

UCH - FC
DOC - B.MobL
A517
c-1



**Neurogénesis de la epíffisis: participación de los
genes proneurales y neurogénicos.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial a los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en ciencias con mención en

Biología Molecular Celular y Neurociencia

Facultad de Ciencias

Por

Julio Amigo Donoso

Enero, 2005

Director de tesis: Dr. Miguel Luis Allende Connelly

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

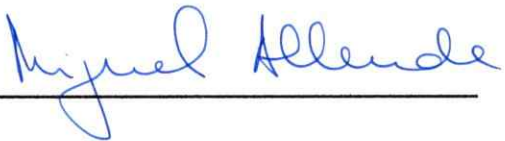
Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Julio Amigo

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención Biología Molecular Celular y Neurociencia, en el examen de Defensa privado de Tesis rendido el día 5 de Octubre de 2004.

Director de Tesis.

Dr. Miguel Allende.



Comisión evaluación de la Tesis.

Dr. Margarita Carú





Dr. Juan Olate.

Dr. Jimena Sierralta.



Dr. Omar Orellana.



.....a mi familia en general a mis amigos en particular

AGRADECIMIENTOS.

“Sólo que la “sustancia” del hombre no es el espíritu, como síntesis del alma y cuerpo, sino la existencia”.

Martin Heidegger.

El biólogo tiene una desventaja el hecho trabajar con conceptos y ocupar su tiempo buscando definiciones acerca de lo que es la vida, y la vida como se sabe es una materia compleja. La vida surge, se elabora cambia y como Heidegger no ignoraba, la vida es tiempo. Pero el biólogo tiene que resignarse a este manejo, tiene que explorar, luego pensar, luego dejar que le lleguen las ideas; debe trabajar en la materia vital, debe escribir, pero sobre todo debe publicar, y así trabaja durante años y se siente solo, viviendo en una suerte aislamiento; pero si el tiempo es propicio y hay azar con compromiso, llega un momento en el cual descubre que no está solo. En ese momento abre los ojos y se encuentra rodeado por sus amigos, conocidos y desconocidos, personas que han pasado por su vida y que le han enriquecido, y en ese momento se siente existir y su vida y su tiempo, felicidades y angustias tienen sentido. Yo ahora me siento muy feliz y agradezco la felicidad de haberlos conocido: Julio, Celia, Matías, Claudio, Claudia, Pablo R, Pamela, Pablo F, Mariana, Nico, Loreto, Lica, Ammy y los nombres que vendrán.

Agradezco también a mi mentor Miguel Allende por el consejo, la elaboración de este escrito y la discusión de los resultados.

INDICE DE MATERIAS

TITULO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE MATERIAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	
SUMMARY.....	
INTRODUCCION.....	1
1. La epífisis como modelo de estudio en la neurogénesis.....	1
1.1. Neurogénesis temprana.....	2
1.2. Expresión génica durante la neurogénesis.....	2
1.3. Mecanismos de activación de los genes proneurales.....	4
1.4. Función de los genes proneurales en la neurogénesis de los vertebrados.....	5
1.5. Los genes proneurales y la identidad neuronal.....	6
2. La vía Notch.....	7
2.1. Notch participa en la inhibición lateral.....	9
3. El órgano pineal o epífisis en el pez cebra.....	11
3.1. Especificación del territorio de la epífisis.....	11
3.2. La neurogénesis en la epífisis.....	12
4. Desarrollo de la línea lateral posterior.....	15
4.1. Neurogénesis en la línea lateral posterior.....	16
5. Plan de esta tesis.....	17

HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	20
1. Animales.....	20
1.1. Obtención y mantenimiento de los embriones de pez cebra (<i>Danio Rerio</i>).....	20
1.2. Fijación de los embriones.....	21
1.3. Empleo de oligonucleótidos morfolidos.....	21
1.4. Microinyección de embriones e inducción con dexametasona.....	22
1.5. Transcripción <i>in vitro</i> de mRNA.....	23
1.6. Análisis de los patrones de expresión de los genes estudiados mediante hibridación <i>in situ</i>	26
1.7. Inmunodetección para marcadores de neuronas.....	32
1.8. Método de tinción vital en la línea lateral de los embriones.....	34
1.9. Análisis de los efectos producidos por la microinyección.....	34
1.10. Análisis de embriones mutantes.....	35
RESULTADOS.....	37
1. Especificación neuronal en la epífisis.....	37
1.1. Expresión temporal <i>zash1a</i> , <i>ngn1</i> y <i>neuroD</i>	37
1.2. Expresión <i>deltaA</i> , <i>B</i> y <i>D</i> en la epífisis.....	41
1.3. <i>Zash1a</i> regula la expresión de <i>delta</i>	44
1.4. <i>Zash1</i> auto-regula su expresión en la neurogénesis.....	47
2. Neurogénesis en la epífisis.....	50
2.1. <i>Zash1a</i> y <i>ngn1</i> regulan la neurogénesis primaria.....	50
2.2. <i>Zash1a</i> regula la formación de las neuronas pineales.....	55
3. Notch-Delta participa en la selección de neuronas en la epífisis.....	57
3.1. Notch regula la expresión de <i>zash1a</i> , <i>ngn1</i> y <i>neuroD</i>	57
3.2. Notch controla la expresión de <i>deltaA</i> , <i>B</i> y <i>D</i>	61
3.3. Notch controla la producción de neuronas primarias en la epífisis.....	63
3.4. Notch controla la neurogénesis de los fotorreceptores y las neuronas de conexión.....	63

4. Neurogénesis en la línea lateral posterior (llp).....	67
4.1. Expresión de <i>neuroD</i> en la llp.....	67
4.2. La formación del ganglio en la llp es dependiente de <i>ngn1</i>	68
4.3. Función de <i>neuroD</i> en el desarrollo de la llp.....	69
4.4. Notch regula la expresión de <i>neuroD</i> en la llp.....	72
DISCUSIÓN.....	76
1. Mecanismos implicados en el posicionamiento de la epífisis.....	76
2. Mecanismos implicados en la especificación neuronal.....	77
2.1. <i>Zash1a</i> activa la expresión de <i>delta</i>	77
2.2. Autorregulación de <i>zash1a</i> y <i>zash1b</i> en la neurogénesis.....	79
2.3. Genes involucrados en la identidad posicional de <i>zash1a</i> y <i>1b</i>	80
2.4. Relaciones de epístasis entre <i>zash1a</i> , <i>ngn1</i> y <i>neuroD</i>	83
3. Mecanismos implicados en el control del número de neuronas.....	84
3.1. <i>Zash1a</i> controla la neurogénesis primaria.....	84
3.2. Papel de <i>zash1a</i> y <i>ngn1</i> en la neurogénesis de la epífisis.....	85
3.3. <i>Zash1a</i> y <i>ngn1</i> definen territorios en la epífisis.....	86
4. Mecanismo de la inhibición lateral en la epífisis.....	87
4.1. Notch regula la expresión de los genes proneurales.....	87
4.2. Notch regula la expresión de <i>deltaA</i> , <i>B</i> y <i>D</i>	91
4.3. Notch es mediador de la inhibición lateral.....	93
4.4. Notch regula la producción de neuronas y glías.....	96
5. Mecanismos implicados en la diferenciación neuronal.....	97
5.1. La diferenciación de fotorreceptores y neuronas de conexión.....	97
6. Mecanismos implicados en la neurogénesis de la línea lateral posterior (llp).....	102
6.1. Papel de <i>ngn1</i> en la generación de los ganglios sensoriales.....	102
6.2. Papel de <i>neuroD</i> en la diferenciación de la llp.....	103
6.3. Expresión de <i>delta</i> en la neurogénesis de la llp.....	104
6.4. Notch regula <i>neuroD</i> en la llp.....	105
CONCLUSIONES.....	107
PERSPECTIVAS.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla.1. Clones utilizados para la síntesis de mRNA.....	24
Tabla.2. Clones para la síntesis de Ribosondas.....	29
Tabla.3. Disminución en la expresión de <i>delta</i> en embriones inyectados con MO <i>zash1a</i>	47
Tabla.4. Aumento en la expresión de los <i>zash1a</i> y <i>zash1b</i> en embriones inyectados con MO <i>zash1a</i> + MO <i>zash1b</i>	49
Tabla.5. los genes <i>zash1a</i> y <i>ngn1</i> participan en la formación de neuronas primarias en la epíffis.....	53
Tabla.6. <i>zash1a</i> regula la formación de los fotorreceptores (Zpr1+) y las neuronas de conexión (Tuac+) en la epíffis.....	57
Tabla.7. Notch regula la formación de los fotorreceptores (Zpr1+) y las neuronas de conexión (Tuac+) en la epíffis.....	66

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN.

Figura. 1. Transducción de la vía Notch/Delta.....	8
Figura. 2. El Mecanismo de inhibición lateral.....	10
Figura. 3. Modelo de la neurogénesis en la epíffisis.....	13
Figura. 4. Composición neuronal de la epíffisis en el pez cebra.....	14
Figura. 5. Desarrollo de los neuromastos en la línea lateral posterior.....	16

RESULTADOS.

Figura. 6. Comparación de la expresión de <i>zash1a</i> y <i>zash1b</i>	38
Figura. 7. En la pineal la expresión de <i>zash1a</i> presenta dos fases: Activación y represión.....	38
Figura. 8. Expresión de los genes <i>zash1a</i> y <i>zash1b</i> en el cerebro.....	40
Figura. 9. Expresión dinámica de <i>ngn1</i> y <i>neuroD</i> en la epíffisis.....	40
Figura. 10. Patrón de expresión de <i>ngn1</i> y <i>delta</i> en la neurogénesis de pez cebra.....	43
Figura. 11. Patrones de expresión de los genes <i>deltaA</i> , <i>B</i> y <i>D</i> en la neurogénesis de la pineal.....	43
Figura. 12. <i>Zash1a</i> controla la expresión de los genes <i>deltaA</i> , <i>B</i> y <i>D</i>	46
Figura. 13. <i>Zash1a</i> autorregula su expresión.....	46
Figura. 14. <i>Ngn1</i> participa en la neurogénesis de la epíffisis.....	51
Figura. 15. <i>Zash1a</i> participa en la neurogénesis de la epíffisis.....	51
Figura. 16. <i>Zash1a</i> y <i>ngn1</i> regulan la expresión de <i>Islet1</i> en la pineal.....	54
Figura. 17. <i>Zash1a</i> regula la formación de las neuronas de conexión.....	54
Figura. 18. <i>Zash1a</i> regula la formación de los fotorreceptores en la epíffisis....	56
Figura. 19. Expresión de <i>zash1a</i> y <i>ngn1</i> la neurogénesis de <i>mind bomb (mib)</i>	60
Figura. 20. Expresión de <i>neuroD</i> en el mutante <i>mib</i>	60

Figura. 21. Expresión de <i>deltaA, B y D</i> en la neurogénesis de <i>mib</i>	62
Figura. 22. Hiperplasia neuronal en el mutante <i>mib</i>	62
Figura. 23. Notch controla la producción de neuronas de conexión en la epífisis.....	64
Figura. 24. Notch controla la producción de fotorreceptores en la epífisis.....	65
Figura. 25. Notch activado reprime la formación de los fotorreceptores.....	66
Figura. 26. Desarrollo de la línea lateral posterior (llp).....	69
Figura. 27. <i>Ngn1</i> regula la formación del ganglio en la llp.....	69
Figura. 28. Expresión de <i>neuroD</i> en la llp.....	71
Figura. 29. <i>NeuroD</i> participa en la formación de los neuromastos en la llp.....	71
Figura. 30. Neurogénesis en la llp del mutante <i>mib</i>	73
Figura. 31. Notch regula la expresión de <i>neuroD</i> en la llp.....	74

DISCUSION.

Figura. 32. Modelo para la especificación y selección neuronal en la epífisis...	82
Figura. 33. Modelo de competencia neuronal en la epífisis.....	90
Figura. 34. Posible actividad de <i>flh</i> en la neurogénesis.....	94
Figura. 35. Interacciones genéticas durante la neurogénesis de la epífisis....	101

ABREVIATURAS

<i>Ac-sc</i>	<i>Achaete-scute</i>
<i>AchE</i>	<i>Acetilcolinesterasa</i>
<i>ato</i>	<i>atonal</i>
<i>BCIP</i>	<i>5-bromo 4-cloro 3-indol fosfato</i>
<i>bHLH</i>	<i>dominio básico de unión a DNA, conectado por un lazo Hélice-lazo-Hélice.</i>
<i>BMP</i>	<i>Proteína morfogénica óseo (Bone Morphogenic Protein)</i>
<i>da</i>	<i>daughterless</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxiribonucleico</i>
<i>DEPC</i>	<i>Dietilpirocarbonato</i>
<i>din</i>	<i>dino</i>
<i>DTT</i>	<i>Ditiotreitol</i>
<i>Espl</i>	<i>Enhancer of split</i>
<i>FGF</i>	<i>Factor de crecimiento fibroblástico embrionario</i>
<i>FGF8</i>	<i>Factor de crecimiento fibroblástico 8</i>
<i>Fih</i>	<i>Floating head</i>
<i>FRET-43</i>	<i>Anticuerpo específico de fotorreceptores</i>
<i>llp</i>	<i>línea lateral posterior</i>
<i>MAB</i>	<i>Tampón de ácido maleico</i>
<i>MAB/BMB</i>	<i>Boehringer Mannheim Blocking Reagent 2% en MAB</i>

mib	mind bomb
ml	mililitros
Mbl	Masterblind
mm	milímetros
mM	miliMolar
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	microMolar
NAT	N-acetiltransferasa
NBT	Cloruro de 4-nitro blue tetrazolium
ng	nanogramos
ngn	neurogenina
nM	nanoMolar
PBS	Tampón fosfato salino
pg	picogramos
PCR	Reacción en Cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehido
Shh	Sonic hedgehog
snb	somitabun
SNC	Sistema Nervioso Central
snh	snailhouse

SNP *Sistema Nervioso Periférico*

srw *swirl*

Su(H) *Supresor of hairless*

Tuac *Tubulina acetilada*

U *Unidades*

RESUMEN

En el pez cebra, el órgano pineal o epífisis es una estructura simple formada por pocas neuronas: Fotorreceptores y neuronas de conexión. Al principio del desarrollo embrionario, *floating head (flh)* especifica el territorio presuntivo de la epífisis y activa la neurogénesis permitiendo la expresión de *zash1a*. El gen proneural *zash1a* y sus genes homólogos (*ngn1*, *neuroD*) codifican para factores transcripcionales con dominios básicos de unión al DNA (bHLH). Estos genes han sido descritos en varias especies de animales incluyendo insectos, nemátodos y vertebrados, sugiriéndose que participan en el desarrollo embrionario durante la especificación y formación de los precursores neuronales. Sin embargo, al comenzar nuestro trabajo se desconocía el papel de *zash1a*, *ngn1* y *neuroD* en la neurogénesis de la epífisis. Con este objetivo, nos propusimos estudiar la función de los genes referidos en la diferenciación de las neuronas pineales y, asimismo, determinar las interacciones genéticas que participan en la selección neuronal. En consecuencia, planteamos la siguiente hipótesis: *zash1a* regula la expresión de *delta* en los precursores neuronales de la epífisis permitiendo la diferenciación hacia fotorreceptores y neuronas de conexión. Para resolver esta pregunta usamos una aproximación embriológica que involucra el aumento y la pérdida de la función de los genes de interés, mediante expresión artificial de genes constitutivamente activos y el uso de embriones mutantes de la vía Notch llamados *mindbomb (mib)*.

En la neurogénesis de la epífisis se encontró que, *zash1a* controla la expresión de *deltaA*, *B* y *D*. A su vez, mostramos que *zash* (*zash1a* y *zash1b*) tiene la capacidad de autorregular su expresión mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. Además, encontramos que *zash1a* y *ngn1* regulan la producción de neuronas primarias, no asimismo su diferenciación hacia fotorreceptores y neuronas de conexión. Investigando la neurogénesis en el mutante *mib*, determinamos que Notch regula la expresión de *zash1a*, *ngn1*, *neuroD* y *delta*. Efectivamente, la activación de la vía Notch produce menor expresión de los genes proneurales y *delta*. En este contexto, Notch controla la cantidad de neuronas primarias formadas en la epífisis.

Nosotros postulamos que los genes proneurales y neurogénicos participan en vías de señalización implicadas en la selección de los precursores neuronales, pero no en su diferenciación. Este proceso define el número pero no el tipo de neuronas formadas en el órgano pineal.

SUMMARY

In zebrafish the pineal organ or epiphysis is a relatively simple structure, formed by a limited number of neurons: Photoreceptors and connective neurons. At the beginning of the embryonic development, the gene *Floating head (Flh)* specifies the presumptive territory of the epiphysis and activated the neurogenesis, allowing the expression of *zash1a*. The proneural gene *zash1a* and these homologous genes (*ngn1*, *neuroD*) codified transcriptional factors with basic domain for binding to DNA (bHLH). These genes have been described in several species of animals, including insects, nematodes and vertebrates, suggesting that they participate during the embryonic development in the specification and formation of the neuronal precursors. Nevertheless, at the beginning of this work, the role of *zash1a*, *ngn1* and *neuroD* was not known in the neurogenesis of the epiphysis. With this object, we proposed to study the function of the proneural genes in the epiphysial cluster neurogenesis, and to define the genetic interactions involved in neuronal selection process. We postulated the following hypothesis: *zash1a* regulates the expression of *delta* in the neuronal precursors allowing the differentiation of these structures into photoreceptors and connection neurons. To solve this question we use an embryological approach that involves the increase and the loss in the function of the target genes by means of artificial expression of constitutive active genes and the use of mutant embryos for Notch signalling pathways called *mind bomb (mib)*.

We found that in the epiphysial neurogenesis the expressions of the *delta* genes are dependent of *zash1a* function. Additionally, we observed that

the genes *zash1* (*zash1a* and *zash1b*) have the capacity of auto-regulate its own expression by a negative feedback mechanism. An interesting finding is that the genes *zash1a* and *ngn1* regulate the production of primary neurons but not their differentiation into photoreceptors or connective neurons. Investigating the neurogenesis in the *mib* mutant we determine that the proneural genes *zash1a*, *ngn1*, *neuroD* and *delta* are sensitive to the lateral inhibition mediated by Notch. Effectively, the activation of the Notch route produces minor expression of the proneurals genes and *delta*. In this context, Notch regulate the quantity of primary neurons formed in the epiphysis

We postulate that the proneural and neurogenics genes take part in the signalling pathways involved in the selection of the neuronal precursors, but not in his differentiation. This process defines the number but not type of neurons that forms the pineal organ.

INTRODUCCIÓN

1. La epífisis como modelo de estudio de la neurogénesis.

La ontogenia del sistema nervioso, también llamada neurogénesis es uno de los eventos más complejos de la embriogénesis e involucra la diferenciación de neuronas y glías y la posterior formación de circuitos neuronales, procesos que se encuentran coordinados entre células adyacentes. Aún no se conocen los mecanismos que determinan que células no especializadas se comprometan a diferenciarse, pero sí se sabe que existe una regulación del destino celular durante el desarrollo, que abarca una serie de eventos como es la inducción de genes, migración celular e interacciones entre células. La neurogénesis se ha estudiado en variados modelos incluyendo *Drosophila*, nematodos, anfibios, peces y mamíferos. Las evidencias permiten establecer la participación de los genes proneurales y neurogénicos en la neurogénesis de invertebrados y vertebrados (ver revisiones en Artavanis-Tsakonas, 1999; Brunet y Ghysen, 1999). En efecto, varias características morfológicas, fisiológicas y moleculares son compartidas por las neuronas de todas las especies.

Un modelo muy adecuado para estudiar la neurogénesis es el órgano pineal o epífisis, pues ilustra las principales interrogantes de la biología del desarrollo, las cuales son: ¿Cómo participan las señales solubles y celulares autónomas, en el correcto posicionamiento de las células y tejidos? ¿Cómo

ocurre la generación de los distintos tipos de células y neuronas que componen el organismo adulto? Además, pueden plantearse otras preguntas que dicen relación con el control de la morfogénesis, las interacciones célula-célula, la simetría celular y los mecanismos que controlan la migración neuronal.

1.1. Neurogénesis temprana.

El sistema nervioso central de los vertebrados se desarrolla a partir de células ectodermales de la línea media dorsal del eje corporal y su diferenciación es inducida por la interacción del ectodermo con el mesodermo vecino. Durante dicho proceso el ectodermo neural se engruesa para formar la placa neural, que luego se invagina para dar lugar al tubo neural (Bronner-Fraser y Fraser, 1997). En el inicio el tubo neural, consiste en una monocapa de precursores neuronales, los que posteriormente darán origen a los diferentes tipos de neuronas. El patrón embrionario rostral (anterior) caudal (posterior) se prefigura en la placa neural y se hace más evidente una vez forma el tubo neural, que posteriormente se reorganiza rostralmente dando origen a las vesículas cerebrales y caudalmente originando en la columna vertebral (Bronner-Fraser y Fraser, 1997).

1.2. Expresión génica durante la neurogénesis.

Paralelamente al desarrollo del patrón morfológico, se genera el patrón de expresión génica a lo largo del eje rostro caudal y dorso ventral del tubo neural. Un precursor neuronal para definir su identidad: 1) determina su

identidad espacial de acuerdo al sistema Cartesiano dorsal-ventral, rostral-caudal y derecho-izquierdo. 2) modula su proliferación celular, 3) interpreta las señales celulares autonomas y externas que conllevan a detener el ciclo celular y adoptar un fenotipo diferenciado.

Los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo neural, son regulados positiva o negativamente por varios factores de transcripción del tipo homeoproteína (bHLH). En *Drosophila*, se clonaron cuatro genes del tipo bHLH pertenecientes al complejo *Achaete-scute* (*Ac-sc*), integrada por los miembros: *Achaete* (*Ac*), *scute*(*sc*), *letal of scute* (*lsc*) y *asense* (*as*) (García-Bellido, 1979; Ghysen y Dambly-Chaudiere, 1988; Villares y Cabrera, 1987; González y cols., 1989). Más tarde, se definió que la expresión de los genes *Ac-sc* se produce en el ectodermo neuronal marcando las células progenitoras del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Campuzano y Modolell, 1992). Estos genes *Ac-sc* participan en la especificación de las neuronas sensoriales, interneuronas y astrocitos o glías (Jiménez y Modolell, 1993; Jan y Jan, 1994). En *Drosophila*, las evidencias sugieren que los genes *Ac-sc* son regulados por la inhibición lateral mediada por Notch. Efectivamente, la activación de Notch reduce en forma significativa la expresión de los genes *Ac-sc* (Artavanis-Tsakonas, 1999; Brunet y Ghysen, 1999).

En los vertebrados los homologos de *Ac-sc*, denominados generalmente *Ash*, están presentes en todas las especies analizadas (por ejemplo *mash1* en ratón, *cash1* en pollo, *zash1* en el pez cebra y *xash1* en *Xenopus*) y otros tres

genes que curiosamente se han encontrado sólo en algunas clases de vertebrados (*mash2* en mamíferos, *xash3* en *Xenopus* y *cash4* en pollo).

La familia de los genes proneurales incluye hoy día genes adicionales como son *neurogenina (ngn)*, *neuroD*, *atonal (ath)* y otros, todos ellos involucrados en procesos de selección de precursores o diferenciación neuronal.

1.3. Mecanismos de activación de los genes proneurales.

Las proteínas bHLH funcionan como homo y heterodímeros y se unen a una secuencia común del DNA llamada E-box. Las regiones básicas de la proteína se unen al DNA, mientras el dominio "Hélice-Lazo-Hélice" está involucrado en la dimerización con otro bHLH. Los genes *Ac-sc* controlan la competencia neuronal mediante un mecanismo que puede ser dividido en dos etapas: al principio, bajos niveles de mRNA para *Ac-sc*, permiten que los progenitores permanezcan en un estado de activa proliferación. Más tarde, al aumentar los niveles de mRNA de *Ac-sc* se induce la diferenciación de los precursores neuronales (Culi y Modolelli, 1998; Koyano-Nakagawa y cols., 1999). El inicio de la expresión de *Ac-sc* depende de un mecanismo de retroalimentación positivo que involucra las proteínas *Senseless* en *Drosophila* (Nolo y cols., 2000), *Xcoe2* (Dubois y cols., 1998) y *Hes6* en vertebrados (Koyano-Nakagawa y cols., 2000; Bae, 2000). A su vez, se ha descrito un mecanismo de autorregulación donde la proteína *Ac-sc* controla la expresión del mRNA para *Ac-sc* (Van Doren y cols., 1992; Sun y cols., 1998).

1.4. Función de los genes proneurales en la neurogénesis de los vertebrados.

Se han utilizado diversas técnicas para encontrar los genes bHLH involucrados en la neurogénesis de los vertebrados. Es así como se clonaron *mash*, *xash*, *math*, *neuroD2*, *neurogenina (ngn)*, *ngn2*, *ngn3*, *neuroD4* (Lee y cols., 1997). Esta familia de genes presenta una expresión diferencial tanto temporal como espacial en el desarrollo del sistema nervioso. Dependiendo si actúan en tiempos tempranos o tardíos durante la diferenciación, pueden ser divididos en factores de determinación o de diferenciación, respectivamente (Guillemot y cols., 1993; Casarosa y cols., 1999; Morrow y cols., 1999; Tomita y cols., 2000; Cau y cols., 2002). También existen factores de la familia bHLH que actúan como represores, es decir, regulando negativamente la neurogénesis (Lee y cols., 1997). Los genes proneurales pueden ser clasificados en tres tipos básicos. 1) Factores de determinación como, *mash1*, *math1*, *ngn1*, *ngn2*. 2) Factores de diferenciación como, *neuroD*, *neuroD2*, 3) reguladores negativos como, *hes*.

En el pez cebra, se han aislado dos genes *Ac-sc* llamados *zash1a* y *zash1b* (Allende y Weinberg, 1994). El gen *zash1a* se expresa en la epífisis desde la etapa de la neurula tardía y en varias regiones del cerebro: telencéfalo, diencefalo (incluyendo la epífisis) y rombómeros (Allende y Weinberg, 1994). En esta especie *ngn1* actúa en las células precursoras de los ganglios sensoriales (Blader y cols., 1997; Andermann y cols., 2002). Además, *ngn1* favorece el

desarrollo de las neuronas Rohon-Beard (RB) mediante una interacción recíproca con los genes *notch/delta* (Cornell y Eisen, 2002).

En la diferenciación neuronal, el papel de los factores bHLH no está totalmente determinado. Existe evidencia de que los genes de determinación *ngn*, pueden ser reguladores positivos de la neurogénesis. Es así como *ngn1* y *ngn2*, inhiben la diferenciación glial, promoviendo la neuronal (Ma y cols., 1996; Morrow y cols., 1999; Tomita y cols., 2000).

1.5. Los genes proneurales y la identidad neuronal.

El destino de las células que generarán los precursores neuronales o gliales del SNC, parece determinarse cuando las células se encuentran aún en una activa proliferación. A su vez, decisiones como que tipo neuronal será, ocurren hacia el final del ciclo celular (Ferreiro y cols., 1994; Ma y cols., 1996). Entre la regulación del ciclo celular y la determinación/diferenciación neuronal, se manifiestan diferentes maneras de interacción entre ambos procesos que podrían contribuir en conjunto a la coordinación de la neurogénesis. Por lo general la expresión de genes proneurales es transitoria. En *Drosophila* el descenso en la expresión de *Ac-sc* coincide con la diferenciación de los órganos sensoriales en el SNC y SNP (Cubas y cols., 1991; Cubas y cols., 1993; Jarman y cols., 1993; Skeath y Carroll, 1993). Asimismo, en vertebrados los niveles de mRNA para *Ac-sc* y *ngn1* bajan ostensiblemente antes que los progenitores se diferencien a neuronas (Gradwohl y cols., 1996; Fode y cols., 2000). Un hecho a destacar es que *Ac-sc* y *ngn1* inducen la diferenciación

neuronal activando la transcripción de *neuroD* (Lee y cols., 1995; Chitnis y Kintner, 1996; Farha y cols., 2000). En efecto, en ratones la sobreexpresión de *neuroD* induce una prematura diferenciación neuronal (Lee y cols., 1995; Farah y cols., 2000). Por su parte, los análisis embriológicos de *Xenopus* muestran un patrón de expresión secuencial para *ngn1*, *xath3* y *neuroD*. De hecho, *ngn1* induce transcripción de *xath3* y *neuroD*. Por el contrario, *xath3* y *neuroD* no regulan la expresión de *ngn1* (Ma y cols., 1996; Perron y cols., 1999). De manera similar, en el pez cebra *ngn1* activa la expresión de *neuroD* (Blader y cols., 1997; Mueller y Wulliman, 2002a; Mueller y Wulliman, 2002b). Basándonos en estas evidencias es posible sugerir que *ngn1* activa directamente la transcripción de *neuroD* (Blader y cols., 1997; Korzh y cols., 1998).

2. La vía Notch.

Los genes *notch* y *delta* codifican proteínas de transmembrana, correspondientes a receptor y ligando de la vía de transducción Notch-Delta. La activación de Notch por Delta, induce un mecanismo competitivo conocido con el nombre de inhibición lateral, el cual funciona en la selección neuronal en varias especies y en múltiples tejidos (Ver revisión en Artavanis-Tsakonas y cols., 1999). La interacción entre Delta y Notch implica el inicio de una proteólisis secuencial del receptor. El primer corte ocurre cuando Delta se une a Notch lo que expone el sitio reconocido por una proteasa del tipo Furin. Dicho corte elimina gran parte del tallo extracelular. El segundo corte lo ejecuta una

proteasa tipo TACE (presenilina). Este último evento determina la translocación del tallo intracelular (NICD) al núcleo (Fig. 1). Aquí el NICD interactúa con un factor transcripcional, Supresor of Hairless Su(H), permitiendo la activación de los genes de la familia *Espl/hes/her/hairy*, según sea la especie (ver revisión en Artavanis-Tsakonas y cols., 1999). En el pez cebra, existe una línea de peces mutantes llamada *mindbomb* (*mib*), la cual permite analizar la participación de la vía Notch en la generación de neuronas durante el desarrollo embrionario. Los embriones *mib* presentan una falla generalizada en la vía Notch que determina la aparición de neuronas supernumerarias en varias zonas del sistema nervioso (Jiang y cols., 1996). Recientemente se ha caracterizado la proteína responsable de este defecto y se le ha descrito como una ubiquitina ligasa, responsable de la activación del receptor Notch por parte del ligando Delta (Itoh y cols., 2003).

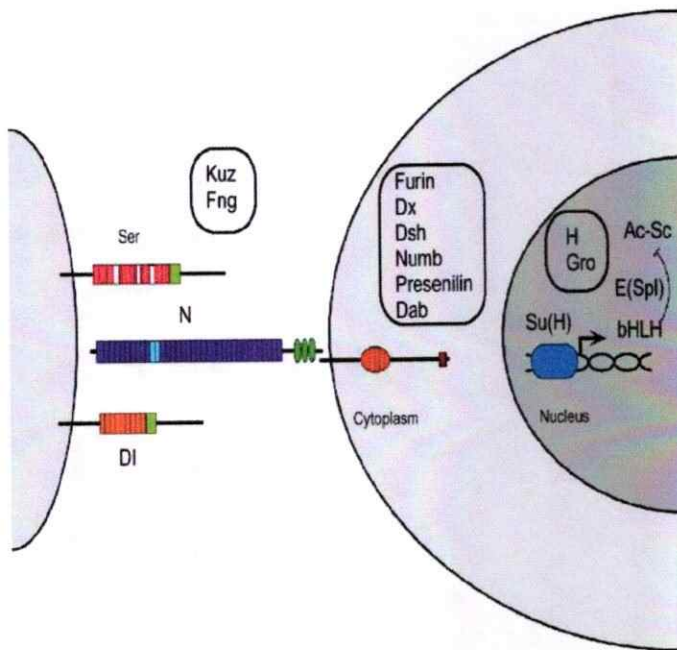


Fig. 1. Transducción de la vía Notch/Delta. (Artavanis-Tsakonas y cols., 1999). Las proteínas receptor /ligando Notch/Delta, participan en las interacciones célula-célula. La activación de Notch permite el corte del tallo intracelular del receptor y su movimiento al núcleo, donde junto con Su(H), activa la transcripción del represor E(Spl).

2.1. Notch participa en la inhibición lateral.

La Figura 2 muestra el mecanismo de inhibición lateral mediado por Notch. En *Drosophila*, Notch restringe la expresión de genes proneurales a las neuronas presuntivas. Brevemente, al principio aumentan los niveles de mRNA para *delta* en los progenitores neuronales. Acto seguido, el aumento de Delta determina la activación de Notch en la célula vecina. Esta célula con mayor actividad Notch expresa el represor transcripcional *Esp1* (Campuzano y Modolell, 1992; Jarman y cols., 1993; Ma y cols., 1996; Blader y cols., 1997; Henrique y cols., 1997), que inhibe la expresión del gen proneural y *delta*. Finalmente, las interacciones célula-célula determinan que sólo los progenitores con bajos niveles de Notch activado, sean seleccionados para formar neuronas (Hinz y cols., 1994; Kunisch y cols., 1994).

En el pez cebra se han identificado cuatro homólogos de los genes *delta*: *deltaA*, *deltaB*, *deltaC* y *deltaD* (Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Dornseifer y cols., 1997; Appel y Eisen, 1998; Haddon y cols., 1998). En esta especie los genes *deltaA*, *B* y *D* participan en la neurogénesis, en tanto *deltaC* actúa definiendo límites celulares en la especificación del notocordo y los somitos (Jiang y cols., 2000; Latimer y cols., 2002).

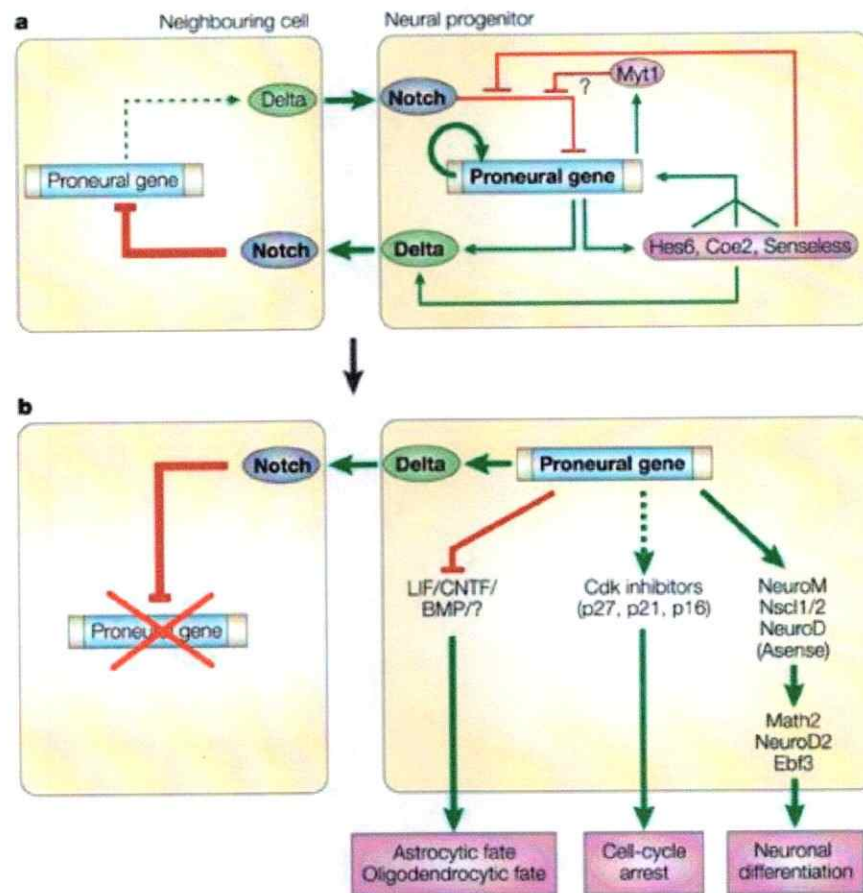


Fig. 2. El mecanismo de inhibición lateral (Bertrand y cols., 2002). (A) Mediante la inhibición lateral se incrementa la expresión del gen proneural y *delta* en el progenitor neuronal. A su vez, se reprime la expresión de los mismos genes en la célula vecina. (B). La célula progenitora, inicia una serie de eventos que permitirán la diferenciación neuronal. Entre ellos cabe destacar, la expresión de *neuroD* y la detención del ciclo celular.

3. El órgano pineal o epífisis en el pez cebra.

Evolutivamente, se postula que la epífisis surgió para permitir a los animales detectar cambios periódicos de luz y oscuridad. Esta glándula está compuesta por fotorreceptores y un sistema neuroendocrino acoplado, el cual transforma los estímulos visuales en hormonas como serotonina y melatonina (Korf, 1994).

En todos los vertebrados, la epífisis cumple una función reguladora del sueño. Es interesante que la epífisis de los primeros cefalocordados (peces y anfibios) contiene, a semejanza de la retina, fotorreceptores (Rollang, 1988; Korf y Rolang, 1989). Dado que la retina apareció más tarde en la evolución, es posible que al comienzo la epífisis sirviera como retina rudimentaria.

En el pez cebra, la epífisis, localizada en la superficie del diencefalo, es la primera estructura embrionaria donde ocurre neurogénesis (Wilson y Easter, 1991a, Wilson y Easter, 1991b). En términos estructurales la pineal está compuesta por pinealocitos que pueden ser divididos en tres clases: Los fotorreceptores, las neuronas de conexión y las neuroglías (Korf, 1994).

3.1. Especificación del territorio de la epífisis.

El sistema nervioso en los vertebrados se caracteriza por su alto grado de organización. Los lineamientos básicos de su estructura se establecen durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, en la gastrulación y neurulación. En este período la placa neural está formada por una capa de células que origina el tubo neural, el cual se extiende a lo largo del eje anterior

posterior del embrión. En el tubo neural es posible distinguir las 3 divisiones principales del cerebro: cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo) y cerebro posterior (romboencefalo). Cada uno de estos territorios contiene las células precursoras que darán origen a las estructuras del sistema nervioso central adulto. Entre el límite dorsal del prosencefalo y mesencefalo se localiza la epífisis. Este órgano es muy atractivo desde el punto de vista embriológico, ya que posee propiedades de organizador. Al respecto, los estudios genéticos muestran la participación de *masterblind* (*mbi*) y *floating head* (*flh*) en el correcto posicionamiento de la estructura (Masai y cols., 1997). En resumen, *mbi* y *flh* son los factores que definen más tempranamente el territorio presuntivo de la epífisis (Fig. 3). Así lo muestran los estudios de peces mutantes donde un descenso en la actividad *mbi* determina una expresión ectópica para *flh* (Heisenberg y cols., 1996; Masai y cols., 1997; Houart y cols., 1998; Heisenberg y cols., 2001). Recientemente, se ha mostrado que *mbi* codifica para Axin1, un componente esencial de la vía Wnt (Heisenberg y cols., 2001). Estos datos han sugerido que la actividad concertada de las proteínas Flh y Axin1 son responsables de establecer los límites anterior y posterior de la epífisis.

3.2. La neurogénesis en la epífisis.

Desde la etapa de la neurula la epífisis puede ser identificada por la expresión de *zash1a* (Allende y Weinberg, 1994). Durante el desarrollo epifisiario, la mantención de la transcripción para *zash1a* esta bajo el control del

gen *flh* (Fig. 3). Dicha regulación es esencial para sostener la neurogénesis (Masai y cols., 1997). Ciertamente, al bloquear la función de *flh* se produce un marcado descenso en la producción de neuronas (Masai y cols., 1997). Evidencias más recientes sugieren que *flh* activa o mantiene las señales que determinan la expresión de los genes involucrados en la neurogénesis, *zash1a*, *ngn1*, *neuroD* (Cau y Wilson, 2003). Además, embriones que carecen de la función conjunta de *zash1a* y *ngn1* presentan una severa disminución en la producción de neuronas. Esto es consecuente con la pérdida de varios fotorreceptores y neuronas de conexión. Considerando estos cambios se ha sugerido que los genes *zash1a* y *ngn1* podrían ser efectores de la función neurogénica de *flh* en la epíffisis (Cau y Wilson, 2003)

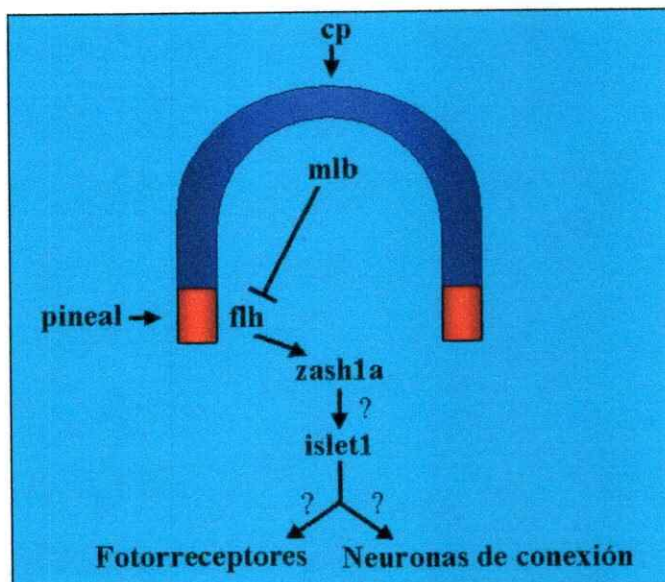


Fig. 3. Modelo de la neurogénesis en la epíffisis. (Masai y cols., 1997). Durante la gastrulación *mlb* es requerido para restringir la expresión de *flh* en el eje anterior posterior de la epíffisis. Aquí la actividad de *flh* es necesaria para mantener la producción de neuronas. En ausencia de *flh* la expresión de *zash1a* no es mantenida y esto determina un bloqueo en la producción de neuronas marcadas con *islet1*. El mecanismo que permite la diferenciación de los fotorreceptores y neuronas de conexión aún se desconoce. cp, cerebro presuntivo.



En la epífisis del pez cebra, se dispone de varios marcadores moleculares para identificar los distintos tipos de neuronas que componen el órgano. Es así como, las neuronas primarias son reconocidas por la expresión de la proteína *Islet1* que tipifica la transición mitótica desde células indiferenciadas a neuronas (Ericson y cols., 1992, Pfaff y cols., 1996). Después del primer día de desarrollo embrionario, la epífisis se caracteriza por la producción de acetilcolinesterasa (AChE), en las neuronas unipolares, bipolares y multipolares (Wilson y Easter, 1991a; Wilson y Easter, 1991b). En la misma etapa las neuronas de conexión son visibles en el eje dorsal ventral del diencefalo (Wilson y Easter, 1991a), pudiendo ser reconocidas por la expresión de *pax6* y Tubulina acetilada (Tuac) (Macdonald y cols., 1994; Masai y cols., 1997).

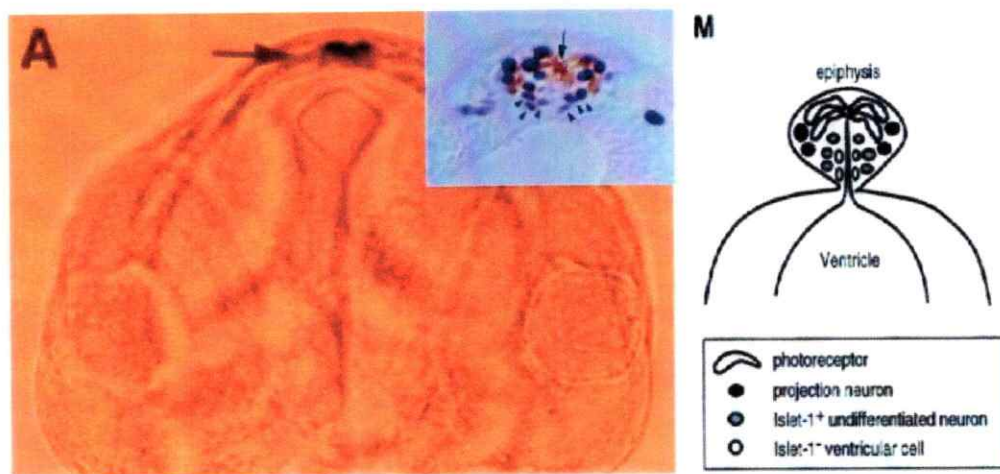


Fig. 4. Composición neuronal de la epífisis en el pez cebra. Visión frontal a las 36 horas df. Obsérvese la marca de *Zpr1* en los fotorreceptores (flecha). En el recuadro se muestra una sección transversal del epitálamo dorsal. Mediante inmunocitoquímica se detecta la Opsina en los fotorreceptores (café) e *Islet1* (negro) en las neuronas primarias de la epífisis. En la parte derecha de la Figura se muestra una representación esquemática de la neurogénesis en la epífisis. En ella *Islet1* marca los precursores que son comunes a fotorreceptores y neuronas de conexión (Masai y cols., 1997).

La producción de fotorreceptores empieza 36 horas después de la fecundación. En ellos se expresa una proteína de membrana similar a la presente en los conos de la retina, reconocida con el anticuerpo Zpr1 (Larison y Bremiller., 1990). Mediante análisis inmunocitoquímico con anticuerpos dirigidos contra las proteínas Islet1 y Opsina es posible detectar las neuronas de conexión en la base ventral de la epífisis y los fotorreceptores en la superficie dorsal (Fig. 4).

4. Desarrollo de la línea lateral posterior (llp).

La línea lateral posterior (llp) es un sistema sensorial presente en peces y anfibios que permite a los animales detectar los movimientos de agua, coordinar las respuestas de escape y la navegación solidaria en cardúmenes. Como en el caso de la pineal, este sistema sensorial ha experimentado profundas transformaciones en la evolución de los tetrápodos, quedando representado en los pelos sensoriales presentes en el oído (Metcalf, 1989). La llp esta formada por un primordio que migra a lo largo del tronco y la cola de los embriones permitiendo depositar entre 8-9 neuromastos (Fig. 5).

Basándose en estudios clásicos que muestran un aumento progresivo en la cantidad de neuromastos (Stone, 1933), se ha propuesto que el desarrollo de la llp ocurre como renuevo del primer neuromasto depositado (Metcalf., 1989). Recientemente, se ha sugerido un segundo mecanismo que involucra la formación de un primordio migratorio capaz de depositar neuromastos regularmente.

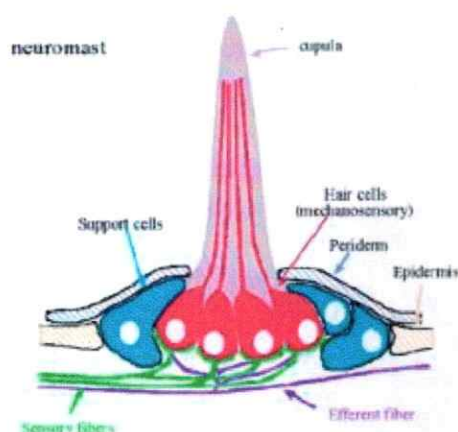


Fig. 5. Desarrollo de los neuromastos en la línea lateral posterior (llp). En las larvas marcadas con 4-di-2-Asp (DASPEI), se puede apreciar que la llp esta formada por 9 neuromastos distribuidos a lo largo del miosepto horizontal. En la parte inferior de la figura se observa un modelo esquemático, donde se muestra un neuromasto, compuesto por los cilios que forman un pelo sensorial (rojo) y las células de soporte (azul), distribuidas alrededor de los cilios.

4.1. Neurogénesis en la línea lateral posterior (llp).

Algunos de los primeros genes expresados en la placoda de la llp, son *atonal* (*zath1*) y *ngn1* (Itoh y Chitnis, 2001; Andermann y cols., 2002, Cornell y Eisen, 2002). En la neurogénesis de la llp *ngn1* precede y activa la expresión de *neuroD*. En embriones inyectados con oligonucleotido morfolino para *ngn1* el ganglio de la llp desaparece, en cambio los neuromastos se forman

normalmente. Este resultado indica que el desarrollo del ganglio y de los neuromastos se produce por vías independientes (Andermann y cols., 2002).

El análisis de la expresión de los genes proneurales y neurogénicos en los neuromastos de la llp, muestra que la transcripción del gen proneural *zath1* se produce en un patrón similar a los genes neurogénicos *delta* (*deltaA*, *deltaB*), los cuales parecen definir las células presuntivas del neuromasto (Itoh y cols., 2001). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la función de estos genes en la neurogénesis de la llp.

5. Plan de esta tesis.

Las evidencias muestran que *flh* y *zash1a* son los factores de transcripción que promueven la neurogénesis en el territorio presuntivo de la epífisis. Su expresión es secuencial, siendo la transcripción de *zash1a* dependiente de la actividad de *flh*. De hecho experimentos de pérdida de función han sugerido que, *flh* y *mb1* controlan el territorio de expresión para *zash1a* y de esta manera el territorio con potencial para formar neuronas (Masai y cols., 1997). Sin embargo, Al principio de esta tesis se desconocía el papel de *zash1a* en la neurogénesis de la epífisis. Con este objetivo propusimos analizar la función de *zash1a* y la posible interacción genética entre *zash1a* y la vía Notch/Delta durante la selección y diferenciación neuronal en la epífisis.

En el desempeño de esta tesis encontramos claras analogías entre la neurogénesis de la epífisis y la llp, sobre todo en lo que respecta a la actividad genética durante la selección neuronal. En efecto, es factible sugerir un

mecanismo común en la neurogénesis de los órganos sensoriales en el pez cebra.

HIPÓTESIS.

zash1a regula la expresión de *delta* en los precursores neuronales de la epífisis, permitiendo la diferenciación de los fotorreceptores y las neuronas de conexión.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la función de *zash1a* en la neurogénesis de la epífisis, asimismo, determinar interacción genética entre *zash1a* y la vía Notch/Delta. Además, analizar el papel de los genes proneurales y neurogénicos en la formación de la IIP. Esto para definir los mecanismos comunes que participarían en la neurogénesis de los órganos sensoriales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1- Caracterización de la función del gen *zash1a* en la neurogénesis de la epífisis.
- 2- Análisis de las interacciones genéticas entre el gen proneural *zash1a* y los genes neurogénicos (*Notch/delta*) en la neurogénesis de la epífisis.

- 3- Caracterización del desarrollo de la epífisis en los mutantes de la vía Notch, *mindbomb (mib)*.

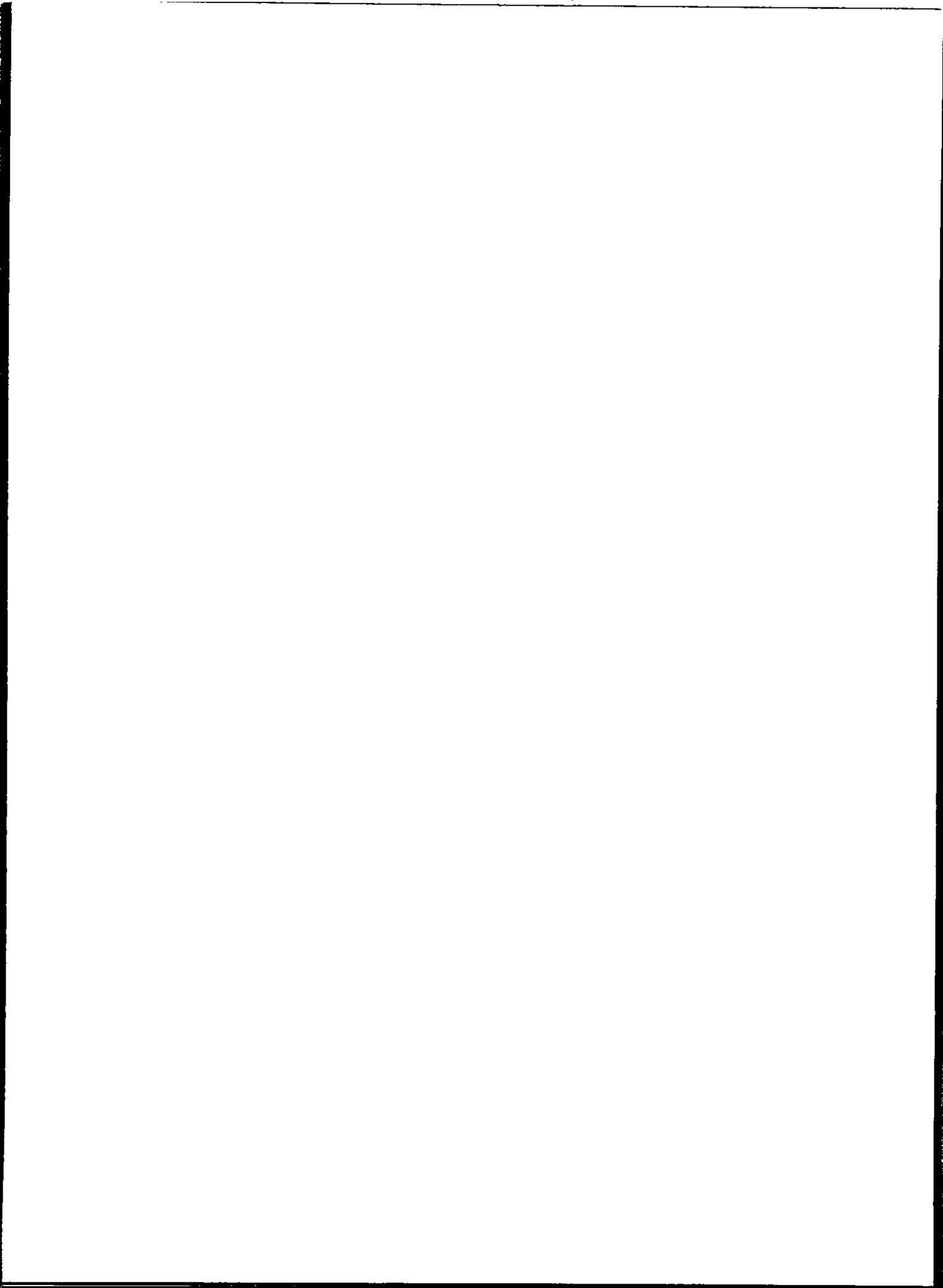
- 4- Estudio de la neurogénesis en la línea lateral posterior.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

1.1. Obtención y mantención de los embriones de pez cebra (*Danio rerio*).

Se obtuvieron embriones de pez cebra (*Danio rerio*, Telostei, Cyprinidae), por cruces naturales entre peces adultos, en agua a 28°C, con alimentación diaria y ciclos de luz-oscuridad de 10 y 14 horas respectivamente. En la realización de los cruces se procede a juntar los peces machos y hembras, en cubetas especiales provistas de una rejilla en la base para evitar el canibalismo de los huevos fecundados. Una vez colectados los huevos son colocados en una solución salina que contiene azul de metileno (E3 al 1%), que previene la contaminación de los embriones con hongos. Algunas veces es posible suplir el medio de incubación con Estreptomicina (100mg/ml) y así prevenir las infecciones por bacterias. Los embriones son lavados cada cierto tiempo con la misma solución y se mantienen a 28°C (la velocidad del desarrollo en los embriones de pez cebra es dependiente de la temperatura). Se uso la clasificación de estadios de Kimmel y cols. (1995).



1.2. Fijación de los embriones.

Para los objetivos de este trabajo se procedió a fijar embriones en diferentes etapas de desarrollo, usando para ello Paraformaldehído al 4% (PFA 4%). Los embriones vivos son fijados en PFA 4% durante 1-2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. La sobre exposición de los embriones a la solución PFA 4%, es perjudicial, pues a mayor tiempo de incubación, menor es la permeabilidad de los embriones a las sondas o anticuerpos. Una vez cumplido el tiempo de fijación, se procede a retirar el corion en forma manual mediante el empleo de Pinzas Dupont N° 5.

1.3. Empleo de oligonucleótidos morfolinos,

Los oligonucleótidos morfolino (Gene Tools, Corvallis OR, EEUU), fueron diseñados para bloquear la función de los genes *zash1a*, *zash1b*, *ngn1* y *NeuroD* al nivel de la traducción de las proteínas. Accedimos a las secuencias nucleotídicas de cada uno de los genes empleando el programa GenBank.

Para cada uno de los morfolinos se preparó un stock 10ng/μl del oligonucleotido en una solución salina denominada DANIEAU 1X y 10% de rojo de fenol. El rojo de fenol es un compuesto inerte que permite visualizar el sitio de inyección. Se hicieron diluciones 8ng/μl, 5ng/μl, 2,5ng/μl, 1,5ng/μl y 1ng/μl, con el objeto de encontrar la concentración adecuada y evitar los efectos inespecíficos. Las inyecciones con oligonucleótidos morfolinos para *zash1a*, *zash1b* con concentraciones mayores que 5ng/μl produjeron toxicidad en los

embriones tratados. Por el contrario, no observamos efectos en el fenotipo al micro-inyectar los embriones con concentraciones inferiores a 1ng/ μ l. Los efectos más específicos se observaron en concentraciones de morfolino *zash1a*, *zash1b* que fluctúan en un rango entre 1,5ng/ μ l -2,5ng/ μ l. En el caso del morfolino contra *ngn1*, los efectos más notables sobre el desarrollo embrionario se consiguieron en concentraciones de 1ng/ μ l a 1,5ng/ μ l (Cornell y Eisen, 2002). En el caso del morfolino contra *neuroD*, observamos defectos en desarrollo de los embriones en concentraciones sobre 5ng/ μ l. Al micro-inyectar morfolinós para cada uno de los genes referidos observamos diferentes efectos sobre el fenotipo. Esto sirvió como control de la especificidad de los diferentes morfolinós durante el desarrollo embrionario.

En nuestros análisis utilizamos como control embriones silvestres sin inyectar y embriones silvestres inyectados con agua u otro morfolino. La micro-inyección se efectuó entre la etapa de 1 y 4 células. Para realizar las inyecciones se empleo un microinyector provisto de un micromanipulador.

1.4. Microinyección de embriones e inducción con dexametasona.

Se realizo la sobre activación de la vía Notch mediante microinyección de un mRNA que codifica para el tallo intracelular de la proteína Notch, el cual activa en forma constitutiva la señal (NICD). La activación de la quimera de Notch-GR se lleva a cabo mediante la adición de dexametasona disuelta en etanol 95%, al medio de cultivo a una concentración final de 4 ug/ml (Kolm y

Sive, 1995), en el momento apropiado del desarrollo sobre el cual se deseó investigar la función de la vía Notch. En el citoplasma, Notch-GR y la Hsp90 forman un complejo inactivo. La unión a dexametasona se asocia con la liberación del GR del complejo y con un cambio conformacional en la estructura que permite la exposición de la señal de localización nuclear y posterior activación de la transcripción. Los mRNA NICD fueron transcritos *in vitro* antes de la sobreexpresión en los embriones. Se inyectó en el estadio de una célula por el polo animal. La concentración de mRNA a inyectar se determinó en cada experimento. Los embriones fueron incubados hasta varios estadios de desarrollo para estudiar los efectos de la sobreexpresión de la vía Notch. Las consecuencias fueron evaluadas mediante la técnica de hibridación *in situ* o por análisis de la morfología embrionaria.

1.5. Transcripción *in vitro* de mRNA.

Se transcribió el mRNA de los clones linearizados de los genes investigados en esta tesis. Dependiendo de la orientación del inserto se usó la enzima de restricción y de polimerización adecuadas (Tabla 1).

La transcripción de los mRNA para la inyección en embriones se realizó, mezclando 1 µg de plasmidio linearizado, 2,5 µl de tampón de transcripción 10X, 2,5 µl de DTT 0,1M, 2,5 µl de mezcla de nucleótidos, 5 µl de GpppGppp 2,5 uM, 1 µl de RNAsin (20U), agua DEPC (libre de RNAsas) hasta completar 25 µl y 1 µl de la RNA polimerasa respectiva. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 20 minutos, para luego agregar 1 µl de GTP 25 µM y continuar la

incubación a 37°C. Después de dos horas se agregó 1µl de DNAsa I y se continuó la incubación durante otros 30 minutos. El mRNA sintetizado se extrajo con un volumen de una mezcla fenol, cloroformo, alcohol isoamilico 25:24:1, y se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de litio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El mRNA se centrifugó durante 20 minutos a 12.000g para luego eliminar el sobrenadante, lavar con etanol al 70% y volver a centrifugar a 12000g durante 5 minutos, luego de los cuales se eliminó el líquido y secó el mRNA para finalmente resuspenderlo en 20 µl de agua DEPC.

Tabla.1. Clones utilizados para la síntesis de mRNA.

Enzimas de Restricción y RNA polimerasas usadas.

Gen	Enzimas de restricción	RNA Polimerasa	Referencia
NICD	NotI	SP6	MacLaughlin y cols., 2000
NICD-GR	NotI	SP6	MacLaughlin y cols., 2000
DeltaDpst	NotI	SP6	Dornserfier y cols., 1997
Her-4	NotI	SP6	Dornserfier y cols., 1997
Zash1a	XbaI	T3	Allende y Weinberg,

			1994
--	--	--	------

Reactivos de Biología Molecular.

- Acetato de Sodio 3M pH5.2, Winkler Ltda., Chile
- Agarosa, Winkler Ltda., Chile
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda., Chile
- Blocking reagent (BMB), Roche, Alemania
- Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1, Winkler Ltda., Chile
- Cloruro de cobalto, Winkler Ltda., Chile
- dGTP Ext. Mix, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra
- Dicromato de sodio y de potasio
- Dig-HighPrime, Roche, Alemania
- DNAsa, Boehringer, Mannheim, Alemania
- DTT 0.1M, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra
- EDTA 0.5M pH8, Winkler Ltda., Chile
- Enzimas de restricción: ScaI, SacII y sus tampones respectivos pertenecen a MBI Fermentas.
- Enzimas polimerasas T7, T3, Sp6, MBI, Fermentas
- Escherichia coli DH5 α competentes (stock de laboratorio)
- Etanol, Merck, Alemania
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile



- Isopropanol, Merck, Alemania
- LiCl 10M, Winkler Ltda., Chile
- MgCl₂ 50mM, New England Biolabs, Estados Unidos
- Naranja de acridina, Merck, Alemania
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania
- Suero de oveja, Gibco, BRL
- Tampón T4 DNA Ligasa 10x y T4 DNA Ligasa, Biolabs, New England
- Tampón transcriptasa reversa
- Tampón de reacción de PCR 10x menos Mg, 50mM Cloruro de Magnesio, Taq polimerasa y Deoxinucleósidos de trifosfato para PCR, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, GibcoBRL, Inglaterra
- Transcriptasa reversa SUPERScript II
- Trizol (Total RNA Isolation Reagent), DTT 0.1M, tampon RT 5x, cloruro de magnesio 25 mM y Superscript II, GibcoBRL, Inglaterra
- X-gal, Winkler Ltda., Chile

1.6. Análisis de los patrones de expresión de los genes estudiados, mediante hibridación *in situ*.

Se usaron sondas de RNA modificadas por la incorporación de digoxigenina, las cuales fueron generadas a partir de los cDNA para los distintos marcadores de la epífisis y de la línea lateral posterior (Tabla. 2). El cRNA para sondas se sintetizó mezclando 1 µg de plasmidio linearizado, 2,5 µl de tampón de transcripción 10X, 2,5 µl de DTT 0,1M, 5µl de una mezcla de

nucleótidos 2,5 μ M c/u, 5 μ l de DIGmix, 0.5 μ l de RNAsin (20U), agua DEPC (libre de RNAsas) hasta completar 25 μ l y se agregó finalmente 1 μ l de la RNA polimerasa correspondiente. Luego de dos horas se agregó 1 μ l de DNAsa I, para continuar con la incubación durante otros 30 minutos. Al final de la transcripción se agregó 75 μ l de agua DEPC y se hizo pasar la mezcla que contiene RNA sintetizado en una columna de Sephadex equilibrada con TE pH 7,5 (Quiagen) para eliminar los nucleótidos libres, no incorporados al cRNA sintetizado.

Los productos de las linearizaciones y transcripciones fueron analizados en geles de agarosa 1% TAE y las determinaciones de las concentraciones de ácidos nucleicos se realizaron mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm. Por lo general la incubación con la sonda se realizó a una concentración de 1 μ g/ml. Los embriones completos fueron fijados durante 1 hora en PFA 4%. A continuación se retiró el PFA 4% y se efectuaron tres lavados con metanol 100% para luego rehidratar con tres lavados sucesivos de 5 minutos en metanol 75%, 50% y 25% en PBS 1X v/v. Después de lavar al menos tres veces con PBST 1X, se agregó tampón de hibridación *in situ*, suficiente como para cubrir los embriones, este se recambió por tampón fresco una vez que los embriones caen hasta el fondo del tubo. Se realizó preincubación a 65-70°C entre 1-6 horas para luego someter a hibridación *in situ* con ribosondas por 8 horas o más. Luego de la incubación con las sondas ya no es necesario mantener las precauciones con respecto a las RNAsas y las soluciones usadas no contienen

DEPC. El lavado de la sonda se realiza a sí mismo a 65-70°C, con incubaciones sucesivas de 10 minutos cada una y dos finales de 30 minutos, con las soluciones: formamida/SSC 2x al 75% (10min), formamida/SSC 2x al 50% (10 min), formamida/SSC 2x al 25% (10 min) y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2x. Se continúa con tres lavados en PBS1X o PBST 1X y dos lavados de 5 minutos en MABT 1X. Acto seguido se agregó MAB/BMB/LS (ver reactivos hibridación *in situ*), para bloquear los sitios inespecíficos a anticuerpos y se incubo durante dos horas a temperatura ambiente. Al final de este periodo se cambio el medio por anticuerpo anti-digoxigenina 1/2000 en MAB/BMB/LS y se deja incubando a 4°C durante toda la noche. Al otro día se realizaron 5 lavados de media hora cada uno con MAB para lavar el anticuerpo. Todos los lavados e incubaciones se realizaron con o sin agitación, no cambiando el resultado final. Se revelo mediante el uso de un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (AP, ver reactivos hibridación *in situ*). Previo al revelado las muestras fueron ambientadas en solución de AP, con tres lavados de 5 minutos cada uno, luego de los cuales se agregó una solución de BCIP/NBT en solución AP para incubar en ausencia de luz a 37°C durante el tiempo necesario. Después de revelar la hibridación *in situ* los embriones se fijaron en formaldehído al 4% diluido en PBS durante una hora. Las preparaciones así teñidas se observaron bajo microscopio de luz.

Tabla.2. Clones para la síntesis de ribosondas.**Enzimas de restricción y RNA polimerasas usadas.**

Gen	Enzima de Restricción	RNA Polimerasa	Marcador	Referencia
DeltaA	SpeI	T7	Neurogénesis	Haddon y cols., 1998
DeltaB	XhoI	T7	Neurogénesis	Haddon y cols., 1998
DeltaC	XbaI	T7	Somitogénesis, Retina neural	Haddon y cols., 1998
DeltaD	HindIII	T3	Neurogénesis, somitogénesis	Haddon y cols., 1998
Exo-rodopsina	BamHI	T3	Fotorreceptores en la pineal	
Fih	HindIII	T3	Pineal	Talbot y cols., 1995
Her-4	XhoI	T3	Neurogénesis	Takke y cols., 1999.
Islet-1	EcoRI	T7	Neuronas primarias	Ericson et al. 1992, enviado por Cornell, R.
Neurogenina-1	SpeI	T7	Neurogénesis	Blader y cols.,

			temprana	1997, enviado por Cornell. R
Notch-1a	XhoI	T3	Neurogénesis, Somitogénesis, vasculogénesis	Bierkamp y Campos-Ortega, 1993
Otx-2	EcoRI	T7	Fotorreceptores en la pineal, cerebro	Li et al. 1994
Pax-6	BamHI	T7	Neuronas de conexión	Macdonald et al. 1994
Zash1a	BamHI	T7	Precusores neuronales	Allende y Weinberg, 1994
Zash1b	EcoRI	T7	Precusores neuronales	Allende y Weinberg, 1994

Reactivos de Hibridación *in situ*

- Anticuerpo 1º anti-Digoxigenina (Boehringer-Mannheim, Alemania)
- Anticuerpo 2º anti-mouse Fb (Amersham Life Science, Little Chalfont, Inglaterra)
- BCIP (Merck, Darmstadt, Alemania)
- BMBR, Boehringer Mannheim Blocking Reagent (Boehringer-Mannheim, Alemania)
- Citrato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de magnesio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- DAB (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- Deoxicolato de sodio (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- EDTA (Merck, Darmstadt, Alemania)
- EGTA (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Formamida (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Heparina (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- H₂O₂ 30% (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- K₃Fe(CN)₆ (Merck, Darmstadt, Alemania)
- K₄Fe(CN)₆*3H₂O (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- MOPS (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- NBT (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NP-40 (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)

- Paraformaldehido (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- RNA de tórula (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- TRIS (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, E.E.U.U)
- Proteínasa K, (Merck, Darmstadt, Alemania)
- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, USA

1.7. Inmunodetección para marcadores de neuronas.

Para caracterizar los tipos de neuronas presentes en la epífisis, se detectaron los anticuerpos Islet-1 y HuC en las neuronas primarias, Tuac en las neuronas de conexión y FRET43 o Zpr1 en los fotorreceptores. Al principio del análisis se fijaron los embriones en PFA 4%, a las 28 horas para detectar las proteínas Islet1, HuC, Tuac, y a los dos días de vida para detectar Zpr1. Posterior a la extracción manual del corion, se ambientaron los embriones completos, haciendo una serie de lavados que comprenden: dos lavados de 5 minutos en PBS 1X, un lavado de 5 minutos en agua pura, un lavado de 7 minutos en acetona a -20°C , un lavado de 5 minutos en agua y cuatro lavados de 5 minutos en PBS 1X. De inmediato, se agregó la solución de bloqueo MAB/BMR/LS y se dejaron los embriones durante media hora en ella. Acto seguido, se retiró el bloqueador y se agregó una dilución de 1:100 (islet1), 1:10 (Huc), 1:1000 (Tuac) y 1:200 (Zpr1) del anticuerpo monoclonal respectivo, en la que los embriones fueron dejados durante incubación nocturna de al menos 8 horas. El día posterior se lavaron los embriones con MABT 1X 5 veces por 20

minutos, luego se reemplazo esta solución por tampón de bloqueo que contenía el anticuerpo secundario en una dilución de 1:200. Los embriones así tratados se dejaron incubando otra vez toda la noche. Completado el tiempo de incubación, se procedió a lavar con PBST 1X cuatro veces durante 20 minutos y se incubaron los embriones en DAB por 15 minutos, a continuación se agregó al DAB un 1 μ l de una dilución de peróxido de hidrógeno 1/10. Se siguió la reacción bajo lupa hasta obtener la tinción adecuada. La reacción se detuvo lavando 2 veces por 5 minutos con PBST 1X y posterior fijación en solución de PFA 4%.

Reactivos para inmunocitoquímica

- Acetona, Merck, Alemania
- Anticuerpo anti-Islet1, Developmental Antibody Data Bank, EEUU
- Anticuerpo anti-Huc, Developmental Antibody Data Bank, EEUU
- Anticuerpo anti-Tuac, Developmental Antibody Data Bank, EEUU
- Anticuerpo anti-Zpr1, Developmental Antibody Data Bank, EEUU
- DAB (30mg en 100ml PBS ,0.03% w/v), Sigma, Saint Louis, EEUU
- Ig anti-ratón, Amersham, Life Science
- Solución de bloqueo (20% suero de bovino, 1% DMSO, 0.3%Tween-20 en PBS, 0.5% tritón)

1.8. Método de tinción vital en la línea lateral de los embriones.

A las 72 horas post-fertilización sumergimos las larvas en 1mM de DASPEI (2-(4-dimethyl-aminostyryl)-N-ethyl pyridinium iodide; Molecular probes, Oregon) en E3 (5mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) durante 20 minutos. Según el protocolo descrito por Balak y cols. (1990). Luego lavamos las larvas con E3 y las anestesiamos con Tricaina. Finalmente, para fotografiar los neuromastos montamos las larvas en metilcelulosa.

1.9. Análisis de los efectos producidos por la microinyección.

Se inyectaron poblaciones de entre 50 y 150 embriones con oligonucleótidos morfolinicos o RNA mensajero NICD. Los embriones tratados fueron cultivados hasta diferentes estadios del desarrollo para analizar los efectos de la perturbación en la función de genes sobre la neurogénesis de la epífisis. Estas características fueron evaluadas mediante inmunocitoquímica o hibridaciones *in situ* usando marcadores moleculares específicos. En los especímenes tratados se procedió a contar los embriones que presentan cambios en cuanto al número de células teñidas con los marcadores respecto al total de embriones inyectados. El cambio en la expresión de genes se definió como aumento, expansión o disminución notoria en la tinción de las células en comparación con los controles. A continuación, se obtiene un porcentaje de cambio efectuando la razón entre los especímenes que presentan cambio en la marca respecto al número total de embriones.

1.10. Análisis de embriones mutantes.

Se obtuvieron embriones mutantes *mindbomb* (*mib*) mediante cruces naturales de fundadores heterocigotos para la mutación *mib*. Generalmente el 25% de los embriones observados bajo lupa presentan el fenotipo mutante. Las características fenotípicas que permiten diferenciar los embriones mutantes de los silvestres son; claros defectos en la segmentación, curvatura de la cola y un desarrollo anormal de la cabeza en los embriones *mib* (Jiang y cols., 1996).

Soluciones

- Acetona, Merck, Alemania
- EDTA 0.2M Winkler Ltda, Chile
- MAB (Acido Maleico 0.1M; NaCl 0.15M; pH7.5)
- MABT (MAB+Tween-20 0.1%)
- Solución blanqueo (5.95 ml de agua destilada, 0.25 ml de SSC20x, 0.5 ml de formamida, 3.3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para 10 ml totales)
- Solución de Hibridación *in situ* (SSC 5X; Heparina 50ug/mL; RNA de Tórula 500ug/mL; Tween-20 0.1%; pH x.x)
- PBS (Winkler Ltda, Chile)
- PBST (PBS+Tween-20 0.1%)
- Solución AP (MgCl₂ 50mM; NaCl 100mM; Tris 100mM; Triton-X100 0.2%; Tween-20 0.2%; pH 9.5)

- Solución E3 1X (NaCl 5mM; KCl 0.17mM; CaCl₂ 0.13mM; MgSO₄ 0.33mM; Azul de Metileno 10-5 %)
- Solución Paraformaldehido 4% en PBS
- SSC 20X (175 grs de NaCl, 88.5 grs de citrato de sodio, pH 7, para un volumen final de 1lt)
- Solución denaturante (Southern blot, 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl)
- Solución neutralizante (Southern blot, 0.5 M tris, 1.5 M NaCl, PH 7)
- Tampón de Hibridación 50% formamida (southern Blot)(12.5 ml SSC 20x, 10 ml de blocking stock solution 10%, 0.5 ml N-laurilsarcosina 10%, 0.1 ml SDS 10%, 6.9 ml de agua destilada y 20 ml de formamida para un volumen final de 1 lt)
- Solución de lavado 1 (Southern blot) (SSC 2x, 0.1% SDS); 2 (SSC 0.1x, 0.1% SDS)
- Tampón de lisis (100mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 10mM EDTA y 0.2 % SDS)
- Solución de corrida TAE 50x (242 grs de tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 para un volumen final de 1 lt)

RESULTADOS

1. Especificación neuronal en la epífisis.

1.1. Expresión temporal de *zash1*, *ngn1* y *neuroD*.

Caracterizamos la expresión de *zash1a*, *zash1b* empleando sondas antisentido. Colectamos embriones que luego fijamos entre las etapas de 12 y 28 horas post-fertilización (hpf). A continuación, procesamos las muestras por hibridación *in situ* para detectar la expresión de *zash1a* y *zash1b*. En la Figura 6 se muestra la expresión de *zash1a* en tres zonas de la cabeza: Cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo) y cerebro posterior (romboencefalo). A las 16 horas pf se observa expresión de *zash1a* en varias células progenitoras del telencefalo ventral, telencefalo dorsal, los rombómeros y la epífisis. Por su parte, la expresión de *zash1b* se localiza en el telencefalo dorsal y en las células más ventrales de los rombómeros presuntivos (Fig. 6B).

En la epífisis la expresión de *zash1a* se inicia a las 12 horas pf (Fig. 7A). A partir de las 18 horas pf el mensajero para *zash1a* se localiza en la región posterior de la epífisis llamada núcleo de la comisura posterior (ncp) (Fig. 7C). A las 24 horas pf los niveles de mRNA *zash1a* disminuyen y después de las 28 horas pf es difícil detectar células que expresen el mRNA de *zash1a* (Fig. 7F).

Para observar con mayor claridad la expresión de los genes *zash1* en el cerebro, extirpamos quirúrgicamente el vitelo de los embriones dejando solo el hemisferio animal. Como se muestra en la Figura 8, en el cerebro los genes

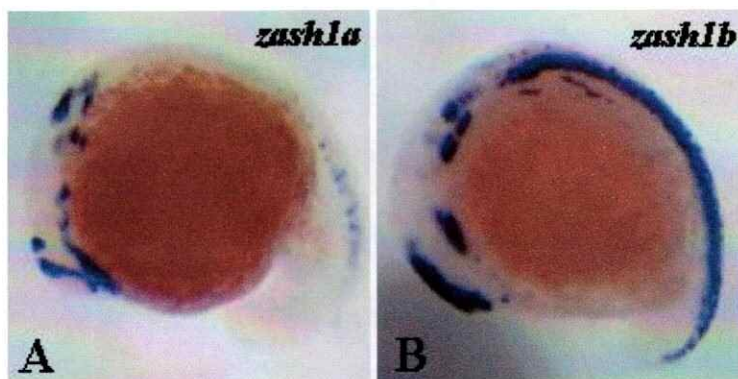


Fig. 6. Comparación de la expresión de *zash1a* y *zash1b*. (A-B) Visiones laterales con anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba. Embriones fijados a las 16 horas y procesados por hibridación *in situ*, para detectar el mRNA de *zash1a* y *zash1b*. (A-B). La expresión de *zash1a* y *zash1b* se produce en los precursores neuronales de la cabeza, el tronco y la cola de los embriones. Note que el patrón de expresión de ambos genes es complementario.

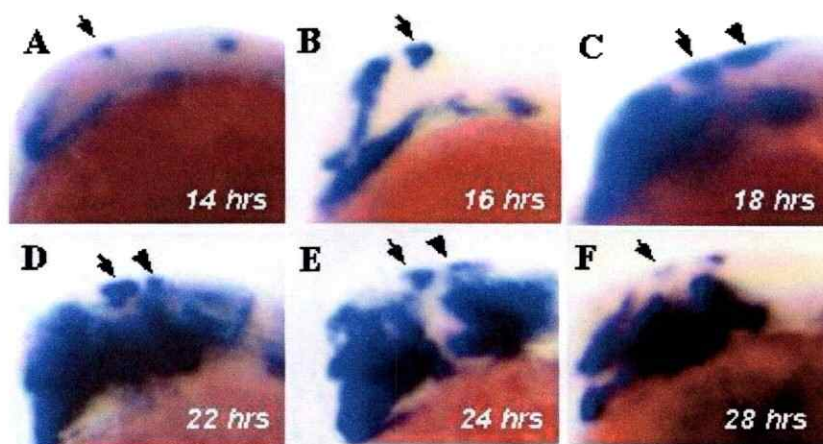


Fig. 7. En la pineal la expresión de *zash1a* presenta dos fases: Activación y represión. (A-D) Visiones laterales con anterior hacia la derecha y dorsal hacia arriba. Embriones fijados entre las 14 y las 28 horas pf y procesados por hibridación *in situ* para detectar el mRNA de *zash1a*. (A-C) Entre las 12 y las 18 horas dpf se activa la expresión de *zash1a* en las células de la epífisis (flecha) y el ncp (cabeza de flecha). (D-F). Desde las 22 horas de desarrollo se observa una disminución progresiva de los niveles de mensajero *zash1a* en la epífisis y el ncp. Después de las 28 horas la expresión de *zash1a* es casi indetectable en la epífisis (flecha). ncp, núcleo de la comisura posterior.

zash1a y *zash1b* muestran una trama de expresión complementaria (Allende y Weinberg, 1994). A las 24 horas pf, el mensajero de *zash1a* se localiza en varias zonas neurogénicas entre las cuales cabe destacar: el telencéfalo (te), el hipotálamo (hp), la retina (rp), la epífisis (e), los rombómeros (flechas) y el locus cerúleus (lc) (Fig. 8A). Por su parte *zash1b* marca el tegmento (tg), las células de la región más ventral del hp y de los rombómeros incluyendo el lc (Fig. 8B).

El siguiente paso fue analizar el patrón espacial y temporal de la expresión de *ngn1* en la epífisis. Para ello fijamos embriones a las 12 y 18 horas pf y procesamos las muestras por hibridación *in situ* detectando la expresión del mRNA para *ngn1*. En la etapa de los 8 somitos (12 horas pf), el mensajero de *ngn1* se distribuye en la parte anterior del telencéfalo, marcando las células progenitoras que darán origen a las neuronas más rostrales y dorsales del telencéfalo (Fig. 9A). En el epítálamo la expresión de *ngn1* se produce en el diencéfalo dorsal marcando los precursores neuronales de la epífisis (Fig. 9A y E). Como en el caso de *zash1a* los niveles de mRNA para *ngn1* disminuyen progresivamente en el tiempo. A las 18 horas pf, la expresión se restringe a la región posterior de la epífisis marcando células aledañas al ncp (Fig. 9B y F). El periodo en el cual se produce la expresión de los genes *zash1a* y *ngn1* sugiere que ellos participan en la neurogénesis de los precursores comunes de fotorreceptores y neuronas de conexión.

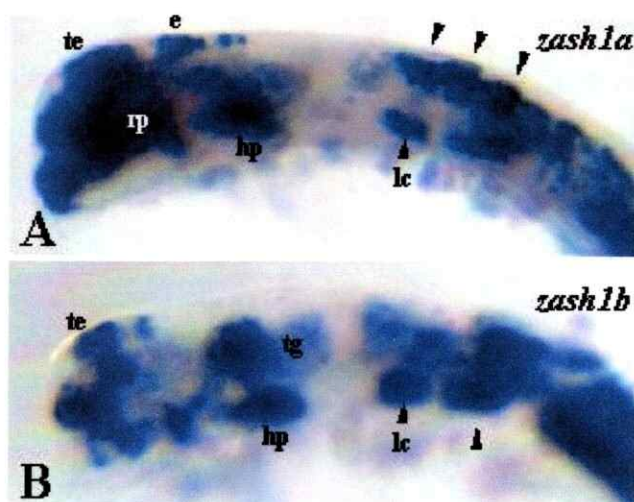


Fig. 8. Expresión de los genes *zash1a* y *zash1b* en el cerebro. (A). Embriones fijados a las 24 horas y procesados por hibridación *in situ* para detectar los mRNA de *zash1a* y *zash1b*. (A). El mensajero de *zash1a* se localiza en los precursores neuronales del telencéfalo (te), el hipotálamo (hp), la retina presuntiva (rp), la epífisis (e), en la zona dorsal de los rombómeros (flechas) y en el locus cerúleus (lc). (B). Por su parte, *zash1b* marca el tegmento (tg), las células de la región ventral del hp y los rombómeros, incluyendo la parte ventral y posterior del lc.

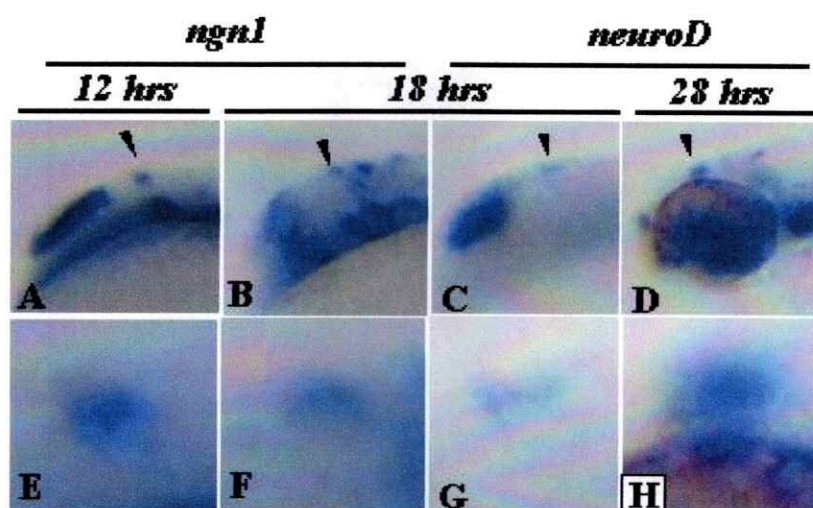


Fig. 9. Expresión dinámica de *ngn1* y *neuroD* en la epífisis. Visiones laterales con anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba. (A-H). Los embriones fijados entre las 12 y las 28 horas pf, fueron procesados por hibridación *in situ*, para detectar los mRNA de *ngn1* y *neuroD*. (B-C). Note que a las 18 horas, la expresión de *ngn1* y *neuroD* coincide en el diencéfalo dorsal, marcando la epífisis (flecha). (E,H). Magnificación de la epífisis.

Las evidencias previas muestran que, a lo largo de la placa neural el nivel de mRNA de *neuroD* es regulado por la actividad de *ngn1* (Blader y cols, 1997; Cornell y Eisen, 2002). A diferencia de *ngn1* la expresión de *neuroD* es más tardía y marca las células que han sido seleccionadas para formar neuronas (Korzh y cols., 1998; Muller y Wulliman, 2002b).

En los ensayos de hibridación *in situ* para *neuroD* usamos la sonda antisentido clonada por el grupo de Korzh y cols. (1998). Como se muestra en la Figura 9C, en la etapa de los 18 somitos (18 horas pf) *neuroD* se expresa claramente dorsal y anterior en el telencéfalo. En cambio, la expresión epifisiaria es débil localizándose en las células más superficiales (Fig. 9C y G). El descenso en la expresión epifisiaria de los genes *zash1a* y *ngn1* coincide con el periodo (18-28 horas pf), en el cual la expresión de *neuroD* aumenta (Fig. 9D). En efecto, pasadas las 28 horas pf, la epífisis expresa altos niveles de mRNA para *neuroD* (Fig. 9H). En esta etapa, la mayor expresión de *neuroD* coincide con la aparición de las primeras neuronas post-mitóticas, las cuales pueden ser identificadas por la expresión de *islet1* (Masai y cols., 1997; Mueller y Wullimann, 2002b).

1.2. Expresión de *deltaA*, *B* y *D* en la epífisis.

Primero, caracterizamos la expresión de los genes *deltaA*, *deltaB* y *deltaD*, en la pineal. En la epífisis el patrón de expresión de los tres genes *delta* es semejante y coincide con el lugar donde se produce la expresión de *ngn1* (Fig. 10). Este hecho concuerda con la regulación mutua que se ha demostrado

para *ngn1* y *delta* (Cornell y Eisen, 2002). Como se observa en la Figura 10, los mensajeros para *deltaA*, *B* y *D* se localizan en el cerebro presuntivo marcando las células precursoras de motoneuronas y sensoriales Rohon Beard (RB) (Fig. 10B y D). En la médula espinal *deltaA*, *B* y *D* se expresan en un patrón mosaico que por su trama recibe el nombre de patrón del tipo sal y pimienta (Haddon y cols., 1998a).

Realizamos determinaciones de los parámetros de expresión de los tres genes *delta* y comprobamos que entre las 12 y 18 horas pf se produce un cambio en la intensidad y extensión de la marca en las células de la epífisis (Fig. 11). Al principio de la neurogénesis, el mRNA para *deltaA*, *B* y *D* se produce en un grupo compacto de células correspondientes a los precursores neuronales. Conforme avanza el desarrollo, se observa un aumento progresivo en la expresión de *deltaA* y *B* (Fig. 11C y D; 11G y H). Esto coincide con el incremento en los niveles epifisarios del mRNA para *zash1a* (Fig. 7A y C). A las 18 horas pf observamos que, el mRNA para *deltaB* se localiza en el núcleo de la comisura posterior, el cual colinda con la región caudal de la epífisis (Fig. 11H). En la misma etapa, la expresión de *deltaD* se restringe a la región ventral de la epífisis (Fig. 11L).

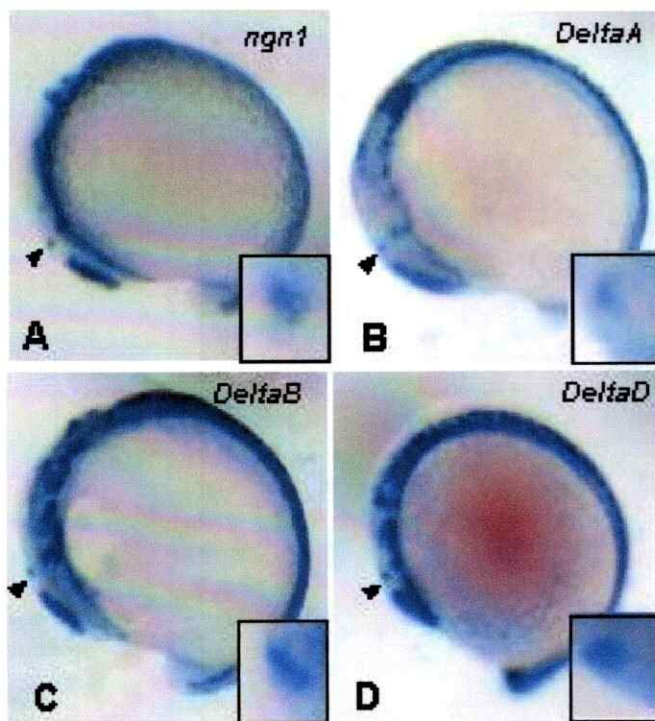


Fig. 10. Patrón de expresión de *ngn1* y *delta*, en la neurogénesis del pez cebra. Visiones laterales con anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba. Embriones fijados a las 12 horas pf, fueron tratados por hibridación *in situ*, para detectar los mRNAs de *ngn1*, *deltaA*, *deltaB* y *deltaD*. (A-D). Note que la expresión de *ngn1* coincide con la expresión de los genes *delta* en la epífisis (flecha y recuadro inferior derecho).

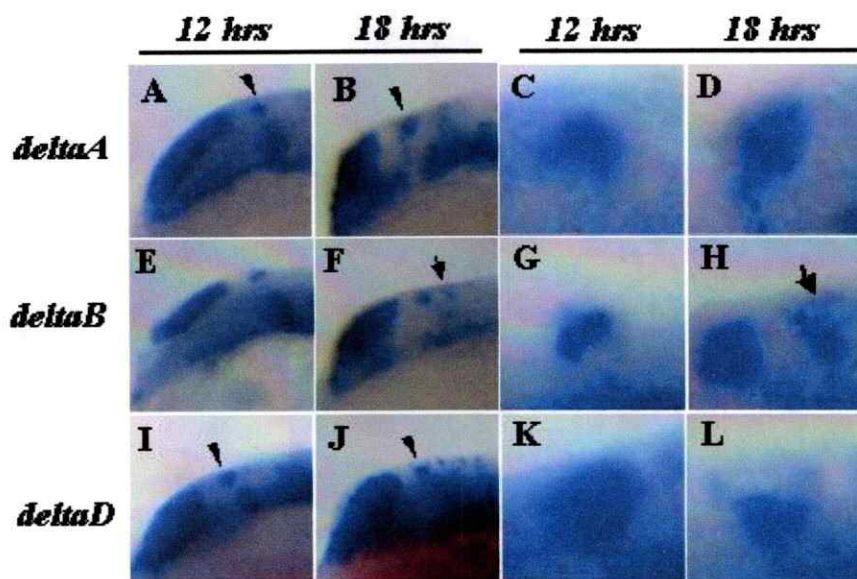


Fig. 11. Patrones de expresión de los genes *deltaA*, *B* y *D*, en la neurogénesis de la pineal. Vistas laterales con anterior a la izquierda y dorsal arriba. Los embriones fueron fijados a las 12 y 18 horas pf y procesados por hibridación *in situ* para detectar los mRNA para *deltaA*, *B* y *D*. (G-L). Magnificación de la epífisis. Obsérvese que, durante la neurogénesis de la epífisis, la expresión de los genes *delta* cambia progresivamente.

1.3. *Zash1a* regula la expresión de *delta*.

En nuestro trabajo utilizamos los morfolidos para *zash1a* y para *zash1b* dirigidos contra las secuencias de inicio de la traducción, localizadas en el extremo 5' de cada uno de los RNA mensajeros que codifican para las proteínas *zash1*. Inyectamos los morfolidos en embriones, en la etapa de una a ocho células. Por su reducido tamaño las moléculas de oligonucleótidos morfolidos se distribuyen homogéneamente en todo el embrión. Esto puede confirmarse mediante con el uso de morfolidos marcados con un indicador fluorescente (Nasevicius y Ekker., 2000).

Determinamos la interacción genética entre *zash1a* y *delta* microinyectando morfolido para *zash1a* en aproximadamente 150 embriones en la etapa de una célula. A continuación, fijamos los embriones y los procesamos por hibridación *in situ* para detectar la expresión de los mRNA de *deltaA*, *B* y *D*. En la epífisis de los embriones tratados con el morfolido para *zash1a* observamos una notoria disminución en la expresión de los tres genes *delta* (Fig. 12). Repetimos los experimentos por separado confirmando los resultados (Tabla.3). Los embriones tratados con morfolido para *zash1a* presentan un descenso en los niveles del mRNA para *delta*, el cual concuerda con las zonas del cerebro donde se expresa *zash1a*. Esto indica que el morfolido para *zash1a* actúa específicamente. Por el contrario, nunca detectamos cambios en la expresión de *delta* al inhibir la actividad del gen *neuroD* (Tabla.3). Un resultado lógico, si recordamos que en la epífisis la expresión de *delta* precede a la expresión de *neuroD*. De acuerdo con lo

anterior, Cau y Wilson (2003), también muestran que la expresión *delta* es dependiente de la función de *zash1a* (Cau y Wilson, 2003).

Cuando inyectamos al mismo tiempo los morfolinós para *zash1a* y *zash1b* observamos la disminución en los niveles de mRNA para *deltaA*, *B* y *D* en las regiones donde la expresión de *zash1a* y *zash1b* coincide con la expresión de *delta* (Allende y Wienberg, 1994; Haddon y cols., 1998). Junto con nosotros otros autores muestran que, en la epífisis la transcripción de *delta* es efectivamente dependiente del gen *zash1a* (Hans y Campos-Ortega., 2002; Cau y Wilson, 2003).

A continuación, analizamos el efecto de bloquear la función *ngn1* sobre la expresión de los genes *delta*. Para ello inyectamos 1.5ng de morfolino para *ngn1* en embriones recién fertilizados. Luego comparamos los niveles de mensajeros *delta* en los embriones tratados con respecto a los animales control. En la epífisis de los embriones tratados con morfolino para *ngn1* no observamos cambios notables en la expresión de los genes *delta A*, *B* y *D*, a diferencia de lo observado en otras regiones del cerebro donde los niveles de mRNA para *delta* son regulados por *ngn1* (Cornell y Eisen, 2002). Según los resultados anteriores podemos decir que, en la epífisis *zash1a* regula la actividad de *delta*. Un hallazgo interesante hecho por Cau y Wilson (2003) es que los genes *zash1a* y *ngn1* regulan cooperativamente la transcripción de *delta*. En efecto, la pérdida de función de ambos genes produce un defecto más marcado en la expresión de *delta*, comparada con la pérdida de la función de cada gen por separado (Cau y Wilson, 2003). Este tipo de regulación de genes proneurales sobre *delta*

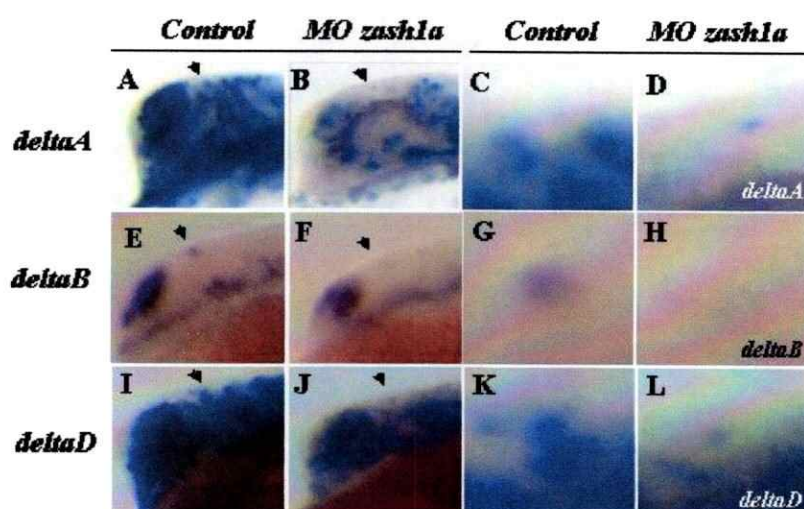


Fig. 12. *Zash1a* controla la expresión de los genes *deltaA*, *B* y *D*. (A-L). Visiones laterales con anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba. (C-D, G-H, K-L)). Amplificación de la epífisis en los mismos embriones. Inyectamos embriones de una célula con 1.5 ng de *MO zash1a*. Luego procesamos los especímenes por hibridación *in situ* para detectar la expresión de los genes *deltaA*, *B* y *D*. En la epífisis de los embriones inyectados con *MO zash1a*, se produce una disminución notable en la expresión de los genes *delta*. Por el contrario, la expresión de *delta* es normal en el telencéfalo (38 y 43 embriones revisados).

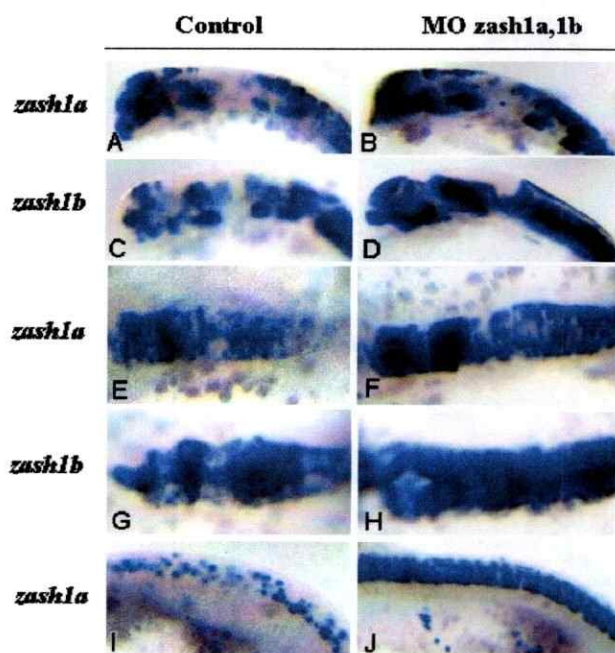


Fig. 13. *Zash1* autorregula su expresión. Visiones laterales (A-D, I-J) y dorsales (E-H) con anterior hacia la izquierda. Los embriones fueron inyectados en la etapa de una célula, con 1.5 ng (c/u) de los morfollinos para *zash1a* + *zash1b*. Fijamos los especímenes a las 24 horas y realizamos hibridación *in situ* para detectar la expresión de mRNA para *zash1a* y *zash1b*. En los embriones tratados con *MO (zash1a+zash1b)*, se observa aumento en la expresión de ambos genes *zash1*, en todos los territorios donde estos normalmente son expresados. Note que el efecto es particularmente claro en la epífisis. (56 embriones revisados)

ha sido descrito previamente en el SNP de ratón, donde *mash1* y *ngn1* regulan la expresión de los genes *delta* (Casarosa y cols., 1999; Cau y cols., 2002).

Tabla.3. disminución en la expresión de *delta*, en la epífisis de embriones inyectados con MO *zash1a*.

MO inyectado	sonda	% de disminución de la expresión	
		16 h (n)	28h (n)
MO <i>zash1a</i>	deltaA	65% (42)	73% (37)
	deltaB	72% (38)	nd
	deltaD	68% (43)	66% (48)
	islet-1	nd	76% (52)
	ngn1	0% (43)	0% (49)
MO <i>ngn1</i>	deltaA	0% (28)	nd
	deltaB	0% (32)	nd
MO <i>neuroD</i>	deltaA	0% (17)	nd
	deltaB	0% (15)	nd
	<i>zash1a</i>	0% (21)	nd

n, numero de embriones analizados (ver descripción de la cuantificación en materiales y metodos)
nd, no determinado

1.4. *Zash1* auto-regula su expresión en la neurogénesis.

Buscamos un nivel adicional de complejidad en la función de los genes *zash1a* y *zash1b*. Para ello estudiamos la existencia de interacciones reguladoras entre ambos genes. Mecanismos similares operan en el desarrollo de *Drosophila*, *Xenopus* y ratón (Modolell, 1997; Chitris y Kintner, 1996). Debido que los morfolinós interfieren la función genética a nivel de las proteínas. Esperamos que los niveles de mensajero para *zash1a* y *zash1b*, en los embriones tratados con morfolino, no sean afectados excepto cuando exista una regulación de la proteína *Zash1* sobre el mRNA del mismo gen. En este

experimento coinyectamos 120-150 embriones en la etapa de una célula con morfolino para *zash1* (*zash1a* y *zash1b*). Luego fijamos los especímenes entre las 22-24 horas pf y los procesamos por hibridación *in situ* para detectar la expresión del mRNA de *zash1a* y *zash1b*. Comparamos los embriones morfantes respecto de los embriones control, sin inyectar. En los embriones tratados con morfolino para *zash1* detectamos un marcado aumento en los niveles de mRNA para los genes *zash1a* y *zash1b* (Fig. 13). En los embriones silvestres, la expresión de *zash1a* se localiza en la región anterior del telencéfalo, en el hipotálamo y el techo óptico (Allende y Weinberg, 1994). En los embriones inyectados con morfolino para *zash1* (*zash1a* + *zash1b*) se produce aumento en los niveles de expresión de mRNA para *zash1a* en la epífisis y en la espina dorsal. Aquí, el mRNA para *zash1a* se expresan en posiciones ectópicas, es decir, marcando células que normalmente no expresan el gen *zash1a* (Fig. 13B, F y J). Además, se observan mayores niveles de mRNA para *zash1a* en los rombómeros y en el locus cerúleus (Fig. 13B). En tanto, la expresión de *zash1b* aumenta en el telencéfalo, el hipotálamo, el tegmento y los rombómeros (Fig. 13D y H). Repetimos estos experimentos por separado, obteniendo los mismos resultados (Tabla. 4).

Es importante destacar que, al realizar el mismo ensayo en embriones inyectados con morfolino para *neuroD* y/o para *ngn1*, no detectamos aumento en la expresión de los genes *zash1a*, *zash1b*, descartando que la inyección del morfolino por si misma aumente la expresión de *zash1a* y *zash1b*. A su vez,

esto sirve como control de la especificidad de los morfolininos para *zash1* (*zash1a* + *zash1b*).

Por lo tanto este experimento muestra que los genes *zash1* (*zash1a*, *1b*) tienen la capacidad de regular los niveles de mRNA de si mismos, mediante un mecanismo retroalimentación negativa.

Tabla.4. Aumento en la expresión de *zash1a* y *zash1b* en la epífisis de embriones inyectados con MO *zash1a* + MO *zash1b*

MO inyectado	% de aumento en la expresión	
	sonda	24h (n)
MO <i>zash1a</i> + <i>zash1b</i>	<i>zash1a</i>	72% (56)
	<i>zash1b</i>	67% (49)
MO <i>ngn1</i>	<i>zash1a</i>	0% (32)
	<i>zash1b</i>	0% (41)
MO <i>neuroD</i>	<i>zash1a</i>	0% (34)
n, número de embriones revisados		

Existen varios mecanismos que podrían dar cuenta de la auto-regulación de *zash1*. Por una parte, es posible que los genes *zash1* controlen su propia expresión inhibiendo la transcripción a nivel del promotor como ocurre en *Drosophila* (Modolell, 1997). Una alternativa, es que *zash1* reprima indirectamente su expresión activando la inhibición lateral mediada por *delta* (Chitnis y Kintner., 1996).

2.- Neurogénesis en la epífisis.

2.1. *Zash1a* y *ngn1* regulan la neurogénesis primaria.

Como se describió previamente, los genes proneurales *Achaete scute* y *neurogenina1* (*zash1a*, *ngn1*), se expresan temprano en los precursores neuronales de la epífisis (Fig. 6 y Fig. 9). Sin embargo, su papel en el desarrollo de la epífisis era desconocido. Estudios paralelos realizados en *Drosophila* y vertebrados han mostrado que los genes proneurales confieren competencia neuronal durante el desarrollo (Ghysen y Dambly-Chaudiere, 1988; Campos-Ortega, 1993; Casarosa y cols., 1999; Cau y Wilson, 2003). En este sentido Cau y Wilson. (2003) muestran que *ngn1* y *zash1a* operan de manera redundante en la neurogénesis de la epífisis. Sin embargo, aún no es claro si estos genes además de instruir a los progenitores neuronales, operan durante los procesos de selección y diferenciación neuronal. Así, decidimos estudiar este punto utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra neuronas primarias, fotorreceptores y neuronas de conexión (Masai y cols., 1997).

Para investigar el efecto de la pérdida de función de *ngn1* y *zash1a* en la formación de las neuronas primarias, detectamos la expresión de las proteínas Islet1 y HuC (Masai y cols., 1993; Appel y Eisen, 1998). Con este objeto, inyectamos embriones en la etapa de una célula con concentraciones de 1.5ng de morfolino para *ngn1*. Luego, fijamos los embriones tratados a las 28 horas pf y los procesamos por inmunocitoquímica para detectar el anticuerpo contra HuC o contra Islet1. En los análisis comparamos los embriones tratados respecto a controles sin inyectar.

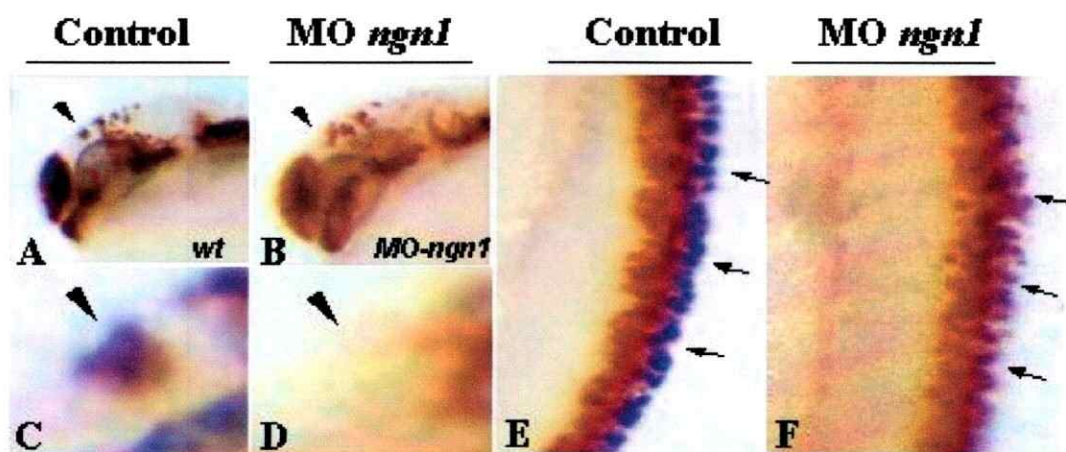


Fig. 14. *Ngn1* participa en la neurogénesis de la epífisis. (A-D). Vista lateral con anterior hacia la izquierda y dorsal, arriba. (C,D). Amplificación de la epífisis en los mismos embriones. (E,F). Vista lateral a la altura del tronco, con anterior hacia arriba y dorsal a la derecha. Los embriones fueron inyectados en la etapa de una célula, con 1.5 ng de morfolino para *ngn1*. Luego, los embriones fueron fijados a las 28 horas y procesados por inmunocitoquímica para detectar la expresión del marcador de neuronas primarias Huc. (B,D). En los embriones inyectados, las neuronas localizadas en la epífisis desaparecen (flecha). (E-F). Al inhibir la función de *ngn1* (con MO *ngn1*), se pierden la mayoría de las neuronas sensoriales o Rohon-Beard (en el tronco de los embriones). (43 embriones revisados).

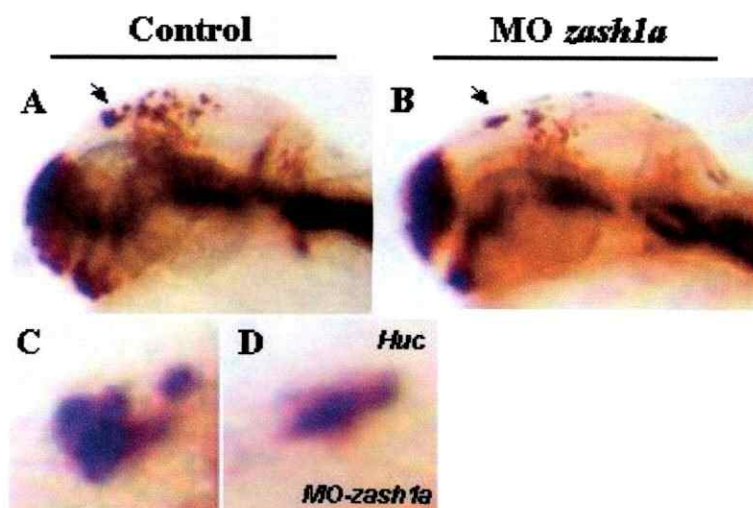


Fig. 15. *Zash1a* participa en la neurogénesis de la epífisis. (A,D). Visiones laterales con anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba. (C,D). Amplificación de la epífisis en los mismos embriones. Los embriones fueron fijados a las 28 horas y procesados por inmunocitoquímica para detectar la expresión de Huc en las neuronas primarias. (B,D). En los embriones inyectados con 1.5ng de MO para *zash1a*, se aprecia una disminución significativa en las neuronas primarias de la epífisis (flecha). (32 embriones revisados)

Como se muestra en la Figura 14, la pineal de los embriones inyectados con morfolino para *ngn1* muestran disminución significativa en la cantidad de neuronas marcadas con HuC (Fig. 14B y D). Cabe destacar que las larvas tratadas con morfolino *ngn1* son insensibles a los estímulos táctiles, debido a la desaparición de todas las neuronas sensoriales llamadas Rohon-Beard (RB) y a los ganglios sensoriales (Fig. 14E).

En un experimento análogo inyectamos embriones con una concentración 2.5ng de morfolino para *zash1a*. Luego fijamos las muestras a las 28 horas pf y las procesamos por inmunocitoquímica para detectar el anticuerpo HuC. Como se muestra en la Figura 15, la interferencia de *zash1a* produce una disminución considerable de las células positivas para Huc en la epífisis (Fig. 15B y D). Es importante destacar que, la inyección del morfolino *zash1a* nunca produce una pérdida total de las neuronas primarias.

En los embriones tratados con el morfolino *zash1a* la producción de neuronas primarias es normal en el ganglio sensorial denominado trigémino (Fig. 16C). En contraste, al eliminar la función de la *ngn1* se produce una pérdida casi completa de las neuronas sensoriales tanto en el trigémino como en las Rohon-Beard (Fig. 16B).

Al inyectar el morfolino para *ngn1* o para *zash1a* por separado, encontramos que la epífisis de los embriones morfantes revela en cada caso una reducción parcial en la expresión de *Islet1* (Fig. 16B y C). Por lo tanto, ninguno de los dos genes por separado es esencial en la neurogénesis primaria de la epífisis. En un estudio paralelo Cau y Wilson. (2003) muestran que la

microinyección combinada de los morfolinós para *ngn1* y *zash1a* produce reducción casi completa en los niveles de mRNA para *islet1*, indicando que *zash1a* y *ngn1* cooperan durante el desarrollo de la epífisis (Cau y Wilson, 2003).

Mediante análisis inmunológico mostramos que *zash1a* y *ngn1* operan en la neurogénesis de la epífisis regulando la formación de neuronas primarias, las cuales constituyen ambos tipos celulares presentes en la pineal: fotorreceptores y neuronas de conexión. Además, observamos que la interferencia en la función de *zash1a* y/o *ngn1* bloquea la neurogénesis de la epífisis previo a la diferenciación (Tabla. 5).

Tabla.5. los genes *zash1a* y *ngn1* participan en la formación de neuronas primarias en la epífisis.

MO inyectado	anticuerpo	<u>%de disminución en la expresión</u> 28h (n)
MO <i>ngn1</i>	Huc	78% (43)
	Islet1	68% (43)
MO <i>zash1a</i>	Huc	72% (32)
	Islet1	74% (41)
MO <i>neuroD</i>	Huc	0% (34)
n, número de embriones revisados		

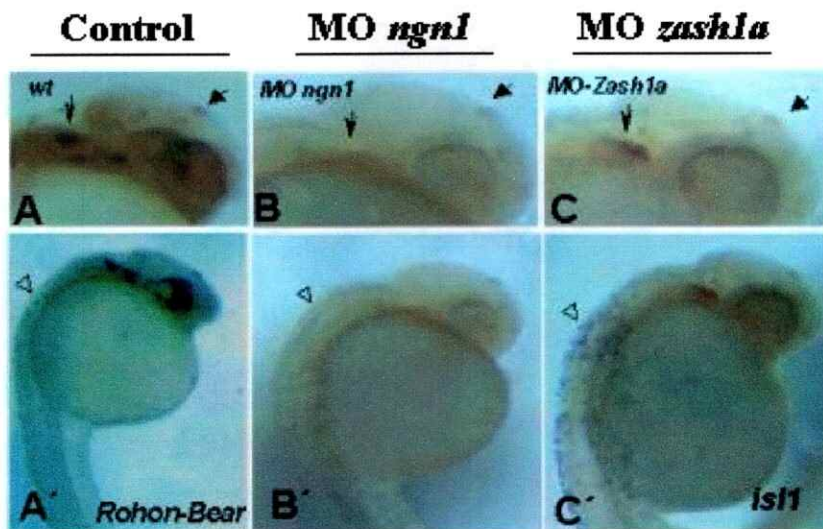


Fig.16. *Zash1a* y *ngn1* regulan la expresión de *Islet1* en la pineal. Embriones con anterior a la derecha y dorsal hacia arriba. Los embriones fueron fijados a las 28 horas y procesados por inmunocitoquímica para detectar la expresión de *Islet1*. En los controles la expresión de *Islet1* se produce en la epífisis (flecha gruesa), en el trigémino (flecha fina) y en las Rohon-Beard (flecha vacía). (B, B'). Al inyectar el MO *ngn1*, desaparecen las neuronas del ganglio trigémino (flecha) y las Rohon-Beard (flecha vacía). Además, se observa disminución de *Islet1* en las neuronas de la epífisis (cabeza de flecha). (C,C'). En los embriones tratados con MO *zash1a* disminuye la expresión de *Islet1* en la pineal (cabeza de flecha), en tanto en desarrollo del trigémino (flecha) y de las Rohon-Beard (flecha vacía) es normal. (43 -MO *ngn1*- y 41 -MO *zash1a*- embriones revisados).

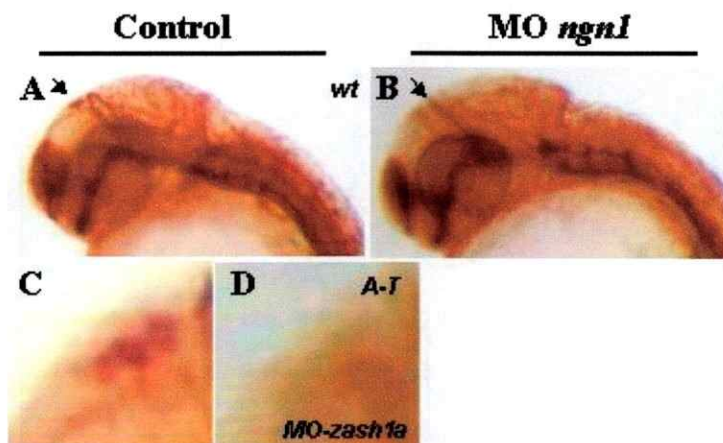
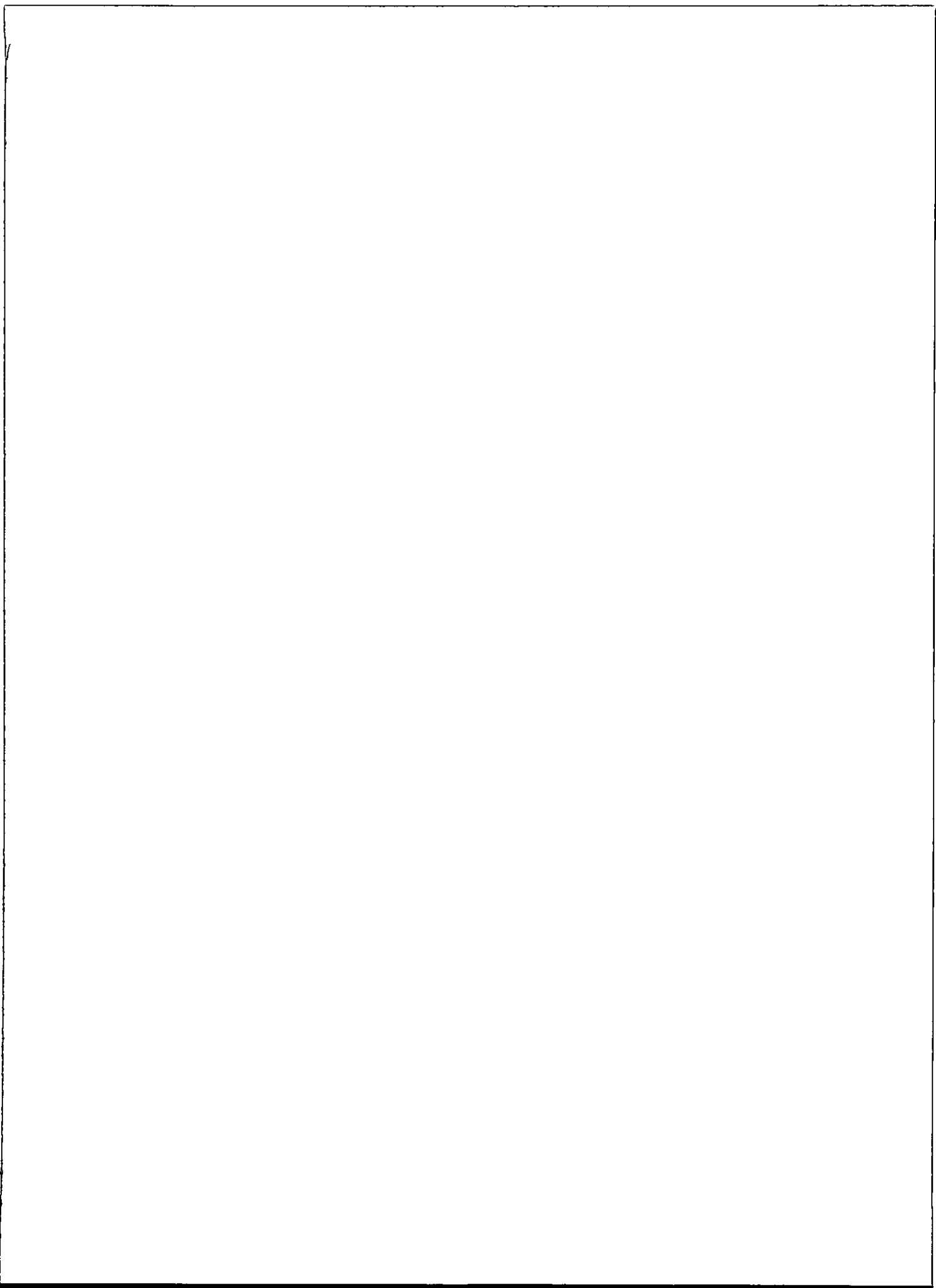
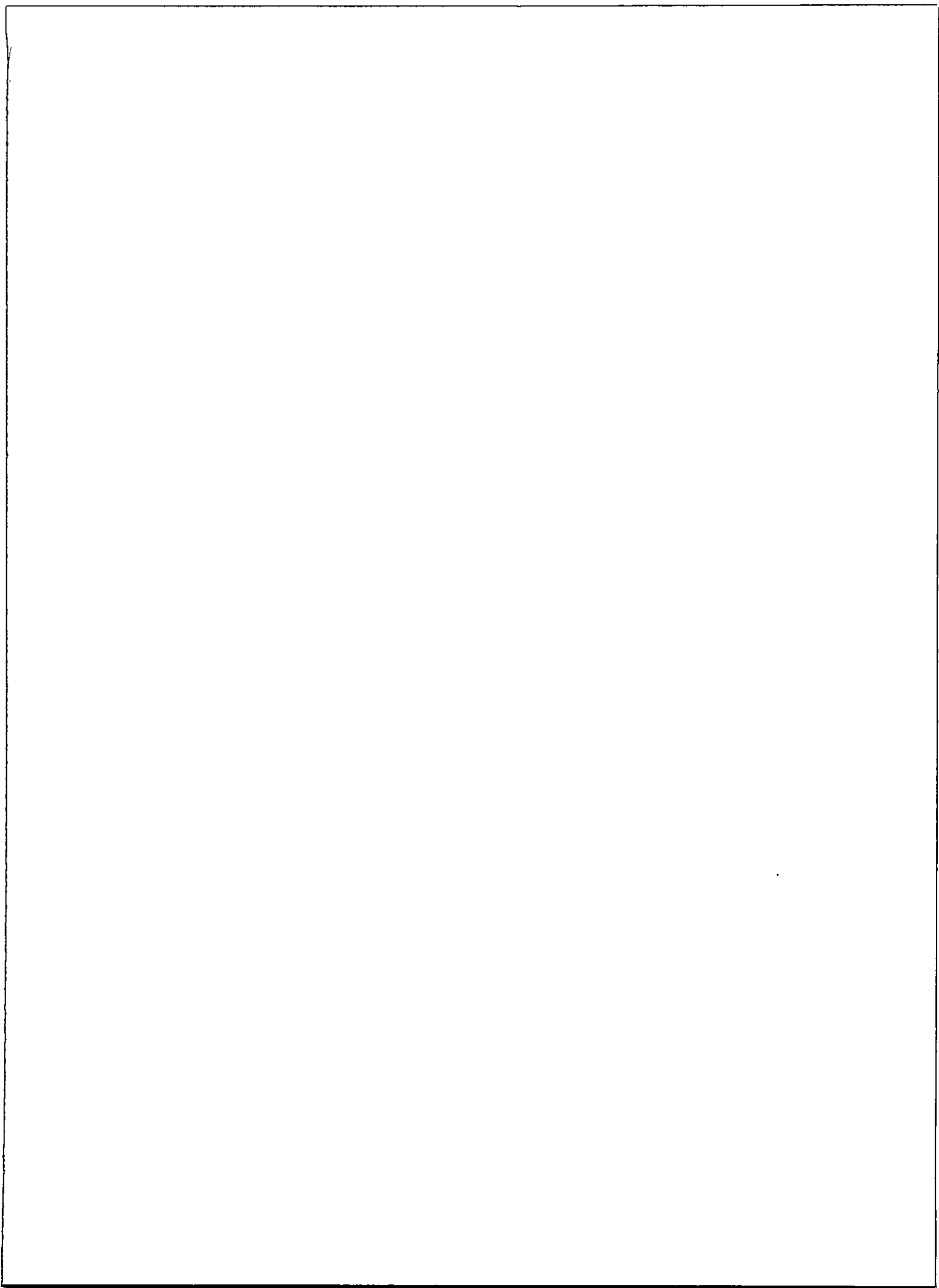
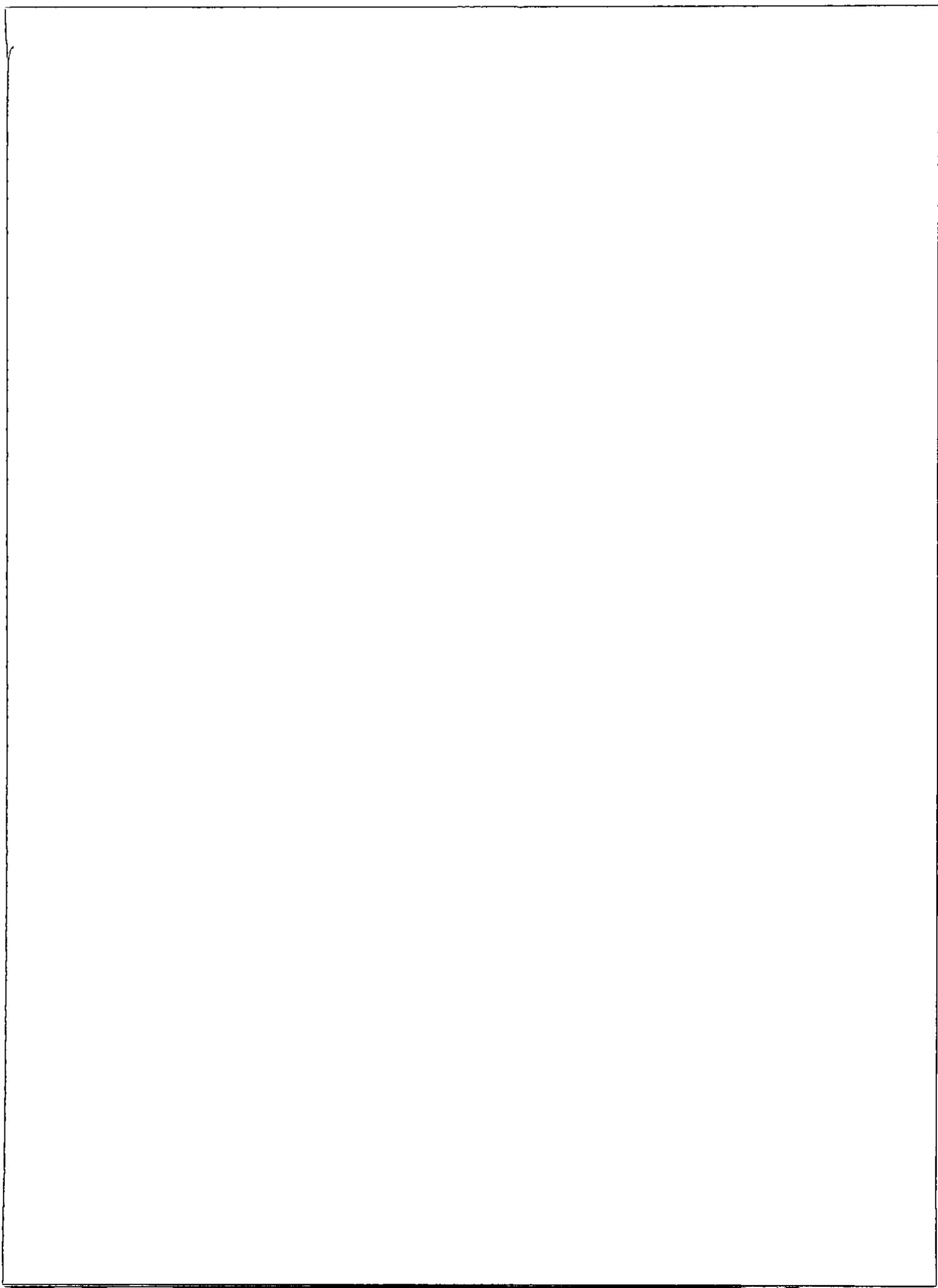


Fig. 17. *Zash1a* regula la formación de las neuronas de conexión. (A,D). Visiones laterales con anterior a la izquierda y dorsal arriba. (C,D). Amplificación de la epífisis en los mismos embriones. Los embriones fueron tratados por inmunocitoquímica para Tuac a las 28 horas. (B,D). En la epífisis de los embriones inyectados con MO *zash1a*, desaparecen las neuronas de conexión (flecha). (32 embriones revisados)







2.2. *Zash1a* regula la formación de las neuronas pineales.

Después del primer día de vida las neuronas de conexión pueden ser reconocidas con el uso de un anticuerpo dirigido contra la Tubulina acetilada (Tuac) (Wilson y Easter, 1991a; Wilson y Easter, 1991b). Por su parte, los fotorreceptores pueden ser identificados con el anticuerpo Zpr1 o Fret43 (Larison y Bremiller, 1990; Masai y cols., 1997). Para determinar el papel que cumple *zash1a* en la producción de cada tipo de neurona inyectamos embriones en la etapa de una célula con 2.5ng de MO *zash1a*. Luego, fijamos los embriones a las 28 horas pf y los procesamos por inmunocitoquímica para detectar la expresión de los antígenos Tuac y Zpr1. Cuantificamos los efectos del tratamiento comparando la expresión de Tuac en embriones inyectados con respecto a controles sin inyectar (Tabla. 6). En los embriones silvestres Tuac es expresada en los axones de las neuronas de conexión (Fig. 17A y C). Como se observa en la Figura 17B, el tratamiento de los embriones con morfolino para *zash1a* determina una drástica disminución en la generación de neuronas de conexión. (Fig.17B, D).

El siguiente paso consistió en caracterizar el efecto del morfolino para *zash1a* sobre el desarrollo de los fotorreceptores. La proteína Zpr1 se expresa en la membrana de los fotorreceptores a partir de las 36 horas de desarrollo (Larison y Bremiller., 1990; Masai y cols., 1997). En los embriones tratados con morfolino *zash1a* observamos una notable disminución en el número de fotorreceptores (Fig. 18). Para determinar el rol de *zash1a* en la neurogénesis de los fotorreceptores, contamos la cantidad de células marcadas con Zpr1 en

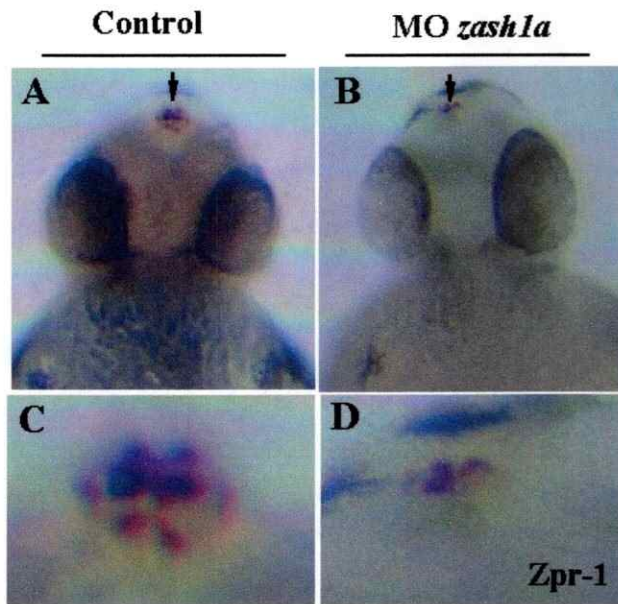


Fig. 18. *Zash1a* regula la formación de fotorreceptores en la epíffis. (A-D). Visiones frontales con dorsal hacia arriba. (C-D). Amplificación de la epíffis. Embriones fijados a las 48 horas y tratados por inmunocitoquímica para revelar la presencia de Zpr-1. (A,C). En los embriones control, los fotorreceptores aparecen organizados en el techo del diencefalo, en la glándula pineal. (B,D) En los embriones inyectados con 1,5 ng MO *zash1a*, se observa una disminución significativa de los fotorreceptores.

los embriones tratados con respecto a los embriones sin inyectar. En el 78% de los embriones morfantes se observa disminución en la cantidad de fotorreceptores (Tabla. 6).

Cuando inyectamos el morfolino *zash1a*, detectamos una disminución considerable en la formación de fotorreceptores y neuronas de conexión. Así mismo, *zash1a* regula la producción de neuronas primarias, que corresponden a las primeras neuronas formadas en la epíffis. Es decir, *zash1a* controla el número de neuronas pineales formadas durante la neurogénesis.

Tabla. 6. *zash1a* regula la formación de fotorreceptores (Zpr1+) y neuronas de conexión (Tuac+) en la epífisis

MO inyectado	anticuerpo	%de disminución de la expresión	
		28h (n)	48h (n)
MO <i>zash1a</i>	Zpr-1	nd	74% (63)
	Tuac	72% (67)	nd

n, número de embriones revisados., nd, no determinado.
 Zpr1 marcador de los fotorreceptores.
 Tuac (tubulina acetilada), marcador de las neuronas de conexión.

3. Notch-Delta participa en la selección neuronal de la epífisis.

3.1. Notch regula la expresión de *zash1a*, *ngn1* y *neuroD*.

En *Drosophila* el mecanismo de inhibición lateral participa en la selección neuronal regulando la transcripción de los genes proneurales pertenecientes al complejo *Ac-sc* (revisiones, Campos-Ortega, 1993; Modolell, 1997; Ghysen y Dambly-Chaudiere, 1988). En mosca las mutaciones que afectan la actividad de la vía Notch determinan la aparición de neuronas ectópicas (Modolell, 1997).

Durante la neurogénesis del pez cebra los genes neurogénicos parecen mediar la inhibición lateral (Appel y Eisen, 1998; Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Haddon y cols., 1998a; Itoh y cols., 2003; Takke y cols., 1999; Cornell y Eisen, 2002). En esta tesis enfocamos nuestro análisis en el desarrollo de la epífisis y en la función de los genes proneurales y neurogénicos. Para ello utilizamos una línea de peces mutantes que carecen del gen *mib*. La proteína Mib corresponde a una ubiquitina ligasa necesaria en la transducción de la vía Notch (Itoh y cols., 2003). En los mutantes de esta vía se produce un aumento general de la neurogénesis del SNC y SNP (Jiang y cols., 1996).

En los todos los experimentos que se describen más adelante usamos entre 60 y 100 embriones descendientes de fundadores heterocigotos para la mutación *mib*. El 25% de los especímenes observados bajo lupa muestran el fenotipo *mib*. Los rasgos fundamentales que permiten distinguir los embriones mutantes respecto de los silvestres son: defectos en la segmentación y diferenciación del notocordo, los cuales producen una curvatura anormal en la cola de los embriones mutantes (Jiang y cols., 1996). Otra característica notable en *mib* es una protuberancia anormal en el límite ubicado entre el cerebro medio y posterior (Jiang y cols., 1996).

Para analizar la interacción entre la vía Notch/Delta y los genes proneurales fijamos embriones *mib* y silvestres a las 14, 18 y 24 horas pf. Luego, procesamos las muestras por hibridación *in situ* para detectar la expresión del mRNA para *zash1a*, *ngn1* y *neuroD*. En la epífisis de los embriones *mib* la interferencia de la vía Notch produce un marcado aumento en el nivel de mRNA para *zash1a* (Fig. 19B, F y J). Estos resultados indican que en condiciones normales Notch regula la expresión de *zash1a*. Ciertamente, en las visiones dorsales de *mib* se observa un incremento notorio en la expresión de *zash1a* en la epífisis, entre otras zonas (Fig. 19J).

Previamente se ha reportado una interacción de regulación entre la vía Notch y *ngn1* (Cornell y Eisen, 2002). De acuerdo con lo anterior, observamos un drástico aumento en la expresión de *ngn1* en la epífisis de los embriones *mib*, indicando que la pérdida parcial de la función Notch produce una expansión en el territorio con competencia neuronal (Fig. 19D, H y L).

Nuestros resultados sugieren que la actividad de la vía Notch controla los niveles de expresión para los genes proneurales *zash1a* y *ngn1*, regulando de este modo la competencia neuronal. De hecho la interferencia en la vía Notch, en los embriones *mib*, permite un aumento y expansión en la cantidad de precursores neuronales que expresan *zash1a* y *ngn1*.

En la epífisis, el inicio en la transcripción de *neuroD* se produce a las 18 horas pf (Fig. 20A y C), coincidiendo con la formación de las primeras neuronas post-mitóticas (Masai y cols., 1997). En el caso de los embriones *mib* la expresión de *neuroD* aumenta y se produce prematuramente (Fig. 20B, D y F). En consecuencia, los genes neurogénicos *notch/delta* actuarían reprimiendo la prematura aparición de *neuroD*. Cuando la vía Notch falla se produce una mayor cantidad de neuronas prematuramente diferenciadas.

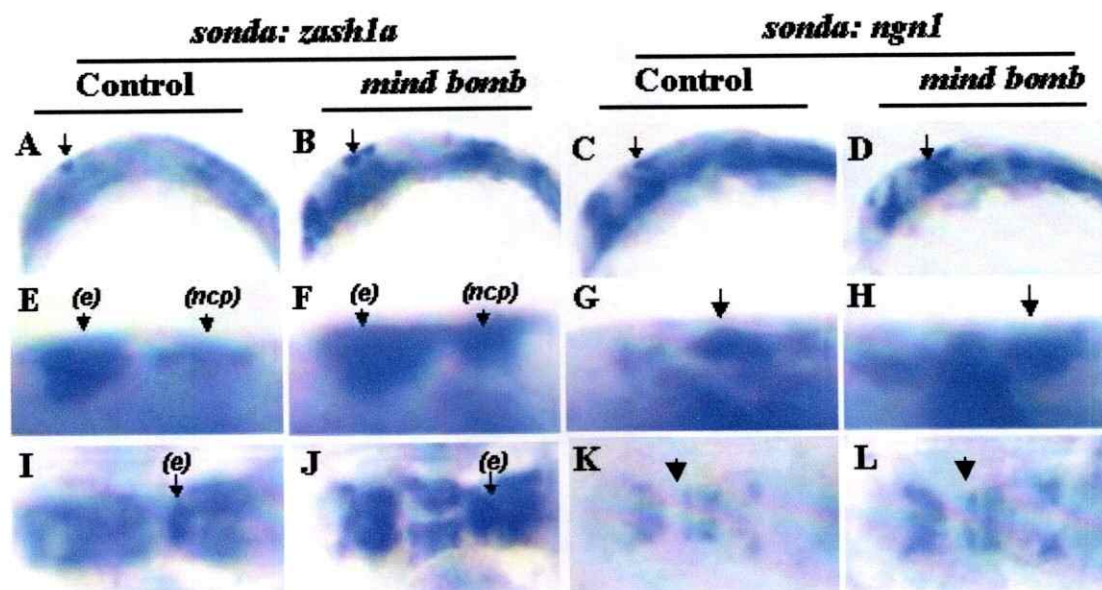


Fig. 19. Expresión de *zash1a* y *ngn1* en la neurogénesis de *mind bomb* (*mib*). (A-H). Visión lateral con dorsal hacia arriba. (I-L) Visión dorsal con anterior hacia la izquierda. Los embriones fueron colectados a las 18 horas y procesados mediante hibridación *in situ* para detectar la expresión de *zash1a* y *ngn1*. En los embriones mutantes la expresión de *zash1a* y *ngn1* aumenta en la epífisis (flecha) y en el núcleo de la comisura posterior (*ncp*).

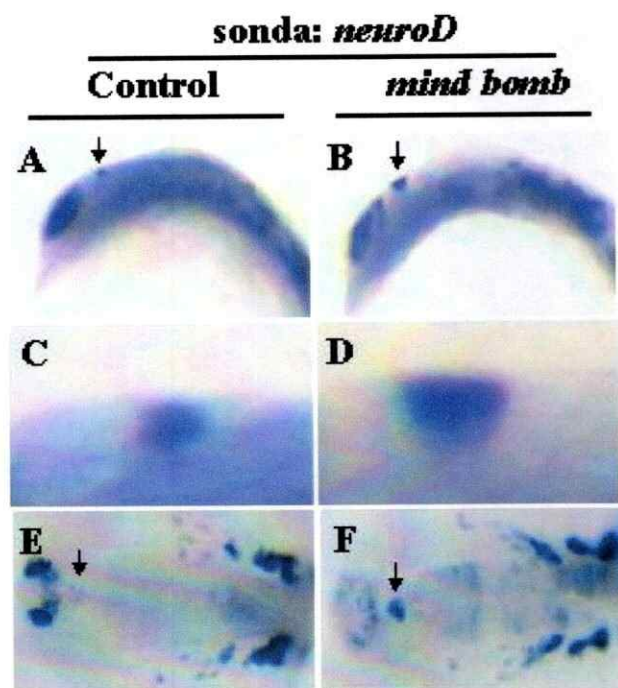


Fig. 20. la expresión de *neuroD* en el mutante *mib*. (A-D). Visión lateral, (E-F). Visión dorsal, con anterior a la izquierda. Embriones de 18 horas tratados por hibridación *in situ* para revelar la expresión de *neuroD*. (A,C,E). Expresión de *neuroD* en la epífisis de los embriones silvestres. (B,D,F). En los mutantes se produce aumento anticipado en la expresión de *neuroD*, lo que sugiere diferenciación neuronal prematura.

3.2. Notch controla la expresión de *deltaA*, *B* y *D*.

La siguiente serie de hibridaciones *in situ* se realizaron para investigar de que forma la actividad de Notch regula la expresión del ligando de la misma vía (Notch-Delta) en las células de la epíffisis. Anteriormente se ha demostrado que los genes *delta* se expresan más profusamente en las células precursoras que luego se diferenciarán en neuronas (Haddon y cols., 1998; Appel y Eisen, 1998). Los evidencias señalan que la vía Notch regula la expresión de *delta* en los precursores de neuronas (Haddon y cols., 1998). Basándonos en esto, podemos sugerir que la inhibición lateral activa una señal represiva entre las células de la pineal, que previene que dos precursores neuronales vecinos expresen niveles equivalentes de *delta* e impide que se desarrollen como neuronas primarias al mismo tiempo. Este mecanismo involucraría un proceso competitivo entre las células progenitoras que permitiría la selección neuronal. Si esto es cierto, deberíamos esperar un mecanismo de retroalimentación negativa de la expresión de *delta*, por la vía Notch.

Para probar este modelo fijamos embriones *mib* entre las 12-18 horas pf y los tratamos según el protocolo de hibridación *in situ*, para detectar la expresión de los mRNA de los genes *delta A*, *B* y *D*. Estas tinciones evidencian un marcado aumento en la expresión de los tres genes *delta* en la epíffisis de embriones *mib* en relación con los controles. Estos resultados se muestran en la Figura 21 y sugieren que la falla en la vía Notch produce un incremento notable en la expresión de los genes *delta*.

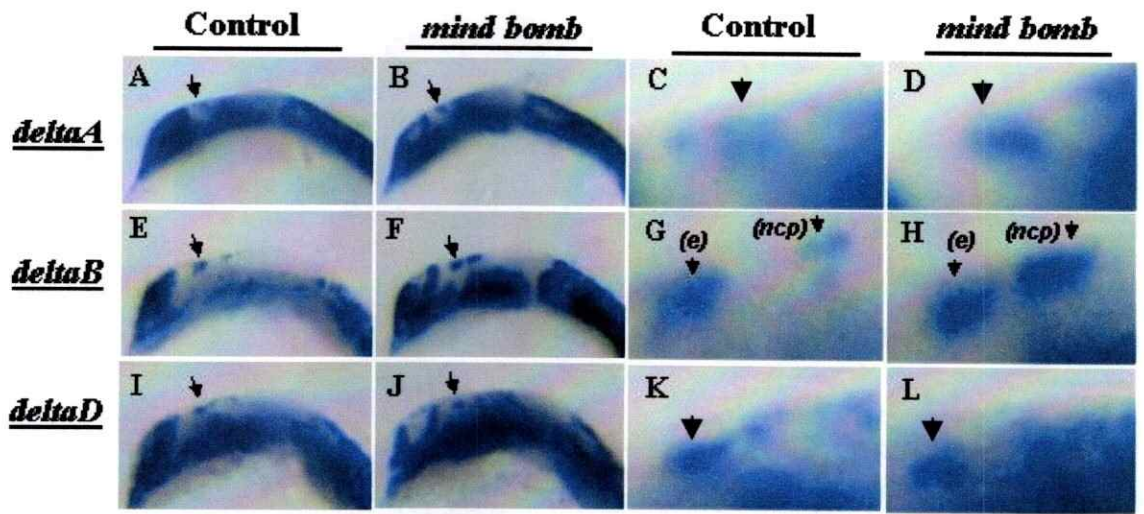


Fig. 21. Expresión de *deltaA*, *B* y *D*, en la neurogénesis de *mib*. (A-L). Visión lateral con anterior a la izquierda y dorsal hacia arriba. (C-D, G-H, K-L). Amplificación de la epífisis en los mismos especímenes. Los embriones fueron fijados a las 18 horas y procesados mediante hibridación in situ para detectar la expresión de *deltaA*, *B* y *D*. En los embriones mutantes *mib*, la expresión de los genes *delta* experimenta un aumento general y en particular en la epífisis (flecha). Sin embargo, *deltaB* presenta un incremento más drástico, incluyendo el ncp.

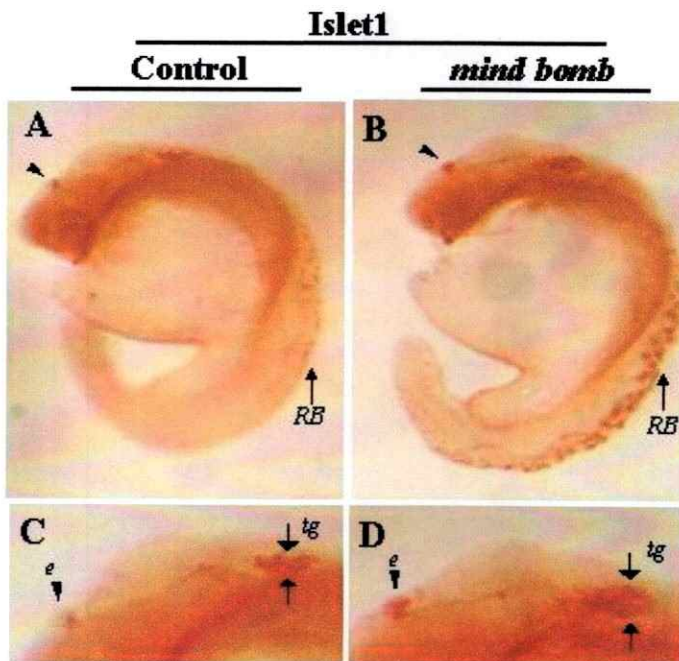


Fig. 22. Hiperplasia neuronal en el mutante *mib*. Visiones laterales de embriones a las 20 horas, que fueron procesados por inmunocitoquímica para revelar la expresión de la proteína Islet1 en las neuronas primarias. (A,C). En los controles la expresión se muestra en la epífisis (flecha), el ganglio trigémino (doble flecha) y las neuronas sensoriales (RB) (espina dorsal). (B,D). Note que en *mib* aumenta la producción de neuronas en la epífisis (flecha), el trigémino (doble flecha) y las Rohon Beard (RB).

3.3. Notch controla la producción de neuronas primarias en la epífisis.

Estudiamos el efecto de Notch sobre la producción de neuronas primarias en la epífisis. Para ello fijamos embriones mutantes *mib* y silvestres a las 24 horas pf y procesamos los especímenes por inmunocitoquímica para detectar el marcador de neuronas primarias Islet1. En los análisis estadísticos comparamos los embriones mutantes *mib* (25%), con los animales normales (75%), presentes en el misma cohorte de embriones.

La mutación en *mib* origina sobreproducción general de neuronas primarias en la epífisis (e), ganglio trigémino (tg) y Rohon Beard (RB) (Fig. 22), indicando que la vía Notch regula la neurogénesis primaria. En efecto, la menor actividad de la vía Notch en los embriones *mib* determina un aumento marcado en el número de neuronas.

3.4. Notch controla la neurogénesis de los fotorreceptores y las neuronas de conexión.

Al inicio de este trabajo nos preguntamos por las interacciones genéticas que participan en la especificación y diferenciación de las neuronas de conexión y los fotorreceptores. En la determinación de estos tipos celulares podrían participar varios mecanismos (ver discusión), uno de ellos podría ser la especificación lateral mediada por Notch (Appel y Eisen, 1998; Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Cornell y Eisen, 2002; Haddon y cols., 1998; Itoh y cols., 2003; Takke y cols., 1999). Analizamos esta predicción usando dos

aproximaciones complementarias: induciendo en forma exógena y constitutiva la vía Notch e investigando la diferenciación neuronal en la pineal del mutante *mib*.

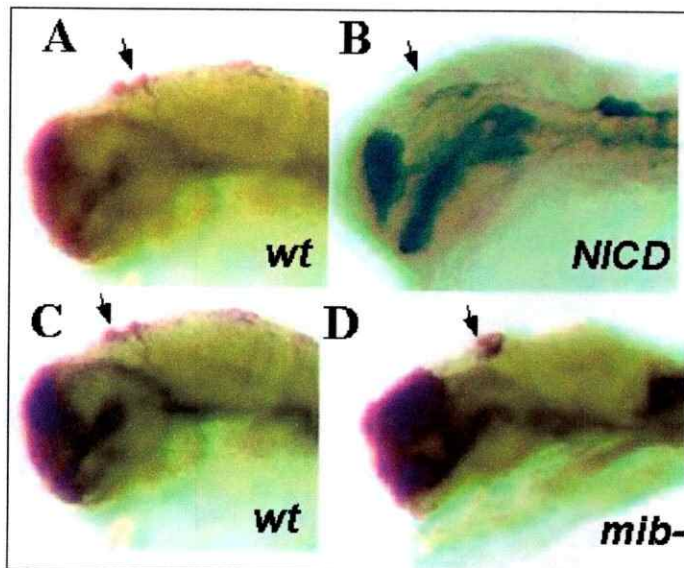


Fig. 23. Notch controla la producción de las neuronas de conexión en la epíffis. (A-D). Visiones laterales a las 28 horas pf. Los embriones fueron tratados por inmunocitoquímica para detectar Tuac en las neuronas de conexión. (B). En los embriones inyectados con mRNA de NICD (Notch constitutivo activo), disminuye la producción de neuronas de conexión (flecha). (D). Por el contrario, en la epíffis de los mutantes *mib*, se producen neuronas supernumerarias (flecha).

La activación artificial de la vía Notch se consigue mediante el uso de un constitutivo activo de Notch que contiene el dominio intracelular de la proteína (NICD). Procedimos a inyectar embriones en la etapa de una célula con 100ng de mRNA NICD. A continuación, fijamos las muestras entre 22 y 28 horas pf y las procesamos por inmunocitoquímica para detectar la proteína Tubulina acetilada (Tuac) en las neuronas de conexión. De un promedio de 80 embriones inyectados con NICD, en el 68% detectamos reducción en la expresión de Tuac (Fig. 23B y Tabla.7). Por el contrario, ninguno de los embriones tratados con NICD muestra aumento en la expresión de Tuac. Adicionalmente, fijamos embriones *mib* y por inmunocitoquímica detectamos Tuac. Obsérvese que en la

epíffis de los embriones *mib* se produce un marcado aumento en la formación de las neuronas de conexión (Fig. 23D).

Para determinar la forma como la vía Notch participa en la producción de fotorreceptores, fijamos embriones *mib* a las 48 horas pf y procesamos las muestras para revelar la marca del anticuerpo Zpr1. En los mutantes *mib* los fotorreceptores se forman en mayor número. Básicamente las células se producen en mayor cantidad y muchas veces no conservan las posiciones nativas (Fig. 24).

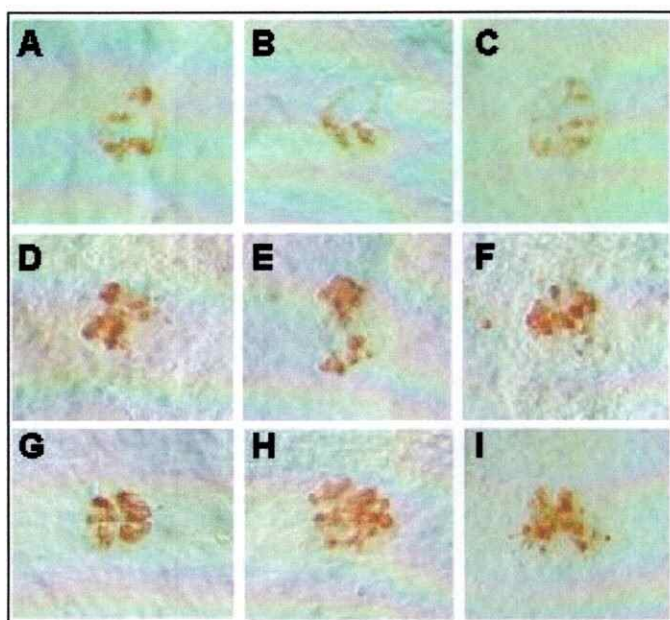


Fig. 24. Notch controla la producción de fotorreceptores en la epíffis. (A-I). Visiones dorsales de la epíffis. (A-C). Embriones silvestres. (D-I). Mutantes *mib*. Las muestras fueron tratadas por inmunocitoquímica para detectar la proteína Zpr1. (A-C). En los embriones normales la expresión de Zpr1 se produce en una región restringida de la epíffis. (D-I). En cambios en los mutantes *mib*, se producen fotorreceptores supernumerarios y atípicos.

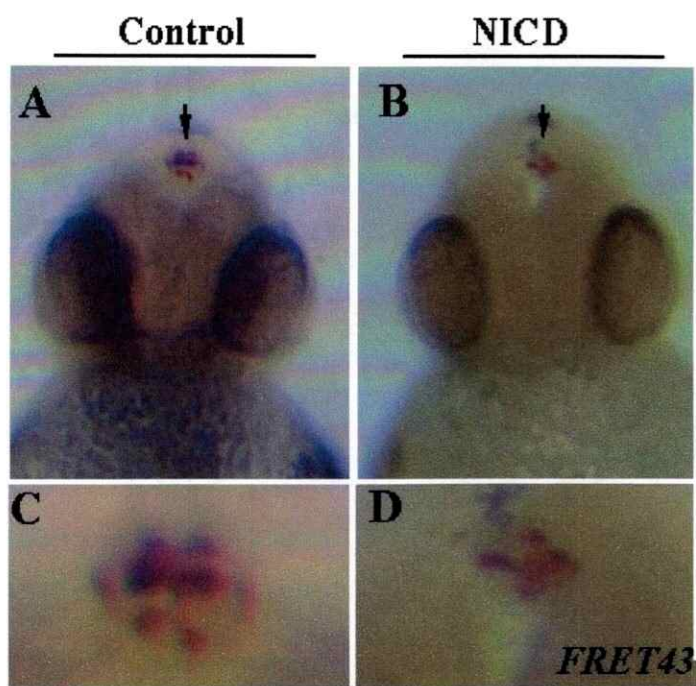


Fig. 25. Notch activado, reprime la formación de los fotorreceptores. (A-D). Visiones frontales con dorsal hacia arriba. (C-D). Amplificación de la epíffisis. Los embriones fueron fijados a las 48 horas pf y tratados por inmunocitoquímica para revelar la presencia de Zpr-1. (A,C). En los embriones control los fotorreceptores se observan en la epíffisis (flecha). (B,D) En los embriones inyectados con 100 ng mRNA NICD, se observa una disminución significativa fotorreceptores epifisarios.

A continuación, probamos el efecto de la activación constitutiva de Notch sobre el desarrollo de los fotorreceptores. Para ello inyectamos embriones en la etapa de una célula con 100ng de mRNA para NICD. Fijamos estos especímenes a los dos días pf y procedimos a revelar el anticuerpo Zpr1 en la pineal. En los embriones tratados con NICD, se produce menor cantidad de fotorreceptores comparados con los embriones sin inyectar (Fig. 25).

Estos resultados indican que, durante la neurogénesis de la epíffisis la producción de fotorreceptores y neuronas de conexión esta bajo el control de la vía Notch (Tabla. 7). Básicamente hemos demostrado que una perturbación en la actividad de la vía, ya sea inhibición (*mib*) o sobre activación (NICD), se traduce en aumento y disminución del número de neuronas, respectivamente.

Tabla.7. Notch regula la formación de fotorreceptores (Zpr1+) y neuronas de conexión (Tuac+) en la epíffisis

inyección	anticuerpo	%de disminución en la expresión	
		28h (n)	48h (n)
mRNA <i>NICD</i>	zpr-1	nd	72% (64)
	Tuac	68% (43)	nd
n, número de embriones revisados., nd, no determinado. zpr1 marcador de los fotorreceptores. Tuac (tubulina acetilada), marcador de las neuronas de conexión.			

4. Neurogénesis en la línea lateral posterior (llp).

4.1. Expresión de *neuroD* en la llp.

Los neuromastos son inervados por neuronas sensoriales cuyos cuerpos celulares se encuentran localizados en el ganglio craneal (Romboencéfalo) (Revisión en Ghysen y Dambly Chaudiere, 2004). Se sabe que las neuronas sensoriales se proyectan al primordio antes de que este migre y permanecen asociados a él durante el depósito de los neuromastos (Gompel y cols., 2001a; Gompel y cols., 2001b; Sapede y cols., 2002). Como se muestra en la Figura 26, entre 7 y 9 neuromastos se forman a lo largo del tronco y la cola de los embriones (Fig. 26).



4.2. La formación del ganglio de la llp es dependiente de *ngn1*.

Determinamos la función de *ngn1* en el desarrollo de la llp mediante la inyección de 1,5ng de morfolino para *ngn1*. Fijamos los embriones a las 24 horas de desarrollo y procesamos las muestras por inmunocitoquímica detectando HuC. Analizando la tinción bajo la lupa, vimos una desaparición completa de los ganglios sensoriales que inervan los neuromastos en la llp (Fig. 27B). Usado el método de tinción vital DASPEI, examinamos los neuromastos en los morfantes *ngn1* y no encontramos diferencias notables respecto de los controles. Andermann y cols. (2002) encuentran un resultado similar y sugieren que la neurogénesis de los neuromastos es independiente de la inervación craneal regulada por *ngn1* (Anderman y cols., 2002).

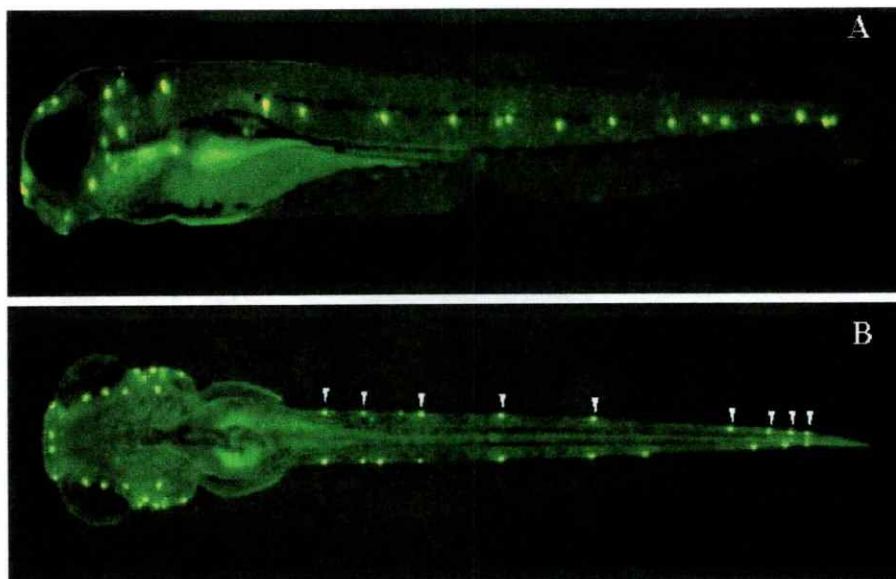


Fig. 26. Desarrollo de la línea lateral posterior (llp). (A). Visión lateral. (B). Visión dorsal con anterior hacia la derecha. Los neuromastos son teñidos con el método de tinción vital DASPEI y las larvas son observadas por microscopía de fluorescencia. La llp esta compuesta por entre 8 y 9 neuromastos, que son depositados a lo largo del tronco y la cola de los embriones.

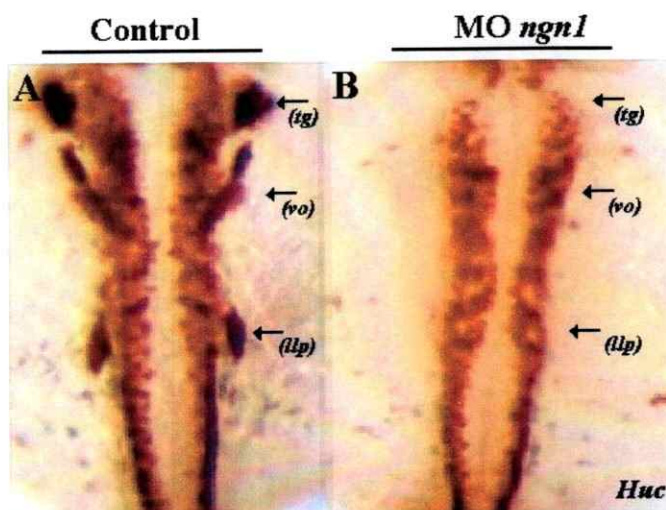


Fig. 27. *Ngn1* controla la formación del ganglio en la llp. (A-B). Visión dorsal justo posterior al ojo, con anterior hacia arriba. Los embriones fueron fijados a las 24 horas y se procesaron por inmunohistoquímica para revelar la señal de Huc en los ganglios sensoriales. (B). En los embriones inyectados con 1.5 ng MO *ngn1*, se observa la pérdida de todos los ganglios sensoriales, incluido el de la llp. Note que las motoneuronas y neuronas entéricas se forman normalmente. Tg, trigémino; vo, vesícula otica; llp, línea lateral posterior.

Nuestros resultados, en conjunto con estudios paralelos, demuestran que, *ngn1* es indispensable en el desarrollo de los ganglios que proyectan sus neuronas a la llp (Anderman y cols., 2002). También indican que la formación de los neuromastos es independiente de la inervación, es decir, la neurogénesis de las células ciliadas en la llp es independiente de la función de *ngn1*.

Al bloquear la función de *ngn1*, se produce la completa desaparición de los ganglios: trigémino, del oído y de la línea lateral posterior (Fig. 27 B). Previamente hemos mostrado que *ngn1* participa en el desarrollo de las neuronas sensoriales en la espina dorsal y en la epífisis. Por este motivo es dado decir la *ngn1* participa fundamentalmente en la determinación y especificación de las neuronas que forman los órganos sensoriales en el pez cebra (Anderman y cols., 2002; Cornell y Eisen, 2002; Cau y Wilson., 2003).

4.3 Función de *neuroD* en el desarrollo de la llp.

Nosotros encontramos que *neuroD* se expresa en el ganglio de la línea lateral posterior durante la embriogénesis. Una visión espacio/temporal de las células permite concluir que la ubicación de los mensajeros *neuroD* es bastante dinámica en el ganglio de la llp (Fig. 28). En los ganglios sensoriales la expresión de *neuroD* es precedida por la expresión de *ngn1* (Andermann y cols., 2002).

Para examinar la función de *neuroD* en la formación de los neuromastos inhibimos su función usando morfolino para *neuroD*. Al segundo día df, incubamos los embriones en una solución 1mM de DASPEI.

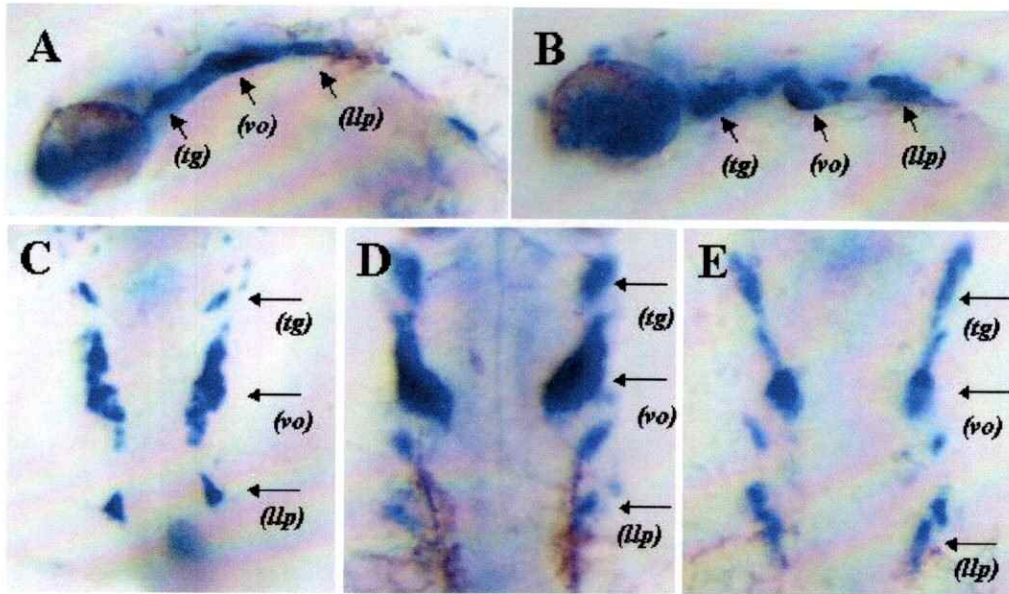


Fig. 28. Expresión de *neuroD* en la llp. (A-B). Visiones laterales con anterior a la izquierda y dorsal hacia arriba. Los embriones fueron fijados a las 30 (A) y 36 (B) horas pf y tratados por hibridación *in situ* para determinar la expresión de *neuroD*. *NeuroD* se localiza en el trigemino (tg), la vesícula ótica (vo), y la línea lateral posterior (llp). (C-D). Visiones dorsales justo detrás del ojo, con anterior hacia arriba. Los embriones fueron fijados a las 18 (C), 30 (D) y 36 (E) horas de desarrollo. El cambio espacial en la expresión de *neuroD*, se relaciona con el cambio en la disposición de las placas sensoriales.

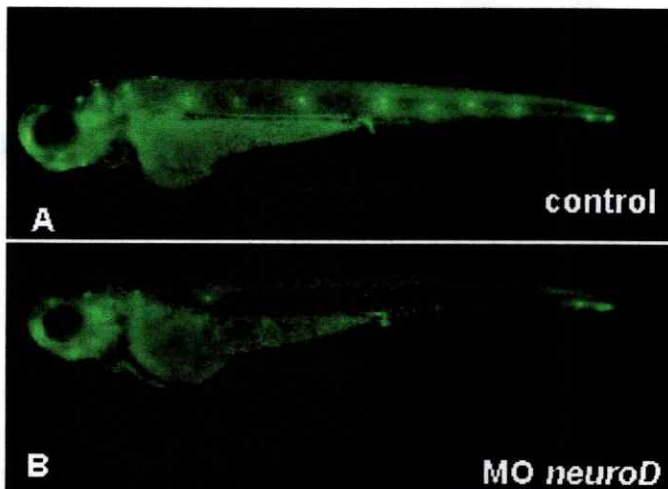


Fig. 29. *NeuroD* participa en la formación de los neuromastos en la llp. (A-B). Visiones laterales de embriones a los 3 días de vida. (A). Embrión silvestre tratado con el método de tinción vital DASPEI, observado por microscopia de fluorescencia. Note la formación de 8 neuromastos en el tronco y cola. (B). En los embriones tratados con 5ng de MO *neuroD*, los neuromastos de la llp no se desarrollan normalmente, ya que por lo general disminuye su número.

En los embriones tratados con *neuroD* se observan muy pocos neuromastos (Fig. 29). El rango de fenotipos en los embriones morfantes va desde un solo neuromasto justo detrás del oído a unos pocos neuromastos localizados en la cola (Fig. 29B). Por el contrario, la formación de neuromastos en la cabeza es normal y sirve como un control de la buena condición de los embriones inyectados con morfolino *neuroD* (Fig. 29A).

4.4. Notch regula la expresión de *neuroD* en la llp.

Analizando la llp de *mib*, Itoh y Chitnis. (2001) observan que las células precursoras de neuromastos son sensibles a la inhibición lateral. Los autores observan formación de neuronas ectópicas dentro de los neuromastos en *mib* (Itoh y Chitnis, 2001). Usando el método de tinción DASPEI no encontramos neuromastos maduros en el mutante *mib*. Una posible explicación es que, en ausencia de la vía Notch, las células neuronales que no se diferencian mueren o degeneran por apoptosis.

Para estudiar la participación de la inhibición lateral en el desarrollo de los neuromastos. Fijamos embriones silvestres y mutantes *mib* a las 18 horas df. Procesamos las muestras por hibridación *in situ* contra el mRNA de *deltaA*, *B* y *neuroD*. En la placa de la llp de *mib* se produce un aumento notable en la expresión de los genes *deltaB* y *neuroD* (Fig. 30). Por el contrario, la expresión de *deltaA* se restringe a unas pocas células (Fig. 30D). Esto contrasta claramente a lo observado en los rombómeros del mismo mutante, donde la expresión de *deltaA* aumenta y se expande (Fig. 30B). Estos datos indican que

los mRNA de *deltaB* y *neuroD*, son los mensajeros que mejor prefiguran los territorios presuntivos de la llp y que ellos son también los más sensibles a la inhibición lateral.

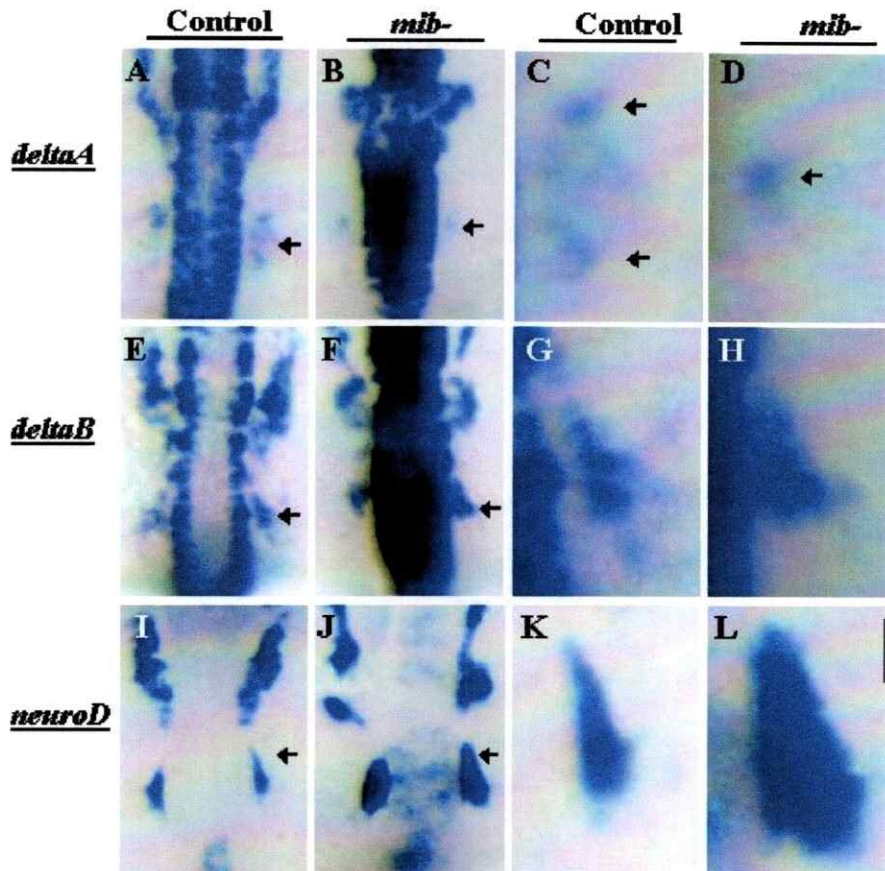


Fig. 30. Neurogénesis en la llp del mutante *mib*. (A-L). Visión dorsal con anterior hacia arriba. (C-D, G-H, K-L). Amplificación de la llp de los mismos especímenes. Los embriones fueron colectados a las 18 horas y procesados mediante hibridación *in situ* para detectar la expresión de *deltaA*, *B* y *neuroD*. (A-D). En los embriones silvestres la expresión de *deltaA* se produce en los precursores neuronales ubicados a lo largo del eje anterior posterior, correspondiente a los rombómeros, en el oído y en la llp (flecha). (C-D). En los embriones *mib*, la transcripción de *deltaA*, se restringe a menos células y es mayor. (E-H). Normalmente *deltaB* se expresa, en los bordes laterales de los rombómeros, en el ganglio trigémino, el oído y la llp (flecha). (F-H) En los mutantes *mib*, la expresión de *deltaB* aumenta marcadamente en las células que forman la llp (flecha). (I-L). En el caso normal, la expresión de *neuroD* marca las células que están iniciando la diferenciación hacia neurona (Mueller and Wullimann, 2002b) y se produce en un patrón espacial que es más localizado con respecto a los genes *deltaA*, *B*. En la figura se puede apreciar que a las 18 horas *neuroD* marca las neuronas presuntivas en la línea lateral. (K-L). La mutación en *mib*, determina un incremento drástico en la expresión de *neuroD* en la llp, lo que indica que hay un mayor número de células diferenciando hacia neuronas.

Al activar la vía Notch usando el constitutivo activo NICD observamos una reducción casi completa en la expresión de *neuroD* localizada en el ganglio de la Ilp (Fig. 31E). Este efecto es concordante con inhibición del desarrollo de los neuromastos en los embriones inyectados con NICD.

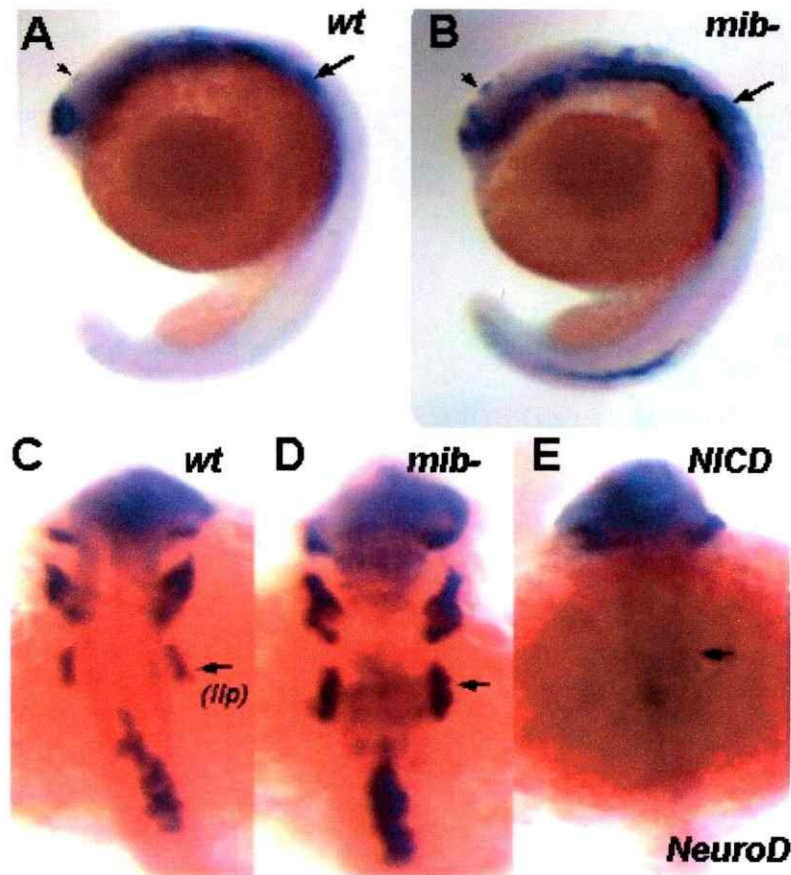


Fig. 31. Notch regula la expresión de *neuroD* en la Ilp. (A-B). Visiones laterales con anterior a la izquierda y dorsal hacia arriba. (C-E). Visión dorsal con anterior hacia arriba. Los embriones fueron fijados a las 24 horas y procesados por hibridación *in situ* para detectar la expresión de *neuroD*. (B,D). En los embriones mutantes *mib*, la expresión de *neuroD* aumenta. (E). Por el contrario en los embriones inyectados con 100 ng de NICD, la expresión de *neuroD* tiende a desaparecer.

Estas observaciones y las precedentes, ayudan a formarse una idea de cómo las interacciones moduladas por Notch-Delta se conservan en el desarrollo de dos tipos de órganos sensoriales, la epífisis y la línea lateral posterior.

DISCUSIÓN.

1. Mecanismos implicados en el posicionamiento de la epífisis.

En la formación del mesodermo axial, el notocordo es el tejido embrionario que determina las propiedades de los distintos tipos celulares a lo largo del eje anterior-posterior de los embriones (revisión Chitnis, 1999). A semejanza del notocordo, en el cerebro anterior se expresan varias moléculas difusibles y que actúan a nivel celular determinando la posición anterior-posterior y dorsal-ventral de la vesícula epifisiaria. Por una parte, en el eje anterior posterior del tubo neural anterior se expresan componentes de la vía Wnt que poseen propiedades posteriorizantes (Molven y cols., 1991; Saito y cols., 2000; Heisenberg y cols., 2001). Las señales verticales de *bmp7* y *shh* (Nguyen y cols., 1998) emitidas en el eje dorso-ventral de la epífisis son capaces de inducir la expresión de *flh* (Masai y cols., 1997), *fgf8* y *otx2* (Li y cols., 1994). Es posible sugerir que estas mismas señales estén involucradas en la inducción de los componentes de los genes proneurales y la vía Notch/Delta. Así, tanto planar como verticalmente las señales presentes en el primordio presuntivo de la epífisis, podrían activar los genes que finalmente participan en la posición y la neurogénesis de la epífisis.

Previamente los genes *floating head (flh)* y *masterblind (mbi)* se han implicado en el posicionamiento de la epífisis y se ha demostrado que regulan la producción de fotorreceptores y neuronas de conexión (Masai y cols., 1997,

Heisenberg y cols., 2001). Durante el desarrollo del cerebro anterior la epífisis actuaría como un centro organizador induciendo el desarrollo neural. Se ha propuesto que el patrón de diferenciación anterior posterior de la pineal es producto de un gradiente de actividad de Wnt (Heisenberg y cols., 2001). Heisenberg y cols. (2001) mostraron que la señal Wnt participa controlando la expresión de *flh* en el cerebro anterior. En los mutantes de *masterblind (mbi)* el aumento en la actividad Wnt determina una expansión hacia anterior del territorio correspondiente a la epífisis. Los autores concluyen que la actividad de *mbi* reprime la transcripción de *flh* en el telencéfalo, restringiéndola a la región del epítalamo.

Recientemente, Se ha establecido que la actividad de *flh* es necesaria y suficiente para mantener y activar la transcripción de los genes proneurales *zash1a* y *ngn1*. Ciertamente, la pérdida de neuronas epifisarias observada en embriones mutantes *flh*, es al menos en parte a través de la inhibición de *zash1a* y *ngn1*. Aquí, ambos elementos convergen y activan la transcripción de *neuroD*, permitiendo la generación de neuronas (Cau y Wilson, 2003).

2. Mecanismos implicados en la especificación neuronal.

2.1. *Zash1a* activa la expresión de *delta*.

En el presente trabajo nos propusimos caracterizar la función de los genes *zash1* en el desarrollo del cerebro, centrándonos principalmente en la neurogénesis de la epífisis. Puesto que no disponíamos de peces mutantes para los genes *zash1a* y *ngn1*, usamos una aproximación genética reversible

haciendo uso de oligonucleótidos morfolinos. Los morfolinos son análogos no iónicos de DNA, modificados químicamente para aumentar su estabilidad. Estos oligonucleótidos antisentido pueden bloquear selectivamente la síntesis de las proteínas mediante dos mecanismos: inhibiendo el inicio de la traducción de las proteínas o impidiendo el empalme de los exones generando proteínas truncadas (Heasman, 2002). Varios estudios han certificado la eficiencia y selectividad de los morfolinos como inhibidores específicos de la función de las proteínas durante el desarrollo del pez cebra (Nacevisius y Ekker., 2000; Heasman, 2002).

Primero analizamos la interacción genética entre *zash1a* y *delta*. Encontramos que *zash1a* es capaz de inducir la expresión del mRNA para *deltaA*, *deltaB* y *deltaD*. La expresión de *zash1a* en una zona que coincide con el dominio de expresión de *delta*, es compatible con una función para *zash1a* regulando la competencia neuronal en la epífisis.

La interferencia de la función de *zash1a* con morfolinos, suprime fuertemente la expresión para *deltaA*, *B* y *D* en la pineal. Además, en los embriones mutantes *flh* donde la función de *zash1a* es parcialmente reprimida, se ha descrito que los niveles iniciales de expresión para los genes *delta* son prácticamente normales (Cau y Wilson, 2003). Se ha observado que en los embriones mutantes *flh*, tanto *zash1a* como *delta* son inicialmente expresados, pero no se mantienen en el tiempo (Masai y cols., 1997; Cau y Wilson, 2003). Podemos postular que *flh* interacciona selectivamente con un elemento regulador en el promotor de *zash1a*, distinto del elemento encargado de activar

la expresión del gen. Algo similar ocurre en *Drosophila*, donde la región 3' del promotor *Achaete-scute* (*Ac-sc*) responde a factores transcripcionales que activan la expresión del gen, mientras, otras secuencias en el extremo 5' unen factores involucrados en la mantención de la expresión de *Ac-sc* (ver revisiones en Campuzano y Modolell, 1992; Modolell, 1997).

La observación que *zash1a* activa la transcripción de los genes *delta*, en varias zonas donde la expresión de ambos genes coincide, sugiere que este efecto podría ser directo. En *Drosophila* la dimerización entre *Ac-sc* y *daughterless* (*da*) permite la activación transcripcional del promotor para *delta* (Kunish y Campos-Ortega, 1994). Además, en pez cebra mediante el uso de embriones transgénicos, se ha mostrado que *zash1a* regula directamente el promotor de *deltaD* (Hans y Campos-Ortega, 2002). Así, podemos sugerir que *zash1a* participaría en la activación directa de *deltaA*, *B* y *D* en las células precursoras de neuronas en la epífisis.

2.2. Autorregulación entre *zash1a* y *zash1b* en la neurogénesis.

Los patrones de expresión de *zash1a* y *zash1b* presentan homologías en varias zonas del cerebro embrionario (Allende y Weinberg, 1994, Mueller y Wullimann, 2002a). En esta tesis, encontramos una regulación recíproca entre ambos genes y mostramos que controlan mutuamente sus niveles de expresión. En efecto, mediante la inyección de morfolinós observamos que la pérdida de la función de *zash1* (*zash1a* y *zash1b*), se traduce en un aumento de los niveles de mRNA para *zash1* en el SNC y SNP. Esto indica que la expresión

de *zash1* depende de un ciclo de mantención que involucra al factor transcripcional *zash1* y posiblemente Notch, ya que al bloquear *zash1* o la vía Notch se expande la expresión de *zash1* en los tejidos neurogénicos.

Desde el punto de vista teórico podemos proponer dos mecanismos de autorregulación. El primero directo, involucra elementos en el promotor de *zash1* susceptibles de ser reprimidos por *zash1* sólo o en combinación con otros cofactores transcripcionales. El segundo indirecto, comprometería la vía Notch a través de la inhibición lateral. Como indicamos *zash1a* induce la expresión del ligando *delta*, esto ayuda también a la activación de la vía Notch. A su vez, Notch podría reprimir la actividad de *zash1a*. Efectivamente, varios estudios en pez cebra han mostrado la conservación del mecanismo de inhibición lateral durante la selección neuronal en diversos órganos y tejidos (Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Blader y cols., 1997; Dornseifer y cols., 1997). Los estudios convergen en mostrar que los niveles de actividad de los factores proneurales bHLH y la vía Notch, son determinantes en definir el tamaño de la región de competencia neuronal (Haddon y cols., 1998; Appel y Eisen, 1998; Takke y cols., 1999; Cornell y Eisen, 2002). Como indicio de ello, en los mutantes de la vía Notch (*mib*) encontramos un aumento significativo en los niveles de mRNA para *zash1a* y *b*, indicando un aumento en el tamaño de la región de competencia neuronal.

2.3. Genes involucrados en identidad posicional de *zash1a* y *b*.

Es posible que en el embrión otros factores aparte de la vía Notch estén encargados de regular la expresión de los genes *zash1*. Apoyando esta

posibilidad, en *Drosophila* los genes del complejo *iroquois*, son requeridos para inducir elementos reguladores del promotor de *Ac-sc*, permitiendo la generación de los órganos sensoriales en determinadas posiciones dentro del sistema nervioso de la mosca (Gomez-Skarmeta y Modolell, 1996). Por su parte, en la epífisis del pez cebra, la mantención de la expresión de *zash1a* esta bajo el control del gen *flh* (Masai y cols., 1997; Cau y Wilson, 2003). Es interesante notar que en los mutantes de la vía Wnt (*mb1*), tanto *flh* como *zash1a* son expresados en posiciones ectópicas, ocupando territorios correspondientes al prosencéfalo (Masai y cols., 1997). Es tentador proponer que un sistema de señales semejante al involucrado en el posicionamiento de neuronas en *Drosophila*, actuaría en la neurogénesis de la epífisis (Fig. 32). En este modelo los genes *flh* y *mb1*, actuarían como genes de pre-patrón, siendo responsables de restringir la expresión de *zash1a* en el eje anterior-posterior del epitálamo dorsal (Fig. 32). Algunas características del gen *flh* favorecen esta posibilidad. En el primordio de la epífisis la expresión de *flh* es regulada por la actividad de señales solubles como Bmp y Wnt, las cuales son mediadoras de la identidad posicional durante el desarrollo (Masai y cols., 1997; Barth y cols., 1999; Heisenberg y cols., 2001). Por otra parte, *flh* controla la expresión de dos factores transcripcionales del tipo bHLH. En efecto, el factor transcripcional *flh* es esencial en activar la expresión de *ngn1*. En tanto, únicamente contribuye a sostener la expresión de *zash1a* durante la neurogénesis (Cau y Wilson, 2003).

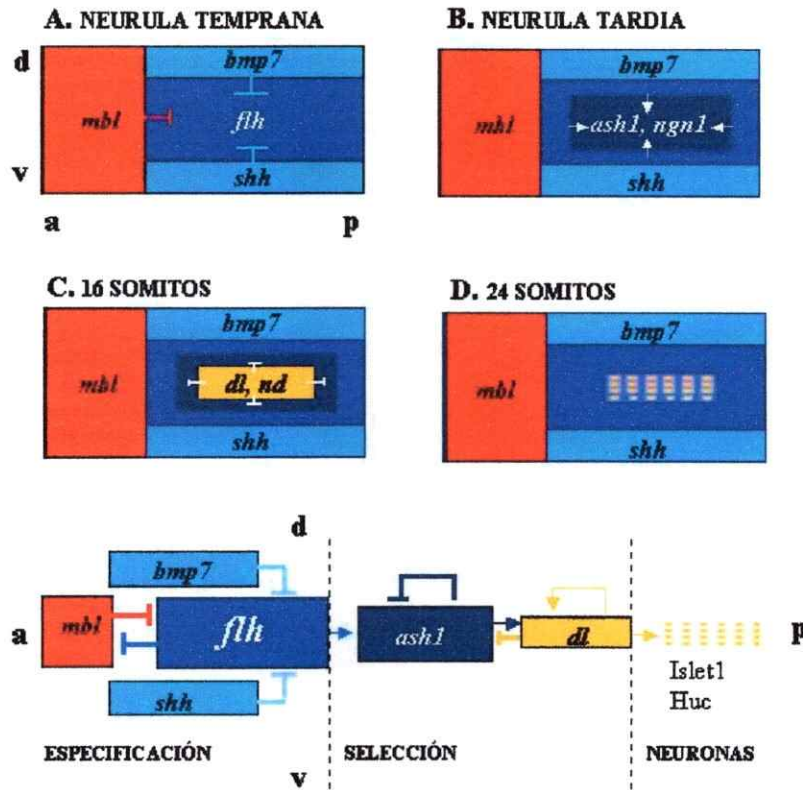


Fig. 32. Modelo para la especificación y selección neuronal en la epífisis. (A) En la neurula temprana. El territorio presuntivo de la epífisis marcado con *flh* es restringido en el eje dorsal ventral por la expresión de *bmp7* y *shh*. En tanto, *mbl* regula la expresión de *flh* en el eje anterior. (B) En la neurula tardía. *Flh* activa la transcripción de *ash1a* y *ngn1* en un dominio que se superpone con el territorio de la epífisis. (C) A las 16 horas pf. El aumento en los niveles de mRNA para *delta* (*dl*) y *neuroD* depende de la actividad inductora de *ash1a* y *ngn1*. Es este estadio empiezan las actividades represivas de *delta* sobre la expresión de *ash1a* y *ngn1*. Estas definen la selección neuronal. (D) A partir del primer día de desarrollo comienzan a surgir las primeras neuronas. a: anterior, p: posterior, D: dorsal, v: ventral

2.4. Relaciones de epístasis entre *zash1a*, *ngn1* y *neuroD*.

En mamíferos, usando roedores transgénicos como modelo de estudio se ha mostrado que durante la especificación de los progenitores olfatorios *mash1* y *ngn1* forman parte de una cascada genética en la cual *mash1* actúa corriente arriba de *ngn1* permitiendo su expresión (Cau y cols., 2002). Así, la falta de función de *mash1* se traduce en la disminución del mRNA para *delta* junto con la desaparición de varias neuronas olfatorias. Por el contrario, la pérdida de la función de *ngn1* no afecta la expresión del ligando de la vía Notch, sino que afecta exclusivamente la diferenciación neuronal (Cau y cols., 2002).

Con el fin de analizar posibles relaciones de epístasis entre los genes *zash1a* y *ngn1* durante la neurogénesis epifisiaria, observamos el patrón de expresión de los mRNA para *zash1a* o *ngn1* en embriones tratados con el morfolino para el otro gen. A diferencia de ratón, en estos ensayos no encontramos evidencias que apoyen una regulación cruzada entre *zash1a* y *ngn1*. De modo similar, los embriones morfantes para *neuroD* no presentan cambios en la expresión de *zash1a* o *ngn1*. Estas observaciones pueden ser explicadas sugiriendo que los genes *zash1a* y *ngn1* tendrían una jerarquía equivalente, probablemente formando parte de vías paralelas que contribuyen en conjunto a la producción de neuronas epifisarias. En resumen y como indicamos antes, *zash1a* y *ngn1* activan la expresión de *neuroD*. Pero, este último no regula el nivel transcripcional de *zash1a* y *ngn1*.

3. Mecanismos implicados en el control del número de neuronas.

3.1. *Zash1a* controla la neurogénesis primaria.

Encontramos que *zash1a* cumple un papel determinando la cantidad de neuronas diferenciadas en la epífnis. Usando embriones tratados con morfolinós para *zash1a* y *zash1a/ngn1*, Cau y Wilson (2003) observan una disminución significativa en la transcripción de factores característicos de fotorreceptores y neuronas de conexión, como *otx5* y *one-cut*. En este contexto, *otx5* activa la transcripción de genes circadianos en los pinealocitos (Gamse y cols., 2002). Por su parte, *one-cut* participa en la diferenciación de los fotorreceptores en *Drosophila* (Nguyen y cols., 2000). Del mismo modo, bloqueando la función de *zash1a* observamos una disminución en el número de neuronas primarias y sensoriales. Esto probablemente debido al descenso en la expresión de *deltaA*, *B* y *D*, en los precursores de fotorreceptores y neuronas de conexión. Además, mostramos que *zash1a* no participa en la diferenciación neuronal ya que, en los embriones morfantes para *zash1a* no detectamos disminución de fotorreceptores en favor de neuronas de conexión o viceversa. Por el contrario, en los embriones morfantes se produce una disminución equitativa en la formación de los dos tipos de neuronas. Por lo tanto, es posible sugerir que *zash1a* participa tempranamente en la neurogénesis de la epífnis, definiendo la cantidad de neuronas precursoras que más tarde se diferencian en fotorreceptores y neuronas de conexión.

3.2. Papel de *zash1a* y *ngn1* en la neurogénesis de la epífisis.

Mediante inyección de morfolinós para *zash1a* y *ngn1*, analizamos la actividad de los factores transcripcionales bHLH durante la generación de neuronas en la epífisis. Nuestros resultados muestran que *zash1a* y *ngn1* regulan de manera redundante las proteínas Islet1 y Huc en las neuronas primarias. Al bloquear la función de los genes por separado observamos un descenso moderado pero significativo en el nivel de ambas proteínas en la epífisis. Por lo tanto, ninguno de los dos genes por sí sólo es suficiente y necesario para dar cuenta de la neurogénesis primaria. En efecto, al bloquear la actividad de *ngn1* junto con *zash1a* mediante hibridación *in situ* se detectan menores niveles de mRNA para *islet1*, indicando que ambos genes cooperan en la generación de neuronas (Cau y Wilson, 2003).

Es claro de nuestro trabajo que la expresión de *zash1a* y *ngn1*, precede a la expresión de una tercera proteína bHLH codificada por *neuroD*. Además, como en otras especies, encontramos que *neuroD* es activado inicialmente dentro del dominio de expresión de *zash1a* (Ma y cols., 1996; Blader y cols., 1997; Fode y cols., 1998; Cau y Wilson, 2003). De forma similar, en el desarrollo de las crestas neurales *ngn1* y la vía Notch participan controlando la expresión de *neuroD* (Cornell y Eisen, 2002). En conjunto, estos resultados apoyan la idea que los genes proneurales tempranos *zash1a* y *ngn1* son requeridos para activar la expresión de *neuroD*. Más aún, se ha encontrado que la expresión de *neuroD* coincide con el inicio de la diferenciación neuronal (Miyata y cols., 1999; Liu y cols., 2000; Schwab y cols., 2000; Mueller y

Wullimann, 2002b). Estos datos sugieren que *zash1a* y *ngn1*, participan en la neurogénesis de la epífisis antes de la diferenciación neuronal.

3.3. *Zash1a* y *ngn1* definen territorios en la epífisis.

Estudios realizados en *Drosophila*, pollo, ratón, *Xenopus* y pez cebra, coinciden en indicar que durante la neurogénesis operan secuencialmente los genes proneurales y neurogénicos (Campuzano y Modolell, 1992; Chitnis y cols., 1995; Henrique y cols., 1997; Haddon y cols., 1998; Brunet y Ghysen, 1999; Casarosa y cols., 1999). En la epífisis, encontramos una sucesión similar entre la expresión de *zash1a*, *ngn1* y *delta*, que revela una progresión en la neurogénesis. La sucesión comienza con la expresión de *zash1a* y *ngn1* en un grupo de células equivalentes que constituyen en conjunto los precursores neuronales. Aquí, y en la misma etapa, se produce la expresión de *deltaA*, *B* y *D*. Además, observamos que el descenso en la expresión de los genes *zash1a*, *ngn1* y *delta*, coincide temporalmente con la formación de las primeras neuronas post-mitóticas, caracterizadas por la expresión de *neuroD* (Mueller y Wullimann, 2002b). Nuestros análisis muestran que en la etapa de la neurula tardía, la epífisis es dividida en un territorio anterior, que expresa altos niveles de *zash1a*, y una región posterior que expresa niveles moderados de *ngn1*. Este hecho, indica que los genes *zash1a* y *ngn1*, podrían participar en la especificación de distintas subpoblaciones neuronales. Ciertamente, notamos que la interferencia de los factores transcripcionales del tipo bHLH *zash1a* y *ngn1* no suprime completamente la neurogénesis en la epífisis. Sin embargo, no

hallamos evidencias que permitan indicar un papel de los factores *zash1a* y *ngn1* en la especificación del fenotipo neuronal en la epífisis.

Hasta aquí hemos analizado la función del gen proneural *zash1a* en la neurogénesis de la epífisis del pez cebra, en particular el papel de *zash1a* como activador de la expresión de los genes *deltaA*, *deltaB* y *deltaD* en los precursores de neuronas y la posible función de *zash1a* en la producción y diferenciación neuronal. A continuación analizaremos la función de los genes neurogénicos *notch/delta* en la especificación de las neuronas en la epífisis. Además, discutiremos como el balance entre las actividades de los genes proneurales y neurogénicos regula la cantidad de neuronas formadas durante la neurogénesis de la pineal.

4. Mecanismo de inhibición lateral en la epífisis.

4.1. Notch regula la expresión de los genes proneurales.

La vía Notch/Delta es el principal mecanismo de señalización intercelular descrito en la embriogénesis de vertebrados e invertebrados. Se ha descrito su participación en varios eventos del desarrollo entre los cuales cabe destacar: neurogénesis, segmentación, vasculogénesis, angiogénesis, entre otros. La activación de Notch por Delta produce la proteólisis del primero en la cara interna de la membrana plasmática. El segmento intracelular del receptor se mueve al núcleo de la célula donde activa la expresión del represor transcripcional *enhancer of split* en *Drosophila* y sus ortólogos *hairy/hes/her* de pollo/ratón/pez cebra (Artavanis-Tsakonas y cols., 1999).

En el pez cebra se dispone de varias líneas de peces mutantes útiles para estudiar la función genética de Notch. Entre ellas la mutación *mindbomb* (*mib*), cuya proteína corresponde a una ubiquitina ligasa indispensable en la señalización vía Notch (Jiang y cols., 1996; Itoh y cols., 2003). En la epífisis de *mib*, la disminución en la actividad Notch determina sobreexpresión de *zash1a*. En esta última condición, Notch tampoco puede reprimir la expresión de *ngn1* y *neuroD*, promoviendo el desarrollo de neuronas supernumerarias. A la inversa, la sobreexpresión de un constitutivo activado de Notch bloquea la síntesis de fotorreceptores y neuronas de conexión. Esto posiblemente debido a la represión de Notch sobre los genes proneurales del tipo bHLH. A su vez, al disminuir los niveles de los factores bHLH disminuye Delta y con ello la actividad de la vía Notch. De esta forma, cada modificación experimental en la actividad de los genes proneurales bHLH y/o *notch/delta* determina cambios en el número de neuronas formadas en la epífisis. Asimismo, en la placa neural la formación de neuronas es reprimida mediante sobreexpresión de Notch (Takke y cols., 1999). En efecto, la inducción de las células de la cresta neural requiere un nivel específico de actividad Notch, la cual reprime la expresión del gen bHLH *ngn1* (Cornell y Eisen, 2002). En concordancia, durante la neurogénesis de mamífero los ligandos de la vía Notch, Delta/Serrate/Jagged, regulan la expresión de *mash1* y *ngn1* (Casarosa y cols., 1999; Fode y cols., 1998; Cau y cols., 2002).

Nuestros resultados muestran que la disminución de la inhibición lateral en los embriones *mib* determina expresión ectópica para *neuroD* en la epífisis.

Cabe notar que en la mayoría de los embriones *mib* la expresión de *neuroD* se produce prematuramente. Basándonos en las evidencias previas podemos sugerir que Notch controla el tiempo de la competencia neuronal, mediante la represión de uno o más factores bHLH (Jiang y cols., 1996), regulando así mismo, el tamaño de la región de competencia. En efecto, demostramos que en los mutantes *mib* dicha región caracterizada por la expresión de genes proneurales, se expande aumentando la probabilidad de neurogénesis dentro de ella (Fig. 33).

No sabemos como Notch puede reprimir la expresión de los diferentes genes proneurales en la epífisis. Pero, a semejanza de *Drosophila*, en vertebrados la vía Notch induce la expresión de los represores transcripcionales Hairy/Hes/Her, ortólogos de *Enhancer of split*. Estas proteínas en colaboración con otros factores transcripcionales como *groucho*, podrían mediar la represión transcripcional de los genes proneurales. Como indicio de ello se ha demostrado que *her4*, el ortólogo de *enhancer of split* en pez cebra, regula negativamente la expresión de *ngn1*, actuando como el efector transcripcional de la vía Notch (Takke y cols., 1999).

Observamos que desde el estadio de neurula tardía, la epífisis presenta expresión de genes proneurales (*zash1a*, *ngn1*, *neuroD*) y neurogénicos (*notch/delta*). Previamente se ha mostrado que durante el desarrollo de la placa neural, existe una interacción recíproca entre ambos genes, la cual define el

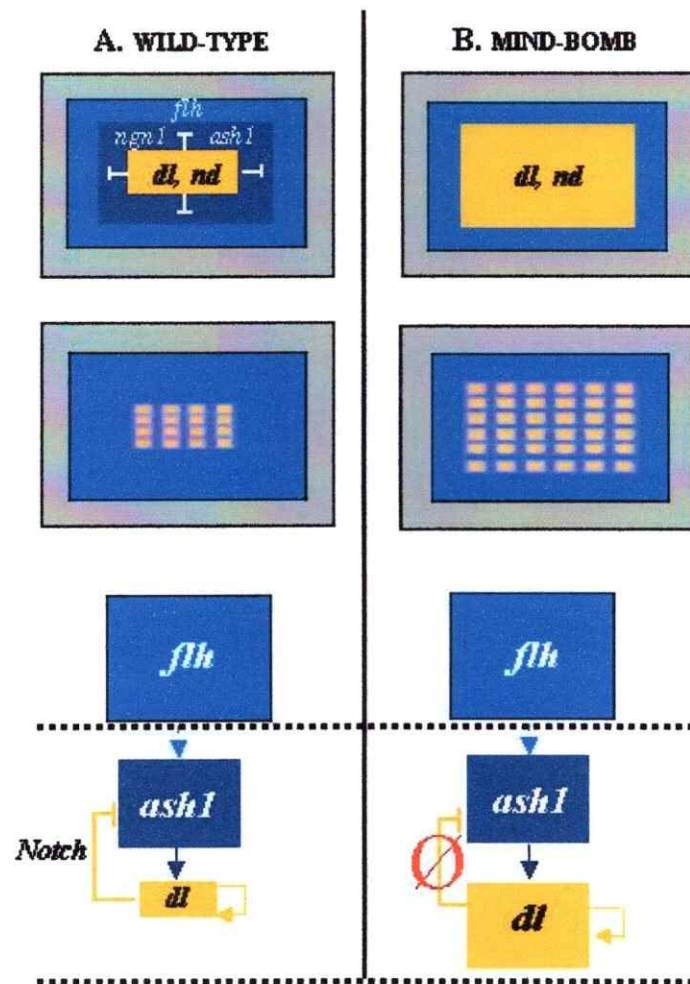


Fig. 33. Modelo de competencia neuronal en la epífisis. (A) El gen homeoproteína *flh* activa la expresión de *zash1a* en un grupo de células equivalentes. A su vez, *zash1a* permite la acumulación de *delta* en el mismo territorio. Las células seleccionadas para formar neuronas poseen suficiente actividad de *zash1a* y *delta* como para superar la represión mediada por la vía Notch. (B) En efecto, en los mutantes *mib* la interferencia de la vía Notch determina una expansión en el territorio con competencia neuronal y un incremento en la neurogénesis.

nivel de competencia neuronal en las células precursoras de neuronas (Appel y Eisen, 1998; Haddon y cols., 1998; Takke y cols., 1999; Cornell y Eisen, 2002).

En esta tesis hemos encontrado la operación de un mecanismo similar en la

neurogénesis de la epíffis. Adicionalmente, hemos demostrado que, producto de una perturbación, ya sea sobre activación o inactivación de la función proneural por Notch, se produce un exceso o detrimento en la generación de neuronas epifisiarias.

4.2. Notch regula la expresión de *deltaA*, *B* y *D*.

En la epíffis del pez cebra los genes *deltaA*, *B* y *D* son expresados en un grupo compacto de células. Esto se diferencia de lo que ocurre en territorios neurogénicos de la placa neural donde los diferentes genes *delta* se expresan en una trama mosaico (Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Dornseifer y cols., 1997; Haddon y cols., 1998, Appel y Eisen, 1998; Takke y cols., 1999).

En esta tesis mostramos que el patrón de expresión de *delta* se restringe progresivamente a los precursores neuronales de la epíffis. Lo mismo ocurre en otras regiones neurogénicas que forman compartimientos neuronales, como el telencéfalo, el hipotálamo, los rombómeros, los órganos sensoriales y la línea lateral (Itoh y Chitnis., 2001; Cornell y Eisen, 2002; Itoh y cols., 2003). Estos hallazgos sugieren que los genes *notch/delta* participan de manera conservada en regulaciones genéticas en la neurogénesis de la epíffis, SNC y SNP. Las evidencias precedentes sumadas a las nuestras, indican que los genes *flh*, *mbl*, *zash1a*, *ngn1* son requeridos para definir los territorios epifisarios con competencia neuronal (Masai y cols., 1997; Cau y Wilson, 2003). Efectivamente, en el primordio de la epíffis *flh*, *zash1a* y *ngn1* inducen la expresión de los genes *deltaA*, *B* y *D*. Según observamos, el nivel de

mensajero para *delta* parece ser estabilizado mediante el mecanismo de inhibición lateral mediado por la vía Notch. Así lo muestra el aumento significativo en la expresión de *delta* en los mutantes *mib*.

Probablemente, en la epífisis la expresión de *deltaA*, *B* y *D* involucra un ciclo de mantención, que depende de factores transcripcionales bHLH y la vía Notch. Ciertamente, al inactivar la función de los genes *zash1a* (bHLH) o Notch pudimos inhibir o inducir respectivamente, la expresión de *deltaA*, *B* y *D*. Una interpretación de nuestros resultados es que Notch está bloqueando la transcripción de *delta* en las células epifisarias que expresan *zash1a*. Anteriormente, propusimos que *zash1a* es mediador de la competencia neuronal activando *delta* y que a su vez, Notch reprime la transcripción de *zash1a*. Así lo muestra la sobreexpresión de *zash1a* debida a la falta de función de Notch en *mib*. En concordancia, los embriones *mib* muestran expansión significativa en la expresión epifisaria de *delta*, acompañada de un aumento en la cantidad de neuronas (Fig. 33). Esto permite pensar que el sistema Notch/Delta, principal mecanismo de interacción célula-célula, podría ser el responsable de las interacciones que definen la neurogénesis en la epífisis.

En la neurogénesis de invertebrados y vertebrados se ha mostrado que *delta* es capaz de regular la expresión de sí mismo mediante un mecanismo de retroalimentación dependiente de Notch (Campuzano y Modolell, 1992; Bierkamp y Campos-Ortega, 1993; Dornseifer y cols., 1997; Haddon y cols., 1998; Takke y cols., 1999). Basándonos en esto, podemos sugerir que la inhibición lateral activa una señal represiva entre las células de la pineal, que

previene que dos precursores neuronales vecinos expresen niveles equivalentes de *delta*, impidiendo que se desarrollen como neuronas primarias al mismo tiempo. Este mecanismo involucraría un proceso competitivo entre las células vecinas que permitiría la selección neuronal. Según Collier y cols. (1996) podemos expresar esta relación de la siguiente manera. El nivel de expresión del mRNA para *delta* es inversamente proporcional a la actividad de Notch en la misma célula. Además, el nivel de expresión del ligando Delta determinaría la adopción de un destino celular, altos niveles de Delta permitirían la adopción de un destino neuronal y bajos niveles de Delta un destino hacia célula accesoria o glía (Collier y cols., 1996).

4.3. Notch es mediador de la inhibición lateral.

En *Drosophila*, la inhibición lateral genera una relación competitiva entre células adyacentes (Collier y cols., 1996; Monk, 1998). Esta operación permite explicar cómo pequeñas diferencias iniciales entre células vecinas son amplificadas mediante un mecanismo de retroalimentación positivo, prediciendo a la vez, un patrón mosaico para la expresión de *delta* (tablero de ajedrez). Por el contrario, en la epífisis la expresión de *delta* se produce entre células contiguas. En relación con esto, *flh* funciona como un gen de pre-patrón y define un primordio con competencia para formar neuronas (Masai y cols., 1997; Cau y Wilson, 2003), activando la expresión de genes proneurales como *zash1a*, *ngn1* y *neuroD* (Cau y Wilson, 2003). Es factible proponer que la expresión constante de *flh* en un grupo de células adyacentes permite la

acumulación de suficiente producto proneural (bHLH), como para superar la inhibición lateral transmitida por Notch entre células adyacentes (Fig. 34). Esta

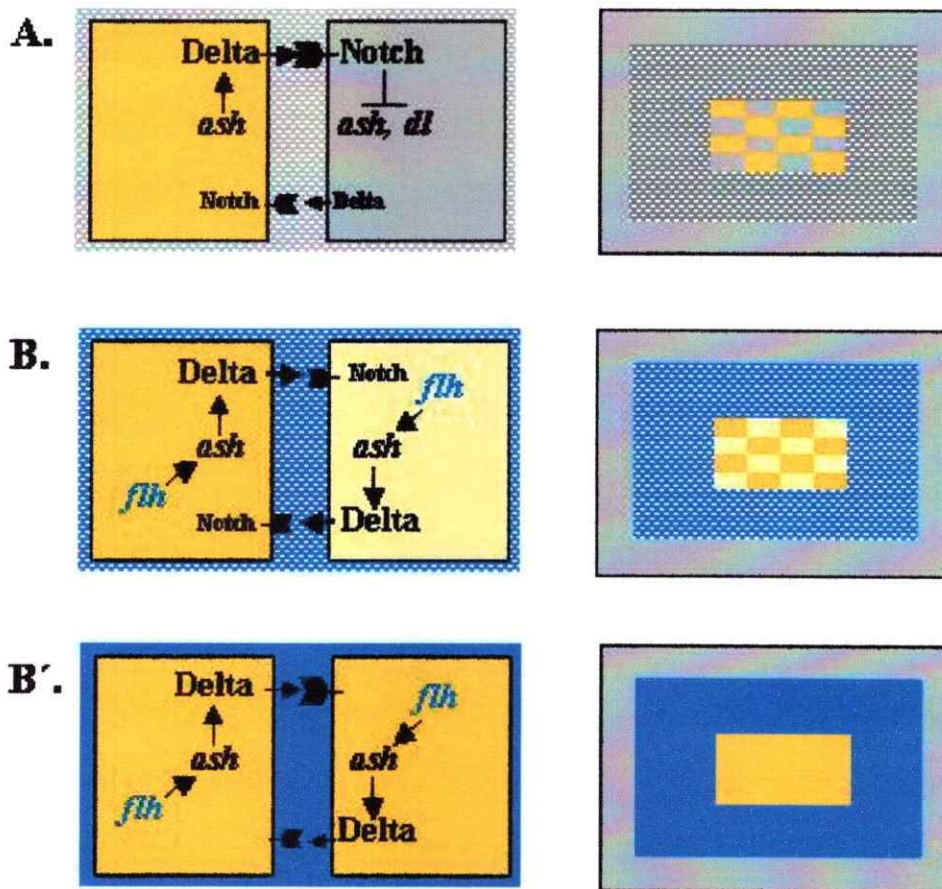


Fig. 34. Posible actividad de *flh* en la neurogénesis. (A) En ausencia de *flh* la inhibición lateral opera entre células vecinas. (B) En la epítesis al principio la *flh* activa la expresión de *ash1* y *delta*. *Delta* activa Notch en la célula vecina iniciando una serie de interacciones competitivas entre las células. (B'). La actividad de *flh* mantiene la expresión de *ash1* en un grupo de células adyacentes permitiendo superar la inhibitoria lateral mediada por Notch. Es probable que este mecanismo permita la especificación neuronal en la epítesis.

hipótesis sugiere que el papel principal del gen homeoproteína *flh* (en la neurogénesis de la epíffisis) es establecer los ciclos de mantención en la transcripción de los genes *zash1a* y *delta* entre células vecinas. Así, la señal *flh* mantendría la expresión de *zash1a*, este factor bHLH induciría por su parte la expresión de *delta*, la cual también sería mantenida por la actividad permanente de *flh*. De la misma manera a lo observado en la placa neural los genes proneurales y neurogénicos estarían encargados de controlar el número de neuronas. Por su parte, la activación territorial de *flh* sobre los genes proneurales y *delta* podría contrarrestar el efecto represivo de la señal Notch (Fig. 34).

Es necesario notar que la falta de función de Notch en el mutante *mib*, modifica de forma diferencial la expresión epifisaria a nivel de los RNA mensajeros para los genes *deltaA*, *D* y *B*, esto es, observamos una expansión más significativa en la expresión de mRNA para *deltaB*. La gran expresión epifisaria de *deltaB* en los embriones *mib*, puede indicar una respuesta diferencial de los genes *deltaA*, *D* y *B* frente a la inhibición lateral. En efecto, Haddon y cols. (1998) muestran que Delta B es el ligando de Notch más fuertemente regulado por la inhibición lateral a lo largo de la placa neural de los embriones (Haddon y cols., 1998). Por consiguiente y cotejando con los resultados de Haddon y cols, (1998), es factible postular que en la epíffisis la expresión del mRNA para *deltaB* es más susceptible a la inhibición lateral (mediada por Notch) comparada con la expresión de los mRNA para *deltaA* y *deltaD*.



4.4. Notch regula la producción neuronas y glías.

De las consideraciones anteriores es posible sugerir que la diferenciación de las neuronas sensoriales en la epífisis no depende de la interacción entre los genes proneurales y neurogénicos. En efecto, al sobre activar la vía Notch vemos que se producen menos neuronas de conexión y fotorreceptores. Si en la epífisis Notch participase en la diferenciación neuronal, se daría como primera condición que el aumento o la pérdida de actividad de la vía, produjera un cambio en la relación de fotorreceptores y neuronas de conexión. Sin embargo, en el mutante *mib* se produce un exceso de neuronas de los dos tipos. Por consiguiente, podemos sugerir que Notch controla la cantidad de neuronas primarias, pero no participaría en la diferenciación de las mismas.

Varias líneas de evidencia han propuesto que Notch promueve directamente el desarrollo de algunos tipos de glías (Tomita y cols., 2000; Vetter, 2001; Hae-Chule y Appel, 2003). Por ejemplo, en la retina de ratón la producción de glías radiales es fuertemente inducida río abajo de Notch (Bae y cols., 2000). En pez cebra, analizando la neurogénesis del mutante *mib*, Jiang y cols. (1996), sugieren que la vía Notch induce un aumento en la producción de glías en detrimento de las neuronas. Así lo confirmó el análisis de embriones transgénicos que sobreexpresan Notch activado en la retina de pez cebra (Scheer y cols., 2001). Ambas interpretaciones sugieren que las mismas células son las precursoras comunes de neuronas y glías (Jiang y cols., 1996; Scheer y cols., 2001). Al hilo conductor de estas evidencias, es posible sugerir que la vía Notch actúa al inicio de la neurogénesis seleccionando la cantidad de células

precursoras que darán origen a neuronas y glías. A favor de esta hipótesis nuestros análisis preliminares indican un descenso de la gliogénesis en *mib* (resultados no mostrados). Pero en estos análisis no pudimos descartar que dicho efecto fuera un fenómeno secundario, derivado del incremento en la apoptosis o necrosis celular de los embriones *mib*. Este punto puede ser resuelto en el futuro mediante la determinación de muerte celular, usando técnicas como Tunnel o medición de la replicación del DNA usando tinciones con Bromo-deoxi-uridina.

5. Mecanismos implicados en la diferenciación neuronal.

5.1. La diferenciación de fotorreceptores y neuronas de conexión.

En la neurogénesis de la epífisis aún hay varios aspectos que se desconocen respecto de la diferenciación hacia fotorreceptores y neuronas de conexión. Es factible, que junto con la inhibición lateral, otros mecanismos puedan controlar la especificación de los distintos tipos de neuronas que constituyen la pineal. En *Drosophila*, pollo y ratón factores como Prospero, Numb y Lunatic-Fringe, actúan como moduladores de la función de Notch. Algunas de estas proteínas son expresadas en el desarrollo de la epífisis (Glasgow y Tomarev, 1998; Appel y cols., 2003). En pollo, la proteína Numb funciona como un antagonista de Notch. Inicialmente, se expresa en un grupo de células indiferenciadas y más tarde se localiza exclusivamente en las células seleccionadas para formar neuronas (Eddison y cols., 2000). En el pez cebra el homólogo vertebrado de *prospero*, *prox1* participa como cofactor de *numb* y se

expresa en varias etapas relevantes de la neurogénesis (Glasgow y cols., 1998). Tanto *prox1* como *numb*, están asociados con las divisiones celulares asimétricas que actúan concertadamente junto con la inhibición lateral, en la diferenciación neuronal dentro del SNC y SNP (Campos-Ortega, 1997). Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado la expresión de *prox1* y *numb* en la epífisis.

Los datos que se disponen hasta ahora permiten descartar y/o postular mecanismos para la diferenciación neuronal en la epífisis. En este órgano, los genes proneurales podrían actuar de manera análoga a lo observado en *Xenopus*, ratón y pollo. En estas especies, los genes *ngn* (*ngnr-1*, *ngn1*, *ngn2*) y *Ac-sc* (*xash3*, *mash1*, *cash4*) forman una jerarquía regulatoria, que determina la diferenciación de neuronas sensoriales y motoras en el SNC y SNP (Ma y cols., 1996; Fode y cols., 1998; Ma y cols., 1998; Casarosa y cols., 1999; Perron y cols., 1999; Cau y cols., 2002). Sin embargo, en la neurogénesis de la epífisis Cau y Wilson (2003) y nosotros observamos que los genes proneurales *zash1a* y *ngn1* no presentan regulaciones cruzadas. Adicionalmente, mostramos que la diferenciación neuronal es independiente de la función de *zash1a* y *ngn1*.

Una interpretación alternativa, es que la aparición de un tipo de neurona requiera la formación previa del otro tipo de neurona. En efecto, nuestros ensayos inmunocitoquímicos muestran que las neuronas de conexión aparecen el primer día de desarrollo, mientras los fotorreceptores sólo se detectan a partir del segundo día. Para analizar el papel de los linajes celulares en la diferenciación, en el futuro se podrían realizar ablaciones genéticas o

mecánicas que eliminen células de modo selectivo. Por otra parte, la diferenciación neuronal podría depender de genes que solo se expresan en las neuronas de conexión como, *pax6* (Masai y cols., 1997), *lim3* (Glasgow y cols., 1997), *one-cut* (Nguyen y cols., 2000), o genes exclusivos de los fotorreceptores como, *Crx* (Liu y cols., 2001), *otx2* (Nishida y cols., 2003), *otx5* (Gamse y cols., 2002) y *exorodopsina* (Mano y cols., 1999). Indicio de ello es que, *otx2* regula los niveles de expresión del factor transcripcional *Crx* (Nishida y cols., 2003). A su vez, *otx2* y *Crx* inducen directamente el promotor de *exorodopsina*, determinando la diferenciación hacia fotorreceptores.

Es posible representar la neurogénesis en la epífisis de la siguiente manera: el límite anterior de *flh* compite con la actividad represora de *mb1* desde la región anterior, definiendo el límite anterior de la expresión de *flh* y así la posición de la epífisis en el epitálamo (Masai y cols., 1997; Heisenberg y cols., 2001). El límite dorsal para la expresión de *flh* queda definido por la actividad de *bmp7*, en tanto el límite ventral es mantenido por la expresión de *shh* (Nguyen y cols., 1999). Luego, *flh* mantiene la expresión de *zash1a* y *ngn1* en los precursores neuronales de la epífisis (modelo en Fig. 35). Por su parte, *zash1a* y *ngn1* inducen la expresión de *delta* y *neuroD* (Cau y Wilson., 2003). Como hemos visto la vía Notch y Delta participa controlando la cantidad de neuronas formadas en la epífisis. En esta vesícula Notch se expresa de forma homogénea y su activación puede depender de la localización de sus ligandos. Resultados previos muestran que la sobre activación de Notch disminuye en forma general la expresión de los genes proneurales y *delta*, activando

gliogénesis en detrimento de la neurogénesis (Blader y cols., 1997; Takke y cols., 1999; Scheer y cols., 2001). Por otra parte, en los embriones *mib* nosotros encontramos un marcado aumento en la expresión de los genes proneurales y *delta* en la epífisis, esto como consecuencia de la interferencia en la señal Notch. La suma de estos resultados permite postular que, en la pineal el balance entre neurogénesis y gliogénesis podría depender de los niveles de actividad transduccional de vía Notch. Efectivamente, encontramos que al aumentar la actividad de la vía Notch se producen menos neuronas de conexión y fotorreceptores (Tuac, Zpr1). Adicionalmente, la diferenciación neuronal en la epífisis podría ser parte explicada por la convergencia de genes que actúan más tardiamente que la vía Notch como son: *Onecut*, *pax6*, *otx2*, *otx5* y *Crx* entre otros (Fig. 35).

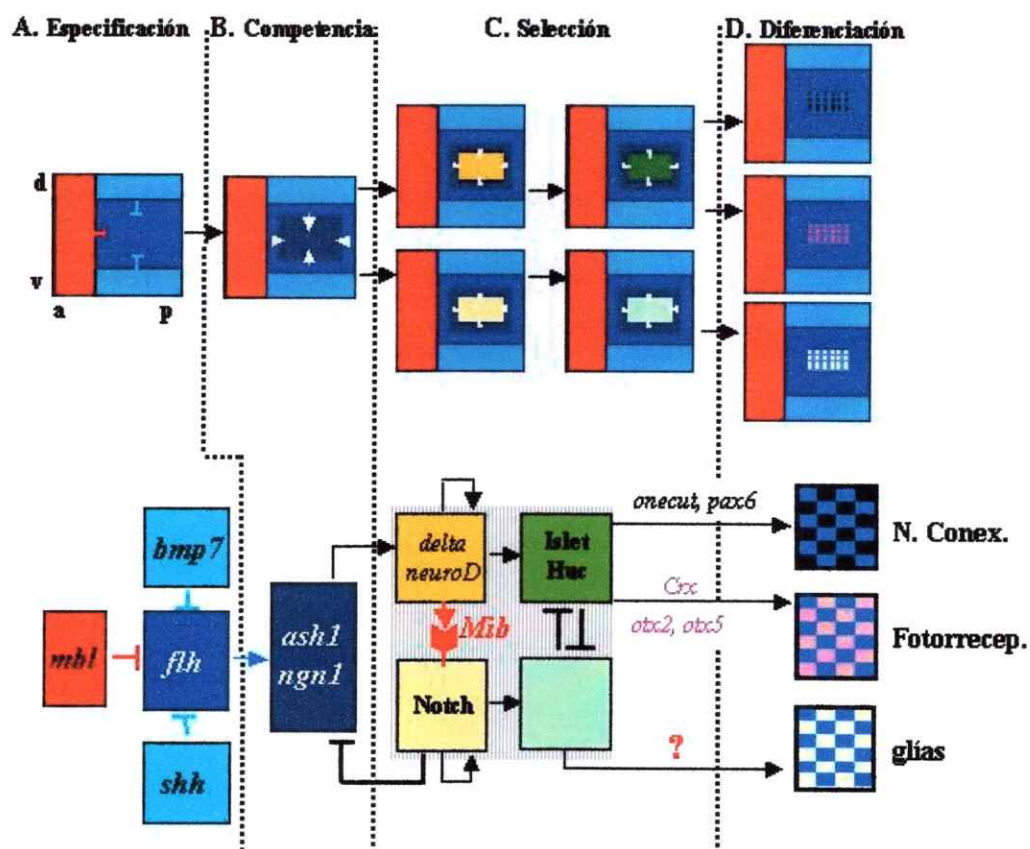


Fig.35. Interacciones genéticas durante la neurogénesis de la epifisis. Al principio *flh* conecta la información posicional con la neurogénesis activando la expresión de los genes proneurales *zash1a* y *ngn1*. Ambos genes activan *delta* en los precursores neuronales. Delta activa Notch en las células vecinas. Las células que expresan altos niveles de *delta* son seleccionadas para formar neuronas primarias (Islet1 y Huc). Las células que expresan bajos niveles de *delta* reprimen la neurogénesis a favor de la formación glías. La proteína *Mib* es indispensable en la transducción de la señal vía Notch. En efecto, la pérdida de la función *mib* determina la formación de neuronas supernumerarias. Más tarde las neuronas primarias se diferencian hacia neuronas de conexión (Tuac) y fotorreceptores (Fret43). Probablemente la diferenciación neuronal depende de la acción concertada de genes como, *otx2*, *otx5*, *pax6*, *one-cut*, entre otros.

6. Mecanismos involucrados en la neurogénesis de la línea lateral posterior (llp).

6.1. Papel de *ngn1* en la generación de ganglios sensoriales.

El primordio de la línea lateral posterior (llp) se localiza en la superficie del neuroéctodermo, esta formado por una sola capa de células asentadas sobre el ganglio de la llp, el cual inerva los neuromastos durante la migración. Hasta el momento, no se conocen los mecanismos moleculares implicados en neurogénesis y diferenciación de las neuronas, cilios, y glías, que forman la llp.

La llp, al igual que otros órganos sensoriales, deriva de placodas ectodérmicas (revisión Metcalfe., 1989). En el caso de pez cebra, se ha mostrado que *ngn1* es esencial en el desarrollo de los ganglios trigémino, ótico y llp (Andermann y cols., 2002; Cornell y Eisen, 2002). Alternativamente, otras especies emplean más de un gen para el mismo proceso, por ejemplo, en ratón y *Xenopus* *ngn1* participa en la formación del ganglio proximal, en tanto *ngn2* participa en la neurogénesis del ganglio epibraquial (Fode y cols., 1998; Ma y cols., 1998; Schlosser y Northcutt, 2000). En pez cebra observamos que la pérdida de la función de *ngn1*, elimina todos los ganglios sensoriales. Sin embargo, comprobamos que los neuromastos se forman y diferencian normalmente en ausencia de *ngn1*. Por consiguiente, *ngn1* no interviene en la neurogénesis de los neuromastos. Efectivamente, Anderman y cols. (2002) llegan a una conclusión similar usando la misma metodología.

6.2. Papel de *neuroD* en la diferenciación de la IIP.

Nuestros resultados muestran que la transcripción de *neuroD* es previa al comienzo de la migración de la IIP. Además, hemos utilizado oligos morfolidos para interferir con la función de *neuroD* y analizar de este modo el papel de *neuroD* en la neurogénesis de la IIP. El principal efecto de bloquear *neuroD* es la aparición de neuromastos indiferenciados en la IIP, esto sugiere que el factor transcripcional bHLH *neuroD* es un componente indispensable para la diferenciación de los neuromastos en la IIP.

A semejanza de la epífisis, en la placoda y en el ganglio de la IIP la expresión de los genes proneurales (*ngn1* y *zath1*) precede a la expresión de *neuroD*. Considerando otros sistemas donde *ngn1* regula *neuroD* (Blader y cols., 1997; Korzh y cols., 1998; Cau y Wilson, 2003), podemos sugerir que *ngn1* y *zath1* funcionan río arriba de *neuroD*, controlando la neurogénesis de neuronas del ganglio de la IIP.

Por lo antes dicho, podemos concluir que *ngn1* no participa en el desarrollo de los neuromastos (Andermann y cols., 2002). Además, encontramos que *neuroD* participa exclusivamente en la diferenciación de los mismos ya que, en embriones tratados con el morfolino para *neuroD*, los neuromastos se depositan normalmente (resultados no mostrados).

6.3. Expresión de *delta* en la neurogénesis de la llp.

Las evidencias previas muestran que la migración de los neuromastos puede ser monitoreada en el tiempo detectando la expresión de *notch3*. Además, indican que la restricción espacial en la transcripción de los genes *zath1* y *delta* revela una progresión en la neurogénesis de la llp (Itoh y Chitnis, 2001). Como en la epífisis, en la llp los genes proneurales y neurogénicos son expresados en un patrón que sugiere la participación de la inhibición lateral en el proceso de selección de los neuromastos. En efecto, Itoh y cols. (2001) muestran que en la llp la expresión de *zath1* y *delta* es inversamente proporcional al nivel de expresión para *notch3*. Esto concuerda con el aumento en el número de cilios producidos en el mutante de la vía Notch, *mib* (Itoh y Chitnis, 2001).

En la epífisis y la llp de los embriones *mib*, hemos mostrado una expansión de la zona de competencia neuronal, indicativo de un aumento en la probabilidad de neurogénesis. Sorprendentemente, en *mib* no detectamos neuromastos funcionales con el método de tinción vital DASPEI. Sin embargo en *mib*, la ausencia de neuromastos puede deberse entre otras causas, al aumento de la muerte celular o apoptosis.

Basándonos en nuestros resultados podemos concluir la conservación de varios eventos genéticos entre la neurogénesis de la epífisis y de la llp. La restricción temporal en la expresión de los genes proneurales y *delta* es similar en el desarrollo de ambas estructuras. Los niveles de expresión de *ngn1*, *zash1a*, *zath1* y *delta*, pueden ser modificados variando la actividad de la vía

Notch. En efecto, en los embriones mutantes de Notch, se produce un aumento en la expresión del gen proneural *neuroD* y *delta*, acompañado de un incremento en la cantidad de neuronas formadas.

5.4. Notch regula *neuroD* en la llp.

Nuestros experimentos muestran que, la sobreexpresión de un constitutivo activado de Notch (NICD) produce una fuerte inhibición en la expresión de *neuroD* correspondiente a los ganglios sensoriales y en consecuencia al ganglio de la llp. Este efecto, probablemente se debe a la activación del represor transcripcional Her en los embriones tratados NICD (Takke y cols., 1999). Por el contrario, mostramos que la inactivación de la vía Notch en *mib*, produce expresión ectópica de *neuroD*. Los efectos observados sobre la expresión de *neuroD*, al aumentar o disminuir la actividad de vía Notch, son posiblemente el resultado de la regulación que ejerce Notch sobre los genes proneurales tempranos como *ngn1* o *zath1*. Sin embargo, este punto debe ser demostrado en el futuro.

Durante el desarrollo de pez cebra Notch se expresa en forma homogénea en las zonas neurogénicas y se sabe que su activación depende de la localización de los ligandos de la vía (Haddon y cols., 1998; Appel y Eisen, 1998). Hemos mostrado que *deltaA* y *B* presentan un patrón dinámico de expresión localizándose en el primordio de la llp. Por su parte *neuroD* se expresa en las mismas células, pero en un territorio más amplio. Esto nos lleva a analizar la expresión de *deltaA*, *deltaB* y *neuroD*, en la llp de los embriones

mutantes de Notch (*mib*). Efectivamente, mostramos que la disminución en la actividad Notch permite una sobreexpresión de los genes *deltaB* y *NeuroD*. El análisis detallado de la expresión de *deltaA* y *deltaB* en *mib*, muestra una sobreexpresión más marcada en el caso de *deltaB*. Lo cual indica que ambos genes son regulados diferencialmente por la inhibición lateral. De este modo, es factible sugerir que tanto en la epífisis como en la llp, el gen *delta* que presenta mayor sensibilidad por la inhibición lateral es *deltaB*.

CONCLUSIONES

1. *zash1a* y *ngn1* participan en la neurogénesis de la epíffisis.

1.1. *zash1a* regula la competencia neuronal activando *delta* (*deltaA*, *deltaB*, *deltaD*) en los precursores neuronales.

1.2. *zash* (*zash1a*, *zash1b*) autorregula su expresión mediante un mecanismo de retroalimentación negativa.

1.3. La expresión espacio/temporal de los genes *zash1a*, *ngn1* y *neuroD* revela una jerarquía reguladora en la neurogénesis de la pineal.

1.4. *zash1a* y *ngn1* son necesarios para la formación de las neuronas primarias, pero no participan en la diferenciación hacia fotorreceptores y neuronas de conexión.

2. Notch regula la selección de precursores neuronales en la epíffisis.

2.1. Notch regula la expresión de los genes proneurales *zash1a*, *ngn1* y *NeuroD*.

2.2. Notch regula el número de neuronas formadas. En efecto, en *mib* la interferencia de la vía Notch determina la aparición de neuronas supernumerarias.

2.3. Notch no participa en la diferenciación neuronal de la epíffisis.

3. Un mecanismo similar opera en la neurogénesis de la epífisis y de la línea lateral posterior (llp).

3.1. La neurogénesis de la epífisis y la llp presentan las siguientes características comunes. 1. Expresión de genes proneurales (*neuroD*) y neurogénicos (*delta*),

3.2. En el mutante *mib*, la interferencia de la vía Notch determina el aumento en la expresión de *neuroD* y *delta* tanto en la llp como en la epífisis.

PERSPECTIVAS

En la neurogénesis existen varias interrogantes que dicen relación con los mecanismos moleculares que coordinan el proceso de diferenciación entre células adyacentes. Aún se desconoce en forma completa la sucesión de eventos que determina que las células madres se diferencien, pero si se sabe que existe una relación entre el destino neuronal y la inducción genética durante el desarrollo, la cual conlleva a la migración celular y la interacción entre células adyacentes. Ya en tiempos tempranos de la embriogénesis, previo a la divergencia de los distintos tipos celulares, se produce interacción entre las células mediada por los genes *notch/delta*. El hecho de que los genes proneurales y neurogénicos participan en las primeras etapas de la neurogénesis en la epífisis y la línea lateral posterior, permite pensar en una conservación funcional de estos genes entre vertebrados y *Drosophila*. Es interesante notar que, en el pez cebra la epífisis parece poseer características de organizador. En este dominio localizado en el techo del diencefalo se expresan moléculas secretadas como Wnt y BMP. Por otra parte, los genes *otx2*, *otx5*, *oncut*, *pax6*, se expresan previo a la diferenciación en los precursores de fotorreceptores y neuronas de conexión. Sería interesante estudiar el papel de estos genes en el establecimiento de las vías de diferenciación neuronal en la epífisis, en particular la interacción de Wnt y BMP con estos genes y en paralelo investigar la relación entre los genes *zash1a*,

ngn1, *notch/delta* como un elemento común en la definición de la cantidad de neuronas formadas dentro del sistema nervioso embrionario.

Otros aspectos importantes de resolver en el futuro son: la participación de elementos reguladores de la vía Notch como Lunatic-fringe, Numb y Prospero en la selección neuronal y hasta que punto los diferentes genes delta participan de manera diferencial en la neurogénesis de la epífisis.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Allende, M.L. and. Weinberg, E.S. (1994). The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev. Biol.* **166**, 509-530.
2. Andermann, P., Ungos, J., Raible, D.W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev. Biol.* **251**, 45-58.
3. Appel, B. And. Eisen, J. S. (1998). Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by *Delta* function. *Development* **125**, 371-380.
4. Appel, B., Marasco, B., McClung, L. E., Latimer, A. J. (2003). Lunatic fringe regulates Delta-Notch induction of hypochord in zebrafish. *Dev Dyn.* **228**, 281-286.
5. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
6. Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M., Kageyama, R. (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* **127**, 2933-2943.
7. Balak, K. J., Corwin, J. T., Jones, J. E. (1990). Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *J Neurosci.* **10**, 2502-2512.

8. Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., Wilson, S. W. (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development*. **126**, 4977-4987.
9. Bierkamp, C. And. Campos-Ortega, J. A. (1993). A zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Notch* and its pattern of transcription during early embryogenesis. *Mech. Dev.***43**, 87-100.
10. Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Strahle, U. (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-4569.
11. Brunet, J. And Ghysen, A. (1999) Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. *BioEssays* **21**, 313-318.
12. Cai, L., Morrow, E. M., Cepko, C. L. (2000). Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* **127**, 3021-3030.
13. Campos-Ortega, J. A. (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* **10**, 1305-1327.
14. Campos-Ortega, J. A. (1997). Asymmetric division: dynastic intricacies of neuroblast division. *Curr Biol.* **7**, R726-728.
15. Campuzano, S. And. Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet.* **8**, 202-208.
16. Casarosa, S., Fode, C. and. Guillemot, F. (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-534.

17. Cau, E., Casarosa, S. and Guillemot, F. (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**, 1871-1880.
18. Cau, E. and Wilson, S. E. (2003). Ash1a and Neurogenin1 function downstream of Floating head to regulate epiphyseal neurogenesis. *Development* **130**, 2455-2466.
19. Chitnis, A. And. Kintner, C. (1996). Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* **122**, 2295-2301.
20. Collier, J. R., Monk, N. A. M., Maini, P. K. and Lewis, J. H. (1996) Pattern formation by lateral inhibition with feedback: A mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* **183**, 429-446.
21. Cornell, R.A. and Eisen, J.S. (2002). Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function. *Development* **129**, 2639-2648.
22. Cubas, P. et al. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**, 996-1008.
23. Culi, J. And. Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev.* **12**, 2036-2047.

24. Davis, R. L. And Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342-8357.
25. Dornseifer, P., Takke, C. and Campos-Ortega, J. A. (1997). Overexpression of a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* perturbs differentiation of primary neurons and somite development. *Mech. Dev.* **63**, 159-171.
26. Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L., Vicent, A. (1998). X $Coe2$, a transcription factor of the *Col/Olf-1/EBF* family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **8**, 199-209.
27. Eddison, M., Le Roux, I., Lewis, J. (2000). Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 11692-11699.
28. Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M., Yamada, T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. (1992). *Science.* **256**, 1555-60.
29. Farah, M. H., Olson, J. M., Suric, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**, 693-702.
30. Ferreira, B., Kintner, C., Zimmerman, K., Anderson, D., Harris, D. H. (1994). XASH genes promote neurogenesis in *Xenopus* embryos. *Development* **120**, 3649-3655.

31. Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., Guillemot, F. (1998). The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* **20**, 483-494.
32. Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J., Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* **14**, 67-80.
33. Gamse, J. T., Shen, Y. C., Thisse, C., Thisse, B., Raymond, P. A., Halpern, M. E. And Liang, J. O. (2002). Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat. Genet.* **30**, 117-121.
34. Garcia-Bellido, A. (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **91**, 491-520.
35. Ghysen, A. And Dambly-Chaudiere, C. (1988) From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev.* **2**, 495-501.
36. Ghysen, A. And Dambly-Chaudiere, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* **14**, 67-73.
37. Glasgow, E., Karavanov, A. A., Dawid, I. B. (1997). Neuronal and neuroendocrine expression of lim3, a LIM class homeobox gene, is altered in mutant zebrafish with axial signalling defects. *Dev Biol.* **192**, 405-419.
38. Glasgow, E., Tomarev, S. I. (1998). Restricted expression of the homeobox gene prox 1 in developing zebrafish. *Mech Dev.* **76**, 175-178.

39. Gomez -Skarmeta, J. L. and Modolell, J. (1996). araucan and caupolican provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **10**, 2935-2945.
40. Gompel, N., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A. (2001a). Neuronal differences prefigure somatotopy in the zebrafish lateral line. *Development.* **128**, 387-393.
41. Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A. (2001b). Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech Dev.* **105**, 69-77.
42. Gonzalez, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., Campuzano, S. (1989). Molecular analysis of the asense gene, a member of the achaete-scute complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* **8**, 3553-3562.
43. Gradwohl, G., Fode, C. & Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* **180**, 227-241.
44. Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J., Joiner, A. L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell.* **75**, 463-476.
45. Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. And Lewis, J. (1998). Multiple *Delta* genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development.* **125**, 359-370.

46. Hae-Chul, P. And. Appel, B. (2003). Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development*. **130**, 3747-3755.
47. Hans, S. and Campos-Ortega, J. A. (2002). On the organisation of the regulatory region of the zebrafish deltaD gene. *Development*. **129**, 4773-4784.
48. Heasman, J. (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense?. *Dev Biol*. **243**, 209-14.
49. Heisenberg, C.P. Brand, M. Jiang, Y.J. Warga, R.M. Beuchle, D. van Eeden, F.J. Furutani-Seiki, M. Granato, M. Haffter, P. Hammerschmidt, M. Kane, D.A. Kelsh, R.N. Mullins MC, Odenthal J, Nusslein-Volhard, C. (1996). Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. **123**, 191-203.
50. Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R. et al. (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev*. **15**, 1427-1434.
51. Henrique, D., Tyler, D., Kintner, C., Heath, J. K., Lewis, J. H., Ish-Horowicz, D., Storey, K. G. (1997). cash4, a novel achaete-scute homolog induced by Hensen's node during generation of the posterior nervous system. *Genes Dev*. **11**, 603-615.
52. Hinz, U., Giebel, B., Campos-Ortega, J. A. (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell*. **76**, 77-87.

53. Houart, C. Westerfield, M. Wilson, S.W. (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature*. **391**, 788-792.
54. Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E., Kageyama, R. (2002). Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development*. **129**, 831-842.
55. Itoh, M. and Chitnis, A. B. (2001). Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech Dev*. **102**, 263-266.
56. Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wrigth, G. J., Ariza-McNaughton, L. et al. (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell*. **4**, 67-82.
57. Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1994). Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu. Rev. Genet.* **28**, 373-393.
58. Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell*. **73**, 1307-1321.
59. Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Beuche, D., Furutani-Seki, M., Kelsh, R. N., Warga, R. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M et al. (1996). Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. **123**, 205-216.

60. Jiang, Y., Aerne, B. L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D and J Lewis. (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature*. **408**, 475-479.
61. Jimenez, F. And. Modolell, J. (1993). Neural fate specification in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 626-632.
62. Kessaris, N., Pringle, N., Richardson, W. D. (2001). Ventral neurogenesis and the neuron-glia switch. *Neuron*. **31**, 677-680.
63. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* **203**, 253-310.
64. Kolm, P. J. and Sive, H. L. (1995). Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* **171**, 267-272.
65. Korf, B. M. Rollang and Korf, H. W. (1989). Ontogenetic development of S-antigen and rod-opsin immunoreactions in retinal and pineal photoreceptors of *Xenopus laevis* in relation to the onset of melatonin-dependent color-change mechanisms. *Cell Tissue Res.* **258**, 319-329.
66. Korf, H. W. (1994). The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenic considerations. (1994). *Ann N Y Acad Sci.* **719**, 13-42.
67. Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z. (1998). Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.* **13**, 92-104.

83. Modolell, J (1997). Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **4**, 285-296.
84. Molven, A., Njølstad, P.R., and Fjose, A. (1991). Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish *wnt-1* (*int-1*) gene. *EMBO. J.* **10**, 799-807.
85. Monk, N. A. (1998). Restricted-range gradients and travelling fronts in a model of juxtacrine cell relay. *Bull. Math. Biol.* **60**, 901-918.
86. Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E., Cepko, C. L. (1999). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development.* **126**, 23-36.
87. Mueller, T. And. Wullimann, M. F. (2002a). BrdU-, neuroD (*nrd*)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. *Mech. Dev.* **117**, 123-135.
88. Mueller, T. And. Wullimann, M. F. (2002b). Expression domains of neuroD (*nrd*) in the early postembryonic zebrafish brain. *Brain Res. Bull.* **57**, 377-379.
89. Nasevicius, A., Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet.* **26**, 216-220.
90. Nguyen, V.H. Schmid, B. Trout, J. Connors, S.A. Ekker, M. Mullins, M.C. (1998). Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a *bmp2/swirl* pathway of genes. *Dev Biol.* **199**, 93-110.
91. Nguyen, D. N., Rohrbaugh, M. and Lai, Z. (2000). The *Drosophila* homolog of *f Onecut* homeodomain proteins is a neural-specific

- transcriptional activator with a potential role in regulating neural differentiation. *Mech. Dev.* **97**, 57-72.
92. Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, S., Furukawa, T. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci.* **6**, 1255-1263.
93. Nolo, R., Abbott, L. A., Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell.* **102**, 349-362.
94. Perron, M., Opdecamp, K., Butter, K., Harris, W. A., Bellefroid, E. J. (1999). X-ngnr-1 and Xath3 promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **96**, 14996-15001.
95. Rollag, M. D. (1988). Response of amphibian melanophores to melatonin. *Pineal Res. Rev.* **6**: 67-93.
96. Saito, T., Sawamoto, K., Okano, H., Anderson, D. J. and Mikoshiba, K. Wilson, S. W. and Rubenstein, J. L. (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron.* **28**, 641-651.
97. Sapede, D., Gompel, N., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A. (2002). Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line. *Development.* **129**, 605-15.
98. Scheer, N., Groth, A., Hans, S., Campos-Ortega. (2001). An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development.* **128**, 1099-107.

99. Schlosser, G., and Northcutt, R. G. (2000). Development of neuro-genic placodes in *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* **418**, 121–146.
100. Schwab, M. H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F. J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M. J., Nave, K. A. (2000). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/NeuroD) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 3714-3724.
101. Skeath, J. B. and Doe, C. Q. (1996). The achaete-scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the *Drosophila* CNS. *Curr. Biol.* **6**, 1146-1152.
102. Stone, L. S. (1933). The development of lateral-line sense organs in amphibians observed in living and vital-stained preparations. *J. Comp. Neurobiol.* **57**, 507-540.
103. Sun, Y., Jan, L. Y. And. Jan, Y. N. (1998). Transcriptional regulation of atonal during development of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Development.* **125**, 3731-3740.
104. Takke, C., Dornseifer, P., Weizsäcker, E. V and Campos-Ortega, J. A. (1999). her4, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)*, is a target of NOTCH signalling. *Development.* **126**, 1811-1821.
105. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature.* **414**, 112-117.
106. Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal

- versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J.* **19**, 5460-5472.
107. Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A., Posakony, J. W. (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae. *Genes Dev.* **6**, 2592-2605.
108. Vetter, M. A. (2001). Turn of the helix: preventing the glial fate. *Neuron.* **29**, 559-562.
109. Villares, R. And. Cabrera, C. V. (1987). The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell.* **50**, 415-424.
110. Wilson, S. W. and Easter, S. S. Jr. (1991a). Stereotyped pathway selection by growth cones of early epiphyseal neurons in the embryonic zebrafish. *Development.* **112**, 723-746.
111. Wilson, S. W. and Easter, S. S. Jr. (1991b). A pioneering growth cone in the embryonic zebrafish brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2293-2296.
112. Zhou, Q., Choi, G., Anderson, D. J. (2001). The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2.