

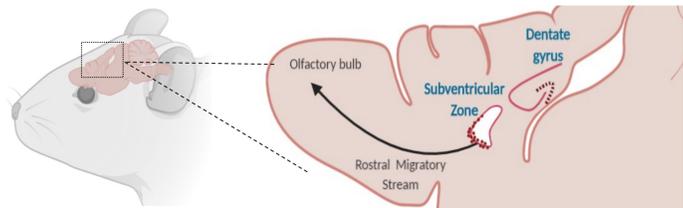
ESTUDIO DEL PAPEL DE CDH2 EN LA REGULACIÓN DE LA QUIESCENCIA DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES POSTNATALES

Mateos-Martínez CM¹, Mateos-White I¹ and Gil-Sanz C¹

¹Instituto Universitario de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED). Universitat de València, Departamento de Biología Celular, C./ Dr Moliner, 46100 Burjassot, España.

INTRODUCCIÓN

La **neurogénesis adulta** es el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales a partir de precursores neurales adultos (células madre neurales y progenitores) y ocurre a lo largo de la vida solamente en dos regiones restringidas del cerebro adulto en mamíferos: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. En concreto, en este trabajo se estudia la SVZ de los ventrículos laterales. Las células madre neurales (NSCs) que se localizan en ese nicho están pre-especificadas desde estadios embrionarios tempranos pero permanecen quiescentes hasta que les ocurra una reactivación postnatal en la que se originan diferentes tipos de interneuronas que migran a través de la ruta migratoria rostral (RMS) hasta llegar al bulbo olfatorio (OB)¹.



Uno de los mecanismos que regulan la neurogénesis está relacionado con las moléculas de adhesión célula-célula (CAM) entre las que destacan las **cadherinas** (Cdh), proteínas transmembrana dependientes de Ca²⁺. Durante la corticogénesis, se ha descrito que la inactivación de Cdh2 al inicio de la neurogénesis está ligada a una malformación severa que incluye la formación de la “doble corteza”, disrupción de uniones adherentes entre NSCs y mucha proliferación de estas NSCs corticales². Además, se ha visto que la inactivación de Cdh2 utilizando un ratón diferente que contenga la recombinasa Cre activa desde E13,5 produce una desarticulación de la capa endimaria y una hiperplasia de la SVZ debida a una mayor proliferación de las NSCs, sugiriendo que la adhesión mediada por Cdh2 es necesaria para el mantenimiento de la quiescencia de las NSCs³.

Por tanto, para intentar esclarecer el papel de Cdh2 regulando la quiescencia de estas NSCs, en este trabajo se propone inactivar Cdh2 únicamente de las NSCs quiescentes (qNSCs) durante el desarrollo postnatal utilizando una estrategia de electroporación *ex utero* inducible por tamoxifeno en ratones con Cdh2 floxeado cruzados con ratones reporteros de CRE con la finalidad de poder observar el linaje de estas qNSCs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

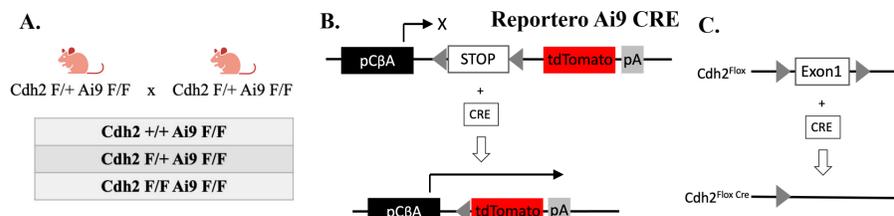


Figura 1. (A) Se cruzaron ratones con la secuencia de Cdh2 floxeada con ratones reporteros de CRE (Ai9 F/F) para obtener en la misma camada descendencia Cdh2 F/F;Ai9, Cdh2 F/+;Ai9 o Cdh2 +/-;Ai9. (B) El ratón reportero de Cre Ai9 presenta secuencias loxP flanqueando un cassette STOP que previene la expresión de la proteína fluorescente roja (tdTomato). Los ratones Ai9 expresan tdTomato fluorescente cuando se produce la recombinación mediada por Cre. (C) Esquema del *knockout* condicional de los ratones Cdh2 F/F. La recombinación mediada por Cre interrumpe la expresión de Cdh2 debido a la escisión de un exón crítico (Exon1).

2. Electroporación *ex utero*

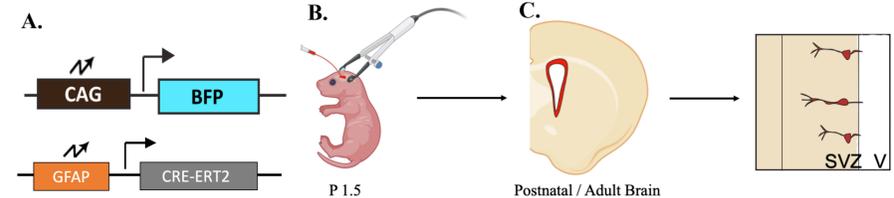


Figura 2. (A) Con el objetivo de visualizar las células de la SVZ se co-electroporan dos plásmidos no integrativos: uno que contiene el promotor general CAG (conduciendo la expresión de BFP) y otro promotor específico de NSC, GFAP, que expresa la forma inducible por tamoxifeno de la recombinasa CRE: CRE-ERT2. (B) Esquema de la electroporación *ex utero*: los vectores de expresión que contienen el DNA de interés se introducen en un ventrículo lateral del ratón en el día postnatal 1 (P 1,5) y un pulso eléctrico permite entrar al DNA en las células en contacto con el ventrículo. (C) Los cerebros de los animales electroporados se analizarán a edades postnatales (perfusión en P40). Además, debido a que se utilizan plásmidos no integrativos, la fluorescencia es solo visible en células con poca o nula capacidad de división después de la electroporación, incluyendo las células quiescentes.

3. Procesamiento histológico y análisis

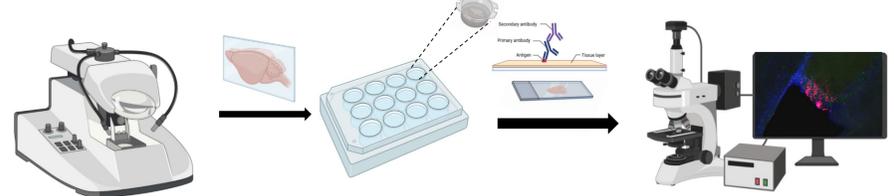


Figura 3. Tras la disección de los cerebros, se obtuvieron secciones sagitales con un vibratomo para realizar análisis histológicos e inmunofluorescentes utilizando microscopía confocal.

RESULTADOS

4. Papel de Cdh2 en la regulación de la activación postnatal de las qNSCs

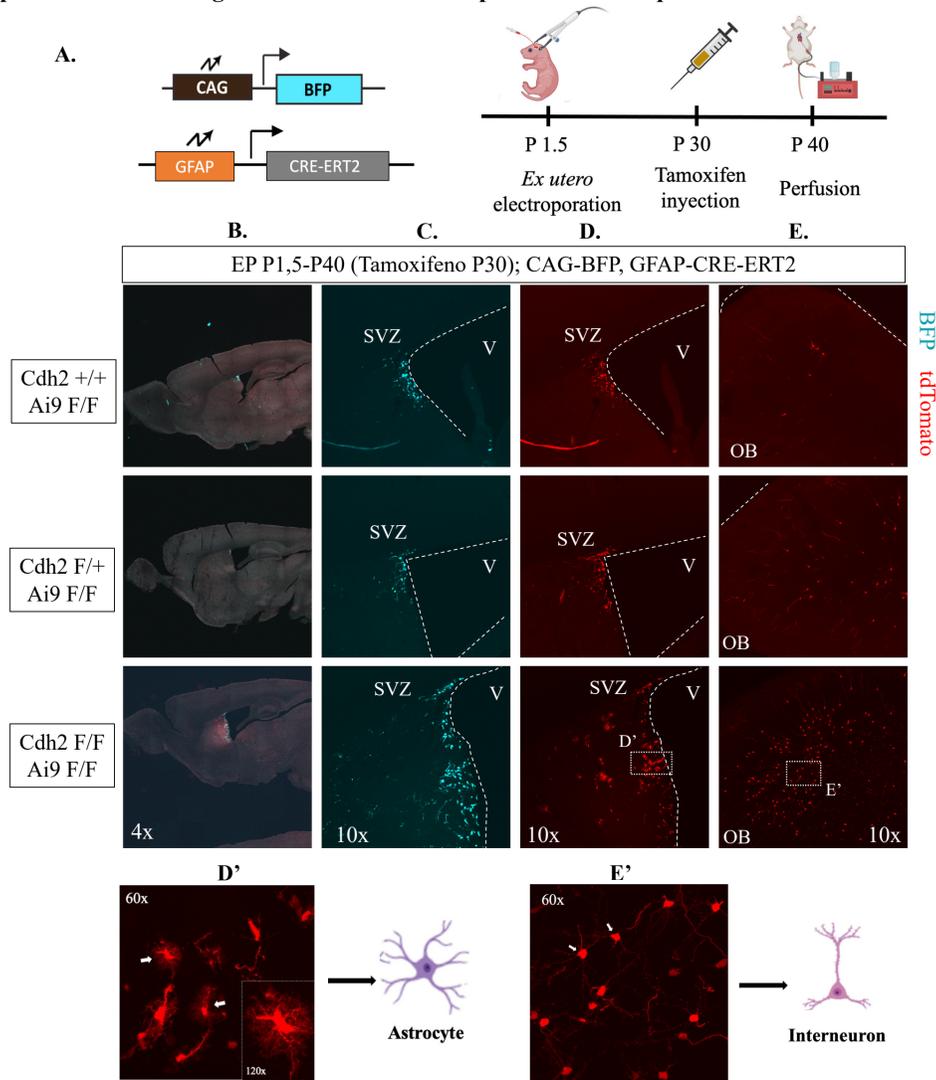


Figure 4. (A) Los ratones reporteros Cdh2 Ai9 CRE fueron electroporados en P1,5 con dos plásmidos no integrativos: CAG-BFP y GFAP-CRE-ERT2. Esta estrategia permite la visualización en azul de las qNSCs e induce la recombinación de CRE tras la inyección de tamoxifeno (a P30), lo que provoca la expresión de tdTomato y la inactivación de Cdh2 en las qNSCs y su descendencia, de acuerdo con la actividad del promotor GFAP. (B) Visión general de las secciones coronales cerebrales de los ratones de los diferentes genotipos (Cdh2F/Ai9; Cdh2F/+Ai9; Cdh2+/+Ai9). (C) Imágenes de baja magnificación (10x) de la SVZ en las que se visualizan qNSCs que expresan BFP como control de la electroporación, mostrando áreas similares cercanas al ventrículo. (D) Imágenes de baja magnificación (10x) de la SVZ en las que se visualizan qNSCs mostrando una satisfactoria recombinación dependiente de CRE debido a la expresión de tdTomato. (E) Imágenes de baja magnificación (10x) del OB en las que se muestra un incremento en la producción de interneuronas en ratones con las dos copias de Cdh2 inactivadas. Estas interneuronas vienen de la activación postnatal de las qNSCs que migran al OB siguiendo la RMS. (D') En los ratones mutantes, parece haber un incremento en la producción de astrocitos. Los astrocitos se identifican por características morfológicas. (E') Ampliación de la zona del OB para visualizar la morfología de las interneuronas.

5. Organización de la SVZ tras la eliminación condicional de Cdh2

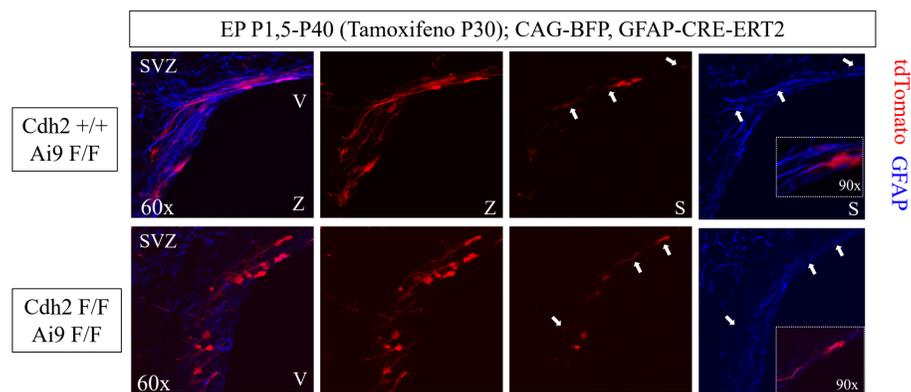


Figura 5. Comparación de las células tdTomato⁺/GFAP⁺ en la SVZ de los ratones control y mutantes. Las dos primeras columnas muestran una Z-stack de imágenes de confocal, mientras que las dos últimas muestran un único plano (S). Se muestra que la eliminación de Cdh2 tras la recombinación mediada por CRE produce cierta desorganización de la SVZ, observando una mayor dispersión del ventrículo de las NSCs marcadas en ratones Cdh2 F/F (Z). Además, las células tdTomato⁺ localizadas pegadas al ventrículo expresan el marcador de NSCs GFAP (azul) (S).

CONCLUSIONES

1. La técnica de la electroporación *ex utero* es útil para estudiar la neurogénesis postnatal en la SVZ y para llevar a cabo experimentos funcionales.
2. La inactivación postnatal de Cdh2 utilizando esta técnica parece afectar tanto al comportamiento de la quiescencia de las NSCs de la SVZ como a su organización morfológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience*, 22(3):629-34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002>.
2. Gil-Sanz, C., Landeira, B., Ramos, C., Costa, M. R., & Muller, U. (2014). Proliferative Defects and Formation of a Double Cortex in Mice Lacking Mlt4 and Cdh2 in the Dorsal Telencephalon. *Journal of Neuroscience*, 34(32), 10475–10487. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1793-14.2014>
3. Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J. M., Consiglio, A., Delgado, A. C., Kypta, R., López-Otin, C., Kirstein, M., & Fariñas, I. (2014). MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nature Cell Biology*, 16(7), 629–638. <https://doi.org/10.1038/ncb2993>
4. Feliciano, D. M., Lafourcade, C. A., & Bordey, A. (2013). Neonatal Subventricular Zone Electroporation. *Journal of Visualized Experiments*, 72. <https://doi.org/10.3791/50197>