

UCH-FC
DOC-BIOM
C 227
C1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO



“Papel de CTIP1 en la neurogénesis y diferenciación neuronal *in vivo*”

JOSE ALFONSO CANOVAS SCHALCHLI

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN
EN BIOLOGIA MOLECULAR, CELULAR Y NEUROCIENCIAS**

Directores de tesis:

**Manuel Kukuljan Padilla, Ph.D, M.D
Jimena Sierralta Jara, Ph.D.**

SANTIAGO-CHILE

2014

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de doctorado presentada por el candidato:

José Alfonso Cánovas Schälchli

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de defensa privada de tesis rendido el día 2 de Junio del año 2014.

Directores de Tesis:

Dr. Manuel Kukuljan

Dra. Jimena Sierralta

Comisión de evaluación de la tesis

Dr. Christian González-Billault (Presidente)

Dra. Kathleen Whitlock

Dr. Jorge Campusano

Dra. Verónica Palma

Manuel Kukuljan
.....
Jimena Sierralta
.....
Christian González-Billault
.....
Kathleen Whitlock
.....
Jorge Campusano
.....
Verónica Palma
.....



A circular stamp from the Faculty of Sciences Library Central, University of Chile, is stamped over the signatures. The stamp contains the text: "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE".

Lugar de realización de la tesis y financiamiento

La mayor parte del trabajo experimental presentado en esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Programa de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Manuel Kukuljan y la Dra. Jimena Sierralta. Los análisis bioinformáticos y los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Regulación Génica, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Andrés Bello, dirigido por el Dr. Martín Montecino.

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento proveniente de las siguientes fuentes:

- 1.- Beca de Mantención para Doctorado en Chile. CONICYT. N° 2108064
- 2.- Beca para Asistencia a Congresos en el Extranjero. CONICYT.
- 3.- Proyecto FONDECYT. N° 1120483
- 4.- Iniciativa Científica Milenio. Biomedical Neuroscience Institute (BNI) (PROYECTO ICM P09-015F).

Índice de contenidos

Agradecimientos	1
Lugar de realización de la tesis y financiamiento	2
Índice de contenidos	3
Índice de figuras	7
Índice de tablas	10
Abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	15
1.- Introducción	17
1.1.- Visión general de la función, desarrollo y organización de la corteza cerebral	17
1.2.- Corticogénesis: de progenitores neurales a la corteza cerebral	21
1.3.- Tipos de neuronas de proyección presentes en la corteza cerebral y sus eferencias	24
1.4.- Control molecular de la especificación y desarrollo de subtipos de neuronas de proyección	29
1.4.1.- Especificación de subtipos de NP a nivel de células progenitoras	29
1.4.2.- Especificación post-mitótica de subtipos de NP	31
1.5.- Identificación de CTIP1 como potencial regulador de la identidad de subtipos neuronales	36
2.- Hipótesis	43
3.- Objetivo general	43
3.1.- Objetivos específicos	43
4.- Materiales	44
4.1.- Reactivos químicos	44
4.1.1.- Reactivos y sistemas comerciales de biología molecular	44
4.1.2.- Reactivos y materiales usados para inmunofluorescencia	45

4.1.3.- Reactivos usados para inmunoblot	45
4.1.4.- Reactivos usados para cultivos de bacterias	46
4.1.5.- Reactivos para cultivos de líneas celulares	46
4.1.6.- Reactivos para cultivos primarios neuronales	47
4.1.7.- Reactivos y materiales utilizados en experimentos de electroporación <i>in utero</i>	47
4.1.8.- Vectores	48
4.1.9.- Cepas bacterianas	48
4.1.10.- Anticuerpos	49
4.1.11.- Partidores	49
5.- Metodología	54
5.1.- Extracción de RNA total y RT-PCR	54
5.2.- PCR cuantitativo	54
5.3.- Inmunoprecipitación de cromatina	55
5.4.- Clonamiento de shRNAs contra CTIP1 en FUX-GFP	56
5.5.- Clonamientos de marcos de lectura de variantes de CTIP1, CTIP2 y TBR1	57
5.5.1.- Clonamiento de variantes de CTIP1	57
5.5.2.- Clonamiento de CTIP2 y TBR1	59
5.6.- Obtención, purificación y secuenciación de DNA plasmidial	59
5.7.- Generación de vectores lentivirales	60
5.8.- Mantenimiento y transfección de líneas celulares COS7 y HEK293T	60
5.9.- Cultivos primarios de neuronas corticales de embrión de ratón y transducción lentiviral	61
5.10.- Western blot	62
5.11.- Inmunohistofluorescencia	62
5.12.- Animales y electroporación <i>in utero</i> (EPIU)	63
5.13.- Comentarios acerca de la técnica de electroporación <i>in utero</i> y consideraciones de su utilización en el presente estudio	64
5.14.- Microscopía, análisis de imágenes y análisis estadísticos	65

6.- Resultados	66
6.1.- Estudio del patrón de expresión espacio-temporal de CTIP1 en la corteza cerebral en desarrollo	66
6.2.- Generación de herramientas moleculares para la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	73
6.3.- Estudio de los efectos de la inhibición de la expresión de CTIP1 sobre el programa general de diferenciación de NP glutamatérgicas	76
6.4.- Estudio de los efectos sobre el fenotipo molecular de subtipos neuronales corticales, asociados a la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 <i>in vivo</i>	79
6.4.1.- Búsqueda <i>in silico</i> de sitios de unión putativos para CTIP1 en el genoma del ratón	79
6.4.2.- Análisis de la capacidad de unión de CTIP1 a su sitio consenso en la región regulatoria de <i>Tbr1 in vivo</i> , y efecto de la inhibición de CTIP1 sobre la expresión de TBR1 en cultivos corticales primarios	80
6.4.3.- Efecto sobre los niveles de expresión de TBR1 en capas profundas de la corteza, asociados a la alteración de los niveles de expresión de CTIP1	82
6.4.4.- Efectos sobre la expresión de CTIP2 en la capa 5 de la corteza, asociados a la alteración de los niveles de expresión de CTIP1	86
6.5.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales asociados a la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5	90
6.6.- Estudio de interacciones genéticas entre CTIP1, CTIP2 y TBR1 en la regulación del desarrollo y diferenciación de las NPSC	95
6.6.1.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales al restablecer la expresión de CTIP2 en el contexto de inhibición de la expresión de CTIP1	95

6.6.2.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales en experimentos de inhibición doble de CTIP1 y TBR1	100
7.- Discusión	113
8.- Conclusiones	127
9.- Referencias	129

Índice de Figuras

Figura 1. Territorios de progenitores telencefálicos	18
Figura 2. Origen de NPs e interneuronas en el desarrollo cortical	21
Figura 3. Representación esquemática de la formación “de adentro hacia afuera” de las láminas corticales y de la temporalidad de generación de subtipos de NP	25
Figura 4. Clasificación hodológica de subtipos neuronales presentes en la corteza	27
Figura 5. Control molecular de la especificación de distintos subtipos de NP	33
Figura 6. CTIP1 es expresado abundantemente en la corteza post-natal e hipocampo	40
Figura 7. Análisis del patrón de expresión de CTIP1 durante el desarrollo cortical embrionario y post-natal	41
Figura 8. CTIP1 es expresado diferencialmente en distintas capas corticales en la corteza post-natal	42
Figura 9. CTIP1 no es expresado por progenitores neurales en la corteza en desarrollo	67
Figura 10. CTIP1 es expresado por neuronas postmitóticas en la corteza en desarrollo	68
Figura 11. CTIP1 no es expresado en células gliales	69
Figura 12. Comparación de la expresión de CTIP1 con FTs que presentan expresión laminar en la corteza	72
Figura 13. Herramientas moleculares para la manipulación de la expresión de CTIP1	75
Figura 14. La inhibición de la expresión de CTIP1 no afecta el programa de diferenciación general de NPs <i>in vivo</i>	78
Figura 15. CTIP1 posee un sitio de unión en el promotor de TBR1 y regula negativamente su expresión en neuronas corticales <i>in vitro</i>	81
Figura 16. La inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a un incremento en la expresión de TBR1	84
Figura 17. La sobre-expresión de CTIP1 en NPs de la capa 6 inhibe la	

expresión de TBR1	85
Figura 18. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a una disminución en la expresión de CTIP2 en NPs de la capa 5 y a una disminución de la expresión de <i>Fezf2</i> en cultivos corticales	88
Figura 19. La sobre-expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 inhibe la expresión de CTIP2	89
Figura 20. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales	92
Figura 21. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales	93
Figura 22. La sobre-expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales	94
Figura 23. La EPIU de pCTIP2 induce altos niveles de expresión de CTIP2 en las células electroporadas	97
Figura 24. La electroporación doble de shCTIP1 y pCTIP2 rescata los niveles de expresión de CTIP2 en las NP de la capa 5	98
Figura 25. La co-electroporación de shCTIP1 y pCTIP2 rescata los defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales inducidas por la inhibición de la expresión de CTIP1	99
Figura 26. Interferencia de TBR1	101
Figura 27. La inhibición de la expresión de TBR1, pero no de CTIP1, se asocia a defectos migratorios de NPs	104
Figura 28. La inhibición de la expresión de TBR1 se asocia a defectos migratorios en células destinadas a capas superficiales de la corteza	105
Figura 29. La electroporación doble de shCTIP1 y shTBR1 inhibe eficientemente la expresión de CTIP1 y TBR1 en las NP localizadas en la capa 5	108
Figura 30. La Inhibición doble de CTIP1 y TBR1 rescata los defectos en el desarrollo de proyecciones sub-cerebrales observadas en la inhibición de la expresión de CTIP1	109
Figura 31. La electroporación doble de shCTIP1 y shTBR1 no recupera la	

expresión de CTIP2 en las NP localizadas en la capa 5	110
Figura 32. La inhibición doble de CTIP1 y TBR1 se asocia a una acumulación de células en la capa 6 que presentan altos niveles de expresión de CTIP2	111
Figura 33. Modelo propuesto que describe el rol de la expresión diferencial de CTIP1 en las capas corticales 5 y 6	128

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de horquillas de RNA contra CTIP1	49
Tabla 2. Secuencias de horquillas de RNA contra TBR1	50
Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados para PCR cuantitativos	50
Tabla 4. Partidores utilizados en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina	51
Tabla 5. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 sin epítotope	51
Tabla 6. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 con epítotope HA	52
Tabla 7. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 con epítotope MYC	52
Tabla 8. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1S resistente a shCTIP1 con epítotope MYC	53
Tabla 9. Partidores utilizados en la clonación de CTIP2 (isoforma b)	53
Tabla 10. Partidores utilizados en la clonación de TBR1	53

Abreviaturas

BMP:	Bone Morphogenetic protein
cDNA:	DNA complementario
ChIP:	Inmunoprecipitación de cromatina
CP:	Placa cortical
CR:	Células de Cajal-Retzius
CSPN:	Neurona de proyección costico-espinal
CST:	Tracto cortico-espinal (ó tracto piramidal)
DE:	Desviación estándar
DNA:	Ácido desoxiribonucleico
EPIU:	Electroporación <i>in utero</i>
FGF:	Fibroblast Growth Factors
FT:	Factor transcripcional
GABA :	Ácido gamma-aminobutírico
GFP:	Proteína fluorescente verde
IP:	Progenitor intermedio
KO:	<i>Knock-out</i>
mRNA.	Ácido ribonucleico mensajero
MZ:	Zona marginal
NP:	Neurona de proyección
NPC:	Neurona de proyección callosa
NPCFu:	Neurona de proyección cortico-fugal
NPCTh:	Neurona de proyección cortico-talámica
NPSC:	Neurona de proyección subcerebral
MOI:	Multiplicidad de infección
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PP:	Preplaca
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa

SD:	Desviación estándar
SEM:	Error estándar de la media
shRNA:	Horquilla de ácido ribonucleico
SH:	Sonic Hedgehog
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Precursor neuronal corto
SP:	Subplaca
t-test:	Prueba t de Student
VZ:	Zona ventricular
RG:	Glia radial
WB:	Inmunoblot, Western blot

Resumen

La corteza cerebral es la región del cerebro responsable de nuestras habilidades cognitivas superiores, ayudándonos no sólo a percibir el mundo y a responder a este, sino que también a entenderlo. El asombroso poder de procesamiento de información de la corteza cerebral que subyace a estas capacidades depende de la compleja organización de su estructura. La corteza madura se organiza radialmente en seis capas, y cada capa se encuentra ocupada por diferentes subtipos de neuronas de proyección (NP) que son generadas en una secuencia temporal estrechamente regulada a partir de células progenitoras del pialo. La amplia diversidad de subtipos de NP que residen en distintas capas de la corteza pueden ser distinguidas en términos de perfil de expresión génica, características morfológicas, patrones de conectividad y la función que desempeñan. Las NPs pueden ser clasificadas en dos grupos principales de acuerdo a su patrón de conectividad: NPs corticofugal, que residen en capas corticales profundas (capas 5 y 6) y proyectan sus axones hacia regiones lejanas de la corteza, y NPs intracortical, que se ubican principalmente en capas superficiales de la corteza y proyectan sus axones hacia regiones ipsi ó contralaterales de la corteza. Las NP corticofugal pueden ser además subclasificadas en neuronas corticotálámicas, cuyos cuerpos celulares residen en la capa 6 y extienden sus axones hacia el tálamo, y NP subcerebrales, cuyos cuerpos celulares se confinan a la capa 5 de la corteza y proyectan sus axones hacia blancos caudales subcerebrales, dentro de los que se incluye la médula espinal. El conocimiento actual indica que la identidad de los subtipos de NP es inicialmente especificada en células progenitoras, y que luego es implementada a través de procesos posteriores de adquisición de destino que ocurren a nivel postmitótico. La identificación y caracterización de reguladores transcripcionales que controlan la especificación y diferenciación de neuronas corticales hacia distintas clases de subtipos neuronales representa un paso crucial para la comprensión de cómo la arquitectura y conectividad cortical emergen durante el desarrollo. Los datos actuales indican que la especificación de NPs corticofugal es regulada por relaciones inhibitorias mutuas establecidas, al menos en parte, por los factores transcripcionales FEZF2,



CTIP2 y TBR1. Para ganar un mayor conocimiento de cómo se establece la diversidad de NPs durante el desarrollo, estudiamos la función de CTIP1, que es un factor transcripcional postmitótico que es dinámicamente expresado durante el desarrollo de la corteza murina y que adquiere un patrón de expresión laminar en la corteza postnatal mostrando altos niveles de expresión en las capas 2/3 y 5, y bajos niveles de expresión en la capa 6. Se observó un patrón de expresión recíproco entre CTIP1 y TBR1 en NPs ubicadas en capas profundas de la corteza y que CTIP1 actúa como un represor de la expresión de *Tbr1*. La inhibición *in vivo* de CTIP1 en NPs de la capa 5 de la corteza mediante electroporación *in utero* de shRNAs, condujo a un incremento en la expresión de TBR1, una inhibición de la expresión de CTIP2 y a defectos en el desarrollo del tracto cortico-espinal (CST). Interesantemente, encontramos que los defectos en el desarrollo del CST son mediados por los incrementos en la expresión de TBR1. Concluimos que los altos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 5 favorecen la expresión de CTIP2 y el desarrollo de proyecciones sub-cerebrales, a través de la represión transcripcional de TBR1. Nuestros datos sugieren que la dosis diferencial de CTIP1 entre las capas 5 y 6 determina el grado de represión de *Tbr1*, contribuyendo tanto al origen laminar como al establecimiento de destinos alternativos de las NP corticofugal en las capas profundas de la corteza.

Abstract

The cerebral cortex is the brain region responsible of our higher cognitive abilities helping us not only to perceive the world and respond to it but also to understand it. The astonishing information-processing power of the cerebral cortex underlying those abilities relies on the complex organization of its structure. The mature cortex is radially organized into six distinct layers and each layer is populated by different projection neuron (PN) subtypes that are generated in a tightly orchestrated temporal sequence from pallial progenitor cells. The broad diversity of PN subtypes residing at distinct laminar positions can be distinguished in terms of gene expression profiles, morphological features, connectivity patterns and the function they serve. PNs can be classified into two main groups according to their connectivity patterns: corticofugal PN, which reside in deep layers (layers 5 and 6) and send their axons away from the cortex, and intracortical PN, that are found mostly within superficial cortical layers and send their axons to the ipsi- or contralateral cortex. Corticofugal PN are further divided into corticothalamic neurons, whose cell bodies reside in layer 6 and extend their axons towards the thalamus and subcerebral projection neurons, whose cell bodies are confined to layer 5 and project axons towards caudal subcerebral targets, including the spinal cord. Current knowledge indicates that the identity of PN subtypes is initially specified in progenitor cells and then, implemented through subsequent processes of fate acquisition occurring at postmitotic phase. The identification and characterization of transcriptional regulators controlling the specification and differentiation of newborn cortical neurons into distinct classes of neuronal subtypes represent crucial steps for understanding how cortical architecture and connectivity emerge during cortical development. Current data indicate that the specification of corticofugal PNs is regulated by mutual inhibitory relationships established at least in part by the transcription factors FEZF2, CTIP2 and TBR1. To further understand how the diversity of PN is established during development we studied the role of CTIP1, which is a postmitotic transcription factor dynamically expressed during mouse developing cortex

that acquires a laminar expression pattern in the post-natal cortex showing high expression levels in layers 2/3 and 5 and low expression levels in layer 6. We observed a reciprocal expression pattern between CTIP1 and TBR1 in PNs located in deep cortical layers and found that CTIP1 functions as a repressor of Tbr1 expression. The *in vivo* inhibition of CTIP1 expression in layer 5 PNs by *in utero* electroporation of shRNAs led to an increase in TBR1 expression, a decrease on CTIP2 expression and defects in the development of the cortico-spinal tract (CST). Interestingly, we found that the defect in CST development is mediated by TBR1 increased expression. We conclude that the high CTIP1 expression levels in layer 5 PN play a permissive role for CTIP2 expression and for the development of subcerebral projections, through the transcriptional repression of *Tbr1* gene. Our data suggest that the differential dosage of CTIP1 between layer 5 and 6 determine the degree of repression of *Tbr1* gene and thus contribute to establish both, the alternative fates and the laminar origin of corticofugal PN in deep cortical layers.

1.- Introducción

1.1.- Visión general de la función, desarrollo y organización de la corteza cerebral.

La ontogénesis del sistema nervioso es un proceso complejo y estereotipado que depende de la acción coordinada de programas genéticos que son desplegados en patrones temporales y espaciales precisamente definidos durante el desarrollo de un individuo, y que permiten la emergencia de un sistema extraordinariamente sofisticado compuesto por cientos de tipos celulares interconectados en forma precisa. La función normal y coordinada de las células que constituyen el sistema nervioso -neuronas y células gliales- le otorgan la capacidad de llevar a cabo procesos diversos que incluyen desde la percepción sensorial y elaboración de respuestas motoras, hasta funciones cognitivas de alta complejidad propias de nuestra especie como el lenguaje ó el pensamiento abstracto (Kandel y cols. 2000).

La corteza cerebral es la estructura más compleja del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y es, en gran medida, responsable de las funciones cognitivas de alto nivel características de este tipo de animal. El gran tamaño de esta estructura cerebral en mamíferos se debe a que ha experimentado una expansión dramática durante la evolución, especialmente en primates humanos y no humanos. La corteza cerebral se divide en regiones. La neocorteza corresponde a la región más extensa de la corteza y se ubica entre otras dos regiones corticales, la arquicorteza y la paleocorteza. La expansión evolutiva neocortical da cuenta de la mayor parte del incremento en el tamaño global del cerebro en las especies actuales más avanzadas en términos cognitivos (O'Leary y cols. 2007).

En vertebrados todas las estructuras que componen el SNC se originan a partir del neuroepitelio o neuroectodermo, que corresponde a la región del ectodermo comprometida con el linaje neuronal como resultado de procesos de inducción neural que ocurren tempranamente en el desarrollo (Stern 2006). El neuroectodermo en sí es

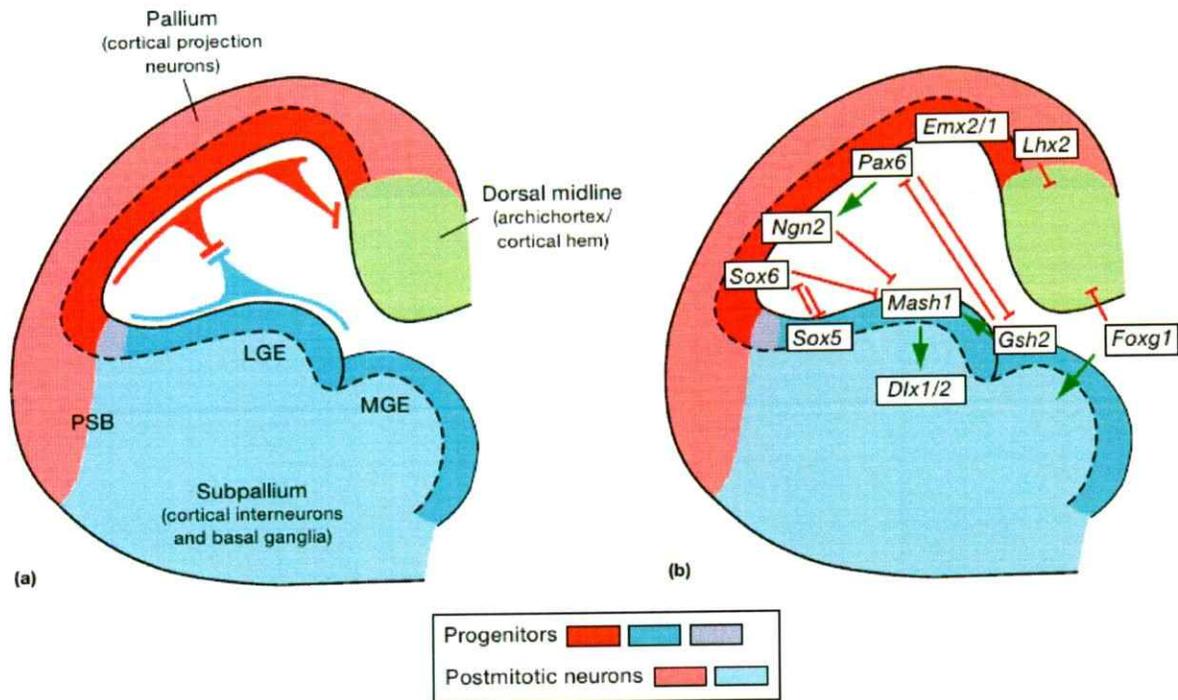


Figura 1. Territorios de progenitores telencefálicos. **A.** Durante el desarrollo de la neocorteza (aproximadamente en el día embrionario 10.5 de ratón), el telencéfalo es parcelado en dos grandes dominios: palio (dorsal; rojo) y subpalio (ventral; azul). El palio da origen a las NP excitatorias de la neocorteza, neuronas hipocampales, plexo coroideo y las células de Cajal-Retzius. El subpalio, que se subdivide en las eminencias gangliónicas medial, lateral y caudal (MGE, LGE y CGE), da origen a los ganglios basales y regiones límbicas asociadas, y también a las interneuronas inhibitorias que migran en forma tangencial hacia la corteza. La segregación espacial de los dominios proliferativos (rojo oscuro y azul oscuro) da lugar a programas de diferenciación diferentes establecidos por códigos combinatorios de FTs que permiten la generación de distintas poblaciones de subtipos de neuronas corticales inhibitorias y excitatorias. Nótese que los programas de diferenciación de distintos territorios se reprimen mutuamente. **B.** Se muestran varios de los reguladores transcripcionales clave que determinan los territorios telencefálicos dorsal y ventral mediante interacciones mutuamente represivas. PSB, límite palio-subpalio; LGE/MGE, eminencia gangliónica lateral/medial. Adaptado de MacDonald y cols. 2013.

un epitelio pseudoestratificado compuesto por células progenitoras neuronales multipotenciales capaces de generar cientos de tipos neuronales de distintas clases, además de oligodendrocitos y astrocitos, de acuerdo a coordenadas temporales y espaciales definidas (Guillemot, 2007). Durante la fase del desarrollo conocida como neurulación, la capa de células neuroectodermales se pliega y se cierra para formar el tubo neural, el cual crece y se expande en forma diferencial a lo largo de su extensión

dando origen a distintas vesículas que, a su vez, darán origen a distintos segmentos y estructuras del SNC (O'Leary y cols., 2007).

Particularmente, la corteza cerebral se origina a partir de la porción dorsal del procencéfalo anterior (telencéfalo), que es una estructura cerebral formada por la evaginación de los dos hemisferios cerebrales en el extremo rostral del tubo neural y que es circundante a los ventrículos laterales (Kandel y cols., 2000). A pesar de su enorme complejidad, el telencéfalo comienza -al igual que todas las estructuras del SNC- como una capa simple de células neuroepiteliales localizadas en la región más anterior del tubo neural. El elaborado proceso mediante el cual esta capa primordial de células multipotenciales progresa en la formación del cerebro maduro puede ser dividido en fases discretas que han sido extensivamente estudiadas en el ratón (Hébert y Fishell, 2008). Las fases iniciales involucran la asignación de identidad posicional en el eje antero-posterior del tubo neural en base a gradientes de moléculas de señalización extracelular (morfógenos) como SH (*Sonic Hedgehog*), FGF's (*Fibroblast Growth Factors*) y BMP's (*Bone Morphogenetic Proteins*) (Rallu y cols., 2002). Seguido a estas fases tempranas de *patterning* en que el primordio telencefálico ha sido especificado, el telencéfalo embrionario es subdividido en distintos territorios mediante la acción combinatoria de factores transcripcionales (FT) cuyos dominios de expresión emergen a partir de la identidad posicional impartida por gradientes de morfógenos como los ya mencionados (**Figura 1**) (Hébert y Fishell, 2008). Mediante la interacción de estos FTs, que suelen ser represivas, se terminan por definir dos grandes territorios de progenitores telencefálicos con identidades específicas: el territorio telencefálico dorsal (ó palio) y el territorio telecefálico ventral (subpalio). La identidad impartida sobre estos territorios de progenitores, es decir, la combinatoria de FTs que expresan, implica que sus células progenitoras se encuentran comprometidas con la generación de linajes celulares específicos y, por lo tanto, con la generación de estructuras cerebrales particulares. De esta forma el palio, desde su región anterior y lateral, dará origen primariamente a las neuronas de proyección (NP) excitatorias de la corteza, mientras que a partir de su región medial-dorsal, que incluye a la arquicorteza y el

cortical hem, se originarán las neuronas hipocampales, el plexo coroídeo y las células de Cajal-Retzius (CR). Por su parte, el subpallio, que se subdivide en las eminencias gangliónicas medial, lateral y caudal (MGE, LGE y CGE), dará origen a los ganglios basales y regiones límbicas asociadas, y también a interneuronas inhibitorias que migran hacia regiones dorsales en forma tangencial para posicionarse y contribuir a la conectividad en la corteza (MacDonald y cols., 2013) (Figura 1 y 2).

La capacidad sobresaliente de procesamiento de información que posee la corteza cerebral emerge a partir de la compleja organización de su estructura. En su dimensión radial la corteza madura está constituida por 6 capas histológicamente diferenciables. Cada capa cortical está compuesta por poblaciones de subtipos neuronales con características extremadamente diversas en términos de expresión génica, morfología y patrón de conectividad, lo cual genera distinciones funcionales notables entre subtipos neuronales y entre capas corticales (Molyneaux y cols. 2007; Leone y cols. 2008). Adicionalmente, en su dimensión tangencial, la corteza se organiza en áreas funcionales especializadas dedicadas al procesamiento e integración de distintas clases de información (sensitiva, motora, visual, etc). Estas especializaciones funcionales de las diferentes áreas corticales son consecuencia de una variedad de aspectos tales como citoarquitectura, patrones de aferencias y eferencias, y perfil de expresión génica (O'Leary y Nakagawa, 2002; Sur y Rubenstein, 2005; Rash y Grove, 2006). La comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan la emergencia de la estructura cortical con su extraordinaria diversidad fenotípica y funcional ha sido por muchos años un tema central para la neurobiología.

1.2.- Corticogénesis: de progenitores neurales a la corteza cerebral.

En términos básicos, la corteza cerebral está compuesta por dos clases generales de neuronas: NPs e interneuronas. Las NPs representan el grupo mayoritario de neuronas corticales y se originan a partir de células progenitoras localizadas en la región dorsal de los ventrículos laterales telencefálicos (O'Leary y Koester. 1993; Molyneaux y cols. 2007) (**Figura 2**). Las NPs se caracterizan por utilizar glutamato como neurotransmisor y por proyectar sus axones hacia blancos lejanos intra ó extracorticales (de ahí el nombre NP). Las interneuronas son generadas por células progenitoras localizadas en nichos proliferativos ventrales del cerebro (subpalio) y desde allí migran tangencialmente hacia la corteza (**Figura 2**). Este tipo neuronal se caracterizan por utilizar GABA como neurotransmisor y por establecer conectividad local con células corticales próximas (Wonders y Anderson. 2006). Aún cuando los atributos básicos mencionados permiten la clasificación de neuronas corticales dentro de estos dos grandes grupos, cada una de estas clases de neurona presenta una enorme diversidad fenotípica de subtipos neuronales diferenciables en términos de conectividad, morfología, localización laminar del soma, patrón de expresión génica y conducta electrofisiológica (Molyneaux y cols. 2007).

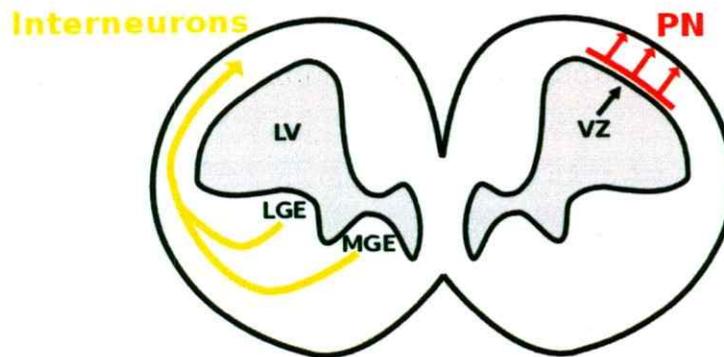


Figura 2. Origen de NPs e interneuronas en el desarrollo cortical. Diagrama esquemático de un corte coronal de un telencéfalo de ratón en desarrollo. Las NPs son generadas a partir de progenitores neurales localizados en la pared dorsal de los ventrículos laterales (LV). Las NP post-mitóticas migran radialmente desde la zona ventricular (VZ) hacia la corteza cerebral naciente (flechas rojas). Las interneuronas son generadas a partir de progenitores neurales ventrales localizados en las eminencias gangliónicas laterales (LGE) y mediales (MGE). Las interneuronas post-mitóticas migran tangencialmente hacia la corteza en desarrollo (flecha amarilla).

La corteza cerebral se origina a partir del delgado neuroepitelio que reviste la pared dorsal de los ventrículos laterales telencefálicos y que recibe el nombre de zona ventricular (VZ) (Figura 2)(Bayer y Altman, 1991). La totalidad de la población de subtipos de NPs se origina a partir de tres tipos generales de células progenitoras, identificables por sus propiedades proliferativas, estados de competencia y expresión génica: progenitores neuroepiteliales, glias radiales (RG) y progenitores intermedios (IP) (Gal y cols., 2006; Gotz y Huttner, 2005). Durante el desarrollo neocortical temprano, la VZ está compuesta solamente por progenitores neuroepiteliales multipotentes comprometidos con el linaje cortical (dorsal). Si bien este tipo de progenitor realiza mayoritariamente divisiones celulares simétricas que expanden su número, también llevan a cabo, aunque en menor proporción, divisiones asimétricas que dan lugar a las primeras neuronas post-mitóticas que formarán la preplaca (PP) (Chenn y McConnell, 1995; Gotz y Huttner, 2005; Smart, 1973). Conforme avanza la corticogénesis, los progenitores neuroepiteliales se diferencian en RG, que pasan a ser la población predominante de células progenitoras en la VZ. Las RG comparten con sus células de origen la expresión de algunos marcadores (ej. Nestina, RC2 y Pax6), la polaridad apico-basal y la multipotencialidad (Hartfuss y cols., 2001; Malatesta y cols., 2003). Una característica distintiva de este tipo de célula progenitora es que presentan un largo proceso que se extiende desde la pared ventricular hasta la superficie pial que tiene una función crucial en el proceso de migración radial de las neuronas post-mitóticas por actuar como guía y soporte en distintas fases del proceso (Rakic, 1972; Rakic, 2003). Varios estudios que indican que las RG pueden actuar como progenitores neuronales directos mediante divisiones asimétricas ó indirectamente a través de la producción de células progenitoras intermedias (IP), que más tarde se dividirán y generan NPs (Noctor y cols., 2004). Se ha identificado un segundo tipo de glia radial, la glia radial externa (oRG), que también posee un largo proceso basal que se extiende hasta la pia, sin embargo carece del proceso que apical característico de la RG. La oRG se identificó primero en la SVZ de la corteza en desarrollo de humanos, y hasta recientemente se pensaba que este tipo de célula está presente sólo en animales girencefálicos (Fietz y cols. 2010). Sin embargo, hace poco tiempo se encontró que

este tipo de célula también está presente en la corteza de roedores, aunque en un bajo número. La oRG lleva a cabo divisiones asimétricas para auto-regenerarse y, al mismo tiempo, producir NPs post-mitóticas (Wang y cols., 2011; Martínez-Cerdeño y cols., 2012). Recientemente se ha identificado un tipo de progenitor con características similares a la glia radial (expresión RC2 y GLAST) pero que poseen un proceso pial mucho más corto, razón por la cual han sido denominados SNP (*Short Neural Precursors*). La conducta y función de este tipo de progenitor no se ha establecido claramente (Gal y cols., 2006).

Los IP constituyen el tercer grupo principal de progenitores neocorticales, los cuales se diferencian a partir de las RG y migran hacia la región basal de la VZ para conformar la SVZ a partir de E13.5 como una capa histológicamente identificable (Götz y Huttner, 2005; Noctor y cols., 2004). A nivel molecular, los IP se distinguen de la RG por la expresión de TBR2, CUX2 y el transcrito *Svet1*. A diferencia de la RG, los IP no expresan PAX6 ni SOX2. La mayoría de las divisiones mitóticas que llevan a cabo los IP son simétricas neurogénicas, es decir, generan dos neuronas post-mitóticas hijas (Noctor y cols., 2004). Es por este motivo que se ha señalado que los IP representan una población de “amplificación” para la generación de NPs, luego de las divisiones asimétricas llevadas a cabo por las RG. Interesantemente, se ha señalado que el número de IP generados en el desarrollo cortical de distintas especies, sería determinante para el tamaño y superficie de la corteza (Lui y cols., 2011). De hecho, el tamaño de la SVZ y por tanto el número de IPs en el desarrollo cortical de primates es considerablemente mayor que en otros mamíferos (Lui y cols., 2011).

Las células progenitoras presentes en la VZ y SVZ generan los subtipos de NP residentes en las distintas capas de la corteza en un orden temporal precisamente controlado entre los días embrionarios E10.5 y E15.5 (E10.5-E15.5) en el ratón (Rakic 2006). Luego de la salida del ciclo mitótico, las NP post-mitóticas migran radialmente en dirección dorsal para posicionarse en la corteza naciente. Los procesos morfogénicos, fases y mecanismos moleculares que subyacen el proceso migratorio

de NP han sido extensivamente estudiados (Rakic, 1972 Noctor y cols., 2004). El primer grupo de NPs post-mitóticas que se genera (en E10.5) se posiciona por encima de la VZ y por debajo de la superficie pial para dar origen a la PP. Las neuronas post-mitóticas generadas subsecuentemente se acumulan dentro de la preplaca y comienzan a generar la placa cortical (CP), que dividirá a la preplaca en una capa superficial llamada zona marginal (MZ ó capa 1), y en una capa profunda llamada subplaca (SP) (**Figura 3**) (Bayer and Altman, 1991). La CP, que dará origen a la corteza con su naturaleza laminar distintiva, se forma secuencialmente a partir de olas migratorias radiales de NPs post-mitóticas mediante un mecanismo “de adentro-hacia afuera”, es decir, los grupos neuronales generados más tardíamente se posicionan superficialmente respecto a las neuronas generadas más tempranamente hasta formar todas las capas corticales correspondientes (**Figura 3**)(Angevine y Sidman, 1961; Rakic, 1974; Custo Creig y cols., 2013). De lo anterior se infiere que las NP dentro de una misma capa comparten el momento de salida del ciclo mitótico, aún cuando no necesariamente tienen el mismo fenotipo en términos de morfología, conectividad y expresión génica (McConnell y Kaznowski, 1991; Lai y cols., 2008).

1.3.- Tipos de NP presentes en la corteza cerebral y sus eferencias.

Como se ha mencionado anteriormente, dentro del amplio grupo de NP glutamatérgicas presentes en la corteza es posible identificar una amplia diversidad fenotípica de acuerdo a atributos como patrones de conectividad, localización laminar del soma, morfología dendrítica y expresión génica. Al respecto, las NPs pueden ser clasificadas en 2 grupos generales, de acuerdo a criterios hodológicos (proyecciones anatómicas) (Fame y cols., 2011; Lai y cols., 2008; MacDonald y cols., 2013) (**Figura 4**):

1) NPs corticofugales (NPCFu): proyectan sus axones hacia estructuras lejanas fuera de la corteza. Las NPCFu peden además ser subdivididas en:

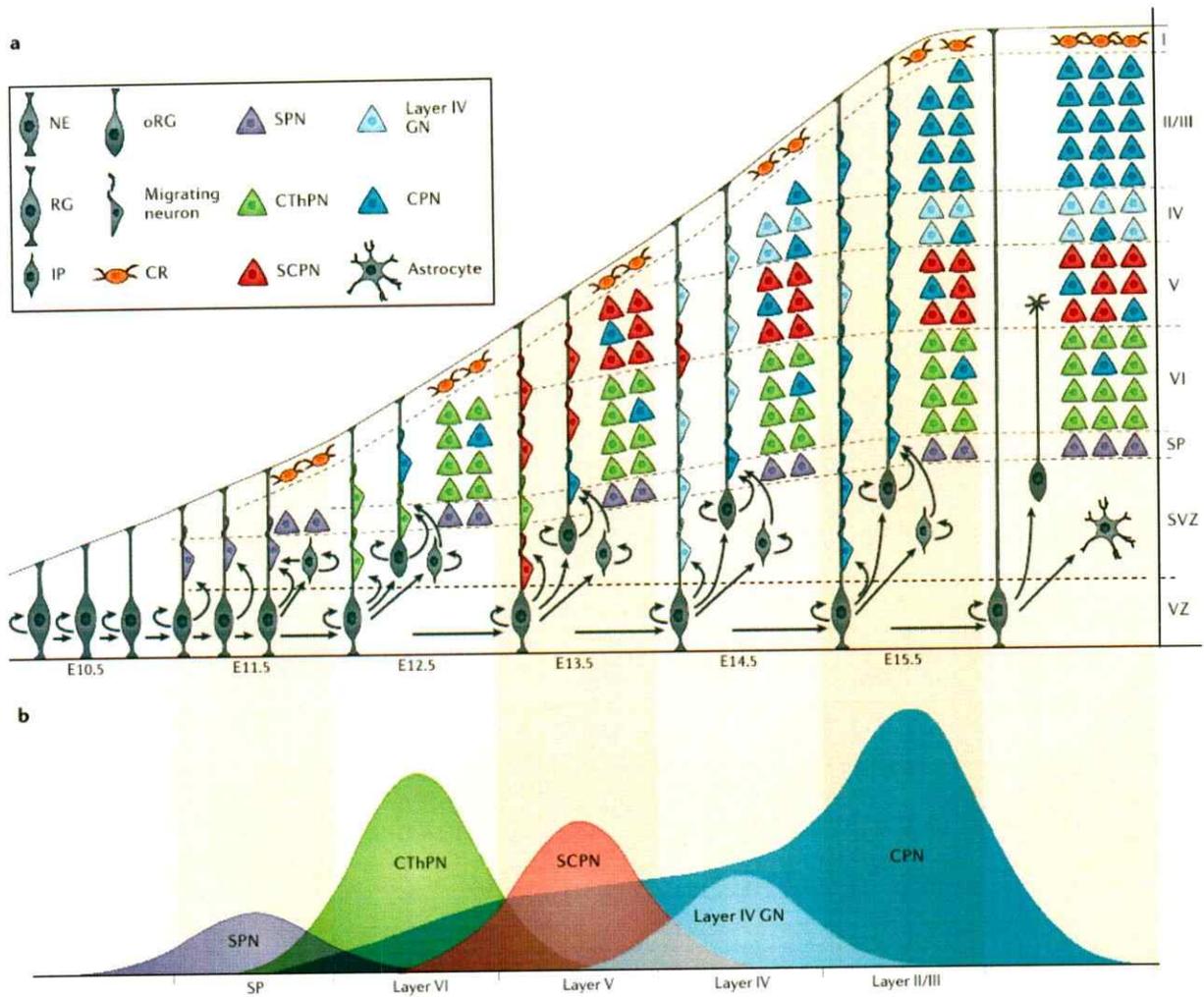


Figura 3. Representación esquemática de la formación “de adentro hacia afuera” de las láminas corticales y de la temporalidad de generación de subtipos de NP. A. Cada lamina cortical es formada por olas sucesivas de NP post-mitóticas. Las NP generadas tempranamente en el desarrollo se ubican en capas profundas de la corteza, mientras que las generadas tardíamente se localizan en capas superficiales de la corteza. Se indican los tipos de células progenitoras dan origen a la corteza, células de CR y células gliales. La población glial comienza a generarse tardíamente en el proceso de corticogénesis una vez que ha concluido la fase neurogénica (después de E15.5). NE: célula neuroepitelial, RG: glia radial, IP: progenitor intermedio, oRG: glia radial externa, CR: célula de Cajal-Retzius, SPN: neurona de la subplaca, CThPN: NP cortico-talámica, SCPN: NP subcerebral, GN: neurona granular, CPN: NP callosa. **B.** Las NP residentes en cada capa cortical son generadas en un orden temporal preciso. No obstante, existe cierto grado de superlapiamiento temporal en la generación de distintos subtipos de NP. Custo Creig y cols. 2013.

-NP subcortical: neuronas de la SP y neuronas de proyección corticotalámicas (NPCTh). Ambos tipos neuronales proyectan sus axones al tálamo.

-NP subcerebral (NPSC): proyectan sus axones caudalmente hacia el tectum, tronco encefálico y médula espinal, principalmente.

2) NP callosas (NPC): proyectan su axón primario hacia regiones homotópicas del hemisferio contralateral a través del cuerpo calloso (CC).

Estos distintos tipos de NP son generados en una secuencia temporal precisa y tienen localizaciones laminares definidas dentro de la corteza (**Figura 3**). Las NP's subcorticales y NPSC se ubican exclusivamente en capas profundas de la corteza (capas 5, 6 y SP), mientras que las NPC se encuentran distribuidas heterogéneamente entre las capas 2/3, 5 y 6, aunque se concentran en las capas superiores de la corteza (capas 2 y 3) (**Figura 3 y 4**)(Fame y cols. 2011).

Las NPCFu son generadas exclusivamente durante los primeros días de la corticogénesis. En la corteza murina, las neuronas generadas en E11.5 forman la capa más profunda de la corteza, la SP, y proyectan axones subcorticales pioneros hacia el tálamo a través de la cápsula interna, dando lugar al primer tracto corticofugal (**Figuras 3 y 4**)(Allendoerfer y Shatz, 1994; McConnell y cols., 1989). El tálamo también es el blanco de las proyecciones axonales de las NPCth, que son generadas alrededor de E12.5 y se posicionan en la capa 6 de la corteza (**Figuras 3 y 4**). Si bien las neuronas de la SP y las NPCth comparten el mismo blanco de proyecciones axonales, estos subtipos neuronales poseen funciones y destinos diferentes: las neuronas de la SP mueren post-natalmente en la mayoría de las especies, aunque se piensa que tienen roles instructivos en el establecimiento de la conectividad cortico-talámica y tálamo-cortical durante el desarrollo (Allendoerfer y Shatz, 1994; Deng y Elberger, 2003). Por su parte, las NPCth persisten durante toda la vida en la capa 6 de la corteza y establecen conexiones permanentes con núcleos talámicos (Lai y cols. 2008).

Las NPSC son generadas en E13.5, justo después de las NPs subcortical. Las NPSC se localizan exclusivamente en la capa 5 de la corteza (**Figuras 3 y 4**). Aunque todas las NPSC tienen una posición laminar común y son generadas dentro de la misma ventana temporal (E13.5), presentan una diversidad fenotípica considerable entre distintas áreas corticales (**Figura 4**). Por ejemplo, las NP cortico-espinales se localizan en el área sensori-motora y extienden su axón primario hacia la médula espinal estableciendo el tracto cortico-espinal (CST), con algunas ramas colaterales hacia el tálamo, núcleo estriado, núcleo rojo, protuberancia anular y tronco encefálico, mientras que las NP cortico-tectal se localizan en el área visual de la corteza y proyectan su axón primario hacia el colículo superior (tectum) (Arlotta y cols., 2005; Molyneaux y cols., 2007) (**Figura 4**).

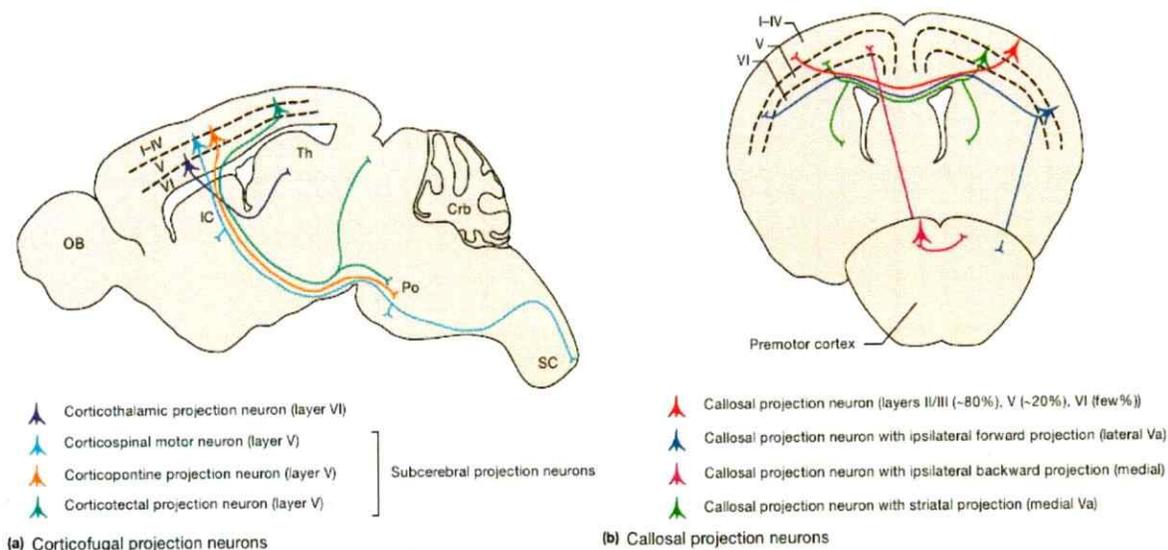


Figura 4. Clasificación hodológica de subtipos neuronales presentes en la corteza. A. Las NPCFu proyectan su axón hacia regiones extracorticales y se clasifican en: NPCTh y NPSC. NPCTh: NPs localizadas en la capa 6 de la corteza, que proyectan sus axones a diferentes núcleos talámicos (morado). NPSC: NPs localizadas en la capa 5. Se pueden identificar varios tipos con proyecciones hacia la médula espinal (celeste), protuberancia del tronco (naranja) y hacia el tectum (verde). Existe una amplia variedad de NPSC que proyectan a distintas regiones del tronco encefálico que no son mostradas por simplicidad. **B.** NPC: localizadas en virtualmente todas las capas corticales, presentando una densidad mayor en capas 2/3. Presentan una alta diversidad fenotípica con patrones de proyección complejos. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Fame y cols. 2011.

Inicialmente en el desarrollo cortical (E12.5-E13.5), una pequeña población de NPC son generadas al mismo tiempo y tienen la misma localización laminar que las NPCFu. Después de E14.5, la producción de NPCFu se detiene en forma definitiva para dar paso a la generación exclusiva y masiva NPC que poblarán las capas superficiales de la corteza (capas 2/3). Por lo tanto, en contraste con las NPCFu, las NPC son heterogéneas con respecto de su posición laminar y con respecto al momento en que son generadas, ya que se generan prácticamente durante todo el proceso corticogénico (E12.5-E15.5) (Guillemot y Macklis, 2007) (**Figuras 3**). Las NPC presentan una extraordinaria diversidad fenotípica, evidenciable por la alta variedad de patrones de proyección axonales con extensiones secundarias hacia distintas regiones corticales ó estructuras extracorticales (**Figura 4**). Además de las proyecciones interhemisféricas hacia regiones contralaterales homotópicas presentes en todas las NPC, se han descrito subpoblaciones de NPC que extienden proyecciones secundarias hacia el núcleo estriado ipsi y/ó contralateral, hacia regiones corticales frontales ipsi y/ó contralaterales ó caudalmente hacia regiones corticales somatosensoriales (Wilson, 1987; Cauller y cols., 1998; Mitchell y Macklis, 2005). Estas subpoblaciones de NPC con proyecciones duales de largo alcance se localizan principalmente en capas profundas de la corteza (Mitchell y Macklis, 2005). Por otra parte, las NPC ubicadas en capas superficiales participan en el establecimiento de circuitos locales en columnas corticales a través de sus proyecciones duales. Esta extensa variedad de patrones de conectividad observados en NPC da cuenta de la función integradora de información a nivel inter e intra hemisférico atribuida a esta población neuronal (Fame y cols., 2011).

Se ha planteado que las NPC son filogenéticamente más jóvenes que las NPCfu, apareciendo en mamíferos placentarios (Aboitiz y Montiel, 2003). La amplia distribución laminar de las NPC habla no solamente de su amplia ventana de generación durante la corticogénesis, sino que también sugiere una expansión evolutiva preferencial de esta población neuronal durante la expansión cortical que ha tenido lugar durante la evolución. La expansión evolutiva de las NPC se ha extremado en primates, motivo por el cual se ha sugerido que la emergencia de esta población

neuronal, concomitantemente con la ganancia en complejidad de conectoma cortical que implicó su aparición, han jugado un rol crucial en el desarrollo capacidades cognitivas de alto nivel observadas en este tipo de animal (Fame y cols., 2011).

1.4.- Control molecular de la especificación y desarrollo de subtipos de neuronas de proyección.

1.4.1.- Especificación de subtipos de NP a nivel de células progenitoras.

Como población general, los progenitores neuronales corticales poseen la competencia para producir la extraordinaria diversidad fenotípica de la corteza cerebral mediante la generación de distintas clases de NP en olas neurogénicas secuenciales, con lo cual se establece una estrecha correlación entre la identidad laminar y momento de nacimiento de la neurona post-mitótica (**Figura 3**). Sin embargo, los mecanismos moleculares que operan a nivel de células progenitoras y que son responsables de la generación del amplio repertorio fenotípico y del orden fijo de generación de distintos subtipos de NPs, son pobremente conocidos (Custo Creig, 2013).

Mediante estudios de rastreo del linaje de progenitores corticales, se han identificado NP post-mitóticas clonalmente relacionadas dispersas en distintas capas corticales, indicando que una célula progenitora determinada puede dar origen a varios destinos laminares (Luksin y cols., 1988; Walsh y Cepko, 1988; Parnavelas y cols., 1991). Estos datos llevaron a sugerir la existencia de un mecanismo de especificación temporal progresiva que intruye a las células progenitoras en forma sucesiva para la generación de diferentes subtipos de NPs. Consistentemente con este modelo, se encontró en una elegante serie de experimentos que progenitores corticales aislados desde cortezas en fases tempranas del desarrollo y que son transplantado en cortezas en fases más tardías del desarrollo son capaces de generar NPs de todas las capas corticales. Por el contrario, progenitores asilados de cortezas tardías y transplantados en corteza tempranas sólo son capaces de generar NPs de capas superficiales y no de

capas profundas (Frantz y McConnell, 1996; Desai y McConnell, 2000). Estos datos sugirieron que los progenitores neurales son progresivamente restringidos en su potencial de diferenciación conforme avanza el desarrollo.

A pesar de que se han descubierto genes que identifican a las células progenitoras como poblaciones generales comprometidas con el linaje neocortical (dorsal) (ej: Pax6, Tbr2 y Sox6), no se han identificado reguladores (extrínsecos o intrínsecos) que controlen la especificación temporal de diferentes subtipos de NP. De manera interesante, se ha encontrado que progenitores aislados *in vitro* desde cortezas en fases tempranas del desarrollo replican la secuencia de división y especificación observada *in vivo*, lo cual es sugerente de que existen ciertos mecanismos intrínsecos que operan en la especificación progresiva de las células progenitoras (Shen y cols., 2006). Interesantemente, en estudios recientes se ha documentado la existencia de poblaciones de progenitores comprometidos desde fases tempranas del desarrollo con la generación de subtipos neuronales particulares. Las primeras evidencias en esa línea provienen de la observación de que algunas células progenitoras expresan tempranamente en el desarrollo ciertos FTs que luego son expresados en subtipos de NPs particulares. Por ejemplo, se observa que *Fezf2* se expresa en algunos progenitores en la VZ durante la fase de generación de NPs de capas profundas (E12.5-E13.5) y luego se expresa post-mitóticamente en NPCFu (Inoue y cols., 2004; Arlotta y cols., 2005; Molyneaux y cols., 2005). Adicionalmente, se ha observado la expresión de CUX2 en progenitores de la SVZ y algunos de la VZ durante la fase de generación de NP de capas superiores, para luego identificar la expresión de la proteína en NPC de capas superiores de la corteza (Nieto y cols., 2004; Zimmer y cols., 2005; Molyneaux y cols., 2009). Esta evidencia ha permitido sugerir que las NP de capas superiores son generadas principalmente por progenitores de la SVZ, a diferencia de las NPCFu que son generadas principalmente por progenitores de la VZ (Molyneaux y cols., 2007; Zimmer y cols., 2004; Aboitiz y Montiel, 2003; Tarabykin y cols., 2001; Desai y McConnell 2000; McConnell y Kaznowski, 1991). La evidencia directa de la existencia de progenitores comprometidos con linajes particulares de NPs

proviene de experimentos en que se realizó marcaje genético de progenitores que expresan CUX2 muy temprano en el desarrollo que posteriormente dan origen exclusivamente a NPC de capas superiores (Franco y cols., 2012). Queda abierta la interrogante sobre la existencia de otras poblaciones de progenitores comprometidos con linajes de NP particulares. No obstante, la existencia de progenitores comprometidos tempranamente con linajes específicos no permite descartar la existencia de otras poblaciones de progenitores multipotentes que generan en forma secuencial distintas clases de su subtipos de NP's (Creig y cols., 2013).

1.4.2.- Especificación post-mitótica de subtipos de NP.

Si bien los estudios acerca de los mecanismos de especificación de subtipos de NP a nivel de células progenitoras representan un punto importante para entender el origen de la diversidad celular en la corteza, no explican cómo las características fenotípicas finales son implementadas en neuronas post-mitóticas en términos de identidad laminar y patrones de conectividad. Se ha establecido que la función de determinantes post-mitóticos que operan en distintos subtipos de NPs son lo que terminan por definir e implementar en forma precisa la identidad fenotípica dictaminada previamente a nivel de la célula progenitora (Creig y cols., 2013). Por ejemplo, las NPCFu de capas profundas de la corteza -NPSC y NPCth- presentan patrones de proyección axonal completamente diferentes cuando han alcanzado su estado maduro, sin embargo estas diferencias comienzan a emerger luego de un proceso de refinamiento post-mitótico que toma varios días. De hecho, los axones corticofugales de estas poblaciones neuronales viajan juntos durante varios días antes de que sus trayectorias definitivas comiencen a diferenciarse (Molnar y Cordery., 1999). Un paso crítico para avanzar en la comprensión de los mecanismos que gobiernan la especificación y diferenciación post-mitótica de las distintas clases de NP ha dependido de la identificación y caracterización funcional de genes que presentan expresión post-mitótica acotada a subtipos de NP particulares. El marcaje retrogrado de subtipos de NP mediante la inyección de trazadores en las rutas anatómicas de sus proyecciones

axonales, seguido de FACS (*fluorescence activated cell sorting*) y comparación del transcriptoma de las poblaciones de NP purificadas mediante microarreglos, ha permitido identificar genes que se expresan específicamente en cierto tipos de NP (Arlotta y cols., 2005). Mediante el estudio de la función de estos genes, se ha encontrado que la especificación de las tres clases principales de NPs presentes en la corteza, de acuerdo a la clasificación hodológica (NPC, NPSC y NPCTh), parece ser regulada por una compleja red de interacciones en la que los FTs FEZF2, SATB2, CTIP2 y TBR1 juegan un rol central (**Figura 5**) (Srinivasan y cols., 2012; Britanova y cols., 2008; Alcamo y cols., 2008; Han y cols., 2011, Chen y cols. 2008). Se ha encontrado que la determinación de identidades laminares específicas es dependiente de complejos códigos combinatorios establecidos, al menos en parte, por estos FTs (Srinivasan y cols., 2012).

Las NPSC y las NPCTh son subtipos neuronales estrechamente relacionados que residen en capas profundas de la corteza (capas 5 y 6, respectivamente) y que son generados secuencialmente durante fases tempranas de la corticogénesis (Lai y cols., 2008). Se ha reportado que TBR1 juega un rol importante en el establecimiento de las características diferenciales de las poblaciones de NPCFu (**Figura 5B**) (Hevner y cols., 2001, McKenna y cols., 2011, Bedogni y cols., 2012). TBR1 presenta altos niveles de expresión en células de la SP y en las NPCTh de la capa 6 y bajos niveles de expresión en neuronas de la capa 5. La función de TBR1 es esencial para la especificación de las NPCTh y para el desarrollo de las proyecciones axonales hacia el tálamo por parte de esta población celular (Han y cols. 2011; McKenna y cols. 2011).

El FT FEZF2 es crucial para la especificación de las NPSC y para el desarrollo de las proyecciones axonales hacia el tronco encefálico y la médula espinal (tracto cortico-espinal, CST) que caracterizan a estas células. FEZF2 presenta altos niveles de expresión en NPSC, como consecuencia de la regulación transcripcional positiva por SOX4 y SOX11 (Shim y cols., 2011), al tiempo que presenta bajos niveles de expresión en NPCTh y neuronas de la SP (Inoue y cols., 2004). Mediante estudios de ratones KO

(*knock-out*) se ha evidenciado que FEZF2 es crucial para la especificación de NPSC, puesto que en estos mutantes la expresión de genes que definen a la capa 5 desaparece (ej. CTIP2), al igual que las proyecciones axonales hacia el tronco encefálico y la médula espinal (Molyneaux y cols, 2005; Chen y cols, 2005).

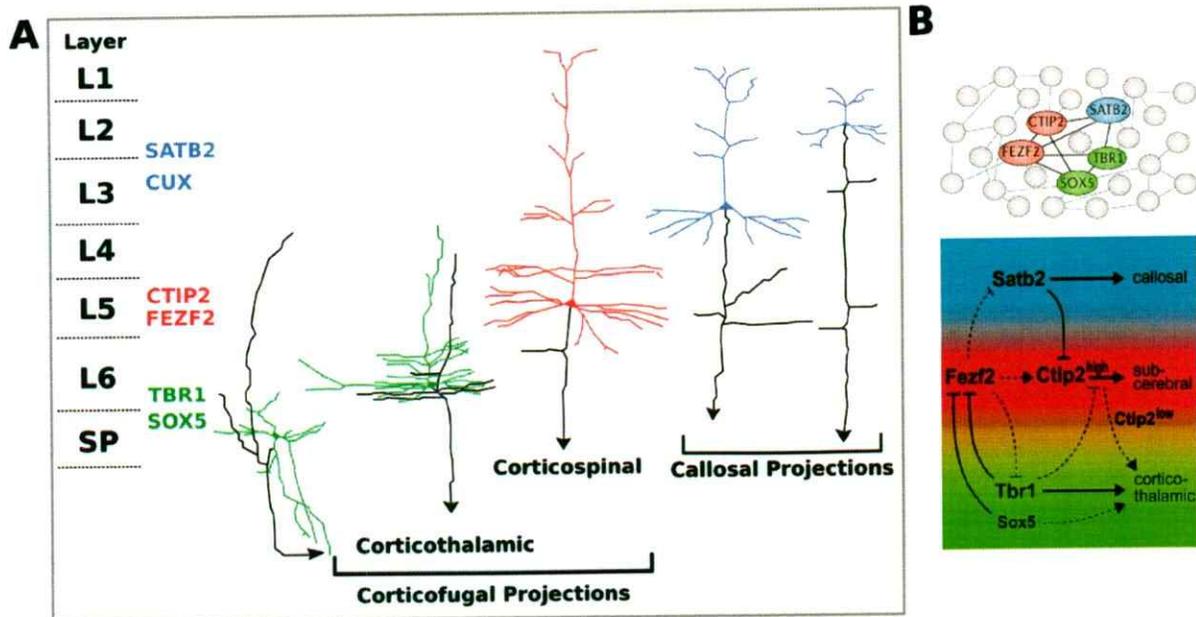


Figura 5. Control molecular de la especificación de distintos subtipos de NP. **A.** Esquema simplificado que describe la organización laminar de la corteza. Se señala la posición laminar, el patrón de proyecciones axonales y algunos FTs expresados por distintos subtipos de NP. Las NP corticofugal (verdes y rojas) residen exclusivamente en las capas 5 y 6 de la corteza, mientras que aquellas que proyectan sus axones dentro de la corteza (azules) residen principalmente en las capas superiores de la corteza, aunque un pequeño número de ellas se localiza en las capas 5 y 6. Nótese que cada subtipo neuronal expresa una combinación específica de FTs. **B. arriba.** Controladores moleculares conocidos en la generación de subtipos de NP que forman nodos clave dentro de una elaborada red transcripcional escasamente conocida. **Abajo.** Relaciones regulatorias entre controladores moleculares que definen la generación de distintas clases de NPs. Las flechas continuas señalan regulaciones positivas. La flecha punteada entre FEZF2 y CTIP2 señala una regulación positiva indirecta. Las líneas terminadas en barra indican inhibición directa. Las líneas punteadas terminadas en una barra que van de FEZF2 a SATB2, FEZF2 a TBR1, y de TBR1 a CTIP2, indican inhibiciones pero no necesariamente directas. Las flechas punteadas que van de SOX5 y de CTIP2^{low} indican que aquellos FTs son importantes en el desarrollo de axones cortico-talámicos. CTIP2^{high} y CTIP2^{low}, indican nivel alto (en capa 5) y bajo (en capa 6) de expresión, respectivamente. Esquema en A, modificado de Gaspard y Vanderhaeghen (2011). Esquemas en B fueron extraídos de Creig y cols. (2013) (arriba) y de McKenna y cols. (2011) (abajo).

El FT CTIP2 es el principal efector río abajo de FEZF2 en el control de la diferenciación apropiada de las NPSC (**Figura 5B**)(Chen y cols., 2008). De hecho los defectos en la proyecciones axonales hacia el tronco y médula espinal observado en ratones *Fezf2*^{-/-} se rescatan completamente al re-exresar CTIP2 en el sistema (Chen y cols., 2008). CTIP2 presenta altos niveles de expresión post-mitótica en NPSC, mientras que presenta bajos niveles de expresión en NPs de la capa 6. En ausencia de CTIP2, las NPSC son generadas y posicionadas correctamente en la corteza, sin embargo muestran defectos notables en la fasciculación, crecimiento y guía axonal, de manera que las proyecciones axonales no alcanzan a extenderse hasta el tronco encefálico ni la médula espinal porque pierden su ruta normal desfasciculándose a nivel del cerebro medio (el manojó axonal pierde integridad, dispersándose en varias direcciones) (Arlotta y cols., 2005). Aparentemente, la regulación de la expresión CTIP2 es un punto crucial para el desarrollo de las NP corticales, puesto que reguladores transcripcionales que controlan el desarrollo de otros subtipos de NPs (NPC ó NPCTh) operan, al menos en parte, mediante la inhibición de la expresión de CTIP2 (Alcamo y cols., 2008; Britanova y cols., 2008; Lai y cols., 2008) (**Figura 5B**).

Se ha establecido que TBR1 y el eje FEZF2-CTIP2 juegan roles antagónicos importantes en la especificación de las NPCFu (Mckenna y cols., 2011; Han y cols., 2011) (**Figura 5B**). FEZF2 promueve la especificación de NPSC, en parte por la inhibición de TBR1 en la capa 5. En animales KO para FEZF2, la expresión de TBR1 se expande hacia NPs de la capa 5 instruyéndolas en la proyección de axones hacia el tálamo, sugiriendo que los altos niveles de expresión de FEZF2 observados en la capa 5 juegan un rol inhibitorio sobre la expresión de TBR1 (Molyneaux y cols., 2005; Chen y cols., 2005). Por el contrario, en animales KO para TBR1 se ha observado que NPs de la capa 6 adquieren altos niveles de expresión de FEZF2 y extienden aberrantemente sus axones hacia blancos subcerebrales (Han y cols., 2011; Mckenna y cols., 2011). Se ha determinado que TBR1 ejerce represión transcripcional directa sobre *Fezf2* mediante su unión a elementos regulatorios conservados en el gen *Fezf2* inhibiendo así su expresión en NPs de la capa 6 (Han y cols., 2011; Mckenna y cols., 2011).

El factor transcripcional SOX5 controla la generación ordenada de NPCFu mediante la restricción de la expresión de genes que definen el fenotipo de las NPSC (FEZF2-CTIP2) hasta el momento en que la generación de las neuronas de la SP y las NPCTh se ha completado (Lai y cols. 2008). En ausencia de SOX5, se generan prematuramente NPSC en desmedro de NPCTh y neuronas de la subplaca. Consistentemente con lo anterior, se ha descrito que los altos niveles de expresión de SOX5 en la capa 6 reprimen directamente la expresión de FEZF2 mediante su unión a elementos regulatorios de dicho gen (**Figura 5B**)(Shim y cols., 2011).

De manera interesante, igualmente se han observado relaciones regulatorias antagónicas entre los programas transcripcionales que definen NPC *versus* NPCFu (Alcamo y cols., 2008; Britanova y cols., 2008; Chen y cols., 2008). FEZF2 promueve la especificación de NPSC, en parte, por la represión de SATB2 (Chen y cols. 2008). Por su parte, SATB2 corresponde a un FT que promueve la identidad de NPC como población general a través de la represión de la identidad subcerebral mediante inhibición transcripcional directa de CTIP2 (Alcamo y cols., 2008; Britanova y cols. 2008) (**Figura 5B**). No obstante, los mecanismos que especifican las distintas subclases de NPC son pobremente conocidos. Hasta el momento se ha observado que diferentes clases de NPC con localizaciones laminares distintas presentan complejos patrones de expresión génica, sin embargo se ha avanzado poco en entender el entramado regulatorio que define la diversidad de NPC (Fame y cols., 2011)

En síntesis, el desarrollo de las distintas clases de NP corticales depende de códigos combinatorios de FTs que se establecen post-mitóticamente. Las complejas relaciones regulatorias entre programas transcripcionales que definen los distintos subtipos de NPs corticales, sólo recientemente se han comenzando a comprender. La identificación y caracterización funcional de nuevos actores moleculares que forman parte del proceso de especificación y diferenciación de subtipos de NP corticales, así como las relaciones genéticas que pudieran tener con los actores moleculares ya identificados, son pasos clave para entender el origen de la diversidad fenotípica en la

corteza cerebral (Figura 5B).

1.5.- Identificación de CTIP1 como potencial regulador de la identidad de subtipos neuronales.

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos que controlan la generación de diversidad de NPs en la corteza, variados aspectos del control transcripcional no han sido dilucidados. Con el objetivo de dilucidar estos aspectos, utilizamos una estrategia basada en la conservación evolutiva de los mecanismos transcripcionales utilizados durante el desarrollo del sistema nervioso de distintas especies con el objetivo de identificar reguladores transcripcionales relevantes en el desarrollo cortical. Se realizó un rastreo genético de ganancia de función en *Drosophila* para buscar genes involucrados en el control del desarrollo neuronal (Oliva y Sierralta, 2010) para luego investigar los patrones de expresión de sus genes ortólogos en el sistema nervioso central de mamíferos. De esta manera identificamos el gen de *Drosophila* CG9650, cuyo ortólogo en mamíferos codifica para el FT CTIP1.

CTIP1 (también llamado BCL11a - B cell lymphoma 11a - ó Evi9 - Ecotropic viral integration site 9) es un factor transcripcional con motivos estructurales dedos de zinc C_2H_2 que fue identificado en ratón junto a su parólogo, CTIP2, como interactores bioquímicos de 3 FTs llamados COUP-TFI, II y III (Avram y cols., 2000), los cuales pertenecen a una subfamilia de receptores nucleares huérfanos muy conservados evolutivamente (Pereira y cols., 2000) con funciones importantes reportadas en el desarrollo del sistema nervioso de *Xenopus* (Van der Wees y cols., 1996), *Drosophila* (Mlodzik y cols., 1990) y ratón (Qiu y cols., 1997). En experimentos *in vitro* se ha determinado que CTIP1 actúa como un co-represor de COUP-TFII potenciando su actividad represora mediante un mecanismo independiente de tricostatina A (TSA), lo que sugiere que la acción represora de CTIP1 involucra algún mecanismo no asociado a la función de histonas deacetilasas clase I y II (Avram y cols., 2000). Más tarde se reportó que CTIP1 puede actuar directamente como un represor transcripcional en

forma independiente de los FT's COUP-TF mediante su unión directa al DNA a través de elementos ricos en GC, nuevamente de forma insensible a TSA (Avram y cols., 2002). Senawong y cols. (2005) determinó que CTIP1, al igual que su parólogo CTIP2, reprime la expresión de genes reporteros mediante un mecanismo dependiente de SIRT1, una histona deacetilasa clase III sensible a NAD⁺, lo que sugiere que los mecanismos de represión transcripcional mediados por CTIP1 se asocian a cambios en el estado de organización de la cromatina. Recientemente se determinó que SIRT1 se expresa abundantemente en progenitores neocorticales de la VZ y que regula positivamente la diferenciación neuronal (Hisahara y cols., 2008).

En estudios que conciernen a la estructura del gen *Ctip1* se ha encontrado que debido a *splicing* alternativo del mRNA y/o uso de un promotor interno éste gen puede dar origen a tres péptidos diferentes en roedores: CTIP1 (BCL11a-L [Long] ó Evi9a), CTIP1-S (BCL11a-S [Short] ó Evi9c) y Evi9b (Kuo y Hsueh, 2007; Nakamura y cols., 2000; Satterwhite y cols., 2001). Los patrones de expresión de las distintas isoformas son complejos en distintos tejidos por lo que no han sido caracterizados en forma completa (Kuo y Hsueh, 2007), sin embargo se ha encontrado que las isoformas CTIP1 y CTIP1-S se expresan abundantemente en el cerebro de roedores (Kuo y Hsueh, 2007). Mediante estudios de transfección de estas isoformas en células COS-7 se ha detectado que presentan distribuciones subcelulares diferenciales, observándose que la isoforma CTIP1 presenta una distribución esencialmente nuclear con un patrón punteado dentro del organelo, mientras que CTIP1-S presenta una distribución difusa tanto en el núcleo como en el citoplasma (Nakamura y cols., 2000). La isoforma CTIP1 contiene 4 dedos de zinc en su estructura, siendo esenciales los dos dedos de zinc ubicados hacia el C-terminal para el reconocimiento de su elemento de respuesta en el DNA (Avram y cols., 2002), mientras que la función de los otros dos dedos de zinc N-terminales no es clara. Puesto que los dedos de zinc C-terminales no están presentes en la isoforma CTIP1S, se ha sugerido que esta isoforma no es capaz de interactuar con el DNA. La región comprendida entre los aminoácidos 194 a 378 de CTIP1 está involucrada en las interacciones bioquímicas con las proteínas COUP-TF y SIRT1

(Avram y cols., 2000; Senawong y cols., 2005). Sin embargo, esta región no está presente en la isoforma CTIP1S por lo que se espera que no presente tales interacciones bioquímicas. Existen datos que indican que la función transcripcional de CTIP1 depende de la formación de homodímeros mediante la interacción entre las regiones comprendidas entre los aminoácidos 1 a 171 y 171 a 434. Puesto que los primeros 210 aminoácidos de la isoforma CTIP1S son idénticos a los de CTIP1, es posible la formación heterodímeros entre ambas isoformas impidiéndose la formación de homodímeros de CTIP1 y, consecuentemente, la inhibición de su función transcripcional (Avram y cols., 2002). Esto podría proporcionar sentido funcional a la distribución diferencial de ambas isoformas en el cerebro de rata. Se ha demostrado además que la distribución de ambas isoformas está sujeta a cambios en distintas etapas del desarrollo (Kuo y Hsueh, 2007).

Se ha reportado que CTIP1 es expresado en tejido hematopoyético, sistema nervioso en desarrollo y cerebro adulto de roedores (Saiki y cols., 2000; Satterwhite y cols., 2001; Nakamura y cols., 2007). Particularmente en el sistema nervioso, se ha encontrado mediante análisis por western-blot (WB), hibridación *in situ* e inmunohistoquímica que CTIP1 presenta una expresión robusta en corteza, hipocampo, núcleo estriado, cerebelo y región dorsal de la médula espinal (Leid y cols., 2004; Kuo y Hsueh, 2007; John y cols., 2012). Se conoce muy poco respecto de la función de CTIP1 en el contexto del sistema nervioso. Sólo recientemente se ha reportado que CTIP1 controla la diferenciación de neuronas sensitivas de la médula espinal dorsal contribuyendo al desarrollo de circuitos sensoriales espinales (John y cols., 2012). Adicionalmente, se ha reportado que CTIP1 participa en la morfogénesis de neuronas hipocampales en cultivo (Kuo y cols., 2009). Por el contrario, se han realizados variados estudios orientados a conocer la función de CTIP1 en tejidos hematopoyéticos debido a que desregulaciones en su expresión causadas por integraciones retrovirales en el genoma de ratón se asocian al desarrollo de leucemia mieloide, lo cual ha categorizado al locus de CTIP1 como un proto-oncogen (Nakamura y cols., 1996). Adicionalmente se demostró interacción directa entre CTIP1 y BCL6, un proto-oncogen

asociado al desarrollo de leucemias (Nakamura y cols., 2000). Asimismo, se ha identificado al ortólogo humano de CTIP1 como un locus sujeto a eventos de translocación cromosómica asociados a ciertos tipos de leucemias (Satterwhite y cols., 2001), sugiriendo una asociación directa entre CTIP1 y malignidades sanguíneas.

Con el fin de esclarecer la función de CTIP1 en tejido hematopoyético, se generaron ratones KO para el gen observándose letalidad neonatal por causas desconocidas. Se detectó que estos animales presentan claras deficiencias en el desarrollo de poblaciones linfocitarias tipo B y varios tipos de linfocitos T, concluyéndose que CTIP1 es un factor transcripcional clave en los programas genéticos involucrados en la diferenciación de linfocitos (Liu y cols., 2003).

La identificación de *Ctip1* como consecuencia del rastreo genético realizado en *Drosophila*, los datos de expresión del gen en corteza existentes hasta el momento y la inexistencia de estudios funcionales del gen en el desarrollo cortical, nos motivaron a estudiar la función de CTIP1 como un potencial regulador del desarrollo de la corteza cerebral. Mediante el uso de un anticuerpo comercial que sólo detecta la isoforma larga de CTIP1 se determinó el patrón de expresión de la proteína en la corteza en desarrollo de ratón. Consistentemente con datos publicados anteriormente, encontramos mediante inmunohistoquímica que CTIP1 presenta expresión nuclear y es abundantemente expresado en el telencéfalo post-natal de ratón (Kuo and Hsueh, 2007), presentando altos niveles de expresión en la corteza cerebral e hipocampo (**Figura 6**). Con el objeto de estudiar cambios temporales en la abundancia de CTIP1 en la corteza, se analizaron mediante WB extractos de ese tejido obtenidos en distintos estadios del desarrollo, observándose que CTIP1 presenta una expresión robusta en la corteza entre E14.5 y E17.5, período coincidente con el peak neurogénico cortical. A partir del día post-natal 3 (P3) se observa una disminución clara y progresiva en la expresión de CTIP1, en relación a los estadios previos analizados (**Figura 7A**). En las edades embrionarias analizadas se observaron algunas bandas con un peso mayor al esperado para CTIP1. Previamente se reportó que CTIP1 es intensamente sumoylado,

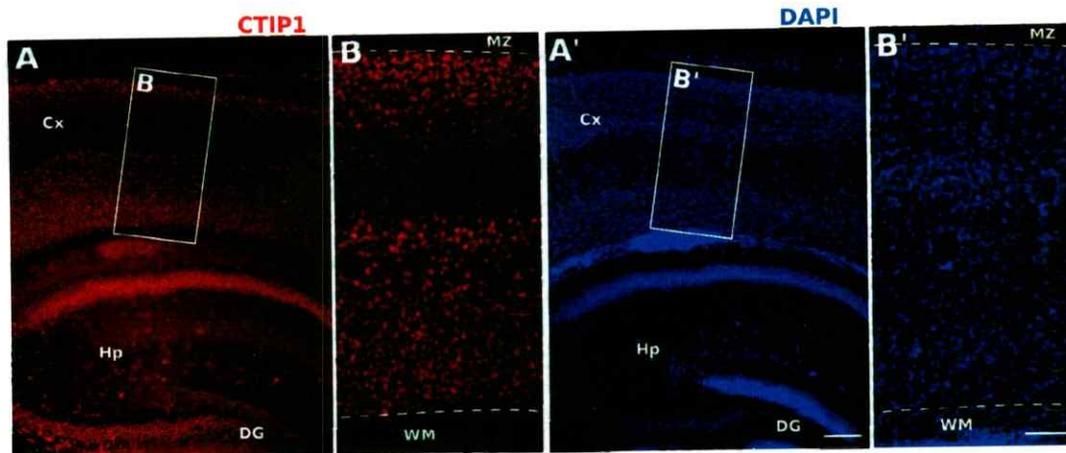


Figura 6. CTIP1 es expresado abundantemente en la corteza post-natal e hipocampo. A y A'. Fotos de baja magnificación mostrando una sección coronal de un cerebro P15. **B y B'** magnificación de las áreas encerradas por los cuadros blancos en A y A'. Cx: corteza, Hp: hipocampo, MZ: Zona marginal, WM (materia blanca), DG (giro dentado). Barras de escala: 200µm.

observándose un patrón de bandas similar al observado aquí (**Figura 7A**). Sin embargo, no se ha esclarecido la significancia funcional de esta modificación post-traducciona (Kuwata y Nakamura, 2008). Con el objetivo de analizar la distribución espacial de CTIP1 en función del tiempo, se realizaron inmunotinciones contra CTIP1 en cortes coronales de cerebros en distintos estadios del desarrollo cortical. En cerebros E15.5 y E17.5 se observó que CTIP1 presenta una distribución homogénea a través de todo el espesor de la capa cortical (**Figura 7C**). Sorprendentemente, a partir de P0 se observó una distribución diferencial de CTIP1 en la corteza (**Figura 7C y 8**). Este patrón de distribución diferencial se hizo más evidente en P3 y se mantuvo en las edades posteriores analizadas (**Figuras 7C y 8**). La comparación del patrón de expresión cortical de CTIP1 con el de NeuN, un marcador pan-neuronal que presenta una expresión ubicua en neuronas corticales, deja en clara evidencia las diferencias en los niveles de expresión de CTIP1 en distintas capas corticales (**Figura 8A**). Interesantemente, en un reporte previo en que se analiza la expresión de CTIP1 en el cerebro de rata mediante la utilización de un anticuerpo distinto al utilizado en nuestros análisis, se observa un patrón de expresión cortical equivalente al reportado en este estudio confirmando un enriquecimiento en la expresión de CTIP1 en las capas 2-3 y 5,

una expresión moderada en la capa 6 y casi nula en la capa 4 (Figura 8A y B) (Kuo y Hsueh 2007).

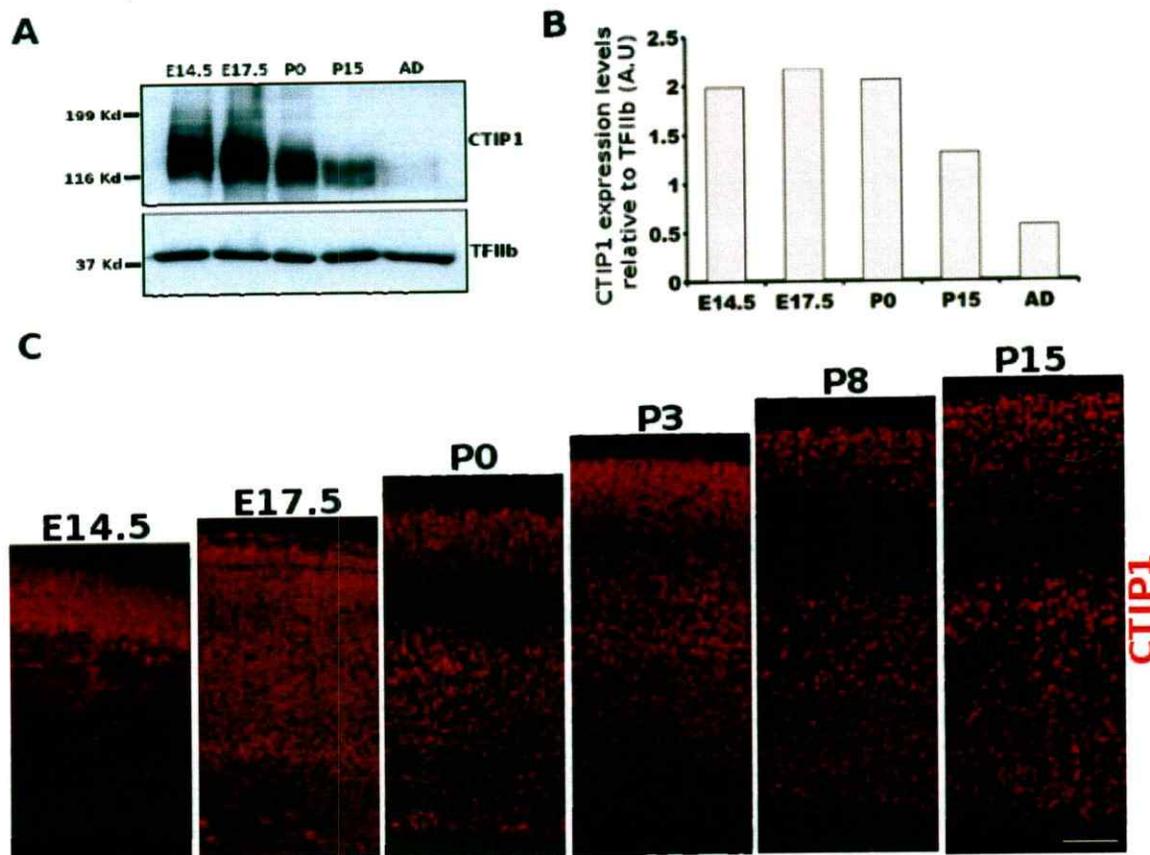


Figura 7. Análisis del patrón de expresión de CTIP1 durante el desarrollo cortical embrionario y post-natal. A. Análisis por Western-blot de la abundancia de CTIP1 en la corteza cerebral en estadios embrionarios y post-natales. **B.** Cuantificación densitométrica de la banda de CTIP1 relativa a TFII- β en las diferentes edades analizadas. **C.** Análisis por inmunofluorescencia del patrón de expresión de CTIP1 en la corteza cerebral en diferentes edades embrionarias y post-natales. Nótese los niveles diferenciales de expresión de CTIP1 en las distintas capas corticales a partir de P0 en adelante. Barra de escala: 100 μ m.

En conjunto, estos datos indican que el patrón de expresión espacial de CTIP1 presenta un comportamiento dinámico durante el desarrollo de la corteza, transitando desde un patrón de expresión homogéneo en la corteza embrionaria hacia un patrón de expresión diferencial en la dimensión radial de la corteza post-natal con un claro enriquecimiento en las capas 2-3 y 5.

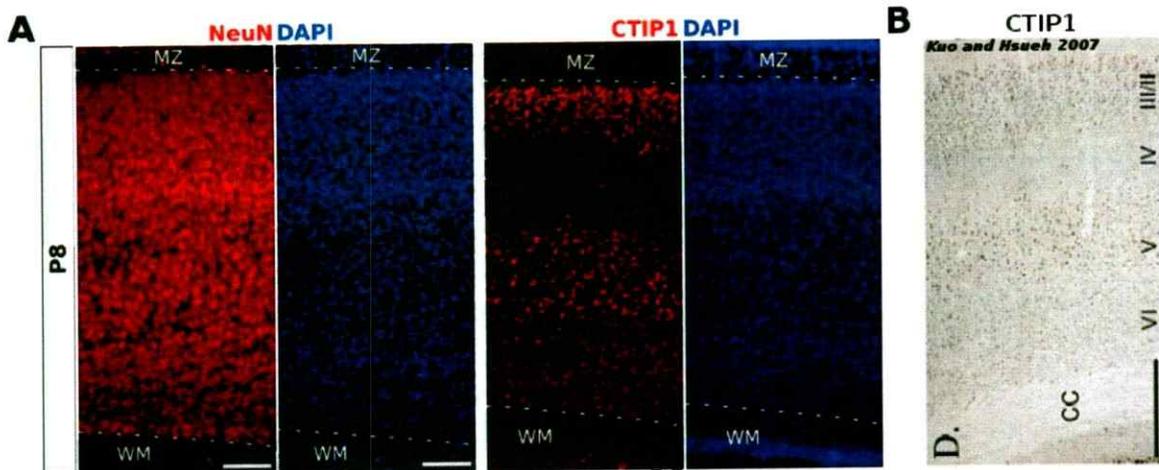


Figura 8. CTIP1 es expresado diferencialmente en distintas capas corticales en la corteza post-natal. **A.** Secciones coronales representativas de una corteza P8. Se compara la expresión del marcador pan-neuronal NeuN con la expresión de CTIP1. Nótese que NeuN es expresado ubicuamente en todo el espesor cortical, no así CTIP1, que presenta una expresión diferencial en la corteza con enriquecimiento en las capas 2-3 y 5. **B.** Sección coronal representativa de un cerebro de rata en donde se analiza la expresión de CTIP1. El patrón de expresión de CTIP1 es consistente con el reportado por nosotros. Imagen extraída de Kuo and Hsueh (2007). Barras de escala: 100µm (A); 500µm(B).

La expresión diferencial de CTIP1 en distintas capas de la corteza representa un punto interesante a considerar puesto que la función de genes con expresión laminar y/o restringida a ciertas clases de NP en la corteza (como es el caso de SATB2, FEZF2, CTIP2 y TBR1) se ha asociado a la especificación de subtipos de NP corticales (Srinivasan y cols., 2012; Britanova y cols., 2008; Alcamo y cols., 2008; Han y cols. 2011, Chen y cols. 2008). Adicionalmente, dada la existencia de datos previos que indican que CTIP1 está involucrado en programas de diferenciación celular de linajes específicos de linfocitos (Liu y cols., 2007; Yu y cols., 2012) y que participa en la diferenciación de subtipos neuronales en la médula espinal (John y cols. 2013), **es factible hipotetizar que CTIP1 esté involucrado en las redes transcripcionales que controlan la especificación ó diferenciación de subtipos de NP en la corteza.**

2.- Hipótesis

CTIP1 participa en la red de control transcripcional que regula la generación de la diversidad de subtipos neuronales en la corteza cerebral.

3.- Objetivo general

Estudiar la función asociada a CTIP1 en la generación de subtipos neuronales en la corteza cerebral.

3.1.- Objetivos específicos

Objetivo 1: Determinar el patrón de expresión temporal y espacial de CTIP1 en la corteza en desarrollo de ratón.

Objetivo 2: Investigar relaciones regulatorias entre CTIP1 y FTs involucrados en la generación de subtipos neuronales en la corteza cerebral.

Objetivo 3: Estudiar los efectos asociados a la inhibición de la expresión de CTIP1 en la especificación de subtipos neuronales en la corteza, basándose en el análisis de marcadores fenotípicos.

Objetivo 4: Estudiar los efectos asociados a la inhibición de la expresión de CTIP1 en la especificación de subtipos neuronales en la corteza, basándose en el análisis de proyecciones axonales.

4.- Materiales

4.1.- Reactivos químicos

4.1.1.- Reactivos y sistemas comerciales de biología molecular

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

Agarosa para biología molecular (Winkler, Santiago, Chile)

Agua grado biología molecular (Winkler, Santiago, Chile)

Alcohol isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemania)

Bromuro de etidio (Invitrogen, California, EE.UU)

dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP. 100mM c/u (Invitrogen, California, EE.UU)

EDTA (Winkler, Santiago, Chile)

Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)

Estándar de peso molecular. 1Kb plus DNA ladder (Fermentas, Ontario, Canadá)

Endonucleasas de restricción: XhoI, NotI, EcoRI, ClaI, BstBI (Promega, Madison, EE.UU)

Glicina (Winkler, Santiago, Chile)

Glicógeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

Inhibidor de RNAsa, Rnasa out (Invitrogen, California, EE.UU)

Kit de purificación de DNA plasmidial Maxiprep Endofree® (Qiagen, California, EE.UU)

Kit de purificación de DNA desde gel o PCR, Wizard® SV (Promega, Madison, EE.UU)

Mezcla de inhibidores de proteasas 50X (Roche, Basel, Suiza)

NP-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

T4 DNA ligasa (Promega, Madison, EE.UU)

Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

Oligo (dT) primer (12-18), 50uM (Invitrogen, California, EE.UU)

Pfu DNA polimerasa (Fermentas, Ontario, Canadá)

Proteinasa K (Roche, Basel, Suiza)

Proteína A/G asociada a perlas de agarosa (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, EE.UU)

RNAse A (Invitrogen, California, EE.UU)

Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, EE.UU)

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

Tris (Winkler, Santiago, Chile)

Trizol® (Invitrogen, California, EE.UU)

Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, California, EE.UU)

Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) (Ambion, Madison USA)

Solución tampón de electroforesis, TAE 1X (Tris-acetate-EDTA)

Tampón TE (Tris-EDTA, pH 8.0)

4.1.2.- Reactivos y materiales usados para inmunofluorescencia

Paraformaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

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

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

Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

NP-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)

Portaobjetos (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania)

Cubreobjetos (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania)

PBS 1X (Buffer salino de fosfato)

Placas de 12 pocillos con netwells (Corning Life Sciences, Tewksbury, EE.UU)

4.1.3.- Reactivos usados para inmunoblot

Mezcla de inhibidores de proteasas 50X (Roche, Basel, Suiza)

Solución tampón para lisis celular (solución acuosa de Tris 50mM, SDS 0.1%)

Solución tampón de carga 5X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; SDS 6%; glicerol 20%; beta-

mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0.07%)
Acrilamida/bisacrilamida 30% (29/1) (Sigma, St Louis, EE.UU)
Solución tampón de electroforesis: 125 mM, glicina 80 mM, SDS 1.7 mM, pH 8.3)
Estándar de peso molecular Page Ruler (Fermentas, Ontario, Canadá)
Solución tampón PBST (PBS 1X/Tween-20 0.2%)
Papel filtro para transferencia (BioRad, California, EE.UU)
Almohadillas de fibra para transferencia (BioRad, California, EE.UU)
Membrana de nitrocelulosa (BioRad, California, EE.UU)
Metanol técnico (TCL, Santiago, Chile)
Solución de bloqueo: Leche descremada Svelty 5% en PBST
Sistema comercial para detección quimioluminiscente, Super Signal West Pico (Pierce, Illinois, EE.UU)
Persulfato de amonio (Winkler, Santiago, Chile)
TEMED (Sigma, St Louis, EE.UU)
Tween-20 (Sigma, St Louis, EE.UU)
Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU)

4.1.4.- Reactivos usados para cultivos de bacterias

Medio Luria Bertani (LB) 10mg/ml
10 mg/ml Bacto-tryptona (Difco, Maryland, EE.UU)
5 mg/ml Bacto-extracto de levadura (Difco, Maryland, EE.UU)
Agar-LB 15mg/ml Bacto-Agar en LB (Difco, Maryland, EE.UU)

4.1.5.- Reactivos para cultivos de líneas celulares

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, California, EE.UU)
Suero bovino feta, Fetal clone (Hyclone, Austin, EE.UU)
Penicilina/streptomicina 100x (Gibco, California, EE.UU)
Anfotericina B (Sigma, St Louis, EE.UU)

L- Glutamina (Gibco, California, EE.UU)

Tripsina (Invitrogen, California, EE.UU)

Suero fetal bovino, FetalClone III, HyClone (Logan, UT, EEUU)

4.1.6.- Reactivos para cultivos primarios neuronales

Suplemento B-27 (Gibco, California, EE.UU)

Medio Neurobasal (Gibco, California, EE.UU)

Poli-L-Lisina (0.01%) (Sigma, St Louis, EE.UU)

L-Glutamina (Gibco, California, EE.UU)

Tripsina (Invitrogen, California, EE.UU)

HBSS, Hank's Balanced Salt Solution 10X (Sigma, St Louis, EE.UU)

MEM, Minimum Essential Medium (Sigma, St Louis, EE.UU)

Ácido pirúvico (Sigma, St Louis, EE.UU)

Glucosa (Sigma, St Louis, EE.UU)

4.1.7.- Reactivos y materiales utilizados en experimentos de electroporación *in utero*

Colorante inerte, Fast Green (Fisher, Massachusetts, EE.UU)

Electrodos tipo pinza, 5mm de diámetro (BTX, Massachusetts, EE.UU)

Electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad, California, EE.UU)

Capilares de vidrio (7690F22) (Thomas Scientific, EE.UU)

Suero fisiológico (NaCl 0.9%) (Laboratorio Frenesius Kabi, Santiago, Chile)

Ketoprofeno inyectable (50mg/ml) (Sanofi-aventis, Santiago, Chile)

Máquina para estirar capilares de vidrio (*puller*), modelo P-87 (Sutter Instruments, California, EE.UU)

4.1.8.- Vectores

pFUXH1-GFP: Vector de expresión en mamíferos y de generación de partículas lentivirales que se originó a partir del vector FUGW (Lois y cols. 2002) requiriendo los siguientes pasos. Brevemente, el sitio EcoRI fue eliminado del vector FUGW. Se introdujo un oligonucleótido en el sitio PacI, creando un sitio de clonamiento múltiple con las siguientes enzima de restricción: 5'-PvuI, BsiwL, EcoRI, BstBI y PacI. El promotor H1 (reconocido por la RNA polimerasa III) del vector pZOFF fue insertado entre los sitios EcoRI y BstBI, creando FUXH1-GFP. Posee un cassette de resistencia a ampicilina. La expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) se encuentra bajo el control del promotor de ubiquitina C humano (Lois y cols. 2002).

pLKO.1: Vector de expresión de shRNA's para mamíferos. Además es utilizado para la generación de partículas lentivirales. Es un vector altamente recomendado para el clonamiento y expresión de shRNA's. Posee un cassette de resistencia a ampicilina. Este vector está siendo utilizado para la generación de librerías de shRNA's por *The RNAi Consortium* (Root y cols. 2006). No posee genes reporteros fluorescentes.

pCAGIG: Vector de expresión de proteínas para mamíferos que codifica un mRNA bicistrónico que incluye un sitio de entrada ribosomal interno para la traducción de GFP (*IRES-GFP*). La expresión del mRNA bicitrónico se encuentra controlada por el promotor CAG (C, CMV enhancer; A, chicken β -actin promoter; G, sitio aceptor de splicing del gen de b-globina de conejo), que opera eficientemente en neuronas corticales *in vivo*. Posee un cassette de resistencia a ampicilina. El vector fue desarrollado por Matsuda y Cepko (2004).

4.1.9.- Cepas bacterianas

Para la amplificación de las construcciones plasmidiales de interés se utilizó la cepa *TOP10* de *E. Coli*. Se generaron bacterias químicamente competentes en el laboratorio para realizar las transformaciones con plamidios de interés. La cepa fue crecida en placas LB/Agar ó LB líquido suplementado con antibióticos bajo las

condiciones estándar de cultivo.

4.1.10.- Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron: CUX1 (SCBT #sc-13024), TBR1 (Abcam #AB31940), MYC (Hybridoma Bank #9E10), HA (SCBT #sc-13024), CTIP1 (SCBT #sc-56011, Clon 14B5), CTIP2 (SCBT #sc-56014, clon 25B6), TFIIB (SCBT #sc-225), Tubulina (Sigma-Aldrich #T8328), Ki67 (Chemicon, AB9260), SOX2 (Chemicon #AB5603), MAP2 (Chemicon #MAB378), GFAP (Chemicon #AB5541), Doublecortin (SCBT #sc-8066), Tuj1 (Chemicon #CBL412), TBR2 (Abcam #AB23345), V-GLUT (Chemicon #MAB5502), NeuN (Chemicon #MAB377).

4.1.11.- Partidores

Todos los partidores fueron sintetizados IDT (Iowa, EE.UU)

Tabla 1. Secuencias de horquillas de RNA contra CTIP1

	Secuencia codificante de la horquilla
sh1CTIP1	GCTCCGTTATCCTGCTAGATTCTCGAGAATCTAGCAGGATAACGGAGC
sh2CTIP1	CCGCAGGGTATTTGTAAAGATCTCGAGATCTTTACAAATACCCTGCCG
sh3CTIP1	GCACTTAAGCAAACGGGAATTCTCGAGAATCCCGTTTGCTTAAGTGC
sh4CTIP1	CACAAACGGAAACAATGCAATCTCGAGATTGCATTGTTCCGTTTGTG
sh5CTIP1	GCCAGAGGATGACGATTGTTTCTCGAGAAACAATCGTCATCCTCTGGC

En negrita se indican las secuencias complementarias que forman el tallo de la horquilla de RNA. En letras normales se muestra la secuencia que forma el bucle de la horquilla.

Tabla 2. Secuencias de horquillas de RNA contra TBR1

	Secuencia codificante de la horquilla
sh1TBR1	CACGGATATTACACA ACTAAACTCGAGTTTAGTTGTGTAATATCCGTG
sh2TBR1	CAGGCCAC TTTGGCTGAAATTCTCGAGAATTCAGCCAAAGTGGCCTG
sh3TBR1	CCACCGCTCATTACA ATATTTCTCGAGAAATATTGTAATGAGCGGTGG
sh4TBR1	CCTCCATCAAATCCATCGACTCTCGAGAGTCGATGGATTTGATGGAGG
sh5TBR1	GATCCCAATCACTGGAGGTTTCTCGAGAAACCTCCAGTGATTGGGATC

En negrita se indican las secuencias complementarias que forman el tallo de la horquilla de RNA. En letras normales se muestra la secuencia que forma el bucle de la horquilla.

Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados para PCR cuantitativos

Gen	Secuencia 5'-3'
<i>Fezf2-F</i>	caccggagctagaccgtttgt
<i>Fezf2-R</i>	agcgtggagctgcgattga
<i>Tbr1-F</i>	caacaggccactttggctgaa
<i>Tbr1-R</i>	aatgagcgggtgggatcgaga
<i>Gapdh-F</i>	aactcccactcttcacctt
<i>Gapdh-R</i>	ttactccttggaggccatgt

F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.



Tabla 4. Partidores utilizados en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina.

Gen	Secuencia 5'-3'
<i>Tbr1</i> ; región genómica -327/-241	F: acctgggtactccaattctgc
	R: tgtagaccggtttccctt
<i>Tbr1</i> ; región genómica -192/+14	F: tcatcaacctgtccggcctat
	R: agctgggtggaacttgggtat
<i>Frzb</i> ; región genómica +623/+849	F: acctgggagcaacttggatc
	R: gagcagccaggactagcaac

Las regiones genómicas amplificadas por cada par de partidores son relativas al sitio de inicio de la transcripción del gen indicado. F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 5. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 sin epítipo

	Secuencia 5' - 3'
CTIP1-F7	T ACTCGAG cccacaattcatottccctgcg
CTIP1-R1	gctgcc GttAcaCtgCttccTCttAtg ctcgataaaaataagaatgct
CTIP1-F2	ctctgcttagaaaaagggtgtggataagccgccttccccttctcccatcgag
CTIP1-R5	T AGCGGCCGC tcagaacttaagggttcttgagcttccat

En negrita y mayúscula se indican los sitios de restricción de XhoI (CTIP1-F7) y NotI (CTIP1-R5). En negrita y minúscula se indica el codón de término (CTIP1-R5). El partidor CTIP1-R1 fue el utilizado para hacer la mutágenesis del marco de lectura de CTIP1L para obtener la variante resistente al shCTIP1 (mutCTIP1). En negrita y mayúscula se muestran las nucleótidos mutados. F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 6. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 con epítipo HA

	Secuencia 5' - 3'
CTIP1-F1	gta CTCGAG atgtctcgccgcaagcaagg
CTIP1-R1	gctgcc GttAcaCtgCttccTCttA tgcctcgataaaaaataagaatgtc
CTIP1-F2	ctctgcttagaaaaaggtgtggataagccgccttccccttctcccatcgag
CTIP1-R3	ta GCGGCCG Ctca AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA gaacttaagggttcttgagc

En negrita y mayúscula se indican los sitios de restricción de XhoI (CTIP1-F1) y NotI (CTIP1-R3). En negrita y minúscula se indican el codón de inicio (CTIP1-F1) y el codón de término (CTIP1-R3). El partidor CTIP1-R1 fue el utilizado para hacer la mutágenesis del marco de lectura de CTIP1L para obtener la variante resistente al shCTIP1 (mutCTIP1-HA). En negrita y mayúscula se muestran los nucleótidos mutados. F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 7. Partidores utilizados en la clonación de CTIP1 resistente a shCTIP1 con epítipo MYC

	Secuencia 5' - 3'
CTIP1-F1	gta CTCGAG atgtctcgccgcaagcaagg
CTIP1-R6	ta GCGGCCG ttta CAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTC gaacttaagggttcttgagc

En negrita y mayúscula se indican los sitios de restricción de XhoI (CTIP1-F1) y EagI (compatible con NotI) (CTIP1-R6). En negrita y minúscula se indican el codón de inicio (CTIP1-F1) y el codón de término (CTIP1-R3). En la amplificación de PCR para clonar esta variante se utilizó como templado la variante resistente al shCTIP1 con epítipo HA. F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 8.- Partidores utilizados en la clonación de CTIP1S resistente a shCTIP1 con epítipo MYC

	Secuencia 5' - 3'
CTIP1-F1	gta CTCGAG atgtctcgccgcaagcaagg
CTIP1-R1	gctgcc GttAcaCtcCttcTCttA tgctcgataaaaaataagaatgtc
CTIP1-F2	ctctgcttagaaaaaggtgtggataagccgccttccccttctcccatcgag
CTIP1L-R4	ta GCGGCCGC tca CAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTGTTC Caagtttctcagaacttaagg

En negrita y mayúscula se indican los sitios de restricción de XhoI (CTIP1-F1) y NotI (CTIP1-R4). En negrita y minúscula se indican el codón de inicio (CTIP1-F1) y el codón de término (CTIP1-R4). El partidor CTIP1-R1 fue el utilizado para hacer la mutágenesis del marco de lectura de CTIP1S para obtener la variante resistente al shCTIP1 (mutCTIP1-S-MYC). En negrita y mayúscula se muestran las nucleótidos mutados. F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 9. Partidores utilizados en la clonación de CTIP2 (isoforma b)

	Secuencia 5' - 3'
CTIP2-F	AT GAAATTC atgtcccgcgcaaacagggcaacc
CTIP2-R	AT GCGGCCGC cttagctcctctcagcctgctogattttgac

En negrita y mayúscula se indican los sitios de restricción de EcoRI (CTIP2-F) y NotI (CTIP2-R). En negrita y minúscula se indican el codón de inicio (CTIP2-F) y el codón de término (CTIP2-R). F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

Tabla 10. Partidores utilizados en la clonación de TBR1

	Secuencia 5' - 3'
TBR1-F	AT GAAATTC atgcagctggagcattgcctctctcctt
TBR1-R	AT CTCGAG tta CAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTGTTC Cgctgtgagtagaagccata

En **negrita y mayúscula** se indican los sitios de restricción de EcoRI (TBR1-F) y XhoI (TBR1-R). En **negrita y minúscula** se indican el codón de inicio (CTIP2-F) y el codón de término (CTIP2-R). F: oligonucleótido *forward*; R: oligonucleótido *reverse*.

5.- Metodología

5.1.- Extracción de RNA total y RT-PCR.

Se realizaron extracciones de RNA total desde cortezas E17.5 ó desde cultivos primarios corticales E13.5 mantenidos 4 días *in vitro*, para distintas aplicaciones posteriores. La purificación del RNA total se hizo con Trizol® siguiendo los pasos del protocolo estándar indicado por el fabricante (Invitrogen). Se determinó la concentración y pureza de cada preparación mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm. La síntesis de cDNA fue llevada a cabo utilizando 2 ug de RNA total, en los casos en que utilizó en aplicaciones de clonamiento de marcos de lectura. En los casos en que se buscaba cuantificar la abundancia relativa de ciertos mRNA, se utilizaron 500 ng de RNA total para llevar a cabo la reacción de síntesis de cDNA. En todas las reacciones de síntesis de cDNA se utilizó el kit de transcripción reversa Superscript III (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando oligo-dT (Invitrogen).

5.2.- PCR cuantitativo

Para cada mRNA analizado, primero se generó una curva de calibración estándar mediante diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida del respectivo amplicón, obtenida por PCR convencional de una preparación de cDNA de cerebro de embrión de ratón E17.5. La determinación de la concentración del amplicón en esta muestra, se llevó a cabo por espectrofotometría. La reacciones de PCR

cuantitativo se realizaron utilizando la sonda "*Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix*" de Stratagene (La Jolla, CA, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 μ L. Las secuencias de los partidores *forward* y *reverse* se diseñaron en el laboratorio. Para cada muestra de cDNA obtenida a partir de cultivos primarios corticales transducidos con partículas lentivirales (ver más abajo), se determinó la abundancia relativa de los mRNA de *Tbr1*, *Fezf2* y *Gapdh*. La abundancia de este último se utilizó como referencia para el proceso de normalización. Se utilizó programa MxPro versión 4.0 de Stratagene (La Jolla, CA, EEUU) para el análisis de datos. El cálculo de la abundancia relativa de los mRNA de interés se realizaron con el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando el valor promedio del ciclo al cual se alcanzó el valor umbral de fluorescencia determinado por el equipo (C_T).

5.3.- Inmunoprecipitación de cromatina

Se extrajeron cortezas de embriones E17.5, se lavaron con PBS1X y luego se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en formaldehído 1% con agitación suave. La reacción de entrecruzamiento se detuvo mediante la adición de glicina 0.125M durante 5 minutos. Los siguientes pasos fueron realizados a 4°C. La cortezas se lavaron con PBS1X. Posteriormente se agregó 1 ml de buffer de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.8, KCl 20mM, MgCl 3 mM, NP-40 0.1% y mezcla de inhibidores de proteasas) y se realizó una incubación de 10 min en hielo para luego homogenizar las corteza con un homogenizador Dounce. El extracto celular fue recolectado por centrifugación a 1500 x g durante 5 minutos y resuspendido en 0.5 ml de buffer de sonicación (HEPES 50 mM, pH 7.9, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, Deoxicolato ácido 0.1%, SDS 0.1% y mezcla de inhibidores de proteasas). Para reducir la longitud de los fragmentos de cromatina a ~500 pb (confirmado por análisis electroforético y por PCR), el extracto fue sonificado con un sonicador Misonix (modelo 3000) con un pulso de 15 segundos al 30% del poder máximo. La muestra se centrifugó a 16000 x g por 10 minutos y se colectó el sobrenadante, se alicuotó, se congeló con nitrógeno y se guardó a -80°C. Se utilizó una alicuota para medir la

absorbancia a 260 nm y determinar la concentración de ácidos nucleicos. Los extractos fueron resuspendidos en 500 ul de buffer de sonicación. Las muestras fueron pre-aclaradas mediante la incubación con 50 ul de proteína A/G asociada a perlas de agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 4°C con agitación. Después de centrifugar las muestras a 1000 x g durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-CTIP1 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-Histona 3 (Santa Cruz Biotechnology) durante 12 horas a 4°C. Para recuperar los inmunocomplejos se agregaron 50 ul de proteína A asociada a perlas de agarosa y se realizó una incubación de 1 hora a 4°C. Los complejos fueron lavados 1 vez con cada uno de los siguientes buffers durante 5 minutos a 4°C con agitación: buffer de sonicación, buffer de sonicación con 500 mM de NaCl, LiCl buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, LiCl 500 mM, NP-40 0.1% y Deoxicolato ácido 0.1%) y buffer TE pH 8.0 (2mM EDTA y 50 mMTris-HCl, pH 8.0). Los complejos proteína-DNA luego fueron eluidos mediante la incubación con 100 ul de buffer de elución (NaHCO₃ 50 mM y SDS 1%) durante 15 minutos a 65°C. Luego de un paso de centrifugación a 10000 x g durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se agregó NaCl a una concentración final de 200 mM. La mezcla fue incubada con 20 mg/ml de RNAsa A durante 12-16 horas a 65°C para revertir el entrecruzamiento. Las proteínas fueron digeridas con 100 mg/ml de proteinasa K durante 2 horas a 50°C y el DNA fue recuperado mediante una extracción con Fenol/Cloroformo y precipitación con Etanol utilizando glicógeno (20 mg/ml) como *carrier* de precipitación. Los partidores utilizados para evaluar la unión de CTIP1 al promotor de *Tbr1* y *Frzb* mediante PCR cuantitativo se indican en la tabla 4.

5.4.- Clonamiento de shRNAs contra CTIP1 en FUX-GFP.

Se obtuvieron 5 plasmidios codificantes para shRNAs contra CTIP1 murino desde *The RNAi Consortium*. Los shRNA's estaban clonados en el vector pLKO.1 bajo el control del promotor U6 (reconocido por la RNA polimerasa III). Debido a que el vector pLKO.1 no tiene un gen reportero para monitorear la transfección, se decidió

clonar los cassettes de expresión (U6-shRNA) de los cinco clones pLKO.1 en FUX-GFP para simplificar la realización de los experimentos de transfección *in vitro* y electroporación *in utero* (EPIU) (ver más adelante). El vector FUX-GFP fue digerido con EcoRI-ClaI para extraer el promotor H1. Los vectores pLKO.1 también fueron digeridos con EcoRI-ClaI para extraer el fragmento que contiene los cassetes de expresión U6-shRNA. Los productos de digestión fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%. Se extrajo la banda de interés, y se purificaron cada uno de los fragmentos mencionados utilizando un kit de purificación de DNA desde gel o PCR, Wizard® SV (Promega). Posteriormente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa, se ligó cada uno de los fragmentos purificados con FUX-GFP, digerido con las enzimas de restricción mencionadas. Los productos de ligación fueron transformados en bacterias TOP10. Los clones positivos se seleccionaron mediante digestión con XhoI, puesto que la región de la horquilla de los shRNA contra CTIP1 corresponde a un sitio XhoI. Por lo tanto los clones positivos incorporan un sitio XhoI adicional al vector FUX-GFP, permitiendo una rápida identificación de los clones positivos. Los clones positivos fueron corroborados por secuenciación.

5.5.- Clonamientos de marcos de lectura de variantes de CTIP1, CTIP2 y TBR1.

5.5.1.- Clonamiento de variantes de CTIP1.

Se generaron 3 variantes largas de CTIP1 resistentes a la acción del shCTIP1: mutCTIP1, mutCTIP1-HA y mutCTIP1-MYC. La variante larga que no lleva epítipo incluye un fragmento de la región no traducida del extremo 5' del mRNA (5'-UTR), mientras que el clonamiento de las otras variantes no incluye este fragmento, sino que se clonaron a partir del codón de inicio. Las tres variantes fueron clonadas en el vector pCAGIG-IRES-GFP entre los sitios de corte único XhoI y NotI localizados en el sitio de múltiple clonamiento. Las variantes mutCTIP1 y mutCTIP1-HA se generaron a partir de

dos productos de PCR que luego fueron direccionalmente ligados en pCAGIG (digerido con XhoI y NotI), mediante una reacción de ligación triple. El clonamiento se realizó de esta forma para generar mutagénesis por PCR en el sitio blanco de shCTIP1, y de esa manera generar variantes insensibles al interferente. El partidador que lleva los nucleótidos mutados es el CTIP1-R1 (**tablas 5, 6 y 7**). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como templado cDNA sintetizado a partir de RNA total de cortezas de embriones E17.5. Los pares de partidores utilizados en cada una de las reacciones de PCR fueron:

Variante larga sin epítotope:

PCR #1: CTIP1-F7/CTIP1-R1

PCR#2: CTIP1-F2/CTIP1-R5

Variante larga con epítotope HA:

PCR #1: CTIP1-F1/CTIP1-R1

PCR#2: CTIP1-F2/CTIP1-R3

Cada uno de los productos de PCR se sometió a electroforesis en geles de agarosa para descartar la amplificación de productos no deseados. Posteriormente las bandas correspondientes al tamaño deseado fueron purificadas y digeridas con las enzima de restricción adecuadas. Posteriormente se procedió a realizar las ligaciones triples.

Por su parte, la variante larga mutCTIP1-MYC, se generó mediante una sola reacción de PCR utilizando como templado mutCTIP1-HA. El producto de PCR fue purificado después de ser sometido a electroforesis en un gel de agarosa, utilizando un kit de purificación de DNA desde gel o PCR, Wizard® SV (Promega). Posteriormente el producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas y se ligó en pCAGIG.

La variante mutCTIP1S-MYC se generó de manera análoga a las variantes mutCTIP1 y mutCTIP1-HA utilizando pares distintos de partidores (**ver tabla 8**):

PCR #1: CTIP1-F7/CTIP1-R1

PCR#2: CTIP1-F2/CTIP1-R4

Igualmente en este caso el partidor CTIP1-R1 lleva los nucleótidos mutados para generar una variante de CTIP1S-MYC insensible al shCTIP1.

5.5.2.- Clonamiento de CTIP2 y TBR1.

Se amplificaron los marcos de lectura de ambos genes mediante reacciones de PCR utilizando como templado cDNA sintetizado a partir de RNA total de cortezas de embriones E17.5. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa para descartar la generación de productos no deseados. Los productos de PCR fueron purificados utilizando un kit de purificación de DNA desde gel o PCR, Wizard® SV (Promega). Posteriormente los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción apropiadas y se ligaron en pCAGIG, igualmente digerido con las enzimas apropiadas de acuerdo a la estrategia de clonamiento (**Ver tablas 9 y 10**).

La integridad de la secuencia de todas las construcciones mencionadas hasta aquí fueron corroboradas por secuenciación.

5.6.- Obtención, purificación y secuenciación de DNA plasmidial.

Para la purificación de DNA plasmidial para efectos de clonamientos, identificación de clones positivos ó secuenciación, se utilizó el sistema comercial de extracción de DNA plasmidial QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). Las preparaciones plasmidiales utilizadas para experimentos de EPIU se purificaron utilizando el Kit de purificación de DNA plasmidial Maxiprep Endofree® (Qiagen). Los pellets de DNA se resuspendieron habitualmente en unos 150 ul de buffer TE para obtener una concentración de DNA de unos 4 ug/ul. La secuenciación de todas las construcciones

plasmidiales generadas en este estudio fueron encargadas a la empresa estadounidense Laragen.

5.7.- Generación de vectores lentivirales

Las partículas lentivirales fueron generadas de acuerdo a como se ha descrito en la publicación "Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes" (Sena-estevez y cols. 2004). Los plasmidios utilizados en las transfecciones triples de células HEK293T fueron: FUX-GFP (vector de transferencia), el plasmidio pVSV-g que codifica las proteínas de la envoltura del virus, y el plasmidio $\Delta 8.9$ que codifica los genes gag/pol/rev necesarios para el empaquetamiento viral. Después de 48 hrs de transfección, se recolecta el sobrenadante de las células HEK293T y por último se filtra (se utilizan filtro con tamaño de poro: 0.45 μm). El sobrenadante que contiene las partículas lentivirales se ultracentrifuga para lograr concentrar las partículas virales. El pellet de virus se resuspende habitualmente en unos 500 μl de Neurobasal. Células HEK293T son transducidas con una serie de diluciones del virus concentrado para determinar el título del virus concentrado, de acuerdo a como se ha descrito en Sena-estevez y cols. (2004). Las partículas virales generadas de esta manera se utilizaron para transducir cultivos primarios de neuronas corticales (ver más abajo) con una multiplicidad de infección (MOI) de 5.

5.8.- Mantenimiento y transfección de líneas celulares COS7 y HEK293T.

Tanto las células COS-7 (ATCC número CRL-1651) y las células HEK 293T (ATCC número CRL-11268) fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) rico en glucosa, con L-glutamina 4 mM y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% para las células COS-7 y al 10%

para las HEK 293T. Además, el medio de cultivo para las tres líneas celulares incluyó 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2,5 µg/mL de anfotericina B. Todos los productos utilizados en el cultivo celular fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) a excepción del FetalClone III que se obtuvo de HyClone (Logan, UT, EEUU). Para las transfecciones de las distintas construcciones plasmidiales utilizadas en este estudio, se utilizó Lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células no se mantuvieron más de 48 hrs post-transfección.

5.9.- Cultivos primarios de neuronas corticales de embrión de ratón y transducción lentiviral.

El procedimiento utilizado en el cultivo primario de neuronas fue estandarizado de acuerdo a como ha sido descrito previamente (Goslin y Banker, 1991). Mediante disección se extrajeron las cortezas cerebrales de embriones de ratones CF1 de E13.5 ó E15.5 y se digirieron en tripsina al 0.05% en PBS 1X durante 15 minutos a 37°C. Luego los tejidos fueron lavados tres veces con medio de disección (HBSS 1X), y disgregados mecánicamente forzando repetidamente su tránsito, mediante aspiración y expulsión, a través de una pipeta Pasteur cuya punta se redondeó previamente a la llama del mechero. Para los experimentos de transducción de los cultivos con partículas lentivirales, las neuronas corticales se sembraron en placas de Petri de 35 mm previamente tratadas con poli-L-lisina al 0.01%, a una densidad de 8×10^5 células por placa en medio de adhesión, constituido por MEM con suero de caballo al 10%, ácido pirúvico 1 mM y glucosa al 0.6% poli-L-lisina al 0.01%. Después de cuatro horas de incubación a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂, el medio de adhesión fue reemplazado por el medio de mantenimiento, compuesto por medio Neurobasal con B-27 al 2%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/mL, estreptomina 100 µg/mL, glucosa al 0.6 % y Anfotericina B 0.25 µg/mL, luego de lo cual, se prosiguió con la incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Al momento de realizar el cambio de medio de

adhesión por medio de mantenimiento, se agregaron las partículas lentivirales de interés. Luego de 16 horas de incubación con las partículas lentivirales, se desechó el medio que contiene partículas lentivirales y se reemplazó por medio fresco. Luego de esto, los cultivos primarios fueron mantenidos por 3 días más *in vitro*. Generalmente luego de 72 horas post-transducción, se examinó la expresión de GFP.

5.10.- Western blot.

Muestras de distinta índole (cortezas embrionarias, cultivos primarios corticales, líneas celulares) fueron lisadas en tampón de lisis (Tris 10mM; SDS 0.1%, suplementado con cocktail de inhibidores de proteasa) y posteriormente el extracto celular fue homogenizado pasándolo 10 veces a través de una jeringa. El material insoluble se removió por centrifugación. Para determinar la concentración de proteínas en los extractos de proteínas, se utilizó el método del BCA (ácido bicinonínico). La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Brevemente, las proteínas (20-40 ug) fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8 ó 10 % y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo fueron incubados a 4°C durante toda la noche con agitación. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rabanito (HRP) y se utilizaron en diluciones que van entre 1:5000 a 1:10000. Las incubaciones con anticuerpos secundarios se realizaron durante 1-2 hrs a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia por métodos estándares. Los films fotográficos fueron escaneados y el analizados por densitometría de las bandas de las proteínas de interés con el programa ImageJ (NIH).

5.11.- Inmunohistofluorescencia

Los embriones electroporados son retirados de la madre en la fase de desarrollo de interés según el objetivo que se quiera conseguir de acuerdo al diseño experimental. Los cerebros son extraídos del cráneo luego de la perfusión intracardíaca de los

embriones utilizando formaldehído al 4%. Se realizan cortes coronales seriados de los cerebros en vibrátomo (Leica VT1000-S). Las secciones de cerebro son procesadas para análisis por inmunohistoquímica como sigue: incubación en solución de bloqueo (suero de burro 3%; tritón X-100 0.25% en PBS 1X) durante 2 hrs. Luego las secciones son incubadas con diluciones apropiadas de anticuerpos primarios por 24 h a 4°C seguido de dos lavados con PBS 1X y uno con solución de bloqueo por 15 min. Posteriormente las secciones son incubadas con los anticuerpos secundarios (asociados a fluoróforos) correspondientes por 2 hrs seguido de dos lavados con PBS 1X. En algunos casos, los cortes son teñidos con DAPI. Para ello los cortes son incubados durante 10 min en una solución diluida de DAPI, seguido de dos lavados en PBS1X. Por último los cortes son montados en portaobjetos en medio de montaje para fluorescencia (Vectashield) para ser analizados por microscopía.

5.12.- Animales y electroporación in utero (EPIU)

En todas las cirugías se utilizaron hembras preñadas de la cepa CF1. La manipulación de los animales se realizó conforme a los protocolos éticos para el trabajo con animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El procedimiento de EPIU se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Saito, 2006). Brevemente, hembras preñadas son anestesiadas con isoflurano al 2% y se realiza una laparotomía para exponer los cuernos uterinos. DNA plasmidial a una concentración de $\sim 4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se mezcla con Fast Green (FisherBiotech) (concentración final: 0.05%) para monitorear el sitio de la inyección. Aproximadamente 1-2 μl de solución se inyectan en la región telencefálica ventricular derecha o izquierda de cada embrión utilizando una micropipeta de vidrio fabricada a partir de un microcapilar estirado en un *puller* para micropipetas (Sutter Instruments, modelo P-87). La cabeza de los embriones es puesta cuidadosamente entre un electrodo tipo pinza. Luego se dan 5 pulsos eléctricos (35-40 volts, 50 ms de duración a intervalos de 1 s) aplicados con un electroporador Gene Pulser Xcell (Biorad). Finalmente, los cuernos uterinos son

devueltos a la cavidad abdominal y se sutura la incisión. Inmediatamente luego de finalizar la cirugía, la madre es inyectada con ketoprofeno para disminuir los dolores post-operatorios. Se permite que continúe el desarrollo de los embriones hasta distintas edades gestacionales de acuerdo al objetivo del experimento.

5.13.- Comentarios acerca de la técnica de electroporación *in utero* y consideraciones de su utilización en el presente estudio.

La técnica de electroporación *in utero* (EPIU) es una manera efectiva para transfectar regiones discretas (parches) de células progenitoras de la VZ en la corteza en desarrollo. Los experimentos de electroporación han probado ser exitosos durante una ventana bastante extensa del desarrollo embrionario del ratón (E12-E16). La ventajas de este método están determinadas por el control espacial y temporal de la transfección. El sitio de la transfección en la extensión de la superficie ventricular puede ser dirigido espacialmente mediante la orientación del campo eléctrico del pulso de corriente para transfectar la región ventricular deseada. En el estudio aquí presentado el campo eléctrico es dirigido hacia la región dorso-lateral de la VZ, de manera que el polo positivo de la pinza se ubica en la región dorso-lateral de la cabeza del embrión. De esta manera se logra que el material genético a transfectar ingrese a todo el parche de células ventriculares dorso-laterales que más tarde en el desarrollo dará origen a la corteza cerebral. Los cerebros más tarde son procesados y analizados por microscopía. En este estudio se analiza la región cortical correspondiente al área sensori-motora. Todos los cortes coronales de cerebros electroporados mostrados en este estudio corresponde a esa región de la corteza. Los cerebros que por errores técnicos resultan electroporados en regiones diferentes a la mencionada son desechados y no considerados en los análisis.

En los experimentos ejecutados en esta tesis se utiliza la EPIU para realizar transfecciones de construcciones plasmidiales que expresan shRNA's para así llevar a cabo experimentos de inhibición de la expresión de genes, ó construcciones

plasmidiales que expresan transgenes para llevar a cabo experimentos de ganancia de función. Una de las virtudes de esta técnica es que permite la realización de experimentos de co-transfección, mediante la inyección ventricular de más de una construcción plasmidial. Se observó que en experimentos que involucran la inyección de dos construcciones plasmidiales se logran tasas de co-transfección cercanas al 90% (Lo turco y cols., 2009).

5.14.- Microscopía, análisis de imágenes y análisis estadísticos.

Las imágenes de secciones de cerebro fueron obtenidas mediante microscopía confocal con un equipo BX-DSU, Disk Scanning Unit (Olympus). El análisis, cuantificación y manipulación de imágenes se realizará utilizando los programas Cell@ (proporcionado con el microscopio DSU Olympus), ImageJ (NIH) y GIMP (*GNU image manipulation program*). Los análisis estadísticos se realizaron en Libreoffice Calc. Los análisis de correlación se realizaron mediante el test de Pearson. Los análisis estadísticos de comparación entre grupos de datos se realizaron con la prueba t de Student (t test). Se consideró significancia estadística cuando al menos $p < 0.05$. Las barras de los gráficos representan el promedio \pm DE (desviación estándar) ó \pm SEM (error estándar de la media), según corresponda.

6.- Resultados

6.1.- Estudio del patrón de expresión espacio-temporal de CTIP1 en la corteza cerebral en desarrollo

Como primer paso en la determinación de la función de CTIP1, se determinaron en forma precisa las poblaciones celulares que expresan CTIP1 en la corteza cerebral en desarrollo. Se realizaron inmunotinciones contra CTIP1 y distintos marcadores cuya expresión identifica distintas poblaciones celulares residentes en la corteza en desarrollo. En cortezas E15.5, se observó que la expresión de CTIP1 se excluye completamente de progenitores ventriculares y sub-ventriculares, identificados por la expresión de SOX2 y TBR2, respectivamente. Sin embargo, se puede observar que CTIP1 es abundantemente expresado en todo el espesor de la CP, lo cual sugiere que este FT es expresado por neuronas post-mitóticas corticales (**Figura 9**). Consistentemente con lo anterior, se observó una completa exclusión de la expresión de CTIP1 y Ki67 (proteína expresada en células en activa proliferación), no encontrándose ninguna célula Ki67+ que fuera CTIP1+. Sin embargo, se observó un alto grado de co-expresión de CTIP1 y Doblecortina (DCX), que es una proteína asociada a microtúbulos expresada en neuronas post-mitóticas corticales (Gleeson and cols., 1999), de manera que todas las células DCX+ en la CP fueron también CTIP1+ (**Figura 10**). Sólo se observaron algunas células en la IZ que no expresaron DCX, que probablemente corresponden a células que recientemente han salido del ciclo mitótico y por lo tanto expresan niveles muy bajos de DCX. Adicionalmente, se encontró que CTIP1 se excluye completamente de la población glial presente en la corteza, identificada por la expresión de GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) en cerebro post-natal (**Figura 11**). En conjunto estos resultados indican que la expresión de CTIP1 se excluye de los nichos proliferativos del telencéfalo dorsal (VZ y SVZ) confinándose sólo a NP post-mitóticas.

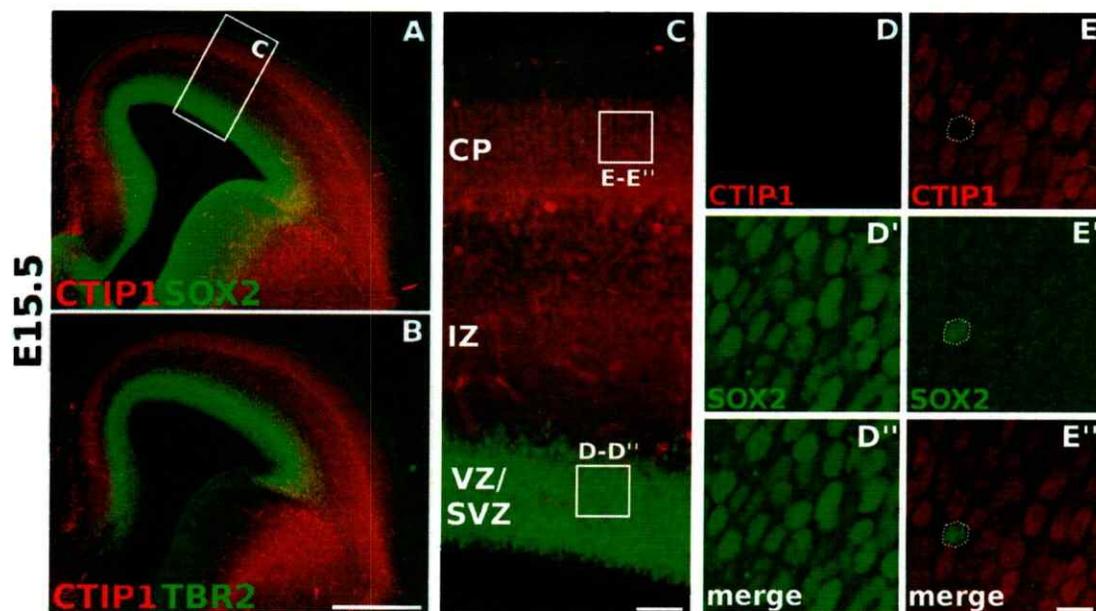


Figura 9. CTIP1 no es expresado por progenitores neurales en la corteza en desarrollo. **A-B.** Secciones coronales de un cerebro de embrión de ratón E15.5 mostrando el patrón de expresión de CTIP1. La expresión de CTIP1 es contrastada con la expresión de SOX2 y TBR2, que son expresados en las regiones proliferativas del palio. SOX2 se expresa en RG, mientras que TBR2 en IP. El área dentro del rectángulo en A se muestra magnificada en C. C. La expresión de CTIP1 es excluida de la zona ventricular (VZ) y zona sub-ventricular (SVZ). Se observa una expresión moderada en la zona intermedia (IZ) y una alta expresión en la placa cortical (CP). **D-D'' y E-E''.** Magnificación de las áreas encerradas por los cuadros blancos en C. Nótese la nula expresión de CTIP1 en células progenitoras SOX2 positivas. Barras de escala: B, 500µm ; C: 50µm; E'': 15µm.

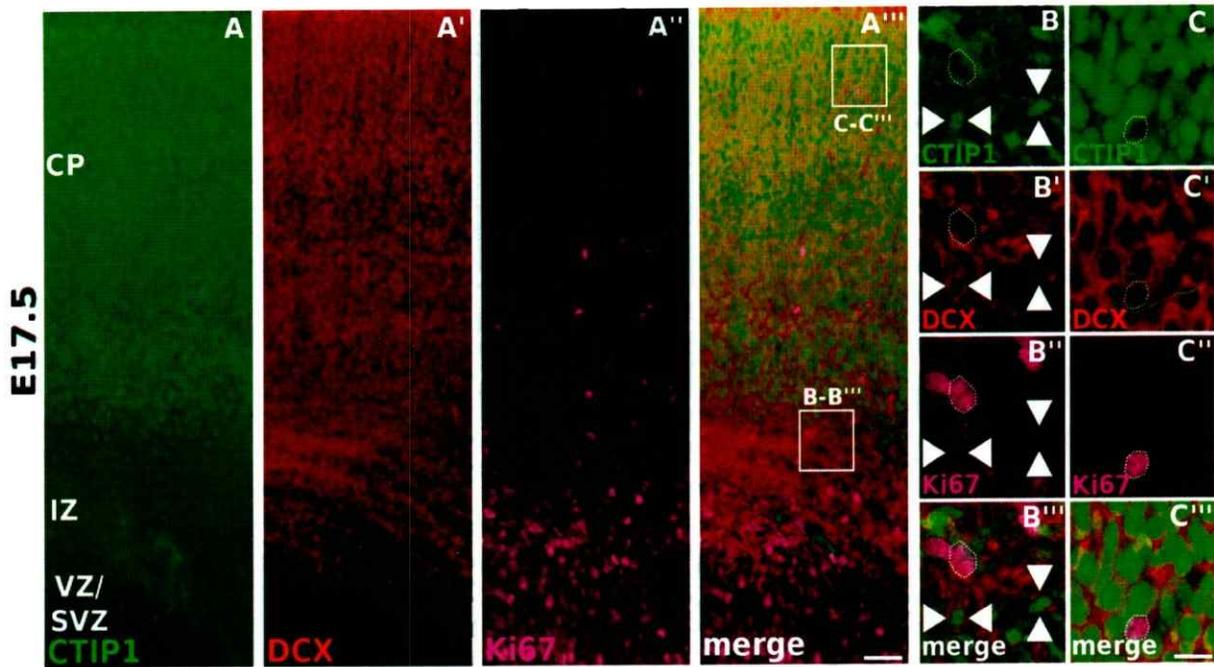


Figura 10. CTIP1 es expresado por neuronas post-mitóticas en la corteza en desarrollo. A-A'''. Sección coronal de un cerebro E17.5. CTIP1 es co-expresado con Doblecortina (DCX) en neuronas post-mitóticas en la IZ y CP, mientras que no es expresado en células en activa proliferación identificadas por la expresión de Ki67. **B-B''' y C-C'''.** Magnificación de las áreas encerradas por los cuadros blancos en A'''. Las puntas de flecha muestran células cerca de la región proliferativa que expresan CTIP1 y DCX, pero no Ki67. Barras de escala: A''': 50µm; C''': 15µm.

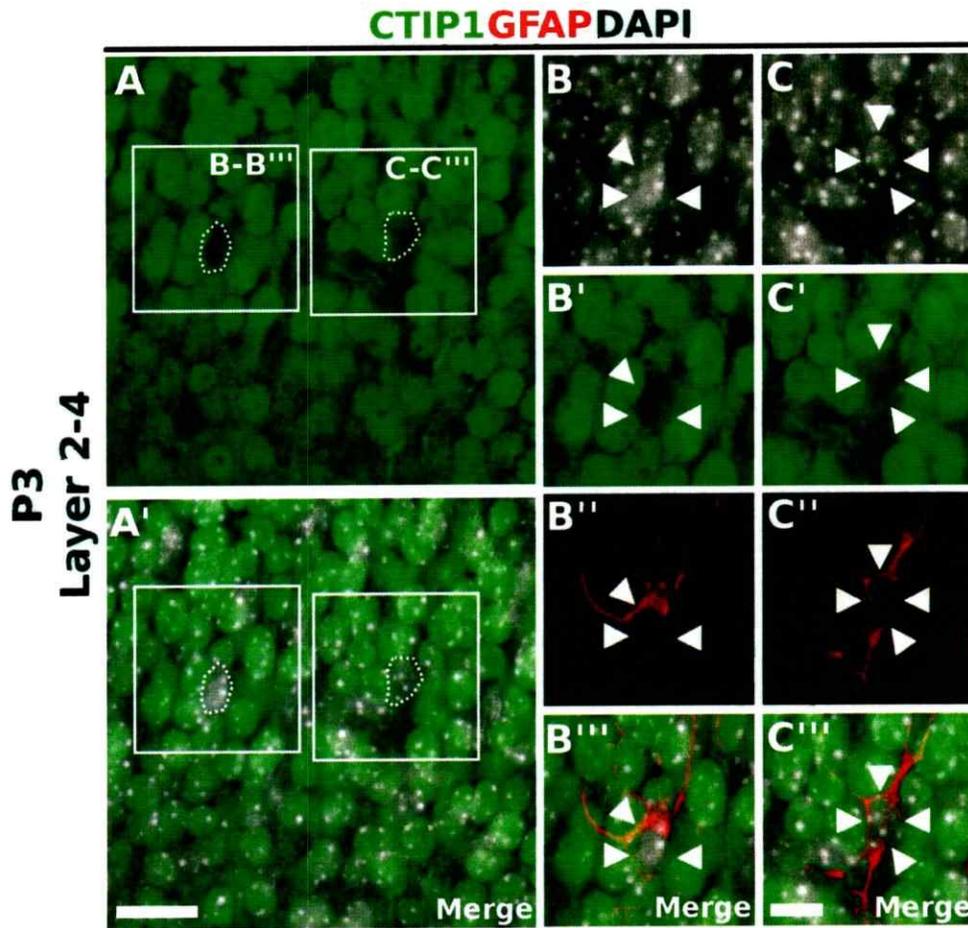


Figura 11. CTIP1 no es expresado en células gliales. A-A'. Región representativa de las capas 2-4 de la corteza de un corte coronal de un cerebro P3 en donde se muestra que CTIP1 no es co-expresado con GFAP, un marcador que identifica la población glial. En las fotografías se observan los núcleos (DAPI) de dos glías localizadas próximamente entre sí (A'). **B-B'''** y **C-C'''**. Magnificación de las áreas encerradas por los cuadros blancos en A y A'. Nótese la expresión nula de CTIP1 en las células que expresan GFAP (puntas de flecha). Barras de escala: A': 20µm; C''': 10µm.

Con el objetivo de complementar los datos de expresión mostrados más arriba y de describir en forma más precisa la distribución laminar y los subtipos de NP que expresan CTIP1 en la corteza postnatal, se comparó su expresión con FTs que presentan expresión enriquecida en capas específicas de la corteza. Se definieron los límites laminares en la corteza mediante la expresión de CUX1, CTIP2 y TBR1, que son FTs que presentan elevada expresión en las capas 2-4, 5 y 6, respectivamente (Molyneaux y cols., 2007) (**Figura 12**). Consistentemente con los datos presentados anteriormente, se observan elevados niveles de expresión de CTIP1 en las capas 2-3 y 5, al tiempo que se observan niveles de expresión moderados en la capa 6 y muy bajos niveles de expresión en la capa 4. Nótese el claro contraste en los niveles de expresión entre los límites de las capas 4-5 y 5-6 (**Figura 12B**). Al comparar la expresión de CTIP1 en la capa 5 con la de su homólogo, CTIP2, se encontró que la mayoría de las células de la capa 5 expresa CTIP1 (~63%, n = 4 cerebros), mientras que sólo un ~40% expresa CTIP2. Interesantemente, la gran mayoría de células que expresan CTIP2 en esta capa, expresa también CTIP1 (~75% de las células CTIP2+ son también CTIP1+), mientras que del total de células que expresan CTIP1, sólo un ~44 expresa CTIP2 (**Figura 12B y C**). Adicionalmente, se comparó la expresión de CTIP1 con TBR1, que es un FT que define la capa 6 de la corteza en donde presenta elevados niveles de expresión, a la vez que presenta bajos niveles de expresión en la capa 5 (MacKenna y cols. 2011) (**Figura 12B**). Interesantemente, identificamos un patrón recíproco entre la expresión de CTIP1 y la expresión de TBR1 en las capas profundas de la corteza al comparar los niveles promedio de intensidad de la marca fluorescente de ambas proteínas en dichas capas (**Figura 12D**). Aunque un número importante de células co-expresa ambas proteínas en las capas 5 y 6, se encontró que altos niveles de expresión de CTIP1 se correlacionan con bajos niveles de TBR1 al cuantificar la intensidad de fluorescencia de ambos marcadores célula por célula (**Figura 12E**).

Con todo, se puede sostener que la mayoría de las células CTIP2 positivas en la capa 5, son también CTIP1 positivas. Por otro lado, se evidenció una clara correlación negativa en la expresión de CTIP1 y TBR1 en capas profundas de la corteza. El

complejo patrón de expresión de CTIP1 en la corteza cerebral impide tener una noción clara respecto de su función en el contexto del desarrollo cortical. El patrón de expresión diferencial y graduado de CTIP1 en subtipos de NP residentes en distintas capas corticales, es un argumento importante para estudiar el rol de CTIP1 mediante estrategias experimentales que permitan manipular su expresión en forma dirigida a distintas poblaciones de NP, de manera de comprender su función en contextos celulares específicos.

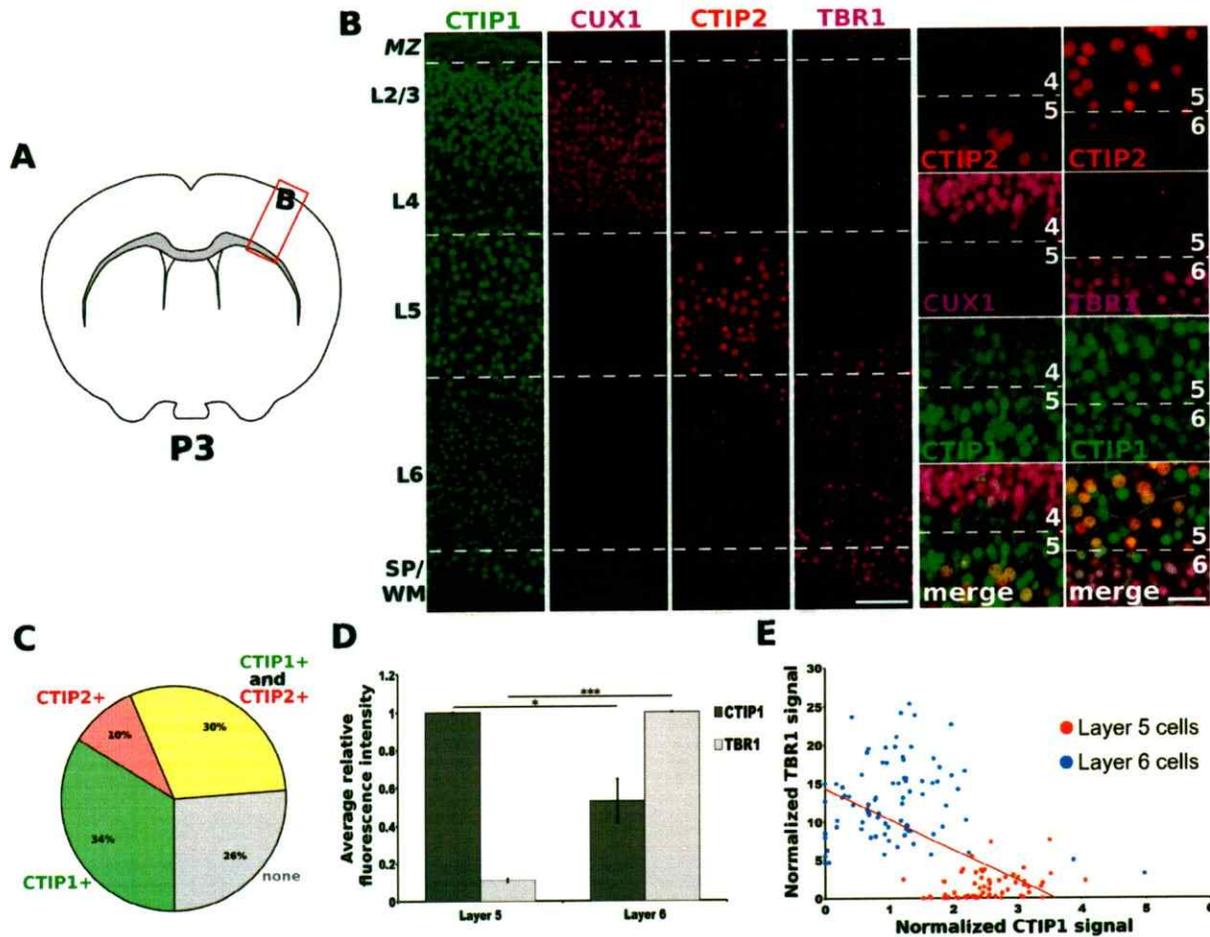


Figura 12. Comparación de la expresión de CTIP1 con FTs que presentan expresión laminar en la corteza. **A.** Representación esquemática de una sección coronal de una corteza P3. **B.** Región representativa de la corteza mostrada en A con un cuadro rojo. Las diferentes capas de la corteza son identificadas por la expresión de CUX1 (capas 2-4), CTIP2 (capa 5) y TBR1 (capa 6). Las imágenes fueron adquiridas a partir de dos cortes coronales seriados de cerebro de 30 μ m de espesor en donde se realizaron inmunofluorescencias triples contra CTIP1-CTIP2-TBR1 ó CTIP1-CTIP2-CUX1. Las fotografías que muestran la expresión de CTIP1, CTIP2 y TBR1 corresponden a un mismo corte, mientras que la fotografía que muestra la expresión de CUX1 fue obtenida de un corte adyacente. También se incluyen fotos de alta magnificación mostrando la región límite entre las capas 4 y 5 (columna de paneles de alta magnificación de la izquierda) y entre las capas 5 y 6 (columna de paneles de alta magnificación de la derecha). Nótese los altos niveles de expresión de CTIP1 en las células residentes en la capa 5, que contrastan con los bajos niveles de expresión en las capas 4 y 6. **C.** Cuantificación del número de células residentes en la capa 5 que expresan CTIP1 y/ó CTIP2. **D.** Análisis de los niveles promedio de intensidad de la señal fluorescente de CTIP1 y TBR1 en células de capas profundas de la corteza (capas 5 y 6). Los resultados se muestran como promedio \pm DE. $n = 3$; t test * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. **E.** Análisis de correlación de Pearson entre los niveles de intensidad de la marca CTIP1 y TBR1 célula por célula en las capas 5 y 6. Índice de correlación de Pearson ($r = -0.57$). t test (dos colas); $p < 10^{-4}$. Barras de escala: 100 μ m (imagen baja magnificación); 30 μ m (imagen alta magnificación).

6.2.- Generación de herramientas moleculares para la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 *in vitro* e *in vivo*.

Con la finalidad de estudiar la función de CTIP1 fue necesario generar herramientas genéticas capaces de modificar sus niveles de expresión *in vitro* e *in vivo*. Para disminuir la expresión de CTIP1 se utilizó la tecnología de horquillas de RNA (shRNA) (Lambeth y Smith, 2013). Con este propósito, se generaron 5 vectores que codifican diferentes shRNAs contra CTIP1 más GFP como gen reportero de transfección. Para ello se subclonaron cuatro cassettes de expresión [promotorU6-shRNA] en el vector FUXH1-GFP, que además de ser uno de los tres vectores utilizados para el ensamblaje de partículas lentivirales, también puede ser utilizado como plasmidio de expresión de shRNAs en forma autónoma e independiente en transfecciones simples ó en experimentos de EPIU (para ver descripción detallada del clonamiento, vectores y partículas lentivirales dirigirse a la sección de materiales y métodos). Se probó la eficiencia de los cinco shRNAs clonados en FUXH1-GFP en forma independiente mediante inmunocitoquímica contra CTIP1 en cultivos corticales primarios transducidos con partículas lentivirales que expresan los shRNAs. De esta manera se seleccionaron en forma preliminar dos shRNAs (sh2CTIP1 y sh4CTIP1) que, mediante inspección visual, disminuyen eficientemente la marca nuclear de CTIP1 en cultivos corticales primarios con respecto a cultivos transducidos con un lentivirus que expresa un shRNA control (shRNA inespecífico) a las 72 hrs post-transducción. Para obtener datos cuantitativos acerca de la capacidad de interferencia de sh2CTIP1 y sh4CTIP1, se obtuvieron extractos totales de proteína a partir de cultivos corticales primarios mantenidos 72 horas post-transducción con partículas lentivirales que codifican los shRNAs contra CTIP1 seleccionados y shControl. Los niveles de expresión de CTIP1 se evaluaron mediante WB (**Figura 13A**). De esta manera se determinó que la construcción que codifica para la horquilla 4 contra CTIP1 (de aquí en adelante shCTIP1) es la más eficiente en disminuir la expresión de CTIP1, en relación al control (**Figura 13A-B**). De acuerdo a la secuencia del shCTIP1, debería inhibir también la expresión de la isoforma corta de CTIP1 (CTIP1S), sin embargo esa

isoforma no es detectada por el anticuerpo usado en este estudio. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de shCTIP1 para inhibir la expresión de CTIP1 *in vivo*. Mediante experimentos de EPIU se electroporaron el shCTIP1 ó shControl en cerebros de embriones E13.5 que posteriormente fueron analizados en E16.5. Se observó que shCTIP1 inhibe eficientemente la expresión de CTIP1 en neuronas corticales *in vivo* (**Figura 13C**).

Adicionalmente, se clonaron las isoformas larga (CTIP1) y corta (CTIP1-S) de CTIP1 en el plasmidio pCAGIG, el cual es un vector de expresión de proteínas para mamíferos que codifica un mRNA bicistrónico que contiene un sitio de entrada ribosomal interno para la traducción de GFP (*IRES-GFP*). La expresión del mRNA bicistrónico se encuentra controlada por el promotor CAG, que opera eficientemente en neuronas corticales *in vivo* induciendo altos niveles de expresión de transgenes (Matsuda y Cepko, 2007). En las variantes de CTIP1 clonadas en pCAGIG se incorporaron mutaciones silentes en el marco de lectura de manera de hacerlas insensibles a la acción del shCTIP1. En total se generaron tres variantes largas de CTIP1 resistentes al shCTIP1 con y sin epítopes en el extremo C-terminal: pCAGIG-CTIP1-*IRES-GFP*, pCAGIG-CTIP1-HA-*IRES-GFP* y pCAGIG-CTIP1-myc-*IRES-GFP* (de aquí en adelante pmutCTIP1-*epítope*). Se generó una variante de la isoforma corta de CTIP1 resistente a shCTIP1 con un epítoto myc en el extremo C-terminal: pCAGIG-CTIP1S-myc-*IRES-GFP*. La transfección de las construcciones de expresión en COS-7 genera abundante expresión de los transgenes, presentando un patrón de movilidad electroforética consistente con el peso molecular de las isoformas de CTIP1 (**Figura 13D**)(Kuo and Hsueh 2007). Adicionalmente, se observó que el patrón de distribución sub-celular de las variantes de CTIP1 se corresponde con los datos publicados (Nakamura y cols. 2000): CTIP1 presentó localización nuclear, consistentemente con su función como FT, mientras que CTIP1S presentó una distribución esencialmente citoplasmática con expresión leve y difusa en el núcleo. Estas construcciones serán utilizadas para los experimentos de rescate y sobre-expresión de CTIP1 *in vivo* (**Figura 13D-E**).

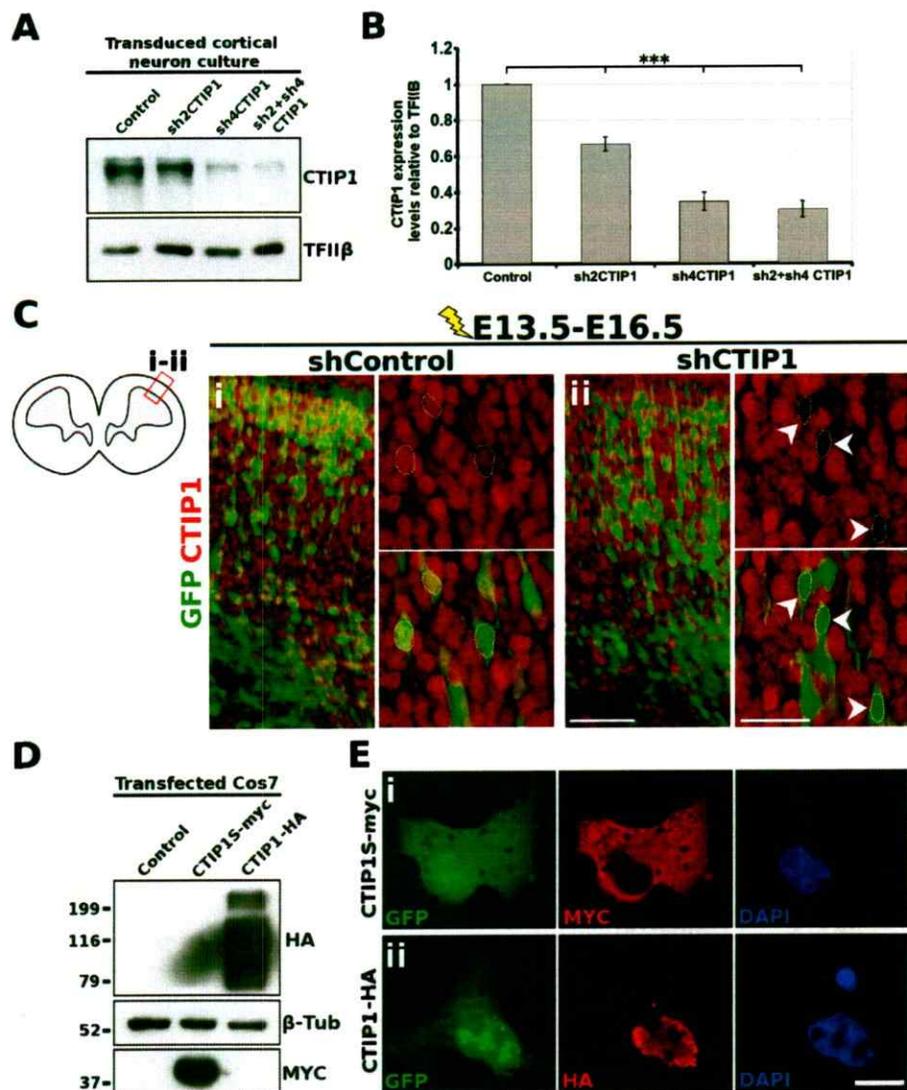


Figura 13. Herramientas moleculares para la manipulación de la expresión de CTIP1. **A.** WB representativo de extractos de cultivos primarios corticales transducidos con partículas lentivirales que expresan shControl, sh2CTIP1 y sh4CTIP1. Las células fueron lisadas 72 hrs post-transducción. **B.** Cuantificación densitométrica de la banda de CTIP1 relativa a la de TFII- β (control de carga) en cada una de las condiciones de transducción señaladas. sh2CTIP1 disminuye la expresión de CTIP1 en un $33.2 \pm 3.9\%$ relativo al control, mientras que sh4CTIP1 lo hace en un $65.5 \pm 5\%$. El uso combinado de los dos interferentes no produjo un efecto sumativo significativo de la eficiencia de interferencia. Los resultados se muestran como promedio \pm DE. $n=3$; t test $***p < 0.001$. **C.** Imágenes de cortes coronales de cerebros electroporados *in utero* con shControl ó shCTIP1. La electroporación se realizó en E13.5 y luego se analizaron los cerebros en E16.5. La expresión de CTIP1 se evaluó mediante IHC. **D.** WB de extractos de células Cos-7 lisadas 48 hrs post-transfección con pCAGIG vacío (control), pmutCTIP1S-myc y pmutCTIP1-HA. **E.** IF en células Cos-7 transfectadas en las mismas condiciones que en D mostrando las distribución sub-celular de las variantes de CTIP1 resistentes a shCTIP1.

6.3.- Estudio de los efectos de la inhibición de la expresión de CTIP1 sobre el programa general de diferenciación de NP glutamatérgicas.

Posteriormente a la salida del ciclo mitótico en los nichos proliferativos corticales (VZ/SVZ), las neuronas post-mitóticas experimentan una serie de procesos que culminan con el posicionamiento final de la célula en la corteza y su diferenciación. En un tiempo breve luego de la salida del ciclo mitótico, la célula debe adquirir la morfología bipolar característica de las neuronas en migración, para luego transportarse hasta su posición final en la corteza (Kriegstein y Noctor, 2004). En forma simultánea a este proceso, la neurona post-mitótica inicia el programa de diferenciación glutamatérgica general, que es común para todas las NP originadas en el telencéfalo dorsal (Götz y Huttner, 2005).

Los datos de expresión mostrados anteriormente muestran que durante fases tempranas del desarrollo cortical, CTIP1 se expresa ubicuamente en las NP post-mitóticas corticales para luego adquirir un patrón de expresión diferencial a través de las capas de la corteza post-natal. La expresión ubicua inicial de CTIP1 en la corteza en desarrollo, permite suponer que podría tener alguna función en el programa de diferenciación general de las NP glutamatérgicas post-mitóticas. Se realizaron experimentos de inhibición de la expresión de CTIP1 *in vivo* mediante EPIU de shCTIP1 (temporalidad experimental de E13.5 a E16.5) y se evaluó la expresión de marcadores que dan cuenta de la diferenciación glutamatérgica general de NPs. Se evaluó la expresión de DCX, que es una proteína fundamental para la motricidad neuronal radial en la corteza (Gleeson y cols. 1999), observándose que la totalidad de las células interferidas para CTIP1 expresan DCX, similarmente a lo observado en cerebros control (**Figura 14A**). Adicionalmente, se evaluó la expresión de V-GLUT (*Vesicular glutamate transporter*) que define el fenotipo glutamatérgico de todas las NP corticales de origen dorsal (Takamori y cols. 2000). No se observaron alteraciones en la expresión de V-GLUT en células interferidas para CTIP1 (**Figura 14B**). La expresión de MAP2, que es una proteína asociada a microtúbulos localizada en el compartimento

somato-dendrítico, define NPs en estado de diferenciación avanzado. Tampoco se encontraron alteraciones en la expresión de MAP2 (**Figura 14C**), ni alteraciones evidentes en la adquisición de la morfología bipolar migratoria de las NP (**Figura 13C y 14**) en condiciones de interferencia de CTIP1. En conjunto estos datos sugieren que CTIP1 no determina, al menos en forma gruesa, el programa de diferenciación glutamatérgico general de las NP corticales.

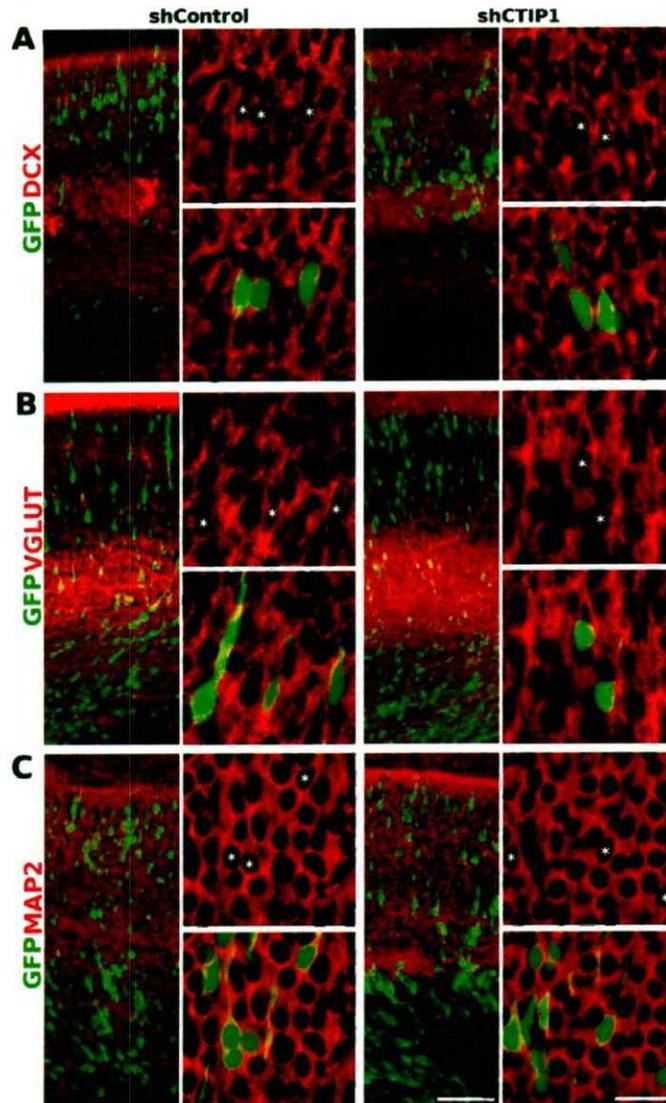


Figura 14. La inhibición de la expresión de CTIP1 no afecta el programa de diferenciación general de NPs *in vivo*. A, B y C. Secciones coronales de cerebros electroporados con shcontrol ó shCTIP1 en E13.5 y analizados en E16.5. La inhibición de CTIP1 no afectó la expresión de DCX (A), VGLUT (B) ni MAP2 (C) en ninguna de las células analizadas. Los asteriscos indican la posición de las células GFP+. Barras de escala: 100 μ m (fotos de baja magnificación); 20 μ m (fotos de alta magnificación).

6.4.- Estudio de los efectos sobre el fenotipo molecular de subtipos neuronales corticales, asociados a la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 *in vivo*.

6.4.1.- Búsqueda *in silico* de sitios de unión putativos para CTIP1 en el genoma del ratón.

Con el objetivo de explorar las redes transcripcionales en que CTIP1 podría estar involucrado y así entender su función en el contexto del desarrollo cortical, realizamos una búsqueda *in silico* de sitios consenso de unión al DNA para este FT (GGCCGC ó GGCCGG) en el genoma de ratón (John y cols., 2012; Avram y cols., 2002; Chen y cols., 2009). Los criterios de búsqueda y selección de genes putativamente regulados por CTIP1 fueron los siguientes:

- a) Se abarcó una región de 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de todos los genes anotados hasta ese momento, sean estos codificantes de proteínas o no.
- b) Se desecharon los genes que no tengan un ortólogo identificado humano, apostando a una conservación del mecanismo regulatorio.
- c) Se seleccionaron sólo los genes que presentan la secuencia GGCCGG ó GGCCGC al menos una vez en las regiones descritas en "a" para ratón y para el ortólogo en humano.

Nos llamó fuertemente la atención el hallazgo de un sitio de unión putativo para CTIP1 en la región promotora de *Tbr1* en la posición -55 relativa al inicio de la transcripción del gen (**Figura 15A**). Basados en la similitud del patrón de expresión cortical de TBR1 en ratón, rata y humano (Hevner y cols., 2001; Hong and Hsueh, 2007; Saito y cols., 2011), supusimos que los elementos *cis*-regulatorios que controlan su expresión, incluyendo los sitios de unión para CTIP1, deberían presentar conservación evolutiva en la región promotora del gen *Tbr1*, por lo que realizamos una búsqueda *in silico* de sitios putativos de unión para CTIP1 en la región regulatoria del

gen de diversas especies con el fin de explorar el grado de conservación del sitio. De esta manera se encontró que el promotor del gen *Tbr1* humano contiene cinco sitios putativos de unión a CTIP1 agrupados entre las posiciones -1713 y -1192, mientras que el gen *Tbr1* de *Gallus gallus* y *Rattus norvegicus* contiene 3 sitios putativos en regiones similares (**Figura 15A**). No se encontraron sitios de unión putativos en el gen *Tbr1* de *Danio rerio* ni *Takifugu rubripes*. Si bien las ubicaciones del/los sitios de unión putativos para CTIP1 en la región regulatoria de *Tbr1* son variables entre los distintos genomas analizados, se encuentran dentro de un rango similar lo cual sugiere que el sitio de unión putativo hallado en la región regulatoria del gen *Tbr1* murino es funcional (**Figura 15A**).

6.4.2.- Análisis de la capacidad de unión de CTIP1 a su sitio consenso en la región regulatoria de *Tbr1* *in vivo*, y efecto de la inhibición de CTIP1 sobre la expresión de TBR1 en cultivos corticales primarios.

Para evaluar la unión de CTIP1 *in vivo* al sitio de unión putativo encontrado en el promotor de *Tbr1* murino, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en corteza en desarrollo de ratón (E17.5). El análisis por ChIP reveló que CTIP1 se encuentra unido al promotor de *Tbr1* en un porcentaje comparable al encontrado en el promotor del gen *Frzb* (**Figura 15B**), un target directo de CTIP1 recientemente identificado (John y cols. 2012). Considerando que este FT actuaría como un represor de la transcripción de acuerdo a la literatura existente (Avram y cols., 2002; Senawong y cols., 2005; Yu y cols., 2012), pronosticamos que una disminución en la expresión de CTIP1 debería asociarse a un aumento en la expresión de TBR1. Consistentemente con lo anterior, una disminución de la expresión de CTIP1 en cultivos corticales primarios mediante la transducción de partículas lentivirales que codifican para shCTIP1, condujo a un aumento significativo en los niveles de expresión de TBR1 (en $62 \pm 20\%$; $p < 0.01$, $n=4$) con respecto al cultivo transducido con partículas lentivirales que codifican el shcontrol (**Figura 15C y D**). Estos resultados sugieren que CTIP1 actúa como un represor transcripcional directo del gen *Tbr1*.

A

Species	Ensembl gene ID	Putative binding sites	Positions and sequences relative to origin of transcription
<i>Mus musculus</i>	ENSMUSG00000035033	1	-55 (GGCCGC)
<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000136535	5	-1713 (GGCCGC), -1673 (GGCCGC), -1405 (GGCCGC), -1305 (GGCCGG), -1192 (GGCCGC)
<i>Rattus norvegicus</i>	ENSRNOG00000005049	3	-1852 (GGCCGC), -1759 (GGCCGG), -1446 (GGCCGC)
<i>Gallus gallus</i>	ENSGALG00000011122	3	-1634 (GGCCGC), -1308 (GGCCGC), -1259 (GGCCGC)
<i>Danio rerio</i>	ENSDARG00000004712	0	n/a
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUG00000005183	0	n/a

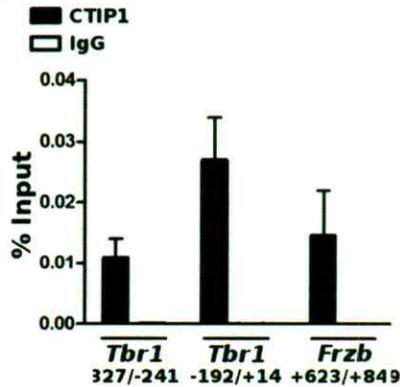
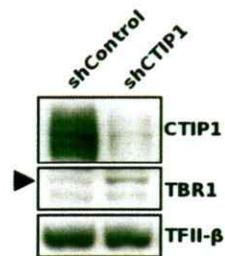
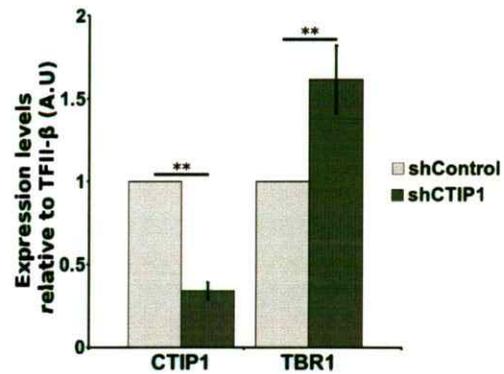
B**C****D**

Figura 15. CTIP1 posee un sitio de unión en el promotor de TBR1 y regula negativamente su expresión en neuronas corticales *in vitro*. **A.** Sitios de unión putativos para CTIP1 encontrados en la región promotora del gen *Tbr1* en diferentes especies. **B.** Experimento de ChIP mostrando que CTIP1 se une al promotor de *Tbr1* en extractos de corteza E17.5. Los datos son presentados como % \pm DE de amplificación relativos a la cromatina *input* (n=3), utilizando partidores que abarcan la secuencia entre las posiciones anotadas debajo de cada barra. Las posiciones indicadas son relativas al sitio de inicio de transcripción. La unión de CTIP1 a la secuencia regulatoria del gen *Frzb* fue utilizada como control positivo. Las barras de unión inespecífica (IgG) no son visibles en la escala del gráfico. **C.** WB representativo de extractos totales de proteína obtenidos a partir de cultivos primarios corticales de E13.5 transducidos con vectores lentivirales que codifican shControl ó shCTIP1. Los extractos de proteína fueron preparados 96 horas post-transducción. **D.** Cuantificación densitométrica de los niveles de TBR1 y CTIP1 relativos a TFII- β (control de carga). Los datos se muestran como promedio \pm DE. n = 4, t test **<0.01.

6.4.3.- Efecto sobre los niveles de expresión de TBR1 en capas profundas de la corteza, asociados a la alteración de los niveles de expresión de CTIP1.

Considerando el patrón de expresión recíproco entre CTIP1 y TBR1 en capas corticales profundas y los datos que sustentan que CTIP1 reprime transcripcionalmente a *Tbr1*, nos propusimos examinar el significado de esta relación regulatoria *in vivo*. Llevamos a cabo experimentos de electroporación *in utero* (Saito y Nakatsuji, 2001) de la construcción que codifica el shCTIP1 en cerebros de ratón embrionarios en el momento de máxima producción de neuronas de capas profundas (E13.5) (Molyneaux y cols. 2007) con el objetivo de indagar si CTIP1 posee un rol asociado a la especificación de los subtipos neuronales residentes en dichas capas corticales. Consistentemente con los resultados de los experimentos *in vitro* mostrados en la sección anterior, la disminución de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asoció a un aumento en la expresión de TBR1. Este efecto se reflejó en un aumento en el número de células que expresan GFP y que son inmunopositivas para TBR1 en dicha capa (controles: $28 \pm 7\%$; pshCTIP1: $63 \pm 5\%$; $n=4$, $p < 0.001$)(Figura 16A y B). El efecto del shCTIP1 sobre la expresión de TBR1 en la capa 5 fue revertido al co-electroporarlo con pmutCTIP1, observándose una reducción significativa en el número de células GFP+/TBR1+ en la capa 5 (a $26 \pm 4\%$), comparado con la electroporación de sólo el shCTIP1 ($n=5$, $p < 0.001$)(Figura 16B). Nótese que en el experimento de doble electroporación se recupera la expresión de CTIP1 en las células GFP+ con respecto a la condición de electroporación de sólo shCTIP1 (Figura 16A). Estos datos son consistentes con la idea de que los altos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 5 tienen un rol represivo sobre la expresión de TBR1 en dicha capa.

Como se observó anteriormente, la capa 6 de la corteza presenta bajos niveles de expresión CTIP1 a la vez que presenta altos niveles de expresión de TBR1 (Figura 12B). Considerando que nuestros datos sugieren que CTIP1 reprime transcripcionalmente a TBR1, hipotetizamos que la elevación de los niveles de expresión de CTIP1 en la capa 6 debería inhibir la expresión de TBR1. De manera

consistente con esta predicción, el incremento en los niveles de expresión de CTIP1 en en NPs de la capa 6 mediante la electroporación de pmutCTIP1 condujo a una disminución significativa en el número de neuronas que son GFP+/TBR1+ (Control 71±3% vs pmutCTIP1 16±13%, $p < 0.001$, $n=5$)(Figura 17A y B). Estos resultados, en conjunto con la evidencia obtenida *in vitro* e *in silico*, son compatibles con la idea de que los niveles diferenciales de expresión de CTIP1 en las capas 5 y 6, modulan los niveles de expresión de TBR1 en las capas profundas de la corteza mediante represión transcripcional directa.

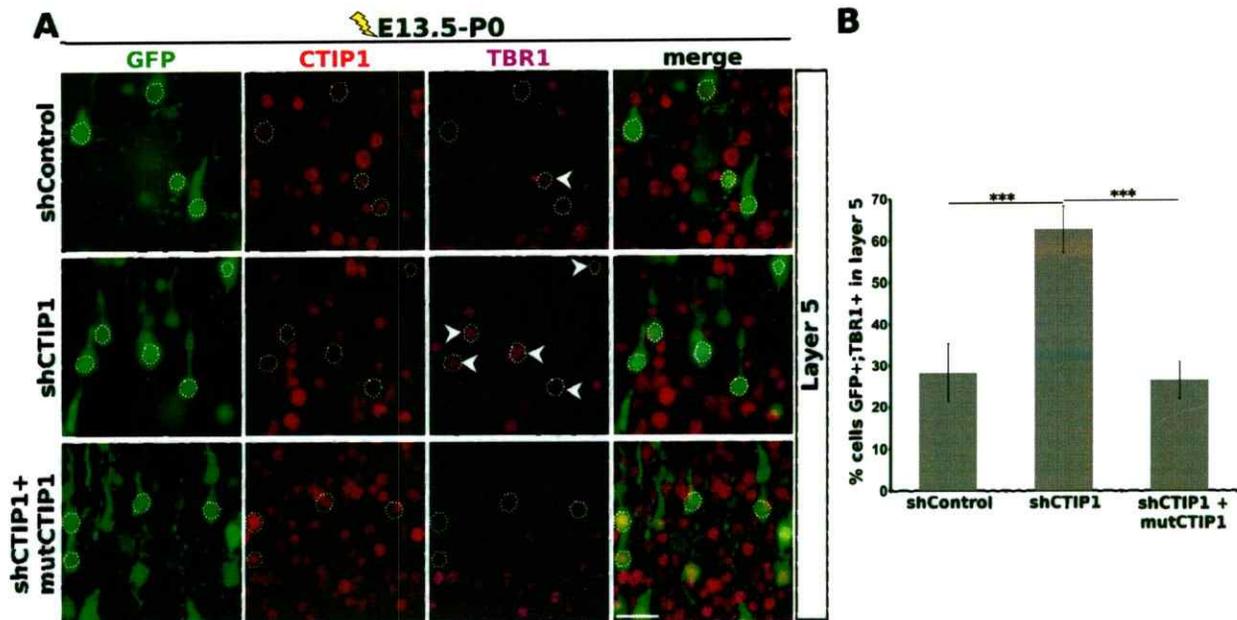


Figura 16. La inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a un incremento en la expresión de TBR1. **A.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con los constructos que codifican para shcontrol (paneles superiores), shCTIP1 (paneles intermedios) y shCTIP1+mutCTIP1 (paneles inferiores). Los cerebros fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha muestran células GFP+/TBR1+. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan TBR1 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de al menos 5 cerebros por condición experimental. t test *** $p < 0.001$.

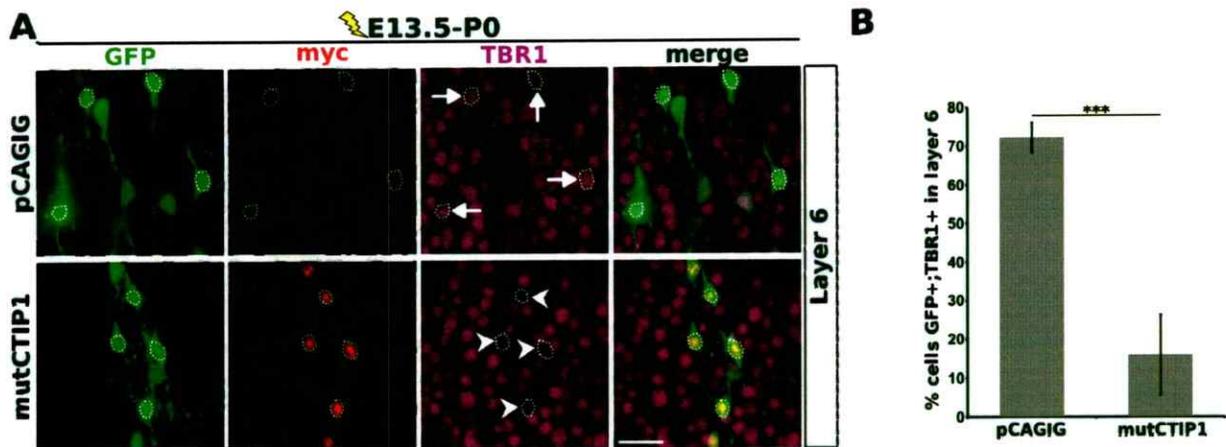


Figura 17. La sobre-expresión de CTIP1 en NPs de la capa 6 inhibe la expresión de TBR1.
A. Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con pCAGIG vacío (control) (paneles superiores), y pCAGIG-mutCTIP1-myc (paneles inferiores). Los cerebros fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 6 en cortes coronales de cerebro. Las flechas indican células GFP+ que expresan TBR1, mientras que las puntas de flecha muestran células GFP+ que no expresan TBR1. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan TBR1 en la capa 6. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de al menos 5 cerebros por condición experimental. t test *** $p < 0.001$.

6.4.4.- Efectos sobre la expresión de CTIP2 en la capa 5 de la corteza, asociados a la alteración de los niveles de expresión de CTIP1

Como se indicó anteriormente, FEZF2 y CTIP2 poseen un rol crucial en la regulación de la identidad y la diferenciación de las NPSC de la capa 5 de la corteza. En animales *Fezf2^{-/-}* se evidencia ausencia de células que expresan CTIP2 en la capa 5 y, consecuentemente, una pérdida del CST (Arlotta y cols., 2005; B. Chen y cols., 2005; Molyneaux y cols., 2005). Sin embargo, los defectos en el CST son rescatados al restaurar la expresión de CTIP2 mediante EPIU, lo cual sugiere que CTIP2 es el principal efector genético río abajo de FEZF2 (Chen y cols., 2008). Por otra parte, datos previos indican que TBR1 es un represor transcripcional directo de FEZF2 (Han y cols., 2011; McKenna y cols., 2011). Consistentemente con lo anterior, se ha demostrado que la expresión ectópica de TBR1 en NP de la capa 5 mediante EPIU inhibe en forma robusta expresión de FEZF2 y el desarrollo del CST (Han y cols. 2011). Adicionalmente, se ha sugerido que TBR1 podría regular negativamente la expresión de CTIP2 mediante un mecanismo independiente de la represión de FEZF2, puesto que se ha observado un rescate parcial de la expresión de CTIP2 en animales doble KO *Fezf2^{-/-}/Tbr1^{-/-}*, y concomitantemente, de los defectos en el CST con respecto a lo observado en animales *Fezf2^{-/-}* (McKenna y cols., 2011). La evidencia sugiere que la regulación de la expresión de CTIP2 por TBR1 no es directa, pues no se han identificado elementos de unión para este FT en el locus de CTIP2 (McKenna y cols., 2011). Con todo, hipotetizamos que el incremento de la expresión de TBR1 en NPs de la capa 5 asociado a la interferencia de CTIP1, debería afectar negativamente la expresión de CTIP2 en dicha capa. Consistentemente con esto, la disminución de la expresión de CTIP1 en la capa 5 mediante la electroporación del shCTIP1 en E13.5, condujo a una disminución robusta en el número de células GFP+/CTIP2+ en dicha capa cortical (control: 32±9% vs pshCTIP1: 4±3 %; p<0.001; n=7) (Figura 18A y B). La falta de un grado de homología significativo entre la secuencia del shCTIP1 y los transcritos predichos de CTIP2 permiten descartar un efecto directo de shCTIP1 sobre CTIP2. Adicionalmente, se evaluó la participación de FEZF2 en el fenotipo observado.

Debido a la inexistencia de anticuerpos comerciales adecuados para detectar FEZF2 por IHF, se realizaron mediciones por PCR cuantitativo de la abundancia del mRNA de *Fezf2* en cultivos corticales primarios E13.5 transducidos con partículas lentivirales que expresan shCTIP1 ó shControl. Luego de 96 horas de la transducción de los cultivos corticales, se observó una reducción significativa, aunque moderada, en los niveles del mensajero de *Fezf2* en los cultivos transducidos con lentivirus que expresan shCTIP1 con respecto al control (shControl: 1.009 ± 0.13 , shCTIP1: 0.870 ± 0.03 ; $n = 11$, $p < 0.014$) (**Figura 18C**). Consistentemente con los experimentos realizados *in vivo*, los niveles de expresión del mensajero de *Tbr1* mostraron un incremento robusto en los cultivos transducidos con partículas lentivirales que expresan shCTIP1 con respecto al control (shControl: 1.014 ± 0.05 , shCTIP1: 1.630 ± 0.04 ; $n = 12$, $p < 0.001$) (**Figura 18C**). En conjunto, estos datos sugieren que el incremento en la expresión de TBR1 en NPs de la capa 5 asociado a la inhibición de CTIP1 se traduce en un efecto represivo sobre la expresión de CTIP2, posiblemente a través de un mecanismo que no depende exclusivamente de la inhibición de FEZF2 por TBR1. Interesantemente, estos datos son compatibles con la idea de que los altos niveles de expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 jugarían un rol permisivo para la expresión de CTIP2 en la capa cortical 5 a través de la represión transcripcional de TBR1.

Al intentar rescatar el fenotipo de disminución de la expresión de CTIP2 en NPs de la capa 5 mediante la co-electroporación de shCTIP1 y pmutCTIP1, se observó que no se recupera el número de células que expresan CTIP2 (**Figura 18A-B**). Este resultado nos condujo a explorar la posibilidad de que la sobre-expresión de CTIP1 por sí sola estuviera alterando la expresión de CTIP2 en la capa 5 mediante un efecto inespecífico o disruptivo asociado a la sobre-expresión. Sorprendentemente, encontramos que al electroporar sólo pmutCTIP1, se afecta dramáticamente el nivel de expresión de CTIP2 en NP de la capa 5 (células GFP+/CTIP2+. Control: $32 \pm 9\%$ vs pmutCTIP1: $1.9 \pm 2\%$; $**p < 0.01$; $n = 6$) (**Figuras 19A-B**).

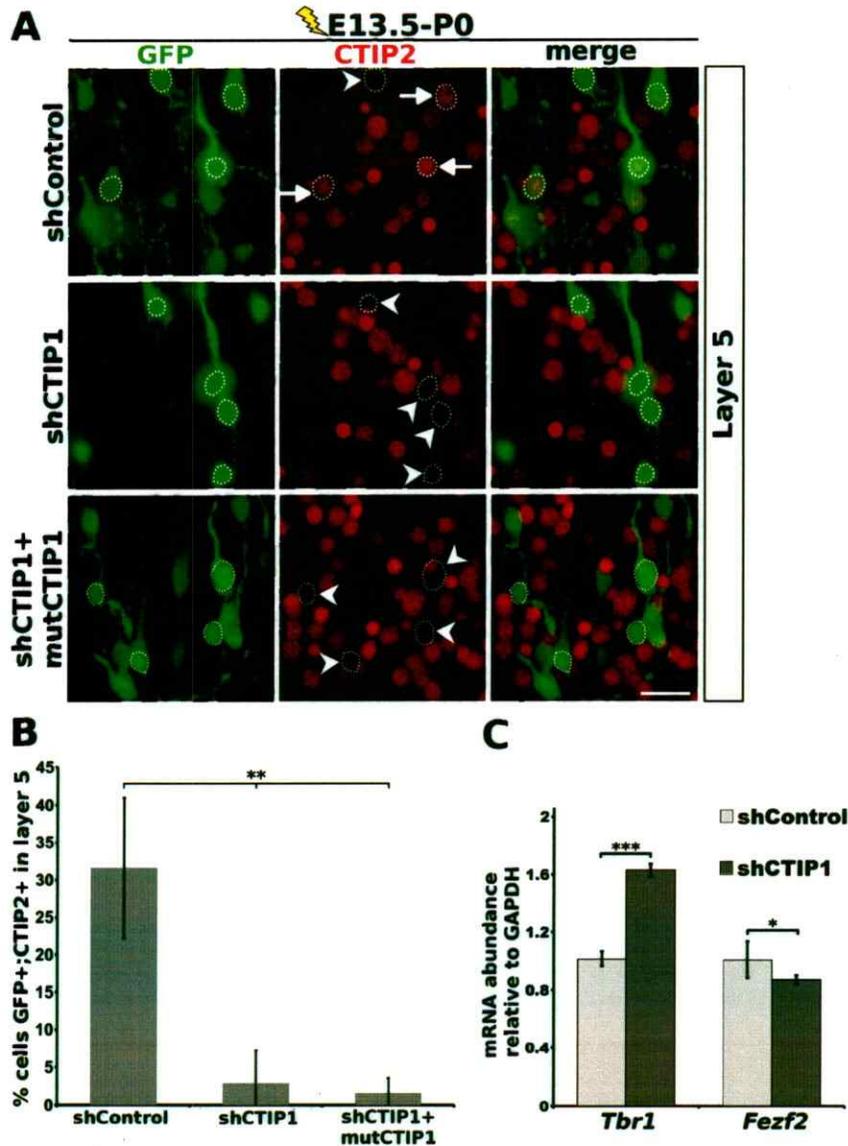


Figura 18. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a una disminución en la expresión de CTIP2 en NPs de la capa 5 y a una disminución de la expresión de *Fezf2* en cultivos corticales. **A.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con los constructos que codifican para shcontrol (paneles superiores), shCTIP1 (paneles intermedios) y shCTIP1+mutCTIP1 (paneles inferiores). Los cerebros fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha muestran células GFP+ que no expresan CTIP2, mientras que las flechas muestran células GFP+ que expresan CTIP2. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan CTIP2 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de al menos 4 cerebros por condición experimental. T test ** $p < 0.01$. **C.** Cuantificación por PCR cuantitativo de los niveles de expresión de los mRNA de *Tbr1* y *Fezf2* en cultivos primarios corticales de E13.5 transducidos con partículas lentivirales que expresan shControl ó shCTIP1. La extracción de RNA se realizó 96 hrs post-transducción. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. $n = 5$; t test * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

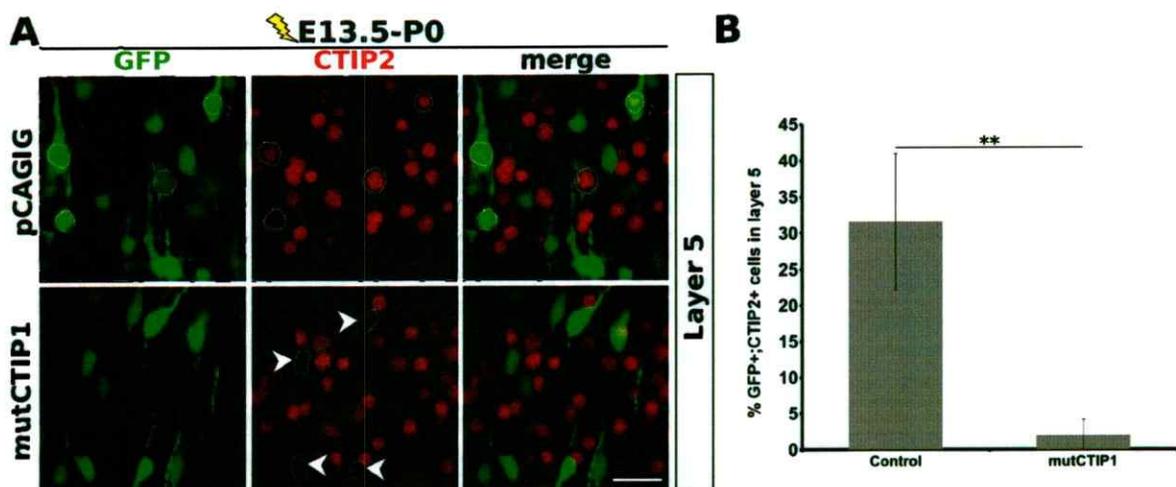


Figura 19. La sobre-expresión de CTIP1 en NP's de la capa 5 inhibe la expresión de CTIP2. **A.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con pCAGIG vacío (control) (paneles superiores) y pCAGIG-mutCTIP1 (paneles inferiores). Los cerebros fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha muestran células GFP+ que no expresan CTIP2. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan CTIP2 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de 6 cerebros por condición experimental. t test ** $p < 0.01$.

6.5.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales asociados a la manipulación de los niveles de expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5.

De acuerdo al conocimiento actual acerca de los mecanismos regulatorios de la identidad fenotípica de las NPSC, se ha situado a CTIP2 como un efector transcripcional crítico para la proyección de axones hacia blancos subcorticales (ej. médula espinal) por parte de estas células. Se ha observado que la delección homocigótica de *Ctip2* se asocia a una alteración dramática de los manojos axonales que proyectan hacia la médula espinal a través del CST (Arlotta y cols., 2005; Chen y cols., 2008). El rol crucial e instructivo de CTIP2 en el desarrollo del fenotipo cortico-espinal se hace aún más evidente en el hecho de que la expresión ectópica de CTIP2 en NPs de la capa 2/3 altera en forma dramática el patrón de proyecciones axonales de esta células, promoviendo la adquisición del fenotipo cortico-espinal en vez del fenotipo de proyección intracortical normalmente observado en esta población celular (Chen y cols. 2008).

En este contexto, vaticinamos que la disminución de la expresión de CTIP2 en NP de la capa 5 asociada a la inhibición de la expresión de CTIP1 debería alterar el desarrollo de los axones sub-cerebrales que se dirigen hacia la médula espinal a través del CST. Mediante nuestra estrategia experimental es posible identificar con claridad proyecciones axonales a grandes distancias del soma debido a la alta solubilidad de GFP, facilitando el análisis de proyecciones subcerebrales presentes en el CST a nivel del tronco encefálico que se originan en NPSC de la capa 5 de la corteza. Por lo tanto para el estudio de las proyecciones axonales de las NPSC hacia la médula espinal, se seccionaron coronalmente los troncos encefálicos de cerebros electroporados *in utero* (E13.5-P0) y se buscó presencia de marca de GFP en el CST (ó tracto piramidal) (**Figura 20**). Dado que el número de células electroporadas varía inherentemente entre experimentos, se comparó la intensidad de fluorescencia en el CST a nivel del tronco encefálico entre cerebros con densidad e intensidad de electroporación similares en la región sensori-motora de la corteza. De acuerdo a lo esperado, encontramos una

reducción evidente de axones que expresan GFP en el CST en cerebros electroporados con shCTIP1 en E13.5 y analizados en P0, con respecto a cerebros control (**Figura 20A-D**). Adicionalmente, se examinaron los axones de proyección subcerebral en el CST de cerebros electroporados en E13.5 y analizados en P7 de manera de descartar un efecto inespecífico de retardo en el crecimiento axonal durante la ventana temporal previamente analizada (E13.5-P0), sin embargo igualmente se encontró una marcada reducción de axones fluorescentes en el CST en cerebros electroporados con shCTIP1, respecto a los cerebros control (**Figura 21A-D**). Dado que NPCs que residen en la capa 5 son generadas junto con NPSC durante la neurogénesis (Molyneaux y cols., 2007), mediante nuestra aproximación experimental inevitablemente se electroporan neuronas con destino calloso de la capa 5 y también, en un grado importante, NPC de capas superiores. No se encontraron diferencias entre cerebros electroporados con shCTIP1 ó shControl al comparar los manojos axonales GFP+ proyectando medialmente hacia al cuerpo calloso. En conjunto estos datos sugieren que los altos niveles de expresión de CTIP1 la capa 5 son determinantes para el desarrollo correcto de proyecciones subcerebrales, pero no de proyecciones callosas.

Al reintroducir CTIP1 en el sistema mediante la co-electroporación de shCTIP1 y mutCTIP1, no se observó la recuperación del fenotipo de pérdida del CST asociado a la interferencia de CTIP1 (**Figura 20E-F**). En forma similar a lo realizado anteriormente, se procedió a analizar el fenotipo de proyección de axones cortico-espinales sobre-expresar CTIP1 mediante la electroporación de sólo pmutCTIP1, observándose pérdida del CST (**Figura 22C-D**). Este es un resultado esperable tomando en consideración que la sobre-expresión de CTIP1 se asocia a una marcada reducción de la expresión de CTIP2 en la capa 5 (**Figura 19**), efector crítico en la extensión y desarrollo de las proyecciones subcerebrales.

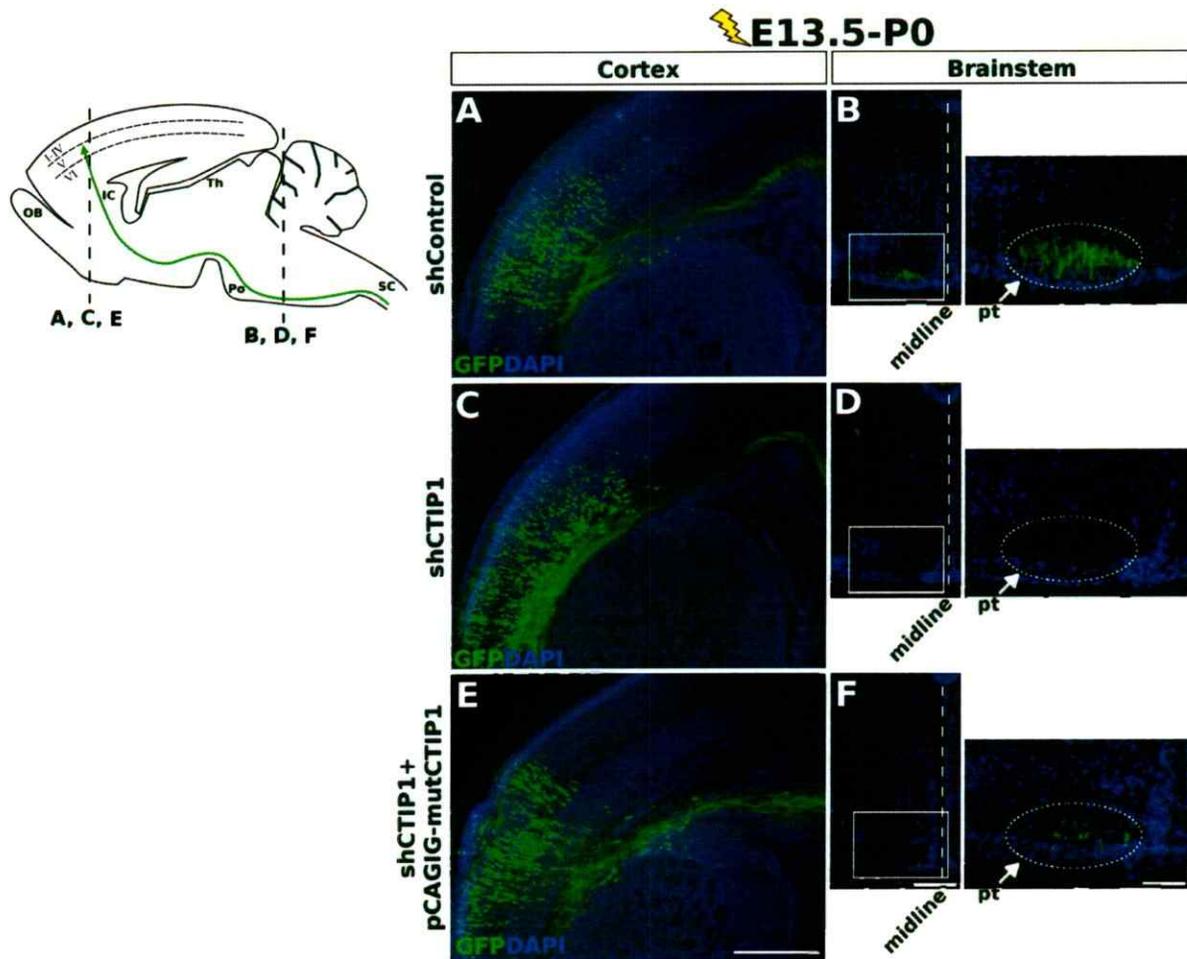


Figura 20. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales. *Izquierda:* Representación esquemática de una sección parasagital de un cerebro de ratón para guiar la comprensión de las secciones mostradas en A-F. Las líneas punteadas indican la posición en el eje antero-posterior de los cortes coronales mostrados de A a F. **A-F.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con los constructos que codifican para shcontrol (A y B), shCTIP1 (C y D) y shCTIP1+mutCTIP1L (E y F). Los cerebros fueron analizados en P0. **A, C y E.** Para una comparación adecuada, se muestran cortes coronales de cerebros con niveles de electroporación comparables en la corteza tanto en número de células, como en intensidad de la marca de GFP. Nótese los axones proyectando hacia el cuerpo calloso. **B, D y F.** Secciones coronales de troncos cerebrales obtenidos de los mismos cerebros mostrados en A, C y E. Se pueden observar claramente axones proyectando por el tracto piramidal (pt) en la condición control, sin embargo se observa una fuerte disminución de la marca de axones en el tracto piramidal en cerebros electroporados con shCTIP1 ó shCTIP1+mutCTIP1. Los recuadros blancos en B, D y F muestran la región magnificada mostrada a la derecha. La elipse y la flecha muestran el área aproximada que ocupa el tracto piramidal. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Barras de escala: (A, C y E) 500 μ m; (B, D y F): 250 μ m; (Regiones magnificadas de B, D y F) 100 μ m.

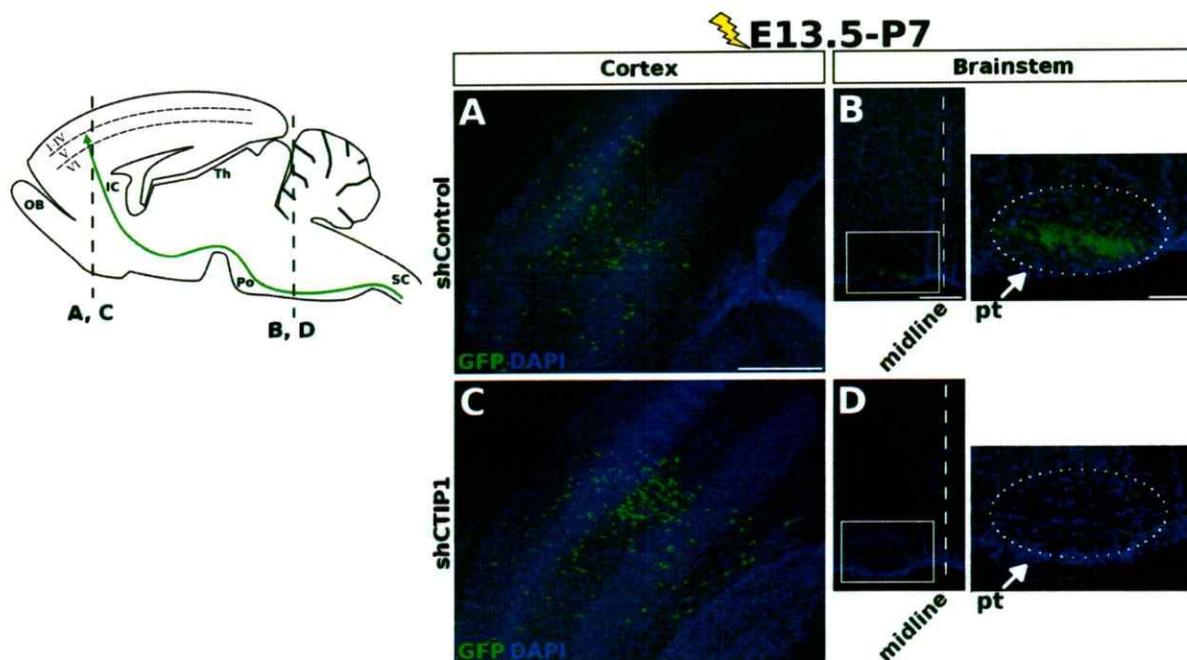


Figura 21. La inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales. *Izquierda:* Representación esquemática de una sección parasagital de un cerebro de ratón para guiar la comprensión de las secciones mostradas en A-F. Las líneas punteadas indican la posición en el eje antero-posterior de los cortes coronales mostrados de A a D. **A-F.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con los constructos que codifican para shcontrol (A y B) y shCTIP1 (C y D). Los cerebros fueron analizados en P7. **A y C.** Para una comparación adecuada, se muestran cortes coronales de cerebros con niveles de electroporación comparables en la corteza tanto en número de células, como en intensidad de la marca de GFP. **B y D.** Secciones coronales de troncos cerebrales obtenidos de los mismos cerebros mostrados en A y C. Se pueden observar claramente axones proyectando por el tracto piramidal (pt) en la condición control, sin embargo se observa una fuerte disminución de la marca de axones en el tracto piramidal en cerebros electroporados con shCTIP1. Los recuadros blancos en B y D muestran la región magnificada mostrada a la derecha. La elipse y la flecha muestran el área aproximada que ocupa el tracto piramidal. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Barras de escala: (A, C) 500 μ m; (B, D): 250 μ m; (Regiones magnificadas de B y D)100 μ m.

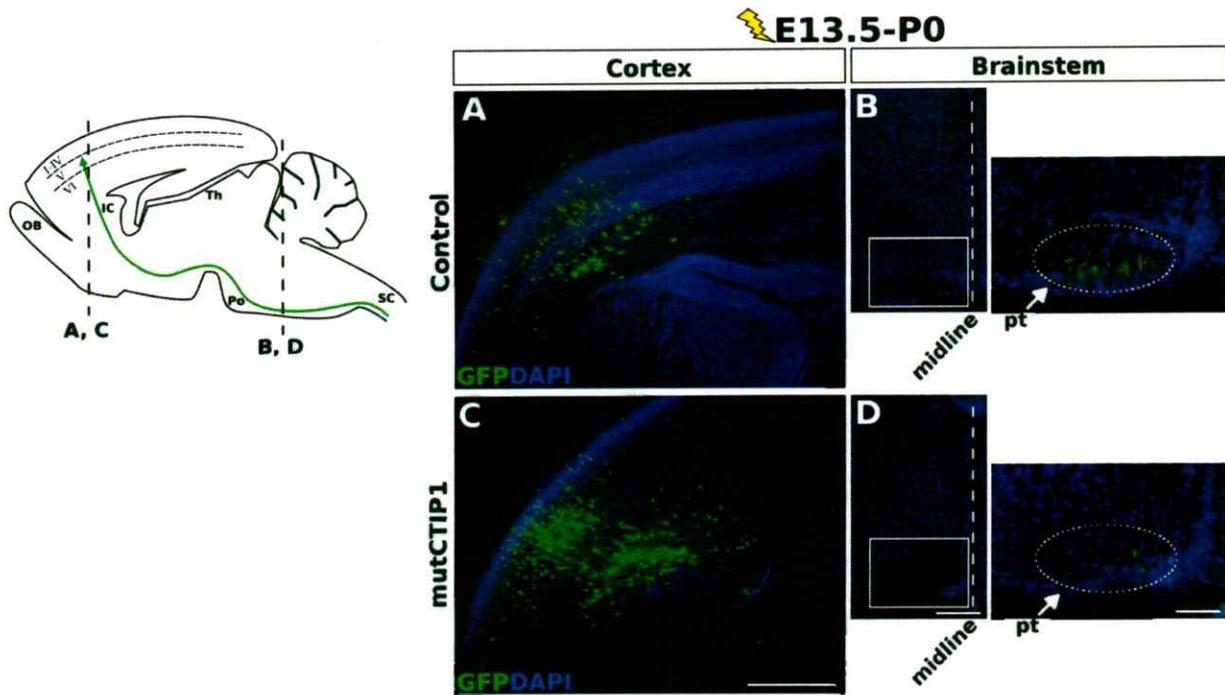


Figura 22. La sobre-expresión de CTIP1 se asocia a defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales. *Izquierda:* Representación esquemática de una sección parasagital de un cerebro de ratón para guiar la comprensión de las secciones mostradas en A-F. Las líneas punteadas indican la posición en el eje antero-posterior de los cortes coronales mostrados de A a D. **A-D.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con pCAGIG vacío (Control) (A y B) y pCAGIG-mutCTIP1 (C y D). Los cerebros fueron analizados en P0. **A y C.** Para una comparación adecuada, se muestran cortes coronales de cerebros con niveles de electroporación comparables en la corteza tanto en número de células, como en intensidad de la marca de GFP. **B y D.** Secciones coronales de troncos cerebrales obtenidos de los mismos cerebros mostrados en A y C. Se pueden observar claramente axones proyectando por el tracto piramidal (pt) en la condición control, sin embargo se observa una fuerte disminución de la marca de axones en el tracto piramidal en cerebros electroporados con mutCTIP1. Los recuadros blancos en B y D muestran la región magnificada mostrada a la derecha. La elipse y la flecha muestran el área aproximada que ocupa el tracto piramidal. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Barras de escala: (A, C) 500µm; (B, D): 250µm; (Regiones magnificadas de B y D)100µm.

6.6.- Estudio de interacciones genéticas entre CTIP1, CTIP2 y TBR1 en la regulación del desarrollo y diferenciación de las NPSC.

6.6.1.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales al restablecer la expresión de CTIP2 en el contexto de inhibición de la expresión de CTIP1.

Con el propósito de estudiar el mecanismo mediante el cual CTIP1 controla el desarrollo de las NPSC y por lo tanto la formación del CST, procedimos a realizar experimentos que revelen las interacciones genéticas entre los actores moleculares estudiados hasta el momento (CTIP1, TBR1 y CTIP2). Hasta ahora, nuestros resultados sugieren que CTIP1 es requerido para mantener la expresión de CTIP2 en NPSC a través de la represión de TBR1. Por lo tanto hipotetizamos que la reincorporación de CTIP2 en las NPSC debería recuperar el fenotipo de pérdida del CST en el contexto de inhibición de la expresión de CTIP1. Para probar esta hipótesis primeramente se clonó el cDNA de CTIP2 en pCAGIG-IRES-GFP y posteriormente se testeó la construcción mediante EPIU. Se puede observar que la construcción de expresión de CTIP2 (de aquí en adelante pCTIP2) induce altos niveles de expresión del transgen en todas las células electroporadas, incluso en células no pertenecientes a la capa 5 de la corteza, que es la capa en donde CTIP2 presenta altos niveles de expresión en condiciones normales (**Figura 23**). Como se esperaba, se observó que la co-electroporación de shCTIP1 y pCTIP2 rescata completamente la disminución de los niveles de expresión de CTIP2 en la capa 5 inducida por la inhibición de la expresión de CTIP1 (shCTIP1: $4\pm 3\%$; shCTIP1+pCTIP2: 69.0 ± 3.9 ; $p < 0.01$; $n=4$) (**Figura 24**). Obsérvese que en estos experimentos de doble electroporación la interferencia de CTIP1 es mantenida (**Figura 24**). Estos resultados, en conjunto con el análisis de homología entre la secuencia del shCTIP1 y los transcritos predichos de CTIP2 realizados anteriormente, confirman la especificidad del shCTIP1 contra CTIP1. Posteriormente se evaluó si la co-electroporación de shCTIP1 y pCTIP2 es capaz de rescatar el fenotipo de pérdida del CST inducido por la inhibición de la expresión de CTIP1. Consistentemente con nuestras predicciones, la restitución de la expresión de

CTIP2 en condición de interferencia de CTIP1 rescató el fenotipo de alteración del desarrollo del CST (Figura 25). Estos resultados sugieren robustamente que los defectos en el desarrollo del CST asociados a la inhibición de CTIP1 son consecuencia de la disminución de la expresión de CTIP2 en las NPSC.

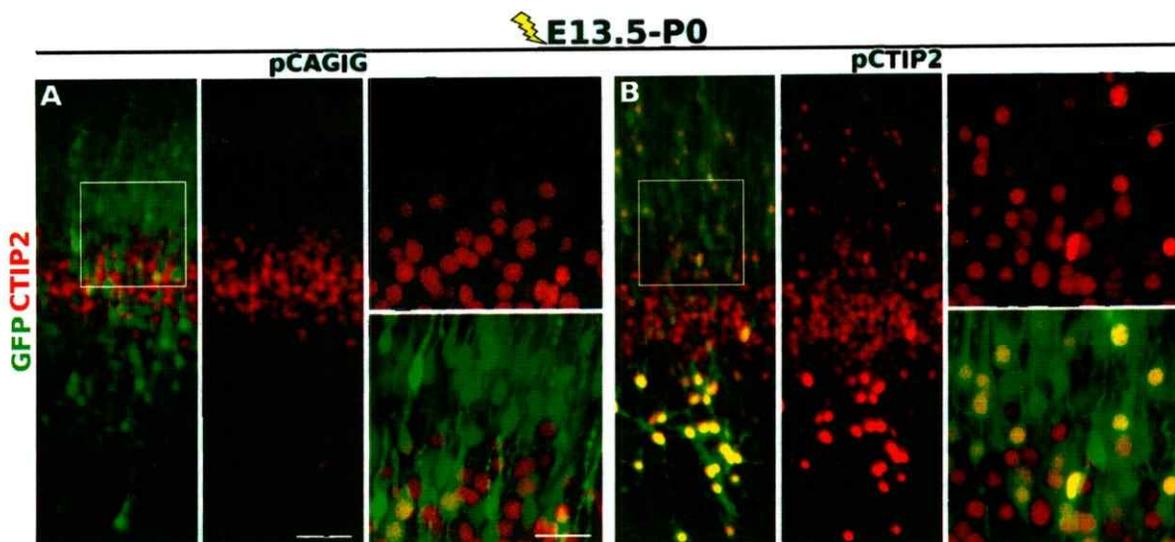


Figura 23. La EPIU de pCTIP2 induce altos niveles de expresión de CTIP2 en las células electroporadas. A y B. Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con pCAGIG vacío (control, A) y pCAGIG-CTIP2 (B). Los cerebros fueron analizados en P0. En las imágenes de baja magnificación se muestra una región representativa de la corteza en cortes coronales de cerebro. En las imágenes de alta magnificación se muestra la región indicada por los recuadros blancos en las imágenes de baja magnificación. En A sólo se observan altos niveles de expresión de CTIP2 en las células GFP+ posicionadas en la capa 5, mientras que en B se observa que casi todas las células GFP+ expresan altos niveles de CTIP2 independiente de su ubicación en la corteza. Barras de escala: Imágenes de baja magnificación: 100um; Imágenes de alta magnificación: 25 um.

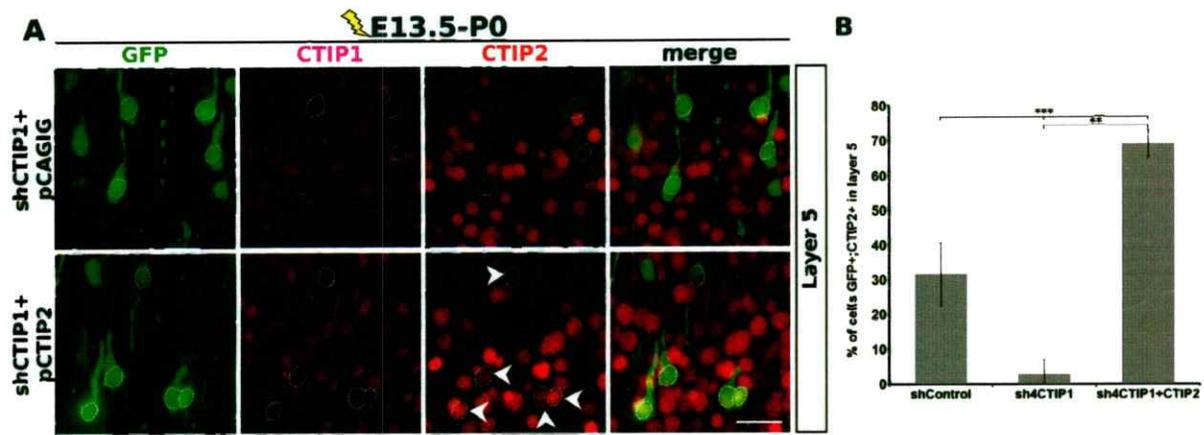


Figura 24. La electroporación doble de shCTIP1 y pCTIP2 rescata los niveles de expresión de CTIP2 en las NP de la capa 5. A. Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con los constructos que codifican para shCTIP1 (paneles superiores, el shCTIP1 se co-electroporó con pCAGIG vacío como control) y shCTIP1+pCTIP2 (paneles inferiores). Los cerebros fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha muestran células GFP+ que expresan CTIP2. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan CTIP2 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis 4 cerebros por condición experimental. t test ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

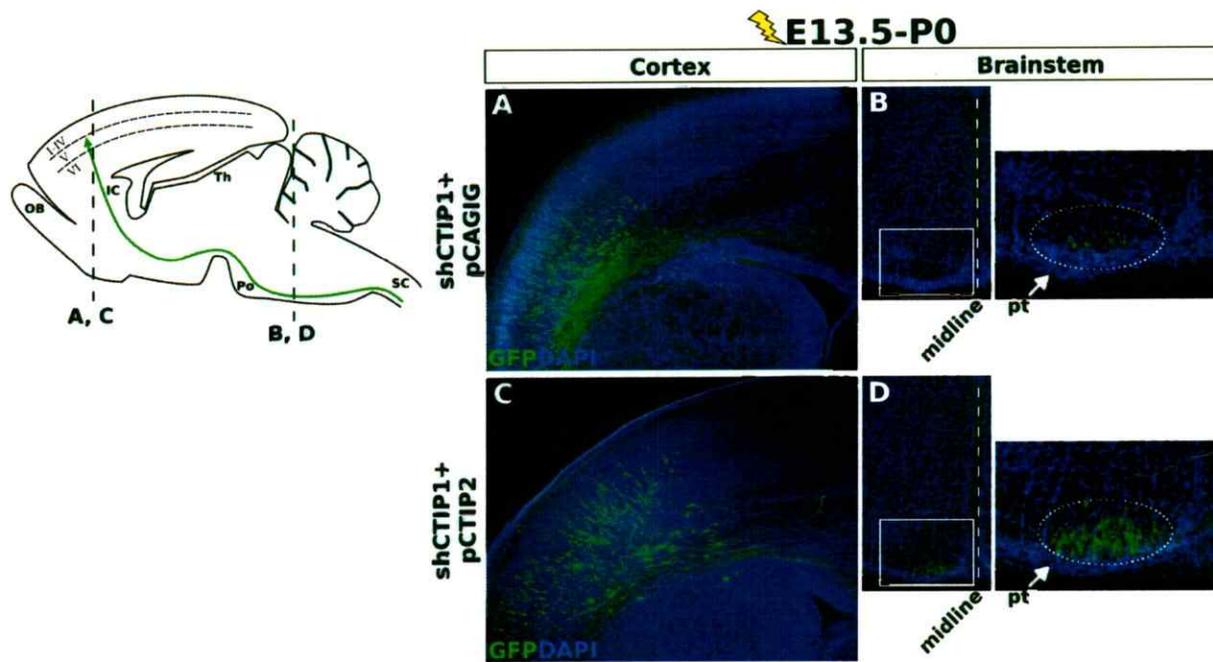


Figura 25. La co-electroporación de shCTIP1 y pCTIP2 rescata los defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales inducidas por la inhibición de la expresión de CTIP1. *Izquierda:* Representación esquemática de una sección parasagital de un cerebro de ratón para guiar la comprensión de las secciones mostradas en A-D. Las líneas punteadas indican la posición en el eje antero-posterior de los cortes coronales mostrados de A a D. **A-D.** Experimentos de electroporación del shCTIP1 (co-electroporado con pCAGIG vacío como control) (A-B) y del shCTIP1+pCTIP2 (C-D) en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. **A y C.** Para una comparación adecuada, se muestran cortes coronales de cerebros con niveles de electroporación comparables en la corteza tanto en número de células, como en intensidad de la marca de GFP. **B y D.** Secciones coronales de troncos cerebrales obtenidos de los mismos cerebros mostrados en A y C. Los recuadros blancos en B y D muestran la región magnificada mostrada a la derecha. La elipse y la flecha muestran el área aproximada que ocupa el tracto piramidal. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Barras de escala: (A, C) 500 μ m; (B, D): 250 μ m; (Regiones magnificadas de B, D)100 μ m.

6.6.2.- Efectos sobre el desarrollo de proyecciones subcerebrales en experimentos de inhibición doble de CTIP1 y TBR1.

Con el propósito de continuar esclareciendo los aspectos mecanísticos en torno a la función de CTIP1 en el contexto de la especificación y desarrollo de las NPSC, se indagó directamente si el incremento en la expresión de TBR1 en NPs de la capa 5, como consecuencia de la inhibición de la expresión de CTIP1, es un factor determinante en los defectos en el desarrollo del CST. Pronosticamos que el fenotipo de defecto en el desarrollo del CST debería rescatarse si logramos inhibir la desrepresión de TBR1 aún en el contexto de inhibición de la expresión de CTIP1. Para inhibir la expresión de TBR1 se testeó un grupo de cinco interferentes contra dicho gen *in vitro* (**Figura 26A**). Para ello se clonó el marco de lectura de TBR1 en pCAGIG-IRES-GFP (pTBR1) y se co-transfectó con cada uno de los plasmidios codificantes para los interferentes a testear en la línea celular HEK293. Luego de 48 horas de la trasfección se lisaron las células para evaluar los niveles de TBR1 por WB. Como se puede observar en la Figura 26 que de los interferentes probados, el más eficiente en la inhibición de la expresión de TBR1 fue el uno (de aquí en adelante shTBR1) (**Figura 26A y B**). Posteriormente se procedió a evaluar la interferencia de TBR1 *in vivo* mediante EPIU del plasmidio que codifica para el interferente seleccionado, observándose que la expresión del gen se inhibe eficientemente en NP's de la capa 6, que es donde TBR1 presenta los más niveles de expresión en la corteza (**Figura 26D**). Los interferentes que codifican para shTBR1 fueron adquiridos en el vector pLKO.1, el cual no posee un gen reportero para monitorear las células electroporadas. Por ello, el shTBR1 fue co-electroporado con FUX-GFP a baja concentración (0.5-1 µg/ul) para identificar la células electroporadas (**Figura 26D**). En la electroporación control se co-electroporó un shRNA inespecífico (shLuc) clonado en pLKO.1 junto con FUX-GFP (**Figura 26C**).

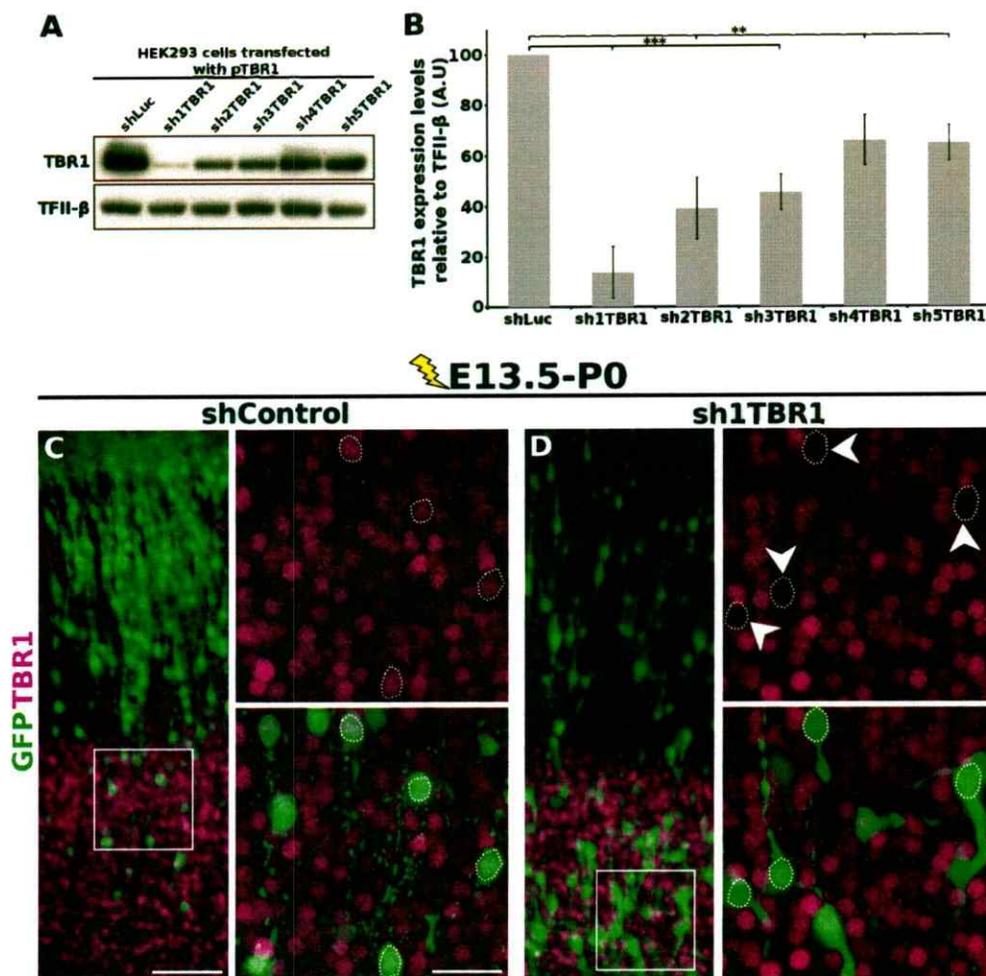


Figura 26. Interferencia de TBR1. **A.** Selección *in vitro* de un shRNA eficiente en la inhibición de la expresión de TBR1. Detección de los niveles de expresión de TBR1 en extractos totales de proteína de células HEK293 transfectadas con pTBR1 (pCAGIG-TBR1) y cada uno de los interferentes a testear (sh1-5 TBR1). Como control se transfectó pTBR1 con un shRNA inespecífico (shLuc, carril 1). Los extractos totales de proteína fueron obtenidos 48 hrs post-transfección. **B.** Cuantificación densitométrica de la banda de TBR1 relativa a la banda del control de carga (TFII β) en cada una de las condiciones de transfección señaladas. El sh1TBR1 es la horquilla de RNA más eficiente en la interferencia de TBR1. n=4, t test **p<0.01; ***p<0.001. **C y D.** Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E13.5 con shcontrol (shLuc+FUX-GFP) (C) y shTBR1 (shTBR1+FUX-GFP) (D). Los cerebros fueron analizados en P0. En las imágenes de baja magnificación se muestra una región de la corteza en cortes coronales de cerebro. En las imágenes de alta magnificación se muestra la región indicada por los recuadros blancos en las imágenes de baja magnificación. Las puntas de flecha señalan células GFP+ que no expresan TBR1. Barras de escala: Imágenes de baja magnificación: 100um; Imágenes de alta magnificación: 25 um.

Sorprendentemente, se observaron claros defectos migratorios en los experimentos de inhibición de la expresión de TBR1, en donde la mayoría de las células se posicionaron en la región correspondiente a la capa 6, a diferencia de los cerebros control en donde se observó una distribución relativamente homogénea de células en las capas 6, 5 y 4 (**Figura 27**). Estos defectos migratorios estuvieron ausentes en experimentos de interferencia de sólo CTIP1 (**Figura 27**), sin embargo en experimentos de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 se observaron defectos migratorios equivalentes a los observados en la interferencia de sólo TBR1. Resulta interesante señalar que en animales *Tbr1*^{-/-} se han reportado malformaciones corticales como consecuencia de defectos migratorios. Estos defectos migratorios fueron atribuidos a una expresión cortical de reelina disminuida como consecuencia de la incorrecta diferenciación de células de CR (Hevner y cols., 2001). De acuerdo a la estrategia experimental utilizada en este estudio, es poco factible atribuir los defectos migratorios observados en nuestros experimentos de electroporación de shTBR1 a una incorrecta diferenciación de células de CR ya que este proceso ocurre más temprano en el desarrollo (E10.5-E11.5) que el momento en que se realizan los experimentos de EPIU en este estudio (E13.5), por lo tanto es muy improbable que se esté afectando función de estas células mediante la estrategia experimental utilizada. Probablemente los defectos migratorios observados en los experimentos aquí presentados sean consecuencia de una función específica y autónoma celular de TBR1 en el proceso de migración que no había sido identificada debido a las diferencias -técnicas y temporales- en el diseño experimental utilizado para estudiar la función de este gen aquí con respecto a otros estudios (animales KO *versus* EPIU de un shRNA). Para evaluar si los defectos migratorios asociados a la inhibición de la expresión de TBR1 son dependientes de la fase del desarrollo de la corteza cerebral -y por lo tanto de la población neuronal sobre la que se ejerce el efecto inhibitorio- ó si en cambio, la inhibición de TBR1 afecta en forma generalizada el proceso migratorio, se realizaron experimentos de EPIU del shTBR1 en E15.5 de manera de ejercer el efecto inhibitorio sobre NP destinadas a capas superiores de la corteza (**Figura 3**). Como es de esperar, la mayor parte de la neuronas electroporadas se localiza en las capas superiores de la corteza al electroporar un

shControl (**Figura 28A, I**). Por el contrario, la electroporación del shTBR1 en E15.5 se asocia a claros defectos migratorios, observándose que muy pocas células alcanzan las capas superficiales de la corteza (**Figura 28E, I**). Interesantemente no se observan alteraciones gruesas en el fenotipo molecular de las células que no completaron su proceso migratorio, puesto que no se evidenciaron diferencias en el número de células que expresa CUX1 ó CTIP2 entre la condición control y la condición experimental (**Figura 28J**). Tampoco se observan diferencias obvias el crecimiento de axones callosos entre las dos condiciones experimentales (**Figura 28A, E**). Estos datos sustentan la idea de que TBR1 es requerido en el proceso migratorio de NPs, probablemente en forma autónomo celular.

Posteriormente se evaluó si en la condición experimental de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 en E13.5 se inhibe eficientemente la expresión de TBR1 en NPs de la capa 5. Se observó que de las pocas células que alcanzan la capa 5, una baja proporción expresa TBR1. Los niveles de expresión de TBR1 fueron similares a los observados en la condición control(control:28±7;shCTIP1+shTBR1:28±8;n=3;p<0.001) (**Figura 29**), demostrando que mediante la doble interferencia de CTIP1 y TBR1 es posible revertir la desrepresión de TBR1 asociada a la inhibición de la expresión de sólo CTIP1.

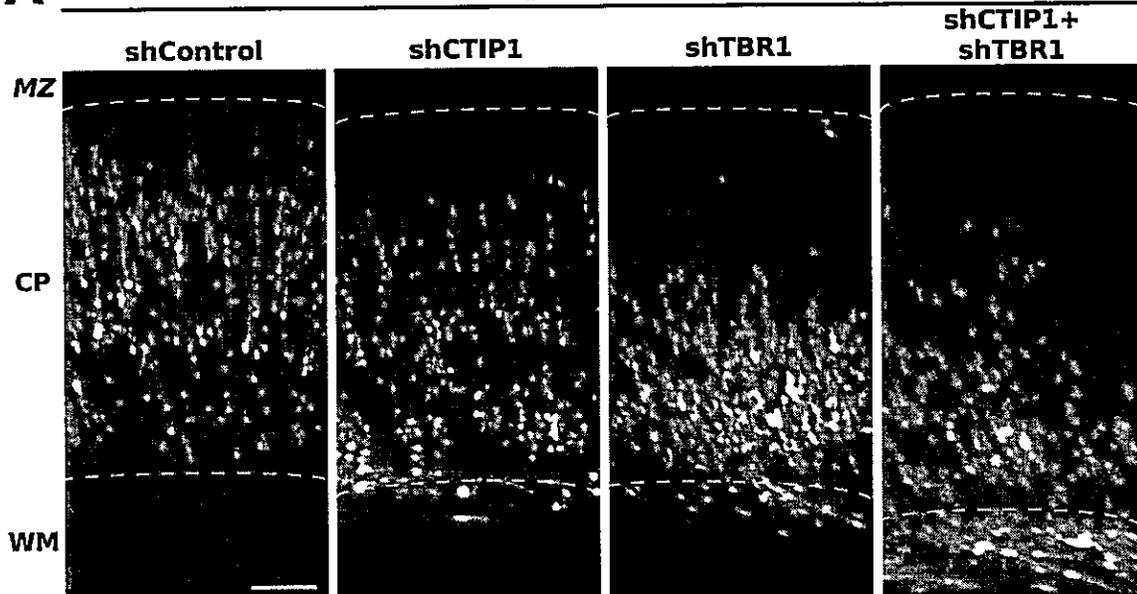
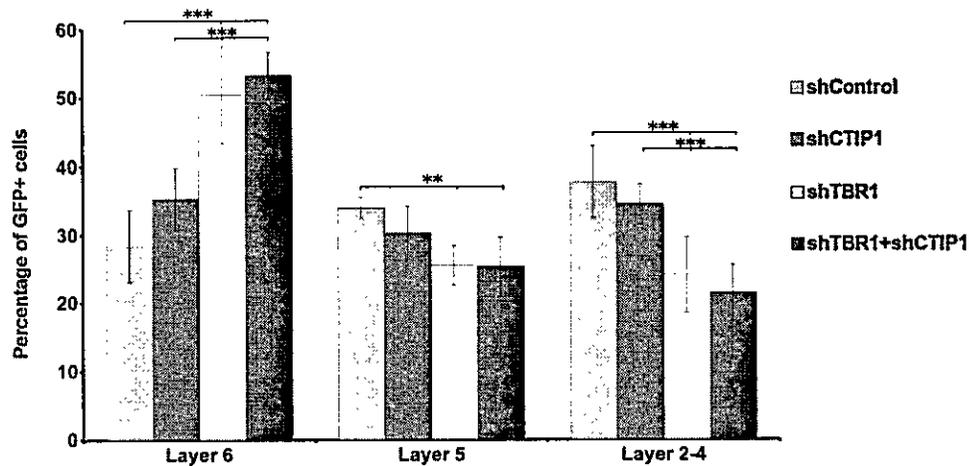
A**E13.5-P0****B**

Figura 27. La inhibición de la expresión de TBR1, pero no de CTIP1, se asocia a defectos migratorios de NPs. **A.** Experimentos de electroporación de las construcciones señaladas en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. En la imágenes se muestra una región de la corteza en secciones coronales de cerebro. Nótese los defectos migratorios en los experimentos de electroporación de shTBR1 y shTBR+shCTIP1. La distribución de las células GFP+ en la condición shCTIP1 no muestra diferencias significativas con la condición control. Barra de escala: 100 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A que muestran la distribución de las células GFP+ en las capas 2-4, 5 y 6. Los resultados están expresados como promedios \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de al menos 5 cerebros por condición experimental. t test ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

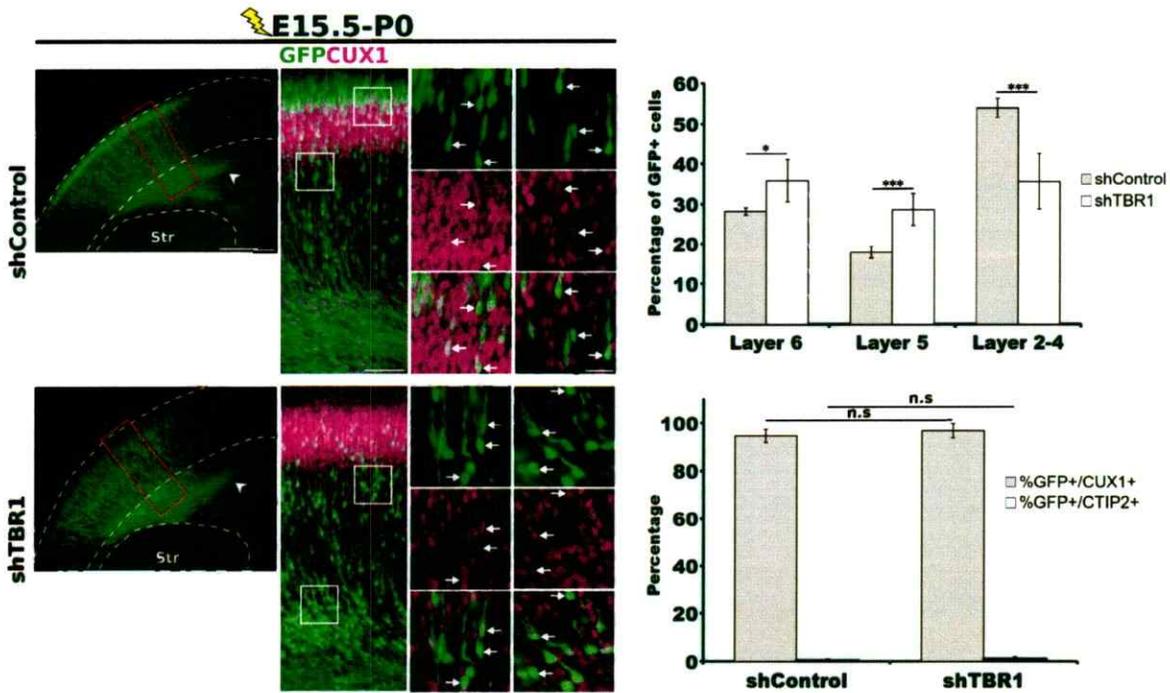


Figura 28. La inhibición de la expresión de TBR1 se asocia a defectos migratorios en células destinadas a capas superficiales de la corteza. A-H. Experimentos que corresponden a cerebros electroporados *in utero* en E15.5 con shcontrol (shLuc+FUX-GFP) (A-D) y shTBR1 (shTBR1+FUX-GFP) (E-H). Los cerebros fueron analizados en P0. El área dentro de los rectángulos rojos en A y E se muestran magnificados en B y F, respectivamente. Las imágenes de alta magnificación de C a D" y de G a H" corresponden a las áreas dentro de los cuadros blancos en las fotografías mostradas en B y F, respectivamente. Las puntas de flecha señalan los axones callosos extendiéndose hacia la región medial. Las flechas señalan células GFP+ que expresan CUX1. I. Cuantificación de los experimentos mostrados en A y H que indican la distribución de las células GFP+ en las capas 2-4, 5 y 6. J. Cuantificación del número de células GFP+/CUX1+ y GFP+/CTIP2+ de los experimentos. Los resultados están expresados como promedios \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis de 5 cerebros por condición experimental. Str: núcleo estriado. Barras de escala. A: 500 μ m; B: 100 μ m; D": 25 μ m.

Si bien existe una estrecha correlación entre la posición de una neurona en la corteza y su identidad, el fenotipo de la célula no está determinado por su posición laminar, sino que depende del momento de su nacimiento. La identidad de una NP es determinada en la célula progenitora (en la última fase S previa a la división mitótica final), mientras que la implementación de las características fenotípicas asociadas a su identidad ocurre post-mitóticamente y depende del código combinatorio de determinantes post-mitóticos que la célula expresa (McConnell y Kaznowski 1991; O'Leary y Koester 1993; Custo Creig y cols., 2013). Consistentemente con esto, en experimentos diseñados para interrumpir la migración normal con metilazoxymetanol o mediante exposición a rayos X, se ha observado que las células incorrectamente posicionadas en la corteza mantienen su patrón de proyecciones normales de acuerdo con el momento del nacimiento de las neuronas (Jensen and Killackey 1984; Yurkewicz y cols. 1984). Se ha llegado a conclusiones similares en ratones *reeler* (ratones KO para reelina). En estos animales las capas corticales se desarrollan en orden invertido debido a severos defectos migratorios, sin embargo los subtipos de NP mantienen el patrón de proyecciones axonales, aunque no en forma tan clara como un animal WT (Caviness, 1976).

Si el defecto en el desarrollo de las proyecciones cortico-espinales observadas en condición de inhibición de CTIP1 se deben a una desrepresión de TBR1 en las NPSC, hipotetizamos que el defecto en el desarrollo del CST debería ser rescatado en experimentos de interferencia doble de CTIP1 y TBR1, independientemente de los defectos en el posicionamiento de las células en la corteza, que como se ha señalado anteriormente, probablemente se asocian a funciones específicas de TBR1 en el proceso migratorio. Interesantemente, se observó en experimentos de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 una clara recuperación del defecto en el desarrollo del CST, a pesar del posicionamiento anómalo de las células en la corteza (**Figura 30**). Al analizar la baja proporción de células que alcanza la capa 5 en la condición de doble interferencia, se observó que no se recuperan los niveles normales de expresión de CTIP2 (**Figura 31**).

Interesantemente, se observó que en experimentos de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 se produce una acumulación de células que expresan altos niveles de CTIP2 en la capa 6 (**Figura 32**), que no fueron observadas en las otras condiciones experimentales (control, shCTIP1, shTBR1) (**Figuras 23A y 32**). Normalmente CTIP2 presenta una expresión baja en las NP de la capa 6 (Arlotta y cols., 2005, Chen y cols., 2008) (**Figura 12, 23 y 32**). Nótese que en la condición de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 las células GFP+/CTIP2+ positivas localizadas en la capa 6 poseen niveles expresión de CTIP2 muy superiores a las células GFP negativas de dicha capa (**Figura 32**). La interpretación del fenotipo de doble interferencia es compleja, no obstante es muy llamativo. Es probable que aquellas células CTIP2 positivas localizadas en la capa 6 correspondan a células destinadas a la capa 5 de la corteza que no ejecutaron el proceso migratorio en forma normal, quedando rezagadas en capas más profundas de la corteza, aún cuando sí adquirieron el destino de NPSC.

Nuestros datos sugieren que la desrepresión de TBR1 asociada a la inhibición de la expresión de CTIP1 representa un aspecto central en el defecto del desarrollo del CST, pues la inhibición de la desrepresión de TBR1 en experimentos de doble interferencia de CTIP1 y TBR1 recupera el defecto del desarrollo de las proyecciones subcerebrales. Por lo tanto los altos niveles de expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 son necesarios para promover el fenotipo subcerebral mediante la represión transcripcional de TBR1.

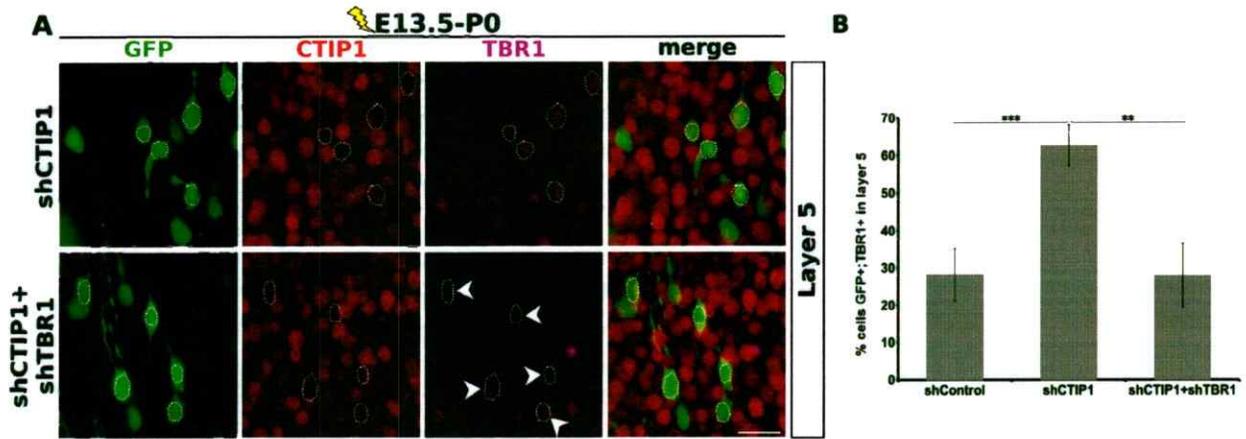


Figura 29. La electroporación doble de shCTIP1 y shTBR1 inhibe eficientemente la expresión de CTIP1 y TBR1 en las NP localizadas en la capa 5. A. Experimentos de electroporación de shCTIP1 (paneles superiores) y de shCTIP1+shTBR1 (paneles inferiores) en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha señalan células GFP+ que no expresan TBR1. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan TBR1 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis al menos 3 cerebros por condición experimental. T test ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

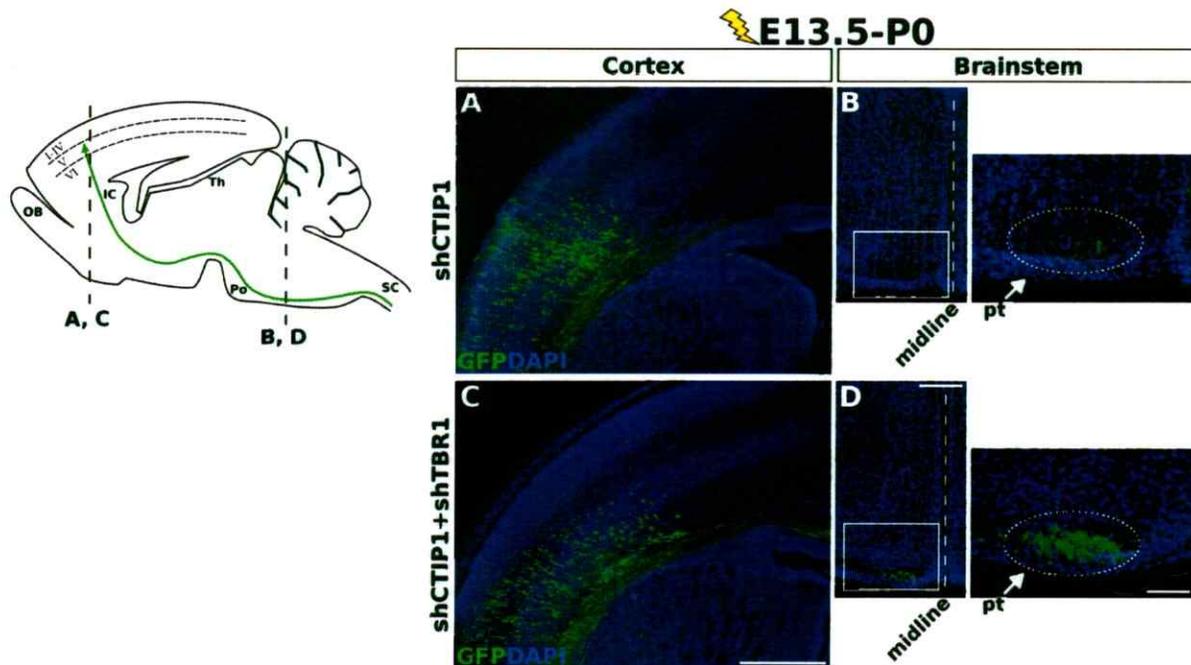


Figura 30. La inhibición doble de CTIP1 y TBR1 rescata los defectos en el desarrollo de proyecciones sub-cerebrales observadas en la inhibición de la expresión de CTIP1. *Izquierda:* Representación esquemática de una sección parasagital de un cerebro de ratón para guiar la comprensión de las imágenes mostradas en A-D. Las líneas punteadas indican la posición en el eje antero-posterior de los cortes coronales mostrados de A a D. **A-D.** Experimentos de electroporación de shCTIP1(A-B) y shCTIP1+shTBR1 (C-D) en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. **A y C.** Para una comparación adecuada, se muestran cortes coronales de cerebros con niveles de electroporación comparables en la corteza tanto en número de células, como en intensidad de la marca de GFP. **B y D.** Secciones coronales de troncos cerebrales obtenidos de los mismos cerebros mostrados en A y C. Los recuadros blancos en B y D muestran la región magnificada mostrada a la derecha. La elipse y la flecha muestran el área aproximada que ocupa el tracto piramidal. OB: bulbo olfatorio, IC: cápsula interna, Th: tálamo, Po: protuberancia, SC: médula espinal. Barras de escala: (A, C) 500 μ m; (B, D): 250 μ m; (Regiones magnificadas de B, D): 100 μ m.

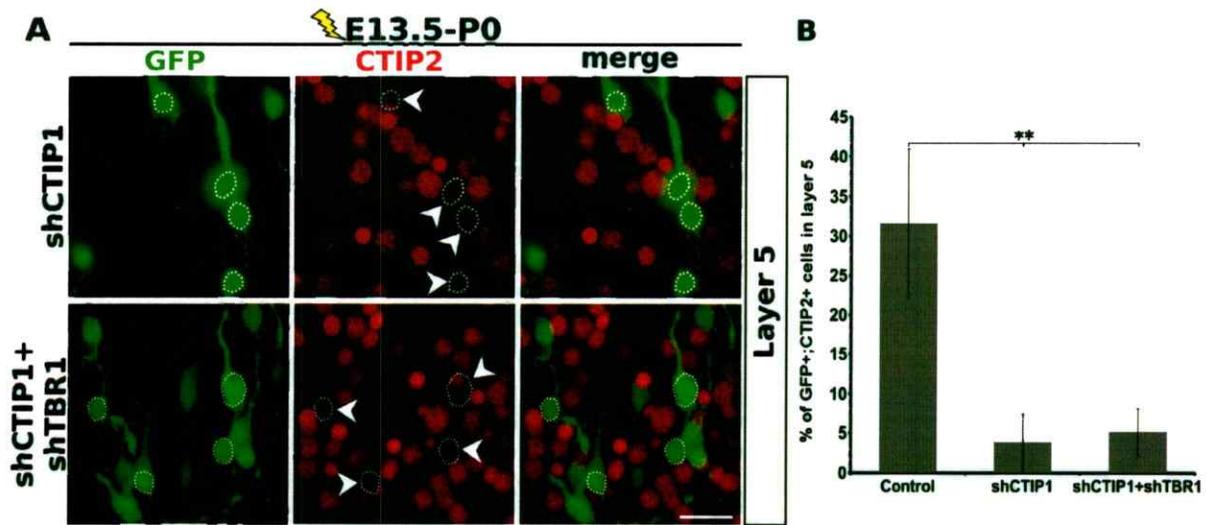
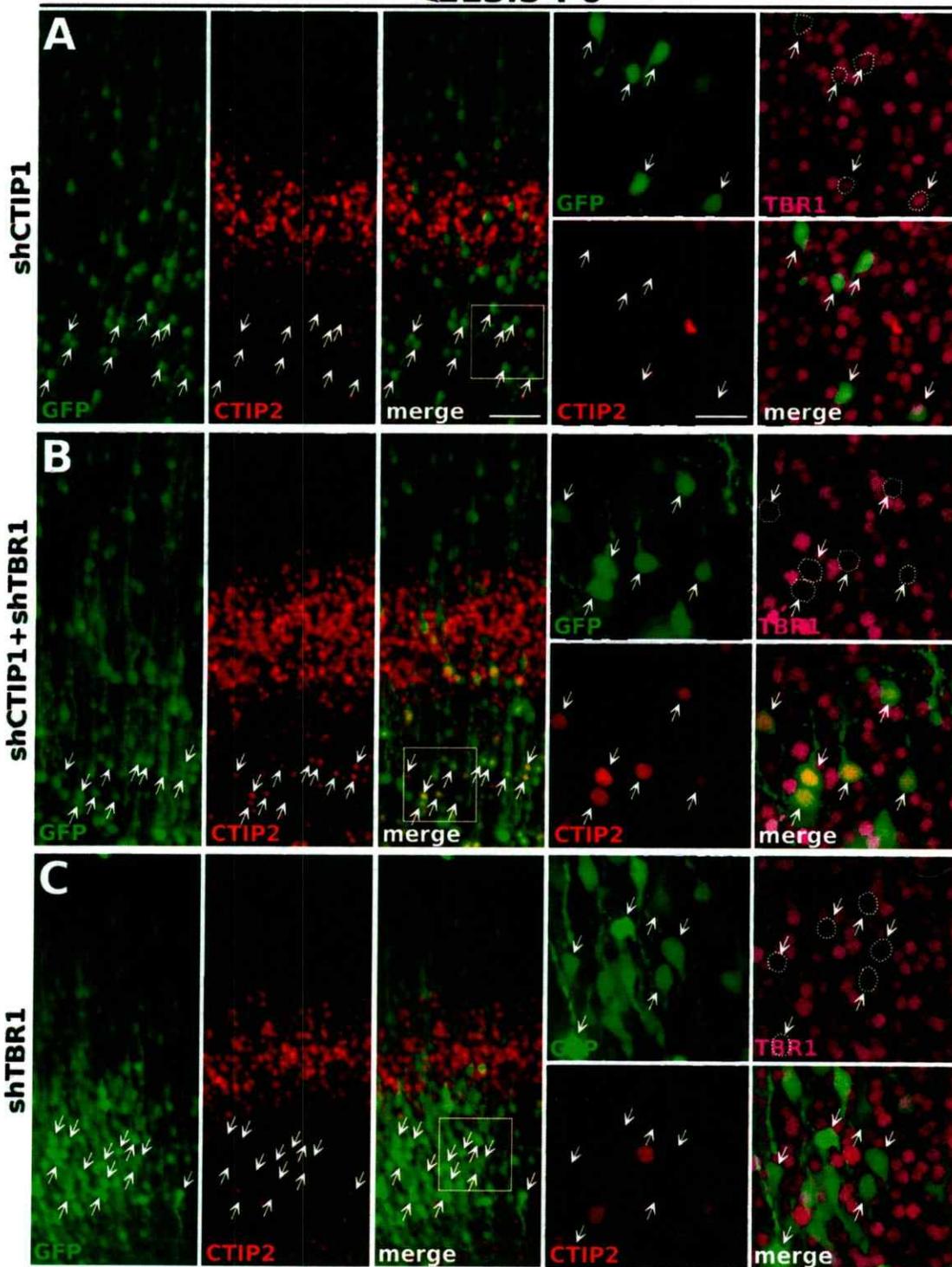


Figura 31. La electroporación doble de shCTIP1 y shTBR1 no recupera la expresión de CTIP2 en las NP localizadas en la capa 5. A. Experimentos de electroporación de shCTIP1 (paneles superiores) y de shCTIP1+shTBR1 (paneles inferiores) en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. Las microfotografías muestran NP de la capa 5 en cortes coronales de cerebro. Las puntas de flecha señalan células GFP+ que no expresan CTIP2. Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación de los experimentos mostrados en A, indicando el porcentaje de células GFP+ que expresan CTIP2 en la capa 5. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE y se obtuvieron del procesamiento y análisis al menos 3 cerebros por condición experimental. T test ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

⚡ E13.5-P0



La leyenda de la figura se encuentra en la página siguiente.

Figura 32. La inhibición doble de CTIP1 y TBR1 se asocia a una acumulación de células en la capa 6 que presentan altos niveles de expresión de CTIP2. A-C. Experimentos de electroporación de shCTIP1(A), de shCTIP1+shTBR1 (B) y de shTBR1 en cerebros E13.5 que posteriormente fueron analizados en P0. En las imágenes de baja magnificación se muestra una región representativa de la corteza en cortes coronales de cerebro. En las imágenes de alta magnificación se muestra el área encerrada por los recuadros blancos en las imágenes de baja magnificación. Las flechas señalan células GFP+ en la capa 6. Nótese los altos niveles de expresión de CTIP2 que presentan las células GFP+ ubicadas en la capa 6 en la condición de electroporación doble de shCTIP1 y shTBR1, en relación a las células GFP- de dicha capa. Compárense también los niveles de expresión de CTIP2 de las células GFP+ localizadas en la capa 6 en las distintas condiciones experimentales mostradas. Barras de escala: Imágenes de baja magnificación: 100um; Imágenes de alta magnificación: 25 um.

7.- Discusión

La identificación y caracterización de reguladores transcripcionales que especifican el destino y la diferenciación de neuronas corticales hacia distintos de subtipos de NP representa un aspecto clave en la ruta hacia la comprensión de las redes transcripcionales que controlan la diversidad fenotípica, arquitectura y conectividad de la corteza cerebral. En este estudio se ha identificado al FT CTIP1 como un importante regulador post-mitótico de la identidad de NPSC de la capa 5 de la corteza, tanto en términos de la adquisición del fenotipo molecular, como en términos del desarrollo del patrón normal de proyecciones axonales que caracterizan a estas células. Estas conclusiones se sustentan fundamentalmente en los siguientes datos: la inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a cambios en el fenotipo molecular en estas células que tienen como consecuencia la perturbación del desarrollo del CST. Los cambios en el fenotipo molecular asociados a la inhibición de la expresión de CTIP1, son evidenciables en el incremento de la expresión de TBR1 y en la disminución de la expresión de CTIP2.

Uno de los aspectos clave que encausó este estudio hacia la caracterización de CTIP1 como un regulador de la identidad de NPSC, fue la determinación de su patrón de expresión espacio-temporal durante el desarrollo cortical. Datos previos de expresión de CTIP1 en la corteza sólo habían determinado en forma gruesa su distribución espacial, sin definir las poblaciones celulares específicas que expresan CTIP1 (Leid y cols., 2004; Kuo y Hsueh, 2007; John y cols., 2012). De acuerdo a nuestros datos, el patrón de expresión espacio-temporal de CTIP1 durante el desarrollo de la corteza resulta ser bastante dinámico. En estadios embrionarios (E15.5-E17.5) se observa que CTIP1 se expresa post-mitóticamente a través de todo el espesor de la CP. Sin embargo en estadios postnatales la expresión de CTIP1 se define en un patrón de expresión diferencial y graduado a través de las capas corticales, observándose altos niveles de expresión en las capas 2/3 y 5, una expresión moderada en neuronas de la capa 6, y una expresión muy baja en la capa 4. En forma llamativa, al comparar la

expresión de CTIP1 con la de otros FTs que presentan expresión laminar, se observó que CTIP1 es expresado por la mayoría de las células que residen en la capa 5, superando en número a las que expresan CTIP2, y que además presenta un alto grado de co-expresión con células que expresan CTIP2 en dicha capa. Adicionalmente, se observó una clara relación recíproca entre el patrón de expresión de CTIP1 y TBR1 en capa profundas de la corteza. TBR1 presenta altos niveles de expresión en las NPCTh de la capa 6, bajos niveles de expresión en neuronas de la capa 5 y niveles de expresión moderados en capas 2/3 de la corteza (Lai y cols., 2008). Previamente se ha reportado que TBR1 juega un rol importante en el establecimiento de las características diferenciales de las poblaciones de NPCFu. Se ha reportado que TBR1 promueve la especificación y diferenciación de neuronas corticotalámicas de la capa 6, al tiempo que inhibe el destino de proyección subcerebral (Hevner y cols., 2001; Han y cols., 2011; McKenna y cols. 2011). En animales *Tbr1*^{-/-} se observa una expansión de células que expresan altos niveles de FEZF2 hacia NPs de la capa 6 que se acompaña del desarrollo de extensiones ectópicas hacia el tronco encefálico por parte de estas células (Han y cols., 2011; Mckenna y cols., 2011). La expansión de la expresión de FEZF2 hacia la capa seis se explica porque TBR1 actúa como un represor transcripcional directo de FEZF2, lo cual implica que TBR1 define el origen laminar de NPSC, restringiéndolo a la capa 5 de la corteza (Han y cols., 2011; MacKenna y cols., 2011). A pesar de la importante función de TBR1 en el establecimiento de la identidad de las NPCFu, poco se sabe acerca de la regulación transcripcional que opera en la definición de sus dominios de expresión. Se ha sugerido que FEZF2 regula negativamente la expresión de TBR1 en neuronas de la capa 5, sin embargo no está claro si esta regulación es directa. Interesantemente, nuestros resultados sugieren que CTIP1 reprime transcripcionalmente en forma directa a TBR1. Varios datos presentados en este estudio sustentan esta relación regulatoria. Primero, mediante el análisis *in silico* de regiones genómicas río arriba del punto de inicio de transcripción de *Tbr1* se identificó la presencia de sitios putativos de unión a CTIP1 que son conservados en varias especies, entre las que se incluye *Mus Musculus*, *Rattus Norvegicus*, *Gallus Gallus* y *Homo Sapiens*. Segundo, mediante ensayos de CHIP utilizando como material

de partida cortezas de ratón en desarrollo (E17.5), se encontró que CTIP1 se une al sitio de unión putativo identificado *in silico*. Tercero, la inducción de la disminución de la expresión de CTIP1 en cultivos primarios corticales se asocia tanto a un incremento en los niveles del mRNA de *Tbr1*, como de su producto proteico. Cuarto, la inhibición de CTIP1 en neuronas de la capa 5, tiene como consecuencia un incremento en los niveles de expresión de TBR1 en neuronas de dicha capa. Por último, el incremento en los niveles de expresión de CTIP1 en neuronas de la capa 6 por electroporación de mutCTIP1 reprime la expresión de TBR1 en dichas células. En conjunto, esta evidencia permite establecer una relación regulatoria entre CTIP1 y TBR1 que no había sido identificada previamente y que tiene importantes consecuencias funcionales en el establecimiento del fenotipo de NPSC. Además nuestros datos sugieren que la expresión diferencial de CTIP1 en capas profundas de la corteza, esto es, altos niveles de expresión en la capa 5 y bajos en la capa 6, determina a su vez (ó al menos en parte), el establecimiento del patrón de expresión recíproco de TBR1, contribuyendo a la definición del origen laminar de NPSC y NPCTh. De manera llamativa, en un trabajo reciente (Srinivasan y cols., 2012) se ha señalado que CTIP2 podría actuar como un represor de la expresión de TBR1, puesto que en animales *Ctip2^{-/-}* se observa un incremento en los niveles de expresión de TBR1 en células de la capa 5. Por otra parte, se ha reportado que CTIP1 y CTIP2 se unen al mismo elemento de respuesta en el DNA (Avram y cols., 2002). Estos datos sientan un buen precedente para hipotetizar que la modulación de la expresión de TBR1 en la capa 5 podría depender en forma conjunta de CTIP1 y CTIP2 en las células que expresan ambos FT. En el futuro será necesario indagar si el elemento de respuesta para CTIP1 identificado en la región regulatoria de *Tbr1* es reconocido por CTIP2, y por lo tanto si ejerce una regulación directa sobre dicho gen.

Como se ha señalado anteriormente, TBR1 es un represor transcripcional directo de FEZF2 el cual, a su vez, se encuentra genéticamente río arriba de CTIP2 regulando positivamente su expresión en NPSC (Chen y cols., 2008; Molyneaux y cols., 2005). Interesantemente, también se ha sugerido que TBR1 podría regular negativamente la

expresión de CTIP2 mediante un mecanismo independiente de la represión de FEZF2, puesto que se ha observado un rescate parcial de la expresión de CTIP2 en animales doble KO *Fezf2^{-/-}Tbr1^{-/-}*, y concomitadamente, de los defectos en el CST con respecto a lo observado en animales *Fezf2^{-/-}*. Tomando en consideración estas relaciones regulatorias, se hipotetizó que la desrepresión de TBR1 asociada a la inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 debería tener un impacto negativo sobre la expresión de CTIP2, ya sea en forma dependiente o independiente de la represión de FEZF2. En forma consistente con nuestra conjetura, se observó que la inhibición de la expresión de CTIP1 se asocia a una disminución de la expresión de CTIP2 en dichas células y, como es de esperar dado el rol crítico de CTIP2 en la extensión y desarrollo de proyecciones subcerebrales (Chen y cols., 2008), se observaron claros defectos en el desarrollo del CST. Al evaluar los niveles de expresión del mRNA de *Fezf2* en condiciones de interferencia de CTIP1 en cultivos primarios corticales, se observó una disminución moderada pero significativa en los niveles de *Fezf2* con respecto al control, consistentemente con la desrepresión de *Tbr1* observada en la misma condición. Previamente se ha reportado que la sobre-expresión de TBR1 en NPs de la capa 5 inhibe robustamente la expresión de FEZF2 y el desarrollo del CST (Han y cols., 2011). Es posible que en nuestros experimentos no se hayan observado cambios dramáticos en los niveles de expresión de *Fezf2* debido a un aspecto técnico relevante: los niveles de expresión de TBR1 que se alcanzan mediante experimentos de sobre-expresión que utilizan promotores fuertes constitutivamente activos, no son comparables con los niveles de desrepresión de TBR1 que se alcanzan en este estudio en forma indirecta a través de la inhibición de CTIP1. Por lo tanto, la dosis celular de TBR1 que se alcanza mediante las aproximaciones experimentales mencionadas, probablemente se correlacione con el grado de represión de *Fezf2* observado en cada caso. Sin embargo, de manera muy llamativa el grado de desrepresión de TBR1 alcanzado en este estudio a través de la inhibición de CTIP1 se asocia con una inhibición robusta de la expresión de CTIP2 *in vivo*, posiblemente a través de un mecanismo que no depende exclusivamente de la inhibición de *Fezf2* por TBR1. Se ha demostrado que la expresión de CTIP2 está sujeta múltiples regulaciones represivas por FTs que controlan la

especificación y diferenciación de subtipos de NPs, como SATB2 (alcamo y cols., 2008; Britanova y cols., 2008), COUP-TFI (Tomassy y cols., 2010) y SOX5 (Lai y cols., 2008), lo cual indica que CTIP2 es un blanco crítico en el entramado regulatorio transcripcional que opera durante el desarrollo de la corteza cerebral. Nuestros datos sugieren que altos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 5 juegan un rol permisivo para la expresión de CTIP2 a través de la represión de la transcripción de TBR1, lo cual posiciona a CTIP1 como un regulador positivo indirecto de la expresión de CTIP2.

En este estudio, se evaluaron directamente las interacciones genéticas entre CTIP1, CTIP2 y TBR1, utilizando como lectura de salida (*readout*) la presencia o ausencia del CST. Se observó que los defectos en el desarrollo del CST asociados a la inhibición de CTIP1 son consecuencia directa de la represión de CTIP2 en NPs de la capa 5, puesto que la sobre-expresión de CTIP2 en condiciones de inhibición de CTIP1 produce un rescate de los defectos en el desarrollo del CST, corroborando el rol crítico de CTIP2 en la diferenciación y desarrollo de axones sub-cerebrales. Por otra parte, se evaluó la contribución de la desrepresión de TBR1 en condiciones de inhibición de CTIP1 en NPs de la capa 5 en los defectos en el desarrollo del CST. Por lo tanto, si la desrepresión de TBR1 en NPs de la capa 5 asociada a la inhibición de CTIP1 es un elemento clave en los defectos del desarrollo del CST, en efecto, la inhibición de tal desrepresión debería rescatar el desarrollo del CST en condiciones de interferencia de CTIP1. Consistentemente con esta conjetura, el desarrollo del CST fue rescatado en condiciones de doble interferencia de CTIP1 y TBR1. En forma muy llamativa, en estos experimentos de doble interferencia se observaron claros defectos migratorios en donde una alta proporción de células electroporadas se ubicó a nivel de la capa 6 y además, dentro de las células localizadas en la capa 6, se encontró un grupo importante que expresa altos niveles de CTIP2. En los experimentos de interferencia de sólo TBR1 se observaron defectos migratorios análogos a los observados en experimentos de doble interferencia, sin embargo estos defectos no fueron observados al interferir sólo CTIP1. Contrariamente a lo observado en los experimentos de doble interferencia, no se observaron altos niveles de expresión de CTIP2 en células

posicionadas en la capa 6 en ninguno de los experimentos de interferencia simple de CTIP1 ó TBR1. Interesantemente, los defectos migratorios asociados a la inhibición de TBR1 resultaron ser generalizados para NP corticales destinada a distintas capas, puesto que en experimentos de interferencia de TBR1 en NPs destinadas a capas superiores de la corteza (EPIU en 15.5), también se observaron claros defectos migratorios. Como se ha indicado anteriormente, es probable que los defectos migratorios observados en este estudio sean consecuencia de una función específica, probablemente autónomo celular, de TBR1 en el proceso de migración no reportada previamente. Previamente se habían reportado defectos migratorios y de laminación de la corteza en animales KO para TBR1, sin embargo esos defectos migratorios fueron atribuidos a una expresión cortical de reelina disminuida como consecuencia de la incorrecta diferenciación de células de CR y no a algún defecto específico inherente de las neuronas en migración (Hevner y cols., 2001). Recientemente se ha instalado como un tema emergente en el estudio del desarrollo cortical que reguladores transcripcionales particulares que regulan aspectos clave de la especificación de ciertos subtipos de NP, co-regulan también aspectos aparentemente generales de la diferenciación neuronal como la arborización de dendritas, desarrollo de espinas dendríticas y migración neuronal (Kwan y cols., 2012). En este contexto, es claro que TBR1 co-regula múltiples aspectos del desarrollo cortical dada la amplia gama de defectos observados en animales $Tbr1^{-/-}$ (defectos en laminación cortical, defectos en la diferenciación de células de CR y de la SP; defectos en la conectividad tálamo-cortical y cortico-cortical), más allá de la especificación y desarrollo de NPCTh discutidos aquí (Hevner y cols. 2001). Interesantemente, durante la neurogénesis cortical se ha reportado un orden secuencial de expresión para los FT SOX2, TBR2 y TBR1 en las fases de transición RG, IP, NP postmitótica, respectivamente. A la luz de los defectos migratorios asociados a la inhibición de TBR1 observados en este estudio, es llamativo que TBR1 se exprese ubicuamente en NP postmitóticas al momento de salida del ciclo celular como parte de las fases normales de diferenciación neuronal, antes de que este FT adquiriera su patrón de expresión laminar característico en la corteza postnatal. Posiblemente esta ventana de expresión post-mitótica regule aspectos generales del

desarrollo de NP glutamatérgicas, que incluye la migración hacia la CP. Sería interesante evaluar este aspecto de la función de TBR1 en el futuro.

Dadas las complejidades de la función de TBR1 en el desarrollo de la corteza, se tornan complejas las interpretaciones referentes al fenotipo migratorio observado en este estudio. Sin embargo, desde la perspectiva de la relación genética entre CTIP1 y TBR1 que se indagó en este trabajo resulta interesante la acumulación de células que expresan altos niveles de expresión de CTIP2 en la capa 6 en los experimentos de doble interferencia de CTIP1 y TBR1, ya que es probable que este grupo de células esté dando cuenta, al menos en parte, de la recuperación del fenotipo del CST considerando el rol instructivo de CTIP2 en el desarrollo de proyecciones subcerebrales. Estas células pueden corresponder a neuronas que recuperaron la identidad de NPSC como consecuencia de la doble interferencia de CTIP1 y TBR1, pero que debido a los defectos migratorios independientes asociados a la inhibición de TBR1 es que se observan acumuladas en la capa 6. Sin embargo, para que esta posibilidad vaya más allá de lo especulativo se requeriría la realización de experimentos adicionales. Una forma de comprobar estas conjeturas, sería mediante la inyección de un trazador axonal retrógrado (CT-B [*Cholera toxin B subunit*] asociado a un fluoróforo) en el tracto piramidal a nivel del tronco encefálico de cerebros electroporados con shTBR1 y shCTIP1, y observar si la marca retrógrada se asocia con las células GFP+ que expresan altos niveles de CTIP2 localizadas en la capa 6. Si nuestras conjeturas en torno a estas células son verdaderas, en este experimento deberíamos esperar encontrar la marca del trazador retrógrado principalmente en neuronas GFP+ de la capa 6 que expresan altos niveles de CTIP2.

En variadas instancias, se ha mostrado que FTs que especifican la identidad de ciertos subtipos neuronales actúan simultáneamente reprimiendo la identidad de subtipos alternativos. Por ejemplo, se ha observado que FEZF2 especifica el destino de las NPSC, y además opera inhibiendo destinos alternativos (destino de proyección calloso y destino de proyección cortico-talámico). Se ha observado que la sobre-

expresión de este FT en NP destinadas a capas superficiales de la corteza cambia su patrón normal de proyecciones callosas por proyecciones sub-cerebrales similares a las de NPSC, evidenciando el rol instructivo de FEZF2 en el establecimiento del fenotipo subcerebral (Molyneaux y cols., 2005). Por otra parte, se ha observado en animales *Fezf2^{-/-}* que mientras algunas NPSC adquieren un fenotipo de proyección talámica (como consecuencia de la desrepresión de TBR1) (McKenna y cols., 2011), otras adquieren un fenotipo de proyección calloso (como consecuencia de la desrepresión de SATB2) (Chen y cols., 2008). Por lo tanto las alteraciones en la especificación de las NPSC asociadas a la pérdida de función de FEZF2, se deben a la adquisición de identidades alternativas por parte de estas células. No está claro si alguno de los fenotipos alternativos que adoptan las NPSC en ausencia de FEZF2 predomina sobre el otro. Si bien en esta tesis se señala que la función de CTIP1 es importante para el establecimiento del fenotipo de las NPSC -en términos moleculares y en términos del patrón de proyecciones axonales- los datos mostrados no permiten afirmar que CTIP1 tenga un rol instructivo en la adquisición del fenotipo de las NPSC. De hecho la sobre-expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 altera drásticamente el fenotipo las NPSC tanto en términos moleculares como en el patrón de proyecciones axonales, aunque posiblemente debido a alteraciones asociadas a la manipulación experimental como es discutido más abajo. No obstante, nuestros datos son compatibles con la idea de que CTIP1 promueve la identidad de NPSC, al menos en parte, inhibiendo que estas células adopten características moleculares propias de las NPCTh, dado el aumento en la expresión de TBR1 asociado a la inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5. Lamentablemente, no se puede afirmar con certeza si las células interferidas para CTIP1 en la capa 5 adoptan, en efecto, un destino alternativo. Para determinar ese aspecto necesitaríamos seguir en forma específica el nuevo blanco de proyección ó al menos la ruta de los axones proyectados por las células que sufrieron una alteración en su identidad fenotípica. Mediante nuestra aproximación experimental no es posible hacer ese tipo de seguimiento. Si bien el diseño experimental utilizado en este estudio (EPIU en E13.5), permite que el DNA electroporado sea incorporado en los progenitores neuronales en el momento en que

se están generando mayoritariamente NP de la capa 5, la incorporación del DNA no se limita sólo a esta población celular puesto que existe solapamiento temporal en la generación de distintos subtipos de NP. Por este motivo observamos células GFP positivas en varias capas en nuestros experimentos y, consecuentemente, axones marcados en distintas rutas anatómicas (callosos y corticofugales). Es factible hipotetizar que las NPSC interferidas para CTIP1 hayan alterado su identidad hacia una de NPC ó NPCTh y, consecuentemente, variado su patrón de proyección subcerebral por un patrón de proyección calloso ó por un patrón de proyección cortico-talámico, respectivamente. Sin embargo, dado que en nuestros experimentos NPCs de distintas capas inherentemente incorporan el DNA electroporado, resultaría complejo distinguir las NPSC interferidas para CTIP1 que sufrieron una alteración de identidad hacia un destino de proyección calloso de aquellas que son originalmente NPC. Por otra parte, tampoco es factible evaluar si las neuronas interferidas para CTIP1 en la capa 5 alteraron su identidad hacia NPCTh mediante el estudio las proyecciones axonales que inervan el tálamo porque: i) En nuestro diseño experimental, normalmente una pequeña población de NPs de la capa 6 incorpora el DNA electroporado y, ii) Las NPSC normalmente extienden colaterales axonales secundarias hacia el tálamo (Catsman-Berrevoets y cols., 1981). En terreno especulativo, nuestros datos son compatibles con la idea de que el incremento en la expresión de TBR1 asociado a la inhibición de CTIP1 en NPs de la capa 5, induciría que estas células adopten características de NPCTh, dado el rol instructivo de TBR1 para promover aquella identidad (McKenna y cols., 2011; Han y cols., 2011). En este contexto, sería interesante combinar nuestros experimentos de EPIU con inyecciones talámicas de un marcador retrógrado (CT-B asociado a un fluoróforo) para luego evaluar la presencia de marca en células localizadas en la capa 5 de la corteza, específicamente en células GFP+ interferidas para CTIP1 en dicha capa. De esta manera se podría evaluar directamente si existen cambios de identidad fenotípica en términos de proyecciones axonales asociados a la inhibición de CTIP1. Sería interesante explorar estas posibilidades en el futuro.

Un punto que necesariamente requiere ser discutido es la incapacidad de

mutCTIP1 de rescatar los defectos en el desarrollo de proyecciones subcerebrales inducidos por la inhibición de CTIP1. Aparentemente este hecho se debe a que la sobre-expresión de mutCTIP1 por sí sola afecta de alguna forma el programa de diferenciación de las NPSC, lo cual es evidenciable en dos hechos: La sobre-expresión de mutCTIP1 disminuye significativamente los niveles de expresión de CTIP2 en NPs de la capa 5 y además, altera en forma clara el desarrollo del CST. Un hecho ampliamente aceptado es que la sobre-expresión de productos génicos puede causar fenotipos mutantes y no necesariamente fenotipos normales. De hecho, las manipulaciones de sobre-expresión han sido utilizadas por mucho tiempo como una herramienta para establecer aspectos de la función de un gen no identificables mediante los tradicionales análisis de pérdida de función (Prelich, 2012). Se ha identificado una variedad de mecanismos mediante los cuales sobre-expresión de productos génicos podrían alterar procesos celulares induciendo fenotipos anómalos: alteración de complejos estequiométricos, competencia por partners de interacción compartidos por más de una vía, secuestro de proteínas, activación de vías alternativas que dependen de la dosis génica, etc (Prelich, 2012). Existen ejemplos en que la sobre-expresión de productos génicos en la corteza genera efectos inesperados y contrarios a las manipulaciones de inhibición de la expresión de genes. Se ha descrito que RND2, que es una GTPasa pequeña que presenta funciones importantes en la migración radial de neuronas post-mitóticas en la corteza. Se evidenciaron claros efectos migratorios en experimentos de EPIU de un shRNA contra RND2 que no pudieron ser rescatados con la sobre-expresión de la proteína utilizando el potente promotor CAG (que es el mismo utilizado por nosotros). De hecho la sobre-expresión de RND2 en altos niveles usando el promotor CAG por sí sola produce igualmente un fenotipo mutante. Sólo se pudieron rescatar los efectos migratorios inducidos por el shRNA mediante la utilización de un promotor más suave (NeuroD1), que indujo una expresión más moderada de RND2 (Heng y cols., 2008). Volviendo al contexto de los experimentos mostrados en este trabajo, es factible especular que la expresión exagerada de CTIP1 bajo el promotor CAG, tenga efectos imprevistos ó deletéreos en la diferenciación de NPSC que impiden el desarrollo del CST. Aparentemente en las

NPC no se altera el fenotipo de proyección axonal hacia el hemisferio contralateral en condiciones de electroporación de mutCTIP1, puesto que se observan axones callosos extendiéndose contralateralmente. Por lo tanto sería posible descartar defectos gruesos inespecíficos en el crecimiento axonal en condiciones de sobre-expresión de CTIP1. Adicionalmente, se debe considerar que mediante nuestra estrategia experimental, se están induciendo altos niveles de expresión de CTIP1 en progenitores neuronales corticales, donde normalmente no se expresa este FT. Indudablemente este hecho podría contribuir a la alteración de procesos que ocurren tempranamente en la célula progenitora y que impactan directamente en la diferenciación normal de NPs. En estas circunstancias, surge la necesidad de conducir experimentos de ganancia de función de CTIP1 que emulen mejor las condiciones fisiológicas en términos de dosis y temporalidad de la expresión de CTIP1. Se podría considerar conducir experimentos de ganancia de función utilizando promotores más suaves y/o que dirijan la expresión de CTIP1 sólo a células post-mitóticas.

Igualmente en el contexto de experimentos de ganancia de función de CTIP1, se debe evaluar si existe contribución de la isoforma corta de la proteína, CTIP1S, al desarrollo de las NPSC. La secuencia blanco del shCTIP1 se ubica en el primer exón del gen, que es compartido por ambas isoformas, por lo tanto se espera que este interferente sea capaz de inhibir también la expresión de CTIP1S. En este contexto resultaría interesante evaluar de qué forma CTIP1S afecta el fenotipo inducido por la electroporación de shCTIP1 mediante la conducción de experimentos del rescate con CTIP1S. Por otra parte, se ha propuesto que CTIP1S forma heterodímeros con CTIP1, inhibiendo la función transcripcional de este último (Avram y cols., 2002). Por lo tanto será interesante evaluar si la ganancia de función de CTIP1S es capaz de fenocopiar el efecto del shCTIP1.

Si bien se ha logrado delinear la importancia de CTIP1 en el contexto del desarrollo de las NPSC, otros hallazgos en este estudio agregan interrogantes a la emergente complejidad de las redes regulatorias que sustentan la diversidad fenotípica

en la corteza. Por ejemplo, se observó que un número importante de células de la capa 5 de la corteza expresan sólo CTIP1, pero no CTIP2. Será importante realizar una delimitación funcional entre estas poblaciones neuronales en el futuro, lo que requerirá una identificación de patrones de expresión génica y eventuales diferencias en conectividad. Adicionalmente, se mostró que CTIP1 también presenta altos niveles de expresión en las capas superiores de la corteza (capas 2/3), donde TBR1, a su vez, presenta niveles moderados de expresión (Hevner y cols., 2001). Sin embargo, la reciprocidad en los patrones de expresión de ambos FT que se observa en las capas profundas de la corteza, no se observa en sus capas superiores. Una de las características sobresalientes de los FTs es la capacidad de controlar la expresión génica en forma dependiente del contexto espacio-temporal. Se ha observado que un mismo FT proneural es capaz de especificar diferentes tipos de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha observado que el factor proneural Neurogenina2 promueve la generación de neuronas motoras en la médula espinal ventral, al tiempo que promueve la generación de NP en el palio (Parras y cols., 2002; Lee y Pfaff, 2003; Schuurmans y cols., 2004). Este hecho refleja la capacidad de FTs proneurales de controlar la expresión de distintos grupos de genes en diferentes regiones, posiblemente debido a la expresión diferencial de FTs interactores lo cual permite la instauración de códigos combinatorios particulares (Lee y Pfaff, 2003). Por lo tanto es factible que la conducta diferencial de CTIP1 en términos de la regulación de TBR1 en los distintos contextos laminares de la corteza, se deba a la presencia de distintos *partners* de interacción de CTIP1. Por otra parte, nuestros datos muestran que CTIP1 presenta niveles moderados de expresión en NPs de la capa 6. Dado el rol represivo de CTIP1 sobre la expresión de TBR1, sugerimos que los bajos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 6 son necesarios para una expresión abundante de TBR1 y por lo tanto para el desarrollo de NPCTh. Sin embargo, es posible que CTIP1 sea requerido en bajas dosis para regular ciertos aspectos de la diferenciación de neuronas de proyección talámica. Consistentemente con esta idea, se han reportado defectos en la diferenciación y organización de NPCTh en animales *Fezf2^t*, aún cuando este gen es expresado en bajos niveles en estas células. Estos datos llevaron a

sugerir que este FT es requerido en bajas dosis para el correcto desarrollo de NPCTh (Chen y cols., 2005; Molyneaux y cols., 2005)

Adicionalmente, surgen otros aspectos interesantes a analizar en torno a la función de CTIP1 descrita en este trabajo. Se han identificado FTs que en contextos celulares diferentes interactúan con CTIP1 y que además se expresan en la corteza. Sin embargo, no se ha estudiado la existencia de convergencia funcional entre CTIP1 y estos interactores en el contexto del desarrollo cortical. Por ejemplo, se ha reportado que BCL6, un interactor físico de CTIP1, se expresa específicamente en NP de la capa 5, incluyendo a las NPSC (Leamey y cols., 2008). Por lo tanto sería de gran interés determinar si tal FT posee un rol convergente con CTIP1 en cuanto al control transcripcional sobre TBR1 y al desarrollo del CST.

Se ha observado que la actividad represora de la transcripción de CTIP1 es dependiente de SIRT1, una histona deacetilasa clase III sensible a NAD⁺, lo que sugiere que los mecanismos de represión transcripcional mediados por CTIP1 se asocian a cambios en el estado de organización de la cromatina (Senawong y cols., 2005). Interesantemente, se ha descrito que SIRT1 se expresa en el compartimento citoplasmático en progenitores corticales y que promueve la diferenciación neuronal mediante su translocación al núcleo (Hisahara y cols., 2008). En otro reporte se observó que SIRT1 presenta una distribución nuclear en neuronas corticales de ratón (Zakhary y cols., 2010). Sería interesante evaluar si la actividad represiva de CTIP1 es en general dependiente de SIRT1 en la corteza.

Inicialmente se describió a CTIP1 como un interactor de la familia de FTs COUP-TF (I, II y III). Se han reportado variadas funciones de COUP-TFI en el desarrollo cortical, que incluyen: el control de la diferenciación neuronal, migración radial, formación de proyecciones comisurales, *patterning* de áreas corticales y, en conjunto con COUP-TFII, el control de la temporalidad del inicio de la fase gliogénica de progenitores corticales (Naka y cols., 2008). Recientemente se ha reportado que

COUP-TFI controla la temporalidad de la generación y especificación de neuronas motoras de proyección cortico-espinal en la corteza somatosensorial, permitiendo así la emergencia de las características funcionales específicas de las áreas motoras y sensoriales en la corteza (Tomassy y cols., 2010). Por lo tanto resultaría tremendamente interesante evaluar la eventual contribución que pueda tener CTIP1, como interactor de COUP-TFI, en esta amplia gama de funciones, en especial en la especificación de subtipos neuronales en distintas áreas corticales.

También se ha reportado que CTIP1 interactúa con los FTs SOX6 y TLX, sin embargo es poco probable que en el contexto del desarrollo cortical exista una función conjunta de estos dos FTs con CTIP1 dado que ambos son expresados en células progenitoras corticales, mientras que en este estudio se evidenció que CTIP1 sólo se expresa post-mitóticamente. Por lo tanto, en el contexto del desarrollo de la corteza no habría co-existencia espacial de la expresión de CTIP1 con SOX6 ó TLX. Sin embargo, se ha reportado que SOX6 se expresa post-mitóticamente en interneuronas que arriban a la neocorteza migrando tangencialmente desde nichos proliferativos ventrales del telencéfalo (MGE y CGE) y que regula la generación de diversidad fenotípica de esta población neuronal (Azim y cols., 2009; Batista-Brito y cols., 2009). En esta tesis no se evaluó la expresión de CTIP1 en interneuronas, sin embargo representa un punto interesante a considerar considerando los trabajos recién citados.

La complejidad emergente de los mecanismos regulatorios que operan a nivel post-mitótico en la especificación de distintas clases de neuronas requieren definir en forma más precisa los códigos combinatorios de FTs que operan en la generación de cada subtipo neuronal. En general, la delineación de las funciones de CTIP1 investigadas en este trabajo contribuyen a la comprensión de la lógica bajo la cual operan los programas transcripcionales que dirigen la generación de la extraordinaria diversidad fenotípica en la corteza cerebral.

8.- Conclusiones

Las principales conclusiones que emanan de este estudio son la siguientes:

CTIP1 se expresa post-mitóticamente en un patrón de expresión diferencial en la corteza post-natal, mostrando altos niveles de expresión en las capas 2/3 y 5, niveles moderados de expresión en la capa 6 y muy bajos niveles de expresión en la capa 4.

CTIP1 presenta un patrón de expresión recíproco con respecto al patrón de expresión de TBR1 en capas profundas de la corteza.

CTIP1 reprime transcripcionalmente a TBR1.

En cuanto a los experimentos funcionales realizados *in vivo* se puede concluir que la función de CTIP1 es importante en el establecimiento de la identidad de NPSC en términos del fenotipo molecular y en términos del patrón de proyecciones axonales porque:

La inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a un incremento en la expresión de TBR1 en dichas células.

La inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a una disminución en la expresión de CTIP2 en dichas células.

La inhibición de la expresión de CTIP1 en NPs de la capa 5 se asocia a claras perturbaciones en el desarrollo de proyecciones axonales subcerebrales.

Tomando en consideración las relaciones regulatorias establecidas en este estudio y la evidencia previamente publicadas se propone un mecanismo que establece que los altos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 5 promueven el desarrollo de

proyecciones subcerebrales fomentando indirectamente la expresión de CTIP2 a través de la represión transcripcional directa de TBR1. Adicionalmente, dado que CTIP1 regula negativamente la expresión de TBR1 es factible conjeturar que los bajos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 6 permiten que TBR1 se exprese abundantemente en dicha capa permitiendo el desarrollo del fenotipo cortico-talámico (Figura 33).

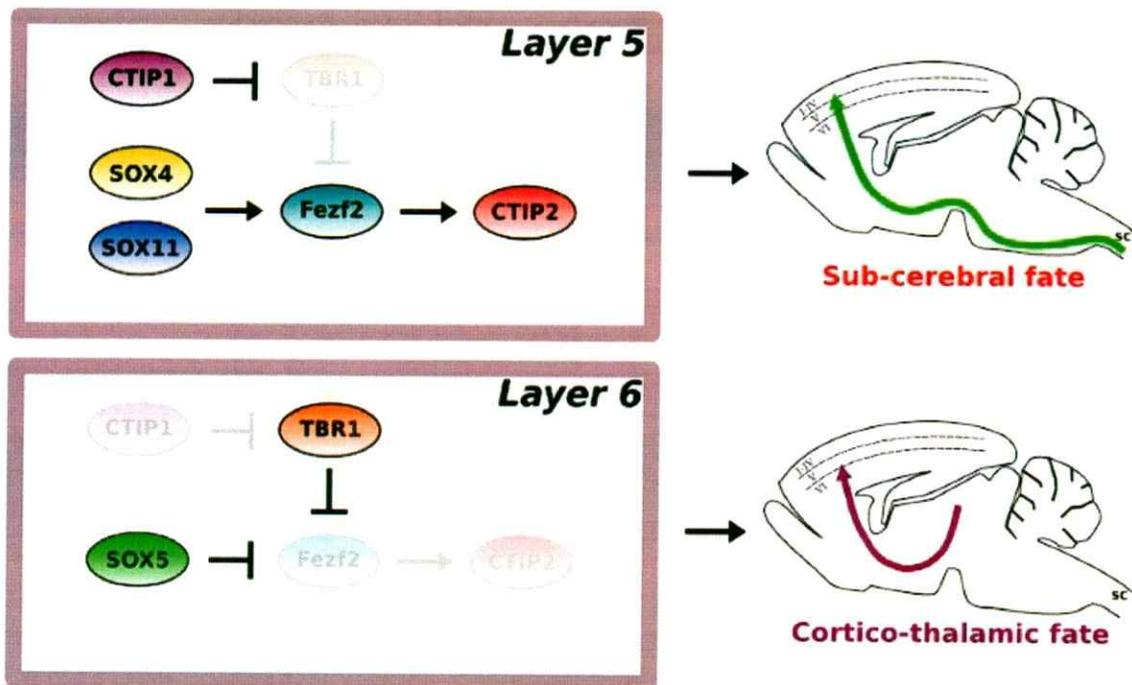


Figura 33. Modelo propuesto que describe el rol de la expresión diferencial de CTIP1 en las capas corticales 5 y 6. Los altos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 5 juegan un rol permisivo para la expresión de CTIP2, a través de la represión transcripcional de TBR1. Esto a su vez permite el desarrollo normal de proyecciones subcerebrales desde la capa 5. Por otra parte, es factible especular que los bajos niveles de expresión de CTIP1 en la capa 6 permiten que TBR1 se exprese abundantemente en dicha capa permitiendo el desarrollo del fenotipo cortico-talámico.

9.- Referencias

- Aboitiz F, and Montiel J. **2003**. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 409–420.
- Alcamo EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobрева G, Fariñas I, Grosschedl R, McConnell SK. **2008**. *Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron.* 57: 364-77.
- Allendoerfer KL, Shatz CJ. **1994**. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 17:185-218.
- Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis JD. **2005**. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron.* 45: 207-221.
- Avram D, Fields A, Pretty On Top K, Nevriy DJ, Ishmael JE and Leid M. **2000**. Isolation of a novel family of C2H2 zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *The Journal of biological chemistry.* 275: 10315-10322.
- Avram D, Fields A, Senawong T, Topark-Ngarm A, Leid M. **2002**. COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem J.* 368: 555-563.
- Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. **2003**. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci.* 6(12): 1277-1283.
- Bayer SA y Altman J. **1991**. Neocortical development. New York: Raven Press.
- Bedogni F y cols. **2012**. *Tbr1* regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 13129-13134.
- Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnár Z, Tarabykin V. **2008**. *Satb2* is a

postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron*. 57: 378-92.

- Catsman-Berrevoets CE, Kuypers HG. **1981**. A search for corticospinal collaterals to thalamus and mesencephalon by means of multiple retrograde fluorescent tracers in cat and rat. *Brain Res*. 218(1-2): 15-33.

- Cauller LJ, Clancy B, Connors BW. **1998**. Backward cortical projections to primary somatosensory cortex in rats extend long horizontal axons in layer I. *J. Comp. Neurol*. 390: 297–310

- Caviness, V.S. **1976**. Patterns of cell and fiber distribution the neocortex of the reeler mutant mouse. *J. Comp. Neurol*. 170: 435-448

- Chen B, Schaevitz LR, McConnell SK. **2005**. Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(47): 17184-17189.

- Chen B, Wang SS, Hattox AM, Rayburn H, Nelson SB, McConnell SK. **2008**. The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 11382-11387.

- Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. **2009**. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis*. 42: 144-149.

- Custo Greig L, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H & Macklis JF. **2013**. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience*. 14: 755–769

- Deng J, Elberger AJ. **2003**. Corticothalamic and thalamocortical pathfinding in the mouse: dependence on intermediate targets and guidance axis. *Anat Embryol (Berl)*. 207(3): 177-192.

- Desai, A.R., and McConnell, S.K. **2000**. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development*. 127: 2863–2872.

- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. **2005**. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci*. 25(1): 247-251.

- Fame RM, MacDonald JL, Macklis JD. **2011**. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci.* 34: 41-50.
- Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. **2010**. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature Neuroscience.* 13: 690–699.
- Franco SJ, Gil-Sanz C, Martinez-Garay I, Espinosa A, Harkins-Perry SR, Ramos C, Müller U. **2012**. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science.* 337: 746–749.
- Frantz GD, McConnell SK. **1996**. Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron.*17(1): 55-61.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. **2006**. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci.* 26: 1045–1056.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. **1999**. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron.* 23(2): 257-271.
- Götz M., Huttner W.B. **2005**. The cell biology of neurogenesis. *Nat review mol cell biol.* 6: 355-380.
- Guillemot F. **2008**. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol.* 83: 37-52.
- Gunnarsen JM, Augustine C, Spirkoska V, Kim M, Brown M, Tan SS. **2002**. Global analysis of gene expression patterns in developing mouse neocortex using serial analysis of gene expression. *Molecular and cellular neurosciences.* 19(4): 560-573.
- Han W, Kwan KY, Shim S, Lam MM, Shin Y, Xu X, Zhu Y, Li M, Sestan N. **2011**. TBR1 directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 3041-3046.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. **2001**. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol.* 229(1): 15-30.
- Hébert JM, Fishell G. **2008**. The genetics of early telencephalon patterning: some

assembly required. *Nat Rev Neurosci.* 9(9): 678-85.

- Heng JI, Nguyen L, Castro DS, Zimmer C, Wildner H, Armant O, Skowronska-Krawczyk D, Bedogni F, Matter JM, Hevner R, Guillemot F. **2008.** Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature.* 455(7209): 114-118.
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. **2001.** Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron.* 29(2): 353-66.
- Hong CJ, Hsueh YP. **2007.** Cytoplasmic distribution of T-box transcription factor Tbr-1 in adult rodent brain. *J Chem Neuroanat.* 33(3): 124-130.
- Inoue K, Terashima T, Nishikawa T, Takumi T. **2004.** Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci.* 20(11): 2909-2916.
- John A y cols. **2012.** Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development. *Development.* 139: 1831-1841.
- Kandel y cols. **2000.** Principles of neural sciences. Fourth Edition.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES. **2012.** Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development.* 139(9):1535-1546.
- Kriegstein AR, Noctor SC. **2004.** Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27(7): 392-399.
- Kuo TY, Hsueh YP. **2007.** Expression of zinc finger transcription factor Bcl11A/Evi9/CTIP1 in rat brain. *J Neurosci Res.* 85: 1628-1636.
- Kuo TY, Hong CJ, Hsueh YP. **2009.** CTIP1 regulates expression of DCC and MAP1b in control of axon branching and dendrite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* 42: 195-207.
- Kuwata T, Nakamura T. **2008.** BCL11A is a SUMOylated protein and recruits SUMO-conjugation enzymes in its nuclear body. *Genes Cells.* 13(9):931-940.
- Lai T, Jabaudon D, Molyneaux BJ, Azim E, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. **2008.** SOX5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron.* 57: 232-247.
- Lambeth LS, Smith CA. **2013.** Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol.* 942: 205-232.
- Lee SK, Pfaff SL. **2003.** Synchronization of neurogenesis and motor neuron

specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron*. 38(5):731-745.

- Leid M, Ishmael JE, Avram D, Shepherd D, Fraulob V, Dollé P. **2004**. CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 4: 733-739.

- Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK. **2008**. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*. 18 : 28-35.

- Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG. **2003**. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol*. 4: 525-532.

- Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 25(4): 402-408.

- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. **2002**. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 295(5556): 868-872.

- Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. **2011**. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 146:18–36.

- Luskin MB1, Pearlman AL, Sanes JR. **1988**. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron*. 1(8): 635-47.

- MacDonald JL, Fame RM*, Azim E, Shnider SJ, Molyneaux BJ, Arlotta P, Macklis JD. **2013**. *Comprehensive Developmental Neuroscience: Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. Rubenstein J, Rakic P, editors. Amsterdam: Elsevier; Specification of Cortical Projection Neurons; p.475-502

- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Götz M. **2003**. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*. 37(5): 751-764.

- Martínez-Cerdeño V, Cunningham CL, Camacho J, Antczak JL, Prakash AN, Cziep ME, Walker AI, Noctor SC. **2012**. Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One*.

7(1):e30178.

- Matsuda T, Cepko CL. **2004**. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(1): 16-22
- Matsuda T, Cepko CL. **2007**. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(3):1027-32.
- McConnell SK. **1988**. Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *J Neurosci*. 8(3): 945-74.
- McConnell SK, Kaznowski CE. **1991**. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*. 254: 282-285.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ. **1994**. Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex. *J Neurosci*. 4: 1892-1907.
- McKenna WL y cols. **2011**. Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J Neurosci*. 31: 549-564
- Mitchell, B.D. and Macklis, J.D. **2005**. Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. *J. Comp. Neurol*. 482: 17–32
- Mlodzik M, Baker NE and Rubin GM. **1990**. Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*. 4: 1848-1861.
- Molnar, Z. y Cordery, P. **1999**. Connections between cells of the internal capsule, thalamus, and cerebral cortex in embryonic rat. *J. Comp. Neurol*. 413: 1–25.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P, Hirata, T, Hibi, M. y Macklis, JD. **2005**. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*. 47: 817–831
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. **2007**. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 8: 427-437.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Fame RM, MacDonald JL, MacQuarrie KL, Macklis JD. **2009**. Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J. Neurosci*. 29: 12343–12354.
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M, Walsh CA. **2004**. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II–IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol*. 479: 168–180

- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. **2004**. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2):136-144.
- O'Leary DD, Chou SJ, Sahara S. **2007**. Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron.* 56(2): 252-69.
- O'Leary DD, Nakagawa Y. **2002**. Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol.* 12(1):14-25.
- O'Leary DD, Koester SE. **1993**. Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex. *Neuron.* 10(6): 991-1006.
- Oliva C, Sierralta J. **2010**. Regulation of axonal development by the nuclear protein hindsight (pebbled) in the *Drosophila* visual system. *Dev Biol.* 344: 911-921.
- Prelich G. **2012**. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 190(3): 841-854.
- Qiu Y, Pereira FA, DeMayo FJ, Lydon JP, Tsai SY, Tsai MJ. **1997**. Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Gene Dev.* 11: 1925-1937.
- Rallu M, Machold R, Gaiano N, Corbin JG, McMahon AP, Fishell G. **2002**. Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development.* 129(21): 4963-4974.
- Rakic P. **1972**. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145: 61-84.
- Rakic P. **2003**. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia.* 43(1): 19-32.
- Rakic P. **2006**. A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex.* 16 Suppl 1:i3-17.
- Rash BG1, Grove EA. **2007**. Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J Neurosci.* 27(43): 11595-115603.
- Root DE, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM. **2006**. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat Methods.* 3(9):715-719.

- Saito T y Nakatsuji N. **2001**. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev Biol.* 240: 237-246.
- Saito T. y cols. **2011**. Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cereb Cortex.* 21(3): 588-596.
- Sankaran VG y cols. **2008**. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 322: 1839-1842.
- Senawong T, Peterson VJ y Leid M. **2005**. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys.* 434: 316-325.
- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S. **2006**. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci.*9(6):743-751.
- Shim S, Kwan KY, Li M, Lefebvre V, Sestan N. **2012**. Cis-regulatory control of corticospinal system development and evolution. *Nature.* 486: 74-79.
- Smart IHM. **1973**. Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat.*116: 67-91.
- Srinivasan K, et al. **2012**. A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (47): 19071-19078.
- Stern CD. **2006**. Neural induction: 10 years on since the 'default model'. *Curr Opin Cell Biol.* 18(6): 692-697.
- Sur M, Rubenstein JL. **2005**. Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science.* 310(5749): 805-10.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. **2000**. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature.* 407(6801): 189-194.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. **2001**. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression.

Development. 128: 1983–1993.

- Van der Wees, J. y cols., 1996. Developmental expression and differential regulation by retinoic acid of *Xenopus* COUP-TF-A and COUP-TF-B. *Mechanisms of Development*. 54: 173-184.
- Wang, Tsai JW, LaMonica B, and Kriegstein A. **2011**. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci*. 14(5): 555–561.
- Walsh, C. & Cepko, C. L. **1988**. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science*. 241: 1342–1345.
- Wilson, C.J. **1987**. Morphology and synaptic connections of crossed corticostriatal neurons in the rat. *J. Comp. Neurol*. 263: 567–580.
- Wonders CP, Anderson SA. **2006**. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7 :687-696.
- Yu Y, Wang J, Khaled W, Burke S, Li P, Chen X, Yang W, Jenkins NA, Copeland NG, Zhang S, Liu P. **2012**. *Bcl11a* is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J Exp Med*. 209(13): 2467-2483.
- Zimmer, C., Tiveron, M.C., Bodmer, R., and Cremer, H. **2004**. Dynamics of *Cux2* expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb. Cortex*. 14: 1408–1420.