



Departament de Biologia cel·lular i parasitologia  
Facultat de Farmàcia

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE DYRK1A COMO  
MODULADOR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS  
MADRE NEURALES, NORMALES Y CANCEROSAS**

NATIVIDAD POZO DE LA ROSA

València, 2013





Memoria presentada por **NATIVIDAD POZO DE LA ROSA** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA en el PROGRAMA DE DOCTORADO DE NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

**Pilar Sánchez Gómez, Doctora en C.C. Químicas y científica titular del Instituto de Salud Carlos III,**

**AUTORIZA** la presentación de la Tesis Doctoral Titulada: **CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE DYRK1A COMO MODULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES, NORMALES Y CANCEROSAS**, de la que es autora Natividad Pozo de la Rosa, Licenciada en Biología, y que ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Isabel Fariñas Gómez (Universidad de Valencia).

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Majadahonda, el día 2 de octubre de 2012.

Pilar Sánchez Gómez

Instituto de Salud Carlos III

Majadahonda (Madrid)



Memoria presentada por **NATIVIDAD POZO DE LA ROSA** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA en el PROGRAMA DE DOCTORADO DE *NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS*.

**Isabel Fariñas Gómez, doctora en C.C. Biológicas y catedrática de la Universidad de Valencia,**

**AUTORIZA** la presentación de la Tesis Doctoral titulada: **CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE DYRK1A COMO MODULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES, NORMALES Y CANCEROSAS**, de la que es autora Natividad Pozo de la Rosa, licenciada en Biología, y que ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Pilar Sánchez Gómez (Instituto de Salud Carlos III).

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Burjassot, el día 2 de octubre de 2012.

Isabel Fariñas  
Catedrática de Biología Celular  
Universidad de Valencia



**A mis padres, Encarnación y Patrocinio**

***In Memoriam***





Llegado el momento de dar las gracias realmente es cuando te das cuenta de que posiblemente sea una de las partes más difíciles de la tesis. Como esta tesis ha sido un poco trotamundos, al caminar por tantos centros de investigación estoy segura de que se me olvidará alguien, espero que sepa perdonarme. Por ello quiero primero dar las gracias sencillamente a todo el mundo que he conocido y que me ha ayudado en mayor o menor medida a que esto sea posible.

Primero de todo gracias a Pilar e Isabel, por confiar en mí (que ya es mucho). A Pilar gracias porque ha sido divertido “hacernos mayores” juntas, gracias por todo lo que me has enseñado y las cosas buenas que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. A Isabel gracias por ser una de las personas más inteligentes que he conocido, por acogerme en tu laboratorio y por dedicarme siempre unos minutos cuando aparezco por tu puerta sin avisar.

Y empezando con “le tour” de centros gracias a toda la gente con la que he coincidido en el laboratorio de Isabel: Zoraida mi compi “felipera”, la de anécdotas y conversaciones interminables que me llevo, gracias Zoropichi, por abrirme tu corazoncito y tu casita y dejarme pasar tantos ratitos con tu pequeña familia. Mireia, no puedo contar cuántas neuronas se ha llevado esta relación, unas por pensar demasiado en la ciencia y otras por otros motivos que no vienen a cuento, gracias Mireyita por ser como eres y haberme dejado compartir tantos buenos momentos (y los que quedan por vivir). Mari Paz gracias por toda la experiencia que acumulas y que has compartido conmigo en diferentes lugares y tiempos, por tu visión de la vida que tantas veces ha cambiado la mía, por los cafés en el despachito del Felipe y las cenas de fin de mes. Laurita gracias por ahorrarme hacer un montón de viajes a la libreta para mirar la concentración de los anticuerpos y por lo bien que sabes escuchar. Mari Ángeles gracias por hacerme reír. Ana gracias por enseñarme lo que es la constancia y la geografía y costumbres de las canarias. María José, la mujer más rápida del labo, gracias por no saber enfadarte. Sacri gracias por dejarme ser tu lapa y enseñarme muchas de las cosas que aprendí en este laboratorio. Raulito gracias por recordarme lo que es la ilusión por la ciencia cuando ésta me flaqueaba. Gracias también a Marifé, Elena, Celia y Miguel, que estaban allí cuando aterricé y que me ayudaron a no perderme en este amplio mundo. Gracias también por sus consejos a la nueva generación de “mayores” que fueron llegando: Jose Manuel Morante, Ana Pérez, Eva y de nuevo Jose Manuel. Y gracias también a Paco y a Martina.

Gracias también a la gente que conocí en el “Felipe”, sobre todo a la gente de “la cena de fin de mes”, Mara, Iván, Laura y Bea (Mari Paz, tú repites pero es que no te puedo poner todo el rato). Porque sigamos quedando hasta ser como los abuelitos de la mesa de al lado.

Finalmente, pero no por ello menos extenso, gracias a la gente del ISCIII que ha aportado un granito de arena a esta tesis. Paloma gracias por enseñarme cómo sobrevivir en el ámbito hospitalario, por tus abrazos que a veces tanta falta me hacían y por no mandarnos a la porra a Cris y a mí con nuestras bromitas. Cristina gracias por ser mi joven padawan, por las risas y las lágrimas, por tu fuerza, por las interminables conversaciones SPF y por ser mi guía en el Erasmus madrileño, ¡eres la mejor

ciruelita!. Rebe, gracias por la chispa y la gracia que tienes y por hacerme reír, por enseñarme que las cosas pequeñas como las mitocondrias y las Rebecas hacen cosas muy grandes, siempre nos quedarán las primeras tardes en el ISCIII, cuando éramos las únicas almas del pasillo. María gracias por los paseos por la montaña, las cervecitas y la vitalidad que tienes y que tan contagiosa es, no cambies nunca. Pilar (in), otra viejuna del clan, gracias por enseñarme que en ciencia se puede ser ordenado, gracias por tantas conversaciones de filosofía de la célula madre, por ser una compañera maravillosa y por tantos consejos sabios. Helena gracias por ejercer de jefa “en funciones” y por tu cariño. Marçal gracias por sacarnos a todos de paseo con el “club del cine” y por las risas terapéuticas cuando entrabas por la puerta. Rafa gracias por poner algo de coherencia en el gallinero del largo pasillo con tanta paciencia y humor. Gracias también a Edurne y Nieves por el aire fresco que transmitían.

Gracias a los amigos albaceteños Eva, Pilar y Llanos por estar conmigo tantísimo tiempo y apoyarme “sea lo que sea lo que quiera que esté haciendo”. Gracias a las compis de angustia en la carrera y que ahora son parte de mis amigas más cercanas: Silvia, Raquelita, Rakel y Ana, porque cuando os he necesitado no he tenido que llamaros y por tantas tardes de cervecitas, y a esos peques que son lo mejor del mundo. Gracias a los “amigos del pueblo” por los veranos, navidades y otras vacaciones memorables. Gracias a “Tacatà Teatre” que son Yolanda, Rafa, Elena y Daniel, por haber sido una vía de escape y haber generado grandes anécdotas. Gracias a Noe y a Jose, por los paseos y las largas conversaciones de terraza (Noe, nos salió bien el plan de ligarnos a dos benicalaeros, jajaja).

Gracias a mi familia, a mis tíos y tías, porque con ellos a mi lado nunca he estado sola, y nunca me ha faltado nada, sois los más grandes. Gracias a mis prim@s que son los mejores herman@s que se puede tener, por las noches de juventud sin dormir, las partidas de Risk y por no fallarme nunca. Y gracias también a la “new generation” que ha costado animarse, pero ya se les oye corretear por las casas.

Gracias a mis suegros, cuñad@s y sobrina, por las paellas de los sábados y por acogerme.

Gracias a mis padres, que tanto se esforzaron por mí y tanto echo de menos, por enseñarme a luchar mientras te queden fuerzas, por darme tanto cariño y cuidarme hasta el fin de sus días. Cuánto amor me habéis dejado.

Y por último gracias a mi pequeña familia, a Luis por ser mi socio en la vida y compartir el pan y las risas, porque cuando me duermo en los laureles siempre me despiertas para que siga adelante, te quiero mucho nene. Y a Marc gracias por ser un bebé tan bueno y dejar a su mami acabar esta tesis, eres el mejor enanito del mundo.

# Índice

## INTRODUCCIÓN

1.	<i>DYRK1A</i> .....	23
1.1.	La “Región Crítica del Síndrome de Down” y el gen <i>DYRK1A</i> .....	24
1.2.	La proteína <i>DYRK1A</i> .....	25
1.3.	Regulación de <i>DYRK1A</i> .....	25
1.4.	Sustratos de <i>DYRK1A</i> .....	25
1.5.	Expresión de <i>DYRK1A</i> en el sistema nervioso central (SNC).....	27
1.6.	Distribución intracelular en el SNC.....	28
1.7.	Modelos murinos para <i>Dyrk1A</i> .....	28
1.7.1.	Modelos trisómicos, completos o parciales, del MMU16.....	28
1.7.2.	Modelos transcromosómicos que contienen total o parcialmente HSA21	28
1.7.3.	Modelos de sobre-expresión YAC/BAC/PAC que contienen varios de los genes del HSA21.....	29
1.7.4.	Modelos de sobre-expresión de gen único.....	29
1.7.5.	Modelo de haploinsuficiencia de <i>Dyrk1A</i> .....	29
1.8.	<i>DYRK1A</i> y la regulación de los progenitores neurales.....	31
2.	Células madre neurales.....	32
2.1.	Células madre en el adulto.....	32
2.2.	Neurogénesis y nichos neurogénicos.....	32
2.3.	Zona subependimaria.....	33
2.3.1.	Estructura de la SEZ y neurogénesis.....	33
2.3.2.	Marcadores moleculares de la SEZ.....	35
2.4.	Mantenimiento y regulación de NSCs.....	37
2.4.1.	Componentes celulares y moleculares del nicho.....	37
2.4.2.	Regulación de las NSCs por el factor de crecimiento EGF.....	39
2.5.	Características <i>in vitro</i> de NSCs.....	39
2.6.	Regulación de la estabilidad del EGFR.....	41
3.	Glioblastomas y “células iniciadoras de tumor”.....	43
3.1.	Definición y clasificación gliomas.....	43
3.2.	Hipótesis de las células iniciadoras de tumor.....	45
3.3.	Marcadores de TICs de GBMs.....	46
3.4.	Origen de los gliomas y las NSCs.....	48
3.5.	EGFR y GBMs.....	48

## METODOLOGÍA

1	Animales.....	55
---	---------------	----

1.1	Cepas de animales .....	55
1.2	Genotipado de animales <i>Dyrk1A</i> .....	55
2	Cultivo primario y mantenimiento de neuroesferas de la SEZ de ratón adulto.....	56
2.1	Medios de cultivo.....	56
2.2	Cultivo primario.....	57
2.3	Mantenimiento y expansión.....	57
3	Cultivo de líneas celulares: c17.2, HEK 293T y Phoenix.....	58
3.1	Medios de cultivo.....	58
3.2	Mantenimiento.....	59
4	Establecimiento y expansión de cultivos de TICs de GBM.....	59
4.1	Medios de cultivo.....	59
4.2	Cultivo primario.....	59
4.3	Mantenimiento y expansión.....	60
5	Ensayos de neuroesferas.....	60
5.1	Medida de la capacidad de proliferación.....	60
5.1.1	Diámetro.....	60
5.1.2	Incorporación de BrdU.....	61
5.2	Medida de la capacidad de auto-renovación.....	61
6	Cultivos de NSCs en matriz de colágeno.....	61
7	Análisis de la expresión génica por medición del RNA mensajero (mRNA).....	62
7.1	Extracción de RNA total.....	62
7.2	Retrotranscripción y reacción de PCR.....	62
8	Análisis de la expresión proteica por Western Blot.....	63
8.1	Preparación de muestras para extracción.....	63
8.2	Extracción y cuantificación de proteína.....	63
8.3	Electroforesis y transferencia a membrana.....	63
8.4	Revelado.....	64
9	Sobre-expresión de proteínas y RNA de interferencia <i>in vitro</i> .....	64
9.1	RNAi y plásmidos utilizados.....	64
9.2	Lipofección de células c17.2.....	65

9.3	Nucleofección de NSCs.....	66
9.4	Transducción de NSCs y TICs de GBM con retrovirus y lentivirus.....	66
9.4.1	Generación de construcciones virales para RNA de interferencia (shRNA)	66
9.4.1.1	Generación de plásmidos retrovirales.....	66
9.4.1.2	Generación de plásmidos lentivirales.....	68
9.4.2	Transfección de células empaquetadoras Phoenix. Producción de retrovirus y lentivirus ecotrópicos.....	68
9.4.3	Transfección de células 293T, producción de retrovirus y lentivirus anfotrópicos.....	69
9.4.4	Transducción de neuroesferas (NSCs y TICs de GBM) con retrovirus y lentivirus, selección con puromicina.....	69
10	Ensayos <i>in vitro</i> .....	70
10.1	Ensayos de internalización y degradación del EGFR.....	70
10.1.1	Medida de la cantidad de EGFR en membrana y de su internalización.....	70
10.1.2	Medida de la degradación de EGFR.....	71
10.2	Separación de células EGFR positivas por FACS.....	71
10.3	Técnicas inmunofluorescentes.....	71
11	Ensayos <i>in vivo</i> .....	72
11.1	Marcaje de células madre mediante inyección de BrdU.....	72
11.2	Xenotrasplantes.....	73
11.3	Preparación de tejidos para las técnicas histológicas.....	74
11.4	Técnicas inmunofluorescentes.....	74
11.5	Morfometría.....	75
12	Análisis estadístico.....	76
13	Anexo.....	76

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1	Estudio de la características de la sez de ratones <i>Dyrk1a</i> <sup>+/-</sup> .....	83
1.1	<i>Dyrk1A</i> se expresa en las NSCs de la SEZ.....	83
1.2	<i>Dyrk1A</i> regula la población de células madre neurales <i>in vivo</i> .....	85
2	Caracterización de los cultivos de NSCs de ratones <i>Dyrk1a</i> <sup>+/-</sup> .....	88
2.1	Los ratones <i>Dyrk1A</i> <sup>+/-</sup> tienen menor número de NSCs.....	88
2.2	<i>Dyrk1A</i> es necesario para la correcta auto-renovación de las NSCs.....	91

2.3	El descenso puntual en los niveles de <i>Dyrk1A</i> produce el mismo efecto que la hemicigosis.....	92
2.4	La proliferación de las células <i>Dyrk1A</i> <sup>+/-</sup> no está alterada.....	93
2.5	Una expresión mínima de <i>Dyrk1A</i> es necesaria para el mantenimiento de las NSCs.....	94
2.6	El fenotipo de las NSCs <i>Dyrk1A</i> <sup>+/-</sup> se observa sólo en respuesta al mitógeno EGF.....	96
3	Estudio de la regulación de los niveles de EGFR por <i>Dyrk1A</i> .....	97
3.1	Los niveles de <i>Dyrk1A</i> <sup>+/-</sup> y EGFR correlacionan en las NSCs, tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .....	97
3.2	La presencia de EGFR en membrana identifica a las NSCs con mayor capacidad de auto-renovación.....	100
3.3	La inhibición de <i>Dyrk1A</i> favorece la degradación pero no la internalización de EGFR.....	102
3.4	La sobre-expresión de <i>Dyrk1A</i> inhibe la degradación de EGFR pero no afecta a los niveles basales del receptor ni a la capacidad de auto-renovación de las NSCs.....	103
3.5	La regulación de los niveles de EGFR por <i>Dyrk1A</i> se produce a través de la fosforilación del regulador de EGFR Sprouty2.....	105
3.6	Modelo propuesto para la regulación de la auto-renovación de las NSCs por <i>Dyrk1A</i> mediada por la degradación del EGFR.....	109
4.	Estudio de la regulación de células iniciadoras de tumor de GBM por <i>DYRK1A</i> .....	111
4.1.	Los cultivos de TICs de GBMs expresan <i>DYRK1A</i> de manera variable.....	111
4.2.	<i>DYRK1A</i> regula la auto-renovación de las TICs de GBMs.....	112
4.3.	La disminución de los niveles de <i>DYRK1A</i> no afecta a la proliferación de las TICs de GBMs.....	114
4.4.	La interferencia de <i>DYRK1A</i> provoca una clara disminución de la cantidad de EGFR en las TICs.....	115
4.5.	La disminución de <i>DYRK1A</i> reduce la capacidad tumorigénica de las TICs de GBMs.....	116
4.6.	La reducción en el volumen del tumor no es debido a una disminución en la proliferación <i>in vivo</i> de las células U87 sh <i>DYRK1A</i> .....	118
4.7.	Los tumores procedentes de células interferidas para <i>DYRK1A</i> tienen menor número de células EGFR positivas.....	119
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	125
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	129



## ABREVIATURAS

- Ara-C.-** Citosina- $\beta$ -D arabinofuranósido
- BDNF.-** Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor*
- BSA.-** Albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*
- BrdU.-** 5-bromo-2-desoxyuridina
- SNC.-** Sistema nervioso central
- DAPI.-** 4',6-diamidino-2-fenolindol dihidrocloruro
- DYRK1A.-** Del inglés *Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase*
- DMEM.-** Medio de Eagle modificado por Dulbecco, del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*
- DNA.-** Ácido desoxiribonucleico, del inglés *deoxyribonucleic acid*
- DSCR.-** Región Crítica del Síndrome de Down, del inglés *Down Syndrome Critical Region*
- EBSS.-** *Earle's balanced salts solution*
- EDTA.-** Ácido etilen-diamino-tetra-acético
- EGF.-** Factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor*
- EGFR.-** Receptor de EGF, del inglés *EGF receptor*
- EtOH.-** Etanol
- FBS.-** Suero bovino fetal, del inglés *fetal bovine serum*
- FGF.-** Factor de crecimiento fibroblástico, del inglés *fibroblast growth factor*
- GADPH.-** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GFAP.-** Proteína ácida fibrilar de la glía, del inglés *glial fibrillary acidic protein*
- GBM.-** Glioblastoma
- GD.-** Giro dentado
- HEPES.-** Ácido (2-(4-(2-hidroximetil)-1-piperacil)- etanosulfónico
- HS.-** Suero de caballo, del inglés *horse serum*
- IF.-** Inmunofluorescencia
- KO.-** Mutante nulo, del inglés *knockout*
- LV.-** Ventrículo lateral, del inglés *lateral ventricle*
- mnb.-** del inglés *minibrain*
- mRNA.-** ARN mensajero
- NSCs.-** Células madre neurales, del inglés *neural stem cells*
- OB.-** Bulbo olfatorio, del inglés *olfactory bulb*
- OMS.-** Organización mundial de la salud
- PB.-** Tampón fosfato
- PBS.-** Tampón fosfato salino
- PCR.-** Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*
- PEDF.-** Factor derivado del epitelio pigmentario, del inglés *Pigment Epithelium-Derived Factor*
- PFA.-** Paraformaldehído

**PTB.-** Dominio de unión a fosfotirosinas

**RNA.-** Ácido ribonucleico, del inglés *ribonucleic acid*

**RNAi.-** RNA de interferencia

**RMS.-** Camino migratorio rostral, del inglés *rostral mygratory stream*

**SD.-** Síndrome de Down

**SDS.-** Dodecil sulfato sódico

**SEZ.-** Zona subependimaria, del inglés *subependymal zone*

**SGZ.-** Zona subgranular, del inglés *subgranular zone*

**Shh.-** *Sonic Hedgehog*

**SNC.-** Sistema nervioso central

**siRNA.-** RNA silenciador o de interferencia, del inglés *silence RNA*

**shRNA.-** del inglés *short hairpinRNA*

**Spry.-** Sprouty

**TBE.-** Tampón tris borato EDTA

**TBS.-** Tampón tris borato salino

**TEMED.-** Tetrametiletilendiamina

**TICs.-** Células madre iniciadoras de tumor, del inglés *tumor initiating cells*

**VEGF.-** Factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés *vascular endotelial growth factor*

**WB.-** *Western blot*





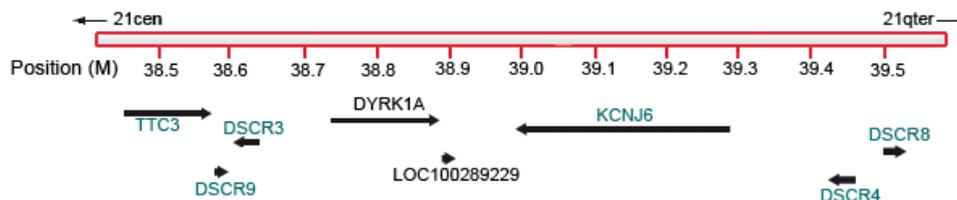
# Introducción



## 1. DYRK1A

### 1.1. La “Región Crítica del Síndrome de Down” y el gen *DYRK1A*

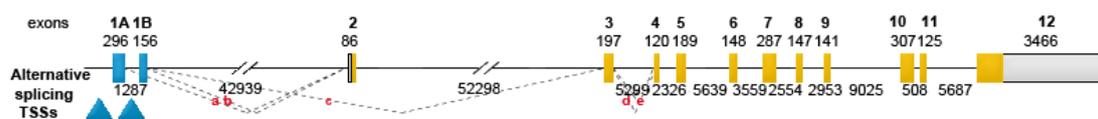
El gen *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A*) se localiza en la región q22.13 del cromosoma 21 humano (HSA21). Estudios de correlación llevados a cabo en pacientes con trisomía parcial del cromosoma 21 durante la década de los noventa delimitaron una región de aproximadamente 30 genes que mapean en una extensión de 5,4 Mb. A dicha región se le denominó “Región Crítica del Síndrome de Down” (DSCR, del inglés *Down syndrome Critical Region*), dado que su repetición era suficiente para causar los defectos fenotípicos presentes en pacientes con dicho síndrome (Delabar et al., 1993). Posteriormente esta región se redujo a 1,2 Mb y 10 genes (incluyendo *DYRK1A*) que, en monosomía, causan microcefalia y retraso mental (Matsumoto et al., 1997) (Figura I1). Más adelante la identificación en dos pacientes con microcefalia de la presencia de una mutación en hemigosis que conlleva la aparición de una proteína *DYRK1A* truncada indicó que la haploinsuficiencia del gen *DYRK1A* es suficiente para causar los defectos presentes en estos pacientes y en otros con monosomía parcial del cromosoma 21 (Møller et al., 2008).



**Figura I1. Localización del gen *DYRK1A* dentro del cromosoma 21 y de la DSCR.** Esquema donde se muestra la localización de *DYRK1A* dentro del brazo q del cromosoma 21.

En el cerebro de pacientes con síndrome de Down (SD) los niveles de la proteína *DYRK1A* se encuentran elevados aproximadamente de un 30% a un 50% (Guimera et al., 1999). *DYRK1A* se expresa en el cerebro de manera ubicua en casi todas las estructuras, tanto en la materia gris como en la blanca (Dowjat et al., 2007), y en concreto en estructuras que están alteradas en el SD como son las capas superficiales de la corteza y el hipocampo. Todo ello hace de *DYRK1A* un firme candidato para explicar las alteraciones neurológicas presentes en el SD.

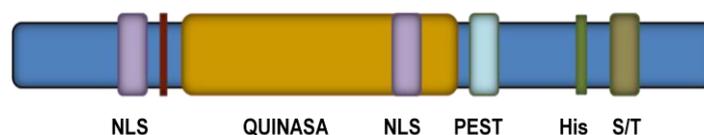
En cuanto a la estructura del gen *DYRK1A*, este contiene 17 exones localizados en 149,7 Kb de DNA genómico. Se han descrito diversos transcritos como resultado del *splicing* alternativo de dicho gen (Figura I2), aunque no existen diferencias funcionales asociadas a ninguna de estas variantes.



**Figura 12. Esquema de la estructura del gen *DYRK1A* donde se muestran los diferentes sitios de *splicing* alternativo.** Esquema donde se muestran los diferentes sitios de *splicing* alternativo para el gen *DYRK1A*. Existe un uso alternativo de los dos primeros exones dependiente de diferentes promotores que no afecta a la pauta de lectura (eventos de *splicing* a y b). Estos promotores difieren en su tamaño y en la capacidad de regulación por el factor de transcripción E2F1 (Maenz et al., 2008). La exclusión del exón 2 puede dar lugar a una proteína truncada N-terminal (evento de *splicing* alternativo c). Los eventos de *splicing* d y e en el exón 4 generan dos variantes proteicas que difieren por la inclusión/exclusión de 9 aminoácidos en la región N-terminal (Kentrup et al., 1996); (Guimera et al., 1999).

## 1.2 La proteína *DYRK1A*

*DYRK1A* es una proteína quinasa que pertenece a la familia de proteínas *DYRK*, perteneciente a su vez al grupo de quinasas *CMCG* [*cyclin-dependent kinases* (CDKs), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *CDK-like kinases* y *glycogen synthase kinases* (GSKs)]. En mamíferos, la familia *DYRK* está compuesta por 5 miembros: *DYRK1A*, *DYRK1B*, *DYRK2*, *DYRK3* y *DYRK4*. Todas las proteínas de la familia *DYRK* comparten un motivo conservado cerca del dominio quinasa que se conoce como “*DYRK* homology (*DH*)-box”. El dominio quinasa se localiza en el centro de la estructura primaria de la proteína. Posee una señal de localización nuclear (NLS) dividida en dos partes: una de ellas localizada N-terminal a la *DH*-box y la otra dentro del dominio quinasa. Consta también de una región de poli-histidina que actúa como una diana para la señal de translocación nuclear (Alvarez et al., 2003) y de un motivo regulador PEST. Los dominios PEST son regiones proteicas ricas en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina que se han asociado con el control de la estabilización proteica (Rechsteiner and Rogers, 1996). A la región C-terminal rica en serinas y treoninas no se le ha asociado ninguna actividad (Figura 13).



**Figura 13. Estructura de la proteína *DYRK1A*.** Los diferentes dominios están explicados en el texto. NLS: señal de localización nuclear, His: región de poli-histidina, S/T: región rica en serinas y treoninas. En rojo se señala la posición de la *DH*-box.

### 1.3 Regulación de *DYRK1A*

Al igual que el resto de miembros de la familia DYRK, *DYRK1A* fosforila residuos de serina y treonina de sustratos exógenos y requiere, para su completa activación, de la auto-fosforilación en el residuo de tirosina Y321, que se localiza dentro del dominio de activación (Kentrup et al., 1996). La capacidad de auto-fosforilación es independiente de otros dominios o de la presencia de cofactores (Göckler et al., 2009) y se pierde cuando la proteína está completamente traducida, pudiendo únicamente a partir de entonces fosforilar residuos de serina y treonina. Existen bastantes evidencias que indican que la regulación de *DYRK1A* debe depender, entre otras cosas, de cambios rápidos en los niveles de mRNA o de proteína. La presencia de secuencias desestabilizadoras (AUUUA) en la región 3'-UTR del mRNA de *DYRK1A* (Kentrup et al., 1996), así como la región reguladora PEST (Rechsteiner and Rogers, 1996) de la proteína apoyan esta hipótesis.

Se han descrito reguladores tanto negativos como positivos de la transcripción de *DYRK1A*. Por ejemplo, en células no neurales la proteína activadora 4 actúa como regulador negativo de la expresión de *DYRK1A* (Kim et al., 2006b). El factor de transcripción E2F1 incrementa la actividad del promotor de *DYRK1A* (Maenz et al., 2008) y en macrófagos de médula ósea el factor nuclear de células T activas (NFATc1) aumenta los niveles de mRNA de *DYRK1A* (Lee et al., 2009).

Otro posible nivel de regulación adicional a los anteriores es la regulación de la actividad quinasa. Algunos ejemplos son la proteína 14-3-3 $\beta$  que es capaz de duplicar la actividad catalítica de *DYRK1A* mediante su unión a un residuo de serina fosforilado en el dominio C-terminal de *DYRK1A* (Alvarez et al., 2007). Por otro lado, la unión de RanBMP a una región adyacente al dominio C-terminal modula negativamente la actividad de *DYRK1A* en células epiteliales (Zou et al., 2003). Otro ejemplo lo conforma la unión del dominio EVH1 de la proteína relacionada con Sprouty2 (SPRED1/2) al dominio quinasa de *DYRK1A*, compitiendo por los mismos sitios de unión a otros sustratos e inhibiendo la fosforilación por *DYRK1A* (Li et al., 2010).

### 1.4 Sustratos de *DYRK1A*

*DYRK1A* fosforila numerosos sustratos *in vitro* (Tabla 1), muy diversos tanto en función como en localización subcelular (tanto nuclear como citoplasmática), aunque tan sólo en algunos casos se han aportado evidencias funcionales *in vivo*.

Tabla1.- Sustratos de DYRK1A

SUSTRATO	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	FUNCIÓN	REFERENCIA
Histona H3	Nuclear	Formación de nucleosomas. Remodelación de la cromatina	(Himpel et al., 2000)
CREB ( <i>cAMP Responsive Element Binding protein</i> )	Nuclear	Desarrollo y diferenciación neuronal. Plasticidad sináptica	(Yang et al., 2001)
STAT3 ( <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> )	Nuclear	Activación de transcripción	(Matsuo et al., 2001)
FKHR ( <i>Forkhead</i> )	Nuclear	Control de la expresión génica mediada por insulina. Regulación de la apoptosis mediada por factores de supervivencia	(Matsuo et al., 2001);(von Groote-Bidlingmaier et al., 2003); (Chang et al., 2007)
Tau	Citosólica	Regulación de la dinámica de microtúbulos. Implicada en la enfermedad de Alzheimer	(Park et al., 2007; Ryoo et al., 2007; Woods et al., 2001)
Gli 1	Citosólica/Nuclear	Regulación transcripcional	(Morita et al., 2006)
eIF2B $\epsilon$ ( <i>Eukaryotic initiation factor 2Bepsilon</i> )	Nuclear/Citosólica	Regulación del inicio de la traducción del mRNA	(Woods et al., 2001)
Dinamina 1	Citosólica	Regulación del ensamblaje del aparato endocítico	(Chen-Hwang et al., 2002; Huang et al., 2004b)
14-3-3	Nuclear/Citosólica	Regulación del andamiaje, protección de proteólisis, defosforilación y secuestro de proteínas diana	(Alvarez et al., 2007; Kim et al., 2004)
Arip-4 ( <i>Androgen Receptor Interacting Protein 4</i> )	Nuclear	Regulación de la transcripción mediada por hormonas tiroideas	(Sitz et al., 2004)
Ciclina L2	Nuclear	Regulación transcripcional relacionado con el <i>splicing</i> de pre-mRNA	(de Graaf et al., 2004)
<i>Glycogen Synthase</i>	Citosólica	Regulación del metabolismo de la glucosa	(Skurat and Dietrich, 2004)
Hip 1 ( <i>Huntingtin Interactin protein 1</i> )	Citosólica	Papel en endocitosis y mantenimiento del esqueleto de actina	(Kang et al., 2005)
NFATc ( <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> )	Nuclear/Citosólica	Regulación del desarrollo y organogénesis	(Arron et al., 2006; Gwack et al., 2006)
<i>Amphiphysin 1</i>	Citosólica	Regulación del aparato endocítico	(Murakami et al., 2006)
$\alpha$ -Synuclein	Citosólica	Posible implicación en la regulación de la síntesis de dopamina. Forma depósitos en la enfermedad de Parkinson	(Kim et al., 2006a)

<i>Synaptojanin-1</i>	Citosólica	Reciclaje de vesículas sinápticas endocíticas	(Adayev et al., 2006)
<i>APP (Amyloid Precursor Protein)</i>	Citosólica/Nuclear	Migración de precursores neuronales. Degradación de $\beta$ -catenina. Regulador transcripcional	(Park et al., 2007; Ryoo et al., 2007)
<i>Caspasa 9</i>	Citosólica (mitocondrial)	Componente de la vía intrínseca apoptótica mitocondrial	(Seifert et al., 2008)
<i>Sprouty2</i>	Citosólica	Regulador negativo de la señalización por receptores tirosina quinasa	(Aranda et al., 2008)
<i>p53</i>	Nuclear	Implicado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis	(Park et al., 2010)
<i>SIRT1</i>	Nuclear	Supervivencia celular Acoplamiento estado metabólico celular a regulación génica	(Guo et al., 2010)
<i>Septina-4</i>	Citosólica	GTPasa	(Sitz et al., 2008)
<i>MAP1B</i>	Citosólica	Regulación de dinámica de microtúbulos en axones en crecimiento	(Scales et al., 2009)
<i>Presenilina-1</i>	Citosólica	Componente del complejo $\gamma$ -secretasa.	(Ryu et al., 2010)

### 1.5 Expresión de *DYRK1A* en el sistema nervioso central (SNC)

El gen *DYRK1A* está expresado de manera generalizada en mamíferos tanto en tejido embrionario en diferentes estadios del desarrollo como en el individuo adulto, con una mayor prevalencia en corazón, pulmón, cerebro y músculo esquelético (Guimera et al., 1999; Guimerá et al., 1996; Okui et al., 1999; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1996). Mediante estudios de hibridación *in situ* en cerebro de ratón se ha descrito que *Dyrk1a* se expresa de manera ubicua en estadios embrionarios, pasando a expresarse en regiones más concretas en el cerebro adulto como son bulbo olfatorio, cerebelo, corteza cerebral, la capa de células piramidales del hipocampo y núcleos hipotalámicos (Guimera et al., 1999; Song et al., 1996). Este patrón de expresión dinámico de *Dyrk1A* durante el desarrollo se confirmó con estudios de expresión posteriores realizados en pollo (Hämmerle et al., 2002) y ratón (Hämmerle et al., 2008) en estadios embrionario y posnatal.

El cambio en el patrón de expresión de *Dyrk1A* de ubicuo en el embrión a más restringido en el adulto conduce a pensar que, durante el neurodesarrollo, el gen *Dyrk1A* puede ejercer un efecto sobre el control de eventos de proliferación y maduración neuronal, mientras que en el adulto puede estar circunscrito a funciones más específicas, como son el aprendizaje/memoria y/o la función motora.

## 1.6 Distribución intracelular en el SNC

Existen muchos estudios sobre la distribución subcelular de DYRK1A. En el cerebro de ratón adulto Dyrk1A se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas y las células gliales (Hämmerle et al., 2008; Martí et al., 2003). En el pollo se ha descrito un cambio de localización de Dyrk1A del núcleo al citoplasma durante la diferenciación de las células de Purkinje (Hämmerle et al., 2003). En el cerebro humano, DYRK1A se localiza en el núcleo y citoplasma de neuronas, y únicamente en el citoplasma en el caso de astrocitos y células endodimarias y endoteliales (Wegiel et al., 2004). Estudios de fraccionamiento bioquímico en tejido cerebral murino indican que la proteína Dyrk1A citosólica se puede agrupar en tres fracciones: una pequeña fracción soluble, otra asociada a la membrana plasmática sináptica y una tercera asociada a vesículas (Aranda et al., 2008; Murakami et al., 2009).

Esta variación en la distribución intracelular de DYRK1A podría estar relacionada con la función diferencial que podría estar realizando DYRK1A en cada uno de estos tipos celulares y explica la gran variedad de sustratos encontrados. Asimismo sugiere un mecanismo adicional de regulación de DYRK1A mediante cambios en su distribución intracelular, aunque se desconoce cómo se podría llevar a cabo o qué proteínas podrían estar implicadas.

## 1.7 Modelos murinos para *Dyrk1A*

El gen *Dyrk1A* de ratón mapea en el cromosoma 16 (Mmu16), en la región sinténica con HSA21 (Song et al., 1996). Dado el interés de dicha región en el estudio del SD se han desarrollado diferentes modelos murinos que abarcan desde la repetición de cromosomas o regiones cromosómicas completas, que incluyen a *Dyrk1A*, a sobreexpresiones o deleciones puntuales de dicho gen.

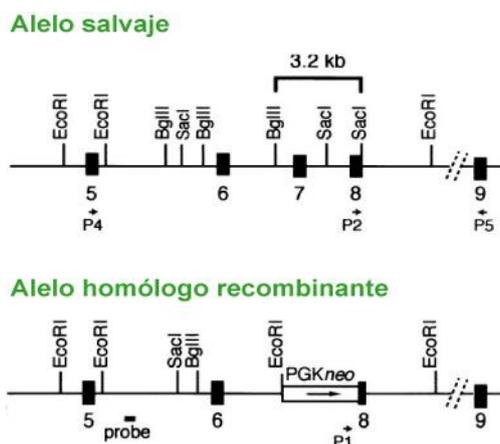
**1.7.1 Modelos trisómicos, completos o parciales, del MMU 16.-** Entre ellos se encuentra el modelo Ts65Dn (Davisson et al., 1990) considerado el modelo de sobre-expresión de SD por antonomasia, ya que reproduce muchas de las características observadas en personas con dicho síndrome, incluyendo dificultades en aprendizaje y memoria así como aspectos relacionados con neurodegeneración temprana.

**1.7.2 Modelos transcromosómicos que contienen total o parcialmente HSA21.-** Estos modelos permiten la sobre-expresión de parte de los genes de HSA21 que se encuentran localizados en Mmu10 y Mmu17. Estos modelos permiten reproducir alteraciones relacionadas con el SD como la cardiopatía congénita, pero tienen el inconveniente de un elevado mosaicismo de manera que sólo un tercio de las neuronas tienen el cromosoma extra (O'Doherty et al., 2005).

**1.7.3 Modelos de sobre-expresión YAC/BAC/PAC que contienen varios de los genes del HSA21.-** Estos modelos se generaron a partir de cromosomas artificiales de levadura (YAC, *Yeast Artificial Chromosome*), de bacteria (BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*) y del bacteriófago P1 (PAC, *P1 bacteriophage artificial chromosome*) y contienen distintos fragmentos cromosómicos cubriendo aproximadamente 2 Mb del HSA 21 (Smith et al., 1995). Entre los distintos modelos generados cabe destacar el modelo transgénico YAC152F7tel, que contiene varios genes en transgénesis, entre ellos el gen *DYRK1A*, y que presentan alteraciones como hiperactividad durante el desarrollo, déficits en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje y un mayor volumen cerebelar (Branchi et al., 2004; Rachidi et al., 2007).

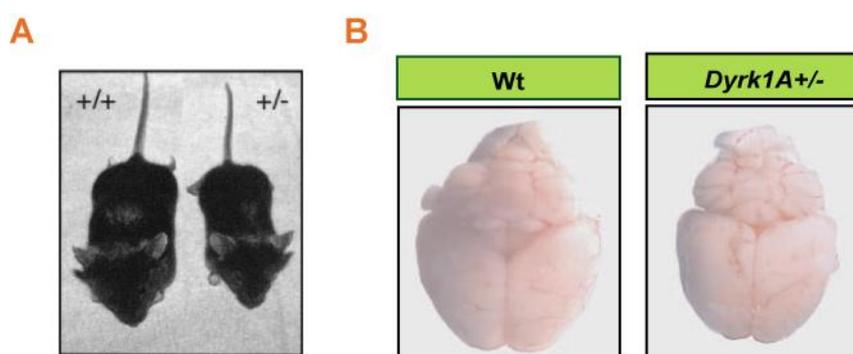
**1.7.4 Modelos de sobre-expresión de gen único.-** Existen una variedad de modelos transgénicos que resultan en la ganancia de función para genes codificados por HSA21 (Vacano et al., 2012). El estudio de estos ratones transgénicos ofrece la ventaja de poder analizar las implicaciones bioquímicas y fenotípicas de la sobre-expresión de los genes de manera individual. Así por ejemplo, los ratones que sobre-expresan el gen *Dyrk1A* de rata en el modelo de copia única TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001), presentan diversas alteraciones entre las que se encuentran: retraso del desarrollo neuromotor consecuencia de la maduración cráneo-caudal tardía y deficiencias en el aprendizaje temporal y en la flexibilidad cognitiva que indican una disfunción en el córtex prefrontal y en el hipocampo. Estos déficits se han corroborado en otros estudios de expresión del gen *DYRK1A* en un cromosoma artificial bacteriano (*DYRK1A* BAC), reproduciendo en el ratón los mismos defectos en aquellas tareas de memoria específicas del hipocampo (Ahn et al., 2006).

**1.7.5 Modelo de haploinsuficiencia de *Dyrk1A*.-** Se generó sustituyendo por recombinación homóloga un fragmento genómico de 3,2 Kb que contiene los exones 7 y 8 del gen (incluyendo la señal de localización nuclear, una pequeña secuencia consenso rica en residuos de aspartato que se especula pueda estar relacionada con la actividad quinasa y tres subdominios del residuo catalítico que son necesarios para la unión de ATP), por un gen de resistencia a neomicina (*neo*) (Fotaki et al., 2002) (Figura I4). Este es el modelo utilizado en la presente tesis.



**Figura 14. Alelo resultante de la recombinación del gen *Dyrk1A*.** Diagrama donde se muestra la estructura del alelo salvaje y el alelo resultante de la recombinación homóloga del gen *Dyrk1A*.

Los ratones mutantes nulos o *knockout* (KO) para *Dyrk1A* no son viables, muriendo entre los estadios embrionarios E10.5 a E13.5. Los ratones heterocigotos para *Dyrk1A* (*Dyrk1A*<sup>+/-</sup>) tienen una viabilidad reducida de aproximadamente el 30% sobre la proporción mendeliana esperada y los que sobreviven hasta adultos son significativamente más pequeños que sus compañeros de camada. Esta diferencia de tamaño se refleja en distintos órganos, entre ellos el cerebro de los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> que es alrededor de un 30% más pequeño que el de sus hermanos de camada (Figura 15), presentando diferencias macroscópicas, siendo la más notable la reducción del *tectum* mesencefálico. No todas las estructuras están alteradas homogéneamente, siendo mayores las reducciones en el cerebro medio y profundo. A pesar de las alteraciones de tamaño, la mayoría de las regiones muestran una citoarquitectura y una composición neuronal normal. En cuanto a su comportamiento los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen un retraso significativo en el desarrollo de algunos reflejos y una marcada hipoactividad (Fotaki et al., 2002; Fotaki et al., 2004).



**Figura 15. Fenotipo del ratón *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>.** A.- Imagen comparativa entre dos machos de la misma camada, uno de fenotipo salvaje y otro heterocigoto para *Dyrk1A*. B.-Visión dorsal del cerebro de dos ratones, salvaje y heterocigoto para *Dyrk1A*, en el que se aprecia la reducción de tamaño, especialmente del *tectum* mesencefálico.

El hecho de que tanto la sobre-expresión génica como la haploinsuficiencia de *Dyrk1A* tengan como resultado la presencia de alteraciones comportamentales y estructurales en el cerebro del ratón adulto apoyan de manera rotunda la hipótesis de la importancia de la dosis génica de *Dyrk1A* en el SNC.

### 1.8 *DYRK1A* y la regulación de los progenitores neurales

En 1995 se describió el papel que el gen *minibrain (mnb)*, homólogo de *DYRK1A* en *Drosophila melanogaster*, juega en la neurogénesis post-embionaria regulando el número de células que se generan en el desarrollo de los diferentes tipos neuronales. Las moscas mutantes para *mnb* se caracterizan por una marcada reducción del tamaño de los lóbulos ópticos y de los hemisferios cerebrales centrales (Tejedor et al., 1995), esta reducción resulta de una disminución en el número de células generadas durante los procesos de proliferación que ocurren en el desarrollo postembrionario. La descripción del patrón de expresión durante el desarrollo de *mnb* refuerza su papel en la regulación de la proliferación de los progenitores neurales. *Mnb* se expresa durante el desarrollo del pollo en células proliferativas en las tres zonas neurogénicas del cerebro fetal: tubo neural, placa neural y placodas craneales, y su expresión siempre precede las oleadas de neurogénesis. Además, se encontró que la distribución del mRNA de *Dyrk1A* durante la división celular de las células neuroepiteliales estaba polarizada, de manera que la expresión de *Dyrk1A* marcaría el cambio entre la fase de proliferación y la de diferenciación neural (Hämmerle et al., 2002). Esta misma regulación espacio-temporal de la expresión de *Dyrk1A* sucede en el desarrollo del SNC en el embrión de ratón, donde además la expresión de *Dyrk1A* pasa de ser transicional en los progenitores tempranos a ser constitutiva ya en las neuronas maduras (Hämmerle et al., 2008). De hecho, la sobre-expresión puntual de *Dyrk1A* en progenitores neurales de córtex embrionario, tanto de pollo como de ratón, conducen a una parada en la proliferación y a una diferenciación temprana de los mismos (Hämmerle et al., 2011; Park et al., 2010; Yabut et al., 2010). Todos estos indicios conducen a pensar que es necesaria una correcta expresión de *Dyrk1A* durante el desarrollo en los progenitores neurales para que se produzca un número correcto de progenie diferenciada.

## **2. CÉLULAS MADRE NEURALES**

### **2.1. Células madre en el adulto**

Las células madre adultas específicas de tejido son células multipotentes, capaces de proliferar en respuesta a estímulo y de generar todos los tipos celulares propios de dicho tejido. Estas células madre tienen la capacidad de mantenerse durante toda la vida del individuo y a su vez abastecer la necesidad de proliferación propia de cada tejido. Para ello han de ser capaces de mantener un balance muy regulado entre auto-renovación (capacidad para dividirse dando lugar a células con las mismas propiedades de célula madre para mantener el número de células madre del tejido) y generación de progenitores más restringidos que den lugar a los tipos celulares tejido diferenciados.

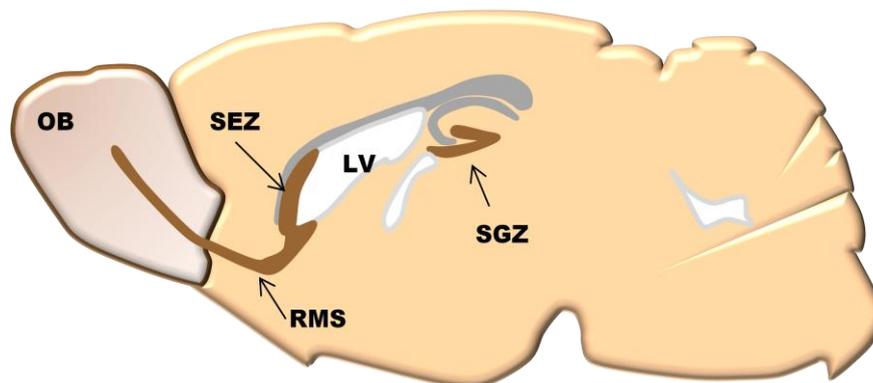
Además del mantenimiento de los diferentes tejidos, estas células son capaces de activarse en respuesta a una necesidad regenerativa consecuencia de una situación patológica. Entre los diferentes factores que regulan la homeostasis de las células madre se encuentra el emplazamiento de estas células en lugares concretos dentro del tejido, donde existe un microambiente específico llamado “nicho” que contribuye de manera notable a la regulación de las células madre (Schofield, 1978).

### **2.2. Neurogénesis y nichos neurogénicos**

Con el descubrimiento a finales de la década de los noventa de que en el cerebro de los mamíferos adultos se produce neurogénesis durante toda la vida del individuo, se ponía fin al dogma que estipulaba que en el momento del nacimiento se encuentran ya todas las células nerviosas que acompañarán al individuo a lo largo de su vida. Esta neurogénesis (entendida como el proceso mediante el cual se generan nuevas neuronas a partir de progenitores) está mantenida por las llamadas células madre neurales (NSCs), las cuales son capaces de proliferar perpetuándose en el tiempo (auto-renovarse) y a su vez dar lugar a progenie capaz de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2010). La neurogénesis adulta es un proceso dinámico y altamente controlado, estando sujeto a modulaciones por estímulos fisiológicos, farmacológicos y patológicos, pudiendo activarse por ejemplo en respuesta a daño (Gould, 2007).

Actualmente se admite que en el cerebro del ratón adulto en circunstancias normales existen dos zonas o nichos neurogénicos activos: la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD) del hipocampo y la zona subependimaria (SEZ) adyacente a los ventrículos laterales (LV) (Figura I6). Las NSCs del GD del hipocampo dan lugar a células gliales y neuronas en la capa granular del GD, las de la SEZ migrarán como precursores por el camino migratorio rostral

(RMS) hasta alcanzar el bulbo olfatorio (OB), donde se diferenciarán a interneuronas. Recientemente se ha demostrado que las NSCs de la SEZ también generan precursores oligodendrogliales que migran al cuerpo caloso y al estriado para diferenciarse en oligodendrocitos maduros (Menn et al., 2006). Existen además otras zonas actualmente en discusión y mucho menos caracterizadas donde se postula que pueda producirse neurogénesis post-embrionaria, entre ellas el propio OB, donde se generan localmente nuevas neuronas no procedentes de la SEZ (Gritti et al., 2002; Kornack and Rakic, 2001).

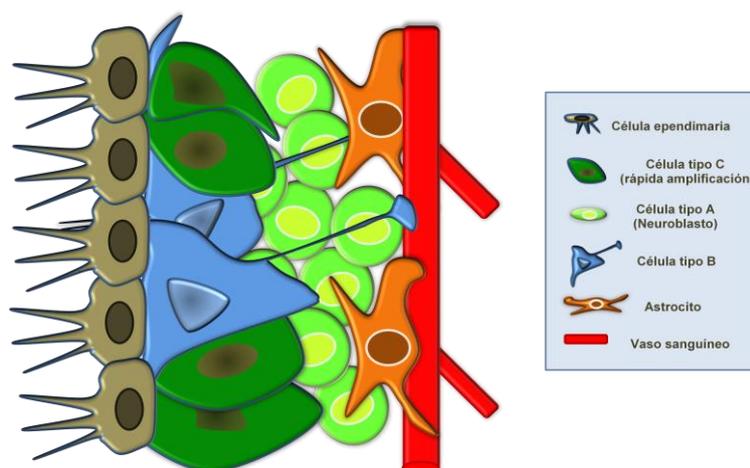


**Figura I6. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto.** Dibujo esquemático del corte sagital de un cerebro de ratón adulto. Las NSCs están presentes en condiciones normales en dos regiones germinales: la zona subependimaria (SEZ) adyacente a los ventrículos laterales (LV) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. OB: Bulbo olfatorio. RMS: Camino migratorio rostral.

## 2.3. Zona subependimaria

### 2.3.1. Estructura de la SEZ y neurogénesis

La SEZ (también llamada zona subventricular o SVZ) es un remanente del neuroepitelio embrionario que persiste durante toda la vida del adulto como una capa mitóticamente activa adyacente a la pared de los ventrículos telencefálicos laterales. En la SEZ del ratón adulto se han identificado diferentes tipos celulares distinguibles por sus características ultraestructurales y/o inmunocitoquímicas: NSCs o células tipo B, progenitores neurales o células tipo C, neuroblastos o células tipo A y células ependimarias (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997; Johansson et al., 1999). Asimismo en el nicho estarían presentes astrocitos y células endoteliales (Figura I7).



**Figura 17. Estructura de la SEZ.** Esquema donde se muestra la citoarquitectura de la SEZ según el modelo propuesto por Álvarez-Buylla.

En la SEZ, las NSCs o células tipo B son células con un ciclo de división lento y tienen las características estructurales e inmunocitoquímicas de los astrocitos, como es la reactividad para la proteína GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). Las células gliales se consideraban hasta hace poco como células especializadas, producto final de la diferenciación neural y con una función principal de soporte para las células neuronales. En los últimos años se ha evidenciado que células de la glía radial durante el desarrollo y una población específica de astrocitos en los mamíferos adultos funcionan como progenitores y células madre. Las NSCs de la SEZ forman parte de un linaje celular que se inicia con los progenitores neuroepiteliales durante el desarrollo y pasa por las células de la glía radial hasta llegar a los astrocitos germinales (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Las células tipo B son capaces de dividirse y generar progenitores más diferenciados o células tipo C, las cuales se dividen rápidamente y por eso se denominan progenitores de rápida amplificación. Las células tipo C pierden el estado indiferenciado de las B dejando de expresar GFAP y pasando a expresar marcadores más relacionados con la adquisición de un linaje neuronal o glial (Capela and Temple, 2002; Menn et al., 2006). Las células tipo C a su vez se diferencian dando lugar a neuroblastos o células tipo A. Estos neuroblastos se asocian en largas cadenas de migración rodeadas por astrocitos (llamadas también gliotubos) hasta el OB formando el RMS (Jankovski and Sotelo, 1996). Las células tipo A expresan una elevada cantidad de la proteína PSA-NCAM y mantienen la capacidad de proliferar durante su migración. Una vez alcanzado el OB los neuroblastos cambian la migración de tangencial a radial hasta alcanzar su posición en el OB y diferenciarse en interneuronas de las capas granular y periglomerular (Corotto et al., 1993; Luskin, 1993). Existe por tanto un linaje celular bien definido en la SEZ, que permite la generación de neuronas durante toda la vida del animal (Figura 18).



**Figura 18. Secuencia de las relaciones de linaje en condiciones normales en la SEZ.** B: Astrocito multipotencial de la SEZ, célula madre, C: progenitor de rápida amplificación, A: neuroblastos migradores, N: neuronas. La flecha azul indica la capacidad proliferativa

Las primeras evidencias que dan soporte a este modelo vinieron de estudios de marcaje retroviral de células GFAP+. Tras la eliminación de las células en proliferación mediante infusión intracraneal de citosina- $\beta$ -D arabinofuranósido (Ara-C), se demostró que células GFAP que estaban en estado quiescente se activaban y proliferaban reconstruyendo completamente la SEZ (Doetsch et al., 1999b; Pastrana et al., 2009; Seri et al., 2001). Estudios más recientes de destino celular utilizando la enzima Cre-recombinasa inducible bajo los promotores de las proteínas Gli, GFAP, GLAST (transportador de glutamato aspartato) y nestina han apoyado la evidencia del concepto de las células tipo B como los precursores primarios de nuevas neuronas en el cerebro adulto (revisado en (Dhaliwal and Lagace, 2011)).

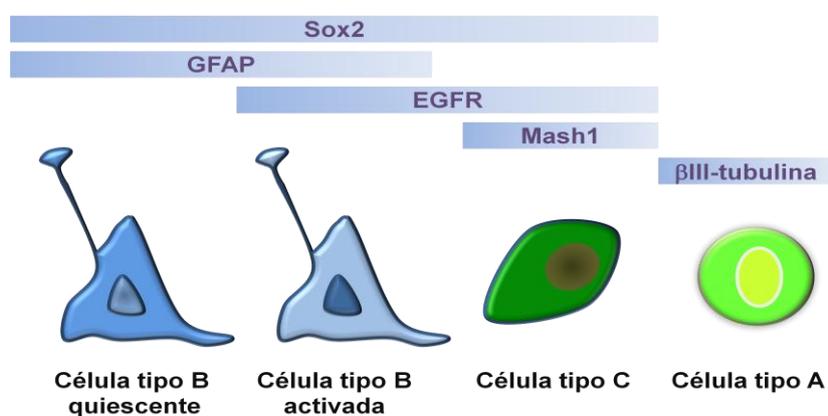
### 2.3.2. Marcadores moleculares de la SEZ

La definición de NSC se ha establecido inicialmente siguiendo criterios principalmente funcionales. La posibilidad de encontrar proteínas expresadas de manera diferencial por los diferentes tipos celulares de la SEZ, que pudieran llevar a su marcaje y purificación, ha llevado a la identificación de numerosos marcadores moleculares y a la tipificación inmunocitoquímica de las subpoblaciones celulares (Figura 19). Muchos de estos marcadores han sido empleados en este estudio:

- **GFAP.-** La GFAP es un marcador principalmente de astrocito maduro y de células de glía radial (Bignami and Dahl, 1973). En la SEZ, la proteína GFAP se expresa en células tipo B (tanto quiescentes como activadas) (Doetsch et al., 1999a), considerándose un marcador de NSCs, aunque también marca astrocitos diferenciados presentes también en el nicho germinal.
- **Sox2.-** Factor de transcripción que regula el desarrollo del sistema nervioso desde los estadios más tempranos del desarrollo, lo cual llevó a pensar que Sox2 podía estar regulando a los progenitores más indiferenciados, y entre ellos a las NSCs. Diferentes estudios involucran a Sox2 en el mantenimiento indiferenciado de las NSCs. Sox2 estaría expresado en la SEZ por las células tipo B y por los progenitores más restringidos (Conti and Cattaneo, 2005; Ellis et al., 2004). Este marcador se puede usar

en combinación con el marcador GFAP para distinguir a las células tipo B de los astrocitos diferenciados.

- **Mash1.-** Factor de transcripción tipo bHLH cuya expresión es esencial para la diferenciación neuronal durante la embriogénesis (Bertrand et al., 2002). Mash1 está expresado por progenitores más diferenciados de rápida amplificación (células tipo C) (aunque también lo expresan pero en un grado mucho menor algunas células tipo B) (Kim et al., 2011). En combinación con EGFR o Sox2 permite identificar a la población de células C.
- **$\beta$ III-tubulina.-** Marcador exclusivo de células tipo A. Es una proteína del citoesqueleto neuronal utilizada como marcador específico de neuronas de nueva generación. Lo expresan neuronas post-mitóticas tempranas y neuronas diferenciadas. (Memborg and Hall, 1995).
- **EGFR.-** El EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) se expresa tanto por células tipo C (Doetsch et al., 2002), como por las células tipo B una vez activadas. De hecho existe una clara inducción de su expresión en el proceso de regeneración de la SEZ tras el tratamiento con Ara-C (Pastrana et al., 2009). La expresión de EGFR en membrana permite identificar a poblaciones de células tipo C y tipo B en combinación con los marcadores Mash1 y GFAP respectivamente.



**Figura I9. Marcadores moleculares en la SEZ.** Marcadores específicos de cada tipo celular que permiten su identificación en la SEZ.

Además de los marcadores inmunocitoquímicos, otra de las características atribuidas a las NSCs y que puede ayudar en su identificación es que son células relativamente quiescentes. De hecho, antes de que se describiera la citoarquitectura de la SEZ se realizaron estudios mediante el marcaje con retrovirus y el uso de nucleósidos que permitieron determinar la existencia de dos poblaciones diferenciadas en cuanto a su ciclo celular, una población de células proliferativas con un ciclo de 12 horas de duración (progenitores neurales) y otra

población más quiescente con un ciclo de 15 días de duración (NSCs) (Doetsch et al., 1999a; Morshead et al., 1994; Morshead and van der Kooy, 1992; Tropepe et al., 1997). Por esta propiedad las NSCs se pueden marcar por la retención de nucleósidos como el BrdU a largo plazo, dado que su ciclo de división lento impide la dilución de los mismos (Johansson et al., 1999).

## **2.4. Mantenimiento y regulación de NSCs**

Como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar de que se ha conseguido aislar NSCs de diferentes regiones del cerebro adulto, la neurogénesis activa está restringida únicamente a dos nichos neurogénicos, la SEZ y la SGZ (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). El nicho neurogénico es el microambiente que da soporte y regula el comportamiento de las NSCs, incluyendo su mantenimiento, auto-renovación, destino celular y desarrollo (Kiel and Morrison, 2008; Li and Xie, 2005).

### **2.4.1. Componentes celulares y moleculares del nicho**

Los componentes celulares principales del nicho de la SEZ son la astrogliá, las células endoteliales, las células vasculares, la propia progenie de las NSCs y las neuronas maduras. En la SEZ, la vasculatura comprende una extensa red de vasos sanguíneos interconectados (Shen et al., 2008). La neurogénesis se produce cercana a los vasos sanguíneos (Palmer et al., 2000), estando las NSCs en contacto con la vasculatura a través de un pie vascular basal (Mirzadeh et al., 2008). Estos contactos entre las NSCs y los vasos sanguíneos son permeables, sugiriendo que los derivados sanguíneos tienen un acceso directo a las NSCs y a su progenie de la SEZ. Mediante estudios de co-cultivos de NSCs y células endoteliales procedentes de la SEZ adulta se ha visto que las células endoteliales promueven la auto-renovación de las NSCs y la neurogénesis (Shen et al., 2004). Además de las hormonas, factores de crecimiento y citoquinas que transportan los vasos, las células endoteliales también secretan factores que contribuyen a la regulación de las NSCs. Entre estos factores que liberan las células endoteliales se encuentra el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, *Pigment Epithelium-Derived Factor*), que se ha demostrado que estimula la neurogénesis adulta (Ramírez-Castillejo et al., 2006). Otro de los factores que promueve angiogénesis y neurogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), cuya infusión intraventricular también se traduce en un aumento en la producción de nuevas neuronas en el OB (Jin et al., 2002). El VEGF también está implicado en la supervivencia de las NSCs y la proliferación de precursores de oligodendrocitos *in vitro* (Le Bras et al., 2006; Wada et al., 2006). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una proteína que previene a las neuronas de la muerte durante su desarrollo. El hecho de que los ratones hemicigotos

presenten una reducción en la neurogénesis del hipocampo y que la infusión de BDNF de lugar a un mayor número de neuronas en el OB, otorga un papel a BDNF en el control de la neurogénesis (Pencea et al., 2001; Zigova et al., 1998).

Múltiples estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la astrogliá juega un papel clave en la regulación de la neurogénesis adulta: auto-renovación de las NSCs, especificación de destino celular, migración, diferenciación y finalmente integración sináptica en los circuitos preexistentes de nuevas neuronas (Barkho et al., 2006; Jiao and Chen, 2008; Ma et al., 2005). Los astrocitos están íntimamente asociados a la vasculatura y a su lámina basal, con sus podocitos rodeando los vasos sanguíneos. Deben actuar como interfase para modular la influencia de factores endoteliales y procedentes de la circulación, así como la disponibilidad de citoquinas y factores de crecimiento en la lámina basal. *In vitro* los astrocitos derivados de la SEZ promueven la proliferación y diferenciación de NSCs (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002). Los astrocitos de la SEZ expresan receptores Robo que regulan la migración rápida de los neuroblastos Slit-1 a través del RMS (Kaneko et al., 2010) y también segregan glutamato para promover la supervivencia de los neuroblastos (Platel et al., 2010). En la SGZ los astrocitos secretan Wnt3 (Song et al., 2002), que promueve la proliferación y la determinación del fenotipo neural (Lie et al., 2005). De hecho la sobre-expresión de  $\beta$ -catenina aumenta la auto-renovación de las NSCs *in vitro* (Chenn and Walsh, 2002). Asimismo se ha demostrado que la astrogliá secreta Shh (*Sonic hedgehog*) que promueve el ciclo celular de los progenitores neurales (Jiao and Chen, 2008). La señalización por la vía de Shh está activada en las NSCs y es necesaria durante la neurogénesis posnatal y adulta para el establecimiento y mantenimiento de las NSCs tanto en la SEZ como en la SGZ (Ahn and Joyner, 2005). Shh actúa directamente sobre la población de células GFAP+ (células tipo B) así como sobre los precursores neurales GFAP- (células tipo C), regulando su proliferación (Machold et al., 2003; Palma et al., 2005).

En la SEZ las células endimarias forman un escudo que protege al nicho neurogénico. También regulan la quiescencia de las NSCs por contactos célula a célula y señales de difusión. Las células endimarias regulan activamente la especificación de destino celular neural mediante la secreción de Noggin que bloquea los efectos gliogénicos de las BMPs producidas por las células de la SEZ (Gomes et al., 2003; Lim et al., 2000a). Además, se postula que el propio batido de los cilios de las células endimarias crea un gradiente de concentración molecular que dirige la migración de los neuroblastos al OB (Sawamoto et al., 2006).

Otro componente fundamental en el mantenimiento de los nichos neurogénicos son los contactos célula-célula que permiten la activación de varias vías de señalización, entre las que destaca la vía de Notch1. Tanto Notch1 como su ligando Jagged se expresan en la SEZ y la

SGZ (Stump et al., 2002). En la SEZ adulta, la delección de RBPj (mediador aguas abajo de todos los receptores Notch), activa las NSCs para diferenciarse en progenitores de rápida amplificación, teniendo como resultado final la depleción de las NSCs quiescentes y la pérdida de la neurogénesis (Imayoshi et al., 2010). Por otro lado la activación transitoria de Notch causa una pérdida de la capacidad neurogénica acompañada de una diferenciación glial acelerada (Gaiano et al., 2000; Morrison et al., 2000). La actividad transcripcional de Notch se ha relacionado con un aumento en la auto-renovación de las NSCs y además promueve la expresión del EGFR (Andreu-Agulló et al., 2009).

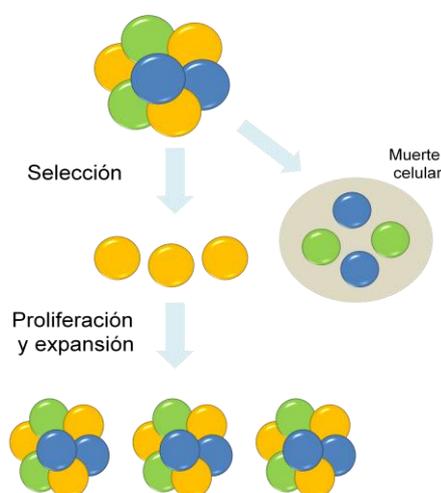
#### **2.4.2. Regulación de las NSCs por el factor de crecimiento EGF**

Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) actúan como mitógenos muy potentes para la activación de las NSCs adultas *in vitro*. *In vivo* ambos factores promueven la proliferación en la SEZ, pero sólo la infusión de FGF2 en la SEZ incrementa el número de nuevas neuronas que llegan al OB (Kuhn et al., 1997). Por su lado la infusión de EGF promueve la proliferación y migración de las células B y C en la SEZ, e inhibe la diferenciación de células tipo C en neuroblastos aumentando la generación de astrocitos en el OB y en el estriado (Doetsch et al., 2002). En lesiones de desmielinización del cuerpo calloso se ha visto que la infusión de EGF en la SEZ promueve la diferenciación astrocitaria (Cantarella et al., 2008), pero también la aparición en las zonas lesionadas de oligodendrocitos procedentes de células B de la SEZ (Gonzalez-Perez et al., 2009). También se ha observado que tras lesiones isquémicas existe una mayor proliferación de progenitores en la SEZ que es dependiente de EGF (y conlleva una mayor expresión de EGFR), pero no de FGF2 (Alagappan et al., 2009). Todos estos trabajos sugieren que EGF y FGF2 difieren en su mecanismo de actuación sobre las NSCs, e incluso se ha postulado que dichos factores de crecimiento podrían actuar sobre diferentes tipos celulares, aunque actualmente es un tema aún en discusión. En cualquier caso se ha demostrado que la expresión del receptor de EGF permite identificar a células tipo C y a células B activadas (Pastrana et al., 2009) y que la separación de células EGFR+ por citometría de flujo permite un enriquecimiento en células formadoras de esferas, tanto en el individuo adulto como durante el desarrollo (Ciccolini et al., 2005). Todo ello refleja el valor que tiene la señalización a través del EGFR para la homeostasis de la SEZ.

#### **2.5. Características *in vitro* de NSCs**

Las NSCs se definen en base a sus características funcionales como unas células capaces de auto-renovarse, proliferar y dar lugar a todos los tipos celulares del linaje neural. Fueron estas características las que permitieron desarrollar un método para aislar NSCs y

cultivarlas *in vitro* (Reynolds and Weiss, 1993). Las NSCs son capaces de proliferar sin un sustrato adhesivo, en ausencia de suero y en presencia de mitógenos (EGF y/o FGF) formando unos agregados esféricos a los cuales se les denomina “neuroesferas” (Morshead et al., 1994; Reynolds and Weiss, 1992). Estas neuroesferas crecidas a baja densidad se generan cada una de una única célula madre y se utilizan para obtener una estimación tanto del número de NSCs presentes en la SEZ (neuroesferas primarias) como del número de NSCs del cultivo (neuroesferas secundarias). Esta estimación es una aproximación al número de NSCs, pero no puede ser tomado como un valor absoluto, dado que existen numerosas evidencias que apuntan a que los progenitores (células tipo C) también podrían formar neuroesferas *in vitro*, o incluso que podrían activar programas latentes ante estímulos como una elevada cantidad de EGF y comportarse como NSCs (Doetsch et al., 2002). Sin embargo se ha propuesto que, a diferencia de las NSCs, estos progenitores tienen más restringida su capacidad de auto-renovación y no serían capaces de mantenerse largos periodos de tiempo en cultivo (Louis et al., 2008). Actualmente se piensa que las neuroesferas no son homogéneas en su composición (Brazel et al., 2005; Dromard et al., 2007), conteniendo un pequeño porcentaje de NSCs (1 a 2 %) y progenitores más o menos diferenciados. Cuando alcanzan un tamaño adecuado, las neuroesferas se pueden disgregar a células individuales química o mecánicamente, de forma que las NSCs que componen la neuroesfera serán capaces de volver a regenerar una esfera completa, expandiendo indefinidamente el cultivo y estableciendo así líneas de NSCs estables (Galli et al., 2003) (Figura I10).



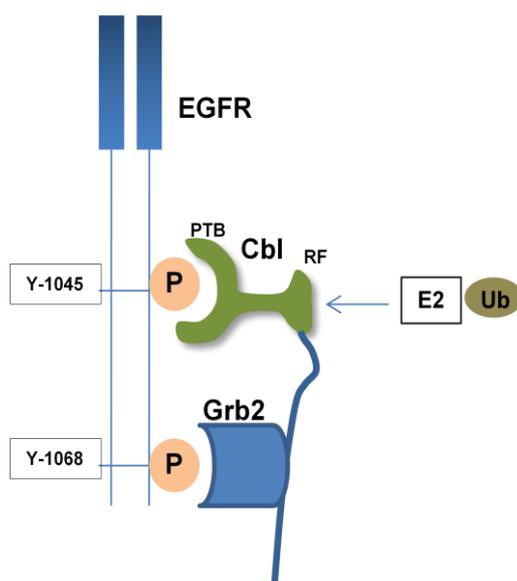
**Figura I10. Esquema de la expansión *in vitro* de las NSCs.** Las esferas una vez formadas en cultivo se disgregan a células individuales. Las esferas no tienen una composición homogénea sino que están formadas por NSCs y progenitores más o menos diferenciados. Tan sólo las células más indiferenciadas son capaces de dar lugar a nuevas neuroesferas propagando el cultivo.

Por último estas neuroesferas se pueden diferenciar mediante su adhesión a sustrato y eliminación de mitógenos generando neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, los tres tipos celulares del SNC (Reynolds and Weiss, 1996).

## 2.6. Regulación de la estabilidad del EGFR

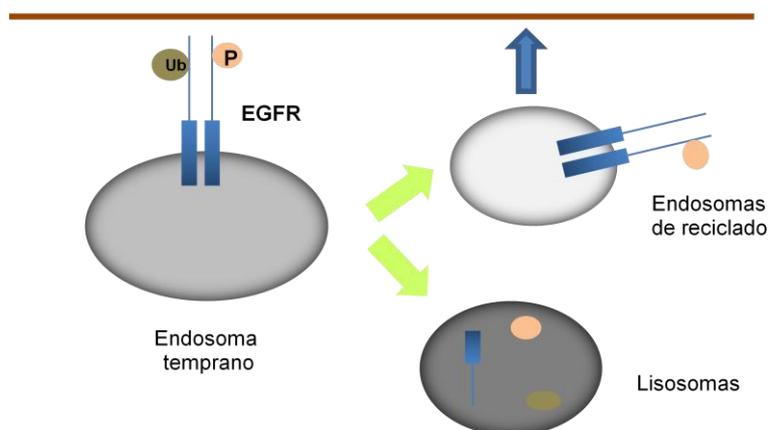
Como se ha mencionado anteriormente, la presencia del receptor de EGF en membrana permite identificar a las células formadoras de esferas (Pastrana et al., 2009; Ciccolini et al., 2005). Por lo tanto, la regulación de la estabilidad de EGFR es importante para la capacidad de auto-renovación de las NSCs.

En respuesta al ligando EGF el EGFR se internaliza y degrada rápidamente, lo cual comporta una rápida reducción del número de receptores disponibles en la superficie celular. Este es el mayor mecanismo de control de la intensidad y la duración de la señalización a través del EGFR (Wells et al., 1990). En condiciones basales en ausencia de activación por el ligando, la tasa de internalización del EGFR es comparable a la tasa de recambio de la propia membrana plasmática (Chang et al., 1993; Resat et al., 2003; Wiley et al., 1991). La unión del EGF al EGFR conlleva la dimerización del EGFR y la activación del mismo, así como una aceleración de la tasa de internalización del receptor (Wiley et al., 1991). En condiciones fisiológicas (baja concentración de EGFR) la mayor parte de la internalización se produce por vesículas recubiertas de clatrina, aunque en condiciones de sobre-expresión de EGFR y/o mayor concentración de EGF pueden actuar otros mecanismos, como pinocitosis o caveolas (Huang et al., 2004a; Wiley, 1988). En la mayoría de tipos celulares la endocitosis del EGFR es dependiente de la proteína Grb-2. Grb-2 consiste en un dominio SH2 y dos dominios SH3. Los dominios SH2 se unen a tirosinas fosforiladas del receptor y los dominios SH3 son capaces de acoplar otras proteínas como es el caso de la E3 ubiquitina ligasa Cbl (Thien and Langdon, 2005), proteína implicada en la internalización y degradación del receptor (Levkowitz et al., 1998). Sin embargo se ha descrito que la propia proteína Cbl es capaz de unirse de manera directa al EGFR mediante un dominio de unión a tirosina quinasa (Levkowitz et al., 1999) (Figura I11).



**Figura I11. Regulación del EGFR por Cbl.** En respuesta a EGF el receptor fosforilado recluta a Cbl a través de su dominio de unión a Grb2, a la vez que el dominio *ring finger* de Cbl reúne moléculas E2 cargadas con ubiquitina. Además Cbl se une también al receptor a través de su dominio PTB. PTB: dominio de unión a fosfotirosina, RF: *ring finger*.

Estos complejos EGF-EGFR con proteínas asociadas se internalizan y se funden con endosomas tempranos. El pH de los endosomas tempranos e intermedios es poco ácido (6.0 a 6.5), permitiendo que los complejos EGF-EGFR-Grb2-Cbl no se disocien (Sorkin et al., 1988). Es durante la maduración del endosoma cuando se produce el reciclado del complejo EGF-EGFR de los endosomas de nuevo a la superficie celular. En cambio el EGFR que ha sido ubiquitinado por Cbl es enviado a los lisosomas para su posterior degradación (Figura I12) (Huang et al., 2006; Levkowitz et al., 1999).



**Figura I12. Balance entre degradación y reciclaje del EGFR.** El EGFR es internalizado junto con sus proteínas asociadas. El reciclado del EGFR no ubiquitinado tiene lugar en el paso de endosomas tempranos a tardíos. El EGFR ubiquitinado permanece en los endosomas para su posterior degradación.

Muchos de los mecanismos de regulación del EGFR se producen por proteínas que interfieren con la actividad de Cbl. Este es el caso de la proteína Sprouty2 (Spry2) que es capaz de unirse al dominio de unión a tirosina quinasa de c-Cbl y al *ring finger* que contiene la actividad E3 ligasa, reduciendo la ubiquitinación del EGFR y, por lo tanto, fomentando su reciclaje a la membrana plasmática en detrimento de su degradación (Rubin et al., 2003; Wong et al., 2002).

### 3. GLIOBLASTOMAS Y “CÉLULAS INICIADORAS DE TUMOR”

#### 3.1. Definición y clasificación gliomas

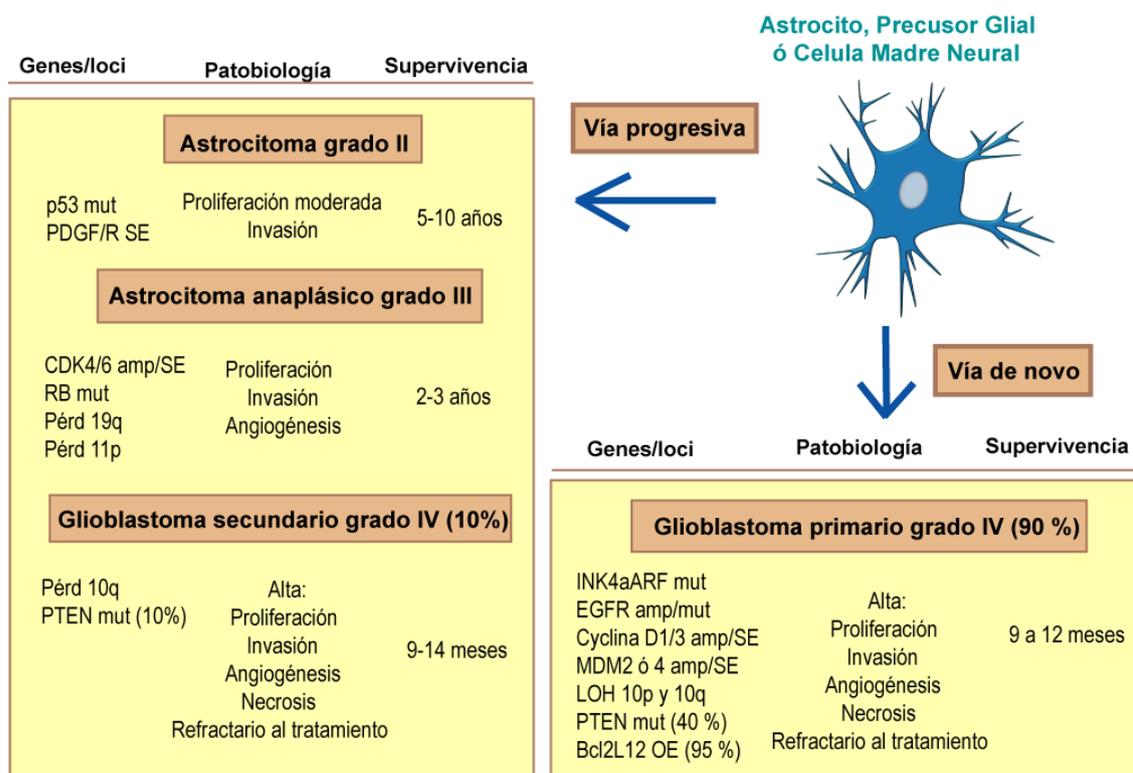
Los gliomas son tumores primarios del SNC que se clasifican según criterios histológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos de acuerdo a la semejanza que presentan con las células estromales normales del cerebro, clasificándose en: astrocitomas (astrocitos), oligodendrogliomas (oligoendrocitos) y oligoastrocitomas (características mixtas entre astrocitos y oligodendrocitos). Asimismo la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los gliomas desde grado I hasta grado IV según una escala basada en su malignidad y en la presencia de diferentes características fenotípicas y alteraciones genéticas (Louis et al., 2007):

- **Tumores grado I.-** Corresponden a tumores benignos que pueden ser curados si se pueden intervenir quirúrgicamente con éxito ya que no son invasivos.
- **Tumores grado II.-** Tumores con bajo grado de malignidad que tienen una lenta progresión clínica pero que no son curables por cirugía debido a la existencia de infiltración en el tejido cerebral circundante al tumor.
- **Tumores grado III.-** Presentan mayor anaplasia y proliferación que los tumores grado II y una evolución clínica mucho más rápida.
- **Tumores grado IV.-** Mayor grado de malignidad que el grado III con la aparición de proliferación vascular y necrosis, y una supervivencia muy baja de entre 9 a 14 meses.

Los glioblastomas (GBM) corresponden según la clasificación de la OMS a un astrocitoma grado IV y se caracterizan por tener una alta heterogeneidad celular intra-tumoral, cambios anaplásicos, una alta proliferación celular, infiltración difusa, áreas de necrosis en empalizada, elevada angiogénesis, resistencia a la apoptosis, y una alta inestabilidad genómica.

El GBM es uno de los tumores más letales en humanos, con un índice de supervivencia a 5 años de tan sólo el 2% de los pacientes (Paulino and Teh, 2005). Los GBM pueden aparecer *de novo* (GBM primarios, mayormente en pacientes de más edad) o ser la consecuencia de la progresión de un astrocitoma de más bajo grado que progresa normalmente de grado II hacia III/IV en aproximadamente 5 a 10 años desde el diagnóstico inicial (GBM secundarios, pacientes por debajo de 45 años mayoritariamente). A pesar de ser

histológicamente indistinguibles se han encontrado diferencias en cuanto al tipo de alteraciones moleculares presentes en uno y otro tipo de GBM (Figura I13).



**Figura I13. Aberraciones genéticas y cromosómicas implicadas en la génesis de GBM.** En la figura se muestran las relaciones existentes entre las lesiones moleculares que llevan a la formación de GBM tanto primarios como secundarios, supervivencia y patobiología. Aunque histológicamente ambos tipos son indistinguibles presentan alteraciones genéticas diferentes. Pérd: pérdida, SE: sobre-expresión, mut: mutante, amp: amplificado.

La alta heterogeneidad celular que se encuentra en los GBMs es una de las posibles causas de la recurrencia que se observa en estos pacientes. Principalmente existen dos modelos que pueden explicar esta elevada heterogeneidad celular intra-tumoral. El primero de ellos es un modelo estocástico, donde las células tumorales tienen una probabilidad aleatoria de adquirir mutaciones debido a influencias del microambiente o a la inestabilidad genómica, que les permiten mantener el crecimiento del tumor y que determinan la progresión de los tumores. El segundo modelo correspondería a un modelo jerárquico donde el crecimiento del tumor dependería de una subpoblación celular a la cual se ha llamado “células iniciadoras de tumor” (*Tumor Initiating Cells, TICs*), o también denominadas “células madre tumorales” o “células repobladoras del tumor” (Magee et al., 2012).

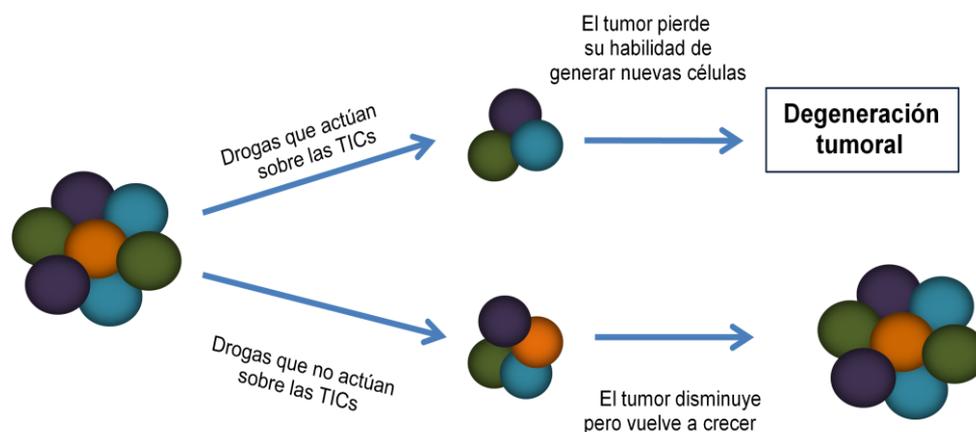
### 3.2. Hipótesis de las células iniciadoras de tumor

Según el modelo de las TICs existe una pequeña sub-población de células cancerosas (las células madre tumorales) que constituyen un reservorio de células auto-suficientes y con capacidad de auto-renovación y mantenimiento del tumor. De manera análoga a las células madre normales, las TICs tienen la capacidad de dividirse y expandir la reserva de células madre tumorales y de diferenciarse en los diferentes tipos celulares que componen la masa del tumor. Estas células madre tumorales se definen experimentalmente por su capacidad de regenerar un tumor tras ser trasplantadas.

Las primeras evidencias que indicaban que en algunos tumores humanos se encuentran células con propiedades más primitivas que el resto del tumor y con unas propiedades cinéticas diferentes vienen de estudios con timidina tritiada en cánceres sanguíneos hacia 1960. Más adelante, en la década de los noventa, se definió una subpoblación de células dentro de la leucemia mieloide aguda que eran capaces de regenerar estos tumores en ratones inmunodeprimidos irradiados (Lapidot et al., 1994). Estas células madre de leucemia aguda tienen en la mayoría de los casos un fenotipo CD34+CD38- similar al que se encuentra en los progenitores hematopoyéticos (Bonnet and Dick, 1997).

En el año 2004 diferentes grupos publicaron la existencia en los GBMs de unos precursores transformados que presentaban todas las características funcionales esperadas en una célula madre incluyendo el atributo principal de las TICs que es la capacidad de regenerar un tumor al ser trasplantadas (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003; Yuan et al., 2004). Estas células, al igual que las NSCs, se pueden cultivar en ausencia de suero y en presencia de los mitógenos EGF y bFGF. En estas condiciones dichas células forman unos agregados similares a las neuroesferas formadas por las NSCs y, al ser trasplantadas, recapitulan mejor las características del tumor del paciente que las líneas celulares de TICs de GBMs crecidas en suero (Lee et al., 2006). Esta subpoblación celular tumoral comparte atributos con las NSCs como son la expresión de los marcadores neurales Sox2 y Nestina, la capacidad de auto-renovación, y la diferenciación a diferentes tipos celulares dentro del linaje neural (Dirks, 2010; Nicolis, 2007; Sutter et al., 2007). Además numerosas rutas de señalización alteradas en GBMs juegan un papel importante en la regulación de la proliferación y la expansión del compartimento de NSCs en el cerebro (Gil-Perotin et al., 2006; Groszer et al., 2006; Meletis et al., 2006; Molofsky et al., 2006), y su pérdida de función en el ratón se asocia con una proliferación descontrolada de los precursores neurales. Este es el caso también del mitógeno EGF, necesario junto con el bFGF para mantener *in vitro* las características de célula madre en NSCs y TICs de GBMs (Lee et al., 2006) y cuyo receptor el EGFR se encuentra mutado en aproximadamente un 40% de los GBM.

Desde el punto de vista terapéutico esta subpoblación celular con características de célula madre ha demostrado ser resistente a los tratamientos convencionales de radio y quimioterapia, considerándose responsable de la recurrencia de los tumores (Figura I14) (Bao et al., 2006). Idealmente las nuevas estrategias terapéuticas deberían ir dirigidas a eliminar las TICs si se quieren obtener beneficios clínicos a largo plazo.



**Figura I14. Acción de las drogas tumorales sobre las TICs de GBMs.** En los tratamientos de quimio- y/o radioterapia convencionales las drogas actúan sobre la masa del tumor sin alterar a las TICs de GBMs, lo cual produce una disminución de la masa tumoral a corto plazo, pero al cabo del tiempo el tumor es capaz de regenerarse. Las drogas específicas contra las TICs actuarían sobre las células mantenedoras del tumor, impidiendo su regeneración a largo plazo.

Entre los diferentes mecanismos que se han propuesto para esta radio- y quimioresistencia de las células madre tumorales están entre otros el incremento en la capacidad de reparación de daño en el DNA (Bao et al., 2006), o el aumento de la señalización a través de las vías de Notch y Wnt- $\beta$ -Catenina (Chen et al., 2007). Asimismo se ha descrito que en gliomas el bloqueo del EGFR conduce a un aumento de la radiosensibilidad de las células madre tumorales (Lammering et al., 2004). Las TICs de GBMs expresan además una mayor cantidad de proteínas relacionadas con la invasión que las demás células de la masa tumoral (Cheng et al., 2011; Ricci-Vitiani et al., 2010), pudiendo estar implicadas en la alta infiltración, característica de este tipo de tumores.

### 3.3. Marcadores de TICs de GBMs

La búsqueda de células madre tumorales en tumores sólidos conlleva, entre otras dificultades, la falta de marcadores de superficie de célula madre normal del tejido que permita aislar las células madre tumorales. El primer marcador de TICs de GBMs que se describió fue la Prominina1 (CD133) que se había descrito anteriormente como un marcador de NSC

embrionaria (Uchida et al., 2000) y de célula madre hematopoyética (Yin et al., 1997). Mediante separación celular basada en fluorescencia con este marcador de superficie se aislaron células tumorales positivas para dicho marcador que eran capaces de reconstruir el GBM al trasplantar un pequeño número de ellas en ratones inmunodeprimidos NOD/SCID, al contrario que las células tumorales CD133- que no eran capaces de regenerar el tumor (Singh et al., 2004b). Además, las células CD133+ eran las únicas capaces de formar esferas *in vitro* (Singh et al., 2003). Más adelante diferentes estudios correlacionaron la cantidad de células CD133+ en un tumor cerebral humano con una peor evolución del paciente (Beier et al., 2008; Pallini et al., 2008; Thon et al., 2010). Pocos años más tarde varios grupos sugirieron que la habilidad de formar tumores reside tanto en la población CD133 positiva como en la población CD133 negativa, (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010; Clément et al., 2009; Wang et al., 2008), con ambas poblaciones formando esferas en cultivo. Estos resultados ponen en duda el uso de CD133 como marcador único para identificar a las TICs en GBM.

Otro de los marcadores que se ha utilizado en NSCs adultas y embrionarias de ratón es el marcador CD15 (también llamado SSEA-1 o LewisX (LeX))(Capela and Temple, 2002, 2006). Este marcador distingue una subpoblación dentro del tumor positiva para CD15 con una mayor capacidad clonogénica (Son et al., 2009), pero en todo caso no consigue purificar la población de células iniciadoras de tumor, sino que únicamente la enriquece.

La integrina  $\alpha 6$  es un componente del receptor de la laminina ( $\alpha 6 \beta 1$ ) que es expresada por los progenitores neurales durante el desarrollo (Georges-Labouesse et al., 1998; Loulier et al., 2009) y por diferentes tipos de progenitores en el cerebro adulto (Kazanis et al., 2010). La expresión de esta integrina en superficie también puede enriquecer la población de células con capacidad de iniciación de GBMs (Lathia et al., 2010). Por otro lado se ha descrito que se pueden identificar TICs de GBM por la expresión del epítipo de superficie celular A2B5 (Ogden et al., 2008; Tchoghandjian et al., 2010) y también por la presencia en la membrana de la molécula de adhesión celular L1CAM (Bao et al., 2008). Otro marcador recién incorporado a la lista de posibles identificadores de células iniciadoras de GBMs es CD90, que separa una subpoblación del tumor con mayor capacidad de formación de esferas y que se encuentra *in vivo* en células adyacentes a la microvasculatura tumoral (He et al., 2011).

El hecho de que, a pesar de todos los esfuerzos que se están realizando para encontrar marcadores específicos de TICs de GBMs, no se haya podido encontrar un marcador único, pone de manifiesto la naturaleza altamente heterogénea de esta enfermedad, así como la posibilidad de que este tipo de tumores se puedan originar por mutaciones en diferentes tipos celulares.

### 3.4. Origen de los gliomas y las NSCs

Existen muchos estudios que indican que las NSCs humanas se localizan también en la SEZ, igual que sucede en el ratón adulto (Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2004). La gran capacidad de auto-renovación de las NSCs les hace candidatas a acumular alteraciones genéticas y epigenéticas, convirtiéndolas en candidatas para iniciar un tumor cerebral. Clínicamente muchos tipos de tumores del SNC se asocian con la pared del ventrículo lateral, teniendo al menos un punto de contacto con dicha pared. Esto sugiere un posible origen tumoral en el compartimento de células madre (Barami et al., 2009). No obstante esto no es así para todos los tumores del SNC, algunos de los cuales no tienen ninguna conexión con el ventrículo. Las células madre y su progenie podrían ser una de las fuentes de origen de tumores, pero no la única existente. Otras células menos indiferenciadas podrían readquirir las características propias de una célula madre, como la auto-renovación o un perfil de proliferación menos restringido, como una parte del proceso de transformación neoplásica, como se ha demostrado en leucemias experimentales (Krivtsov et al., 2006). En todo caso existen varios modelos de lesiones oncogénicas en animales que apoyan que estas zonas activas donde residen las NSCs son más propensas a la gliomagénesis. La introducción de la forma constitutivamente activa del EGFR y la supresión de los genes Ink4a/Arf en NSCs, conduce a la formación de gliomas de alto grado (Bachoo et al., 2002). La supresión de NF1 o PTEN en la población GFAP+ en ratones p53 nulos, genera GBMs de alta penetrancia (Zhu et al., 2005). La frecuencia de inicio de tumores en respuesta a Ras oncogénico en la población GFAP+ es mayor cuando la diana es la SEZ o el hipocampo que el córtex, por lo cual la frecuencia de inicio de tumor es menor en los astrocitos maduros que en las NSCs (Marumoto et al., 2009).

Independientemente del origen celular de los GBMs (NSCs, progenitores gliales o células somáticas con propiedades adquiridas), lo importante desde el punto de vista terapéutico es la existencia en determinados tipos de gliomas de una población maligna con propiedades de célula madre, responsable del crecimiento y de las recidivas tumorales.

### 3.5. EGFR y GBMs

Una de las alteraciones más comunes en GBMs es la activación de la señalización a través de los receptores tirosina quinasa. Los gliomas activan estas vías a través de varios mecanismos como son la sobre-expresión tanto del ligando como del receptor, creando un bucle autocrino, por amplificación genómica del receptor y/o por mutaciones que conllevan la aparición de receptores constitutivamente activos en ausencia de ligando.

Como ya se ha mencionado, la sobre-expresión del EGFR se produce aproximadamente en un 40% de los GBM. La activación de la vía de EGFR se produce por amplificación génica o bien a través de mutaciones. La más común produce la delección de los exones 2 al 7 del EGFR (variedad llamada EGFRvIII), dando lugar a una forma truncada constitutivamente activa que está presente en la mitad de los GBMs con amplificación de dicho receptor. La señalización a través del EGFR tiene una gran importancia en la patogénesis de los GBMs, confiriendo a las células tumorales un mayor carácter tumorigénico, incrementando la proliferación y la resistencia a la apoptosis de las mismas tanto *in vivo* como *in vitro* (Huang et al., 1997; Mazzoleni et al., 2010; Nagane et al., 1996; Narita et al., 2002; Nishikawa et al., 1994), así como aumentando la capacidad invasiva y promoviendo la infiltración propia de estos tumores (Anand et al., 2011). Además la vía del EGFR controla la expresión de marcadores de célula madre en GBMs (Jin et al., 2011) y su expresión podría identificar una subpoblación de células más agresivas dentro del tumor (Mazzoleni et al., 2010).

Otra manera en la que EGFR podría inducir señales oncogénicas es mediante alteraciones en su mecanismo de degradación, que permitieran niveles constantes de señalización. La propia sobre-expresión del EGFR puede saturar las vesículas recubiertas de clatrina y los adaptadores endosomales necesarios para su internalización y degradación (French et al., 1995), conduciendo a una situación patológica. De hecho existen diferentes estudios que relacionan los niveles de EGFR con un aumento en la síntesis de DNA (Coker et al., 1994) y un aumento de la supervivencia celular (Ewald et al., 2003), independientemente del estado de activación del receptor. Esta dualidad entre la activación constitutiva y los niveles de EGFR podría explicar la poca eficacia de los tratamientos actuales utilizados en clínica con inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor. Estos tratamientos bloquean la activación de las vías PI3-K/Akt y MAPK, aguas abajo del receptor, uniéndose al dominio intracelular de los receptores y compitiendo por la unión de moléculas de adenosín trifostato (Karpel-Massler et al., 2009; Wheeler et al., 2010). Este bloqueo de la señalización a través del EGFR parece producir un efecto citoestático (Harari, 2004), de forma que al eliminar el inhibidor las células vuelven a crecer activamente. En cambio, la disminución de los niveles de EGFR mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi) se ha visto que reduce la proliferación e induce apoptosis celular (Nagy et al., 2003), ralentizando el crecimiento de las TICs de GBMs tanto *in vitro* como *in vivo* aumentando notablemente la supervivencia de los animales trasplantados (Kang et al., 2006; Mazzoleni et al., 2010). La alteración de las diferentes proteínas encargadas del tráfico intracelular del receptor también puede llevar a la alteración de la señalización a través del EGFR. Un ejemplo es la proteína Mig-6 que está implicada en el tráfico del EGFR de endosomas tempranos a tardíos promoviendo su degradación y cuya pérdida en GBMs produce un aumento de los niveles de EGFR y por tanto un aumento de la señalización a través del receptor (Ying et al., 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente es necesario el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a regular los niveles de EGFR, bien actuando directamente sobre su nivel de expresión o incluyendo dianas terapéuticas dentro de las moléculas implicadas en el tráfico intracelular del receptor.





# Metodología



## 1 ANIMALES

### 1.1 Cepas de animales

Los animales utilizados en este trabajo se mantuvieron en los estabularios de la Universidad de Valencia y del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de salud Carlos III, y en ambos casos permanecieron bajo control veterinario. Los animales adultos utilizados en todo el trabajo estaban comprendidos entre 2 y 12 meses de edad. Todos los procedimientos realizados cumplieron la normativa española vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 (BOE 21 octubre 2005).

Para el estudio en las NSCs se utilizaron ratones de fenotipo salvaje o bien portadores de una copia inactiva del gen *Dyrk1A* (*Dyrk1A<sup>+/-</sup>*) (Altafaj et al., 2001; Fotaki et al., 2002) (ver introducción), todos ellos con el fondo genético CD1/ICR. Los animales de esta cepa fueron cedidos por el laboratorio de la Dra. Mariona Arbonés.

Los ratones atímicos inmunodeprimidos (*Athyimic Nude Foxn1<sup>nu</sup>*, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), fueron adquiridos a Harlan Ibérica.

### 1.2 Genotipado de animales *Dyrk1A*

Los animales se genotiparon mediante el análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA genómico. Para la extracción se digirió aproximadamente 0,5 cm de cola de ratón, usando para ello 400 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 200 mM, SDS 2%, EDTA 5 mM y 200 µg/ml de proteinasa k (Fermentas)) durante 12 horas a 60 °C en agitación. La muestra se centrifugó para eliminar restos sin digerir durante 8 min. a 14.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se añadieron 75 µl de acetato potásico 8 M y 500 µl de cloroformo (Sigma) y se mezcló todo volteando varias veces el tubo. Tras una incubación de una hora a -80 °C se centrifugó la mezcla durante 8 min. a 14.000 rpm para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se tomaron 200 µl de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo limpio, al que posteriormente se le añadió 1 ml de etanol (EtOH) al 100 % para precipitar el DNA. Se separó el DNA precipitado con ayuda de una varilla de vidrio, se lavó la varilla con EtOH al 70 % y se dejó durante 30 min. a temperatura ambiente para evaporar los restos de etanol, dado que estos restos pueden interferir en la PCR. Posteriormente se resuspendió el DNA genómico mediante la inmersión de la varilla en 100 µl de agua miliQ. Para la PCR se hizo una mezcla de reacción con un volumen final de 24 µl conteniendo: tampón de la enzima Taq polimerasa (Eppendorf) 1X, dNTPs 2,4 mM, cebadores (directo y reverso) 0,06 µM y 0,75 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Eppendorf). La

reacción se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) con el programa de genotipado: desnaturalización inicial a 96 °C 3 min., fase de amplificación (40 ciclos) a 94 °C, 30 seg., 60 °C, 35 seg., 72 °C, 40 seg., y una fase final de elongación a 72 °C 10 min. La lista de los cebadores utilizados está recogida en la tabla M1. Los tamaños de los diferentes productos de amplificación se discriminaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % preparado en tampón Tris-borato-EDTA (TBE: Tris 8,9 mM pH 8, ácido bórico 8,9 mM y EDTA 2 mM) con 10 µg/ml de bromuro de etidio. Como tampón de carga se utilizó una solución al 6X consistente en: glicerol 50 %, azul de bromofenol 0,05 %, cianol de xileno 0,05 % y EDTA 100 mM. Como marcador de tamaño se cargó en una calle del gel 1 µg de marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas). Los tamaños de los productos de PCR resultantes fueron: banda *Dyrk1A* silvestre 928 pb y banda mutante 592 pb.

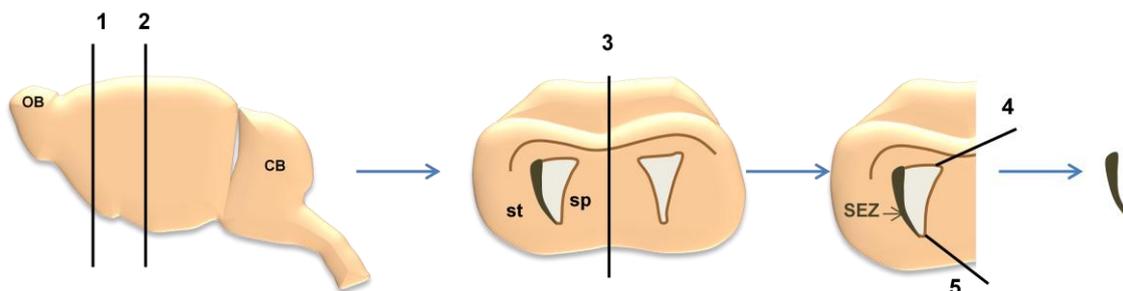
## **2 CULTIVO PRIMARIO Y MANTENIMIENTO DE NEUROESFERAS DE LA SEZ DE RATÓN ADULTO**

### **2.1 Medios de cultivo**

- **Medio control.-** DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12*; Invitrogen), glucosa 0,6 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 %, HEPES 5 mM, L-glutamina (Invitrogen) 2 mM, penicilina/estreptomicina (Invitrogen) 50 unidades/ml y 10 % de la solución hormonal 10X.
- **Medio completo.-** Medio control suplementado con: BSA (albúmina de suero bovino, Sigma) 0,4 %, heparina (Sigma) 0,7 unidades/ml, EGF (Invitrogen) 20 ng/ml y FGF2 (Sigma) 10 ng/ml.
- **Solución de digestión enzimática.-** EBSS (*Earle's Balanced Salts Solution*, Invitrogen), L-cisteína (Sigma) 0,2 mg/ml, EDTA (Sigma) 0,2 mg/ml y papaína (Worthington DBA) 0,9 mg/ml.
- **Solución hormonal 10X.-** DMEM/F12, glucosa 0,5 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,09 %, HEPES 4 mM, apo-t-transferrina (Sigma) 0,8 mg/ml, insulina (Sigma) 0,2 mg/ml, putrescina (Sigma) 90 mg/ml, progesterona (Sigma) 160 nM y Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 240 nM.
- **Solución de lavado.-** DMEM/F12, glucosa 0,6 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 %, HEPES 5 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 50 unidades/ml.

## 2.2 Cultivo primario

Para la obtención de cultivos de NSCs de la SEZ se sacrificaron animales de dos a tres meses de edad por dislocación cervical. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en PBS (tampón fosfato 0,1M pH 7,4 y 0,9 % NaCl, Invitrogen) frío para la posterior disección. Se realizaron dos cortes coronales anterior y posterior a la SEZ (Figura M1). Después se separaron los dos hemisferios con un corte longitudinal en la línea media. Una vez separados los hemisferios se realizaron dos cortes para eliminar el *septum* y dejar el ventrículo lateral al descubierto. Finalmente se reseccionó una pequeña lámina adyacente al ventrículo lateral conteniendo la SEZ y se mantuvo en PBS frío. La disección se realizó con la ayuda de una lupa de disección Leica MZ6. Para la digestión enzimática del tejido se troceó el tejido y se recogió en un tubo limpio. Se aspiró el PBS sobrante y se incubó el tejido con solución enzimática durante 30 min. a 37 °C. Se añadieron dos volúmenes de medio control y se centrifugó durante 10 min. a 1.000 rpm. Posteriormente se aspiró el sobrenadante y se disgregó mecánicamente el tejido usando una pipeta *Pasteur* de vidrio con la punta previamente estrechada a la llama. Se añadieron nuevamente 5 ml de medio control y se centrifugó 10 min. a 1.200 rpm. El sedimento se resuspendió en 200 µl de medio completo y se sembró a una densidad aproximada de 10.000 células/cm<sup>2</sup> (una SEZ en 1 ml de medio) (Ferron et al., 2007), incubándose a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %.



**Figura M1. Esquema de la disección de la SEZ.** Una vez extraído el cerebro completo se realizan dos cortes coronales, uno al acabar los OB (1) y otro antes del comienzo del hipocampo (2), obteniendo una rebanada de tejido de aproximadamente 4 mm que contiene la pared de los ventrículos laterales. Después se realiza un corte por la línea media para separar los hemisferios cerebrales (3). Posteriormente se realizan dos cortes (4 y 5) para eliminar el tejido del *septum* con el fin de dejar la SEZ al descubierto. Finalmente se secciona una fina capa de tejido adyacente al ventrículo lateral.

## 2.3 Mantenimiento y expansión

Aproximadamente a los 6-7 días tras el cultivo primario las neuroesferas alcanzan un tamaño adecuado para el pase. El tamaño de las neuroesferas es crítico a la hora de expandir un cultivo de NSCs. Si el tamaño es demasiado grande los nutrientes no llegarán a las células del centro de la esfera y éstas morirán, disminuyendo el número de células viables. Por otro

lado, si las esferas son demasiado pequeñas conseguiremos mantener el cultivo, pero no expandirlo.

Para el subcultivo las neuroesferas se recolectaron y se centrifugaron durante 5 min. a 600 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las neuroesferas se disgregaron mecánica o enzimáticamente. La disgregación mecánica se utilizó en los pases de mantenimiento y expansión de los cultivos de neuroesferas, en cambio, la disgregación enzimática se usó para conseguir una mayor disociación de las neuroesferas, por ejemplo para ensayos de auto-renovación y proliferación y de separación celular y/o citometría:

- **Disgregación mecánica.-** Las neuroesferas se disgregaron en 200 µl de medio completo haciéndolas pasar a través de la punta de una micropipeta p200 (Gibson) unas 60 veces evitando la generación de turbulencias.
- **Disgregación enzimática.-** Las neuroesferas se resuspendieron en 500 µl de la mezcla enzimática Accumax (Millipore), y se incubaron durante 2 min. a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 ml de medio de lavado y se centrifugaron las células durante 5 min. a 1.200 rpm.

Las células viables se contaron en una cámara Neubauer usando azul de tripano al 0,1 % en suero salino para identificar las células muertas, y se sembraron en medio completo a una densidad de expansión de 50 células vivas/µl. Para los ensayos de auto-renovación y “dobletes” celulares fue necesario disminuir la densidad hasta 2,5 células vivas/µl con el fin de asegurar la clonalidad. Todos los cultivos generados a partir de ese primer pase del cultivo primario se denominan cultivos secundarios.

### **3 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES: C17.2, HEK 293T Y PHOENIX**

#### **3.1 Medios de cultivo**

- **c17.2.-** DMEM, suero bovino fetal (FBS, Invitrogen) 10 %, suero de caballo (HS, Invitrogen) 5 %, L-Glutamina (Invitrogen) 2 mM, penicilina/estreptomicina (Invitrogen) 50 unidades/ml.
- **Phoenix (ATCC) y 293T (ATCC).-** DMEM, FBS al 10 %, L-glutamina (Invitrogen) 2 mM, penicilina/estreptomicina (Invitrogen) a 50 unidades/ml.

### 3.2 Mantenimiento

Las tres líneas celulares se crecieron adheridas al plástico. Se realizaron aproximadamente dos pases por semana. En el caso de las células 293T los pases se realizaron antes de que el cultivo alcanzara una confluencia del 100 %. Para el pase las células se lavaron con PBS y se despegaron del plástico mediante digestión con tripsina 0,5 %/EDTA 0,2 % durante 2 min. a 37 °C. Se añadieron 5 ml de medio de cultivo para inhibir la digestión enzimática. Se recogieron las células y se centrifugaron durante 5 min. a 1.200 rpm. Tras eliminar el sobrenadante las células se resuspendieron en 1 ml de medio y se sembraron a la concentración deseada.

## 4 ESTABLECIMIENTO Y EXPANSIÓN DE CULTIVOS DE TICs DE GBM

### 4.1 Medios de cultivo

- **Medio control.-** Medio *Neurobasal*® (Invitrogen), suplemento B27® (Invitrogen), L-glutamina (Invitrogen) 2 mM y penicilina/estreptomina (Invitrogen) a 50 unidades/ml.
- **Medio completo.-** Medio control suplementado con: heparina (Sigma) a 0,7 unidades/ml, EGF (Invitrogen) a 40 ng/ml y FGF2 (Sigma) a 20 ng/ml.

### 4.2 Cultivo primario

El tejido se mantuvo en medio *Neurobasal* y refrigerado a 4 °C hasta su procesamiento. Con ayuda de un bisturí quirúrgico se troceó el tejido en pedazos de aproximadamente 0,3 cm de grosor. Se recogieron los trocitos en un tubo limpio y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 15 ml de la solución enzimática Accumax (Millipore), incubando el tejido 15 min. a temperatura ambiente y en continua agitación orbital para su digestión enzimática. Se añadieron 15 ml de medio control y se centrifugó durante 10 min. a 1.200 rpm. Tras eliminar el sobrenadante se añadieron 5 ml de medio fresco y otros 5 ml de *Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus* (Amersham Bioscience) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 min. a 400g. La centrifugación a temperatura ambiente en presencia de *ficoll* (solución más densa que el medio de cultivo) hace que los eritrocitos se agreguen y sedimenten al fondo del tubo, mientras que el resto de las células que no tienen una densidad suficiente para atravesar el *ficoll* quedan en la interfase formada entre el medio de cultivo y el *ficoll*. Las células de la interfase se recogen y se añaden 5 ml de medio control. Finalmente las células se centrifugaron 5 min. a 1.200 rpm y se resuspendieron en 1 ml de medio completo. Las células

se contaron en una cámara Neubauer y se sembraron a una concentración aproximada de 50 células vivas/ $\mu$ l. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %.

En ausencia de suero y de un sustrato adhesivo, y en presencia de mitógenos algunas células del tumor crecen formando unos agregados esferoides similares a los que forman las NSCs. Las TICs de GBM mantenidas en estas condiciones mantienen las características fenotípicas del tumor original, incluyendo la capacidad de formar un tumor al ser trasplantadas (Galli et al., 2004; Lee et al., 2006).

### **4.3 Mantenimiento y expansión**

Las esferas formadas por las TICs de GBM proliferan a una velocidad muy variable entre los diferentes cultivos, variando el intervalo entre los pases de 7 a 14 días aproximadamente, y tomando como referencia para el pase el tamaño de las esferas, al igual que en las NSCs. Las esferas se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min. y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron en 500  $\mu$ l de la solución enzimática Accumax en la que se incubaron durante 3 min. a temperatura ambiente. Se añadieron 5 ml de medio control y se centrifugaron las células a 1.200 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante las células individuales se resuspendieron en 1 ml de medio completo, se contaron utilizando una cámara Neubauer y se sembraron a una densidad de 50 céls/ $\mu$ l para la expansión del cultivo.

## **5 ENSAYOS DE NEUROESFERAS**

Las propiedades de proliferación y auto-renovación de las NSCs y las TICs de GBM se pueden ensayar *in vitro*.

### **5.1 Medida de la capacidad de proliferación**

#### **5.1.1 Diámetro**

El diámetro de las esferas se midió a los siete días tras la siembra de las células individuales. Para estimar el tamaño medio de la población se midieron de 150 a 200 esferas, tomando la media del diámetro poblacional como una medida de la proliferación del cultivo (Ohtsuka et al., 2001).

### 5.1.2 Incorporación de BrdU

Otra medida de la capacidad proliferativa de un cultivo es la incorporación del análogo de la timidina BrdU. Este análogo se incorpora durante la fase S del ciclo celular y nos da una medida de las células del cultivo que están en esta fase en un momento determinado. Posteriormente podemos detectar la BrdU incorporada mediante el uso de un anticuerpo específico para dicho nucleótido. Los ensayos *in vitro* de incorporación de BrdU se realizaron en esferas crecidas 48 horas. Para ello se añadió BrdU (Sigma) 2  $\mu$ M durante 5 min. al medio de cultivo y se incubaron las células a 37 °C. Las esferas se adhirieron a cubreobjetos pre-tratados con Matrigel® (Bekton-Dickinson, Bedford, MA, USA) a 0,2  $\mu$ g/ml (preparado en medio control) durante 10 min. a 37 °C. Las esferas adheridas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min. Tras 3 lavados en tampón fosfato (PB) de 5 min. se procedió a la detección de la BrdU incorporada por inmunocitoquímica.

### 5.2 Medida de la capacidad de auto-renovación

La auto-renovación se mide como la capacidad de una célula madre individual para sobrevivir y proliferar formando una neuroesfera. Para medir la capacidad de auto-renovación se disgregaron las neuroesferas y se sembraron las células individuales a una densidad límite de 2,5 células/ $\mu$ l para las NSCs y de 5 células/ $\mu$ l para las TICs de GBM en placas de 96 pocillos, a fin de evitar la agregación celular. A los cinco días se contaron las esferas secundarias formadas.

## 6 CULTIVOS DE NSCs EN MATRIZ DE COLÁGENO

Para el ensayo de formación de colonias en matriz de colágeno (Louis et al., 2008), las células individuales procedentes tanto de cultivos primarios como secundarios de NSCs, se sembraron a una densidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/ml, en un medio de cultivo libre de suero y citocinas (*NeuroCult NCFC Serum-Free Medium without Cytokines*®, StemCell Technologies), suplementos de proliferación (*NeuroCult NSC Proliferation Supplements*®, StemCell Technologies), EGF (Invitrogen) 10  $\mu$ g/ml, FGF (Sigma) 10  $\mu$ g/ml, heparina (Sigma) 0,7 unidades/ml y colágeno 50 % v/v (*Collagen Solution*, StemCell Technologies). Las células se sembraron en placas de 35 mm y se añadieron semanalmente 60  $\mu$ l de medio de mantenimiento (*NeuroCult medium*®, StemCell Technologies) conteniendo suplementos de proliferación, EGF (Invitrogen) 10  $\mu$ g/ml, FGF (Sigma) 10  $\mu$ g/ml y heparina (Sigma) a 0,7 unidades/ml. A las tres semanas se midió el tamaño de los clones utilizando un microscopio

invertido con el programa informático *Leica Application Suite®* versión 2.4.0 (Leica Microsystems).

Los clones se clasificaron en tres categorías según su tamaño: 0-0,5 mm, 0,5 a 1 mm y mayores de 1 mm.

## **7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MEDICIÓN DEL RNA MENSAJERO (mRNA)**

### **7.1 Extracción de RNA total**

Se realizaron extracciones de RNA total a partir de cultivos celulares de, como mínimo 20.000 células, tanto de líneas celulares como de neuroesferas, así como de tejido cerebral de ratón adulto. En el caso de las neuroesferas, éstas se recolectaban sin disgregar para no producir cambios en la expresión génica debido al estrés al que se someten al disgregarse. Las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 min. Se extrajo el RNA usando el kit *Rneasy Minikit* (Qiagen) y siguiendo las condiciones del fabricante. Tras la extracción cuantificamos el mRNA mediante absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro (Eppendorf) y los RNAs extraídos se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior utilización.

### **7.2 Retrotranscripción y reacción de PCR**

Se retrotranscribió 1 µg de RNA a cDNA usando 200 unidades de la enzima *Superscript II RT Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y hexanucleótidos aleatorios (Invitrogen) a una concentración de 3 µg/µl en un volumen de reacción de 40 µl conteniendo tampón "first strand" (Tris-HCl 50 mM, KCl 5 mM, Mg<sub>2</sub>Cl 3 mM), DTT 5 mM, 0,25 mM por cada dNTP (Amersahn Pharmacia), e incubando la reacción 2 horas a 42 °C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). Para ello se usó 1 µl de cDNA en una mezcla de reacción de 20 µl conteniendo Tris-HCl 4 mM, KCl 20 mM, EDTA 20 µM, DTT 200 µM, dNTPS 0,25 mM (Amersham Pharmacia), cebadores 0,25 µM (Sigma-Genosys) y 1 U de Taq DNA polimerasa (Eppendorf). Todas las reacciones se iniciaron con una desnaturalización inicial de 2 min. a 96 °C, seguidas de varios ciclos de amplificación y una elongación final de 10 min. a 72 °C. Las temperaturas de hibridación, secuencias y tiempos se especifican en la Tabla 1. El tamaño de las diferentes bandas de amplificación se discriminó mediante electroforesis en gel de agarosa, cuya concentración varió dependiendo del tamaño del producto de amplificación a discriminar (descrito en el Apartado 1.2).

## 8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR WESTERN BLOT (WB)

### 8.1 Preparación de muestras para extracción

Para la extracción de proteína se recolectaron un mínimo de 200.000 células y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min. En el caso de tejido de cerebro de ratón se realizó la disección en PBS frío. Una vez realizada la disección, el tejido se trocó y se transfirió a un tubo limpio. Se centrifugó a 800 rpm durante 10 min.

### 8.2 Extracción y cuantificación de proteína

Las muestras se lisaron utilizando tampón RIPA conteniendo NaCl 150 mM, tampón fosfato (PB) 20 mM, Triton X-100 1 %, EDTA 5 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1 % y suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Tablets*, Roche y PMSF 1mM) y fosfatasas ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, NaF 1 mM). Se añadió un volumen de entre 20 a 30  $\mu\text{l}$  por muestra y éstas se resuspendieron con la ayuda de una micropipeta subiendo y bajando el volumen (30 veces para células y 60 para tejido) y se dejaron lisar las muestras en hielo durante 20 min. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio para la cuantificación de la proteína.

Para la cuantificación de proteína utilizamos el método colorimétrico Bio-Rad DC Protein Assay Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Como concentraciones patrón para la cuantificación se utilizaron diluciones seriadas de BSA (Pierce) en un rango de concentración de 0 a 1,4 mg/ml. La lectura de la medida colorimétrica se realizó en un lector de placas a una longitud de onda de 562 nm (TECAN Infinite M200).

### 8.3 Electroforesis y transferencia a membrana

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE utilizando el sistema Mini Protean (Bio-Rad) (Gel de resolución: Tris-Cl 0,75 M pH 8,9, SDS 0,4 %, persulfato amónico 0,025 %, TEMED 0,017% con porcentajes de concentración de acrilamida-bisacrilamida de los geles variando del 6 al 12 %, en función del tamaño de las proteínas a detectar. Gel de empaquetado: Tris-Cl pH 6,8 0,1 mM, Acrilamida-bisacrilamida 3%, SDS 0,4 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,025 %). En cada carril del gel de acrilamida se cargó una cantidad de proteína equivalente, diluyendo las muestras más concentradas con tampón RIPA para tener el mismo volumen de carga por carril. Se añadió a las muestras tampón de carga preparado al 3X (Tris-HCl 90 mM pH 6,8, glicerol 50 %, SDS 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 1:20 v/v y azul de bromofenol 0,01 %) y se hirvieron durante 5 min. a 95 °C para desnaturalizar

las proteínas. El tampón de electroforesis contenía: glicina 2 M, Tris-base 250 mM y SDS 1 %. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 60 y 120 voltios dependiendo del tamaño de las proteínas. Como marcador de pesos moleculares se utilizó un marcador preteñido con un rango de pesos moleculares de 20 a 118 kDa (Fermentas). Las proteínas se transfirieron durante 4 horas a 60 voltios o a 30 voltios durante toda la noche a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience), en un tampón de transferencia compuesto por glicina 2 M, Tris-base 250 mM y 20 % de metanol. Tras la electroforesis se lavó la membrana con tampón TBS (tris borato salino tris-HCl 0,1 M pH 7,5 y NaCl al 0,9 %) con un 0,1 % del detergente Tween-20 (Sigma) y se incubaron 5 min. con rojo Ponceau (Ponceau 2 %, ácido tricloroacético 30 % y ácido sulfosalicílico 30 %) para comprobar la eficacia en la transferencia de la proteína. Se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O destilada y se procedió a su revelado.

#### 8.4 Revelado

Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo: TBS-Tween 0,1 % con leche desnatada en polvo al 5 % ó TBS-Tween 0,1 % con BSA al 5 %. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo. Los anticuerpos y diluciones utilizados se encuentran detallados en la Tabla M2. Al día siguiente las membranas se lavaron varias veces con TBS-Tween 0,1 % para eliminar los restos no unidos de anticuerpo y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado (Tabla M3). Posteriormente las membranas se lavaron varias veces con TBS-Tween 0,1 % y se realizó un lavado final con TBS para eliminar los restos del detergente. Las membranas se incubaron durante 5 min. con luminol (*Advance Reagent Plus*, Amersham) y se fotografiaron usando un documentador de geles Kodak Gel Logic 440 Imaging System (Kodak). El tiempo de exposición de la imagen dependió de la intensidad de la señal luminiscente. La intensidad de señal de las bandas se cuantificó mediante el programa *Molecular Imaging* (Kodak). Los niveles de expresión se refirieron siempre al valor de la  $\beta$ -actina o de la enzima GADPH de la misma muestra.

## 9 **SOBRE-EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y RNA DE INTERFERENCIA (RNAi) IN VITRO**

### 9.1 RNAi y plásmidos utilizados

Los siRNAs exógenos consisten típicamente en una región de doble cadena de 19 pares de bases y 2 nucleótidos desapareados en 3', capaces de suprimir la expresión génica

por el proceso conocido como interferencia de RNA. Las secuencias del RNAi usada en este trabajo se encuentran en la Tabla 2.

Los plásmidos de sobre-expresión utilizados fueron los siguientes:

- **pEGFP-DYRK1A.-** Sobre-expresa la proteína de fusión GFP-DYRK1A (Alvarez et al., 2003).
- **pFlag-Spry2.-** Sobre-expresa la proteína Spry2 (Lim et al., 2000b).
- **pFlag-Spry2-T75A.-** Sobre-expresa una proteína Spry2 mutante donde se ha sustituido la treonina fosforilable por Dyrk1A por un residuo de alanina (Aranda et al., 2008).
- **pHA-Dyrk1A.-** Sobre-expresa Dyrk1A (Alvarez et al., 2003).
- **pHA-Dyrk1A-KD.-** Sobre-expresa una forma de la proteína Dyrk1A que carece de actividad quinasa (Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2003).
- **pHA-Dyrk1A- $\Delta$ His.-** Sobre-expresa una proteína Dyrk1A mutante que carece del segmento de polihistidina necesario para la interacción con Spry2 (Aranda et al., 2008).

## 9.2 Lipofección de células c17.2

Las células c17.2 se pasaron y sembraron en placas de 6 pocillos (para recolectar para WB o ensayos de internalización del EGFR) o sobre cubre-objetos tratados previamente con matrigel (para inmunofluorescencia (IF)). Las células se lipofectaron al alcanzar aproximadamente el 70-80 % de confluencia y se crecieron en un medio sin antibiótico/antimicótico. Para la lipofección se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se realizó siguiendo el protocolo comercial. Se incubaron 2  $\mu$ l de lipofectamina con 50  $\mu$ l de Opti-MEM (GIBCO) durante 5 min. a temperatura ambiente. La cantidad de vector de expresión que se lipofectó fue de 1  $\mu$ g y, para los siRNA, se lipofectó la cantidad necesaria para llegar a una concentración final de 50 nM. En ambos casos se diluyeron con 50  $\mu$ l de Opti-MEM. Se juntaron ambas soluciones y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron los 100  $\mu$ l de la solución resultante a las células, a las que previamente se les había retirado el suero para evitar interferencias con la lipofección. Cinco horas después se cambió el medio a las células añadiendo medio fresco. A las 24 horas después de la lipofección se realizaron los ensayos correspondientes. Tanto para extracción de RNA como de proteína, las

células se lavaron con PBS frío y se recogieron utilizando un raspador. Las células para IF se fijaron con PFA al 4% y, tras 3 lavados con PB, se guardaron a 4 °C para su tinción posterior.

### 9.3 Nucleofección de NSCs

Las neuroesferas adultas no se lipofectan con una eficiencia elevada, obteniéndose valores en torno al 40-50 %. Utilizando la electroporación se alcanzan valores de transducción del 85 al 95 % de las células electroporadas. El único inconveniente es que, al ser un método mucho más agresivo con las células, necesitamos una mayor cantidad de células iniciales dado que muchas mueren en la nucleofección.

Tras el pase se sembraron 750.000 células por cada punto de nucleofección. A las 48 horas se recolectaron las neuroesferas sembradas y se centrifugaron durante 10 min. a 800 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de solución de nucleofección (*Mouse NSCs Nucleofector Kit*, Amaxa Biosystem). A esta suspensión se añadió 3 µg de los diferentes plásmidos a introducir o siRNA a una concentración final de 50 nM. Se transfirió la suspensión a una cubeta de nucleofección y las células se electroporaron utilizando un *Nucleofector<sup>TM</sup>* (Amaxa Biosystem) con el programa predeterminado A33, específico de NSCs de ratón adulto. Tras la nucleofección se añadió 1 ml de medio completo y se sembraron las células en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. A las 48 horas tras la nucleofección se recogieron las células para extracción de RNA y/o proteína o bien se disgregaron y se sembraron para ensayos de auto-renovación y/o IF.

### 9.4 Transducción de NSCs y TICs de GBM con retrovirus y lentivirus

#### 9.4.1 Generación de construcciones virales para RNA de interferencia (shRNA)

A pesar de que las nucleofecciones con siRNA para *Dyrk1A* nos permitieron silenciar el gen de manera bastante eficaz alcanzando unas eficacias muy altas de nucleofección, nos planteamos el silenciamiento del gen *Dyrk1A in vitro* de manera estable mediante la transducción de neuroesferas (NSCs y TICs de GBM) con retro- y lentivirus portadores de una construcción *short hairpin* RNA para *Dyrk1A* (ya sea de ratón o humano), que nos permitiera seleccionar y mantener estas células silenciadas.

##### 9.4.1.1 Generación de plásmidos retrovirales

**Digestión del vector.**- Para las construcciones retrovirales se digirieron 3 µg del vector pSUPER.RETRO (OligoEngine) con la enzima HindIII durante 24 horas a 37 °C. Para

comprobar que la digestión había funcionado y separar el plásmido digerido se resolvieron las bandas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting*, Pronadisa) al 1% en tampón TBE y posteriormente se extrajo el plásmido digerido con un kit de extracción de DNA (*DNA Extraction Kit*, Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se continuó la digestión del plásmido linearizado con dos unidades de enzima BglII durante toda la noche a 37 °C.

**Hibridación de oligos.-** Paralelamente se hibridaron los oligos (Ambion) para el shRNA de *Dyrk1A* diseñados contra el exón 4 de dicho gen (5' GATCCCCGCGGAAGGTTTACAATGATTTCAAGAGAATCATTGTAAACCTTCCGCTTTTT-3' y 5'-AAAAAGCGGAAGGTTTACAATGATTCTTCAAATCATTGTAAACCTTCCGGGG-3') y el shRNA control contra el gen de la luciferasa (5'-GATCCCCGTACGCGGAATACAACGATTCAAGAGATCGTTGTATCCGCGTACGTTTTTT-3' y 5'-AGCTAAAAACGTACGCGGAATACAACGATCTTGAATCGTTGTATCGTTATTCCGCGTACGGGG-3') utilizando un tampón de hibridación: 100 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7,4, y aplicando el programa siguiente en un termociclador (Eppendorf): 90 °C 4 min., 70 °C 10 min., 60 °C 20 min., 50 °C, 37 °C 45 min., 10 °C 60 min.

Tanto el vector digerido como los oligos anillados se resolvieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se purificaron usando para ello el kit de purificación de DNA Rapid Gel Extraction System (Marligen bioscience).

**Ligación.-** Para la ligación del vector con el inserto se utilizó la enzima Quick ligasa (New England Biolabs) en un volumen final de reacción de 20 µl conteniendo 50 ng de vector digerido, 2 µl de oligos hibridados, y una unidad de enzima, y dejando la reacción 10 min. a temperatura ambiente.

**Transformación bacterias competentes.-** Se transformaron con el plásmido bacterias competentes DB3.1 por choque térmico. Las bacterias se descongelaron en hielo y se incubaron con los 20 µl de la reacción de ligamiento durante 20 min. en hielo, 2 min. a 42 °C y 4 min. en hielo. Se añadieron 900 µl de LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se centrifugaron las bacterias a 1.200 rpm durante 5 min., se eliminaron 800 µl de sobrenadante y se sembraron 200 µl de la solución restante en placas de LB con el antibiótico ampicilina. Las placas se crecieron durante 12 horas a 37 °C.

**Selección de colonias positivas.-** Para seleccionar las colonias positivas que habían incorporado el vector con la construcción se realizó una PCR usando cebadores frente al plásmido pSUPER (Tabla M1) con el programa de PCR: 94 °C 5 min., 30 ciclos de 94 °C 20 seg., 56 °C 30 seg., 72 °C 30 seg., seguido de un paso final de 72 °C 7 min. Las colonias positivas generan un amplicón de 240 pares de bases y las negativas de 180 pb. De las

colonias positivas se creció durante 10 horas un pre-cultivo a 37 °C en agitación y se extrajo el DNA con el kit *Quiagen Spin Miniprep* (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 9.4.1.2 Generación de plásmidos lentivirales

**Digestión vector pSUPERshDyrk1A, pSUPERshControl y pLVTHM.-** El plásmido pSUPER con los oligos de interés se digirió para liberar los oligos junto con el promotor de la histona H1, utilizando para ello una unidad de las enzimas EcoRI (Fermentas) y BSU151 (ClaI, Fermentas), y dejando la digestión durante 1 hora a 37 °C. Paralelamente se digirió el vector lentiviral pLVTHM (Tronolab) de manera análoga. Finalmente, y para separar el plásmido pLVTHM digerido y el fragmento de los oligos junto con la histona H1, se separaron las bandas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting*, Pronadisa) al 1% en tampón TBE y posteriormente se extrajo el plásmido digerido con un kit de extracción de DNA (*DNA Extraction Kit*, Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La metodología usada para la ligación del vector vacío linearizado pLVTHM junto con el inserto de interés es la misma que la descrita para los vectores retrovirales del apartado anterior. También se realizó de manera análoga la transformación de bacterias competentes.

**Selección de colonias positivas.-** Para seleccionar las colonias positivas que habían incorporado el vector con la construcción se realizó una PCR usando cebadores frente al plásmido pLVTHM (Tabla M1) y con el programa de PCR: 94 °C 5 min., 30 ciclos de 94 °C 20 seg., 56 °C 30 seg., 72 °C 30 seg., seguido de un paso final de 72 °C 7 min. Las colonias que habían incorporado el plásmido con el vector vacío generaron un amplicón de 180 pb, las que sí habían incorporado el plásmido portador del shRNA generaron un amplicón de tamaño 240 pb.

En el caso de las TICs de GBM, los plásmidos usados para la interferencia de *DYRK1A* mediante el uso de lentivirus fueron: pLKO.1shRNACONTROL (Sigma) y pLKOsh*DYRK1A* (Sigma).

#### 9.4.2 Transfección de células empaquetadoras Phoenix. Producción de retrovirus y lentivirus ecotrópicos

Dependiendo de la restricción en los receptores de superficie que reconocen y, por lo tanto, de la especificidad del huésped, las partículas víricas que se utilizaron se pueden dividir en retrovirus y lentivirus ecotrópicos (sólo son capaces de infectar células murinas) y anfotrópicos (capaces de infectar células murinas y humanas).

Para la producción de retrovirus y lentivirus ecotrópicos se utilizaron las células empaquetadoras Phoenix ecotrópicas (ATCC), las cuales son células 293T modificadas de manera que son capaces de producir de manera estable las proteínas gag-pol y proteína de envuelta viral, de forma que los virus generados tienen tropismo únicamente por células de ratón y rata. Se sembraron 1.500.000 células empaquetadoras Phoenix en cada placa de p100. Al día siguiente se comprobó que las células habían alcanzado aproximadamente el 70 % de confluencia, óptimo para la transfección. Se añadieron 7 ml de medio fresco a cada placa de células antes de la transfección. Las transfecciones se realizaron con  $\text{CaCl}_2$ . Para ello se preparó un tubo de 15 ml con 1 ml de HBS ( $\text{NaCl}$  281 mM, HEPES 100 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5 mM, pH 7,2) 2X y en otro tubo 1 ml de solución conteniendo:  $\text{CaCl}_2$  0,025 M y una cantidad variable de 15 a 20  $\mu\text{g}$  de DNA. Se burbujeó la solución con el DNA con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio mientras se iba añadiendo el HBS gota a gota resbalando por la pared del tubo y se incubó 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron los 2 ml de la solución resultante gota a gota sobre la placa de células Phoenix. Las células se incubaron a 37 °C de 5 a 12 horas. Posteriormente se cambió el medio de cultivo por 5 ml del medio de cultivo de las células a transducir. A las 24 horas se recogió el sobrenadante de las células Phoenix y se filtró (filtro 0,45  $\mu\text{m}$ ) para evitar la contaminación del medio con células empaquetadoras. Se añadió medio fresco a las células Phoenix para una segunda recogida al día siguiente. Si no se iba a utilizar inmediatamente el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta su uso.

#### **9.4.3 Transfección de células 293T, producción de retrovirus y lentivirus anfotrópicos**

Para obtener un buen título viral hay que tener un especial cuidado en evitar que las células 293T lleguen a una confluencia del 100%. Es mejor pasarlas cuando alcanzan el 80 % de confluencia. Las células 293T (ATCC) se transfectan con el protocolo de  $\text{CaCl}_2$ , incluyendo en la transfección los plásmidos para la cápside (PM2.G Envelope) y el *core* (psPAX2). Las únicas diferencias con la transfección de las células Phoenix es que sólo se realizó una recogida de medio a las 48 horas tras la transfección.

#### **9.4.4 Transducción de neuroesferas (NSCs y TICs de GBM) con retrovirus y lentivirus, selección con puromicina**

Las neuroesferas se disociaron y se sembraron a densidad de expansión y a las 48 horas tras la siembra alcanzaron un tamaño adecuado para la transducción retroviral (unas 10 a 20 células por esfera). Se recolectaron las neuroesferas y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, las neuroesferas se resuspendieron directamente en el

sobrenadante viral. El sobrenadante viral se diluyó a la mitad con medio completo de cultivo, con el objeto de diluir los restos de suero que pudieran encontrarse en el sobrenadante viral y añadiendo nuevos factores EGF y FGF. Se añadió polibreno al medio a una concentración de 5 µg/ml. A las 12 horas después se cambió el medio de cultivo a las neuroesferas por medio completo.

Cuando las esferas alcanzaron el tamaño adecuado para el pase se disgregaron y se sembraron células individuales para los ensayos de auto-renovación, proliferación y/o análisis de la cantidad de EGFR en membrana mediante citometría de flujo.

Para la obtención de líneas estables, cuando las esferas alcanzaron el tamaño adecuado para el pase se disgregaron y se sembraron en presencia del antibiótico puromicina a una concentración de 0,5 µg/ml para las NSCs y de 2 µg/µl para las TICs de GBM. Las neuroesferas se seleccionaron realizando dos pases (15 días) en presencia de puromicina. Una vez seleccionado el cultivo se retiró la puromicina del medio, volviendo a realizar selecciones con dicho antibiótico cada cuatro o cinco pases (una vez al mes) durante un pase completo para evitar que las células que hubieran podido silenciar el retrovirus (y que proliferan a mayor velocidad) invadieran el cultivo.

La transducción de neuroesferas con lentivirus es análoga a la retroviral, con la única diferencia de que, en el caso del uso de lentivirus, se puede dejar de añadir polibreno al medio. El polibreno mejora la infección, pero es tóxico para muchos tipos celulares.

Las NSCs de ratón se infectaron tanto con retrovirus como con lentivirus ecotrópicos. Las TICs de GBM se infectaron únicamente con lentivirus anfotrópicos.

## **10 ENSAYOS IN VITRO**

### **10.1 Ensayos de internalización y degradación del EGFR**

#### **10.1.1 Medida de la cantidad de EGFR en membrana y de su internalización**

Las células, tanto de la línea celular c17.2 como NSCs, se cultivaron durante 12 horas privadas del mitógeno EGF (en el caso de la línea c17.2 se retira el suero del medio). Las células se incubaron durante 30 min. con EGF conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una concentración de 25 ng/ml a 4 °C para impedir la internalización del receptor. Las células se lavaron tres veces durante 5 min. con PBS frío para eliminar el EGF-Alexa Fluor 488 del medio y se incubaron a 37 °C para permitir la internalización del receptor durante

diferentes tiempos. Las placas se enfriaron de nuevo a 4 °C y se realizó un lavado ácido de 5 min. con DMEM pH 2,2 para eliminar el EGF-Alexa Fluor 488 no internalizado. La emisión fluorescente del EGF-Alexa Fluor 488 a tiempo 0 y a los diferentes tiempos de internalización se detectó por citometría de flujo (MoFlo, Dako) y se analizó con el paquete informático *Sumit* 4.0 (Dako).

### **10.1.2 Medida de la degradación de EGFR**

En las células c17.2 se retiró el suero 24 horas después de la transfección de 5 a 12 horas. Las NSCs y las TICs de GBM se privan de EGF a los cuatro días tras el pase durante 4 y 12 horas respectivamente.

Las células se incubaron con EGF a una concentración de 20 ng/ml para las NSCs y las c17.2 y de 100 ng/ml para las TICs de GBM a 37 °C durante diferentes tiempos. Las células se recolectaron y los tubos se colocaron en hielo para detener la internalización. Se realizaron 2 lavados de cinco min. con PBS frío. La extracción de proteína y posterior cuantificación por WB se realizó como se especifica en el apartado 7.

La intensidad de las bandas obtenidas en el WB se cuantificó con el documentador de geles Kodak Gel Logic 440 Imaging System (Kodak). La intensidad de las bandas de EGFR se normalizó por la intensidad de la banda de  $\beta$ -actina. El porcentaje de degradación del EGFR a los diferentes tiempos se relativizó utilizando la intensidad medida a tiempo 0.

### **10.2 Separación de células EGFR positivas por FACS**

Las células que habían sido previamente disgregadas y marcadas con el ligando fluorescente EGF-Alexa488 como se describe en el apartado 10.1.1 se resuspendieron tras la incubación en frío con el ligando en 1 ml de PBS frío y se filtraron con un filtro de 70  $\mu$ m para evitar agregados celulares. La separación se realizó en un citómetro separador (MoFlo, Dakocytomation), dotado de un láser de argón de 488 nm. Se separaron dos poblaciones, una población negativa para el ligando EGF-Alexa488, que no tenía suficiente cantidad de ligando en membrana para ser detectada por el láser, y otra positiva. Una vez separadas las dos poblaciones se sembraron en una matriz tridimensional de colágeno (ver Apartado 6).

### **10.3 Técnicas inmunofluorescentes**

Se incubaron cubre-objetos de cristal con una dilución de matrigel (Becton Dickinson, Bedford) en medio control (1:100) y se dejaron a 37 °C durante un mínimo de 2 horas y un

máximo de 20. Después se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y se guardaron a 4 °C para su utilización. Para adherir las neuroesferas se añadieron 500 µl de suspensión de neuroesferas a los cubre-objetos de cristal tratados previamente con matrigel, incubándolas durante 10 min. a 37 °C. Tras comprobar que las neuroesferas estaban pegadas, se fijaron durante 10 min. con PFA 4 % y se realizaron tres lavados de 5 min. con PB. Para el bloqueo de uniones inespecíficas se incubaron las células durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por: PB 0,1 M, Triton X-100 (Sigma) 0,2 % y BSA (Sigma) 2% para los antígenos de localización intracelular y una solución compuesta por PB 0,1M y BSA 2% para las proteínas de membrana. Tras el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M3), diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y en agitación continuada.

Para la detección de BrdU y ki67, tras la fijación con PFA, se trataron las células con HCl 2N durante 15 min. seguido de una neutralización con tampón borato sódico 0,1 M, pH 8,6 durante 10 min. Se continuó con tres lavados de 5 min. con PB y se procedió al bloqueo como se describe en el párrafo anterior.

Al día siguiente se lavó el exceso de anticuerpo primario con tres lavados de 5 min. con PB 0,1 M y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo (Tabla M4) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados de PB 0,1 M de 5 min. y se tiñeron los ácidos nucleicos durante 2 min. con DAPI a una concentración final de 2 µg/ml. Tras un último lavado con PB se procedió al montaje de los cubre-objetos usando el medio de montaje FluorSave.

En todos los recuentos de marcadores en células *in vitro* los porcentajes se expresan como el número de células positivas para el marcador en cuestión con respecto al total de células (DAPI positivas). Las tinciones se analizaron mediante microscopía de fluorescencia convencional o microscopía confocal, como se ha descrito en el apartado 10.4.

## 11 ENSAYOS IN VIVO

### 11.1 **Marcaje de células madre mediante inyección de BrdU**

La incorporación *in vivo* de BrdU nos da una idea de la tasa de proliferación (tanto de las células madre como de los progenitores más diferenciados) de la SEZ, donde podemos marcar todas las células en proliferación en una ventana de tiempo determinada. Si esperamos durante el tiempo en el que está estimado que las células madre completan un ciclo de división podemos diferenciar cinéticamente a las células madre, dado que son aquellas que un mes después del marcaje aún son positivas para BrdU, frente a los progenitores más restringidos

que, al tener mayor tasa de proliferación habrán diluido la BrdU. A estas células positivas para BrdU se les llama células retenedoras de la marca (*BrdU label-retaining cells* o  $BrdU^L$ ) y son una estimación del número de células madre de la SEZ (Ferron et al., 2007) (Figura M2)

Para ello en todos los experimentos *in vivo* de marcaje con BrdU (Sigma) en ratones adultos (2 meses de edad) se inyecta una solución de BrdU (Sigma) compuesta por 10 mg/ml de BrdU y disuelta en suero salino fisiológico al 0,9%. Se inyectaron intraperitonealmente 50  $\mu$ g de BrdU por cada mg de peso del animal, realizándose 7 inyecciones en intervalos de dos horas, durante un periodo total de 12 horas (Nowakowski et al., 1989). Los animales se sacrificaron un mes más tarde de las inyecciones para cuantificar las células  $BrdU^L$ . Este método de inyección también se usó para determinar la proliferación de la SEZ, para lo cual los animales se sacrificaron una hora después de la última inyección, lo cual da una estimación de las células de la SEZ en estado proliferativo.

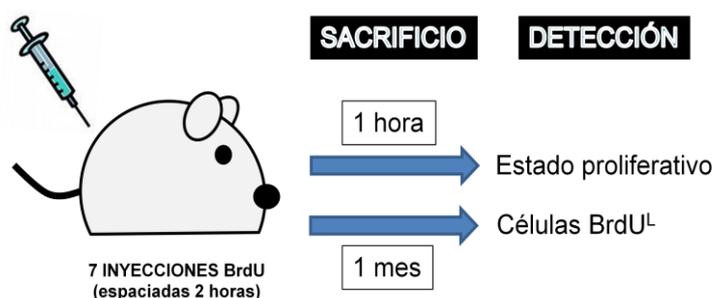


Figura M2. Esquema del marcaje de células en proliferación en la SEZ mediante inyección de BrdU.

## 11.2 Xenotrasplantes

Para comprobar la capacidad tumorigénica de las células interferidas para *DYRK1A* se realizaron trasplantes de células de TICs de glioblastoma en el tejido estriado del cerebro de ratones inmunodeprimidos *Nude Foxn1<sup>nu</sup>* (Harlan Ibérica) de entre 2 y 3 meses de edad.

Las esferas de gliomas se disgregaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente y se llevaron a una dilución de 5.000 ó 50.000 células/ $\mu$ l. Se trasplantaron 2  $\mu$ l de esta solución para tener un total de 10.000 ó 100.000 células, respectivamente, para el trasplante.

Los ratones se anestesiaron utilizando una mezcla de anestésico compuesta por ketamina (Imalgene 1000) 10 %, xilacina (Xilagesic) 9,3 % diluido en PBS estéril e inyectando intraperitonealmente 200  $\mu$ l de dicha solución por cada 25 g de peso del animal. Una vez anestesiados se les administró por vía subcutánea una solución analgésica (Metacam) al 10% diluida en PBS. Los animales se colocaron en un aparato estereotáxico (MyNeuroLab, Benchmark TM). Con la ayuda de un bisturí quirúrgico se realizó una abertura en la piel del cráneo de aproximadamente 1,5 cm en dirección rostro-caudal. Tras limpiar la abertura de

trozos de piel se humedeció con NaCl 0,9% (Braun) para evitar que se secase el tejido. Se fijaron las coordenadas para la inyección, que fueron 2 mm media-lateral derecha y -0,5 mm rostral desde Bregma y el cráneo del animal se perforó utilizando un taladro (Grobet). Las células se inyectaron con una jeringa (Hamilton) de 2 µl de volumen a una profundidad de 3 mm ventral desde la superficie de la corteza, esperando un minuto tras la inyección antes de comenzar a retirar la aguja, la cual se retiró de mm en mm, dejando un minuto de reposo en cada elevación para evitar el reflujo de las células. La piel del cráneo se selló utilizando pegamento tisular (*Histoacryl*, B-Braun).

Los ratones se despertaron tras la cirugía utilizando un reversor de anestesia (Antisedan) al 7,7 % diluido en PBS, e inyectando 100 µl de dicha solución por cada 25 µg de peso del animal. Los animales se mantuvieron en una manta termorreguladora (Cibertec) a 37 °C de temperatura hasta que recuperaron la consciencia y se procedió a su estabulación. Los ratones se mantuvieron estabulados hasta que aparecieron síntomas evidentes de estar desarrollando la enfermedad como son una marcada pérdida de peso, hipo-actividad y deambulación con postura encorvada, sacrificándose los animales finalmente a las 5 semanas tras la cirugía.

### 11.3 Preparación de tejidos para las técnicas histológicas

Los animales se anestesiaron como se ha descrito en el apartado anterior. Los ratones se perfundieron intracardiácamamente con 60 ml de NaCl al 0,9 % y 80 ml de PFA al 4% en PB 0,1 M pH 7,4. Una vez extraídos, los cerebros se post-fijaron con el mismo fijador durante 4 horas. Posteriormente se realizaron lavados con tampón PB durante al menos dos horas. Las muestras para cortes en criostato se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % a 4 °C y durante 24 horas. Los cerebros se congelaron a -20 °C en OCT (Tissue Tek, Sakura) y se cortaron en secciones coronales seriadas de 7 a 13 µm de grosor con un criostato Leica CM1950 (Leica Microsystems). Los cortes se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Las muestras para cortar por vibratomo Leica VT 1000S (Leica Microsistemas) se encastraron en agarosa al 1 % y de ellas se obtuvieron cortes coronales seriados de 40 µm.

### 11.4 Tinciones inmunofluorescentes

El tratamiento del tejido anterior a la incubación con el anticuerpo primario difiere en función del antígeno a detectar.

Para la detección del antígeno BrdU, los cortes se trataron con HCl 2 N durante 30 min. a 37 °C con el objetivo de desnaturalizar la cromatina y posteriormente se incubaron con borato

sódico 0,1 M pH 8,6 durante 10 min. a temperatura ambiente para neutralizar el pH ácido. Los cortes se lavaron con tampón PB y se procedió a su bloqueo. Para la tinción de ki67 se incubaron los cortes con citrato sódico 10 mM pH 6,5 durante 45 min. a 95 °C, con el fin de desenmascarar el antígeno. Se realizaron tres lavados de PB y se procedió a bloquear el tejido. Para el resto de tinciones, el protocolo de inmunotinción comenzaba con una incubación del tejido con un tampón de bloqueo compuesto por PB 0,1 M, 0,2 % Triton X-100 y BSA al 2 %, durante una a dos horas. Posteriormente, se incubaba con el anticuerpo primario de 12 a 48 horas, a la dilución que se muestra en la Tabla M2. Para los dobles marcajes se utilizaron anticuerpos primarios producidos en especies diferentes. Finalmente, para el revelado del anticuerpo se realizaron 3 lavados de PB 0,1 M y se incubó la muestra con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo a la dilución correspondiente (Tabla M3). Tras dos lavados con PB el tejido se tiñó finalmente para marcar los ácidos nucleicos, o bien con DAPI (4',6-diamidino-2-fenolindol dihidrocloruro, Sigma) 5 min. a una concentración final de 2 µg/ml, o bien durante 45 min. con TOPRO (Molecular Probes) a una dilución 1:500. Tras un último lavado con PB se procedió al montaje de los cortes usando el medio de montaje FluorSave (CalbioChem, La Jolla, USA).

Para el análisis de las tinciones se utilizó un microscopio vertical de fluorescencia Nikon E600 (Nikon, Japón) y se usó una cámara digital Nikon DM1200 para la captura de imágenes. Algunas de las muestras se analizaron mediante microscopia confocal, utilizando para ello un microscopio confocal espectral Leica TCSSL perteneciente a la Universidad de Valencia y un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 AOBS perteneciente al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Ambos microscopios están equipados con un láser de argón con cuya banda de 488 nm se excitan los fluorocromos 488, un láser de helio-neón cuya banda de 543 nm se usó para excitar a los fluorocromos Cy3 y la banda de 653 nm para la excitación del fluorocromo Cy5 y TOPRO. En el caso del microscopio Leica TCS SP5 AOBS también se pudo detectar el DAPI, con un diodo azul de longitud de onda 405 nm. Para evitar interferencias entre canales en los casos de muestras con más de un fluorocromo, se excitaron estos de manera secuencial.

### 11.5 Morfometría

Para la comparación del tamaño de los tumores se tuvo en cuenta 1 de cada 4 secciones de cortes de vibratomo de 40 µm de grosor desde el OB hasta en cerebelo. En cada sección analizada se determinó el área total del cerebro y el área tumoral. A partir del área de cada sección y del área del tumor se determinó la relación el área relativa ocupada por el tumor y el área cerebral para cada individuo.

## 12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los ensayos *in vitro* se realizaron los experimentos en, al menos, tres cultivos procedentes de diferentes animales. En caso de los experimentos con líneas comerciales o cultivos primarios de tumores se realizaron al menos tres experimentos independientes. Los ensayos *in vivo* se realizaron en tres animales por condición para los ensayos de las NSCs y en cinco animales para los ensayos de formación de tumores.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS versión 12.0 (SPSS Inc, USA). La distribución normal de las poblaciones se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1995) y en caso de las poblaciones que sí lo eran se aplicó el test de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas. La existencia de diferencias significativas entre las condiciones control y experimental se determinó mediante la prueba de la t de Student. Para comparar valores relativos éstos se transformaron aplicándoles la transformación arcsen (raíz (valor)), previamente a aplicar el test t (Sokal y Rohlf, 1995). En el caso de poblaciones no normales se empleó el test de Mann-Whitney. En todos los análisis presentados se ha considerado como significativa una probabilidad  $p < 0,05$ . Las probabilidades se han representado como  $p < 0,05$  \* y  $p < 0,01$  \*\*.

## 13 ANEXO

**Tabla M1.- Secuencias cebadores**

GEN	SECUENCIA	Tª HIBRIDACIÓN (°C)	Nº CICLOS
<i>β-Actina</i>	5'-CCGGGACCTGACAGACTACCT-3' 3'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA-5'	59	20
<i>mDyrk1A</i>	5'-TGACATCCCTGTCTTCTCA-3' 3'-TCCATTCTGTCCAAAGTCCA-5'	59	25
<i>hDYRK1A</i>	5'-GCAATTCCTGCTCCTCTTG-3' 3'-TTACCCAAGGCTTGTGTCC-5'	59	20
<i>rDyrk1A</i>	5'-GTCCAAACTCATCAATGTATC-3' 3'-CTTGAGCACAGCACTGTTG-5'	59	25
<i>Egfr</i>	5'-CCACGCCAACTGTACCTA-3' 3'-ATCCACTGCATTGAACG-3'	59	34
<i>Gdx</i>	5'-GGCAGCTGATCTCCAAAGTCTGG-3' 3'-AACGTTGATGTCATCCAGTGTTA-5'	59	20
<i>Dyrk1A</i>	5'-CTTATGACAGAGTGAGCAA-3'	60	40
<i>P2-P3</i>	5'-CGTGATGAGCCCTTACCTATG-3'		

Cassete neo P1-P3	5'-CTTATGACAGAGTGGAGCAA-3' 5'-CGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC-3'	60	40
pSuper	5'-TCCTTTATCCAGCCCTC-3' 3'-ATGTGTTCTGGGAAATCACC-5'	56	30
pLVTHM	5'-TCCTTTATCCAGCCCTC-3' 3'-CCCAGTACAAGCAAAAAGCA-5'	56	30

Tabla M2.- Secuencias siRNA

siRNA	SECUENCIA
siC-Cbl	5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGG-3'
siCbl-b	5'-GACACUUUCCGGAUUACUA-3'
siDyrk1A	5'-GCGGAAGGUUUACAAUGAU-3'
siControl	5'-CGUACGCGGAUCUUCGA-3'

Tabla M3.- Anticuerpos primarios

ANTICUERPO	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN USO
$\beta$ -Actina	Ratón	Sigma	AC-15	1:1000 (WB)
$\beta$ III-Tubulina	Conejo	Covance	MRP-435P	1:200 (ICQ, IHQ)
BrdU	Ratón	Dako Cytomation	M0744	1:300 (ICQ, IHQ)
Dyrk1A	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-28899	1:500 (WB)
Dyrk1A	Ratón	Abnova	H00001859-M01	1:150 (ICQ, IHQ), 1:250 (WB)
Dyrk1A	Conejo	Cell Signaling	2771	1:100 (ICQ, IHQ), 1:250 (WB)
EGFR	Oveja	Upstate	06129	1:100 (ICQ, IHQ), 1:500 (WB)
EGFR	Conejo	Abcam	Ab2430	1:50 (ICQ, IHQ)
EGFR humano	Ratón	Invitrogen	AHR5062	1:100 (ICQ, IHQ), 1:500 (WB)
Flag M2	Ratón	Sigma	F 1804	1:200 (WB)
GADPH	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	sc-47724	1:1500 (WB)
GFAP	Conejo	Sigma	G-3893	1:300 (ICQ, IHQ)
GFAP	Ratón	Dako Cytomation	Z0334	1:300 (ICQ, IHQ)
GFP	Conejo	Abcam	Ab290	1:500 (WB)
Ki67	Ratón	Novocastra	NCL-L-ki67-MM1	1:100 (ICQ), 1:50 (IHQ)
Mash1	Ratón	BD	556604	1:150 (IHQ)
Sox2	Cabra	R y D Systems	AF 2018	1:200 (ICQ, IHQ)

<b>Sprouty1</b>	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-30048	1:250 (WB)
<b>Sprouty2</b>	Conejo	Upstate	07-524	1:1000 (WB)
<b>Sprouty3</b>	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-30050	1:250 (WB)
<b>Sprouty4</b>	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-30051	1:250 (WB)
<b>Vimentina (V9)</b>	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-6260	1:200 (IHQ)

WB: Western blot, ICQ: Inmunocitoquímica; IHQ Inmunohistoquímica

**Tabla M4.- Anticuerpos secundarios**

ANTICUERPO	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN USO
<b>Cy3 anti-conejo Ig G</b>	Burro	Jackson	705-165-152	1:1500 (ICQ,IHQ)
<b>Cy3 anti-ratón Ig G</b>	Cabra	Jackson	115-166-062	1:1500 (ICQ,IHQ)
<b>Cy3 anti-oveja Ig G</b>	Cabra	Jackson	713-165-003	1:1500 (ICQ,IHQ)
<b>Alexa 488 anti-cabra</b>	Burro	Invitrogen	A-11055	1:600 (ICQ, IHQ)
<b>Alexa 488 anti-ratón</b>	Cabra	Invitrogen	A-11017	1:600 (ICQ, IHQ)
<b>Alexa 488 anti-conejo</b>	Cabra	Invitrogen	A-11070	1:600 (ICQ, IHQ)
<b>Alexa 488 anti-rata</b>	Cabra	Invitrogen	A-11006	1:600 (ICQ, IHQ)
<b>Dylight 488 anti-ratón</b>	Burro	Jackson	715-486-150	1:500 (ICQ, IHQ)
<b>Dylight 488 anti-conejo</b>	Burro	Jackson	715-486-152	1:500 (ICQ, IHQ)
<b>Cy5 anti-ratón</b>	Cabra	Jackson	115-716-072	1:500 (ICQ, IHQ)
<b>HRP anti-cabra</b>	Conejo	Dako Cytomation	P0449	1:1000 (WB)
<b>HRP anti-ratón</b>	Cabra	Chemicon	AP124P	1:1000 (WB)
<b>HRP anti-conejo</b>	Burro	Amersham	NA 934	1:5000 (WB)

WB: Western blot, ICQ: Inmunocitoquímica; IHQ Inmunohistoquímica





# **Resultados y desarrollo argumental**



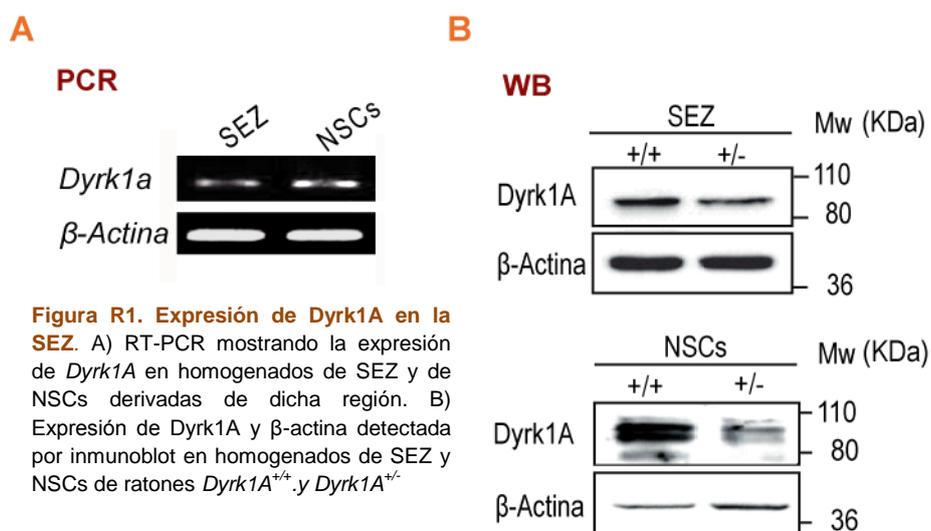
## 1 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA SEZ DE RATONES *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>

*Dyrk1A* tiene una expresión significativa en el cerebro murino, tanto en el embrión como en el adulto (Martí et al., 2003). Asimismo estudios previos indican que *Dyrk1A* está implicado en el correcto desarrollo de los progenitores neurales y en diversos aspectos de la neurogénesis en estadios embrionarios (Hämmerle et al., 2011; Park et al., 2010). Sin embargo no se ha analizado si *Dyrk1A* sigue desempeñando un papel importante en la regulación de los nichos neurogénicos después del nacimiento.

Los ratones mutantes nulos para *Dyrk1A* no son viables, muriendo en el estadio embrionario E10,5 (Fotaki et al., 2002). Sin embargo los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>, a pesar de tener una viabilidad reducida frente a sus hermanos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> de la camada, sí son viables. Así pues decidimos estudiar el fenotipo de la hemicigosis de *Dyrk1A* sobre las NSCs, comenzando por el análisis de la expresión de *Dyrk1A* en las distintas poblaciones celulares que componen la SEZ de ratones adultos de más de 2 meses de edad.

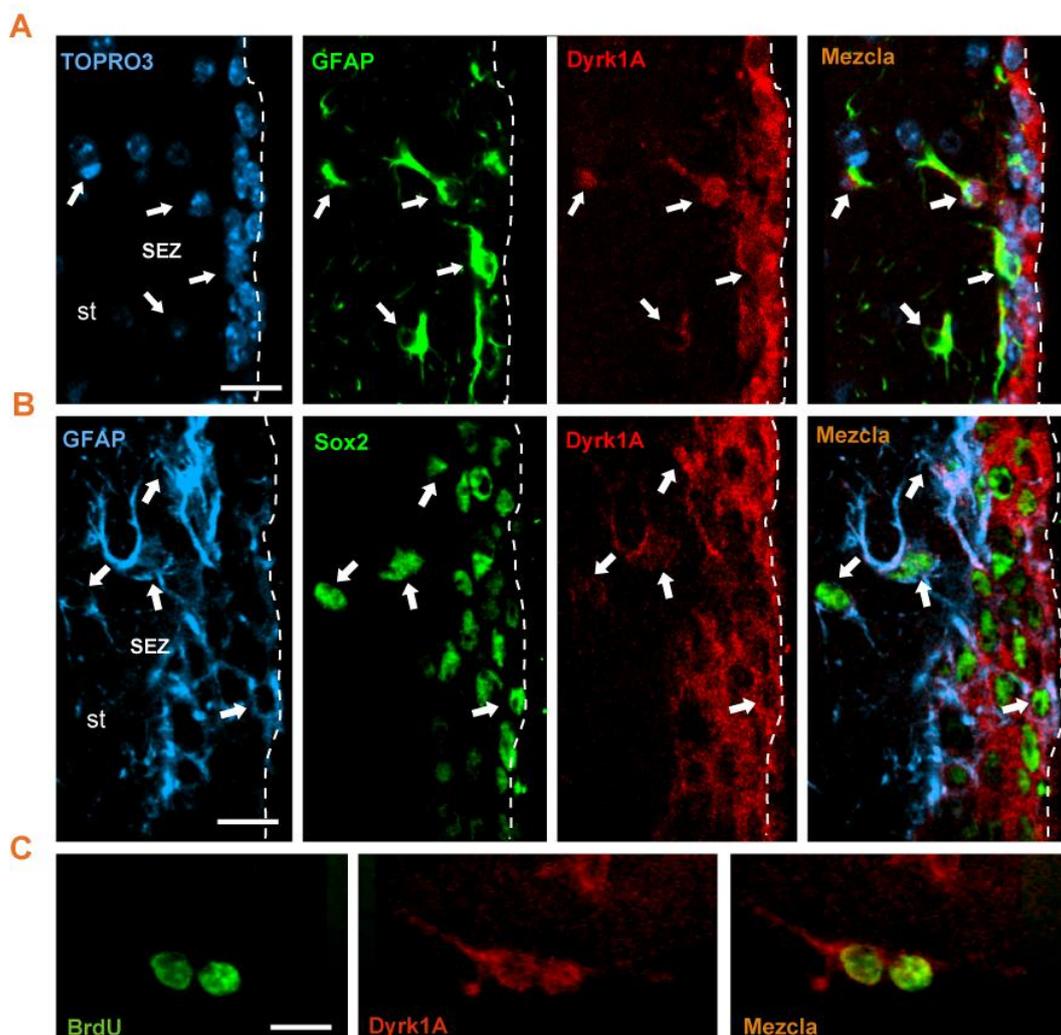
### 1.1 *Dyrk1A* se expresa en las NSCs de la SEZ

Para el estudio de la expresión de *Dyrk1A* en la SEZ y las NSCs derivadas de dicha zona, se obtuvieron homogenados tanto de tejido de la SEZ como de neuroesferas en cultivo y se analizó la expresión de *Dyrk1A* a nivel de RNA y de proteína. El gen *Dyrk1A* medido por RT-PCR se expresa en la SEZ *in vivo* y es expresado por las NSCs *in vitro* (Figura R1A). Análogamente la proteína *Dyrk1A* se expresa también en homogenados tanto de la SEZ como de NSCs en cultivo (Figura R1B). Como era de esperar encontramos que existe una reducción en la cantidad de proteína *Dyrk1A* analizada por WB en la SEZ y en NSCs en cultivo de los animales heterocigotos para *Dyrk1A*, indicando que los niveles de la proteína *Dyrk1A* son dependientes de la dosis génica (Figura R1B). Este resultado nos confirma además la especificidad del anticuerpo (utilizado en este estudio tanto para WB como para detección por IF).



Para examinar la expresión de Dyrk1A *in situ* en la SEZ se utilizaron marcadores específicos de la subpoblación de NSCs de dicha zona, como son la combinación del marcador astrocitario GFAP (marcador de célula madre tipo B y astrocitos quiescentes) (Doetsch et al., 1999a) y del factor de transcripción Sox2 (marcador de célula madre neural tipo B activa y de progenitor de rápida amplificación) (Brazel et al., 2005; Ellis et al., 2004). Dyrk1A se detecta por IF en las células positivas para GFAP adyacentes al LV (Figura R2A), y además se detecta en las células dobles positivas GFAP/Sox2 indicando que las células madre expresan Dyrk1A (Figura R2B).

Una de las características de las NSCs *in vivo* es que son más quiescentes que los progenitores neurales, lo cual permite diferenciarlas cinéticamente. Con el objetivo de ratificar que las NSCs expresan Dyrk1A marcamos dichas células por retención del marcador de proliferación BrdU *in vivo* (descrito en Materiales y métodos). Para ello se inyectaron ratones de tres meses de edad con BrdU y se sacrificaron un mes después de las inyecciones. Como se observa en la Figura R2C las NSCs, que son aquellas que han incorporado BrdU pero que no se han dividido lo suficiente como para diluir el marcaje (células BrdU<sup>+</sup>) (Johansson et al., 1999), son positivas para Dyrk1A.



**Figura R2. Expresión de Dyrk1A en la SEZ *in vivo*.** A) Imágenes representativas de la detección por IF de Dyrk1A y GFAP en la SEZ de ratones de fenotipo salvaje. La pared del ventrículo está delimitada por una línea blanca discontinua. Las flechas indican células doble positivas para dichos marcadores. B) Imágenes representativas de la detección por IF de Dyrk1A, GFAP y Sox2 en la SEZ de ratones de fenotipo salvaje. Las flechas blancas indican células triplemente positivas para dichos marcadores. C) Detalle de la expresión de Dyrk1A en células BrdU<sup>L</sup> en la SEZ. Barras de escala: A y B 20  $\mu$ m, C 10  $\mu$ m.

Los datos indican que Dyrk1A se expresa abundantemente en las células progenitoras de la SEZ y que las NSCs también lo expresan, tanto *in vivo* como *in vitro*.

## 1.2 Dyrk1A regula la población de células madre neurales *in vivo*

Una vez establecido que Dyrk1A se expresa en la SEZ, incluyendo a las NSCs, procedimos a analizar cuál podía ser su función en dicha zona neurogénica. Para ello

analizamos el fenotipo de los ratones hemicigotos para dicha quinasa que, como ya se ha mencionado, presentan una disminución en los niveles de *Dyrk1A* (Figura R1B). En primer lugar procedimos a determinar si había alguna población celular especialmente afectada por la bajada en la expresión de *Dyrk1A*. Para ello se utilizaron los siguientes marcadores:

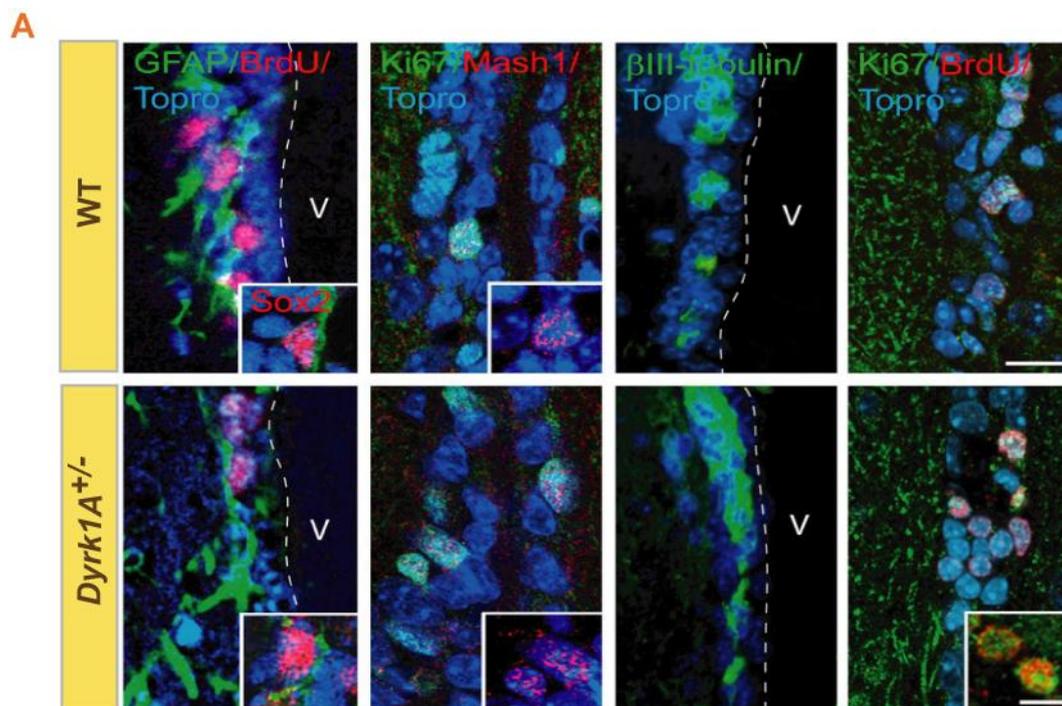
- **GFAP.**- Célula astrocitaria y NSC activa.
- **Sox2.**- Célula madre y de rápida amplificación.
- **Mash1.**- Células de rápida amplificación.
- **$\beta$ III-tubulina.**- Neuroblastos y neuronas de nueva generación.

Se había determinado con anterioridad que los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen un cerebro más pequeño que los ratones *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> (Fotaki et al., 2002). Esta disminución en el tamaño del cerebro también afecta al volumen de la SEZ que se encuentra reducido aproximadamente en un 32 % en los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> (Ferron et al., 2010). Por ello, en el estudio del posible efecto de la hemicigosis de *Dyrk1A* sobre la densidad y la proliferación de los diferentes tipos celulares presentes en la SEZ, se realizó un estudio comparando los porcentajes de los diferentes tipos celulares entre las SEZ de animales salvajes y heterocigotos para *Dyrk1A*, dado que dicho valor porcentual es independiente del tamaño de la SEZ, en lugar de comparar los números absolutos de dichos tipos celulares, que pueden variar simplemente por la diferencia del volumen de la SEZ que se encuentra entre ambos genotipos.

De los tipos celulares analizados encontramos que en la SEZ de animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> de tres meses de edad existe una reducción en la densidad de células GFAP+, así como en las células madre marcadas como dobles positivas para GFAP/Sox2. Sin embargo no se encontraron variaciones ni en la proporción de células de rápida amplificación Mash1 positivas ni en neuroblastos  $\beta$ III-tubulina positivos (Figura R3).

Para el estudio de la cinética de proliferación se estudiaron los marcadores de ciclo celular ki67 y la incorporación de BrdU, en animales de tres meses de edad inyectados con BrdU antes del sacrificio (7 inyecciones en 12 horas y sacrificio 1 hora después de la inyección, explicado en material y métodos) para marcar las células que estaban en proliferación. Como se observa en la Figura R3 en los animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> hay una disminución en la proporción de células GFAP+ proliferantes en la SEZ. Sin embargo este defecto proliferativo no se observa en los progenitores de rápida amplificación ni en los neuroblastos.

También se comprobó que no existía una alteración generalizada de los parámetros de ciclo celular en la SEZ, al no observarse un cambio significativo en el cociente entre células en fase S del ciclo celular (BrdU+) y células en ciclo celular (ki67+) (Figura R3).



**B**

Porcentaje de células	WT	<i>Dyrk1A</i> <sup>+/-</sup>
GFAP	25,7 ± 2,6	** 18,2 ± 1,7
GFAP/BrdU	22,6 ± 1,3	* 15,6 ± 1,1
GFAP/Sox2	12,5 ± 0,6	** 8,3 ± 0,9
Mash1	17,8 ± 0,7	14,4 ± 1,9
Mash1/ki67	51,3 ± 1,8	52,7 ± 3,4
βIII-tubulina	30,3 ± 3,7	29,2 ± 4,2
βIII-tubulina/BrdU	28,6 ± 2,9	23,8 ± 5,1
BrdU/ki67	76,7 ± 7,4	75,6 ± 1,5

**Figura R3. Las NSCs son la población celular más afectada en la SEZ de ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>.**

A) Imágenes representativas del análisis por IF para el marcador de células madre activas GFAP, el marcador de nuevas neuronas βIII-tubulina y los marcadores de proliferación BrdU y ki67 en ratones salvajes y heterocigotos para *Dyrk1A* inyectados previamente con BrdU. B) Porcentajes de la densidad de células positivas para los marcadores Mash1, βIII-tubulina, GFAP y células en proliferación BrdU y/o ki67 en la SEZ de ratones salvajes y heterocigotos para *Dyrk1A* (n=3). Barras de escala 20 μm, en las ampliaciones encuadradas 10 μm.

Estos datos sugieren que la disminución de los niveles de *Dyrk1A* afecta de manera específica a la población de células B en la SEZ, disminuyendo el porcentaje de dicha población celular, pero no afecta a los progenitores de rápida amplificación ni a los

neuroblastos. Estos datos contrastan con los análisis realizados durante el desarrollo del SNC murino que indicaban que la sobre-expresión de *Dyrk1A* inhibe la proliferación de los progenitores neurales y favorece la diferenciación de los mismos (Hämmerle et al., 2011; Yabut et al., 2010). Se puede proponer por tanto la hipótesis de que *Dyrk1A* regula el comportamiento de los progenitores neurales, tanto en el embrión como en el cerebro adulto, aunque su función parece ser antagónica en ambos estadios.

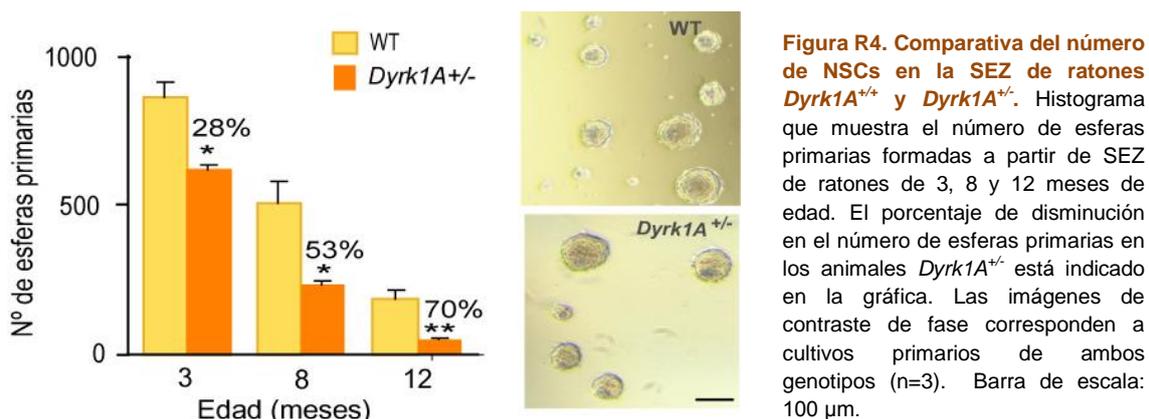
## 2 CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS DE NSCs DE RATONES *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>

Las NSCs de la SEZ pueden crecerse *in vitro* en ausencia de suero y presencia de mitógenos (EGF y/o FGF) en forma de neuroesferas. El ensayo de formación de neuroesferas primarias permite identificar células que poseen características de NSC: auto-renovación, proliferación y diferenciación a los tres tipos celulares del linaje neural. Además el número de neuroesferas que se forman en un cultivo primario procedente de una SEZ se interpreta como una estimación retrospectiva del número de células madre presentes originalmente en dicha región (Reynolds and Weiss, 1992).

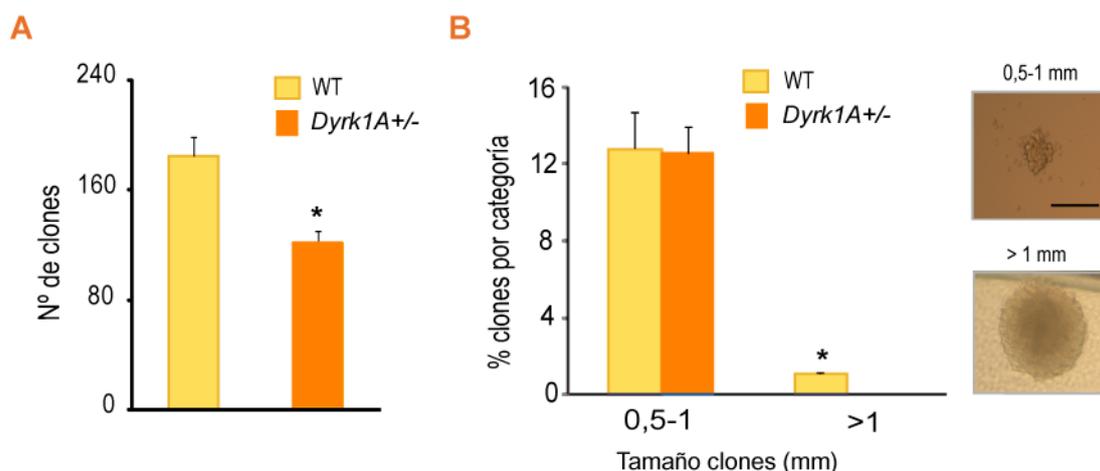
Dado que los resultados anteriores sugerían que la población más afectada por la disminución de los niveles de *Dyrk1A* son las NSCs procedimos a estudiar la capacidad de formación de esferas de la SEZ de ratones salvajes y hemicigotos para *Dyrk1A*, así como el comportamiento *in vitro* de dichas NSCs.

### 2.1 Los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen menor número de NSCs

Para analizar si, efectivamente, los animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen afectada la población de NSCs, se realizaron cultivos primarios de SEZ de animales de ambos genotipos y de edades comprendidas entre los 3 y los 12 meses en ausencia de suero y en presencia de los mitógenos EGF y FGF. De acuerdo con el análisis de los distintos marcadores por IF, en los cultivos procedentes de animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> se forman menos esferas primarias que en los cultivos de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> (Figura R4). A partir de los seis meses de vida del ratón adulto se ha descrito que existe una disminución con la edad del número de NSCs presentes en la SEZ (Enwere et al., 2004; Maslov et al., 2004). Este decaimiento se produce en ambos fenotipos, pero en el caso de los animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> se ve claramente exacerbado.

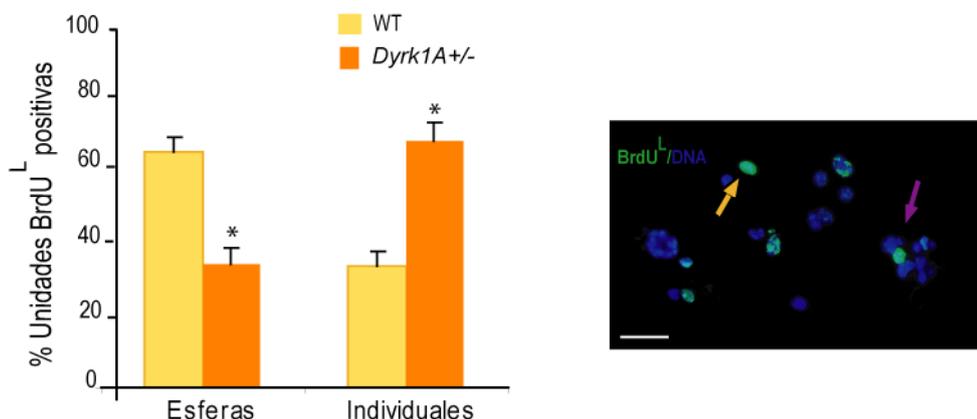


Se ha descrito que en presencia de EGF, tanto los progenitores más indiferenciados como las NSCs pueden formar esferas (Doetsch et al., 2002). Recientemente se ha propuesto que la formación de colonias en cultivos tridimensionales de matrices de colágeno (*Neural colony forming cell assay*) permitiría diferenciar las esferas formadas por las NSCs en base a su mayor capacidad de proliferación, frente a las formadas por los progenitores (Louis et al., 2008). Según los autores las NSCs dan lugar a clones de mayor tamaño en comparación con los progenitores más diferenciados, dado que los progenitores se van a dividir *in vitro* un número limitado de veces y después detendrán su proliferación, pero no las NSCs, que seguirán proliferando indefinidamente. Así pues se decidió realizar ensayos de formación de clones en colágeno de NSCs de cultivos primarios de la SEZ de animales de ambos genotipos de tres meses de edad, en presencia de los mitógenos EGF y FGF. Tras tres semanas en cultivo se procedió al recuento tanto del número de clones formados por cada genotipo así como a la medida del diámetro de los clones. Los cultivos procedentes de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> formaron mayor número de clones que los animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) (Figura R5A). Además, al comparar la distribución del tamaño de los clones por categorías se encontró que únicamente los cultivos procedentes de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> producían colonias de tamaño superior a 1 mm, que proceden de células con mayor capacidad de auto-renovación (Figura R5B).



**Figura R5. Caracterización del crecimiento de la SEZ de ratones WT y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> en matriz de colágeno.** A) Cuantificación del número de clones totales formados en matriz de colágeno por cultivos primarios de NSCs de animales de tres meses de edad de ambos genotipos (n=3). B) Distribución del tamaño de los clones formados en cultivos sembrados en matriz de colágeno a partir de SEZ de animales de 3 meses de edad (n=3). Las imágenes de contraste de fases representan clones de los tamaños indicados. Barra de escala: 500  $\mu$ m.

Como parecen indicar los datos obtenidos de los cultivos primarios de neuroesferas y los recuentos *in vivo*, los niveles reducidos de *Dyrk1A* provocan una disminución en el número de NSCs activas (que incorporan BrdU y son capaces de dividirse para formar esferas *in vitro*). Con el fin de confirmar esta hipótesis analizamos cuál era el comportamiento específico de las células retendedoras de marca (BrdU<sup>L</sup>). Para ello se aislaron células de la SEZ de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> que habían sido previamente inyectados con BrdU (7 pinchazos durante 12 horas) un mes antes del sacrificio. Se sembraron cantidades equivalentes de células individuales procedentes de la SEZ para cada individuo a una densidad clonal de 2,5 céls/ $\mu$ l y en presencia de los mitógenos EGF y FGF. A las 48 horas después de la siembra se realizó una detección por IF de las células en cultivo positivas para BrdU, cuantificando la proporción de células BrdU<sup>L</sup> positivas que se encontraban como células individuales o bien aquellas células BrdU<sup>L</sup> que habían sido capaces de dividirse y comenzar a formar una neuroesfera (Ferron et al., 2007). La figura R6 muestra que en los cultivos procedentes de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> la proporción de células BrdU<sup>L</sup> que son capaces de proliferar *in vitro* en respuesta a los mitógenos y formar una neuroesfera es mayor que en los animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>.



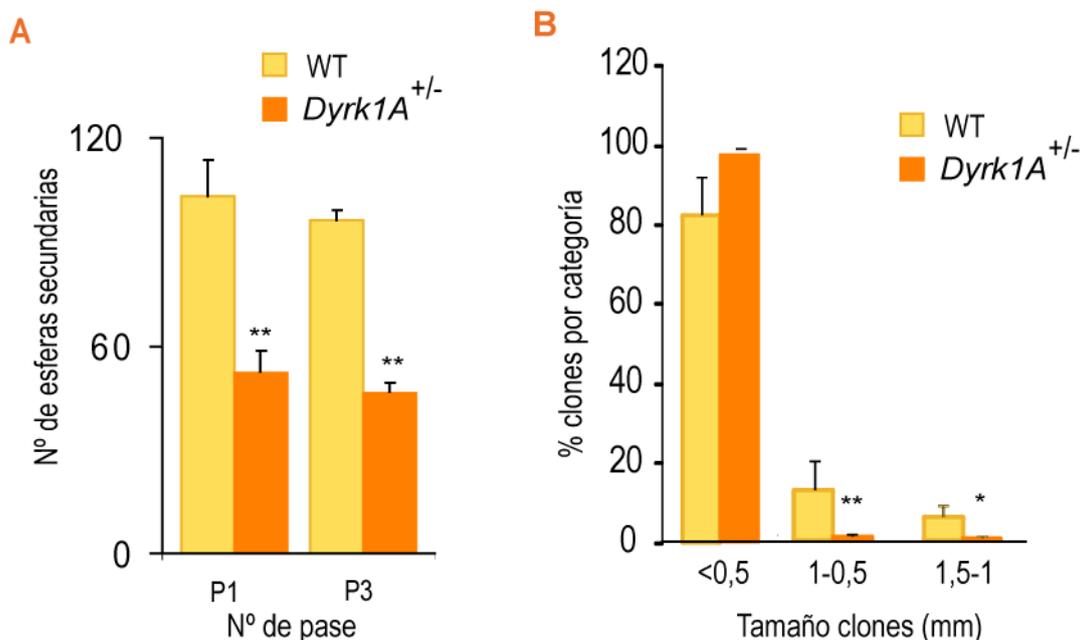
**Figura R6. Las NSCs *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen menos capacidad de activación *in vitro*.** Cuantificación del número de esferas y células individuales con células positivas para BrdU<sup>L</sup> tras 48 horas en cultivo, (n=3). La imagen de IF muestra células positivas para BrdU<sup>L</sup>. La flecha morada indica una célula positiva para BrdU que ha formado una esfera y la naranja una célula BrdU positiva que ha permanecido como célula individual. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Estos datos apoyan la idea de que las NSCs de animales con menor dosis de *Dyrk1A* tienen una menor capacidad de activación frente a las señales mitogénicas, lo cual podría explicar la presencia de un menor porcentaje de células madre en la SEZ de estos animales.

## 2.2 *Dyrk1A* es necesario para la correcta auto-renovación de las NSCs

Con el fin de descartar que el descenso en el número de NSCs y en su capacidad de activación en los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> pudiera ser debido a defectos en el nicho celular y molecular de la SEZ, procedimos a analizar el comportamiento *in vitro* de las células realizando ensayos de formación de esferas secundarias a partir de células individuales de cultivos establecidos de la SEZ de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>, en presencia de los mitógenos EGF y FGF. Las NSCs individuales en pase 1 y 3 se sembraron a una densidad de 2,5 céls/ $\mu$ l para impedir la agregación celular y se cuantificó el número de neuroesferas formadas a los cinco días tras la siembra. Como se puede ver en la Figura R7A, los cultivos *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> formaron menos esferas secundarias que los cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> lo que demuestra que *Dyrk1A* regula directamente el comportamiento de las NSCs.

Se realizaron también ensayos de formación de clones en colágeno de cultivos establecidos de NSCs en pase 3 de animales de 3 meses de edad salvajes y heterocigotos para *Dyrk1A* con el fin de confirmar la disminución en la capacidad clonogénica de los cultivos *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>. Las células de animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> formaron clones significativamente más pequeños que los cultivos de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup>, lo cual indica una menor capacidad de auto-renovación de las células madre de estos cultivos heterocigotos (Figura R7B).



**Figura R7. Dyrk1A regula la auto-renovación de las NSCs.** A) Cuantificación del número de esferas secundarias formadas en ensayos de auto-renovación a densidad clonal en cultivos de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> en pasajes 1 y 3 (n=3). B) Histograma donde se muestra la distribución por tamaños de los clones formados en una matriz tridimensional de colágeno en cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> (Pase 3) a las tres semanas tras la siembra (n=3).

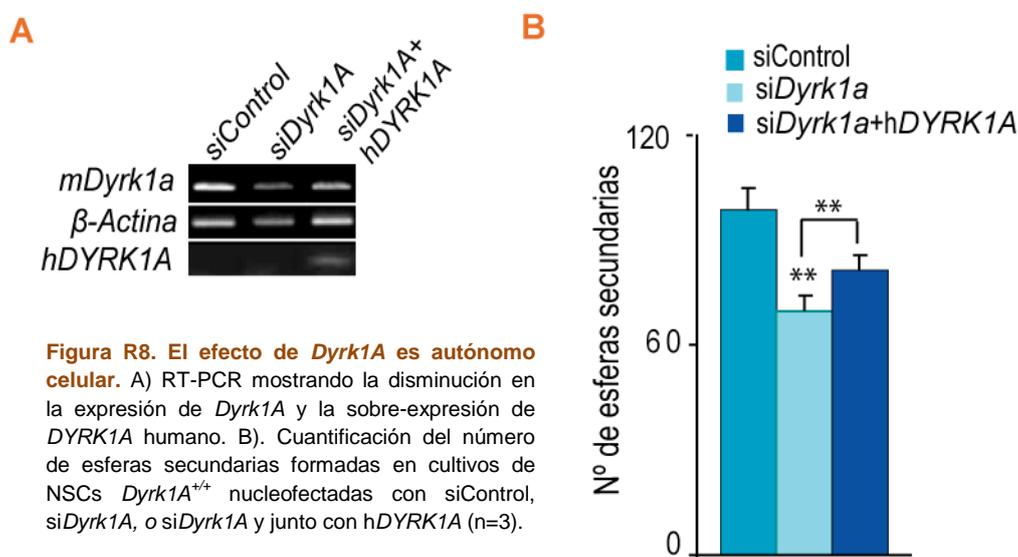
Los experimentos realizados sugieren que *Dyrk1A* participa de manera directa en los procesos de regulación de la activación y la capacidad de auto-renovación de las NSCs.

### 2.3 El descenso puntual en los niveles de *Dyrk1A* produce el mismo efecto que la hemicigosis

El fenotipo que encontramos en las NSCs de los ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> podría ser debido también a la ausencia de *Dyrk1A* durante todo el desarrollo del individuo, ya que esto podría estar seleccionando algún subtipo celular. Para comprobar la autonomía de *Dyrk1A* en la regulación de las NSCs, realizamos ensayos de silenciamiento del gen *Dyrk1A* en NSCs de genotipo salvaje mediante el uso de siRNA.

Para ello se disgregaron neuroesferas de cultivos establecidos de la SEZ de animales de genotipo salvaje y, tras dos días en cultivo, se nucleofectaron las neuroesferas usando un nucleofector de Amax Biosystems con una secuencia de siRNA aleatoria como control negativo (siControl) y un siRNA que reconoce el exón 4 del gen *Dyrk1A* (si*Dyrk1A*). Tres días después de la nucleofección se comprobó que se había silenciado el gen *Dyrk1A* por RT-PCR (Figura R8A). Las esferas formadas se disgregaron y se sembraron las células individuales a

densidad clonal para ensayar la capacidad de auto-renovación, encontrando que las células interferidas para *Dyrk1A* tenían menor capacidad de formar esferas secundarias (Figura R8B). Además este fenotipo se podía revertir parcialmente mediante la expresión de un retrovirus con una construcción para la sobre-expresión de la proteína DYRK1A humana (hDYRK1A), la cual es insensible al RNA de interferencia murino. Para ello se infectaron las neuroesferas con el retrovirus para sobre-expresar el gen *DYRK1A* humano 24 horas tras la nucleofección del *siDyrk1A*. Se comprobó por RT-PCR que *DYRK1A* se estaba expresando (Figura R8A) y que además producía un aumento en el número de esferas secundarias de los cultivos interferidos para *Dyrk1A* (Figura R8B).

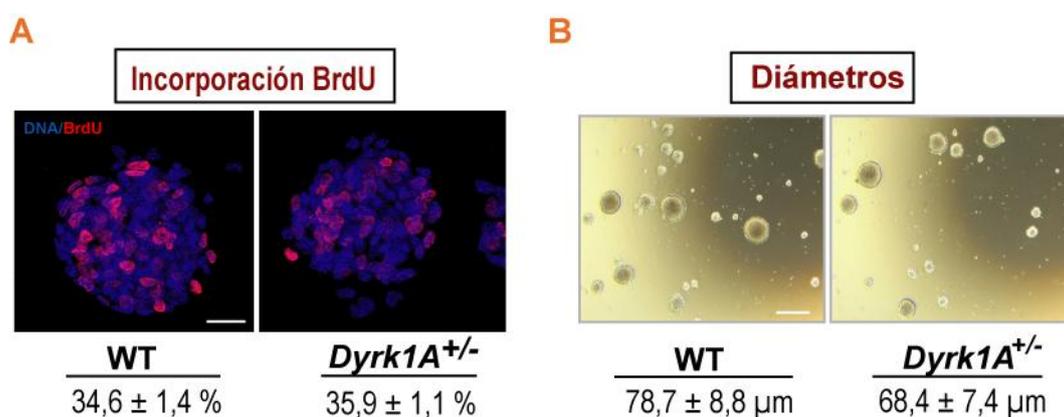


Estos datos indican que *Dyrk1A* actúa de manera autónoma celular para controlar la auto-renovación de la NSCs.

## 2.4 La proliferación de las células *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> no está alterada

La población de células en una neuroesfera no es homogénea; de hecho, tan sólo un 10% de células son capaces de generar esferas secundarias, lo que indica que existe una mezcla de células más o menos diferenciadas, con mayor o menor capacidad de auto-renovación. El ensayo de formación de esferas depende por tanto de la capacidad de auto-renovación y de la capacidad de proliferación, tanto de la NSC como de las células más diferenciadas, generadas a partir de ella. Por ello, la formación de un menor número de esferas observada en los cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> podría corresponderse con una menor capacidad de estas células para auto-renovarse, pero también podía deberse a un déficit en el potencial

proliferativo de las células que forman la esfera. Para descartar esta hipótesis se comprobó la capacidad de proliferación de los cultivos de ambos genotipos, mediante la tasa de incorporación de BrdU (como medida del número de células en fase S del ciclo celular frente al número total de células) y con la medida del diámetro medio poblacional de las esferas (un mayor diámetro se correlaciona con una mayor capacidad proliferativa) (Ohtsuka et al., 2001). No se encontraron diferencias significativas en la proliferación entre ambos genotipos, ni en la tasa de incorporación de BrdU ni en la media del diámetro poblacional de las neuroesferas (Figura R9).



**Figura R9. La cantidad de *Dyrk1A* no altera los parámetros de proliferación en las neuroesferas.**

A) Detección por IF del marcador de proliferación BrdU. Los datos indican el porcentaje de células BrdU positivas en cada cultivo. B) Imagen de contraste de fases de cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>. Los datos son la medida del diámetro medio de las neuroesferas. Barra de escala: A 30 μm, B 100 μm.

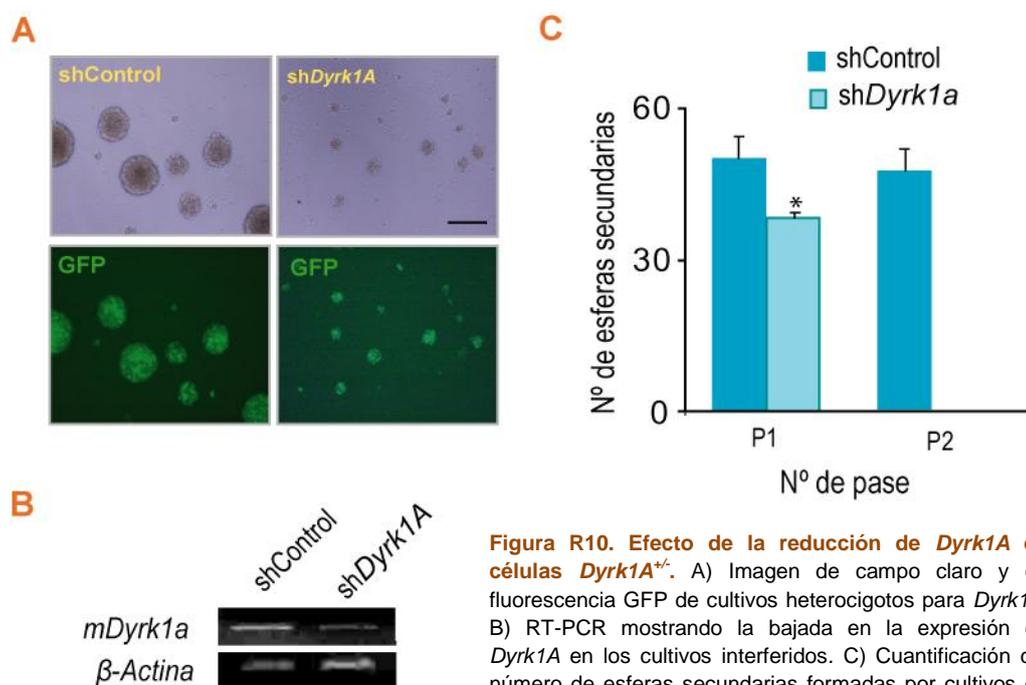
Estos datos indican que la depleción en el número de NSCs en los cultivos de animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> es consecuencia de una menor capacidad de auto-renovación de estas células y no debido a un defecto en la capacidad de proliferación de la progenie de las NSCs. Estos datos están de acuerdo con el análisis cinético de la SEZ (Figura R3) que demostraba que en los ratones heterocigotos no había deficiencias en la capacidad proliferativa de la progenie derivada de la SEZ (progenitores y neuroblastos), y refuerzan las diferencias en el control de la proliferación por *Dyrk1A* entre progenitores embrionarios (Hämmerle et al., 2011; Yabut et al., 2010) y adultos.

## 2.5 Una expresión mínima de *Dyrk1A* es necesaria para el mantenimiento de las NSCs

Para poder acercarnos experimentalmente al estudio del efecto de la carencia de *Dyrk1A* sobre las NSCs recurrimos al uso de lentivirus que expresan una construcción shRNA

para el exón 4 del gen *Dyrk1A* para disminuir la cantidad de *Dyrk1A* en las NSCs heterocigotas, por debajo de la mitad de la dosis génica presente en dichos cultivos.

Se realizaron infecciones en células *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> con lentivirus portadores de una secuencia shControl o sh*Dyrk1A* que se expresan a partir del promotor de la H1 y, en ambos casos, expresan la proteína GFP bajo el control del promotor EF1a. Dos días después de la infección se comprobó la eficacia de la infección mediante la expresión de GFP y la disminución de la expresión de *Dyrk1A* por RT-PCR (Figura R10 A y B). Las neuroesferas se disgregaron y se sembraron en ensayos de auto-renovación a densidad clonal (2,5 céls/μl). Las células heterocigotas transducidas con la secuencia portadora del shRNA para *Dyrk1A* formaron menor cantidad de esferas que las portadoras del shRNA control. Además las esferas formadas tras la infección con sh*Dyrk1A* eran mucho menores en diámetro y no generaban esferas tras su disociación (Figura R10 A y C).

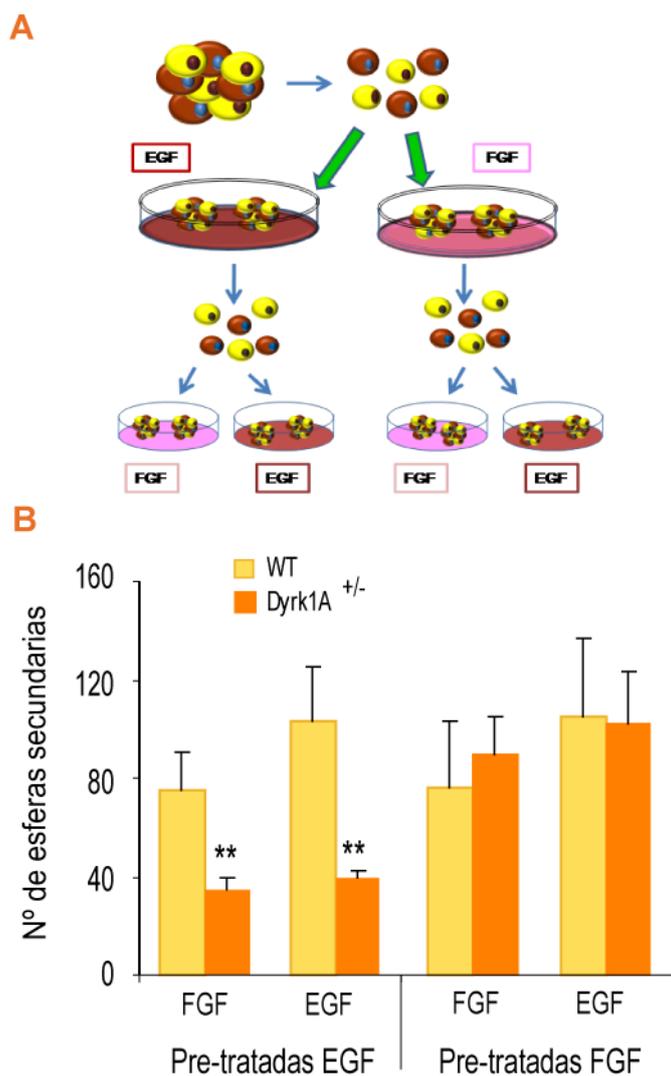


Los datos obtenidos sugieren que las NSCs son extremadamente sensibles a las dosis de *Dyrk1A*. Una disminución en la expresión correspondiente a la hemicigosis provoca defectos claros en auto-renovación, pero por debajo de esos niveles las NSCs no son capaces de dividirse y se produce la extinción de los cultivos.

## 2.6 El fenotipo de las NSCs *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> se observa sólo en respuesta al mitógeno EGF

Las NSCs *in vitro* se cultivan en presencia de los mitógenos EGF y FGF, pero existen diferentes trabajos que han descrito que ambos mitógenos difieren en su mecanismo de actuación y podrían estar regulando diferentes aspectos de la supervivencia y/o proliferación de las NSCs (Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002), e incluso actuar de manera diferencial sobre los diferentes tipos celulares que componen la SEZ (Doetsch et al., 2002; Zheng et al., 2004). Dado que *Dyrk1A* actúa sobre la capacidad de activación de las NSCs *in vitro*, nos planteamos estudiar si esta regulación podía ser dependiente del mitógeno utilizado en cultivo.

Para este estudio se disociaron neuroesferas de ambos genotipos y se sembraron células individuales a densidad de expansión (50 céls/ $\mu$ l) en medio de cultivo en presencia de únicamente uno de los dos mitógenos: EGF (20 ng/ml) ó FGF (10 ng/ml). Tras una semana en cultivo se disgregaron las esferas formadas en cada condición de crecimiento (y para cada genotipo) y se sembraron ensayos de auto-renovación a densidad clonal de nuevo en presencia solamente de uno de los dos mitógenos, de forma que las células pre-tratadas con EGF se sembraron en EGF o FGF y las células pre-tratadas con FGF se sembraron en EGF o FGF (Figura R11A). Como se observa en la Figura R11B las células *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> presentan defectos en auto-renovación sólo si son expandidas en presencia de EGF, ya que si se expanden en presencia de FGF se comportan igual que las *Dyrk1A*<sup>+/+</sup>. Además, es importante señalar que este fenotipo es independiente del mitógeno empleado en la formación de esferas secundarias, lo que confirma que *Dyrk1A* regula de manera específica la expansión de las NSCs en respuesta a EGF y que no afecta a la capacidad de proliferación de la progenie de las células formadoras de esferas.



**Figura R11. Auto-renovación de NSCs en respuesta a los diferentes factores de crecimiento presentes en cultivo.** A) Esquema del diseño experimental. Las células se sembraron a densidad de 50 céls/ $\mu$ l en presencia de EGF o FGF. Posteriormente las esferas formadas se disgregaron y resembraron de nuevo en EGF o FGF para un ensayo de auto-renovación. B) Cuantificación del número de esferas secundarias formadas en el ensayo de auto-renovación descrito en el apartado A, tanto por cultivos salvajes como heterocigotos para *Dyrk1A* en presencia de EGF o FGF (n=3).

Los datos obtenidos sugieren que la regulación de la auto-renovación que ejerce *Dyrk1A* sobre las NSCs se da en respuesta a la señalización a través del mitógeno EGF.

### 3 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EGFR POR *Dyrk1A*

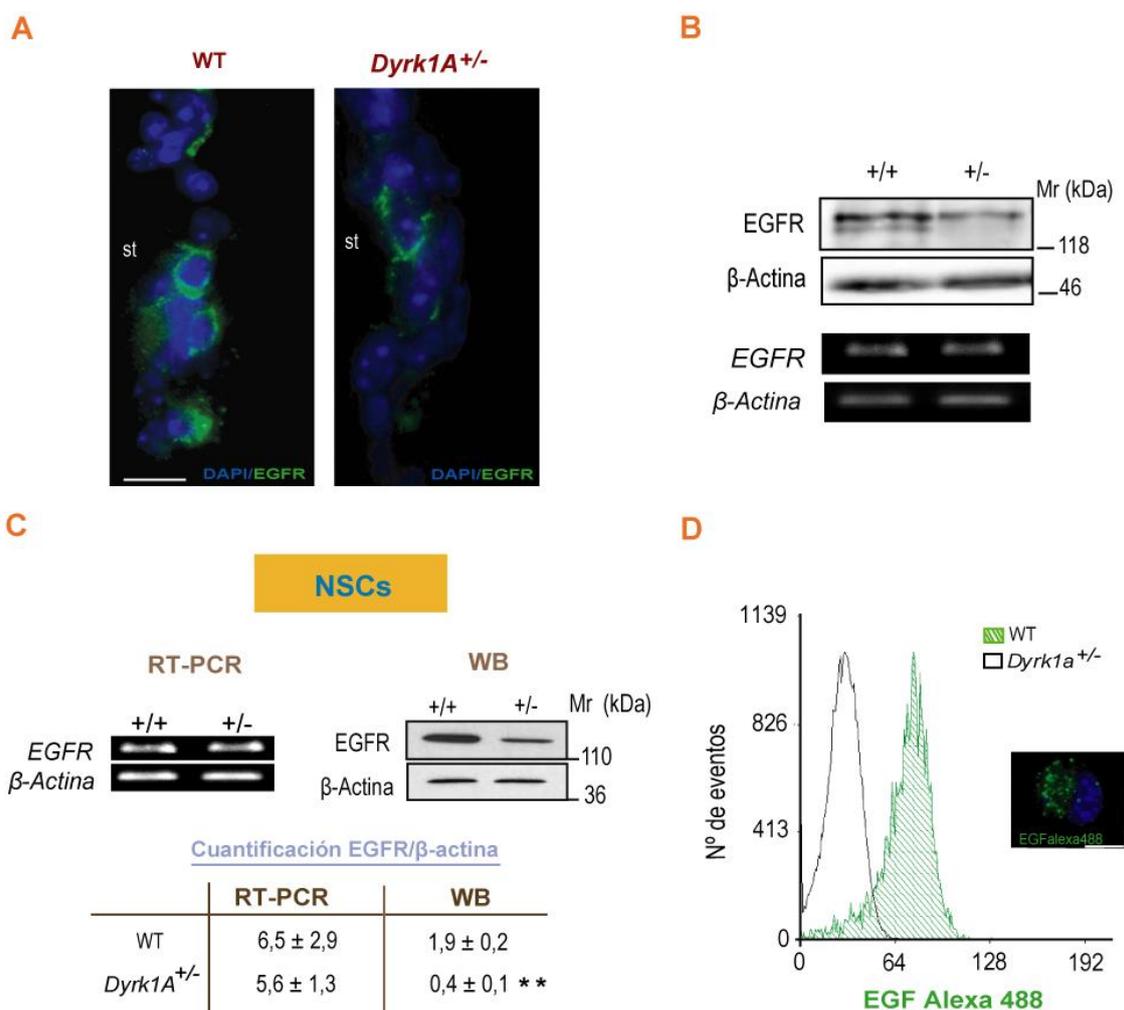
#### 3.1 Los niveles de *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> y EGFR correlacionan en las NSCs, tanto *in vivo* como *in vitro*

Como se ha mencionado en la introducción existen diversos factores que controlan la capacidad de auto-renovación de las NSCs en la SEZ. Se ha sugerido que las NSCs se pueden activar en respuesta a cambios en el nicho celular inducidos en respuesta a daño, o en

presencia de diferentes morfógenos secretados por células del propio nicho (Wang et al., 2011). Estos cambios coinciden con la expresión de diferentes marcadores en las NSCs activas, como inducción de Sox2, la activación de la vía de Notch (Andreu-Agulló et al., 2009), la inhibición de Bmi1, la bajada en la expresión de Id1 (Nam and Benezra, 2009), o el aumento en la expresión de EGFR (Pastrana et al., 2009). Esto último es especialmente interesante ya que la presencia de EGFR en la membrana permitiría identificar de manera prospectiva a NSCs activadas de las NSCs quiescentes (Pastrana et al., 2009). Dado que las NSCs heterocigotas para *Dyrk1A* tienen una menor respuesta a la activación por el mitógeno EGF, una de las maneras en las que *Dyrk1A* podría estar interfiriendo en esta respuesta es mediante la regulación de la expresión del EGFR. Esto explicaría la menor capacidad de activación de estas células en respuesta a EGF.

Los estudios de detección de EGFR por IF *in vivo* mostraron que en la SEZ de ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> se detecta un menor número de células EGFR positivas adyacentes a los ventrículos laterales (Figura R12A). Asimismo el análisis por WB de los niveles de proteína EGFR que se encuentra en homogenados de la SEZ de ratones *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> mostró que la SEZ de los ratones heterocigotos para *Dyrk1A* tiene menor cantidad de EGFR (Figura R12B). Sin embargo, a nivel transcripcional no se encontraron cambios en la expresión de EGFR en homogenados de la SEZ de ambos genotipos medido por RT-PCR (Figura R12B).

*In vitro* las NSCs *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> también presentan una menor cantidad de EGFR a nivel de proteína total pero no se encuentran diferencias significativas en la expresión a nivel de mRNA (Figura R12C). Por último se analizó la cantidad de EGFR disponible para unirse al ligando en la membrana celular de las NSCs por citometría de flujo. Para ello se utilizó el ligando fluorescente verde EGF-Alexa488 (Figura R12D), encontrando que, en consonancia con los datos anteriores, en los cultivos de células *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> disminuye el número de células con niveles detectables de EGFR en la membrana plasmática.



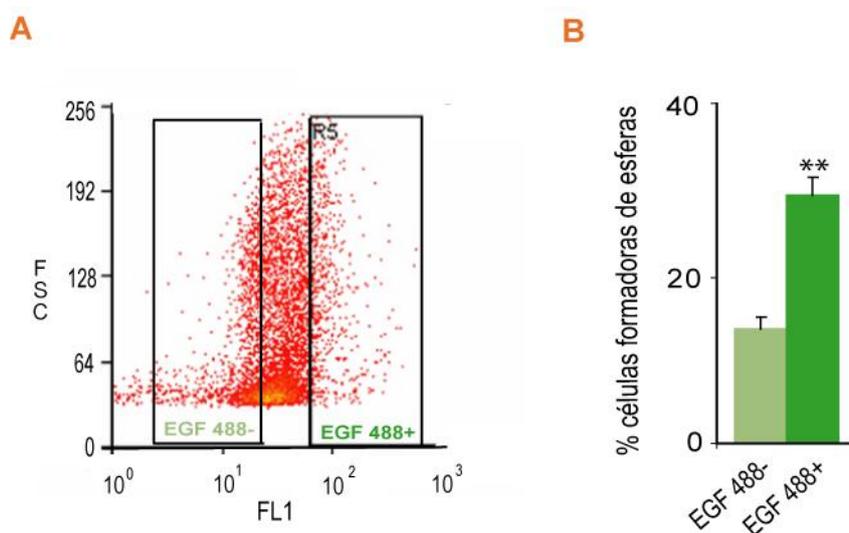
**Figura R12. Los niveles de *Dyrk1A* correlacionan con los de EGFR.** A) Imágenes de IF en la SEZ de animales salvajes y heterocigotos para *Dyrk1A*. B) Expresión de EGFR en SEZ de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>, medida a nivel post-transcripcional mediante análisis de la cantidad de EGFR en extractos de proteína, y a nivel de mensajero mediante RT-PCR. C) Análisis de expresión por RT-PCR y WB de la cantidad de mRNA y proteína en cultivos de neuroesferas de SEZ de animales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>. La cuantificación corresponde a los niveles de EGFR referidos a los niveles de  $\beta$ -actina correspondientes (n= 3). D) Análisis por citometría de flujo utilizando el ligando fluorescente verde EGF-Alexa488 de la cantidad de EGFR presente en la membrana de cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> y *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>. En el recuadro se muestra una imagen representativa de una célula incubada en presencia del ligando fluorescente. Barras de escala A: 20  $\mu$ m, D: 10  $\mu$ m.

El análisis de la expresión del EGFR muestra que en las NSCs la disminución de los niveles de *Dyrk1A* conlleva una reducción en los niveles proteicos de EGFR tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no en los niveles de expresión de dicho receptor a nivel de mRNA, por lo cual la regulación de los niveles de EGFR por *Dyrk1A* debe producirse a través de un mecanismo post-transcripcional. Esta regulación podría explicar la menor activación de las NSCs de ratones *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> en respuesta a EGF y también que el efecto en auto-renovación sólo se observe en presencia de este ligando.

### 3.2 La presencia de EGFR en membrana identifica a las NSCs con mayor capacidad de auto-renovación

Dado que las células *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> tienen menores niveles de EGFR y que estas células heterocigotas tienen un defecto en su capacidad de auto-renovación, quisimos comprobar si efectivamente existía una relación directa entre la cantidad de EGFR presente en las NSCs y la capacidad de auto-renovación de las mismas.

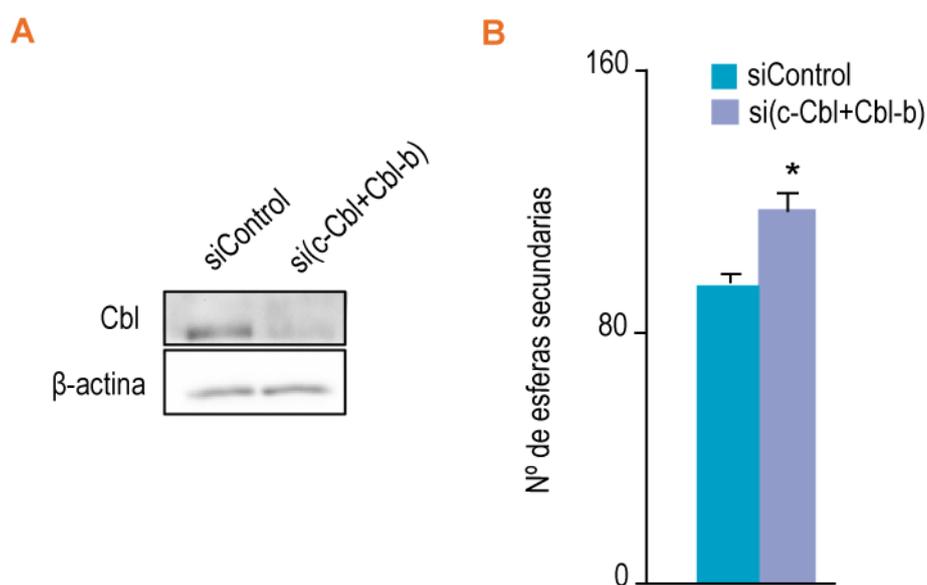
Marcamos células individuales *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> con el ligando fluorescente verde EGF-Alexa488 del EGFR y separamos mediante FACS las células que expresan niveles más elevados de receptor en membrana (EGFR+) de las células con menor expresión del mismo (EGFR-) (Figura R13A). Las células separadas de ambas poblaciones se sembraron a razón de una célula por pocillo. Una semana más tarde se contabilizaron las esferas formadas por cada población, encontrando que las células EGFR+ formaron más esferas que las células EGFR-, indicando que la señalización a través de EGFR aumenta la capacidad de auto-renovación de las NSCs *in vitro* (Figura R13B).



**Figura R13. Las células EGFR positivas son más auto-renovantes.** A) Imagen representativa de las regiones seleccionadas como positiva y negativa para la fluorescencia EGF-Alexa488. B) El histograma muestra el porcentaje de esferas formadas por células individuales EGFR+ o EGFR- (seleccionadas por separación mediante FACS tras la unión al ligando EGF-Alexa488) que son capaces de formar esferas secundarias.

Estos resultados están de acuerdo con los del grupo de la Dra. Doestch (Pastrana et al., 2009) y del Dr. Hellwig (Ciccolini et al., 2005), que indican que mayores niveles de EGFR en membrana se correlacionan con una mayor eficacia en la formación de neuroesferas de los progenitores extraídos de la SEZ adulta y posnatal.

El EGFR se internaliza en respuesta a EGF y, una vez dentro de la célula, o bien es enviado a degradación o es reciclado a la membrana celular, dependiendo entre otros factores de su estado de ubiquitinación. Estos procesos están altamente regulados con el fin de determinar la duración de la señalización a través del EGFR, y conllevan cambios en los niveles de receptor en la membrana celular. Uno de los principales moduladores de la ubiquitinación y posterior degradación de EGFR es Cbl (Thien and Langdon, 2005). De hecho, pudimos comprobar que la disminución en la expresión de dicha proteína mediante la nucleofección de un RNA de interferencia específico para Cbl (tanto para c-Cbl como Cbl-b) (Figura R14A) provocaba un aumento en la capacidad de auto-renovación de las NSCs (Figura R14B).



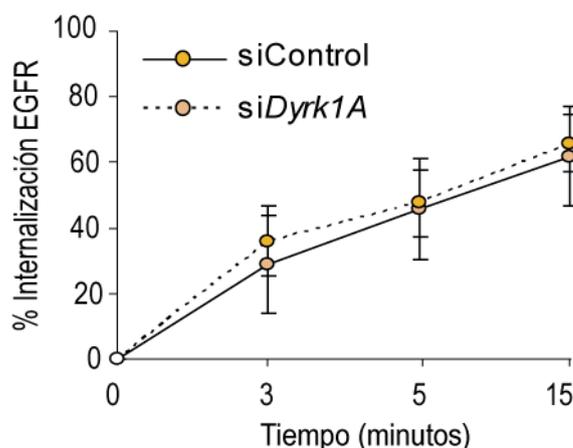
**Figura R14. Una menor degradación del EGFR aumenta la auto-renovación de las NSCs.** A) WB ilustrativo de la eficacia en la disminución de la expresión de c-Cbl y b-Cbl mediante el uso de RNA de interferencia. B) Cuantificación del número de esferas secundarias formadas por las células siControl e interferidas para Cbl.

Estos resultados sugieren que las células con mayor expresión de EGFR en membrana tienen mayor capacidad de auto-renovación y que esto está regulado, entre otros factores, por la cantidad de Dyrk1A presente en las células. Asimismo parece que la presencia de EGFR en la membrana de las NSCs depende del balance entre degradación y reciclaje de dicho receptor. Sin embargo, quedaba por resolver cuál era el mecanismo por el cual Dyrk1A regulaba a nivel post-transcripcional los niveles de EGFR y si existía una relación entre Dyrk1A y la maquinaria que regula la estabilidad de dicho receptor.

### 3.3 La inhibición de Dyrk1A favorece la degradación pero no la internalización de EGFR

Los datos experimentales encontrados en este trabajo señalan que los niveles de *Dyrk1A* se correlacionan positivamente con los niveles de EGFR, tanto a nivel de proteína total como de EGFR en membrana celular, y además esta correlación se produce únicamente a nivel post-transcripcional. Estos resultados sugieren que *Dyrk1A* está contribuyendo de alguna manera a controlar la cantidad de EGFR disponible en la célula. Por ello se decidió estudiar la regulación de la internalización y degradación del EGFR y su relación con los niveles de *Dyrk1A*.

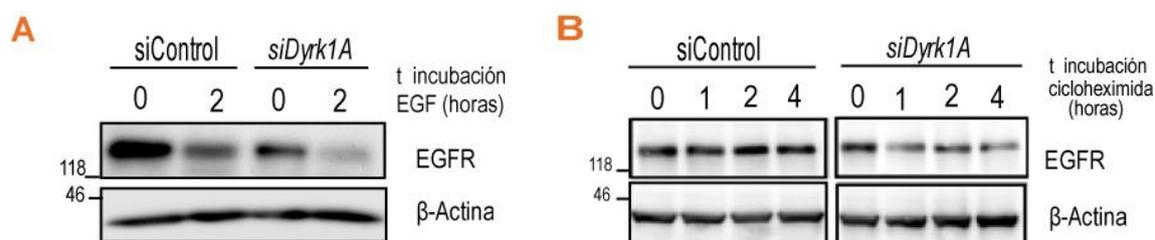
Para el estudio de la tasa de internalización de EGFR y de su posterior degradación se utilizó la línea de células madre murinas c17.2, procedentes de cerebelo de ratón adulto (Snyder et al., 1992). Dicha línea celular fue derivada de progenitores murinos cerebelares mediante la transducción de v-myc y tiene la ventaja de ser mucho más homogénea y estable que los cultivos de neuroesferas, lo que facilita determinados estudios bioquímicos. En los estudios de internalización del EGFR las células c17.2 se lipofectaron con siControl ó si*Dyrk1A* para disminuir los niveles de *Dyrk1A*. 48 horas tras la lipofección y tras una privación de suero de 12 horas las células se incubaron para su marcaje con el ligando EGFAlexa488 en frío y se mantuvieron posteriormente a 37 °C durante diferentes tiempos para permitir la internalización del receptor. Posteriormente se eliminó la fluorescencia del EGF-488 no internalizado y unido al EGFR en membrana mediante un lavado con un tampón ácido, quedando únicamente la fluorescencia del EGF-488 unido al EGFR internalizado. El análisis por citometría de flujo de la cantidad de EGFR internalizado no mostró ninguna diferencia en la tasa de internalización entre células interferidas con siControl o si*Dyrk1A* (Figura R15).



**Figura R15. Dyrk1A no interviene en la dinámica de internalización del EGFR.** Análisis de la tasa de internalización de EGFR medida por citometría de flujo utilizando el ligando fluorescente EGF-Alexa488 en células c17.2 lipofectadas con siControl o si*Dyrk1A* (n=3)

Para estudiar la degradación del EGFR, las células c17.2 se lipofectaron y 48 horas más tarde y tras una privación de suero de 12 horas se realizaron pulsos con EGF a una concentración de 20 ng/ml y se permitió la internalización y posterior degradación del EGFR a diferentes tiempos. Posteriormente las células se recolectaron y se analizó la cantidad de EGFR total por WB.

Las células c17.2 interferidas para *Dyrk1A* tienen menor cantidad de EGFR, tanto a niveles basales como tras dos horas de estimulación con EGF (Figura R16A). Para descartar la posibilidad de que la mayor cantidad de EGFR presente en las células control fuera debido a cambios en la síntesis proteica, analizamos la estabilidad del receptor en presencia del inhibidor del ribosoma cicloheximida. El resultado confirma que la menor cantidad de EGFR que se aprecia en las células c17.2 interferidas para *Dyrk1A* es debido a un aumento en la degradación del receptor y no a cambios en la síntesis *de novo* del mismo (Figura R16B).



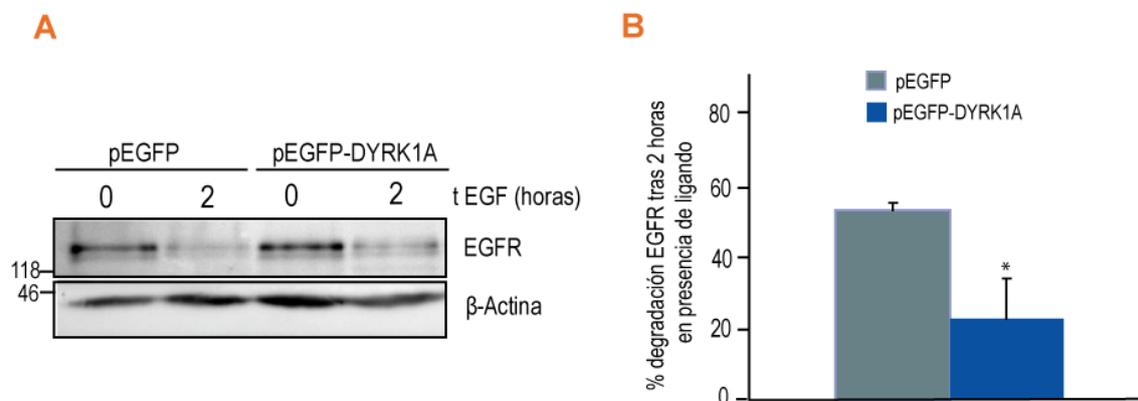
**Figura R16. *Dyrk1A* regula la duración de la vida media de EGFR.** A) Ensayo de degradación de EGFR en respuesta a EGF en células c17.2 lipofectadas con siControl o si*Dyrk1A*, las células se privaron de suero durante 12 horas y se realizaron pulsos de EGF de 20 ng/ml (n=3). B) Ensayo de degradación de EGFR en respuesta a EGF en células c17.2 lipofectadas con siControl o si*Dyrk1A*, en presencia de cicloheximida (n=3).

Los resultados obtenidos señalan que en los progenitores neurales la cantidad de *Dyrk1A* regula los niveles de EGFR de manera que en presencia de un RNA de interferencia para dicha quinasa, aumenta la tasa de degradación del receptor en respuesta a EGF, sin afectar a su tasa de internalización en presencia del ligando. Estos datos explican, por tanto, la menor cantidad de EGFR presente en la membrana de las células heterocigotas para *Dyrk1A*.

### 3.4 La sobre-expresión de *Dyrk1A* inhibe la degradación de EGFR pero no afecta a los niveles basales del receptor ni a la capacidad de auto-renovación de las NSCs

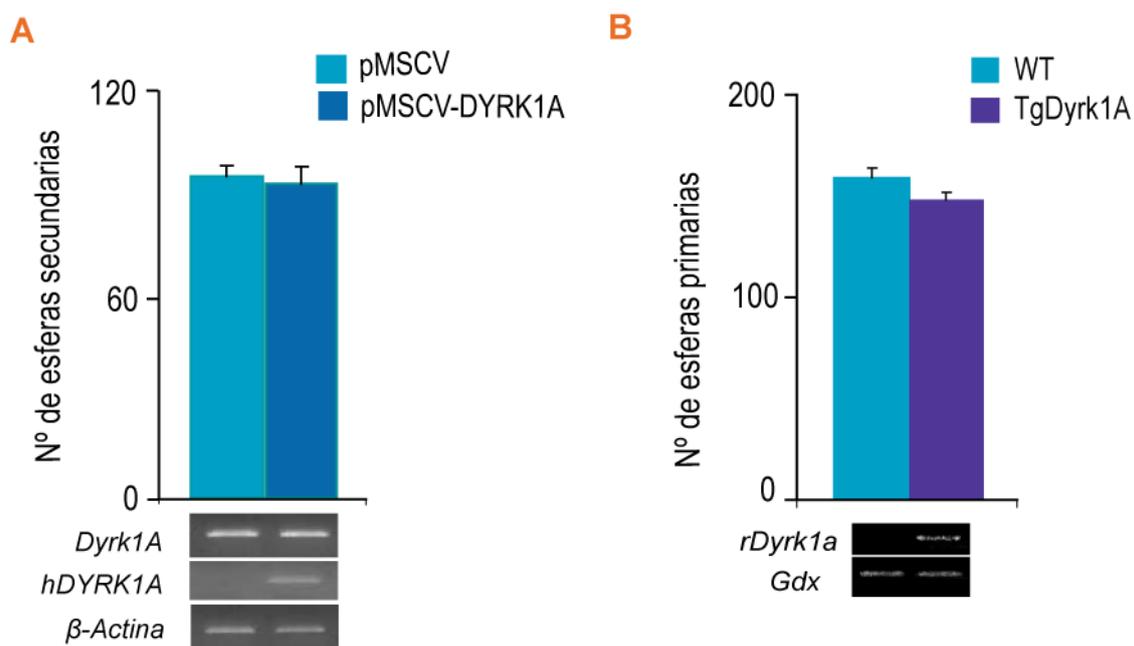
Con el fin de comprobar si la sobre-expresión de *Dyrk1A* también regulaba los niveles de EGFR, las células c17.2 se lipofectaron con las construcciones pEGFP (control) y pEGFP-*DYRK1A* (plásmido de sobre-expresión de *DYRK1A* humano). A las 48 horas tras la lipofección y tras 12 horas de privación de suero se realizaron pulsos de EGF de 20 ng/ml y se permitió la

degradación del EGFR en respuesta a EGF durante 2 horas. La sobre-expresión de *DYRK1A* produce una disminución en la cantidad de receptor degradado a las 2 horas en las células que sobre-expresan *DYRK1A*; sin embargo, no observamos un aumento en los niveles basales de EGFR (Figura R17).



**Figura R17. Dyrk1A reduce la degradación del EGFR.** A) WB ilustrativo de la disminución en la degradación de EGFR en respuesta a EGF (20ng/ml) tras doce horas de privación de suero en células c17.2 sobre-expresando *DYRK1A*. B) Cuantificación por densitometría de banda de la cantidad de EGFR de los ensayos de degradación de EGFR en células c17.2 sobre-expresando *DYRK1A*, normalizado frente a la cantidad de  $\beta$ -actina correspondiente (n=3).

Dado que la inhibición de *Dyrk1A* produce una disminución en la capacidad de auto-renovación que parece ser debida a la menor cantidad de EGFR en membrana, y que el aumento en los niveles de *Dyrk1A* no parece afectar a los niveles basales de EGFR, decidimos comprobar si la sobre-expresión de *Dyrk1A* influía en la capacidad de auto-renovación de las NSCs. Para ello se sobre-expresó la proteína *DYRK1A* mediante el uso de vectores retrovirales en cultivos de NSCs de fenotipo *Dyrk1A*<sup>+/+</sup>. A las 48 horas tras la nucleofección las células se sembraron individualmente para ensayos de auto-renovación y se comprobó la eficacia de la sobre-expresión mediante RT-PCR (Figura R18A). Como se muestra en la figura R18A, la sobre-expresión de *DYRK1A* no produce ningún efecto en la auto-renovación de las NSCs. Asimismo se comparó la capacidad de auto-renovación de los cultivos primarios de NSCs de la SEZ de animales de fenotipo salvaje con la SEZ de animales portadores de una copia del gen *Dyrk1A* de rata (TgDyrk1A) (Altafaj et al., 2001). Tras una semana en cultivo los cultivos de animales TgDyrk1A formaron una cantidad de esferas secundarias similar a los cultivos de animales control (Figura R18B).



**Figura R18. La sobre-expresión de Dyrk1A no influye en la auto-renovación de las NSCs.** A) Histograma donde se muestra la cantidad de esferas secundarias formadas por cultivos de NSCs *Dyrk1A<sup>+/+</sup>* sobre-expresando DYRK1A humano (hDYRK1A). En la parte inferior se muestra el análisis por RT-PCR con cebadores específicos, que demuestra la sobre-expresión de *DYRK1A* humano. B) Cuantificación del número de esferas primarias formadas por cultivos de NSCs de la SEZ de animales control y TgDyrk1A. La RT-PCR muestra la expresión del gen Dyrk1A de rata (*rDyrk1A*).

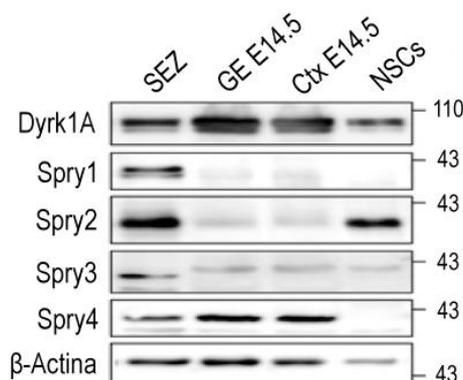
Estos resultados indican que, en condiciones basales, el aumento de los niveles de Dyrk1A por encima de la dosis génica constitutiva no tiene efecto sobre los niveles basales de EGFR ni tampoco aumenta la capacidad de auto-renovación de las NSCs. Sin embargo una mayor cantidad de Dyrk1A si disminuye la degradación del receptor inducida por EGF y podría conllevar un aumento en la duración de la señalización a través del EGFR. El papel de Dyrk1A en la terminación de la señal inducida por EGFR podría ser especialmente relevante en procesos patológicos relacionados con la sobre-expresión de dicho receptor, como es el caso de la formación de tumores, como veremos en la segunda parte de este trabajo.

### 3.5 La regulación de los niveles de EGFR por *Dyrk1A* se produce a través de la fosforilación del regulador de EGFR Spry2

La familia de proteínas Spry están implicadas en la regulación de la señalización a través de los receptores tirosina quinasa, actuando como inhibidores negativos de la activación de MAPK (Mason et al., 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que uno de los miembros de la familia Spry, Spry2, modula de manera positiva la señalización a través del

EGFR, afectando a la estabilidad del receptor. Se ha descrito que Spry2 puede unirse con c-Cbl formando un complejo dependiente de fosforilación que implica a la ubiquitina ligasa E3 para impedir la regulación negativa de EGFR por Cbl (Wong et al., 2002); (Rubin et al., 2003). Recientemente también se ha propuesto que Spry2 podría interferir en el tráfico intracelular del EGFR de endosomas tempranos a tardíos a través de un mecanismo independiente de Cbl, pero que también atenúa la degradación del EGFR en respuesta a la señalización por EGF (Kim et al., 2007). Dado que recientemente se identificó a Spry2 como un sustrato de Dyrk1A (Aranda et al., 2008), nos propusimos comprobar si la regulación de los niveles de EGFR en las NSCs por Dyrk1A podía estar mediada a través de Spry2.

En primer lugar se analizó la expresión de la familia de proteínas Spry (1-4) y Dyrk1A por WB en lisados de diferentes regiones cerebrales como son las eminencias ganglionares y la corteza de embriones en estadio 14,5 de desarrollo, y la SEZ de ratones adultos, comparándolas con extractos de NSCs en cultivo. Como se aprecia en la Figura R19, existe una importante presencia de Dyrk1A en todos los extractos, lo que refuerza su importante papel en la regulación de los progenitores neurales, embrionarios y adultos. Sin embargo, las proteínas Spry1, 2 y 3 son más abundantes en la SEZ que en las regiones embrionarias. En cualquier caso solamente se detectó expresión de un único miembro de la familia, Spry2, en las NSCs adultas en cultivo (Figura R19), por eso decidimos centrar nuestro estudio en esta isoforma.

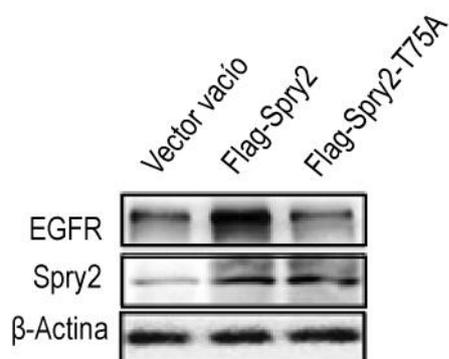


**Figura R19. Expresión de la familia de proteínas Spry.** Análisis por WB de la expresión de las proteínas Dyrk1A y la familia Spry en extractos de la SEZ, eminencias ganglionares (GE) y corteza (Ctx) de embriones de 14,5 días, y de NSCs en cultivo.

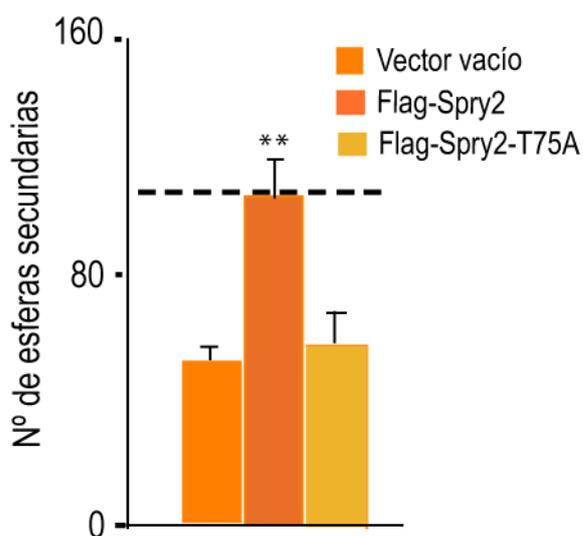
Para comprobar si Spry2 favorece la estabilidad del EGFR en las NSCs se sobre-expresaron en NSCs la forma salvaje de *Spry2* (Flag-*Spry2*) y una forma de *Spry2* mutante (Flag-*Spry2*-T75A) en la que el residuo de treonina fosforilable por Dyrk1A se ha sustituido por un residuo de alanina (Aranda et al., 2008). Las células se nucleofectaron con las construcciones: Flag-*Spry2*, Flag-*Spry2*-T75A y el vector vacío como control negativo. A las 48 horas después de la nucleofección se analizaron los niveles de proteína por WB. Los niveles de EGFR aumentaron de manera notable en las NSCs al sobre-expresar la forma salvaje de *Spry2*, pero no así la forma mutante *Spry2*-T75A (Figura R20). Estos datos indican que *Spry2*

regula de manera positiva los niveles de EGFR en las NSCs, y que dicha regulación parece depender de la fosforilación de Spry2 por Dyrk1A.

**Figura R20. Spry2 regula los niveles de EGFR.** El WB muestra los niveles de EGFR en células *Dyrk1A<sup>+/+</sup>* sobre-expresando las formas salvaje (Flag-Spry2) y mutante no fosforilable por Dyrk1A (Flag-Spry2-T75A).

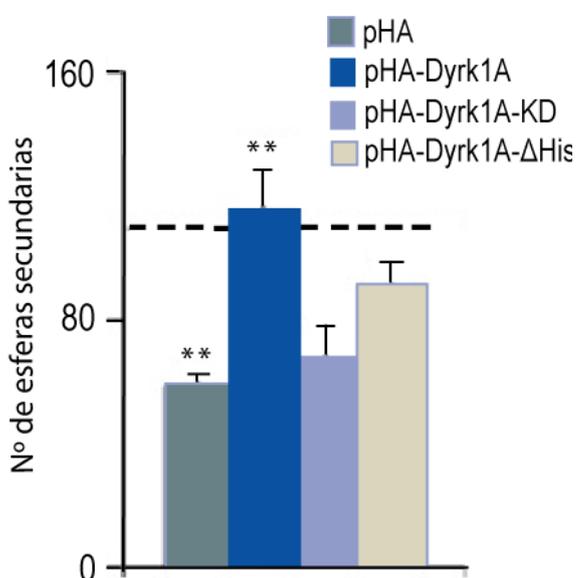


Con el fin de demostrar que Spry2 actúa por debajo de Dyrk1A en la regulación de la estabilidad del EGFR y, por lo tanto, en la regulación de la capacidad de auto-renovación de las NSCs, procedimos a realizar un experimento de rescate del fenotipo de las células heterocigotas. Para ello se sobre-expresaron mediante nucleofección de las NSCs *Dyrk1A<sup>+/-</sup>* las formas salvaje de Spry2 (Flag-Spry2) y la forma mutante no fosforilable por Dyrk1A (Flag-Spry2-T75A). A las 48 horas después de la nucleofección se disgregaron las neuroesferas y se sembraron ensayos de auto-renovación a densidad clonal. Comprobamos que la sobre-expresión de Spry2 rescataba el fenotipo de disminución de auto-renovación en los cultivos *Dyrk1A<sup>+/-</sup>*, aumentando el número de esferas secundarias formadas hasta los valores que encontramos en los cultivos *Dyrk1A<sup>+/+</sup>* (Figura R21). Este aumento en la auto-renovación en los cultivos *Dyrk1A<sup>+/-</sup>* no se apreciaba en los cultivos nucleofectados con la forma mutante Flag-Spry2-T75A. Estos datos apoyan la idea de que es necesario que se produzca la fosforilación de Spry2 por Dyrk1A para estimular la auto-renovación de las NSCs en respuesta al mitógeno EGF.



**Figura R21. La regulación de Dyrk1A sobre el EGFR se produce mediante la fosforilación de Spry2.** Cuantificación del número de esferas secundarias formadas por cultivos de animales heterocigotos para *Dyrk1A*, nucleofectados con Spry2 y la forma mutante Spry2-T75A. (n=3). La línea horizontal discontinua muestra la media de las esferas secundarias formadas por cultivos *Dyrk1A<sup>+/+</sup>* en ensayos de auto-renovación.

Con el fin de obtener una evidencia adicional sobre la importancia de la fosforilación de Spry2 en la regulación de la auto-renovación de las NSCs mediada por Dyrk1A, neuroesferas de cultivos de animales *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> se nucleofectaron con las diferentes construcciones para sobre-expresar *Dyrk1A*: pHA-*Dyrk1A* (forma salvaje de *Dyrk1A*), pHA-*Dyrk1A*-KD (forma quinasa inactiva de *Dyrk1A*) y pHA-*Dyrk1A*-ΔHis (forma mutante de *Dyrk1A* que carece del dominio de interacción con *Spry2*), (Aranda et al., 2008), más un control negativo consistente en el vector de sobre-expresión vacío. A las 48 horas después de la nucleofección se disgregaron y se sembraron las células individuales a densidad clonal para ensayos de auto-renovación. Únicamente la sobre-expresión de la forma salvaje de *Dyrk1A* restauró los niveles de formación de esferas secundarias hasta los niveles normales encontrados en los cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup>. Ni la forma quinasa inactiva de *Dyrk1A*, ni la forma incapaz de interactuar con *Spry2* consiguieron revertir el defecto en auto-renovación de las células *Dyrk1A*<sup>+/-</sup> (Figura R22).



**Figura R22. La actividad quinasa de Dyrk1A y su interacción con Spry2 son necesarias para la correcta auto-renovación de las NSCs.** Cuantificación del número de esferas secundarias formadas por cultivos de NSCs *Dyrk1A*<sup>+/-</sup>, nucleofectadas con las construcciones: pHA*Dyrk1A* (*Dyrk1A* salvaje), pHA*Dyrk1A*-KD (*Dyrk1A* quinasa inactivo) y pHA*Dyrk1A*-ΔHis (no interacciona con Sprouty2). La línea horizontal discontinua muestra la media de las esferas secundarias formadas por cultivos *Dyrk1A*<sup>+/+</sup> en ensayos de auto-renovación.

Los resultados obtenidos indican que la regulación de la auto-renovación de las NSCs por parte de *Dyrk1A* se produce en parte mediante la interacción y posterior fosforilación de la proteína *Spry2*, posiblemente porque *Dyrk1A* afecta de manera positiva a la actividad de estabilización del EGFR de dicha proteína. Es interesante destacar que, sin embargo, *Dyrk1A* afecta de manera negativa a la función de *Spry2* en la regulación de activación de la cascada de MAPK inducida por FGF (Aranda et al., 2008), por lo que se puede proponer un modelo según el cual *Dyrk1A* fosforila a *Spry2* y modifica su actividad de manera positiva o negativa, en función de la vía de señalización y/o del tipo celular.

### 3.6 Modelo propuesto para la regulación de la auto-renovación de las NSCs por Dyrk1A mediada por la degradación del EGFR

El gen *DYRK1A* está asociado en humanos con los defectos neurológicos presentes en pacientes con SD (Park et al., 2009). Así mismo, la expresión ectópica de *Dyrk1A* en progenitores neurales del córtex fetal en desarrollo induce la diferenciación prematura de los mismos (Yabut et al., 2010). Sin embargo, los resultados de este trabajo indican que un incremento moderado de los niveles de *Dyrk1A* no tiene un efecto en el comportamiento de las NSCs adultas. En cambio la disminución de los niveles de *Dyrk1A* causa un defecto en la capacidad de auto-renovación de las NSCs de la SEZ en respuesta al mitógeno EGF. Los efectos dosis-dependientes de *Dyrk1A*, tanto en los trabajos experimentales como en la patología humana, inciden en la importancia que tiene el mantenimiento de una dosis correcta de *Dyrk1A* para preservar una neurogénesis normal, tanto durante el desarrollo como en el individuo adulto, aunque la función de esta quinasa puede ser diferente en ambos estadios.

La regulación de la degradación del EGFR por *Dyrk1A* y el efecto sobre la auto-renovación de las NSCs que dicha regulación conlleva ponen de manifiesto la importancia del tráfico intracelular y el recambio de los receptores implicados en señalización. Es interesante señalar que un mecanismo similar se ha propuesto, por ejemplo, para otro conocido modulador de las NSCs como es Notch, cuya endocitosis y posterior degradación es regulada por la proteína Numb (Berdnik et al., 2002; McGill and McGlade, 2003). Otro punto en común entre ambas vías es el hecho de que tanto Numb como *Dyrk1A* controlen el tipo de división de las NSCs y el destino celular de su progenie celular (Ferron et al., 2010; Fürthauer and González-Gaitán, 2009).

Los resultados de este trabajo indican que la actuación de *Dyrk1A* sobre *Spry2* se da a través de la fosforilación de la Thr75, contribuyendo a la acumulación de EGFR en las neuroesferas en respuesta a EGF. Esta misma fosforilación de *Spry2* por *Dyrk1A* reduce la acción inhibitoria de *Spry2* en la activación de proteínas quinasa en respuesta al mitógeno FGF (Aranda et al., 2008). Por tanto, dependiendo del contexto, *Dyrk1A* estaría actuando como un modulador positivo de la señalización a través de ambos mitógenos, en el caso del FGF antagonizando la acción inhibitoria de *Spry2*, y para el EGF atenuando la degradación del EGFR, posiblemente a través de la unión de *Spry2* a la proteína Cbl. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en el caso de las NSCs la elevada presencia de *Dyrk1A* favorece la acción positiva de *Spry2* sobre EGFR, estimulando la capacidad de auto-renovación en respuesta a EGF, sin que parezca afectar a la respuesta de dichas células a FGF.

Como resumen de esta primera parte del trabajo se puede sugerir un mecanismo (Figura R23) mediante el cual *Dyrk1a* regula los niveles de EGFR en membrana y por tanto, controla la capacidad de auto-renovación de las NSCs. En respuesta al ligando EGF, el EGFR

se fosforila y es internalizado mediante vesículas recubiertas de clatrina o caveolas. El EGFR que se ha unido a Cbl y se ha marcado con ubiquitina pasa de los endosomas a los lisosomas tardíos para su degradación y el EGFR libre de ubiquitina se recicla a la membrana plasmática. La fosforilación de Spry2 por Dyrk1A favorecería la formación de un complejo entre Spry2 y Cbl. Esta interacción con Spry2 disminuiría la cantidad de Cbl capaz de unirse al EGFR, y con ello la cantidad de EGFR ubiquitinado por Cbl. En estas condiciones, en presencia de altos niveles de Dyrk1A y en respuesta al ligando EGF, se favorecería el reciclado del EGFR a la membrana celular frente a su degradación, y se mantendría la señalización a través de dicho receptor. Finalmente, este aumento en la cantidad de EGFR se correlacionaría de manera positiva con una mayor capacidad de auto-renovación de las NSCs. En cualquier caso no podemos descartar que existan mecanismos adicionales a través de los cuáles Dyrk1A pueda estar controlando la estabilidad del receptor, ni que toda la acción positiva de Dyrk1A en las NSCs se deba exclusivamente a la regulación de EGFR. Esperamos que experimentos futuros puedan resolver estas cuestiones.

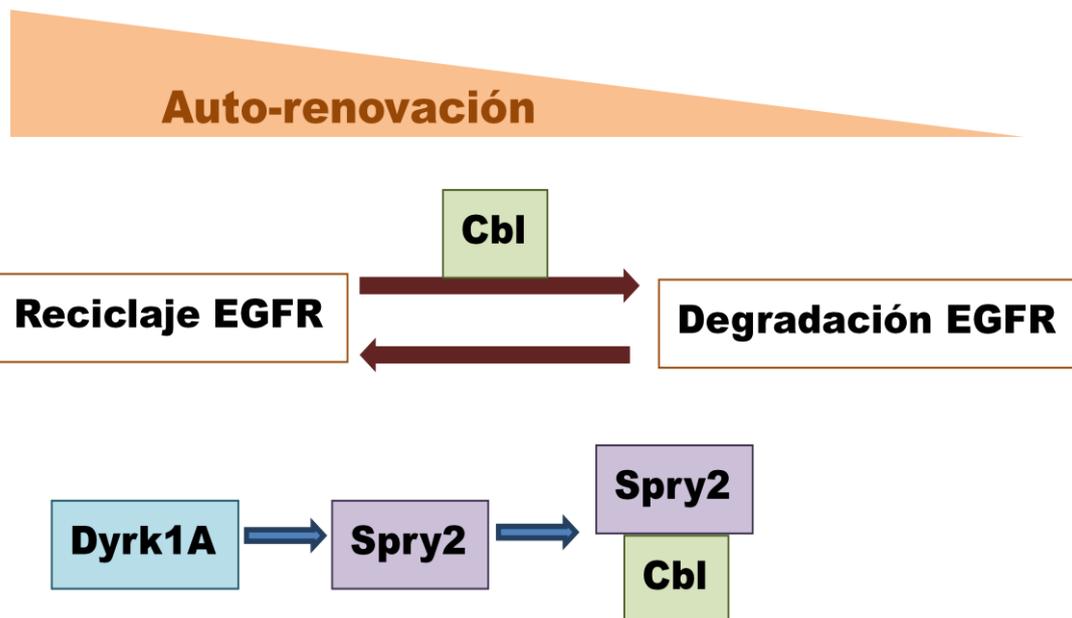


Figura R23. Modelo propuesto para la regulación de la auto-renovación de las NSCs por Dyrk1A a través del EGFR.

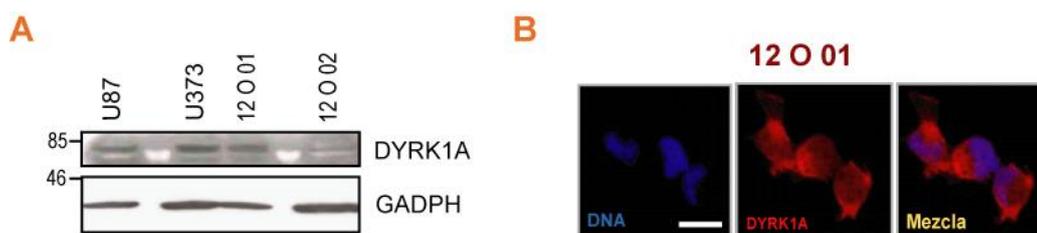
#### **4 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMOR DE GBM POR *DYRK1A***

Como se ha mencionado en la introducción, los GBMs fueron los primeros tumores sólidos en los que se identificó la presencia de una jerarquía celular, con un pequeño porcentaje de células indiferenciadas y con alta capacidad de auto-renovación como responsables del inicio y el crecimiento tumoral (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004a; Yuan et al., 2004). A estas células se las ha denominado células madre del cáncer, por su semejanza con las células madre de los tejidos, o también células iniciadoras de tumor (TICs). En el caso de los GBMs existen evidencias de que estas TICs son especialmente resistentes a los tratamientos convencionales de radio- y/o quimioterapia y podrían ser responsables de las recidivas tumorales (Bao et al., 2006; Beier et al., 2011). Dada su similitud con las NSCs, un punto de partida en el estudio de las TICs de GBMs es comprobar si los mecanismos que subyacen en la regulación de las NSCs se mantienen de alguna forma en estas células iniciadoras de tumor. El estudio de las moléculas que puedan estar implicadas en el mantenimiento y la regulación de la biología de las TICs de GBMs puede contribuir al desarrollo de nuevas dianas para controlar la proliferación y la perpetuación en el tiempo de las células tumorales y, finalmente, al desarrollo de nuevas terapias de tratamiento para estos tumores.

Dado que *Dyrk1A* promueve la auto-renovación de las NSCs el siguiente objetivo de este trabajo fue comprobar si esta regulación se produce también en las TICs de GBMs.

##### **4.1 Los cultivos de TICs de GBMs expresan *DYRK1A* de manera variable**

En primer lugar realizamos un estudio de la expresión de *DYRK1A* en diferentes líneas celulares. Para ello, se analizaron por WB los niveles de *DYRK1A* presente en extractos proteicos de cultivos de TICs de GBMs, tanto de líneas primarias (obtenidas por disociación de muestras de pacientes), como de líneas establecidas (Figura R24A). Los resultados muestran que los niveles de expresión de *DYRK1A* varían entre los cultivos analizados. Las líneas establecidas U87 y U373 presentan una elevada expresión de *DYRK1A*, así como la línea primaria 12 O 01. Sin embargo apenas hay detección de *DYRK1A* en la línea primaria 12O-02.



**Figura R24. Las TICs de GBMs expresan DYRK1A de manera variable.** A) Análisis por WB de los niveles de DYRK1A en dos líneas establecidas de TICs de GBMs, U87 y U373, y en las líneas primarias 12O-01 y 12O-02. B) Imagen de IF confocal de un cultivo primario de TICs de GBMs, donde se aprecia la expresión mayoritariamente citoplásmica de DYRK1A (rojo). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

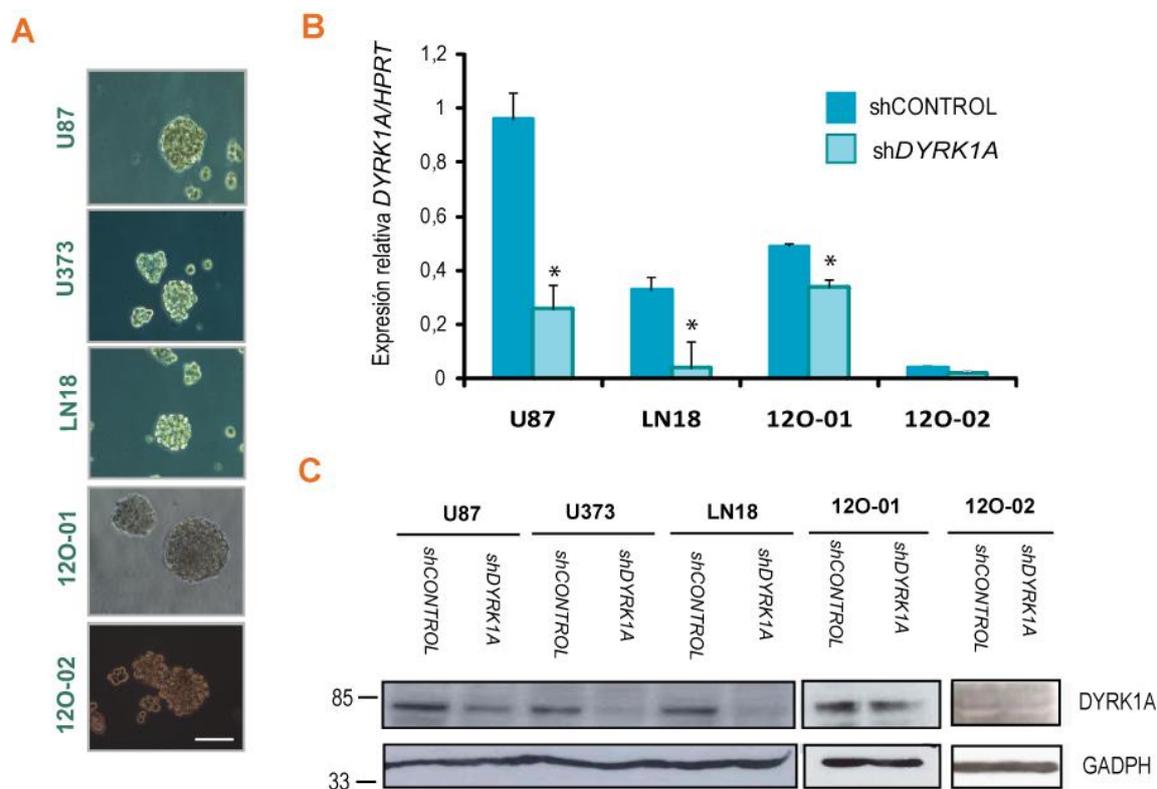
Respecto a la distribución intracelular de DYRK1A, en la mayoría de los cultivos analizados encontramos que, al igual que en las NSCs, DYRK1A tiene una clara expresión citoplasmática, aunque en el núcleo de algunas células de TICs de GBMs se puede observar una ligera expresión (Figura R24B).

#### 4.2 DYRK1A regula la auto-renovación de las TICs de GBMs

Las células de GBMs se pueden crecer en ausencia de suero, sin sustrato adhesivo y en presencia de los mitógenos EGF y FGF, condiciones en las que forman unos agregados similares a las neuroesferas formadas por las NSCs (Figura R25A). Existen diferentes estudios que han demostrado que en estas condiciones de cultivo se mantienen las características genotípicas y fenotípicas del tumor original (Lee et al., 2006), y además se produce un enriquecimiento en TICs (Romaguera et al., 2011). Si asumimos que, al igual que en las NSCs, a una baja densidad celular cada esfera formada proviene de una única célula inicial, podemos utilizar los ensayos de formación de esferas como un reflejo de la capacidad de supervivencia y auto-perpetuación de estas TICs de GBMs.

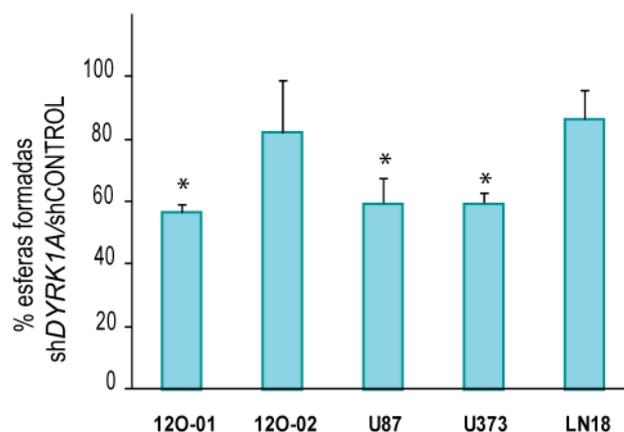
Una vez comprobado que la mayoría de las líneas analizadas expresan DYRK1A se inició el estudio de la posible regulación por *DYRK1A* de las TICs de GBMs. Para disminuir la cantidad de *DYRK1A* en los cultivos recurrimos al uso del RNAi. Para ello se infectaron las líneas celulares U87, U373 y LN18, además de las líneas primarias 12O-01 y 12O-02, con un lentivirus portador de una construcción shRNA aleatoria (sh*CONTROL*), o con una construcción que expresa la secuencia silenciadora para el gen *DYRK1A* (sh*DYRK1A*). Cuatro días después de la infección las células se disgregaron y se sembraron en presencia del antibiótico puromicina, para la selección de las células que habían integrado el lentivirus. Mediante RT-PCR y WB se comprobó la disminución en la de expresión de *DYRK1A* en las diferentes líneas testadas (Figura R25 B y C). Como se aprecia en las imágenes, la interferencia de DYRK1A

fue mucho más efectiva en las líneas establecidas que en los cultivos primarios aunque en todos los cultivos que expresaban *DYRK1A* fue estadísticamente significativa.



**Figura R25. Análisis de expresión tras la interferencia de *DYRK1A*.** A) Imagen de campo claro de cultivos de TICs de GBMs crecidos en medio completo con mitógenos EGF y FGF y en ausencia de suero formando agregados similares a las neuroesferas. B) Cuantificación de la bajada de expresión de *DYRK1A* en los cultivos interferidos medida por PCR cuantitativa. C) WB comparativo de los niveles de *DYRK1A* y GADPH en cultivos interferidos con sh*DYRK1A* y shCONTROL. Barra de escala 40  $\mu$ m.

Posteriormente se realizó un ensayo de formación de esferas a densidad clonal (2.5 céls/ $\mu$ l) a partir de células individuales. La figura R26 muestra que la mayoría de las líneas analizadas presenta una reducción de su capacidad de auto-renovación al disminuir la cantidad de la proteína *DYRK1A*. El hecho de que la línea 12O-02, que apenas expresa esta quinasa, no sea sensible al RNA de interferencia, sugiere que el defecto en auto-renovación observado en las otras líneas es específico y se debe a la disminución de los niveles de la quinasa. Tampoco se observó un efecto significativo en la línea LN18, a pesar de expresar *DYRK1A* a niveles comparables con los de las otras líneas sensibles (Figura R25C). Sin embargo, datos posteriores nos permitieron sugerir una explicación a la falta de efecto de la disminución de *DYRK1A* en la auto-renovación de la línea LN18.



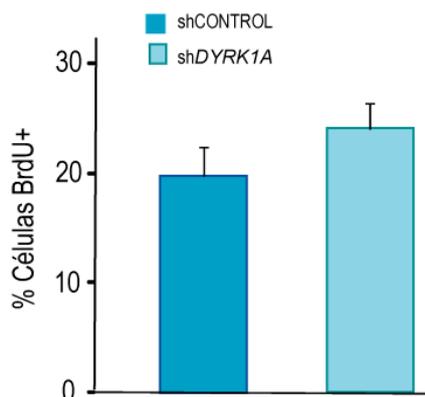
**Figura R26. *DYRK1A* regula la auto-renovación de las TICs.**

Cuantificación de la formación de esferas secundarias en cultivos U87, U373, LN18, 12O-01 y 12O-02 infectados con un lentivirus shCONTROL y shDYRK1A, expresado como la relación de esferas formadas por los cultivos interferidos para shDYRK1A frente a los shCONTROL en cada una de las líneas celulares (n=3).

Los resultados obtenidos indican que DYRK1A podría actuar en la regulación de la auto-renovación de las TICs de GBMs, y en la expansión de las mismas, al menos en un porcentaje de tumores.

#### 4.3 La disminución de los niveles de *DYRK1A* no afecta a la proliferación de las TICs de GBMs

Los datos previos en NSCs demuestran que *Dyrk1A* regula la capacidad de auto-renovación de las mismas sin afectar de manera significativa a sus niveles de proliferación. Quisimos comprobar si *DYRK1A* tenía algún efecto sobre la proliferación de las TICs de GBMs que explicara la menor formación de esferas. Para ello se midió la tasa de incorporación de BrdU en la línea U87, una de las más sensibles al shDYRK1A. Como se observa en la Figura R27 no se encontraron diferencias en la tasa de proliferación de las células U87 shDYRK1A frente a las shCONTROL. Este resultado concuerda con el hecho de que los cultivos de NSCs heterocigotas no tengan afectada su capacidad de proliferación y sugiere que el fenotipo de disminución del número de esferas se debe a una disminución del potencial de auto-renovación de las TICs de GBMs.

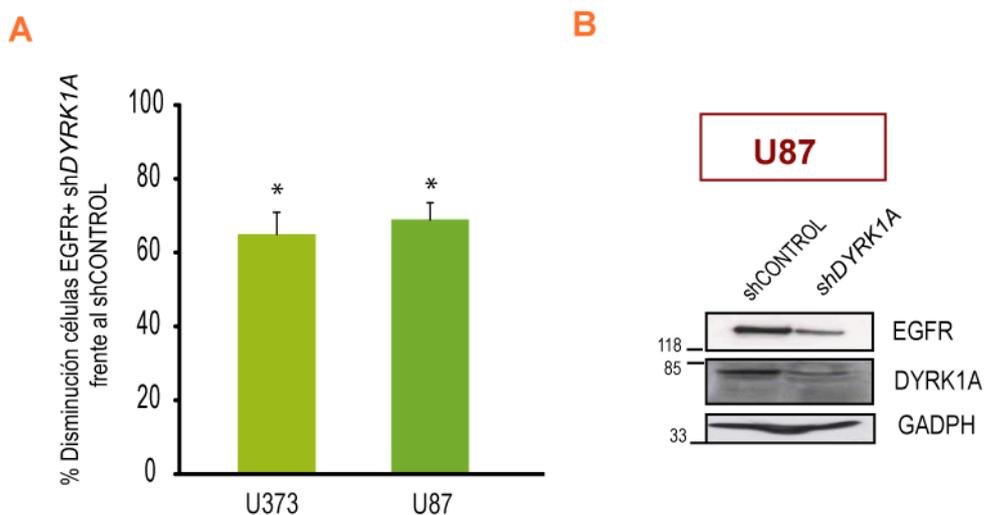


**Figura R27. Análisis de la proliferación de TICs de GBMs tras la interferencia de *DYRK1A*.** Cuantificación de la incorporación de BrdU en cultivos U87 shCONTROL y U87 sh*DYRK1A* (n=3).

#### 4.4 La interferencia de *DYRK1A* provoca una clara disminución de la cantidad de EGFR en las TICs

Aproximadamente en el 40-50 % de los casos de GBMs el EGFR se encuentra amplificado, mutado y/o sobre-expresado. Esto le convierte en una de las principales dianas moleculares para el tratamiento de estos tumores tan agresivos. Además, recientemente se ha demostrado que el EGFR controla la expansión de las TICs de GBMs y el mantenimiento de las propiedades de indiferenciación de las células madre tumorales (Jin et al., 2011). Dado que *Dyrk1A* modula la degradación de dicho receptor en las NSCs, nos propusimos estudiar si esta relación se mantenía en las TICs de GBMs.

Para estudiar si los niveles de *DYRK1A* y los de EGFR correlacionan en las TICs de GBMs, comparamos los niveles de receptor en membrana mediante el marcaje con el ligando fluorescente verde EGF-Alexa488 en células que habían sido infectadas con los lentivirus shCONTROL y sh*DYRK1A*. Cuatro días después de la infección se disgregaron las esferas y las células individuales se marcaron con el ligando EGF-Alexa-488 para su posterior análisis mediante citometría de flujo. La reducción de los niveles de *DYRK1A* provoca una reducción de los niveles de EGFR presentes en la membrana celular de las líneas U373 y U87 mayor del 60 % (Figura R28A). El análisis por WB de extractos de cultivos celulares de U87 también demuestra que la cantidad de proteína de EGFR está claramente disminuida en las células interferidas para *DYRK1A* (Figura R28B).



**Figura R28. Los niveles de EGFR correlacionan con los de DYRK1A.** A) El histograma muestra el porcentaje de disminución de células EGF-Alexa488 positivas en los cultivos de las líneas U87 y U373 interferidos para *DYRK1A* frente a los cultivos CONTROL. B) Análisis por WB de los niveles de EGFR totales en células U87 shCONTROL y shDYRK1A.

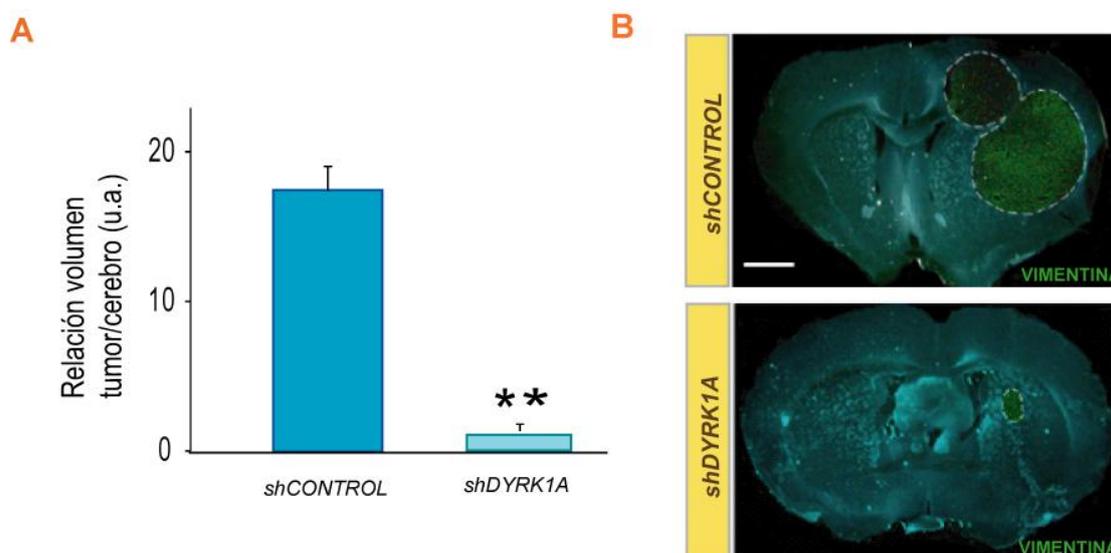
En resumen los resultados muestran que tanto los niveles totales como los niveles de membrana de EGFR se reducen al disminuir DYRK1A en las TICs de GBMs, lo que sugiere que existe una regulación similar a la que encontramos en las NSC, que podría explicar la inhibición de la capacidad de auto-renovación en las TICs en las que se ha interferido la expresión de dicha quinasa.

Es interesante destacar que cuando se analizaron las células LN18 se comprobó que esta línea apenas expresa EGFR en membrana ( $3,4 \pm 0,2$  % de células positivas para EGFR). Esto podría explicar porqué, a pesar de conseguir una disminución clara en la expresión de *DYRK1A*, no se observó ningún fenotipo en la capacidad de auto-renovación (Figura R26) y nos permite sugerir que DYRK1A regula las TICs de aquellos GBMs que expresan altos niveles de EGFR.

#### 4.5 La disminución de *DYRK1A* reduce la capacidad tumorigénica de las TICs de GBMs

Una vez comprobado que la disminución de los niveles de DYRK1A conllevaba una disminución en los niveles de EGFR, y que las TICs de GBMs con *DYRK1A* interferido tenían una menor capacidad de auto-renovarse, decidimos comprobar si estos efectos se correspondían con una menor capacidad de dichas células para iniciar y expandir un tumor.

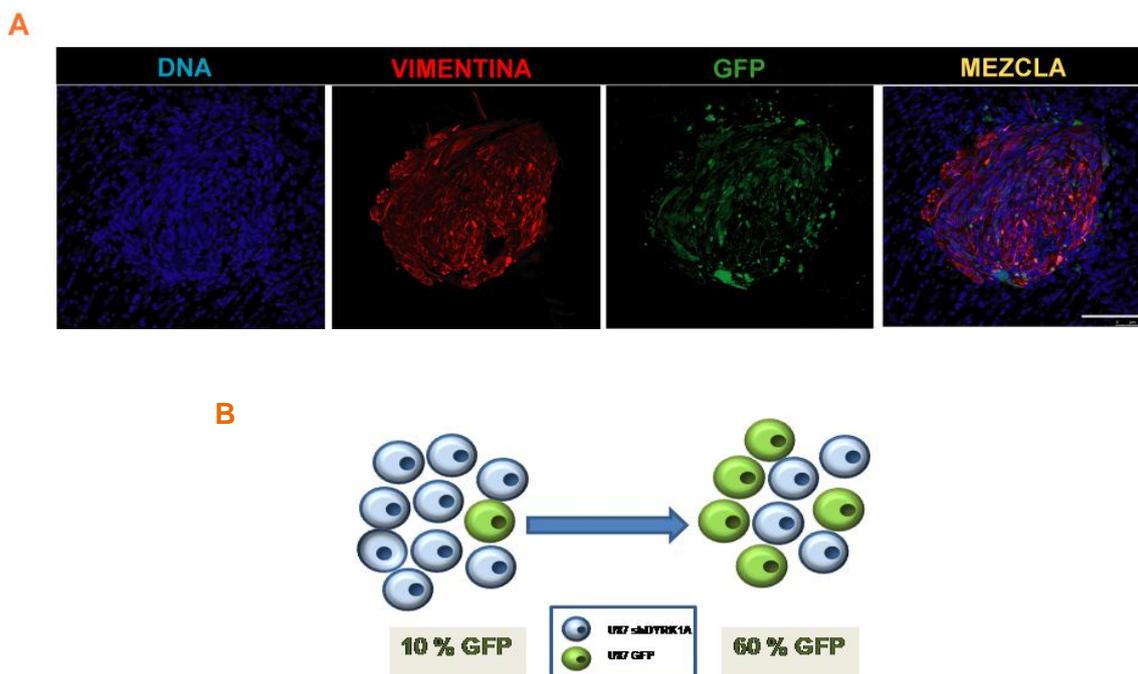
Un primer ensayo consistió en realizar trasplantes ortotópicos en el estriado del cerebro de ratones atímicos inmunodeprimidos *Nude-fox-n*, de células U87 shCONTROL y shDYRK1A, seleccionadas previamente con puromicina. Las esferas se disgregaron y se trasplantaron 10.000 células individuales por animal. Los animales se sacrificaron seis semanas después del trasplante. Los tumores se detectaron utilizando un anticuerpo específico para la proteína VIMENTINA humana. Los tumores formados por las células U87 shDYRK1A presentan una reducción del 80 % de volumen frente a los tumores procedentes de células U87 shCONTROL (Figura R29 A y B), lo cual indica que la interferencia de *DYRK1A* disminuye notablemente la capacidad tumorigénica de las TICs de GBMs.



**Figura R29. La disminución de *DYRK1A* reduce la capacidad tumorigénica de las TICs de GBMs *in vivo*.** A) Cuantificación del cociente entre el volumen del tumor y el volumen del cerebro en cortes de vibratomo de animales inyectados con células U87 shCONTROL (n=4) y shDYRK1A (n=5). B) Imágenes de lupa de fluorescencia superpuestas con imágenes de campo claro de tumores de células U87 shCONTROL y shDYRK1A. La tinción inmunofluorescente verde corresponde a VIMENTINA humana. Los tumores están enmarcados por una línea discontinua blanca. Barra de escala: 800 µm.

Una segunda aproximación consistió en realizar un ensayo de competencia celular en la formación de tumores. Para realizar este experimento se trasplantó una mezcla celular consistente en: 1.000 células U87 shCONTROL-gfp (10%) y 9.000 células U87 shDYRK1A (90%). Las células previamente disgregadas se trasplantaron en el estriado de ratones inmunodeprimidos *Nude-fox-n* y los animales se sacrificaron 6 semanas después de la operación. Los tumores se detectaron con el anticuerpo anti-VIMENTINA humana y se localizaron también las células u87shCONTROL-gfp con una IF anti-gfp. Como se ilustra en la figura R30, el 60% de las células vimentina positivas son también positivas para gfp, indicando que el tumor está constituido en un 60% por células U87 shCONTROL-gfp. Dado que la

proporción inicial de dichas células era del 10 % los resultados indican que las células U87shDYRK1A son menos eficientes en la formación del tumor.



**Figura R30. Las células con menores niveles de DYRK1A tienen menor capacidad tumorigénica.**

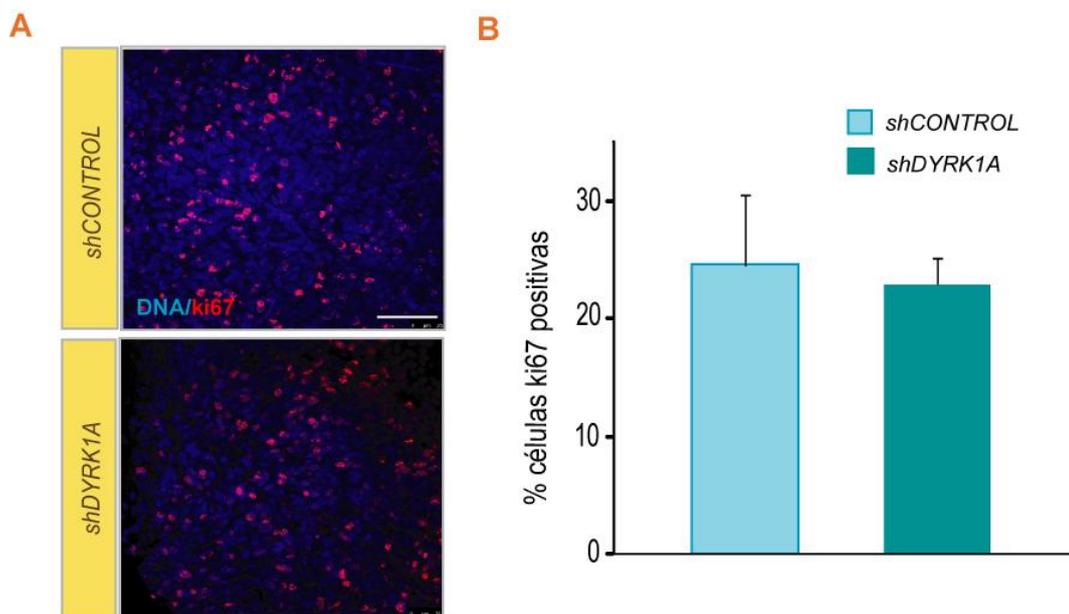
A) Imágenes representativas de la IF para vimentina humana (rojo) y gfp (verde), en un estudio de competencia en formación de tumores tras la inyección de una mezcla de 10 % de células U87 shCONTROL-gfp y 90 % shDYRK1A. B) Esquema ilustrativo del resultado experimental. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Tanto los resultados de auto-renovación *in vitro* como los estudios de formación de tumores *in vivo* sugieren que la disminución en los niveles de DYRK1A se traduce en una reducción en la capacidad de expandirse y de formar tumores de las TICs presentes en los cultivos de un porcentaje de GBMs.

#### 4.6 La reducción en el volumen del tumor no es debido a una disminución en la proliferación *in vivo* de las células U87 shDYRK1A

Para descartar que la reducción en el volumen de los tumores procedentes de células U87shDYRK1A frente a las U87 shCONTROL pudiera ser debido a defectos en su capacidad de proliferación, cuantificamos la cantidad de células en ciclo en zonas de similar densidad tumoral en ambos tipos de tumores mediante IF para el marcador de ciclo celular ki67 (Figura

R31A). No encontramos diferencias significativas en la proliferación celular entre los tumores formados por ambos tipos celulares (Figura R31B).



**Figura R31. La reducción de los niveles de *DYRK1A* no altera la proliferación de las células U87 *in vivo*.** A) Imágenes de fluorescencia para el marcador de ciclo ki67 (rojo), en tumores formados por células U87 shCONTROL y shDYRK1A. B) Cuantificación del porcentaje de células ki67 positivas (n=3 animales por condición). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

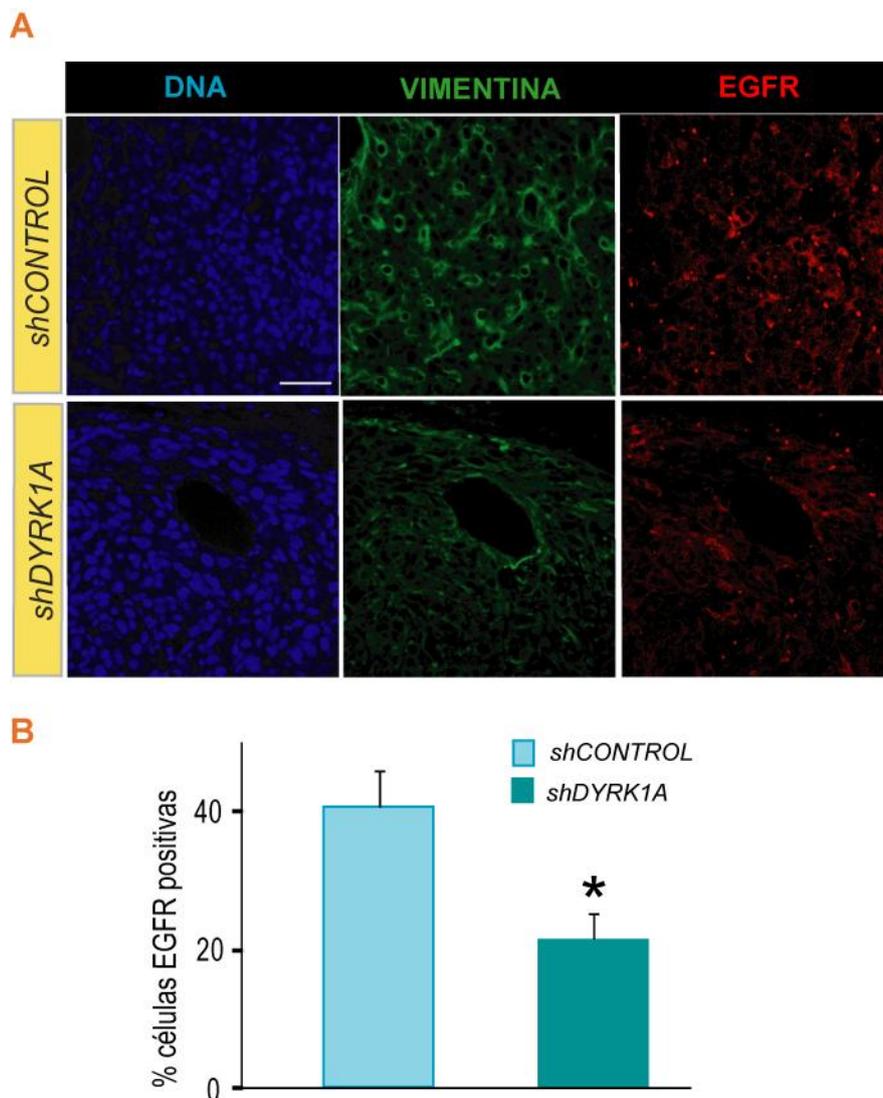
El análisis de los tumores corrobora los datos de incorporación de BrdU *in vitro*, y sugiere que los niveles de *DYRK1A* no afectan a la proliferación de las células formadoras del tumor. Asimismo comprobamos que no existían células apoptóticas (que expresaran la forma activa de la caspasa 3) ni en los tumores U87shCONTROL ni en los U87shDYRK1A, por lo que esta quinasa debe regular directamente la capacidad de iniciar el tumor de las TICs de GBMs.

#### 4.7 Los tumores procedentes de células interferidas para *DYRK1A* tienen menor número de células EGFR positivas

Dado que habíamos demostrado que la interferencia de *DYRK1A* provocaba una disminución en los niveles de EGFR de las TICs de GBMs *in vitro*, nos propusimos determinar si también afectaba a la expresión de EGFR *in vivo*.

Se tiñeron los tumores procedentes de células U87 shCONTROL y shDYRK1A con un anticuerpo que reconoce la proteína EGFR. Como se aprecia en la figura R32A, la distribución del receptor en el tumor es muy heterogénea, observándose células con cantidades elevadas de EGFR. La cuantificación de esas células con mayor nivel de receptor demostró que,

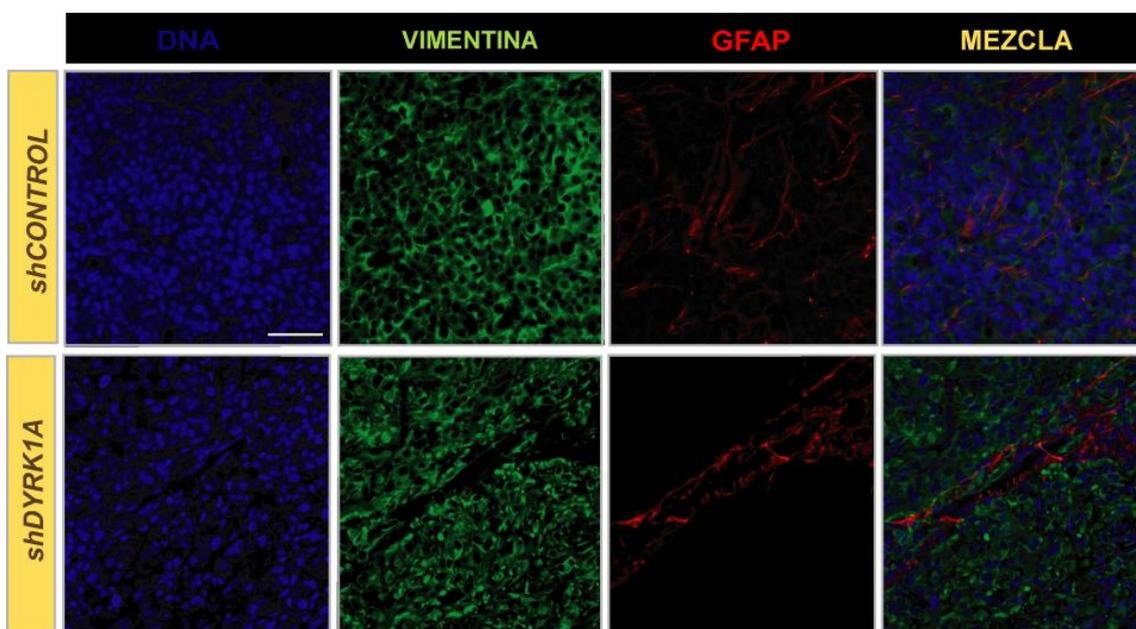
efectivamente, en los tumores formados por células U87 shCONTROL existe una mayor cantidad de células EGFR positivas dentro del tumor que en los formados por células con *DYRK1A* interferido (Figura R32B).



**Figura R32. La disminución de los niveles de *DYRK1A* reduce el porcentaje de células con niveles elevados de EGFR *in vivo*.** A) Imágenes representativas de la IF para EGFR (rojo) y VIMENTINA humana (verde) en tumores procedentes de células U87 shCONTROL y shDYRK1A. B) Cuantificación del porcentaje de células con niveles elevados de EGFR. (n=3 animales por condición). Barra de escala: 40  $\mu$ m.

Estos resultados, junto con el análisis *in vitro*, sugieren que la acción anti-tumoral de la interferencia de *DYRK1A* está mediada por la inhibición de los niveles de EGFR. Recientemente el grupo de la Dra. Galli ha demostrado que las células que expresan niveles más altos de EGFR en la membrana tienen una mayor capacidad tumorigénica e invasiva

(Mazzoleni et al., 2010). Nuestros datos refuerzan este modelo y sugieren que la inhibición de EGFR y/o DYRK1A pueden ser muy efectivos en aquellos GBMs que expresan altos niveles de receptor. En este trabajo no hemos podido analizar la capacidad invasiva ya que las células U87 forman tumores compactos en el cerebro de los ratones inmunodeprimidos (Jacobs et al., 2011). Sin embargo, como se muestra en la Figura R33, sí que observamos diferencias en el borde tumoral, ya que los tumores de células U87 shDYRK1A presentan bordes más definidos, con una clara disminución de las células GFAP positivas (y negativas para Vimentina humana). Esta observación es interesante ya que la presencia de astrocitos reactivos se ha asociado con la progresión tumoral de los GBMs (Charles et al., 2012) y porque sugiere que la inhibición de DYRK1A puede tener un efecto autocrino, mediado por la inhibición de EGFR, y paracrino, modulando otras células del nicho tumoral importantes para el crecimiento de los GBMs.



**Figura R33. Los tumores de células U87 shDYRK1A presentan bordes más definidos y con menos células GFAP positivas.** Imágenes representativas de fluorescencia para VIMENTINA humana (verde) y GFAP (rojo) en tumores procedentes de células U87 shCONTROL y shDYRK1A. Barra de escala.-50  $\mu$ m.

Las alteraciones más comunes en GBMs son las mutaciones y/o sobre-expresiones del EGFR, asociadas con procesos de inicio y progresión tumoral. En muchos casos estas mutaciones incluyen las deleciones de dominios extra o intracelulares de la proteína, o la aparición de formas constitutivamente activas del EGFR (Huang et al., 1997; Mazzoleni et al., 2010; Nagane et al., 1996; Narita et al., 2002; Nishikawa et al., 1994). Todo ello indica que la inhibición de la vía de señalización de EGFR puede ofrecer grandes beneficios terapéuticos en

el caso de los GBMs. Sin embargo, los resultados clínicos del uso de inhibidores de la actividad tirosina quinasa de EGFR no han sido demasiado esperanzadores en este tipo de tumores (Raizer et al., 2004; van den Bent and Kros, 2007). Por ese motivo es importante la búsqueda de dianas terapéuticas que puedan contribuir a la normalización de la señalización a través del EGFR en GBMs. Los resultados de este trabajo indican que DYRK1A está expresado en la mayoría de cultivos derivados GBMs analizados y que, al igual que en las NSCs, dicha quinasa regula la auto-renovación de las TICs. Así mismo, los resultados expuestos indican que los niveles de esta quinasa están relacionados de manera positiva con los de EGFR en dichas células. De hecho, la interferencia de DYRK1A provoca una fuerte inhibición de la capacidad tumorigénica de las TICs, así como una disminución de la cantidad de células con niveles elevados de EGFR presentes en dichos tumores. Por ello cabe esperar que la función de DYRK1A sea especialmente relevante en aquellos GBMs que dependan de EGFR y por lo tanto podría ser una excelente diana terapéutica en este subgrupo de gliomas.

No obstante, en este trabajo no hemos llegado a determinar si, tal como ocurre en las NSCs, DYRK1A regula la degradación del EGFR de manera dependiente de la fosforilación de SPRY2. En este sentido se ha demostrado recientemente que existe una fuerte correlación entre la expresión de los genes de la familia Spry y la amplificación de EGFR, lo que sugiere que dichas proteínas participan de manera positiva en la señalización activada por este receptor (Ivliev et al., 2010), de manera similar a lo que ocurre en NSCs. Por lo tanto, se puede proponer un modelo según el cual la sobre-expresión de DYRK1A en los GBMs, mediante la regulación de las proteínas Sprouty, permitiría estabilizar EGFR en la membrana de las células tumorales, lo cual promovería un aumento en la capacidad de auto-renovación y por tanto en la capacidad formadora de tumores. En este sentido cada vez hay más evidencias de la importancia de la regulación de la maquinaria endocítica de EGFR en GBMs. Se ha descrito en la literatura que Mig6 (molécula que conduce al EGFR a degradación lisosomal) (Ying et al., 2010), EfrinaA5 (que induce la interacción entre CBL y EGFR) (Li et al., 2009) y LRIG1 (controla el reclutamiento de la proteína CBL y la regulación a la baja del EGFR) (Stutz et al., 2008), están poco expresadas o delecionadas en glioblastomas y astrocitomas. Así mismo, se ha demostrado que la restauración de los niveles de estas proteínas en las células de GBM provoca inhibición del crecimiento celular, bloqueo del crecimiento independiente de sustrato y apoptosis. Sin embargo, DYRK1A es una diana más interesante, sobre todo si se consigue demostrar que la inhibición de su actividad quinasa produce el mismo efecto que la disminución de la cantidad de proteína. El estudio de la inhibición farmacológica de DYRK1A y su mecanismo de actuación sobre el EGFR puede ayudar por tanto a definir nuevas vías terapéuticas en aquellos tumores dependientes de dicho receptor.





# Conclusiones



- 1.- Las NSCs de la SEZ expresan Dyrk1A tanto *in vivo* como *in vitro* y de manera dosis génica dependiente.
- 2.- La reducción de los niveles de Dyrk1A disminuye el porcentaje de NSCs en la SEZ.
- 3.- Dyrk1A regula el comportamiento de las células madre de la SEZ tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo esencial para la correcta auto-renovación de las NSCs en respuesta al mitógeno EGF.
- 4.- Una menor dosis génica de Dyrk1A provoca la reducción a nivel post-transcripcional de la cantidad de EGFR presente en las NSCs.
- 5.- Dyrk1A regula los niveles del EGFR, antagonizando la degradación del mismo después de su internalización. Esta inhibición de la degradación del EGFR se realiza, al lo menos en parte, a través de la fosforilación del modulador de receptores tirosina quinasa Spry2.
- 6.- DYRK1A se expresa en numerosas líneas celulares derivadas de GBMs y regula la capacidad de auto-renovación de las TICs.
- 7.- La disminución de los niveles de DYRK1A provoca un retraso considerable en el crecimiento de los tumores, así como alteraciones fenotípicas de los mismos.
- 8.- La regulación de la capacidad tumorigénica de las TICs de GBMs está mediada, al menos parcialmente, por la regulación autocrina de los niveles de EGFR por DYRK1A.



# Bibliografía

- Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., Murakami, N., Wang, R., and Hwang, Y.W. (2006). MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 1060-1065.
- Ahn, K.J., Jeong, H.K., Choi, H.S., Ryoo, S.R., Kim, Y.J., Goo, J.S., Choi, S.Y., Han, J.S., Ha, I., and Song, W.J. (2006). DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22, 463-472.
- Ahn, S., and Joyner, A.L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894-897.
- Alagappan, D., Lazzarino, D.A., Felling, R.J., Balan, M., Kotenko, S.V., and Levison, S.W. (2009). Brain injury expands the numbers of neural stem cells and progenitors in the SVZ by enhancing their responsiveness to EGF. *ASN Neuro* 1.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, J., Oset, M., González, J.R., Flórez, J., Fillat, C., *et al.* (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 1915-1923.
- Alvarez, M., Altafaj, X., Aranda, S., and de la Luna, S. (2007). DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol Biol Cell* 18, 1167-1178.
- Alvarez, M., Estivill, X., and de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J Cell Sci* 116, 3099-3107.
- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
- Anand, M., Van Meter, T.E., and Fillmore, H.L. (2011). Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *J Neurooncol* 104, 679-687.
- Andreu-Agulló, C., Morante-Redolat, J.M., Delgado, A.C., and Fariñas, I. (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12, 1514-1523.
- Aranda, S., Alvarez, M., Turró, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2008). Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 28, 5899-5911.
- Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., *et al.* (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441, 595-600.
- Bachoo, R.M., Maher, E.A., Ligon, K.L., Sharpless, N.E., Chan, S.S., You, M.J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., *et al.* (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1, 269-277.
- Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 68, 6043-6048.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response (Nature), pp. 756-760.
- Barami, K., Sloan, A.E., Rojani, A., Schell, M.J., Staller, A., and Brem, S. (2009). Relationship of gliomas to the ventricular walls. *J Clin Neurosci* 16, 195-201.
- Barkho, B.Z., Song, H., Aimone, J.B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., and Zhao, X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15, 407-421.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67, 4010-4015.
- Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol Cancer* 10, 128.

- Beier, D., Wischhusen, J., Dietmaier, W., Hau, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2008). CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 18, 370-377.
- Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M., and Knoblich, J.A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 221-231.
- Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
- Bignami, A., and Dahl, D. (1973). Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res* 49, 393-402.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Branchi, I., Bichler, Z., Minghetti, L., Delabar, J.M., Malchiodi-Albedi, F., Gonzalez, M.C., Chettouh, Z., Nicolini, A., Chabert, C., Smith, D.J., *et al.* (2004). Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 429-440.
- Brazel, C.Y., Limke, T.L., Osborne, J.K., Miura, T., Cai, J., Pevny, L., and Rao, M.S. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4, 197-207.
- Cantarella, C., Cayre, M., Magalon, K., and Durbec, P. (2008). Intranasal HB-EGF administration favors adult SVZ cell mobilization to demyelinated lesions in mouse corpus callosum. *Dev Neurobiol* 68, 223-236.
- Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.
- Capela, A., and Temple, S. (2006). LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev Biol* 291, 300-313.
- Carpenter, G., and Cohen, S. (1976). 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 71, 159-171.
- Chang, C.P., Lazar, C.S., Walsh, B.J., Komuro, M., Collawn, J.F., Kuhn, L.A., Tainer, J.A., Trowbridge, I.S., Farquhar, M.G., and Rosenfeld, M.G. (1993). Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *J Biol Chem* 268, 19312-19320.
- Chang, H.S., Lin, C.H., Yang, C.H., Yen, M.S., Lai, C.R., Chen, Y.R., Liang, Y.J., and Yu, W.C. (2007). Increased expression of Dyrk1a in HPV16 immortalized keratinocytes enable evasion of apoptosis. *Int J Cancer* 120, 2377-2385.
- Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R., and Kettenmann, H. (2012). The brain tumor microenvironment. *Glia* 60, 502-514.
- Chen, J., Jette, C., Kanki, J.P., Aster, J.C., Look, A.T., and Griffin, J.D. (2007). NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. *Leukemia* 21, 462-471.
- Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., *et al.* (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362-375.
- Chen-Hwang, M.C., Chen, H.R., Elzinga, M., and Hwang, Y.W. (2002). Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem* 277, 17597-17604.
- Cheng, L., Wu, Q., Guryanova, O.A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 643-648.
- Chenn, A., and Walsh, C.A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-369.
- Ciccolini, F., Mandl, C., Hölzl-Wenig, G., Kehlenbach, A., and Hellwig, A. (2005). Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Dev Biol* 284, 112-125.
- Clément, V., Dutoit, V., Marino, D., Dietrich, P.Y., and Radovanovic, I. (2009). Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer* 125, 244-248.

- Coker, K.J., Staros, J.V., and Guyer, C.A. (1994). A kinase-negative epidermal growth factor receptor that retains the capacity to stimulate DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6967-6971.
- Conti, L., and Cattaneo, E. (2005). Controlling neural stem cell division within the adult subventricular zone: an APpealing job. *Trends Neurosci* 28, 57-59.
- Corotto, F.S., Henegar, J.A., and Maruniak, J.A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149, 111-114.
- Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16, 2649-2658.
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtås, S., van Roon-Mom, W.M., Björk-Eriksson, T., Nordborg, C., *et al.* (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243-1249.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., and Akeson, E.C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-280.
- de Graaf, K., Hekerman, P., Spelten, O., Herrmann, A., Packman, L.C., Büssow, K., Müller-Newen, G., and Becker, W. (2004). Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J Biol Chem* 279, 4612-4624.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1, 114-124.
- Dhaliwal, J., and Lagace, D.C. (2011). Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci* 33, 1025-1036.
- Dirks, P.B. (2010). Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol* 4, 420-430.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-11624.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.
- Dowjat, W.K., Adayev, T., Kuchna, I., Nowicki, K., Palminiello, S., Hwang, Y.W., and Wegiel, J. (2007). Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett* 413, 77-81.
- Dromard, C., Bartolami, S., Deleyrolle, L., Takebayashi, H., Ripoll, C., Simonneau, L., Prome, S., Puech, S., Tran, V.B., Duperray, C., *et al.* (2007). NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells. *Stem Cells* 25, 340-353.
- Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., and Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 26, 148-165.
- Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., and Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24, 8354-8365.
- Ewald, J.A., Wilkinson, J.C., Guyer, C.A., and Staros, J.V. (2003). Ligand- and kinase activity-independent cell survival mediated by the epidermal growth factor receptor expressed in 32D cells. *Exp Cell Res* 282, 121-131.

- Ferron, S.R., Andreu-Agullo, C., Mira, H., Sanchez, P., Marques-Torrejon, M.A., and Farinas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nat Protoc* 2, 849-859.
- Ferron, S.R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sánchez, P., Arbonés, M.L., *et al.* (2010). Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell* 7, 367-379.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., and Arbonés, M.L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 22, 6636-6647.
- Fotaki, V., Martínez De Lagrán, M., Estivill, X., Arbonés, M., and Dierssen, M. (2004). Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* 118, 815-821.
- French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K., and Lauffenburger, D.A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem* 270, 4334-4340.
- Fürthauer, M., and González-Gaitán, M. (2009). Endocytic regulation of notch signalling during development. *Traffic* 10, 792-802.
- Gage, F.H. (2010). Molecular and cellular mechanisms contributing to the regulation, proliferation and differentiation of neural stem cells in the adult dentate gyrus. *Keio J Med* 59, 79-83.
- Gaiano, N., Nye, J.S., and Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011-7021.
- Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., and Vescovi, A.L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ Res* 92, 598-608.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N., and Gansmüller, A. (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* 8, 983-986.
- Gil-Perotin, S., Marin-Husstege, M., Li, J., Soriano-Navarro, M., Zindy, F., Roussel, M.F., Garcia-Verdugo, J.M., and Casaccia-Bonnel, P. (2006). Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci* 26, 1107-1116.
- Gomes, W.A., Mehler, M.F., and Kessler, J.A. (2003). Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* 255, 164-177.
- Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27, 2032-2043.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-488.
- Grimes, M.L., Beattie, E., and Mobley, W.C. (1997). A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9909-9914.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Vescovi, A.L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22, 437-445.
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Dougherty, J.D., Le Belle, J., Zack, J.A., Geschwind, D.H., Liu, X., Kornblum, H.I., and Wu, H. (2006). PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 111-116.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 57, 407-418.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcòs, C., Solans, A., Domènech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M.A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* 5, 1305-1310.

- Guo, X., Williams, J.G., Schug, T.T., and Li, X. (2010). DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol Chem* 285, 13223-13232.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P.G., *et al.* (2006). A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441, 646-650.
- Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., and Becker, W. (2009). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J* 276, 6324-6337.
- Harari, P.M. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11, 689-708.
- He, J., Liu, Y., Zhu, T., Zhu, J., Dimeco, F., Vescovi, A.L., Heth, J.A., Muraszko, K.M., Fan, X., and Lubman, D.M. (2011). CD90 is identified as a marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics*.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.G., and Becker, W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275, 2431-2438.
- Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., and Sorkin, A. (2004a). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 279, 16657-16661.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 21, 737-748.
- Huang, H.S., Nagane, M., Klingbeil, C.K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.D., Huang, C.M., Gill, G.N., Wiley, H.S., and Cavenee, W.K. (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 272, 2927-2935.
- Huang, Y., Chen-Hwang, M.C., Dolios, G., Murakami, N., Padovan, J.C., Wang, R., and Hwang, Y.W. (2004b). Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins. *Biochemistry* 43, 10173-10185.
- Hämmerle, B., Elizalde, C., Galceran, J., Becker, W., and Tejedor, F.J. (2003). The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J Neural Transm Suppl*, 129-137.
- Hämmerle, B., Elizalde, C., and Tejedor, F.J. (2008). The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur J Neurosci* 27, 1061-1074.
- Hämmerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., and Tejedor, F.J. (2011). Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138, 2543-2554.
- Hämmerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martínez, S., and Tejedor, F.J. (2002). Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev Biol* 246, 259-273.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30, 3489-3498.
- Ivliev, A.E., 't Hoen, P.A., and Sergeeva, M.G. (2010). Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to proastrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma. *Cancer Res* 70, 10060-10070.
- Jacobs, V.L., Valdes, P.A., Hickey, W.F., and De Leo, J.A. (2011). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* 3, e00063.
- Jankovski, A., and Sotelo, C. (1996). Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371, 376-396.
- Jiao, J., and Chen, D.F. (2008). Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells* 26, 1221-1230.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.

- Jin, X., Yin, J., Kim, S.H., Sohn, Y.W., Beck, S., Lim, Y.C., Nam, D.H., Choi, Y.J., and Kim, H. (2011). EGFR-AKT-Smad signaling promotes formation of glioma stem-like cells and tumor angiogenesis by ID3-driven cytokine induction. *Cancer Res* 71, 7125-7134.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisén, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., *et al.* (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67, 213-223.
- Kang, C.S., Zhang, Z.Y., Jia, Z.F., Wang, G.X., Qiu, M.Z., Zhou, H.X., Yu, S.Z., Chang, J., Jiang, H., and Pu, P.Y. (2006). Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 13, 530-538.
- Kang, J.E., Choi, S.A., Park, J.B., and Chung, K.C. (2005). Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J Neurosci Res* 81, 62-72.
- Karpel-Massler, G., Schmidt, U., Unterberg, A., and Halatsch, M.E. (2009). Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res* 7, 1000-1012.
- Kazanis, I., Lathia, J.D., Vadakkan, T.J., Raborn, E., Wan, R., Mughal, M.R., Eckley, D.M., Sasaki, T., Patton, B., Mattson, M.P., *et al.* (2010). Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals. *J Neurosci* 30, 9771-9781.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271, 3488-3495.
- Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8, 290-301.
- Kim, D., Won, J., Shin, D.W., Kang, J., Kim, Y.J., Choi, S.Y., Hwang, M.K., Jeong, B.W., Kim, G.S., Joe, C.O., *et al.* (2004). Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 499-504.
- Kim, E.J., Ables, J.L., Dickel, L.K., Eisch, A.J., and Johnson, J.E. (2011). Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One* 6, e18472.
- Kim, E.J., Sung, J.Y., Lee, H.J., Rhim, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Min, d.S., Kim, J., Paik, S.R., and Chung, K.C. (2006a). Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281, 33250-33257.
- Kim, H.J., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2007). Spatial regulation of EGFR signaling by Sprouty2. *Curr Biol* 17, 455-461.
- Kim, M.Y., Jeong, B.C., Lee, J.H., Kee, H.J., Kook, H., Kim, N.S., Kim, Y.H., Kim, J.K., Ahn, K.Y., and Kim, K.K. (2006b). A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13074-13079.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4752-4757.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., and Gage, F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17, 5820-5829.
- Lammering, G., Valerie, K., Lin, P.S., Hewit, T.H., and Schmidt-Ullrich, R.K. (2004). Radiation-induced activation of a common variant of EGFR confers enhanced radioresistance. *Radiother Oncol* 72, 267-273.

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macswords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., *et al.* (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.
- Lathia, J.D., Heddleston, J.M., Venere, M., and Rich, J.N. (2011). Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* 8, 482-485.
- Le Bras, B., Barallobre, M.J., Homman-Ludiye, J., Ny, A., Wyns, S., Tammela, T., Haiko, P., Karkkainen, M.J., Yuan, L., Muriel, M.P., *et al.* (2006). VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci* 9, 340-348.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., *et al.* (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391-403.
- Lee, Y., Ha, J., Kim, H.J., Kim, Y.S., Chang, E.J., Song, W.J., and Kim, H.H. (2009). Negative feedback inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *J Biol Chem* 284, 33343-33351.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., *et al.* (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4, 1029-1040.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12, 3663-3674.
- Li, D., Jackson, R.A., Yusoff, P., and Guy, G.R. (2010). Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *J Biol Chem* 285, 35374-35385.
- Li, J.J., Liu, D.P., Liu, G.T., and Xie, D. (2009). EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 28, 1759-1768.
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 605-631.
- Lie, D.C., Colamarino, S.A., Song, H.J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., *et al.* (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370-1375.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7526-7531.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000a). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Lim, J., Wong, E.S., Ong, S.H., Yusoff, P., Low, B.C., and Guy, G.R. (2000b). Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation. Identification of a novel translocation domain. *J Biol Chem* 275, 32837-32845.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Louis, S.A., Rietze, R.L., Deleyrolle, L., Wagey, R.E., Thomas, T.E., Eaves, A.C., and Reynolds, B.A. (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells* 26, 988-996.
- Loulier, K., Lathia, J.D., Marthiens, V., Relucio, J., Mughal, M.R., Tang, S.C., Coksaygan, T., Hall, P.E., Chigurupati, S., Patton, B., *et al.* (2009). beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLoS Biol* 7, e1000176.
- Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.
- Ma, D.K., Ming, G.L., and Song, H. (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 15, 514-520.

- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M.D., Nery, S., Corbin, J.G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J.A., Rubin, L.L., *et al.* (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937-950.
- Maenz, B., Hekerman, P., Vela, E.M., Galceran, J., and Becker, W. (2008). Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol Biol* 9, 30.
- Magee, J.A., Piskounova, E., Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21:283-296.
- Martí, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Pérez-Riba, M., Ferrer, I., and Estivill, X. (2003). Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* 964, 250-263.
- Marumoto, T., Tashiro, A., Friedmann-Morvinski, D., Scadeng, M., Soda, Y., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2009). Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nat Med* 15, 110-116.
- Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., and Pruitt, S.C. (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24, 1726-1733.
- Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 16, 45-54.
- Matsumoto, N., Ohashi, H., Tsukahara, M., Kim, K.C., Soeda, E., and Niikawa, N. (1997). Possible narrowed assignment of the loci of monosomy 21-associated microcephaly and intrauterine growth retardation to a 1.2-Mb segment at 21q22.2. *Am J Hum Genet* 60, 997-999.
- Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K., and Taga, T. (2001). A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J Immunol Methods* 247, 141-151.
- Mazzoleni, S., Politi, L.S., Pala, M., Cominelli, M., Franzin, A., Sergi Sergi, L., Falini, A., De Palma, M., Bulfone, A., Poliani, P.L., *et al.* (2010). Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res* 70, 7500-7513.
- McGill, M.A., and McGlade, C.J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278, 23196-23203.
- Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.M., Nistér, M., Lundeborg, J., and Frisén, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 133, 363-369.
- Memberg, S.P., and Hall, A.K. (1995). Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol* 27, 26-43.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26, 7907-7918.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-278.
- Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443, 448-452.
- Morita, K., Lo Celso, C., Spencer-Dene, B., Zouboulis, C.C., and Watt, F.M. (2006). HAN11 binds mDia1 and controls GLI1 transcriptional activity. *J Dermatol Sci* 44, 11-20.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D.J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071-1082.
- Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1992). Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 12, 249-256.
- Murakami, N., Bolton, D., and Hwang, Y.W. (2009). Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry* 48, 9297-9305.

- Murakami, N., Xie, W., Lu, R.C., Chen-Hwang, M.C., Wieraszko, A., and Hwang, Y.W. (2006). Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome. *J Biol Chem* 281, 23712-23724.
- Møller, R.S., Kübart, S., Hoeltzenbein, M., Heye, B., Vogel, I., Hansen, C.P., Menzel, C., Ullmann, R., Tommerup, N., Ropers, H.H., *et al.* (2008). Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am J Hum Genet* 82, 1165-1170.
- Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bögl, O., Cavenee, W.K., and Huang, H.J. (1996). A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56, 5079-5086.
- Nagy, P., Arndt-Jovin, D.J., and Jovin, T.M. (2003). Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp Cell Res* 285, 39-49.
- Nam, H.S., and Benezra, R. (2009). High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 515-526.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.J., Furnari, F.B., and Cavenee, W.K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 62, 6764-6769.
- Nicolis, S.K. (2007). Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis* 25, 217-229.
- Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., and Huang, H.J. (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7727-7731.
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., and Miller, M.W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18, 311-318.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., *et al.* (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033-2037.
- Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., *et al.* (2008). Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62, 505-514; discussion 514-505.
- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* 276, 30467-30474.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J., and Shimizu, N. (1999). High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62, 165-171.
- Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Banna, G.L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M., Stassi, G., Martini, M., Maira, G., Larocca, L.M., *et al.* (2008). Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14, 8205-8212.
- Palma, V., Lim, D.A., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T.C., Herzberg, C.D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335-344.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-494.
- Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M.S., Song, W.J., Lee, S.H., Seo, H., and Chung, K.C. (2010). Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 285, 31895-31906.
- Park, J., Song, W.J., and Chung, K.C. (2009). Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66, 3235-3240.
- Park, J., Yang, E.J., Yoon, J.H., and Chung, K.C. (2007). Dyrk1A overexpression in immortalized hippocampal cells produces the neuropathological features of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci* 36, 270-279.

- Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6387-6392.
- Paulino, A.C., and Teh, B.S. (2005). Treatment of brain tumors. *N Engl J Med* 352, 2350-2353; author reply 2350-2353.
- Pencea, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J., and Luskin, M.B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21, 6706-6717.
- Platel, J.C., Dave, K.A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M.E., and Bordey, A. (2010). NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65, 859-872.
- Rachidi, M., Lopes, C., Vayssettes, C., Smith, D.J., Rubin, E.M., and Delabar, J.M. (2007). New cerebellar phenotypes in YAC transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region-1. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 488-494.
- Raizer, J.J., Malkin, M.G., Kleber, M., and Abrey, L.E. (2004). Phase 1 study of 28-day, low-dose temozolomide and BCNU in the treatment of malignant gliomas after radiation therapy. *Neuro Oncol* 6, 247-252.
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Fariñas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331-339.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.
- Resat, H., Ewald, J.A., Dixon, D.A., and Wiley, H.S. (2003). An integrated model of epidermal growth factor receptor trafficking and signal transduction. *Biophys J* 85, 730-743.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1993). Central nervous system growth and differentiation factors: clinical horizons--truth or dare? *Curr Opin Biotechnol* 4, 734-738.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175, 1-13.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., *et al.* (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824-828.
- Rubin, C., Litvak, V., Medvedovsky, H., Zwang, Y., Lev, S., and Yarden, Y. (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol* 13, 297-307.
- Ryoo, S.R., Jeong, H.K., Radnaabazar, C., Yoo, J.J., Cho, H.J., Lee, H.W., Kim, I.S., Cheon, Y.H., Ahn, Y.S., Chung, S.H., *et al.* (2007). DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 282, 34850-34857.
- Ryu, Y.S., Park, S.Y., Jung, M.S., Yoon, S.H., Kwen, M.Y., Lee, S.Y., Choi, S.H., Radnaabazar, C., Kim, M.K., Kim, H., *et al.* (2010). Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 115, 574-584.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.
- Scales, T.M., Lin, S., Kraus, M., Goold, R.G., and Gordon-Weeks, P.R. (2009). Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J Cell Sci* 122, 2424-2435.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.

- Seifert, A., Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2008). DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J* 275, 6268-6280.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21, 7153-7160.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338-1340.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., and Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 92-99.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267-7273.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Sitz, J.H., Baumgärtel, K., Hämmerle, B., Papadopoulos, C., Hekerman, P., Tejedor, F.J., Becker, W., and Lutz, B. (2008). The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. *Neuroscience* 157, 596-605.
- Sitz, J.H., Tigges, M., Baumgärtel, K., Khaspekov, L.G., and Lutz, B. (2004). Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Mol Cell Biol* 24, 5821-5834.
- Skurat, A.V., and Dietrich, A.D. (2004). Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* 279, 2490-2498.
- Smith, D.J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J.F., and Rubin, E.M. (1995). Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* 27, 425-434.
- Snyder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwig, E.A., and Cepko, C.L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68, 33-51.
- Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J., and Fine, H.A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440-452.
- Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
- Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportès, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L., *et al.* (1996). Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* 38, 331-339.
- Sorkin, A.D., Teslenko, L.V., and Nikolsky, N.N. (1988). The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation. *Exp Cell Res* 175, 192-205.
- Stump, G., Durrer, A., Klein, A.L., Lütolf, S., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev* 114, 153-159.
- Stutz, M.A., Shattuck, D.L., Laederich, M.B., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2008). LRIG1 negatively regulates the oncogenic EGF receptor mutant EGFRvIII. *Oncogene* 27, 5741-5752.
- Sutter, R., Yadirgi, G., and Marino, S. (2007). Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships? *Biochim Biophys Acta* 1776, 125-137.

- Tchoghandjian, A., Baeza, N., Colin, C., Cayre, M., Metellus, P., Beclin, C., Ouafik, L., and Figarella-Branger, D. (2010). A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol* 20, 211-221.
- Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301.
- Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (2005). c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* 391, 153-166.
- Thon, N., Damianoff, K., Hegemann, J., Grau, S., Krebs, B., Schnell, O., Tonn, J.C., and Goldbrunner, R. (2010). Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci* 43, 51-59.
- Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17, 7850-7859.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Vacano, G.N., Duval, N., and Patterson, D. (2012). The use of mouse models for understanding the biology of down syndrome and aging. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012, 717315.
- van den Bent, M.J., and Kros, J.M. (2007). Predictive and prognostic markers in neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 1074-1081.
- von Groote-Bidingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H.M., Joost, H.G., Becker, W., and Barthel, A. (2003). DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 764-769.
- Wada, T., Haigh, J.J., Ema, M., Hitoshi, S., Chaddah, R., Rossant, J., Nagy, A., and van der Kooy, D. (2006). Vascular endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival. *J Neurosci* 26, 6803-6812.
- Wang, J., Sakariassen, P., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røslund, G., Thorsen, F., Stuhr, L., *et al.* (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768.
- Wang, Y.Z., Plane, J.M., Jiang, P., Zhou, C.J., and Deng, W. (2011). Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. *Stem Cells* 29, 907-912.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., *et al.* (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 1010, 69-80.
- Wells, A., Welsh, J.B., Lazar, C.S., Wiley, H.S., Gill, G.N., and Rosenfeld, M.G. (1990). Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* 247, 962-964.
- Wheeler, S.E., Suzuki, S., Thomas, S.M., Sen, M., Leeman-Neill, R.J., Chiosea, S.I., Kuan, C.T., Bigner, D.D., Gooding, W.E., Lai, S.Y., *et al.* (2010). Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29, 5135-5145.
- Wiley, H.S. (1988). Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *J Cell Biol* 107, 801-810.
- Wiley, H.S., Herbst, J.J., Walsh, B.J., Lauffenburger, D.A., Rosenfeld, M.G., and Gill, G.N. (1991). The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 266, 11083-11094.
- Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Langdon, W.Y., and Guy, G.R. (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J* 21, 4796-4808.
- Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., and Proud, C.G. (2001). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355, 609-615.

- Yabut, O., Domogauer, J., and D'Arcangelo, G. (2010). Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci* 30, 4004-4014.
- Yang, E.J., Ahn, Y.S., and Chung, K.C. (2001). Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 276, 39819-39824.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Ying, H., Zheng, H., Scott, K., Wiedemeyer, R., Yan, H., Lim, C., Huang, J., Dhakal, S., Ivanova, E., Xiao, Y., *et al.* (2010). Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6912-6917.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.
- Zheng, W., Nowakowski, R.S., and Vaccarino, F.M. (2004). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* 26, 181-196.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A., and Parada, L.F. (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* 8, 119-130.
- Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J., and Luskin, M.B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11, 234-245.
- Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X., and Friedman, E. (2003). Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem* 278, 49573-49581.