciado por la generación y aumento en la proporción de progenitores intermedios [Lange y cols., 2009]. Este cambio resulta en un fenotipo de retención transitoria de células en la VZ/SVZ, el cual es comparable al fenotipo observable tras la pérdida de función de CoREST.

Entonces, el silenciamiento de CoREST en progenitores neurales, podría provocar un acortamiento anormal de G1 tanto en glías radiales como en progenitores intermedios, lo que resultaría en el aumento detectado en la proporción de ellos a través del uso de marcadores. Sin embargo, técnicamente las construcciones plasmidiales sólo ingresan a la población celular que delimita los ventrículos cerebrales, correspondiendo ésta a células neuroepiteliales, antes de la neurogénesis (E9-E11) y glías radiales, durante el punto más alto de la neurogénesis (E13-E18), por lo tanto, el efecto primario de la pérdida de función de CoREST, ocurriría al nivel de las glías radiales, sea éste a nivel de la extensión del ciclo celular, o en el evento molecular que desencadena el cambio entre eventos de divisiones celulares asimétricas. De esta manera, CoREST podría regular además genes involucrados en la transición de glía radial a progenitor intermedio, afectando procesos de división celular, específicamente el tipo de división que se lleva a cabo. Esto podría explicar en parte la morfología multipolar que se observa en las células que se mantienen en las zonas inferiores de la corteza en desarrollo tras la interferencia de CoREST (Figura 25). Así, más que una alteración en las transiciones morfológicas experimentadas por las neuronas post mitóticas mientras emergen desde la VZ/SVZ en dirección hacia la placa cortical, lo que se observa sería consecuencia de la identidad celular adquirida por una célula hija tras una ronda de división celular en las glías radiales. Las glías radiales podrían cambiar la transición de

un evento de división celular neurogénico, glia radial → neurona, a uno que conserva el potencial de diferenciación celular, aunque más restringido, glia radial → progenitor intermedio, cuyo fenotipo es multipolar, pues carecen de polaridad apico-basal. Ambos tipos de divisiones celulares corresponden al tipo asimétrico monodiferenciativo, donde una de las células de la progenie mantiene las propiedades de autorenovación y la otra se diferencia en otro linaje [Huttner y Kosodo, 2005; Morrison y Kimble, 2011]. Se ha descrito que el perfil de expresión de las glías radiales que generan neuronas es diferente de aquellas que generan progenitores intermedios, por lo tanto, ambos modos de división parecerían ocurrir en distintas subpoblaciones de glías radiales [Pinto y cols., 2008]. Al mismo tiempo, se ha señalado que la orientación del uso mitótico durante la división de la glia radial es relevante para la neurogénesis. Incrementos en la tasa de divisiones celulares en el eje vertical pueden afectar el número de progenitores y su distribución [Konno y cols., 2008; Shitamukai y cols., 2011]. Sin embargo, no existía evidencia funcional que demuestre que la orientación vertical o oblicua del uso mitótico sea requerida para la neurogénesis. *Insc* (“*Inscuteable*”) codifica una proteína adaptadora descrita inicialmente en neuroblastos de *Drosophila* que participa en el ensamblaje y orientación del uso mitótico. En un estudio reciente se analizó la función del homólogo en ratón (*mInsc*.) Los autores presentan evidencia convincente respecto a la regulación del uso mitótico por parte de *mInsc*, el cual controlaría la generación de progenitores intermedios y neuronas en la neocorteza en desarrollo [Postiglione y cols., 2011]. La función de *mInsc* se investigó generando modelos condicionales de pérdida y ganancia de función. Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de *mInsc* produce un incremento de divisiones celulares horizontales, mientras que la sobreexpresión de *mInsc* resultó en el fenotipo opuesto, donde los usos mitóticos oblicuos y verticales se incrementaron significativamente. La consecuencia biológica del cambio en la orientación del uso mitótico fue un aumento en la proporción de progenitores intermedios *Tbr2+* (50%) tras la sobreexpresión de *mInsc*, y tras la pérdida de función se observó una reducción (10%) con respecto a la condición control (23%). Cabe destacar que estos resultados no estuvieron asociados a cambios en la extensión o salida del ciclo celular. Lo anterior sugiere que las glías radiales generan preferencialmente progenitores intermedios en lugar de neuronas, aumentando así la cantidad de neuronas mediante neurogénesis indirecta (progenitor intermedio →

neurona). Sin embargo, también se observaron incrementos en el marcador Pax6+, expresado por las glías radiales. Es interesante que estos resultados concuerden con los obtenidos en esta tesis, lo que añadiría a CoREST como un nuevo componente molecular en el control de la de las divisiones celulares o en la distribución de los determinantes del destino de la progenie celular. Si la pérdida de función de CoREST resulta en un aumento en el número de células progenitoras es esperable que se generen más neuronas en etapas posteriores. Esto podría ser evaluado mediante el uso de reporteros fluorescentes asociados a promotores específicos para lograr su expresión en poblaciones discretas de la corteza en desarrollo. Por ejemplo, la co-electroporación del shCoREST y shRNA control junto con un plasmidio que exprese RFP a través del promotor neuronal neuroD. Ambos plasmidios ingresan en la población de progenitores, pero sólo GFP se expresa de manera ubicua (progenitores + neuronas); la expresión de RFP queda restringida sólo a la población neuronal (RFP+). Por lo tanto, se esperaría que en la condición de pérdida de función existiera una mayor proporción de células GFP+/RFP+.

Futuros experimentos durante el desarrollo y análisis de imágenes a través de video microscopía (*"timelapse"*) serán necesarios para mostrar si CoREST está relacionado con la extensión del ciclo celular o con la definición y elección del destino celular de la progenie de las glías radiales durante la anafase mitótica.

Se exploró también la posibilidad de que la alteración observada tanto en la posición como en la morfología de las células tratadas con el shCoREST podía ser una consecuencia indirecta de eventos de muerte celular o disminución en la supervivencia de las células GFP+ que emergen de los nichos proliferativos hacia la CP. Los resultados mostraron que sólo un par de células fueron inmunoreactivas para caspasa 3 activa en la condición experimental (shCoREST) así como en la condición control (shControl). Además estas células positivas para caspasa 3 activa no expresaban GFP, por lo tanto su muerte podría atribuirse a un proceso fisiológico (Figura 29). Al mismo tiempo, no se encontraron diferencias en el número de células GFP+/Tunel+ entre ambas condiciones (Figura 30). Estos resultados indican que CoREST es dispensable para la viabilidad de los progenitores neurales y de las neuronas generadas a partir de estos.

Por otra parte, la glia radial, soporte celular por el que las neuronas de proyección se desplazan hacia la placa cortical, se mantuvo sin alteraciones, indicando que el

silenciamiento de CoREST, de manera específica y autónoma celular interfiere con la posición radial de las neuronas corticales (Figura 32).

El nivel actual de conocimiento respecto a las vías de señalización que CoREST integra no es suficiente para proponer un mecanismo definitivo para explicar como participa en la regulación del desarrollo cortical. Sin embargo, es interesante notar que la acción de CoREST en dicho proceso parece ser independiente de REST/NRSF. Esta observación se fundamenta por el descubrimiento de que al transfectar con una forma de CoREST desprovista de su dominio de interacción con REST/NRSF (CoREST Δ N-term) en combinación con el shRNA contra CoREST las neuronas se encuentran normalmente posicionadas con respecto al control (Figura 35 iii). El mismo resultado se observó en estudios similares llevados a cabo por otro integrante del laboratorio, al transfectar con un shRNA dirigido contra REST/NRSF (no mostrado en esta tesis). Además, una forma de CoREST con una delección del dominio de interacción con Sumo 1, el cual ha sido indicado como necesario para la función co-represora dependiente de REST/NRSF, al ser utilizada en experimentos de rescate junto con el shRNA contra CoREST, fue capaz de sostener el proceso normal de migración (Figura 35 v). Por otra parte, el sitio de interacción con Sumo 2/3 ha sido indicado como importante en el proceso de represión asociado a los factores de transcripción Znf198 y CtBP (proteína 1 de unión al extremo c-terminal). La modificación post traduccional por Sumo 2/3 evita el la interaccion con REST/NRSF. La forma truncada de CoREST, desprovista del sitio de union a Sumo2/3, al ser usada junto con el shCoREST en experimentos de rescate, mostro ser eficiente en la restauración de la posición neuronal. (Figura 35 vi). Estas observaciones son concordantes con datos obtenidos a partir de estudios bioquímico/moleculares que sugieren que CoREST podría actuar en una manera independiente de REST/NRSF, regulando genes desprovistos del correspondiente elemento de respuesta. La función de CoREST en la corteza puede asociarse con otros represores transcripcionales, por lo que su identificación, así como los genes que ellos regulan sería de gran avance al entendimiento del desarrollo cortical temprano. Es razonable proponer que las diferencias entre los fenotipos de REST/NRSF y CoREST podrían estar relacionadas a una diversificación funcional de los complejos reguladores formados por ambas proteínas o a diferentes funciones dependiendo de la etapa neurogénica. En efecto, REST/NRSF podría asociarse a CoREST en etapas tempranas

del desarrollo (E9-E11). Luego, a medida que el desarrollo neural transcurre, la composición del complejo formado por CoREST puede cambiar, impartiendo funciones regulatorias especializadas, dependientes del contexto celular a reguladores transcripcionales expresados de manera ubicua. Así, la transición de progenitor o célula troncal neural a neurona post mitótica (neurogénesis); y de neurona post mitótica a neurona diferenciada madura requeriría de un cambio en la composición de las subunidades que forman el complejo en especial de la proteína o factor de unión al DNA.

La delección del dominio C-terminal de CoREST (CoREST Δ C-term) no rescató la alteración en la posición tras la pérdida de función de CoREST (Figura 35 iv). Esto condujo a la identificación de LSD1 y por consiguiente las modificaciones epigenéticas que lleva a cabo (demetilaciones en H3K4, y H3K9) como mediadores importantes de la función de CoREST durante la diferenciación de las neuronas de proyección. El patrón de expresión de LSD1 es idéntico al presentado por CoREST, y además, la disminución de la expresión de LSD1 mediante electroporación *in utero* resultó en la fenocopia de la pérdida de función de CoREST. (Figura 39). Esto es consistente con la asociación física y funcional descrita [Shi y cols., 2005, Foster y cols., 2010] y con la cada vez más creciente relevancia atribuida a LSD1 en el control de la diferenciación neural [Sun y cols., 2010, Zibetti y cols., 2010]. Se sabe que CoREST también se asocia con las histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2 [Perissi y cols., 2010] y así la desacetilación de histonas podría ser también un mecanismo que vincule a CoREST con la regulación de la expresión de genes relevantes para el desarrollo temprano de las neuronas piramidales. HDAC1 y HDAC2 se expresan en distintas etapas del desarrollo de acuerdo a la adquisición del compromiso y diferenciación hacia el fenotipo neuronal. De esta forma pueden contribuir a la regulación de la expresión de genes a lo largo de múltiples transiciones en el desarrollo y mantención del sistema nervioso. HDAC1 tiene una expresión elevada en progenitores neurales tanto en la etapa embrionaria como en la neurogénesis en el adulto. A medida que los progenitores se comprometen con el linaje neuronal la expresión de HDAC1 es disminuida, llegando a ser indetectable en neuronas post mitóticas [MacDonald y Roskams, 2008].

La contribución de las HDAC1 al fenotipo observado tras la pérdida de función de CoREST no se exploró directamente. El extremo amino terminal de CoREST es el

contiene el sitio de interacción con HDAC1. En los experimentos de rescate se probó una forma desprovista del dominio N-terminal de CoREST en su capacidad de para restituir el defecto en el posicionamiento neuronal tras la interferencia de CoREST. Los resultados indican que la asociación de CoREST/HDAC1 no tiene un papel importante en el proceso de neurogénesis, al menos en la ventana temporal en que se realizaron los experimentos (E14.5-E17.5). Por el contrario no se puede descartar que HDAC2 pueda contribuir como un efector.

Sin embargo, HDAC2 es expresada en niveles bajos en progenitores neurales, pero a medida que estos se diferencian a neuronas, la expresión de HDAC2 se incrementa notablemente, y se mantiene en neuronas maduras. Esto sugiere que HDAC2 podría contribuir a la regulación de de distintos subconjuntos de genes durante la diferenciación neuronal. Durante la ejecución de esta tesis se llevaron a cabo estudios de pérdida de función de HDAC2. Estos análisis fueron realizados en la ventana temporal que abarca el periodo neurogénica (E14.5-E17.5). Al evaluar la posición de las neuronas GFP⁺ tratadas con con el shRNA contra HDAC2 (no mostrado en esta tesis) y el shRNA control, no se encontraron diferencias significativas. Los resultados confirmarían que CoREST actuaría en estrecha asociación con LSD1 durante la diferenciación de progenitores y neurogénesis. Esta observación se desprende del hecho que en el extremo carboxilo de CoREST se encuentra el sitio de interacción con HDAC2 y LSD1; luego de utilizar la forma truncada de CoREST desprovista del dominio C-terminal en experimentos de rescate no se logra revertir el defecto en la posición neuronal. La pérdida de función de LSD1 fenocopia el efecto de la interferencia de CoREST, mientras que no se observan diferencias entre el shControl y el shHDAC2. En su conjunto estos datos muestran que en el sistema nervioso HDAC1 y HDAC2 pueden funcionar independientemente y sugieren que HDAC2, contribuiría en la mantención del estado de acetilación durante la fase de diferenciación terminal en neuronas maduras.

Los análisis realizados en etapa post natal 7 (P7), edad en la cual se ha completado a cabalidad el proceso migratorio en condiciones control, mostraron que la alteración migratoria observada tanto en E17.5 como en P0 fue transitoria, considerando que las neuronas depletadas de CoREST finalmente alcanzan su posición definitiva en la corteza (capas II/III) (Figura 41 A). Sin embargo, la pérdida de

función de CoREST en P7 produjo una reducción en las ramificaciones basales de las neuronas corticales (Figura 41 B). Adicionalmente, se analizó la identidad laminar de las células en las capas superiores de la neocorteza. Para esto se realizó inmunofluorescencia contra proteínas expresadas de manera específica en las distintas capas de la neocorteza (Figura 42 A, B, C, D). Los resultados muestran que los defectos en la posición celular que resultan de la pérdida de función de CoREST no inducen cambios en la identidad laminar, con respecto a la expresión de reguladores transcripcionales tales como Cux1 y Tbr1.

Estos resultados confirman que los defectos en el posicionamiento celular observado en la etapa perinatal no conllevan una perturbación en el programa normal de especificación y diferenciación neuronal postnatal en la neocorteza.

CoREST podría tener un rol bifásico, es decir, en el desarrollo y además durante la diferenciación de las neuronas maduras. Sin embargo, es importante notar que nuestra aproximación experimental no permite distinguir si los defectos observados en la morfología de las neuronas piramidales en edad post natal 7 son una consecuencia de defectos tempranos de la diferenciación en los progenitores neurales, en etapas tempranas luego de que la neurona emerge a partir de un progenitor o si provienen de perturbaciones en procesos relativos a la diferenciación terminal neuronal que pueden ser regulados por CoREST.

Las observaciones presentadas en esta tesis sugieren que CoREST participa en la compleja interacción entre los eventos de auto renovación de las glías radiales y de diferenciación neural, modulando la expresión y actividad de diversos genes a través de la estrecha asociación con LSD1. Se propone un modelo en el cual la presencia de CoREST influencia el balance entre la neurogénesis directa e indirecta (Figura 43)

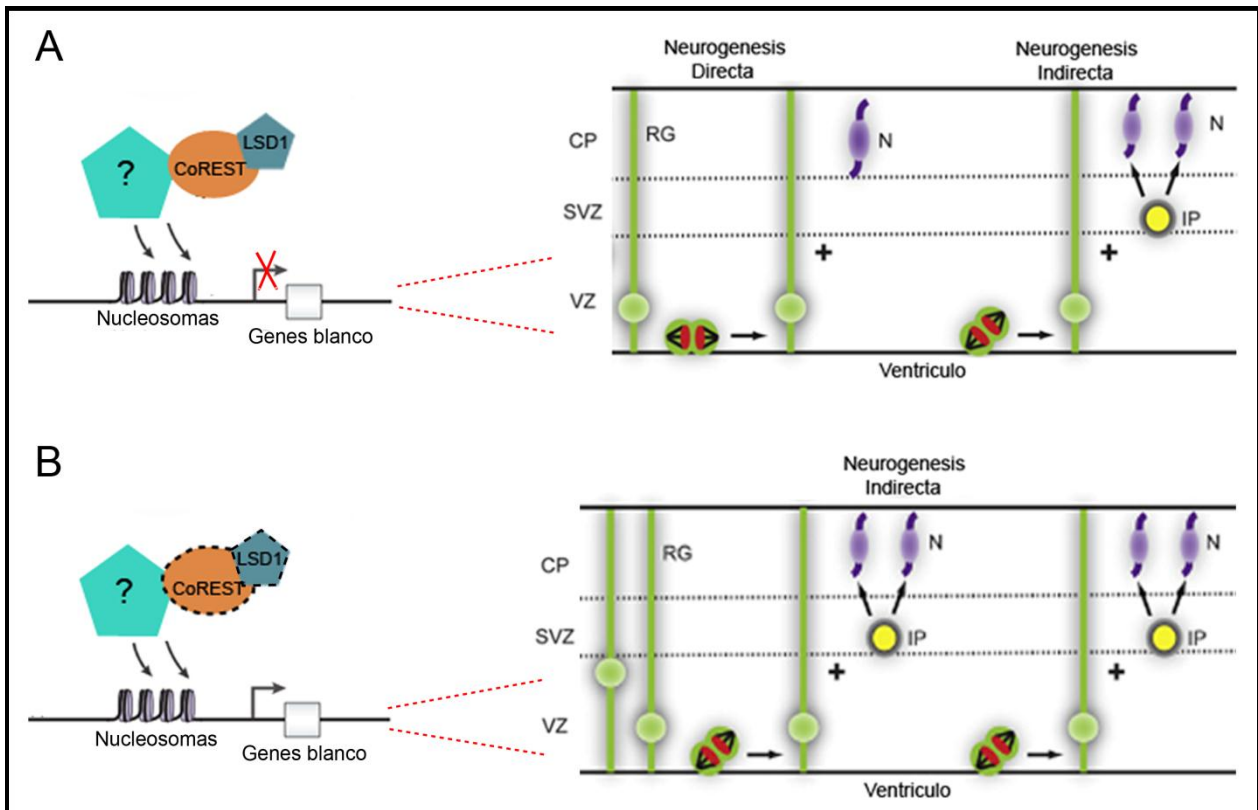


Figura 43. Diagrama que muestra la función de CoREST durante la neurogenesis. A) El control transcripcional ejercido por CoREST junto con LSD1 sería esencial para la transición desde progenitor neural a neurona postmitótica a través de neurogénesis directa e indirecta. **B)** La pérdida de función de CoREST acompañada de la disminución de LSD1 (línea punteada) tiene como resultado que las glías radiales experimenten divisiones neurogénicas indirectas, produciendo una glia radial y un progenitor intermedio, incrementando transitoriamente el total de progenitores detectado. RG, glia radial; IP, progenitor intermedios; N, neuronas.

7.- Conclusión

Los resultados presentados en esta tesis indican que la función de CoREST es importante durante el tránsito de progenitor neural a neurona post mitótica. Específicamente, CoREST tendría un rol en la diferenciación de glias radiales, ya que tras la pérdida de su función se produce un incremento en la cantidad de este subtipo de progenitor neural junto con progenitores intermedios.

Con relación al mecanismo, los resultados obtenidos mediante el uso de diferentes maniobras moleculares muestran que CoREST y en la ventana temporal de E14.5-17.5, ejercería su rol modulador a través de la Demetilasa 1 específica de lisina (LSD1) y no a través de su interactor mejor descrito, REST/NRSF.

Estos son los primeros datos funcionales a partir del modelo murino y muestran la relevancia de la regulación epigenética en el desarrollo de la corteza cerebral, y más ampliamente en el desarrollo neural.

8.- Proyecciones

A pesar del número de genes y vías de señalización teóricamente reguladas por CoREST, las que podrían alterar la viabilidad o destino celular de las neuronas piramidales, los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la idea de que CoREST parece restringir aspectos específicos del desarrollo neuronal. Esto podría conducir a la identificación de genes y otros componentes regulados por CoREST que participan en eventos celulares y moleculares como la transición multipolar/bipolar, control del destino celular que adoptan las células hijas provenientes del conjunto de progenitores neurales, y en el control espacial y temporal de las divisiones celulares efectuadas por estos últimos.

Aprovechando el sistema de electroporación *in utero* en combinación con video microscopía de las células marcadas con reporteros fluorescentes se podrán observar y registrar directamente las divisiones neurogenicas y gliogenicas en el cerebro en desarrollo, así como el comportamiento proliferativo de los precursores neuronales, el rastreo de las células post mitóticas y como ellas se mueven de las zonas proliferativas hacia su posición final. Entonces, la combinación de estas herramientas permitirá la identificación y caracterización inequívoca de las células precursoras durante la etapa embrionaria además de la caracterización fisiológica e inmunohistoquímica de las células fluorescentes bajo estudio. Finalmente presenta una oportunidad para probar hipótesis sobre mecanismos que guían el desarrollo de la corteza cerebral.

Considerando que la pérdida de función de CoREST afecta distintos eventos celulares (diferenciación, posición celular, morfología), sería muy interesante determinar por ejemplo si los efectos morfológicos son una consecuencia de la alteración en el programa de diferenciación de los progenitores o en la migración, o si los defectos en la morfogenesis neurítica se deben a un requerimiento intrínseco de CoREST en este proceso celular. Una estrategia para llevar a cabo estos estudios sería el desarrollo de un modelo de ratón CoREST/loxP. Este modelo podría ser electroporado *in utero* con construcciones plasmidiales codificantes para la recombinasa Cre asociada a un reportero fluorescente bajo promotores que se activan en poblaciones celulares específicas, logrando la depleción completa de CoREST a

través de la recombinación mediada por Cre en progenitores neurales, neuronas postmitóticas y neuronas postmigratorias.

Por otra parte, la investigación de la función de CoREST en la población de progenitores neurales que se encuentra en la zona subgranular del giro dentado y la regulación de su ciclo celular y estado de diferenciación mejoraría nuestro entendimiento de la vía de señalización de CoREST en neurogenesis.

Estos estudios abrirían una nueva posibilidad para entender el mecanismo molecular subyacente a la complejidad celular, estructural y funcional de la estructura laminar de la corteza cerebral.

9.- Referencias

Abrajano JJ, Qureshi IA., Gokhan S., Zheng D., Bergman A., Mehler MF. Differential deployment of REST and CoREST promotes glial subtype specification and oligodendrocyte lineage maturation. *PLoS One*. 4: e7665, 2009

Abrajano JJ., Qureshi IA., Gokhan S., Molero AE., Zheng D., Bergman A., Mehler MF. Corepressor for element-1–silencing transcription factor preferentially mediates gene networks underlying neural stem cell fate decisions. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 107 (38): 16685–1669, 2010

Ayala R., Shu T., Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, Vol. 128 (12): 29-43, 2007.

Anderson SA., Kaznowski CE., Horn C., Rubenstein JL. McConnell SK. Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons *in vivo*. *Cerebral Cortex*, Vol. 12: 702–709, 2002

Andres ME., Burger C., Peral-Rubio MJ., Battaglioli E., Anderson ME., Grimes J., Dallman J., Ballas N., Mandel G. CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 96, 9873-9878, 1999.

Anthony TE., Klein C., Fishell G., Heintz N. Radial glia serves as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, Vol. 41: 881–890, 2004

Arispe N., Doh M., Simakova O., Kurganov B., De Maio A. Hsc70 y Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *The FASEB Journal*, Vol. 18: 1636-1645, 2004

Armisen R., Fuentes R., Olguin P., Cabrejos ME., Kukuljan M. Repressor Element-1 Silencing Transcription/Neuron-Restrictive Silencer Factor Is Required for Neural Sodium Channel Expression during Development of *Xenopus*. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 22(19): 8347-8351, 2002

Bai J., Ramos RL., Ackman JB., Thomas AM., Lee RV., LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nature Neuroscience*, Vol. 6 (12): 1277-1283, 2003

Ballas N., Battaglioli E., Atouf F., Andres ME., Chenoweth J., Anderson ME., Burger C., Moniwa M., Davie J.R., Bowers W.J., Federoff H.J., Rose DW., Rosenfeld M.G., Brehm P., Mandel G. Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31, 353-365, 2001

Ballas N., Grunseich C., Lu DD., Speh JC., Mandel G. REST and Its Corepressors Mediate Plasticity of Neuronal Gene Chromatin throughout Neurogenesis. *Cell*, Vol. 121: 645–657, 2005

- Ballas N., Mandel G. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current opinion in neurobiology*, Vol. 15: 500–506, 2005
- Baudet ML., Zivraj KH., Abreu-Goodger C., Muldal A., Armisen J., Blenkiron C., Goldstein DL., Miska EA., Holt CE. miR-124 acts through CoREST to control onset of *Sema3A* sensitivity in navigating retinal growth cones. *Nature Neuroscience*, Vol. 15(1): 29-38
- Bielas S., Higginbotham H., Koizumi H., Tanaka T., Gleeson JG. Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 20: 593-618, 2004
- Bruce AW., Donaldson Ij., Wood IC., Yerbury SA., Sadowski SI., Chapman M., Göttgens G., Buckley NJ. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 100(1): 10458-10463, 2004
- Campbell K. Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol.13: 50-56
- Campbell K. Cortical neuron specification: it has time and place. *Neuron*, Vol. 46: 373-376, 2005
- Campbell K. y Götz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neuroscience*, Vol. 25: 235–238, 2002
- Caviness VS., Takahashi T. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Development*, Vol. 17: 159–163, 1995
- Chen ZF., Paquette AJ., Anderson DJ. NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nature Genetics*, Vol. 20:136–142, 1998
- Cheng LC., Tavazoie M., Doetsch F., Stem Cells: From Epigenetics to microRNAs. *Neuron*, Vol. 46: 363-367, 2005
- Corbo JC. y cols., Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *The Journal Neuroscience*. 22, 7548–7557, 2002
- Dallman JE., Allopenna J., Bassett A., Travers A., Mandel G. A conserved role but different partners for the transcriptional corepressor corest in fly and mammalian nervous system formation. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 24 (32): 7186-7193, 2004
- Dehay C., Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience* Vol. 8: 438-450, 2007.
- De la Calle-Mustienes E., Modolell J., and Gomez-Skarmeta J.L. The Xiro-repressed gene CoREST is expressed in *Xenopus* neural territories. *Mechanism of Development*, Vol. 110: 209-211, 2002

- Ding N., Zhou H., Esteve PO., Chin HG., Kim S., Xu X., Joseph SM., Friez MJ., Schwartz CE., Pradhan S., Boyer TG., Mediator Links Epigenetic Silencing of Neuronal Gene Expression with X-Linked Mental Retardation. *Molecular Cell*. Vol. 31: 347–359, 2008
- Dixit R., Lu, F., Cantrup R., Gruenig N., Langevin L. M., Kurrasch DM., Schuurmans C. Efficient Gene Delivery into Multiple CNS Territories Using In Utero Electroporation. *J. Vis. Exp.* (52), e2957, DOI: 10.3791/2957, 2011.
- Elias LA., Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, Vol. 448, 901–907, 2007
- Feder JH., Rossi JM., Solomon J., Solomon N., Lindquist S. The consequences of expressing hsp70 in drosophila cells at normal temperatures. *Genes & Development*, Vol. 6: 1402-1413, 1992
- Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 21(1): 23-35, 2011
- Fornieris F., Claudia Binda C., Elena Battaglioli E., Mattevi A. LSD1: oxidative chemistry for multifaceted functions in chromatin regulation. *Trends in Biochemical Science*, Vol. 33(4): 181-189, 2008
- Foster C.T, Dovey O.M, Lezina L, Luo J.L, Gant T.W, Barlev N, Bradley A, Cowley S.M. Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability. *Molecular Cellular Biology*, Vol. 30: 4851-4863, 2010
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science*, Vol. 294:1071-1074, 2001
- Gilbert SF. *Developmental Biology*, Ninth Edition, 2010
- Gómez AV., Galleguillos D., Maass JC., Battaglioli E., Kukuljan M., Andrés ME. CoREST Represses the Heat SOC Response Mediated by HSF1. *Molecular Cell*, Vol. 31: 222-231, 2008
- Götz, M. Glial cells generate neurons - master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist*, Vol. 9: 379-397, 2003
- Götz M., Huttner W.B. The Cell Biology of Neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 6: 777-788, 2005
- Grove EA., Fukuchi-Shimogori T. Generating the cerebral cortical area map. *Annual Review of Neuroscience*. Vol. 26: 355-80, 2003
- Guillemot, F. Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17: 639-647, 2005

- Guillemot F., Molnár Z., Tarabykin V., Stoykova A. Molecular mechanism of cortical differentiation. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 23: 857-868, 2006
- Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W.B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 101: 3196-3201, 2004
- Hsieh J. y Gage F.H. Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17: 664-671, 2005
- Hevner RF., Hodge RD., Daza RAM., Englund C. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: Conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neuroscience Research*, Vol. 55 223–233, 2006
- Huttner WB., Kosodo Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17: 648–657, 2005
- Hutton SR, Pevny LH. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Developmental Biology*. Vol. 352 (1): 40-7, 2011
- Ina A., Sugiyama M., Konno J., Yoshida S., Ohmomo H., Nogami H., Shutoh F., Hisano S. Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 26 (3): 615-23, 2007
- Jackson AL. and Linsley PS. Noise amidst the silence: offtarget effects of siRNAs? *Trends in Genetics*. Vol. 20, 521–524, 2004
- Jarriault S. and Greenwald I. Suppressors of the egg-laying defective phenotype of sel-12 presenilin mutants implicate the CoREST corepressor complex in LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes & Development*, Vol. 16, 2713-2728, 2002
- Kiefer J.C. Epigenetics in Development. *Developmental Dynamics*, Vol. 236: 1144-1156, 2007
- Kondo T. Epigenetic alchemy for cell fate conversion. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 16, 502–507, 2006
- Kuan CY., Roth KA., Flavell RA., Rakic P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in Neuroscience*, Vol. 23:291-297, 2000
- Lange C, Huttner WB., Calegari F. Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. *Cell Stem Cell*, Vol. 5 (3), 320-331, 2009

- Lee EY, Chang CY., Hu N, Wang YC., Lai CC., Herrup K, Lee WH., Bradley A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, Vol. 359(6393): 288-94, 1992
- Lee MG., Wynder C., Cooch N., Shiekhattar R. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, Vol 437: 432-435, 2005
- Lessard J., Wu J., Ranish JA., Wan M., Winslow MM., Staahl BT., Wu H., Aebersold R., Graef IA., Crabtree GR. An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. *Neuron*, Vol. 55 (19): 201-215, 2007
- Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Vol. 295 (5556): 868-872, 2002*
- LoTurco JJ y Bai J. The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends in Neurosciences*, Vol. 29 (7): 407-413, 2006
- Lunyak VV., Buergess R., Prefontaine GG., Nelson C., Sze SH., Chenoweth J., Schwartz P., Pevzner PA., Glass C., Mandel G., Rosenfeld MG. *Science*, Vol. 298: 1747-1752, 2002
- Lunyak VV., Rosenfeld MG. No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell*, Vol. 121 (4): 499-501, 2005
- Mallamaci A., Anastassia Stoykova A. Gene networks controlling early cerebral cortex arealization. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 23: 847–856, 2006
- Marin O., Rubenstein JLR. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 2: 780-790, 2001
- Marteau L., Pacary E., Valable S., Bernaudin M., Guillemot F., Petit E., Angiopoietin-2 Regulates Cortical Neurogenesis in the Developing Telencephalon. *Cerebral Cortex*, 2010
- Matsuda T., Cepko C.L. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol.101:16-22, 2004
- Meyer G., Schaaps JP., Moreau L., Goffinet AM. Embryonic and Early Fetal Development of the Human Neocortex. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 20 (5):1858–1868, 2000
- Miyata T., Kawaguchi A., Okano H., Ogawa M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31: 727–741, 2001
- Mizutani K., Saito T. Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 132, 1295-1304, 2005

Moffat J., Grueneberg D.A., Yang X., Kim SY., Kloepper AM., Hinkle G., Piquani B., Eisenhauer TM., Luo B., Grenier JK., Carpenter AE., Foo SY., Stewart SA., Stockwell BR., Hacohen N., Hahn WC., Lander ES., Sabatini DM., Root DE. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* Vol. 124:1283-1298, 2006.

MacDonald JL., Roskams AJ. Histone Deacetylases 1 and 2 Are Expressed at Distinct Stages of Neuro-Glial Development. *Developmental Dynamics* 237:2256–2267, 2008

Martínez-Cerdeño V, Noctor SC, Kriegstein AR. The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, i152-61, 2006

Molyneaux B., Arlotta P., Menezes J., Macklis J. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 8 (6): 427-437, 2007

Morrison SJ., Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, Vol. 441(29): 1068-1074, 2006

Muraoka A., Maeda A., Nakahara N., Yokota M., Nishida T., Maruyama T., Ohshima T. Sumoylation of CoREST modulates its function as a transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 377 (4): 1031-5, 2008

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, Vol. 4:143– 50, 2001

Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Review Neuroscience*, Vol. 3:423–32, 2002

Nguyen L., Besson A., Ik-Tsen Heng J., Schuurmans C., Teboul L., Parras C., Philpott A., Roberts JM., Guillemot F. p27^{kip1} independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes and Development*, Vol. 20: 1511-1524

Nieto M., Monuki ES., Tang H., Imitola J., Haubst N., Khoury SJ., Cunningham J., Götz M., Walsh CA. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the Subventricular Zone and Upper Layers II–IV of the Cerebral Cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 479: 168–180, 2004

Noctor SC., Martinez-Cerdeno V., Ivic L., Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, Vol. 7: 136-144, 2004

Noctor SC., Martinez-Cerdeno V., Kriegstein AR Distinct Behaviors of Neural Stem and Progenitor Cells Underlie Cortical Neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 508: 28-44, 2008

Dennis DM, O'Leary DDM, Sahara S. Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 18: 90-100, 2008

Olguín P., Oteíza P., Gamboa E., Gómez-Skármeta JL., Kukuljan M. RE-1 Silencer of Transcription/Neural Restrictive Silencer Factor Modulates Ectodermal Patterning during *Xenopus* development. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 26 (10): 2820 –2829, 2006

Ohshima T., Hirasawa M., Tabata H., Mutoh T., Adachi T., Suzuki H., Saruta K., Iwasato T., Itohara S., Hashimoto M., Nakajima K., Ogawa M., Kulkarni A.B., Mikoshiba K. Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development*, Vol. 134: 2273-2282, 2007

Ouyang J, Shi Y, Valin A, Xuan Y, Gill G. Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Molecular Cell*, Vol. 34 (2): 145-54, 2009

Paquette A.J., Perez S.E., Anderson D.J. Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 97: 12318–12323, 2000

Perissi V, Jepsen K., Glass C.K., Rosenfeld, M.G. Deconstructing repression:evolving models of co-repressor action. *Nature Reviews Genetics*, Vol, 11: 109-123, 2010

Pinto L., Mader MT., Irmeler M., Gentilini M., Santoni F., Drechsel D., Blum R., Stahl R., Bulfone A., Malatesta P. Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes-lineage and transcriptome analysis. *Molecular Cellular Neuroscience*, Vol. 38, 15-42, 2008

Rallu M., Machold, R., Gaiano N., Corbin J.G., McMahon AP., Fishell G. Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development*, Vol. 129, 4963-4974, 2002

Ramos R.L. y cols., Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cerebral Cortex* DOI:10.1093/cercor/bhj074, 2005

Roopra A., Huang Y., Dingleline R. Neurological Disease: Listening to Gene Silencers. *Molecular Interventions*, Vol. 1: 219-228, 2001

Roopra A., Qazi, R., Schoenike B., Daley TJ., Morrison JF. Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol. Cell*, Vol. 14, 727–738, 2004

Ruthenburg AJ., Li H., Patel DJ., Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 8: 983-994, 2007

Saito T, Nakatsuji N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental Biology*. Vol. 240: 237-246, 2001

Saito, T. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nature Protocols*, Vol. 1 (3): 1552-1558, 2006

Salomoni, P., Calegari F. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends in Cell Biology*, Vol. 20 (5): 233-243

Scacheri PC., Rozenblatt-Rosen O., Caplen NJ., Wolfsberg TG., Umayam L., Lee JC., Hughes CM., Shanmugam KS., Bhattacharjee A., Meyerson M., Collins FS. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 1892–1897, 2004

Sessa A., Mao C., Hadjantonakis AK, Klein WH., Broccoli V. Tbr2 Directs Conversion of Radial Glia into Basal Precursors and Guides Neuronal Amplification by Indirect Neurogenesis in the Developing Neocortex. *Neuron*, Vol. 60 (9), 56–69, 2008

Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Molecular Cell*, Vol. 19: 857–864, 2005

Shimojo M y Hersh L.B. Regulation of the cholinergic gene locus by the repressor element-1 silencing transcription factor/neuron restrictive silencer factor (REST/NRSF). *Life Science*, Vol. 74 (18): 2213-2225

Singh SK., Kagalwala MN., Parker-Thorburg J., Adams H., Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, Vol. 453 (8): 223-227, 2008

Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 9: 206-221, 2008

Su X., Kameoka S., Lentz S., Majumder. Activation of REST/NRSF target genes in neural stem Cells to Sufficient to cause Neuronal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 24 (18): 8018-8025, 2004

Su X., Gopalakrishnan V., Stearns D., Aldape K., Lang FF., Fuller G., Snyder E., Eberhart CG., Majumder S. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 26 (5): 1666-1678, 2006

Sur M., Rubenstein J. Patterning and Plasticity of the Cerebral Cortex. *Science*, Vol. 310 (4): 805-809

Tabata H., Nakajima K. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23: 9996-10001, 2003

Tapia-Ramirez J., Eggen BJ., Peral-Rubio MJ., Toledo-Aral JJ., Mandel G. A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 94: 1177–1182, 1997

<http://molinterv.aspetjournals.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=pnas&resid=94/4/1177>

Tontsch S., Zach O., Bauer H.C. Identification and localization of M-CoREST (1A13), a mouse homologue of the human transcriptional co-repressor CoREST, in the developing mouse CNS. *Mech. Dev.* 108, 165-169, 2001

Tsai JW., Chen Y., Kriegstein AR., Vallee RB. Lis1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 170 (6): 935-945, 2005

Vallee R., Tsai J.W. The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes and Development*, Vol. 20: 1384-1393, 2006

Vidal RL, Ramírez OA, Sandoval L, Koenig-Robert R, Härtel S, Couve A. Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. *Molecular Cellular Neuroscience*, Vol. 35:501-512, 2007

Wonders CP., Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, Vol. 7: 687–696, 2006

Wang Y., Paramasivam M., Thomas A., Bai J., Kaminen-Ahola N., Kere J., Voskuil J., Rosen GD., Galaburda AM., Loturco JJ. Dyx1c1 functions in Neuronal Migration in Developing Neocortex. *Neuroscience* 143: 515-522, 2006

Wu J., Xie X. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biology*, Vol. 7 (9), R85

Yang M., Gocke C.B, Luo X, Borek D., Tomchick DR., Machius M., Otwinowski Z., Yu H. Structural Basis for CoREST-Dependent Demethylation of Nucleosomes by the Human LSD1 Histone Demethylase. *Molecular Cell*, Vol. 23: 377-387, 2006

Yang P., Zhu B., Wang Y., Gao S. Rcor2 is a subunit of the LSD1 complex that regulates ESC property and substitutes for SOX2 in reprogramming somatic cells to pluripotency. *Stem Cells*, Vol. 29:791–801, 2011

Yokota Y., Ring C., Cheung R., Pevny L., Anton ES. Nap1-Regulated Neuronal Cytoskeletal Dynamics Is Essential for the Final Differentiation of Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*, Vol. 54, 429-445, 2007

Young-Pearce TL., Bai J., Chang R., Zheng JB., Loturco JJ., Selkoe D. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 27 (52): 14459-14469, 2007

