

# **ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE TRANS- CRIPCIÓN PBX EN LA DIFERENCIACIÓN A NEURONA DOPAMINÉRGICA DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN.**

Tesis doctoral de Laura Remesal Gómez



Programa de Doctorado de Neurociencias  
Directora: Dra. Nuria Flames Bonilla  
Tutora: Dra. Isabel Fariñas  
Valencia 2017



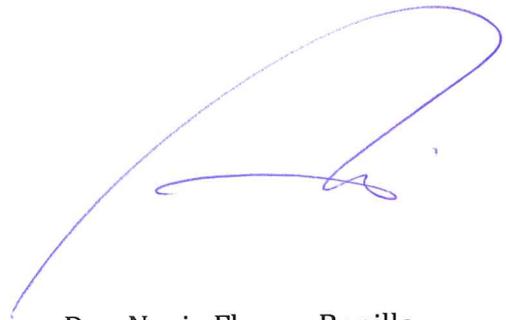


Nuria Flames Bonilla, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular y Directora de la Unidad de Neurobiología del Desarrollo del Instituto de Biomedicina de Valencia del CSIC,

CERTIFICA:

Que Laura Remesal Gómez, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Barcelona, ha realizado bajo mi supervisión, la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la función de los factores de transcripción PBX en la diferenciación a neurona dopaminérgica del bulbo olfatorio de ratón”.

En Valencia, 29 de Mayo de 2017



Dra. Nuria Flames Bonilla

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a una beca predoctoral del Subprograma de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad asociada al proyecto SAF2011-26273.

La investigación ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

“Caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la generación de neuronas serotoninérgicas”. Ministerio de Economía y Competitividad. Plan Nacional I+D (SAF2011-26273).

“Estudio de los mecanismos transcripcionales que regulan la diferenciación de las neuronas monoaminérgicas y su conservación evolutiva”. Ministerio de Economía y Competitividad. Plan Nacional I+D (SAF2014-56877-R).

“Dissecting the gene regulatory mechanisms that generate serotonergic neurons and their link to mental disorders”. European Research Council. Starting Grant.

# Resumen

Las neuronas dopaminérgicas (DA) regulan una amplia variedad de comportamientos; defectos en la función o supervivencia de estas neuronas dan lugar a patologías tan importantes como el Parkinson. Todas las neuronas dopaminérgicas se caracterizan por la expresión de una batería de genes que codifican para un grupo de proteínas implicadas en la síntesis, transporte y recaptación de la dopamina y que en su conjunto denominamos genes de la vía de la dopamina. Por tanto, conocer los factores de transcripción que activan de forma directa la transcripción de estos genes es el primer paso para descubrir las claves de la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas.

Los genes de la vía de la dopamina están altamente conservados a lo largo de la evolución. Estudios en el nematodo *C.elegans* han demostrado que tres factores de transcripción, CEH-20 (factor de la familia PBX), AST-1 (factor de la familia ETS) y CEH-43 (factor de la familia Homeodominio) son necesarios para la diferenciación terminal de las neuronas DA. Estos factores actúan de forma coordinada uniéndose a las regiones reguladoras y activando la expresión, no sólo de los genes de la vía de la DA, sino de la mayor parte del transcriptoma de la neurona dopaminérgica madura.

El sistema dopaminérgico en mamíferos se distribuye en núcleos del mesencéfalo, diencefalo y bulbo olfatorio. Sin embargo, en este proyecto nos hemos centrado en el estudio de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio ya que se trata de la población más ancestral en evolución y además porque las neuronas DA del bulbo requieren para su correcta diferenciación los ortólogos para AST-1 y CEH-43 (ER81 y DLX2 respectivamente). Nuestro principal interés en esta tesis por tanto, ha sido estudiar si homólogos de CEH-20, el tercer factor conocido en el gusano, participan de manera directa en la especificación dopaminérgica del bulbo en organismos superiores como el ratón.

En mamíferos, existen cuatro miembros en la familia PBX: PBX1, PBX2, PBX3 Y PBX4. El estudio de su expresión en el bulbo olfatorio, mediante inmunotinción doble con Tiroxina Hidroxilasa (marcador DA) y los factores PBX, determinó que tanto PBX1 (isoforma 1a pero no 1b) como PBX2 se expresan en las neuronas DA del bulbo olfatorio de neonatos y adultos. El mismo estudio también reveló que la expresión de PBX1a y PBX2 no

es exclusiva de las neuronas DA sino que también se expresan en otras células de la capa periglomerular así como en la capa granular (capa más interna) del bulbo olfatorio y otras neuronas del cerebro. Análisis de expresión de la Tirosina Hidroxilasa en mutantes condicionales para PBX1 específicos del linaje dopaminérgico, mutantes nulos para PBX2 y dobles mutantes, demuestran que PBX1 pero no PBX2 es necesario para la diferenciación de las neuronas DA del bulbo, tanto las generadas durante el desarrollo embrionario como en el adulto.

Estudios de linaje celular, en el que las neuronas del linaje dopaminérgico quedan permanentemente marcadas con la proteína verde fluorescente demuestran que, en los mutantes para PBX1, las neuronas están presentes pero no llevan a cabo su correcta diferenciación DA. Por otra parte, también se observó que un pequeño porcentaje de las neuronas del linaje DA en mutantes para PBX1 expresa ectópicamente Calretinina y/o Calbindina, dos marcadores de otras subpoblaciones de interneuronas del bulbo olfatorio, sugiriendo un cambio de destino celular de DA a otros linajes.

Además, hemos determinado que PBX1 regula la expresión de otros factores de transcripción necesarios para la diferenciación dopaminérgica como MEIS2 y COUP-TF1. Asimismo, los experimentos de electroporación *in vivo* en ratones neonatos confirman que el fenotipo observado en el bulbo olfatorio no es un efecto secundario derivado de posibles defectos de proliferación sino que es un fenotipo de diferenciación terminal y que puede ser rescatado de forma específica por la isoforma PBX1a pero no por PBX1b. Además, experimentos de sobreexpresión muestran que PBX1a y en menor medida PBX1b incrementan la diferenciación a neurona dopaminérgica en las células electroporadas, sugiriendo que en algunos contextos PBX1 es suficiente para inducir diferenciación DA.

Finalmente, hemos detectado que PBX1 se une directamente a las secuencias *cis* reguladoras del gen *Th* apoyando un efecto directo de este factor sobre su expresión. De esta forma proponemos a PBX1a como homólogo funcional de CEH-20 reforzando así la hipótesis de una posible conservación evolutiva en la diferenciación a neurona dopaminérgica entre nematodos y mamíferos.

# Summary

Dopamine signalling regulates a variety of complex behaviours and defects in dopaminergic neuron function or survival result in severe human pathologies such as Parkinson's disease. All dopaminergic neurons are characterized by the expression of a battery of genes that code for a set of proteins required for the synthesis, release and re-uptake of dopamine and all together are called the DA pathway genes. Therefore, understanding how this set of genes are transcriptionally activated in a coordinated manner is the first step to discover the clues of dopaminergic terminal differentiation.

Dopamine pathway genes are highly conserved throughout evolution. Studies in the nematode *C.elegans* have shown that three transcription factors, CEH-20 (PBX transcription factor family), AST-1 (ETS transcription factor family) and CEH-43 (Homeodomain transcription factor family) are necessary for the terminal differentiation of DA neurons. These factors act in a coordinated manner to bind the regulatory regions and activate the expression not only of the DA pathway but of most of the mature dopaminergic neuron transcriptome.

The dopaminergic system in mammals is distributed in nuclei of the mesencephalon, diencephalon and olfactory bulb. However, in this project we have focused on the olfactory bulb dopaminergic neurons since it is the most ancestral population and also because it requires AST-1 and CEH-43 orthologs (ER81 and DLX2 respectively) for their correct differentiation. Our main interest in this PhD project has therefore been to study whether homologues of CEH-20, the third known factor in the worm, directly participates in the dopaminergic specification of the bulb in higher organisms such as the mouse.

In mammals, there are four members in the PBX family: PBX1, PBX2, PBX3 and PBX4. The study of its expression in the bulb, by double immunostaining against Tyrosine Hydroxylase (DA marker) and PBX factors, determined that both PBX1 (isoform 1a but not 1b) and PBX2 are expressed in neonatal and adult olfactory bulb DA neurons. The same study also revealed that the expression of PBX1a and PBX2 is not exclusive to dopaminergic neurons and other cells of the periglomerular layer as well as in the granular layer

(the most internal layer) of the olfactory bulb and other neurons of the brain also express them. Expression analysis of Tyrosine Hydroxylase, the rate limiting enzyme for dopamine synthesis, in PBX1 specific conditional mutants of the dopaminergic lineage, null mutants for PBX2 and double mutants demonstrate that PBX1 but not PBX2 is necessary for the differentiation to dopaminergic neuron of the bulb, both those generated at embryonic stages as well as at adult stages.

Studies of cell lineage tracing in which the neurons of the dopaminergic lineage are permanently marked with green fluorescent protein demonstrate that, in PBX1 mutants, the neurons are present but they are unable to differentiate into DA neurons. On the other hand, it was also observed that a small percentage of the DA lineage neurons in mutants for PBX1 ectopically express Calretinin and / or Calbindin suggesting a change in their cell fate from DA to other lineages.

In addition, experiments indicated that PBX1 regulates the expression of other transcription factors required for dopaminergic differentiation such as MEIS2 and COUP-TF1. Moreover, *in vivo* electroporation experiments in neonatal mice confirm that the phenotype observed in the olfactory bulb is not an indirect effect derived from possible defects in proliferation of progenitors but is due to terminal differentiation defects and that it can be rescued specifically by the PBX1a isoform but not by PBX1b. Furthermore, overexpression experiments show that PBX1a and to a lesser extent PBX1b increase the dopaminergic differentiation in electroporated cells.

Finally, we have detected that PBX1 directly binds to the *cis* regulatory sequences of the *Th* gene supporting a direct effect of this factor on its expression. In this way we propose PBX1a as functional homolog of CEH-20 thus reinforcing the hypothesis of a possible evolutionary conservation in the differentiation to dopaminergic neuron between nematodes and mammals.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>1. Diferenciación terminal neuronal</b>	<b>19</b>
<b>2. Diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas en <i>C. elegans</i></b>	<b>23</b>
<b>3. El bulbo olfatorio en ratón</b>	<b>27</b>
3.1. Estructura y organización del bulbo olfatorio adulto	27
3.2. Eminencias ganglionares y formación del bulbo olfatorio	29
3.3. Neurogénesis adulta en la zona subventricular	31
3.3.1. Organización celular de la zona subventricular adulta y generación de neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio	32
3.3.2. Heterogeneidad de la zona subventricular	32
<b>4. Diferenciación terminal dopaminérgica en el bulbo olfatorio de ratón</b>	<b>36</b>
4.1. Factores de transcripción reguladores de la diferenciación DA	36
4.2. Factores de transcripción de la familia PBX	37
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>1. Modelos animales</b>	<b>49</b>
1.1. Cepas de ratón	49
1.2. Genotipado de animales	52
<b>2. Estudios <i>in vivo</i></b>	<b>54</b>
2.1. Inyección de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)	54
2.2. Electroporación post-natal <i>in vivo</i>	54
2.2.1 Vectores y construcciones	55
2.2.2 Obtención de bacterias competentes	57
2.2.3 Transformación de las bacterias competentes	57
2.2.4 Obtención del DNA plasmídico (maxipreps)	58
2.3. Técnicas histológicas	58
2.3.1 Fijación del tejido	58
2.3.2. Post-fijación del tejido	59
2.3.3. Procesamiento del tejido	59
2.4. Técnicas inmunohistoquímicas	60
2.4.1 Análisis inmunohistoquímico	60
2.5. Hibridación <i>in situ</i> de fluorescencia	61
2.5.1 Obtención de la sonda	61
2.5.2 Detección del mRNA	61
<b>3. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)</b>	<b>64</b>
<b>4. Análisis estadístico</b>	<b>67</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
<b>1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX</b>	<b>73</b>
1.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en cerebro adulto de ratón	74
1.1.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la zona subventricular	74

1.1.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en neuroblastos migradores	78
1.1.3. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la capa periglomerular del bulbo olfatorio	84
1.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en cerebro de ratones neonatos (P0)	92
1.2.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la zona ventricular y subventricular de una SVZ inmadura	92
1.2.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio	96
<b>2. Análisis de las neuronas DA del bulbo olfatorio a E17,5 en mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i>; <i>Pbx2<sup>-/-</sup></i>; <i>Nestin-CRE</i></b>	<b>100</b>
2.1. Cuantificación de células positivas para TH proteína del bulbo olfatorio a E17,5 en mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>Pbx2<sup>-/-</sup></i> ; <i>Nestin-CRE</i>	101
2.2. Cuantificación de células positivas para mRNA de <i>Th</i> del bulbo olfatorio a E17,5 en mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>Nestin-CRE</i>	102
<b>3. Estudio de la población DA del bulbo olfatorio en mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i>; <i>Pbx2<sup>-/-</sup></i>; TH-ires-CRE</b>	<b>105</b>
3.1. Análisis de la expresión de la CRE recombinasa en la línea knock in TH-ires-CRE en el bulbo olfatorio de animales adultos	105
3.2. Análisis de la expresión de la Tirosina Hidroxilasa del bulbo olfatorio adulto en mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>Pbx2<sup>-/-</sup></i> ; TH-ires-CRE	106
3.3. Análisis de la expresión de la Tirosina Hidroxilasa en el bulbo olfatorio de mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i> ; TH-ires-CRE neonatos	108
<b>4. Caracterización de los mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i>; TH-ires-CRE en estadio adulto</b>	<b>109</b>
4.1. Análisis de la supervivencia de las células mutantes para PBX1	109
4.2. Análisis de linaje dopaminérgico en el bulbo olfatorio adulto de mutantes <i>Pbx1<sup>fl/fl</sup></i> ; TH-ires-CRE	110
4.3. Análisis de las poblaciones calretinina y calbindina en el bulbo olfatorio adulto en mutantes para PBX1	112
4.4. Análisis de la población de células GAD67 positivas en mutantes PBX1	114
4.5. Análisis de la expresión de otros factores de transcripción implicados en la diferenciación a neurona DA del bulbo olfatorio en mutantes PBX1	117
<b>5. Estudio de la función de PBX en diferenciación DA del bulbo olfatorio mediante electroporaciones <i>in vivo</i></b>	<b>129</b>
5.1. Análisis de la pérdida de función de PBX1 mediante la electroporación de la CRE-recombinasa	129
5.2. Experimentos de rescate del fenotipo	131
5.3. Análisis de la pérdida de función de PBX1 específica de linaje dopaminérgico	132
5.4. Análisis de la sobreexpresión de los factores de transcripción PBX1A y PBX1B	134
<b>6. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina con PBX1.</b>	<b>136</b>
<b>DISCUSIÓN</b> _____	<b>139</b>
<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONS</b> _____	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>161</b>



# Clave de abreviaturas

<b>ARNm</b>	Mensajero de Ácido Ribonucleico
<b>BO</b>	Bulbo Olfatorio
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'desoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>CB</b>	Neurona Calbindina
<b>CR</b>	Neurona Calretinina
<b>DA</b>	Dopaminérgicas
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
<b>DCX</b>	Doblecortina
<b>EPL</b>	External Plexiform Layer / Capa Plexiforme Externa
<b>FT</b>	Factor de Transcripción
<b>GABA</b>	Gamma-AminoButyric Acid
<b>GCL</b>	Granular Cell Layer / Capa Granular
<b>LGE</b>	Eminencia Ganglionar Lateral
<b>MGE</b>	Eminencia Ganglionar Medial
<b>MCL</b>	Mitral Cell Layer / Capa Mitral
<b>PB</b>	Phosphate Buffer / Tampón fosfato
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction / Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGL</b>	Periglomerular Layer / Capa Periglomerular
<b>RMS</b>	Rostral Migratory Stream / Camino migrador Rostral
<b>SEM</b>	Standard Error of the mean
<b>Sp</b>	Septum
<b>St</b>	Estriado
<b>SVZ</b>	Zona Subventricular
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilasa
<b>VL</b>	Ventriculo Lateral
<b>VZ</b>	Zona Ventricular



# **int**roducción



# 1 DIFERENCIACIÓN TERMINAL NEURONAL

El sistema nervioso se compone de una extraordinaria diversidad de tipos neuronales que se generan a tiempos específicos y en regiones concretas. Entender cómo está programada la generación de esta diversidad en un organismo es uno de los objetivos más fascinantes de la biología. En vertebrados, estos estudios se han concentrado clásicamente en la identificación y manipulación de la actividad (es decir, la eliminación o expresión ectópica) de factores reguladores tales como factores de transcripción o proteínas de señalización (morfógenos). Gracias a estos trabajos, se conocen multitud de cascadas moleculares y las redes que actúan en el desarrollo y que permiten la diferenciación específica de las neuronas (Guillemot, 2007; Jessel, 2000). Durante el desarrollo temprano una serie de morfógenos como FGF, Shh, Wnt, BMP, PDGF, ácido retinoico, etc son secretados y difunden formando gradientes de concentración en el embrión responsables de la regionalización del sistema nervioso central (SNC) (Briscoe *et al.*, 2000). En respuesta a estos gradientes, los progenitores, inician la expresión de diferentes genes proneurales del tipo hélice-bucle-hélice (*bHLH*) entre los que se incluyen *Ascl1* y miembros de la familia neurogenina necesarios y suficientes para iniciar el desarrollo de linajes neurales (Briscoe *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2015).

Sin embargo, aunque conocemos muchos de los FT necesarios para la correcta diferenciación de distintos tipos de neuronas, desconocemos en gran medida cuáles son sus dianas directas y cómo interactúan entre sí para generar y mantener la diversidad neuronal. La generación de los diferentes tipos de neuronas en el sistema nervioso es un proceso de múltiples etapas cuyo punto final es la expresión de distintas baterías de genes de diferenciación terminal, específicas del tipo de neurona, que determinan sus propiedades funcionales.

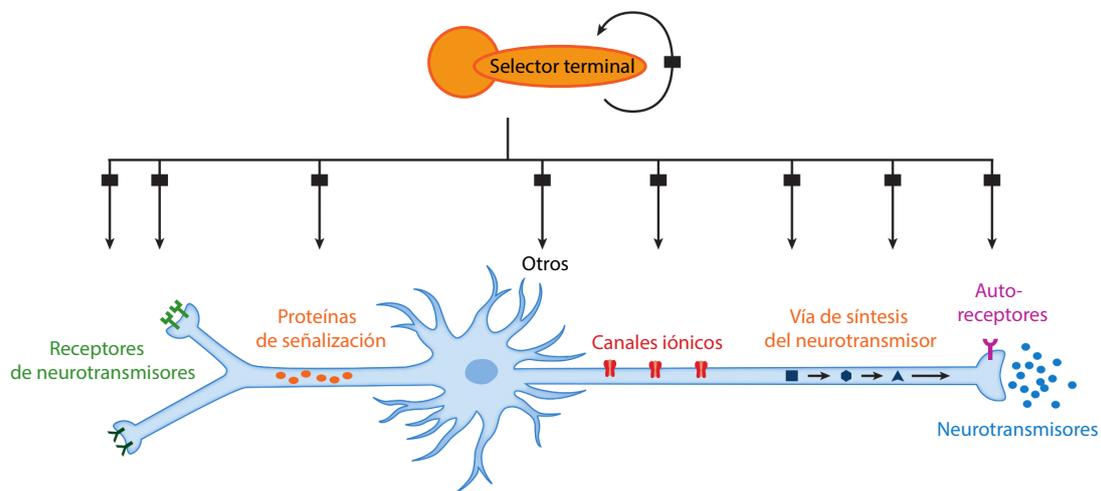
Los genes de diferenciación terminal (también denominados genes efectores o genes estructurales) codifican para proteínas que definen las propiedades diferenciadas de una neurona a lo largo de su vida útil. Estas proteínas incluyen enzimas que median la síntesis de neurotransmisores, transportadores que empaquetan neurotransmisores, receptores de neurotransmisores localizados sinápticamente, canales iónicos que determinan el potencial de reposo de una neurona, moléculas que definen características estructurales tales como patrones de arborización dendrítica y moléculas de adhesión sináptica. Estas proteínas por tanto, forman una firma molecular que define de manera única la identidad y funcionalidad de la neurona y que conforman en gran medida el transcriptoma de una neurona madura. Aunque los componentes de los programas de expresión de las neuronas adultas son flexibles y responden a condiciones externas específicas, un ejemplo de flexibilidad sería la plasticidad sináptica, las características fundamentales de identidad de la neurona muestran poca variación durante su vida post-embionaria.

Es importante mencionar que, en general, ninguna de estas características de identidad, es decir, los productos de genes de diferenciación terminal, son necesariamente exclusivos de un tipo de neurona específico; más bien, una combinación única de genes es la que define un tipo específico de neurona (Hobert *et al.*, 2010).

Con este argumento en mente, el reto de la comprensión de la diferenciación neuronal radica en el estudio de cómo la expresión de estos genes de diferenciación terminal está regulada es decir, qué elementos *cis* reguladores y factores que actúan en *trans* regulan la expresión de estas combinaciones específicas de genes en la diferenciación terminal de cada tipo neuronal.

Los primeros estudios realizados en los años ochenta y noventa sobre las regiones reguladoras de los genes de diferenciación terminal se elaboraron con genes reporteros expresados en líneas celulares o en cultivos primarios (Dennis et al., 1985; Chalfie M et al., 1994; Moss et al., 1996). Sin embargo, dichos estudios eran difíciles de interpretar dado que los factores reguladores a menudo difieren entre el contexto *ex vivo* y el contexto de diferenciación de la célula dentro del organismo. Por ello, la forma más incisiva de realizar estudios sobre la arquitectura reguladora de los programas de expresión génica es llevar a cabo estudios *in vivo*, sin embargo esta aproximación es técnicamente cara y difícil en modelos animales complejos como el ratón.

El uso de modelos animales alternativos y más simples de manipular ha contribuido a un avance en el conocimiento de los mecanismos reguladores que controlan la especificación neuronal. En concreto, la sencillez experimental que ofrece el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), junto con el conocimiento preciso de la composición celular de su sistema nervioso, que contiene sólo 302 neuronas, lo han convertido en una excelente elección para investigar los mecanismos de regulación en *cis* que controlan la expresión de los genes de diferenciación terminal.



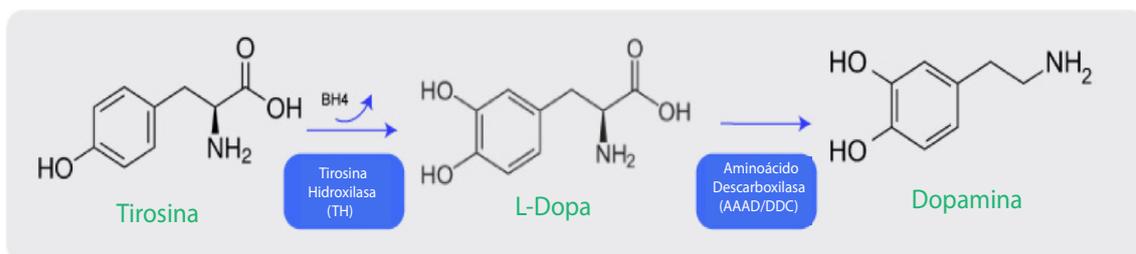
▲ **Figura I1: Mecanismo de acción de los selectores terminales.** Esquema en el que se muestra como los selectores terminales regulan directamente la expresión de la batería de genes de diferenciación terminal ( genes de la vía de síntesis del neurotransmisor, expresión de autoreceptores, canales de iones, síntesis de proteínas de señalización, expresión de receptores para los neurotransmisores etc.) mediante la unión a sus regiones *cis* reguladoras (rectángulos negros). Muchas veces los selectores terminales también autoregulan su propia expresión (representado por la flecha circular). Figura adaptada de O. Hobert, 2011.

Una de las técnicas más recurrentes para este tipo de estudios en *C. elegans* consiste en la fusión de las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de diferenciación terminal a la proteína verde de fluorescencia (GFP, del inglés Green Fluorescence Protein) como mecanismo para identificar los elementos necesarios de regulación específicos de cada tipo neuronal mediante ensayos mutacionales estándar (Wenick et al., 2004).

Este tipo de análisis ha revelado lo que parece ser un principio fundamental de la diferenciación neuronal terminal: la co-regulación, es decir, la regulación de la gran parte de los genes efectores de un tipo neuronal a través de una secuencia reguladora en *cis* común a todos ellos (Hobert, 2011) (Figura I1). Debido a su acción directa y global en la regulación de la diferenciación terminal de un programa neuronal, estos factores de transcripción se han denominado selectores terminales (factor de transcripción o combinación de varios que directamente inicia y mantiene la expresión de genes efectores). Un ejemplo descrito en *C. elegans* es el caso de la batería de genes que determina el neurotransmisor de cada tipo neuronal.

En las neuronas motoras GABAérgicas, la expresión de los genes que codifican para la enzima que sintetiza GABA *unc-25/GAD* (del inglés Glutamic Acid Decarboxylase) y el transportador vesicular GABA *unc-47/VGAT* (del inglés Vesicular GABA Transporter) están controlados por una secuencia reguladora en *cis* de K50 con sitios de unión homeo dominio (Eastman et al., 1999).

Otro ejemplo son los genes que codifican para las enzimas necesarias en la síntesis de la dopamina (DA) y que en su conjunto denominamos como los “genes de la vía de la dopamina”: *cat-2/TH* (del inglés Tyrosine Hydroxylase), *cat-4/GTPCH* (del inglés GTP-cyclohydrolase) y *bas-1/AAAD* (del inglés Aromatic Amino Acid Decarboxylase), *cat-1/VMAT* (del inglés Vesicular Monoamine Transporter), *dat-1/DAT* (del inglés Dopamine Transporter), (Figura I2). Todos ellos comparten una secuencia *cis* reguladora formada por sitios de unión ETS, DLL y PBX que son necesarios para la diferenciación terminal de todas las neuronas DA (Flames et al., 2009; Doitsidou et al., 2013).



▲ **Figura I2: Ruta biosintética de la dopamina.** Esquema donde se muestra la hidroxilación del aminoácido tirosina por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) formándose L-Dopa que es descarboxilada para formar el neurotransmisor dopamina.

Este mecanismo de regulación de la diferenciación terminal también ha sido descrito en otros invertebrados como por ejemplo en la diferenciación de los fotorreceptores del ojo en *Drosophila Melanogaster*. El ojo de la mosca se compone de 800 omatidios aproximadamente, cada uno formado por 20 células entre las cuales se incluyen ocho fotorreceptores (PRs del inglés Photoreceptors), R1-R8. La diferenciación terminal de los distintos PR tiene lugar al final del desarrollo de la retina y requiere de la activación de genes específicos para la rodopsina (*rh* del inglés Rhodopsin) que permitirán la detección de las distintas longitudes de onda de la luz. (Cook *et al.*, 2001). La expresión de los diferentes *rhs* que determinarán los tipos de fotorreceptores está regulada por unos sitios de unión del tipo homeodominio altamente conservados presentes en los promotores de los genes *rhs* a los cuales se une la homeoproteína Otd (del inglés Orthodenticle) (Tahayato *et al.*, 2003).

En vertebrados, el estudio de las regiones reguladoras es un poco más complejo debido a que los elementos *cis* reguladores pueden localizarse y espaciarse en distancias mayores. Sin embargo, en los últimos años se han hecho grandes esfuerzos en identificar las secuencias reguladoras activas en distintas regiones del cerebro, ya sea por transgénesis o mediante el análisis de estados específicos de la cromatina (marcas de histonas y accesibilidad de cromatina) (Frank *et al.*, 2015; Nord *et al.*, 2013; Pattabiraman *et al.*, 2014; Silberberg *et al.*, 2016; Visel *et al.*, 2013).

Además, existen varios estudios que han demostrado que la diferenciación terminal neuronal en vertebrados también está mediada por la regulación coordinada de baterías de genes a través de un número pequeño de factores de transcripción como por ejemplo el papel de PET-1 en la diferenciación serotoninérgica. En ratón, PET-1 es un factor con dominio ETS (T. Hendricks *et al.* 1999; Liu *et al.*, 2010) cuya expresión define la mayoría, si no todas, de las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central. Su delección da lugar a graves defectos en la diferenciación serotoninérgica: defectos en la expresión de la maquinaria necesaria para la síntesis y el transporte de la serotonina, defectos en el crecimiento de los axones hacia sus correctas dianas y defectos en sus propiedades electrofisiológicas (Liu *et al.*, 2010). Además, PET-1 regula directamente la expresión de una multitud de genes de diferenciación serotoninérgica como por ejemplo la enzima limitante de la síntesis de la serotonina, la triptófano hidroxilasa y el transportador de serotonina (T. Hendricks *et al.*, 1999; T. J. Hendricks *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010).

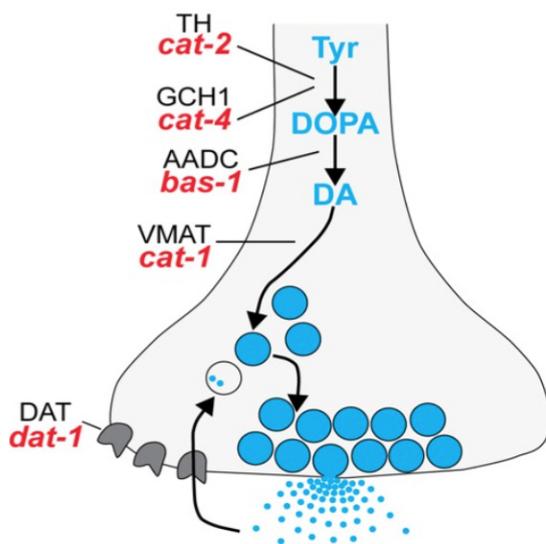
Otra característica clave de los selectores terminales en invertebrados y vertebrados es su expresión sostenida durante toda la vida de la neurona. Por tanto, esta observación sugiere que los selectores terminales pueden no sólo iniciar la expresión de los genes de diferenciación terminal, sino también mantener su expresión, de hecho existen varios ejemplos tanto en invertebrados como en vertebrados que demuestran que la eliminación de estos factores en neuronas adultas maduras da lugar a defectos de mantenimiento de la identidad de estas neuronas (Flames *et al.*, 2009; T. J. Hendricks *et al.*, 2003; Laguna *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2011).

## 2 DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN *C.elegans*

La dopamina es una catecolamina utilizada como neurotransmisor por una amplia variedad de animales, incluyendo tanto vertebrados como invertebrados. En mamíferos, este neurotransmisor cerebral tiene un papel destacado en funciones relacionadas con la cognición, el movimiento voluntario, la motivación, drogo-adicción y la recompensa (Shankar *et al.*, 2005; Flames *et al.*, 2011).

Las neuronas dopaminérgicas sintetizan dopamina a partir del aminoácido aromático tirosina (Figura I3), la dopamina se concentra en vesículas mediante un transportador vesicular de monoaminas y es liberada a la hendidura sináptica. Tras ejercer su acción, la dopamina es recaptada a través de un transportador específico para su posterior reciclaje o degradación (Flames *et al.*, 2011).

Defectos en la función o en la supervivencia de estas neuronas dan lugar a patologías humanas tan importantes como por ejemplo el Parkinson. Tanto las neuronas DA como los genes de la vía de la dopamina están altamente conservadas en evolución (Figura I3).



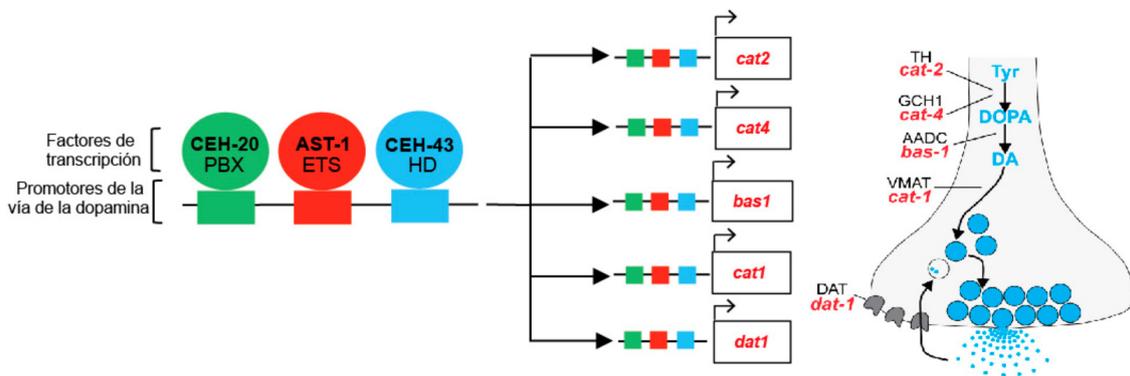
◀ **Figura I3: Genes de la vía de la síntesis de la dopamina.** Representación del terminal sináptico de una neurona dopaminérgica. En rojo se indican los genes de *C.elegans* y en negro la proteína de ratón. TH: tirosina hidroxilasa; GCH1: GTP ciclo hidrolasa; AADC: aminoácido decarboxilasa; VMAT: transportador vesicular de monoaminas; DAT: transportador de dopamina; Tyr: tirosina; Dopa: dihidroxifenilalanina; DA: dopamina. Modificado de (Flames & Hobert, 2011).

Trabajos previos de nuestro laboratorio identificaron en *C.elegans*, una secuencia *cis* reguladora, conocida como secuencia DA, común en los cinco genes de la vía de la dopamina (*cat-2*/TH, *cat-4*/GTPCH, *bas-1*/AAAD, *cat-1*/VMAT y *dat-1*/DAT) y que es necesaria para que los cinco genes se expresen en las ocho únicas neuronas DA que tiene el nematodo en el sistema nervioso hermafrodita (Flames *et al.*, 2009; Doitsidou *et al.*, 2013) (Figura I4).

Los estudios también revelaron que la región *cis* reguladora es reconocida por una combinación de tres factores de transcripción: AST-1 (factor de la familia ETS con dominio ETS), CEH-20 (factor de la familia PBX con homeodominio) y CEH-43 (factor de la fa

milia DLX con homeodominio) necesarios para la correcta diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas en gusano (Figura I4). Finalmente, observaron que en mutantes para los factores de transcripción AST-1, CEH-20 y CEH-43 las neuronas se generaban y expresaban marcadores pan-neuronales pero mostraban defectos en la diferenciación terminal DA (Doitsidou *et al.*, 2013).

Estos factores por tanto, actúan de forma coordinada uniéndose a las regiones reguladoras para iniciar y mantener la expresión del transcriptoma DA incluyendo los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis de la dopamina.



▲ **Figura I4: Figura 4. Código combinatorio de factores de transcripción responsable de la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas en *C. elegans*.** Las secuencias reguladoras de los genes de la vía de la dopamina contienen sitios de unión para estos tres factores (representados por cuadros verdes (PBX), rojos (ETS) y azules (HD))

Curiosamente, en vertebrados, la función de AST-1 y de CEH-43 en la diferenciación terminal dopaminérgica parece haberse conservado. Ratones mutantes del homólogo de *ast-1* (*Er81/Etv1*) muestran defectos en la población DA del bulbo olfatorio (BO). Sin embargo, ni el resto de poblaciones del BO ni la densidad celular ni la proliferación variaron entre animales mutantes y controles (Flames *et al.*, 2009). Tampoco se observó un incremento en la muerte celular.

Por tanto, ER81 probablemente afecte a los últimos estadios de diferenciación dopaminérgica en el BO, de hecho se ha visto que ER81 se une a la región reguladora del gen *Th* (John W. Cave *et al.*, 2010). Finalmente, otro indicativo de la conservación de la función de AST-1 y ER81 se muestra con el rescate del fenotipo mutante para AST-1 con la expresión de ER81 en gusanos transgénicos.

Por otra parte, *ceh-43* es homólogo de *Dlx2*. Durante el desarrollo DLX1, 2, 5 y 6 se expresan en los progenitores, en las células migradoras y en las neuronas maduras del BO (Eisensat *et al.*, 1999), y el mismo patrón se mantiene en adulto (Saino-Saito *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2007; M. S. Brill *et al.*, 2008).

Mutantes nulos para DLX2 muestran defectos tempranos en la diferenciación de las neuronas del BO y una reducción en el número de células que expresan TH (Qiu *et al.*, 1995). Ensayos de sobreexpresión mediante inyecciones retrovirales de DLX2 muestran un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas del BO, indicando su papel en la generación de estas neuronas. Por tanto, DLX2, podría ser el homólogo funcional en ratón de *ceh-43*.

Dado que dos de los tres factores de transcripción descritos como reguladores de la diferenciación terminal DA en *C.elegans* tienen homólogos funcionales en ratón (*ast-1/Er81* y *ceh-43/Dlx2*), estos resultados sugieren que la diferenciación terminal DA en ratón podría seguir los mismos mecanismos definidos en *C.elegans*.

Sin embargo, al inicio de este proyecto se desconocía si los factores PBX (homólogos del gen *C.elegans ceh-20* que actúa junto con *ast-1* y *ceh-43*) tienen algún papel en la diferenciación de las neuronas DA del BO, así como su posible interacción con ER81 y DLX2 (Tabla I1). Por tanto, el objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar si algún miembro o miembros de la familia de los PBX participa en la diferenciación terminal DA del BO.

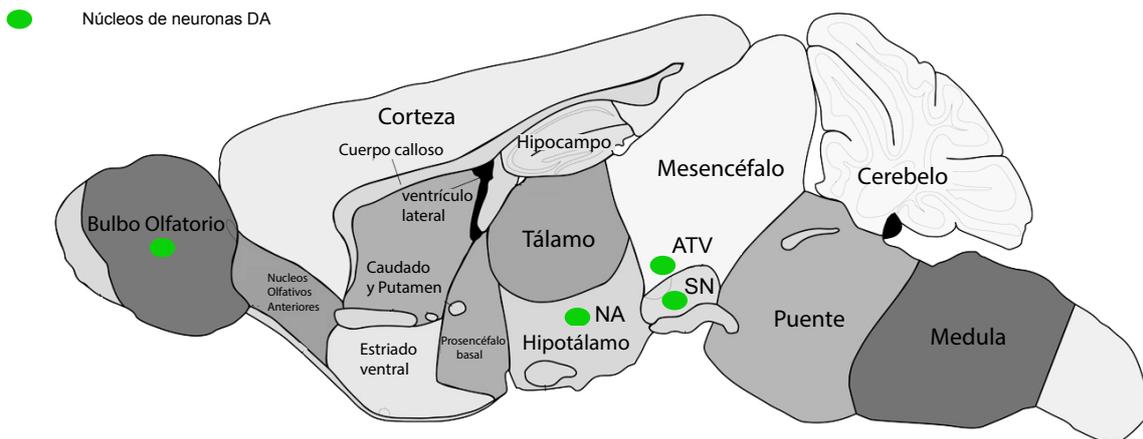
**Tabla I1.** Conservación evolutiva de los factores de transcripción que regulan los genes de la vía de la dopamina en *C.elegans*.

<b>Gen en <i>C.elegans</i></b>	<b>Tipo de factor de transcripción</b>	<b>Homólogo funcional en ratón</b>
<i>ast-1</i>	ETS	<i>Er81</i>
<i>ceh-43</i>	HD	<i>Dlx2</i>
<i>ceh-20</i>	PBX	<i>Pbx (?)</i>

La población DA del cerebro de mamíferos constituye un grupo de células funcional y anatómicamente muy heterogéneo que tienen en común la expresión de los genes de la vía de la DA (Cave *et al.*, 2009; S J Chinta *et al.*, 2005; Flames *et al.*, 2011) (Figura I5). En el cerebro adulto de los mamíferos, las neuronas DA se localizan principalmente en el área ventral tegmental (VTA) y en la substantia nigra pars compacta (SN) del mesencéfalo, en el núcleo arcuato del hipotálamo del diencefalo y en el bulbo olfatorio (BO) del telencéfalo.

Las neuronas de la SN están implicadas en el control motor mientras que las DA de la VTA regulan comportamientos como la recompensa, la motivación, la cognición y la adicción. Por el contrario, las DA del BO son necesarias para el procesamiento de la información del olor procedente de las neuronas receptoras olfatorias.

En este estudio nos hemos centrado en las DA del BO por ser las más ancestrales evolutivamente y porque trabajos previos han mostrado la expresión y funcionalidad de los homólogos de dos de los tres FT identificados en *C.elegans*, ER81 y DLX2 en dicha población dopaminérgica.



▲ **Figura I5: Neuronas dopaminérgicas en el cerebro de ratón.** Representación sagital del cerebro adulto de ratón donde se muestran los distintos núcleos de neuronas dopaminérgicas (verde): bulbo olfatorio; ATV, área tegmental ventral; SN, sustancia negra; NA, núcleo arcuato. Figura adaptada de GENSAT Project at Rockefeller University, <http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=39938>.

## 3 EL BULBO OLFATORIO EN RATÓN

### 3.1. Estructura y organización del bulbo olfatorio adulto

El bulbo olfatorio es la estructura del telencéfalo de los vertebrados implicada en la percepción de los olores. Anatómicamente está dividida en dos estructuras distintas: el bulbo principal y el bulbo accesorio. El bulbo principal presenta una organización laminar dispuesta a modo de capas concéntricas. Siguiendo el orden desde las capas más superficiales hacia las más profundas encontramos las siguientes: capa glomerular (PGL del inglés Periglomerular Layer), capa plexiforme externa (EPL del inglés External Plexiform Layer), capa de células mitrales (MCL del inglés Mitral Cell Layer), capa plexiforme interna (IPL del inglés Internal Plexiform Layer) y finalmente la capa granular (GCL del inglés Granular Cell Layer) (Figura I6A).

Cada una de estas capas está compuesta por diversos tipos celulares. Este conjunto de capas y células se integra en un complejo circuito neural en el que los axones de las neuronas sensoriales olfativas (OSN del inglés Olfactory Sensory Neurons), situadas en la mucosa de la cavidad nasal, establecen sinapsis en un área de estructuras esféricas, denominadas glomérulos, que constituyen la capa glomerular.

Cada neurona sensorial olfativa expresa un solo tipo de receptor (Chess *et al.*, 1994) y todas aquellas que expresan el mismo receptor proyectan a un sólo glomérulo en el BO (Mombaerts *et al.*, 1996; Ressler *et al.*, 1994); de esta manera, cada olor activa una combinación de neuronas sensoriales olfativas y por tanto de glomérulos.

Las neuronas alrededor de los glomérulos se denominan células juxtglomerulares (JG) y morfológicamente se dividen en tres tipos: células periglomerulares (PG), células en penacho (ETC del inglés External Tufted Cells) y células superficiales de axón corto (sSA del inglés Superficial Short Axon Cells). (Figura I6B).

Las células PG se caracterizan por tener el soma más pequeño de los tres tipos celulares (5-10µm de diámetro) y por lo general proyectan sus dendritas a un único glomérulo sólo ocasionalmente, proyectan a varios. (Pinching *et al.*, 1971a, 1971b). Este grupo engloba a los tres principales tipos de interneuronas de la PGL: las neuronas dopaminérgicas que expresan la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH+), y las que expresan proteínas de unión a calcio, las calretinina (CR) y las calbindina (CB) positivas (Parrish-Aungst *et al.*, 2007).

La expresión de CR, CB y TH es excluyente lo que sugiere que cada uno de los marcadores corresponde a un subtipo específico de interneurona (Kosaka *et al.*, 2005). Estas neuronas establecen sinapsis con las neuronas de proyección, entre ellas mismas y en ocasiones, conectan directamente con las neuronas sensoriales olfativas del epitelio olfativo (Kosaka *et al.* 1998). Todas ellas son GABAérgicas es decir, expresan y liberan GABA, principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central sintetizado por la ácido glutámico descarboxilasa (GAD del inglés Glutamic Acid Decarboxylase) (Kosaka *et al.*, 2007; Sawada *et al.*, 2011).

Existen dos genes que codifican para la ácido glutámico descarboxilasa, GAD67 y GAD65 sin embargo, casi todas las TH+ (85%) son GAD67+ aunque las células TH+/GAD67+ representan menos de un 20% del total de las células GABAérgicas de la PGL. Por el contrario, menos de un 7% de las GAD65+ expresan TH+ (Parrish-Aungst *et al.*, 2007). Adicionalmente, las células TH+ también utilizan dopamina como neurotransmisor y junto con los otros dos tipos de células PG (CR y CB) son las responsables de la inhibición intraglomerular (Wachowiak *et al.*, 2006).

Por otra parte, las células sSA muestran un soma ligeramente mayor al grupo anterior (8-12µm de diámetro) y pueden clasificarse en células sSA clásicas y células sSA TH+/GAD67+. Las clásicas, extienden sus dendritas hacia el espacio interglomerular alcanzando uno o dos glomérulos como máximo y establecen sinapsis con células de proyección, entre ellas mismas y células PG mientras que las células TH+/GAD67+, abarcan un número superior de glomérulos (a diferencia de las TH+/GAD67+ del tipo PG anteriores que sólo extendían sus dendritas a un glomérulo) y únicamente establecen sinapsis con células en penacho ( Pinching *et al.*, 1971a, 1971b; Aungst *et al.*, 2003) . Además, como el propio nombre indica, el segundo grupo, incluye células TH+/GAD67+ que liberan GABA y DA como neurotransmisores sin embargo, se desconoce que marcadores y que neurotransmisores caracterizan al primer grupo. Tampoco se conoce la función del grupo de las sSA clásicas pero se ha publicado que las TH+/GAD67+ serían las responsables de la inhibición entre glomérulos (Kiyokage *et al.*, 2010). Actualmente se desconoce ningún marcador molecular que distinga las células sSA TH+/GAD67+ de las células PG TH+/GAD67+.

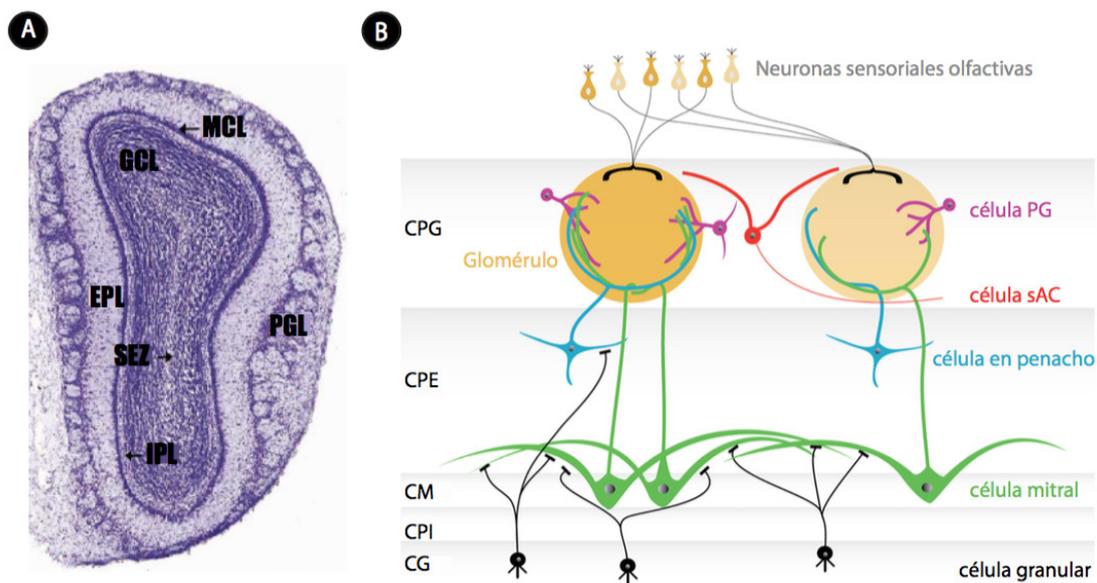
Finalmente, las células en penacho, presentan el soma más grande de los tres tipos (10-15µm de diámetro) y se clasifican en dos grupos: las células en penacho que no presentan dendritas secundarias con el soma localizado en el espacio interglomerular y las células en penacho con dendritas secundarias con el soma ubicado entre la capa PGL y la EPL.

Las dendritas de ambos grupos, al igual que sucede con las PG suelen proyectar a un único glomérulo y de manera excepcional pueden proyectar a más de uno. Otra característica del grupo sin dendritas secundarias es que expresa VGLUT2 y VGLUT3 sin embargo, por el momento se desconocen marcadores para el segundo grupo (Macrides *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1994). Estas células establecen sinápsis con células PG, células sSA, con neuronas olfativas sensoriales, con granulares (las que poseen dendritas secundarias), con mitrales y entre ellas mismas.

Las células en penacho, liberan glutamato y GABA (las que expresan VGLUT3) y únicamente las que tienen dendritas secundarias utilizan CCK y vasopresina como neurotransmisores (Liu *et al.*, 1994; Panzanelli *et al.*, 2005; Tobin *et al.*, 2010). Este grupo de células es el responsable de transmitir señales excitatorias dentro de un glomérulo.

Concretamente, el segundo subgrupo junto con las células mitrales, los dos tipos de neuronas de proyección del BO, conectan circuitos asociados a glomérulos con el mismo tipo de receptor y envían sus axones a la corteza olfativa (Nagayama *et al.*, 2014; Tatti *et al.*, 2014)(Figura I6B).

Por último, la capa granular, que a diferencia de la PGL muestra menos tipos morfológicos diferentes entre los que se encuentra la población de células granulares profundas, que inervan a las neuronas de proyección de la MCL y una segunda población de células granulares más superficiales (entre las que se encuentran las interneuronas CR+/GABA+) las cuales establecen sinápsis con las neuronas en penacho de proyección (Orona E *et al.*, 1984; Greer CA., 1987; Batista- Brito *et al.*, 2008).



▲ **Figura I6. Organización y funcionamiento del bulbo olfatorio.** (A) Representación de las diferentes capas del bulbo olfatorio. PGL, capa periglomerular; EPL capa plexiforme externa; MCL, capa mitral; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa granular; SEZ, zona subependimal. (B) Representación esquemática de la red neuronal del bulbo olfatorio, imagen obtenida de (Nagayama *et al.*, 2014).

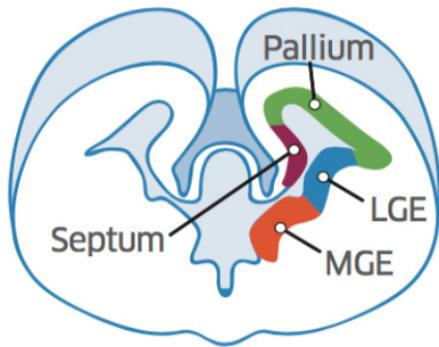
### 3.2. Eminencias ganglionares y formación del BO

Durante el desarrollo embrionario, las eminencias ganglionares o primordios estriatales son las tres principales zonas proliferativas que se encuentran en el subpalium o parte ventral del telencéfalo: la eminencia ganglionar medial (EGM), la eminencia ganglionar lateral (EGL) y la eminencia ganglionar caudal (EGC). Las tres regiones constituyen fuentes celulares que contribuyen en gran medida a la formación de distintas estructuras cerebrales (Figura I7).

Cada una de ellas presenta diferencias en su anatomía, en los marcadores moleculares que las caracterizan y en el patrón de migración de las células que producen. La EGM y EGL son las más estudiadas, aportan células a los ganglios basales (estriado y *globus pallidum*) mediante migración radial, y por migración tangencial son la fuente de la mayoría de las interneuronas de la corteza, del hipocampo (por parte de la EGM) y del BO (por parte de la EGL).

La EGC, por su parte, contribuye a poblaciones específicas de interneuronas, al estriado y a zonas específicas del sistema límbico (Yozu *et al.*, 2005). La EGM y la EGL son también una fuente importante de oligodendrocitos.

En el BO, las interneuronas granulares y periglomerulares se generan a partir de la EGL, mientras que el resto de neuronas se originan a partir de las células neuroepiteliales locales (Anderson *et al.*, 2001; Wichterle *et al.*, 2001)

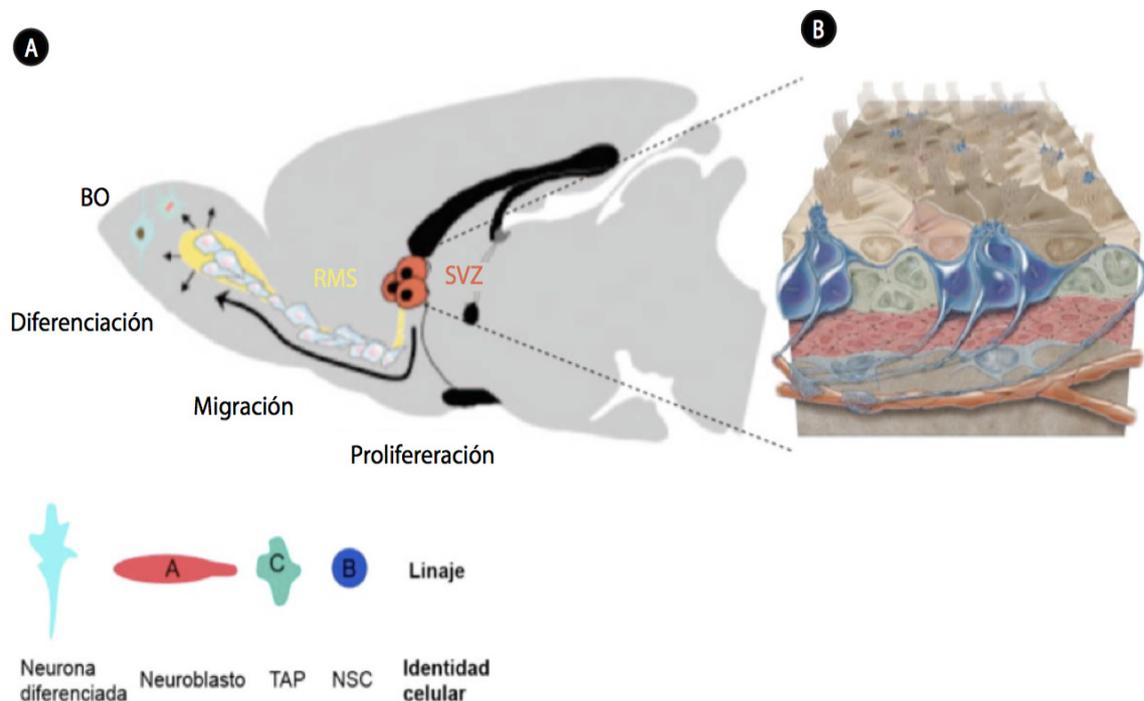


◀ **Figura I7: Eminencias ganglionares de ratón.** Representación coronal del cerebro embrionario de ratón donde se muestran las eminencias ganglionares lateral y medial, el palio y el septum. Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008.

### 3.3. Neurogénesis adulta en la zona subventricular (SVZ)

Una característica muy particular de las interneuronas GABAérgicas del bulbo, incluyendo las dopaminérgicas, es que continúan generándose a lo largo de toda la vida del animal, constituyendo uno de los pocos casos de neurogénesis adulta en el cerebro (Alvarez-Buylla *et al.*, 1995).

Las nuevas neuronas se generan a partir de células madre neurales adultas ( NSCs del inglés Neural Stem Cells) ubicadas en la pared del ventrículo lateral (VL) de la zona subventricular (SVZ del inglés Subventricular Zone) que dan lugar a neuroblastos que migran al BO siguiendo el denominado camino migrador rostral (RMS del inglés Rostral Migratory Stream) hasta terminar diferenciándose en interneuronas del BO (Doetsch *et al.*, 1999; Luskin, 1993) (Figura I8A).



▲ **Figura I8: Generación de neuronas del bulbo olfatorio.** (A) Representación sagital de cerebro adulto, donde se muestra como las neuronas inmaduras generadas en la SVZ migran a través del RMS hacia el bulbo olfatorio. La migración se realiza a través de unas estructuras gliales, denominadas gliotubos. Una vez alcanzado el bulbo, las nuevas neuronas migran radialmente hacia las capas correspondientes donde se diferencian en neuronas granulares y periglomerulares modificado de (Abrous *et al.*, 2005). (B) Representación tridimensional de la SVZ, Células B (azul), células C (verde), células A (rojo). En la imagen se representa como las células B tienen un proceso basal que termina en los vasos sanguíneos. Imagen obtenida de (Mirzadeh *et al.*, 2008).

### 3.3.1. Organización celular de la zona subventricular adulta y generación de neuronas dopaminérgicas del BO

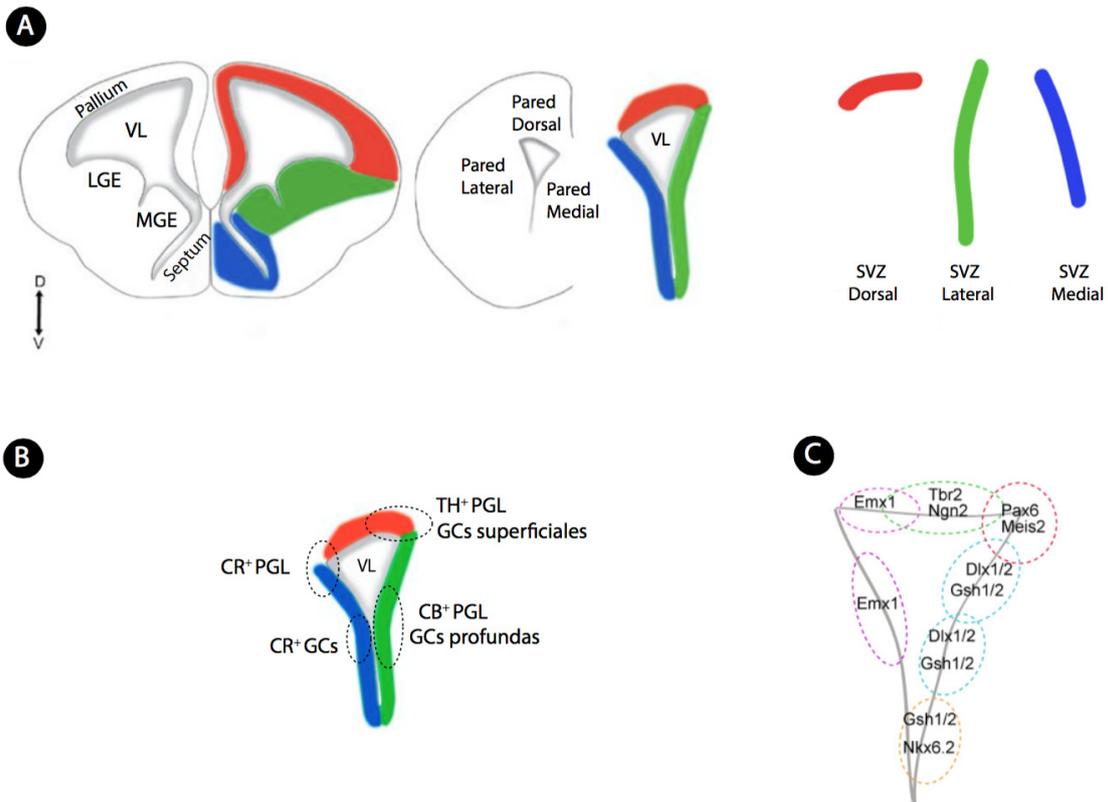
La citoarquitectura y organización de la SVZ han sido ampliamente estudiadas por ser la zona más neurogénica del cerebro adulto de mamíferos, generando diariamente unas 30.000 células (Lois C *et al.*, 1994). En la actualidad sabemos que esta región contiene al menos cuatro tipos celulares que difieren en cuanto a su morfología, ultraestructura y marcadores moleculares (Doetsch *et al.*, 1997): células endoteliales ciliadas (células de tipo E) que participan en la circulación del líquido cefalorraquídeo, astrocitos de división lenta (células de tipo B) que funcionan como NSCs y que actúan como progenitores primarios dando lugar a una población celular de división rápida (células de tipo C, TAPs, del inglés Transit-Amplifying cells,) que actúan como progenitores intermedios (Figura I8 B) (Doetsch *et al.*, 1999). Las células tipo C dan lugar a oligodendrocitos que migran al cuerpo caloso, fimbria y estriado (Menn *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2008) y a neuroblastos inmaduros (células tipo A), los cuales migran tangencialmente hacia el BO formando agregados de células, denominados cadenas, que se mueven por el interior de estructuras tubulares formadas por procesos astrocitarios, conocidos como gliotubos (Gerdes *et al.*, 1984; Lois *et al.*, 1996; Jankovski *et al.*, 1996; Okano *et al.*, 2008; Kaneko *et al.*, 2009). Una vez llegan al BO, los neuroblastos se separan de las cadenas y migran radialmente, hasta alcanzar su destino final donde se diferencian en dos grandes tipos de interneuronas: la inmensa mayoría son las GABAérgicas, que se integran en la capa granular y glomerular y una pequeña proporción dará lugar a neuronas glutamatérgicas de la capa juxtglomerular (Lledo *et al.*, 2006; Merkle *et al.*, 2007; Brill *et al.*, 2009) (Figura I8).

### 3.3.2. Heterogeneidad de la SVZ

A pesar de que el conjunto de NSCs de la SVZ da lugar a nuevas interneuronas olfatorias, existe una gran heterogeneidad espacial responsable de la generación de los diferentes subtipos neuronales del BO. Inicialmente, se pensaba que la zona neurogénica adulta estaba restringida a la parte más rostral de la pared del ventrículo orientada hacia el cuerpo estriado (pared lateral) (Luskin, 1993). Sin embargo, estudios más recientes muestran como la pared orientada hacia el palio (pared dorsal) y la pared orientada hacia el septum (pared medial) también contribuyen a la neurogénesis (Merkle *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007).

Cada pared del ventrículo lateral deriva de una región distinta del telencéfalo embrionario y da lugar a un subtipo neuronal distinto; así, la pared dorsal derivada del palio genera interneuronas periglomerulares TH positivas (neuronas dopaminérgicas), GCs superficiales y una pequeña proporción de células juxtglomerulares glutamatérgicas (Fernández *et al.*, 2011; Merkle *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007), la pared lateral deriva del subpalio, que contiene dos zonas con gran actividad proliferativa la eminencia ganglionar lateral (EGL) y la eminencia ganglionar medial (EGM), y da lugar a células CB+ de la PGL y a las interneuronas de la GCs profundas (Fernández *et al.*, 2011; Merkle *et al.*, 2007), por último, la pared medial deriva del septum y genera principalmente células CR+ tanto GCs como PGCs (Fernández *et al.*, 2011; Merkle *et al.*, 2014; Merkle *et al.*, 2007).

Recientemente se ha visto que la parte rostro-ventral genera interneuronas que se integran en la EPL y en la capa mitral. Estas interneuronas han sido identificadas como “Deep branching GCs” y “perimitral GCs”, “shrub GCs” y “satellite cells” (Merkle *et al.*, 2014; Luis C.Kessaris *et al.*, 2014), (Figura I9A-D).



**▲ Figura I9: Heterogeneidad espacial de la SVZ.**

(A) Las paredes de la SVZ (derecha) derivan de sus equivalentes embrionarios (izquierda). Pallium (rojo), eminencia ganglionar lateral (LGE) y eminencia ganglionar medial (MGE) (Verde), septum (azul). (B) La localización de las NSCs dicta el tipo neuronal que se va generar, representación esquemática de una sección coronal de la SVZ. En general la parte más dorsal y medial da lugar a neuronas que se integran en capas más superficiales del BO, mientras que la pared lateral (donde la actividad neurogénica se puede observar en áreas mucho más caudales) da lugar a neuronas más profundas. CR, calretinina; CB, calbindina; TH+, Tirosina hidroxilasa; PGCs células periglomerulares; GCs células granulares, VL ventrículo lateral. (C) Expresión de los factores de transcripción en las distintas zonas de la SVZ. Figura modificada de (Fiorelli, Azim, Fischer, & Raineteau, 2015).

Por tanto, la gran diversidad de NSCs presente en la SVZ viene determinada por el origen embrionario, por señales externas que vienen del líquido cefalorraquídeo, células endodermias, vasos sanguíneos, matriz extracelular que inducen la expresión de distintos factores de transcripción en distintos progenitores.

Dependiendo de la posición que ocupan las NSCs en las distintas paredes ventriculares éstas expresan un código genético que viene especificado por una combinación determinada de factores de transcripción. Los FT Neurog2 y TBR2 están implicados en especificar las células glutamatérgicas (VGLUT2+) y su expresión queda restringida a la pared dorsal (Brill *et al.*, 2009). Los FT Pax6 y Meis2 también se expresan mayoritariamente en la pared dorsal y en algunas células de la pared lateral, participando en la especificación del fenotipo TH+ y GCs superficiales (Agoston *et al.*, 2014; Hack *et al.*, 2005; Kohwi, 2005).

El linaje Emx1, genera neuronas granulares superficiales principalmente interneuronas CR así como las interneuronas dopaminérgicas y su expresión queda restringida a la pared dorsal y medial (Young *et al.*, 2007). Los FT DLX2 y GSH2 se expresan en los progenitores de la pared lateral, DLX2 trabaja en conjunto con PAX6 para especificar la población TH+ (Brill *et al.*, 2008), mientras que GSH2 da lugar a las interneuronas CB+ (Young *et al.*, 2007).

Los progenitores que se encuentran en la parte más ventral expresan el FT NKX6.2 y dan lugar a las interneuronas de la capa EPL y MCL (Merkle *et al.*, 2014) (Figura I9 C). El FT SP8 se expresa a lo largo de toda la pared del ventrículo de la SVZ y participa en la generación de las interneuronas del BO principalmente de las CR+ y las GABAérgicas no dopaminérgicas (Waclaw *et al.*, 2006).

Por otra parte, los progenitores de la eminencia ganglionar lateral, DLX+/ER81+, según trabajos de Stenman y colaboradores contribuyen a la generación de interneuronas del BO. En la misma publicación también muestran que durante el desarrollo, ER81 se expresa en la zona dorsal de la EGL (Yun *et al.*, 2001), en la ZV del palioventrolateral, en la porción medial de la MGE y en el palio y que en estadios postnatales mantiene su expresión en SVZ (Stenman *et al.*, 2003).

Además de esta heterogeneidad espacial, también existe una heterogeneidad temporal. En general, las interneuronas empiezan a generarse entre el día 12 y 14 del desarrollo embrionario (Stenman *et al.*, 2003; Tucker *et al.*, 2006; Wichterle *et al.*, 2001).

Existe cierta controversia sobre el momento de generación de las distintas interneuronas periglomerulares, así, ensayos con injertos homocrónicos y heterocrónicos muestran que las neuronas CB+ se generan en estadios del desarrollo embrionario más tardíos, mientras que las neuronas CR+ y TH+ se generan principalmente durante el desarrollo postnatal y el adulto (De Marchis *et al.*, 2007).

Por otro lado, en otro trabajo se muestra que las células TH+ se generan en estadios tempranos del desarrollo, con un pico de producción en el día embrionario 12; por el contrario, las calbindinas se generan en los últimos estadios del desarrollo, con un pico entre el día embrionario 15 y 17, y las calretininas principalmente durante el desarrollo

postnatal. En este mismo trabajo se muestra que a día postnatal 0 las tres poblaciones se generan por igual (Batista-Brito *et al.*, 2008). Posteriormente se ha observado que existen dos poblaciones de neuronas DA en el BO, las generadas de forma temprana en el embrión y aquellas que se generan durante la vida adulta. Curiosamente, parece que ambas poblaciones son morfológica y molecularmente distintas, las neuronas generadas durante el desarrollo embrionario suelen tener somas más grandes y no expresan el factor de transcripción COUP-TF1 mientras que las generadas en el adulto suelen presentar un soma menor y expresan COUP-TF1 (Halász N, 1990 ;Baker *et al.*, 1983).

A pesar de las diferencias entre los distintos trabajos, todos ellos muestran que los diferentes subtipos de interneuronas no se generan de forma uniforme durante el desarrollo embrionario y vida adulta sino que se generan preferentemente en una ventana temporal concreta y continúan generándose de forma uniforme durante la vida adulta.

## 4 DIFERENCIACIÓN TERMINAL DOPAMINÉRGICA EN EL BO DE RATÓN

### 4.1. Factores de transcripción reguladores de la diferenciación DA

Como se ha descrito anteriormente, ER81 y DLX2 son dos FT implicados en la diferenciación terminal a neurona DA sin embargo, no son los únicos, otros factores como PAX6, MEIS2 y COUP-TF1 también son necesarios para una correcta diferenciación dopaminérgica en el BO. PAX6 es un FT de la familia Paired box (PAX) que se expresa en los progenitores de las interneuronas del bulbo olfatorio, en una subpoblación de neuroblastos migradores y en la PGL donde principalmente se expresa en neuronas dopaminérgicas (Haba *et al.*, 2009; Stoykova *et al.*, 1994).

La pérdida parcial o total de PAX6 causa una reducción en el número de neuronas DA del BO (Hill *et al.*, 1991; Dellovade *et al.*, 1998; Hack *et al.*, 2005; Kohwi, 2005). Posteriormente, se ha descrito que PAX6 es un factor de transcripción esencial para inhibir la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas en el bulbo olfatorio (Ninkovic *et al.*, 2010). Sin embargo, como sucede con DLX2, aún se desconoce si PAX6 actúa directamente en las células post-mitóticas para inducir su diferenciación terminal hacia DA, si se une a la región *cis* reguladora de los genes de la vía de la DA y si es necesario para el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico, o si su papel se limita a la supervivencia.

MEIS2 es un FT con homeodominio que forma parte de la familia MEIS junto con MEIS1 y MEIS3. MEIS2 se expresa en neuroblastos de la zona subventricular y del RMS y en algunas interneuronas del BO entre ellas la población dopaminérgica (Allen *et al.*, 2007; Marei *et al.*, 2012; Pennartz *et al.*, 2004; Toresson *et al.*, 2000). Experimentos con retrovirus para bloquear la actividad de MEIS demostraron su función en la neurogénesis adulta de la SVZ *in vivo* e *in vitro*. Además, estudios de precipitación de la cromatina mostraron la unión de MEIS2 a la región *cis* reguladora de uno de los genes de la vía de la dopamina (*Th*) y al marcador de neuroblastos migradores (DCX). Por otra parte, ensayos de co-inmunoprecipitación, mostraron una interacción de MEIS2 con PAX6 y DLX2 en el RMS. Por último, también se ha descrito que el papel pro-neurogénico que tiene PAX6 requiere de MEIS2 (Agoston *et al.*, 2014).

COUP-TF1 también conocido como NR2F2 se expresa en las interneuronas de la PGL principalmente en la población dopaminérgica y en la capa granular del BO. Sin embargo, su expresión varía en el tiempo. Experimentos de análisis de expresión revelaron que en la primera semana post-natal la gran mayoría de TH+ son negativas para COUP-TF1 pero al alcanzar el estadio adulto (P21) el porcentaje y co-localización incrementa hasta el 80%. Estos datos, sugieren, aunque no demuestran que la expresión de COUP-TF1 se limita a las neuronas DA postnatales.

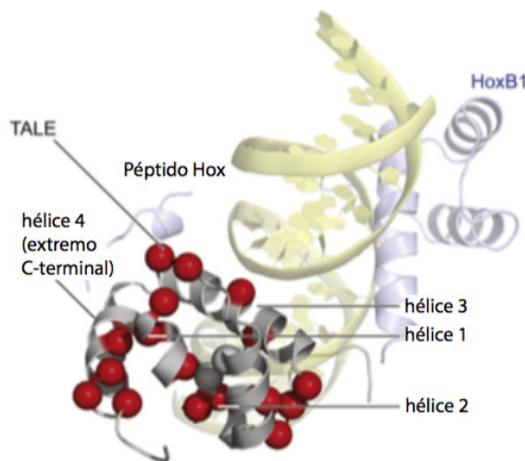
Análisis de los mutantes condicionales para COUP-TF1 del linaje DLX5/6 y EMX1 ( dos de los principales linajes que dan lugar a las interneuronas del BO) mostraron una reducción de la expresión de COUP-TF1 y de TH+ en la PGL únicamente en el linaje EMX1 sugiriendo que la expresión de COUP-TF1 estaría asociada a las DA generadas a partir de progenitores EMX1. Estudios de co-localización con animales transgénicos Gad67-GFP+ mostraron que todas las células COUP-TF1+ eran GFP+. Finalmente, estudios

de privación del olor revelaron que COUP-TF1 regula la expresión de TH mediante un mecanismo dependiente de actividad (Agoston *et al.*, 2014).

#### 4.2. Factores de transcripción de la familia PBX

Los factores de transcripción PBX (del inglés Pre-B cell leukaemia transcription factors) pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas de la clase PBC dentro de la superclase TALE (del inglés Three- Aminoacid-Loop-Extensión ) de las proteínas con homeodominio. Estas proteínas actúan como reguladores de la transcripción y se caracterizan por tener un homeodominio atípico de 63 aminoácidos. Este dominio de unión al DNA se pliega en forma de hélice-bucle-hélice dando lugar a tres alfa hélices.

Una característica que define a las proteínas de la superclase TALE es la inserción adicional de tres residuos de aminoácidos entre la hélice 1 y la 2 del homeodominio (Bürglin, 1997). Las proteínas PBX se distinguen además por conservar 16 residuos de aminoácidos en la parte C-terminal del homeodominio que se pliegan originando la cuarta alfa hélice que es una parte integral del dominio de unión al DNA (Piper *et al.*, 1999). Por otra parte, las secuencias PBC-A y PBC-B situadas en la parte N- terminal del homeodominio promueven la interacción con otras proteínas (Ryoo *et al.*, 1999a; Ryoo *et al.* 1999b) (Figura I10).



◀ **Figura I10: Dominios de interacción de los PBX con el DNA.** Interacción de un factor de transcripción PBX con el DNA (amarillo). El homeodominio  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , el homeodominio  $\alpha_4$  en la parte C-terminal y los residuos adicionales entre las hélices 1 y 2 (TALE) permiten a las proteínas PBX interactuar con el DNA y regular la transcripción de diferentes genes. Figura modificada de (Farber *et al.*, 2011)

Las proteínas PBX tienen un dominio de unión al DNA con secuencias de aminoácidos altamente conservadas tanto dentro de la misma familia como entre especies (Monica *et al.*, 1991). En mamíferos, la subclase PBC está formada por PBX1, PBX2, PBX3 y PBX4 (Kamps *et al.*, 1990; Nourse *et al.* 1990; Monica *et al.*, 1991; Wagner *et al.* 2001), por Extradenticle (Exd) en *Drosophila* (Rauskolb *et al.*, 1993) y por CEH-20, CEH-40 y CEH-60 en *C.elegans* (Shanmugam *et al.* 1999; Shen *et al.*, 1999). PBX1, PBX2, PBX3 y PBX4 muestran un 97% de homología dentro de la región homeodominio y divergen principalmente en las partes N y C-terminal de las proteínas donde no se han encontrado secuencias conservadas (Monica *et al.*, 1991).

Mediante splicing alternativo algunos miembros de la familia Pbx pueden dar lugar a diferentes isoformas. PBX1a y PBX1b son dos isoformas de PBX1, ambas tienen los dominios PBC, el homeodominio y los 16 residuos de aminoácidos en la parte C-terminal que conforman la cuarta alfa hélice sin embargo, PBX1b tiene una secuencia C-terminal más corta que PBX1a (Monica *et al.*, 1991). PBX3a contiene la secuencia entera del gen *Pbx3* formado por 9 exones (incluyendo los dominios PBC, homeodominio y la cuarta alfa hélice), PBX3b tiene truncado el C-terminal por falta del exón siete, PBX3c tiene la misma secuencia que PBX3a pero con el N-terminal truncado en el exón 3 que codifica para parte del dominio PBC-A y parte del dominio PBC-B y por último PBX3d que carece del exón tres y siete es decir, tiene truncados el N-terminal y el C-terminal (Milech *et al.*, 2001).

Por tanto, el splicing alternativo puede dar lugar a nuevas propiedades bioquímicas como la interacción con diferentes proteínas dependiendo de la isoforma. Por ejemplo, ensayos *in vitro* han demostrado que el dominio C-terminal de PBX1A le permite la unión con la proteína co-represora SMRT y NcoR a diferencia de PBX1b que carece de ese dominio (Asahara *et al.*, 1999).

Por tanto, las diferentes proteínas PBX han sido clasificadas en dos grupos: forma larga (PBX1a, PBX2, PBX3a y PBX4) y forma corta (PBX1b, PBX3c y PBX3d) en base a si presentan o no la forma completa de la proteína (Milech *et al.*, 2001; Monica *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 2001).

Las isoformas PBX también muestran cierta especificidad en su patrón de expresión y función: PBX1 participa en el desarrollo y patrón del esqueleto (L Selleri *et al.*, 2001), en el desarrollo del sistema nervioso central (Golonzhka *et al.*, 2015; Sgadò *et al.*, 2012; Villaescusa *et al.*, 2016) en la hematopoyesis (Dimartino *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; L Selleri *et al.*, 2001), en el desarrollo y funcionamiento del páncreas (Kim *et al.*, 2002), en la morfogénesis del riñón, en el desarrollo adrenal y urogenital (Schnabel *et al.*, 2001), y en la formación y patrón de órganos derivados de la bolsa faríngea caudal (Manley *et al.*, 2004).

Análisis inmunohistoquímicos han revelado que PBX1b es la isoforma predominante durante la embriogénesis mientras que la expresión PBX1a queda principalmente restringida al desarrollo de tejido neuronal (Schnabel *et al.*, 2001). La distribución inicial de PBX1b se asocia con la condensación del mesodermo sin embargo, también participa en el patrón de expresión de todos los derivados de las principales líneas germinales. En particular, PBX1b se localiza en las regiones de interacción entre el mesénquima y el epitelio durante los periodos activos de la morfogénesis de tejidos como el hígado, el riñón, los dientes y en las vibrisas de los folículos. (Sharpe *et al.*, 1988; Birchmeier *et al.*, 1993; Dassule *et al.*, 1998; Schnabel *et al.*, 2001).

Ratones deficientes en PBX1 mueren el día 15.5 de su desarrollo embrionario por hipoplasia severa (pulmones, hígado, estómago, intestino, riñones y páncreas) o aplasia (bazo, glándula suprarrenal) de múltiples órganos así como defectos generalizados en el esqueleto axial y apendicular. (L Selleri *et al.*, 2001).

En relación al sistema nervioso, PBX1 se expresa en el prosoencéfalo durante el desarrollo (Long *et al.*, 2009; Toresson *et al.*, 2000) y promueve la diferenciación del córtex frontal inhibiendo genes que promueven la diferenciación dorsocaudal. Mutantes condicionales para PBX1 en el linaje *Nex1* y *Emx1* muestran hipoplasia en el córtex frontal, expansión ventral y dorsomedial del córtex e inversión en las capas del córtex rostral (Golonzhka *et al.*, 2015). Durante el desarrollo del mesencéfalo PBX1a forma parte de la red transcripcional implicada en la diferenciación a neurona dopaminérgica del mesencéfalo mediante la regulación del establecimiento de las proyecciones axonales del mesencéfalo al estriado y mutantes nulos para el factor de transcripción muestran defectos axonales en dichas proyecciones (Sgadò *et al.*, 2012; Villaescusa *et al.*, 2016).

Además, recientemente, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina combinados con RNAseq han revelado la doble funcionalidad de PBX1 en la regulación de la transcripción en las células DA mesencefálicas. Por una parte PBX1 reprime la expresión de *Onecut2* (para evitar otros destinos celulares) y por la otra activa la expresión de *Pitx3* (para promover la diferenciación DA del mesencéfalo) y la de *Nfe211* (para impulsar su supervivencia) (Villaescusa *et al.*, 2016). Experimentos de sobreexpresión de la misma publicación con lentivirus en células madre humanas han demostrado que PBX1 es suficiente para generar neuronas con características dopaminérgicas del mesencéfalo.

Estudios recientes con inyecciones de retrovirus, han demostrado que PBX1 promueve la neurogénesis en los progenitores de la SVZ y frena oligodendrogénesis y que es necesario para la supervivencia de los neuroblastos migradores del BO. Paralelamente ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina revelaron la unión de PBX1 a las regiones promotoras de los genes *DCX* (marcador de neuroblastos migradores) y *TH* (Grebbin *et al.*, 2016).

PBX2 se expresa ampliamente durante el desarrollo principalmente en tejido neuronal y epitelial durante las últimas etapas embrionarias. A pesar de ello, los mutantes para PBX2 no muestran problemas de viabilidad, ni tienen afectada la organogénesis, ni la fertilidad ni la hematopoyesis ni tampoco funciones inmunológicas sugiriendo una posible redundancia funcional entre los miembros de la familia (L Sella *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha publicado que los dobles mutantes (*Pbx1* y *Pbx2*) mueren antes y muestran un drástico incremento en el fenotipo del esqueleto incluso con nuevas alteraciones en comparación a los mutantes simples para PBX1, con lo que en ciertos contextos PBX2 puede compensar la falta de función de PBX1 (Capellini *et al.*, 2006, 2008).

PBX3 se expresa en niveles altos durante el desarrollo predominantemente en el sistema nervioso central incluyendo una región de la médula oblongada implicada en el control de la respiración. Concretamente, PBX3a (y en menor grado PBX3b) se expresan en la parte dorsal del tálamo, cerebelo, medula, ganglios dorsales y neuronas ventrales y dorsales de la médula espinal. También se detectan niveles altos en neuronas mientéricas y en niveles más bajos en los miocitos del músculo liso del intestino así como en condrocitos del esqueleto axial y apendicular (Rhee *et al.*, 2004).

Por el contrario, PBX3c y PBX3d, las otras dos isoformas de PBX3, muestran una amplia expresión en leucemias, en células tumorales del sistema hematopoyético y células linfoides (Milech *et al.*, 2001). Los mutantes para PBX3 son viables durante el desarrollo embrionario pero mueren a las pocas horas del nacimiento por insuficiencia respiratoria

central debido a la actividad anormal de las neuronas inspiratorias en la médula (Rhee *et al.*, 2004).

Finalmente la expresión de PBX4 se ha asociado principalmente a testículos donde es importante para la espermatogénesis (Vlachakis, Ellstrom, & Sagerström, 2000; Wagner *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios en pez zebra han observado el mRNA de *Pbx4* durante la formación del sistema nervioso central en las etapas de segmentación y que su mutación causa alteraciones en la diferenciación antero-posterior del romboencéfalo y el tronco anterior (Pöpperl *et al.*, 2000).

Inicialmente los miembros de la familia Pbx fueron identificados como co- factores de los genes Hox en la regulación de la formación del eje antero-posterior durante el desarrollo embrionario. Distintos ensayos bioquímicos y genéticos han demostrado que PBX1 y EXD (Pbx de *Drosophila*) interactúan físicamente con las proteínas Hox formando heterodímeros. El complejo transcripcional (Hox-Pbx) incrementa la afinidad y la especificidad de unión al DNA de cada proteína a los promotores de los genes diana (Chang *et al.*, 1995). Esta interacción está mediada por la unión de una pequeña secuencia que contiene triptófano conocida como PID (del inglés PBC Interaction Domain) en la proteína Hox y un bolsillo hidrofóbico de la proteína PBX (In der Rieden *et al.*, 2004) aunque también se han reportado casos en los que EXD es capaz de interactuar con proteínas Hox en ausencia de PID (Galant *et al.*, 2002) (Merabet *et al.*, 2003). Los PBX, además de con las proteínas Hox, interactúan con otras proteínas como los miembros de la familia MEIS/PREP con las que pueden dimerizar, mediante interacciones con sus regiones N-terminales, independientemente de los Hox o formar trímeros Hox-PBX-MEIS/PREP que incrementan aún más la afinidad y la especificidad de unión al DNA (Mann *et al.*, 1996).

La secuencia PID también ha sido identificada en otras proteínas homeodominio como Engrailed (L T Peltenburg, 1996) y PDX1 (Peers *et al.*, 1995). PBX1 junto con PDX1 (factor específico del páncreas) regula genes que son cruciales para el correcto desarrollo y fisiología del páncreas como por ejemplo los genes que codifican para insulina o somatostatina (Leonard *et al.*, 1993). Por otra parte, proteínas no-homeodominio como ZFPIP (del inglés Zinc Finger Pbx1 Interacting Protein) han sido identificadas como compañeras de los factores PBX. Sin embargo, a diferencia de las otras interacciones, el complejo PBX1-ZFPIP inhibe la posible interacción entre las proteínas PBX y Hox *in vitro* (Laurent *et al.*, 2007). Algunos receptores nucleares también requieren de la interacción con proteínas PBX como por ejemplo el receptor nuclear  $\alpha$  T3 para la transcripción del gen que codifica para la enzima málica en embrión de pollo (Wan *et al.*, 2001).

Estudios de inmunoprecipitación de la cromatina ChIP han revelado interacciones entre proteínas remodeladoras de las cromatina y factores PBX. Un ejemplo que se ha descrito es la interacción de PBX1 con MYOD para reclutar a SWI/SNF (enzimas del complejo de remodelación de la cromatina) y poder activar la transcripción del gen miogenina importante para la formación del músculo (Arnold *et al.*, 1998; Berkes *et al.*, 2004).

Otros complejos transcripcionales en los que participan las proteínas PBC son los relacionados con la señalización celular como por ejemplo el heterotrímero PBX1- PREP1- SMAD encargado de la regulación del gen FSH $\beta$  via activin (miembro de la familia TGF $\beta$  importante en la regulación de una amplia variedad de respuestas celulares durante el desarrollo)(Bailey *et al.*, 2004).

Además de actuar como mediadores de ciertas vías de señalización celular, los PBX también pueden iniciar la expresión de proteínas clave para la transducción de señales como sucede con el complejo CEH-20 (homólogo de Pbx) y LIN-39 (proteína Hox) encargado de activar la cascada de señalización mediada por Notch importante para el desarrollo de la vulva en *C.elegans* (Takács-Vellai *et al.*, 2007).

Por tanto, de acuerdo con todo lo descrito, se ha propuesto definir a los PBX como proteínas adaptadoras que junto con otros factores de transcripción se unen a promotores para integrar la información de diferentes cascadas de señalización o programas genéticos (Laurent *et al.*, 2008).



**objetivos**



Estudios previos del laboratorio con el nematodo *C.elegans* han determinado que la acción de una combinación de tres factores de transcripción [AST-1 (ETS), CEH-43 (HD), CEH-20 (PBX)] es necesaria para la expresión de genes efectores de las neuronas DA (Flames *et al.* 2009; Doitsidou *et al.* 2013).

En ratón, los homólogos de dos de los tres factores identificados en *C. elegans* (DLX2, homólogo de CEH-43 y ER81 homólogo de AST-1) tienen un papel en la generación de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio, indicando la posible conservación filogenética en la regulación de la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas (Brill *et al.*, 2008; Flames *et al.*, 2009; Cave *et al.*, 2009). Sin embargo, la función de los PBX en la diferenciación DA del BO ha sido poco estudiada hasta la fecha.

Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis es estudiar el papel de los miembros de la familia PBX en la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio. Para lograr este objetivo nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** Determinar el patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en el BO y SVZ.
- **Objetivo 2:** Estudiar los posibles defectos en la expresión de marcadores DA del BO en mutantes para los factores PBX.
- **Objetivo 3:** Caracterizar los efectos de la pérdida de los factores PBX en el linaje DA.
- **Objetivo 4:** Analizar los efectos de la sobreexpresión de los factores PBX en el bulbo.
- **Objetivo 5:** Estudiar si PBX1 se une a secuencias reguladoras del gen *Th*.



# materiales y métodos



# 1 MODELOS ANIMALES

## 1.1. Cepas de ratón

Para la realización de esta tesis se han utilizado ratones de estadio embrionario E17.5, neonatos (P0) y adultos con edades comprendidas entre 1 y 3 meses de edad. Los animales han sido criados y mantenidos en el Servicio de Producción Animal del Instituto de Biomedicina de Valencia de acuerdo con la normativa española y comunitaria vigente y bajo la supervisión de la veterinaria. Para los experimentos de análisis del patrón de expresión se han utilizado animales de la cepa C57BL6 obtenidos del proveedor Harlan Laboratories (C57Bl/6JRccHsd).

Los experimentos de electroporación *in vivo* de sobreexpresión han sido realizados con animales de la cepa CD1 obtenidos del mismo proveedor que la cepa anterior. Para los otros experimentos, indicados en cada caso, se han utilizado animales de cepas modificadas genéticamente.

**Cepa *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*:** Los mutantes nulos convencionales para PBX1 mueren el día embrionario 15/16 por hipoplasia o aplasia severa de múltiples órganos y defectos generalizados en el patrón del esqueleto axial y apendicular (Selleri *et al.*, 2001). Con el objetivo de estudiar el papel de la falta de función del factor PBX1 en estadio adulto se utilizó la estrategia alternativa de uso de mutantes condicionales. Los ratones fueron cedidos por la Dra. Licia Selleri (Weill Cornell Graduate School of Medical Science, New York, USA). Estos ratones son mutantes condicionales para el gen *Pbx1* con fondo genético C57BL6. Mediante recombinación homóloga se introdujeron secuencias loxP en cada extremo del exón 3 (común en todas las isoformas) del gen (Koss *et al.*, 2012). Por tanto, únicamente en presencia de la CRE recombinasa el exón 3 de *Pbx1* es escindido y se produce una pérdida de la expresión de PBX1. Figura M1 A. Esta cepa de ratón fue cruzada con distintas dos cepas CRE recombinasa para delecionar *Pbx1* en subpoblaciones específicas: *Nestin*-CRE y TH-ires-CRE (descritas a continuación).

**Cepa *Pbx2<sup>-/-</sup>*:** Los ratones fueron cedidos por la Dra. Licia Selleri (Weill Cornell Graduate School of Medical Science, New York, USA). Estos ratones presentan una delección del exón 3 del gen que los convierte en mutantes nulos convencionales para PBX2 (Selleri *et al.*, 2004). Los animales deficientes en PBX2 no tienen problemas de viabilidad y pueden analizarse en estadio adulto (Figura M1B)

**Cepa *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup>:** Los ratones portadores de ambas mutaciones fueron generados en el propio Instituto de Biomedicina de Valencia entrecruzando varias generaciones de las cepas anteriores.

**Cepa *Nestin*-CRE:** Los ratones fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Oscar Marín (King's College London, UK) pero generados en The Jackson Laboratory (B6.Cg-Tg(-Nes-cre)1Kln/J; Strain ID 003771). Estos ratones transgénicos expresan la CRE recombinasa bajo el promotor del gen *Nestina* en el sistema nervioso central y periférico incluyendo glía y progenitores. Por tanto, la cepa *Nestin*-CRE produce una delección de sitios LoxP de forma general y temprana en todo el sistema nervioso. Figura M1 C.

**Cepa *TH*-ires-CRE:** Los ratones fueron comprados a European Mutant Mice Association (EMMA Strain name B6.129X1; Strain ID EM:00254). Esta cepa es un “knock-in” que expresan la CRE recombinasa bajo el gen endógeno de *tirosina hidroxilasa*, la recombinasa se encuentra tras la secuencia codificante del gen *Th* y es traducido gracias a la presencia de una secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES) lo que produce asegura que *Th* se exprese de forma normal. Figura M1 D.

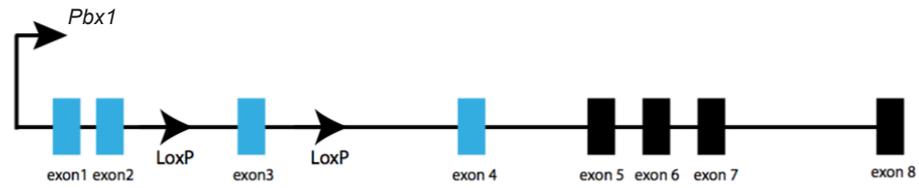
**Cepa RCE (Rosa26-CMV-Enhanced GFP):** Los ratones fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Oscar Marín (King's College London, UK) previamente comprados a The Jackson Laboratory (Gt (ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax; Strain ID 32037-JAX; RCE:loxP). Estos ratones tienen insertada la proteína verde de fluorescencia aumentada (eGFP) en el locus del gen *Rosa26* precedida por una secuencia STOP flanqueada por sitios LoxP. En presencia de la CRE recombinasa, la secuencia STOP es escindida y la eGFP puede expresarse. Por tanto, en estos ratones la expresión de la eGFP dependerá del patrón expresión del promotor que conduce a la CRE recombinasa. Figura M1 E.

**Figura M1: Esquema de la construcción de las cepas *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>, *Pbx2*<sup>-/-</sup>, *Nestin*-CRE, *TH*-ires-CRE y RCE.** (A) Representación del alelo condicional para *Pbx1* de ratón antes y después de la activación de la CRE recombinasa. En la primera figura se muestra el locus de *Pbx1* con los 6 exones (rectángulos negros) y el exón 3 flanqueado por las secuencias LoxP que serán reconocidas por la CRE recombinasa. En la segunda figura se muestra el alelo nulo de *Pbx1* específico de tejido y la secuencia LoxP residual tras la actividad de la CRE recombinasa. Los recuadros azules representan exones que codifican para el dominio PBC. Adaptado de Koss *et al.*, 2012 (B) Representación esquemática del locus de *Pbx2* de ratón, del vector diana y del alelo mutado después de la recombinación homóloga. En la representación superior se muestra el exón 3 del gen *Pbx2* (rectángulo negro) junto con sitios de restricción mapeados. La segunda figura representa la

construcción diana utilizada para escindir el exón 3 la cual lleva un cassette PGK- neo (rectángulo blanco). La última figura muestra el alelo recombinante de *Pbx2* con la inserción del NEO casete en el único sitio SacI del exón 3 de *Pbx2*. Sitios de la enzima de restricción: E, EcoRI; Nhe, NheI; Sal, SalI; Xba, XbaI; Xho, XhoI. Adaptado de L. Sella *et al.*, 2004. (C) Representación esquemática del transgénico insertado en el cromosoma 12. La construcción insertada codifica para la CRE recombinasa regulada por la región promotora del gen *Nestina* de rata. (D) Representación esquemática del locus de *Th* tras la inserción del cassette CRE recombinasa. (E) Representación esquemática del locus ROSA 26 tras la inserción del casette que codifica para la proteína verde de fluorescencia aumentada (eGFP) precedida de un codón stop flanqueado por secuencias LoxP. ►

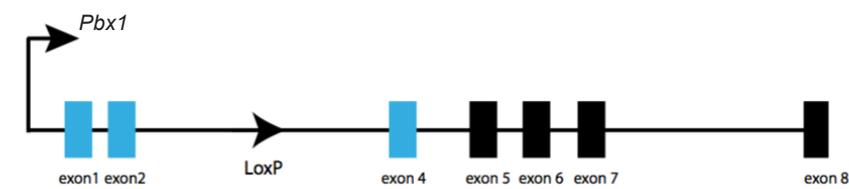
**A** Cepa con *Pbx1* floreado

Alelo condicional de *Pbx1*



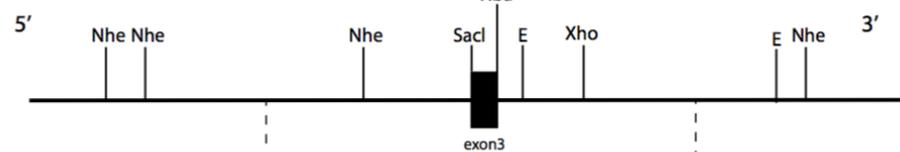
CRE recombinasa

Alelo nulo de *Pbx1* específico de tejido

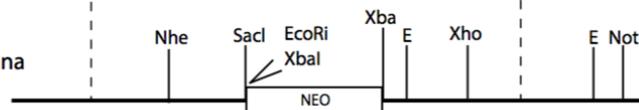


**B** Cepa *Pbx2* mutante

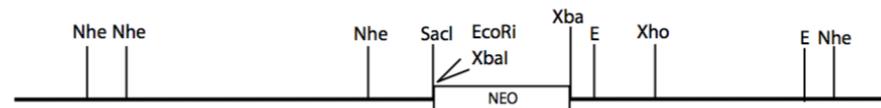
Alelo salvaje de *Pbx2*



Construcción diana



Alelo recombinado *Pbx2*



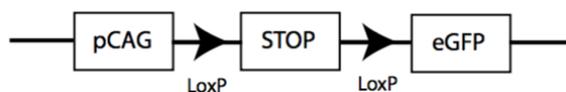
**D** Cepa TH-ires-CRE

Cassette CRE recombinasa insertado en el locus endógeno de *Th* de ratón



**E** Cepa RCE

Locus ROSA 26



## 1.2. Genotipado de animales

El genotipo de los animales se determinó amplificando, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el DNA genómico fue extraído a partir de un fragmento de cola de ratón. El tejido se digirió en tampón de lisis (proteinasasa K (Fermentas) a 200 µg/ml en el tampón Tris-HCl pH8 a 100mM(Sigma), EDTA a 5 mM (Sigma), SDS a 2%, NaCl (Sigma) a 200mM) durante toda la noche a 55C en agitación. A continuación, se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4C y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos limpios. Posteriormente se añadieron 450 µl de isopropanol (Panreac) y se invirtieron los tubos varias veces hasta conseguir visualizar el DNA. Después, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos a 4C y se desechó el sobrenadant A continuación, se añadieron 180 µl de etanol al 70% (Panreac) y se volvieron a centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejaron secar durante 20 min. Por último, el DNA se resuspendió en 100 µl de agua de PCR (Sigma).

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 98C durante 30 segundos una etapa de anillamiento a 98C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 62C durante 1 minuto y 30 segundos. Después de una reacción de 32 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 360 bp y el del alelo mutante era de 522 bp. Los cebadores utilizados fueron:

**oNF952: 5' - ATC AGT GCC ATT TCT CCA GCC - 3'**

**oNF953: 5'- TGG GTA TCC ATT CCA AAG GTG G - 3'**

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx2<sup>+</sup>* fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 98C durante 30 segundos, una etapa de anillamiento a 98C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 58.5C durante 30 segundos. Después de una reacción de 30 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 218 bp, el alelo mutante *Pbx2<sup>-</sup>* no genera banda en estas condiciones. Los cebadores utilizados fueron:

**oLR6:5' – TCT GTT TGC CTG CCT GCT AG - 3'**

**oLR7:5' – GCT TGC TGC GAT AGT CTG AGT G–3'**

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx2<sup>-</sup>* fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 95C durante 2 minutos, una etapa de anillamiento a 95C durante 30 segundos y una etapa de extensión a 61.5C durante 45 segundos. Después de una reacción de 35 ciclos, el producto de amplificación del alelo mutante era de 800 bp, el alelo salvaje no produce banda en estas condiciones. Los cebadores utilizados fueron:

**Pbx2 sense: 5' – TCC TTA AGT CTG TTT GCC TCG CTG – 3'**

**Pbx1 Neo: 5' – CTA TCA GGA CAT AGC GTT GG – 3'**

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Nestin-CRE* fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 94C durante 30 segundos, una etapa de anillamiento a 94C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 51.7C durante 30

segundos. Después de una reacción de 35 ciclos, el producto de amplificación del alelo transgénico es de 100 bp, esta banda no aparece si el alelo *Nestin-CRE* no está presente en el animal. Los cebadores utilizados fueron:

**oNF981: 5' - GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC - 3'**  
**oNF982: 5' - GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT - 3'**

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo TH-ires-CRE fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 94C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94C durante 45 segundos y una etapa de extensión a 54.8C durante 45 segundos. Después de una reacción de 35 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 290 bp y el del alelo transgénico era de 430 bp. Los cebadores utilizados fueron:

**TH-5': 5' - CAC CCT GAC CCA AGC ACT - 3'**  
**TH-3': 5' - CTT TCC TTC CTT TAT TGA GAT - 3'**  
**Cre-UD: 5' - GAT ACC TGG CCT GGT CTG - 3'**

Para la amplificación de la banda salvaje se utilizaron los cebadores TH-5' y TH-3'. Para la amplificación de la banda mutante se utilizaron los cebadores TH-5' y Cre-UD

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo salvaje de Rosa26 fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 95C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 56C durante 1 minuto. Después de una reacción de 40 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 550. Los cebadores utilizados fueron:

**1488/ RCE- Rosa 1: 5' - CCC AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT C - 3'**  
**1489/ RCE- Rosa 2: 5' - CAT ATC CAT TTC TCC CGC TCC TTC - 3'**

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo transgénico RCE fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 95C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 64.5C durante 1 minuto. Después de una reacción de 30 ciclos, el producto de amplificación del transgen es de 300 bp. Los cebadores utilizados fueron:

**1488/ RCE- Rosa 1: 5' - CCC AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT C - 3'**  
**1490/RCE-CAG 3: 5' - CTT ACG GTA AAT GGC CCG CCT GG - 3'**

Para las reacciones de PCR se empleó la Go Tag G2 DNA polimerasa (Promega). Los productos de amplificación de las distintas PCRs se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% para la cepa *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* y al 1% para el resto de las cepas preparado en tampón TAE 1X (EDTA 1mM, ácido acético glacial 20mM y Trizma base 40mM pH7.6). Para teñir el ácido nucleico se utilizó Gel red® (Biogen) a 3µl/100ml y como tampón de carga se utilizó el que incluye la casa comercial dentro de la solución para la reacción de PCR (5X Green GoTaq Flexi Buffer) con la DNA polimerasa (Promega). Finalmente, los geles se fotografiaron con iluminación ultravioleta en un transiluminador (16si Plus, Isogen LifeScience) con el programa Proxima AQ4.

## 2 ESTUDIOS *IN VIVO*

### 2.1. Inyección de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)

La BrdU es un análogo estructural del nucleótido timidina y se incorpora al DNA de las células que se encuentran en fase S del ciclo de división en el momento de la inyección. Una vez las células han incorporado la BrdU puede detectarse inmunohistoquímicamente con un anticuerpo específico.

La administración de BrdU consistió en inyecciones intra-peritoneales de BrdU (Sigma) a una dosis de 50 mg/kg de animal, a partir de una solución madre de 10 mg/ml en solución salina estéril (cloruro sódico al 0,9%).

El régimen de administración fue de 7 inyecciones repartidas cada dos horas, durante un período total de 12 horas (Nowakowski y cols., 1989), en animales de dos meses de edad. Pasados 44 días después de la inyección se sacrificaron los animales mediante perfusión intracardiaca de paraformaldeído al 4%.

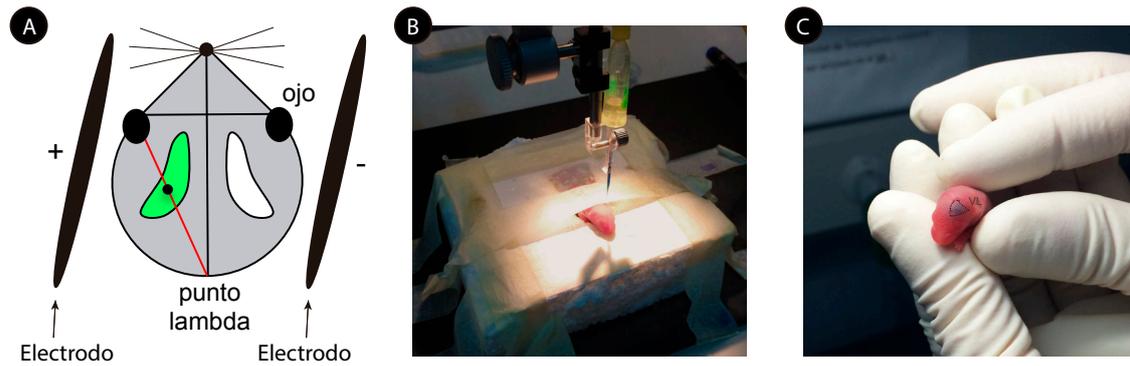
### 2.2. Electroporación post-natal *in vivo*

Para llevar a cabo la electroporación, en primer lugar se anestesiaron los neonatos mediante hipotermia (3 minutos en hielo) y se fijaron con cinta adhesiva sobre un soporte. Las inyecciones se realizaron en la luz del ventrículo lateral izquierdo en el punto medio de una línea virtual que conecta el ojo izquierdo con el punto craneométrico lambda (Figura M2).

Una vez detectado el punto, se inyectó 1µl de solución compuesta por los plásmidos de interés (la combinación de plásmidos y su concentración dependerá de cada experimento tal y como se detalla a continuación) diluidos en tampón fosfato sódico 0.1M pH7.4 (PBS) y colorante verde FastGreen (Sigma) al 1% a una profundidad de 2mm con respecto a la superficie del cráneo.

Seguidamente, el neonato fue colocado bajo una fuente de luz y se comprobó si el colorante verde había sido inyectado correctamente, si la inyección es correcta, el líquido inunda todo el ventrículo y produce una forma de banana fácil de reconocer, si la inyección no es correcta se produce una mancha borrosa redonda.

A continuación, para introducir el DNA plasmático en las células de la pared del ventrículo de los neonatos, se colocan dos electrodos de 7mm de diámetro a ambos lados de la cabeza y se aplicaron 5 pulsos eléctricos de 140v de 50ms con un electroporador (BTX model ECM830). Finalmente, los neonatos se reaniman unos minutos sobre una placa calefactora a 37C y son devueltos con su madre.



▲ **Figura M2: Electroporación postnatal del ventrículo lateral.** (A) Representación esquemática de la electroporación. Una línea virtual (roja) conectando el ojo izquierdo con el punto craneométrico lambda sirve como marcador posicional para la inyección del DNA. El punto de inyección está marca-

do con un punto negro. Las barras laterales indican la posición de los electrodos, orientados para marcar la parte más dorsal del ventrículo lateral (VL). (B) Fotografía en la que se muestra el momento de la inyección del neonato (C) Fotografía en la que se muestra la inyección correcta del ventrículo lateral.

### 2.2.1. Vectores y construcciones

Las construcciones que se utilizaron para los experimentos de electroporación se detallan a continuación:

1. **pCAG-CRE::GFP** (Addgene). Expresa la CRE recombinasa de forma constitutiva.
2. **p-TH-CRE** (generado en el propio laboratorio pNF365) Expresa la CRE recombinasa bajo 5kb del promotor de TH.
3. **pCAG-Ires-GFP** (Addgene). Expresa GFP de forma constitutiva.
4. **pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP** (Addgene). Expresa YFP en presencia de la CRE recombinasa.
5. **pCAG-Pbx1a-Ires-GFP** (generado en el propio laboratorio pNF201) Expresa el gen *Pbx1a* y GFP de forma constitutiva.
6. **pCAG-Pbx1b-Ires-GFP** (generado en el propio laboratorio pNF282). Expresa el gen *Pbx1b* y GFP de forma constitutiva.

**Tabla M1.** Esquema de las condiciones empleadas en los experimentos de electroporación *in vivo*.

Construcción/es	Concentración	Cepa	Experimento
pCAG-CRE::GFP + pCAG-Ires-GFP	2ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>+/+</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup></i>	Control marcando con GFP las células electroporadas
pCAG-CRE::GFP + pCAG-Ires-GFP	2ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup></i>	Pérdida de función de <i>Pbx1</i> en todas las celulas electroporadas
pCAG-CRE::GFP + pCAG-Pbx1a-Ires-GFP	2ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup></i>	Rescate del experimento anterior con <i>Pbx1a</i>
pCAG-CRE::GFP + pCAG-Pbx1b-Ires-GFP	2ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup></i>	Rescate del experimento anterior con <i>Pbx1b</i>
p-Th-CRE + pCAG- LoxP-stop-LoxP-YFP	4ug/ul+ 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>+/+</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup></i>	Control marcando con GFP las células electroporadas del linaje Th
p-Th-CRE + pCAG- LoxP-stop-LoxP-YFP	4ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup></i>	Pérdida de función de <i>Pbx1</i> en las celulas electroporadas que son del linaje Th
p-Th-CRE + pCAG- LoxP-stop-LoxP-YFP	4ug/ul + 4ug/ul	<i>Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup></i>	Pérdida de función de <i>Pbx1</i> en las celulas electroporadas que son del linaje Th en mutantes <i>Pbx2</i>
pCAG-Ires-GFP	4ug/ul	CD1	control de sobreexpresión de GFP
pCAG-Pbx1a-Ires-GFP	4ug/ul	CD1	Sobreexpresión de <i>Pbx1a</i>
pCAG-Pbx1b-Ires-GFP	4ug/ul	CD1	Sobreexpresión de <i>Pbx1b</i>

### 2.2.2. Obtención de bacterias competentes

Se picó una sola colonia de E.coli TOP10 y se sembró en 5ml de LB (Pronadisa). Se dejó crecer durante toda la noche en agitación moderada a 37°C. A continuación, se inocularon los 5ml del pre-cultivo en 500ml de LB y se dejaron crecer en agitación moderada a 37°C hasta alcanzar una D.O600 = 0.5-0.6.

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5.000g durante 20 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante por decantación. Seguidamente, manteniendo la cadena de frío se resuspendió el pellet en unos 5-10ml de agua miliQ a 4°C. Después, se repitieron tres veces más los dos últimos pasos anteriores de centrifugación y resuspensión. A continuación, manteniendo la cadena de frío, se resuspendió el pellet en 5-10ml de glicerol (Panreac) al 10%.

Una vez resuspendido, se añadió hasta un total de 40ml de glicerol al 10%. Posteriormente, se centrifugó a 5.000g durante 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante por decantación. Seguidamente, se resuspendió el pellet en un volumen de glicerol al 10% tal que la concentración final de las células fuese de  $2 \times 10^{11}$  células/ml. Finalmente, la suspensión bacteriana se alícuotó en viales previamente refrigerados (50µl/vial), se congelaron en nitrógeno líquido y rápidamente fueron almacenados a -80°C. Para determinar la eficiencia de transformación (colonias transformantes / µg de plásmido de DNA) se empleó la siguiente fórmula:

$$E = \frac{\text{No de colonias}}{\text{pg plásmido pUC19}} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{vol cél. } (\mu\text{l})}{\text{vol. Plaqueado } (\mu\text{l})} \times \text{FD}$$

### 2.2.3. Transformación de las bacterias competentes

Para la transformación se utilizó un vial de células competentes por cada vector a transformar. Los viales almacenados a -80°C se descongelaron en hielo, seguidamente, se añadió 1µl de DNA del plásmido a amplificar a la suspensión bacteriana y la mezcla se incubó en hielo durante 5-10 minutos. A continuación, el contenido del vial fue transferido a la cubeta de electroporación, (VWR) previamente incubada en hielo durante 30 minutos.

Seguidamente, la cubeta fue introducida en el electroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) donde se aplicó una corriente eléctrica de 1700V durante 5ms. Posteriormente, la suspensión bacteriana con el DNA incorporado se resuspendió en 500µl de medio LB de un nuevo vial.

Después, las bacterias fueron incubadas durante 45 minutos a 37°C con agitación moderada. Pasados los 45 minutos el vial con las bacterias fue centrifugado a 13.000 rpm durante un minuto a RT.

Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 100µl del sobrenadante y se extendieron en placas petri con LB agar suplementado con Ampicilina (50 µg /ml, Sigma) puesto que los vectores tenían resistencia a este antibiótico.

#### **2.2.4. Obtención del DNA plasmídico (maxipreps)**

Se picaron colonias individuales de las placas de E.coli TOP10 transformadas para poner precultivos de 5ml de medio LB. Al día siguiente se prepararon los cultivos para la maxi-prep inoculando 1ml de los precultivos en 200ml de LB y se dejaron en agitación a 37C toda la noche.

A partir de los cultivos de 200ml se procedió a realizar la maxiprep utilizando un sistema de purificación de plásmidos comercial (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). De manera resumida, los cultivos crecidos se centrifugaron a 6.000g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet el 10ml de solución del kit con un vórtex y la suspensión se pasó a un tubo de 30ml estéril. Seguidamente, se añadieron 10ml del tampón de lisis y se mezcló por inversión durante 5 minutos. Luego, se añadió el tampón de neutralización, se mezcló vigorosamente por inversión y se incubó en hielo durante 15-20 minutos.

A continuación, se centrifugó la mezcla a 20.000g durante 30 minutos a 4C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril y se centrifugó de nuevo a 20.000g durante 15 minutos a 4C. El sobrenadante se transfirió a la columna de purificación, equilibrada previamente. Se lavó dos veces la columna con la solución de lavado del kit y se llevó a cabo la elución del plásmido con la solución de elución del kit. El eluido se recogió en tubos falcon de 50ml, se precipitó el DNA con isopropanol (0,7 volúmenes) y se centrifugó a 20.000g durante 60 minutos a 4C. El sobrenadante se eliminó y se lavó el pellet de DNA con etanol al 70% a 5.000g durante 60 minutos a RT.

Finalmente, se dejó secar el pellet durante 10 minutos a RT y se resuspendió en 100µl con fosfato sódico 0.1M pH7 (PBS) filtrado durante 2 horas en el baño a 37C para su total resuspensión. La cuantificación del DNA se realizó en el nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) con el programa Nanodrop 2000/2000c (version del 2009).

### **2.3. Técnicas histológicas**

#### **2.3.1 Fijación del tejido**

Para la obtención de los bulbos olfatorios y la SVZ de animales adultos se perfundieron ratones CD1 de 1 mes de edad y de entre 2-3 meses del resto de cepas con paraformaldehído (PFA) al 4% (Panreac) en tampón fosfato sódico (PBS) 0.1M pH7,4. Para ello, previamente se anestesiaron los animales con Doletal (1/10) a una dosis de 5,5 µl/g vía intraperitoneal.

Tras la toracotomía se cateterizó el ventrículo izquierdo del corazón y se realizó un corte directamente en la aurícula derecha, para permitir la salida de la sangre y de la solución fijadora. Se empleó una bomba peristáltica (Masterflex de Cole Parmer Model) y se trabajó a un flujo constante de 8ml/min. Inicialmente se administraron 30 ml de PBS 0,1M pH7,4 para desplazar la sangre de los vasos sanguíneos y posteriormente se administró 70ml de PFA al 4%. Para la obtención de los bulbos olfatorios y SVZ de animales neonatos (P0)

y embrionarios (E17,5) se empleó la misma técnica descrita previamente con algunas variaciones que se detallan a continuación. Los animales fueron anestesiados en hielo (2-4 minutos), para la perfusión y cateterización del ventrículo se emplearon jeringas de 2ml (BD Plastipak) con una aguja de 30G (BD Microlance) y se administraron 2ml PBS 0,1M pH7,4 y de solución fijadora.

### **2.3.2. Post-fijación del tejido**

Tras la perfusión se extrajeron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en PFA al 4%. Los cerebros adultos se dividieron en dos siguiendo la línea sagital que separa los hemisferios.

A continuación, un hemisferio fue post-fijado durante dos horas y el otro durante toda la noche a 4C en agitación. Sin embargo, todos los cerebros procedentes de animales neonatos (P0) o embrionarios (E17,5) se post-fijaron durante toda la noche a 4C en agitación suave.

Después de la post-fijación, los cerebros se sometieron a tres lavados con PBS 0,1M pH7,4 a 4C en agitación y se prepararon para ser procesados en el criostato. Los cerebros adultos post-fijados toda la noche y el de los embriones E17,5 se lavaron con PBS 1X 0,1M pH7,4 DEPC (PBS tratado con Diethyl dicarbonate, Diethyl oxydifomate, Ethoxyformic acid anhydride(Sigma) 1:1000 durante toda la noche y autoclavada al día siguiente con el fin de eliminar las RNAsas).

### **2.3.3. Procesamiento del tejido**

Con el fin de preservar la integridad de las estructuras anatómicas, los cerebros destinados a ser procesados en el criostato fueron previamente crioprottegidos. Se sumergieron en una solución saturante de sacarosa, primero al 15% y después del 30%, en PBS 0,1M pH7,4 durante toda la noche a 4C para reemplazar el agua del tejido por la sacarosa y evitar la formación de cristales. La sacarosa para crioproteger a los cerebros de los embriones E17,5 se disolvió en PBS 1X 0,1M pH7,4 DEPC.

Una vez crioprottegido el cerebro adulto, se separaron los bulbos olfatorios y el resto del cerebro. Los bulbos y el resto del cerebro se orientaron en un molde específico (Aname) con una solución de congelación (O.C.T, Tissue-Tek Embedding Medium for frozen tissue specimens).

Finalmente, el tejido se congeló sumergiendo el molde en nitrógeno líquido (-196C) y se almacenó a -80C. Los cerebros de embriones y neonatos se procesaron de la misma manera pero sin separar los bulbos del resto del cerebro. Por último, se realizaron secciones coronales (Leica CM1900) de 10µm de grosor que se recogieron en portaobjetos (Super Frost, Fisher) en series paralelas (10 portas/serie) con el fin de obtener una representación rostro-caudal del bulbo olfatorio y de la SVZ. Posteriormente, las secciones se guardaron a -20C hasta su uso.

## 2.4. Técnicas inmunohistoquímicas

La detección de los antígenos de interés se realizó mediante inmunohistoquímica. El tratamiento previo de las muestras dependió del tipo de antígeno a estudiar. Los cortes destinados a la detección de la BrdU, se sometieron a un tratamiento con HCl, para desnaturalizar el DNA y facilitar el reconocimiento por el anticuerpo. El tratamiento consistió en la incubación de los cortes con HCl 2N en agua miliQ a 37C durante 20 minutos, seguido de un lavado con borato sódico 0.1M pH 8,5 de aproximadamente 10 minutos, para neutralizar el pH y a continuación se realizaron varios lavados con PBS 0,1M pH7,4. Para la detección de PBX2 y GAD67, las secciones se sumergieron en una solución de citrato sódico a 10mM pH6,5, se hirvieron 3 veces durante 30 segundos en un microondas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente 20 minutos y se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS0,1M pH7,4.

Posteriormente, el bloqueo de las uniones inespecíficas se llevó a cabo incubando el tejido en una solución de tampón de bloqueo ( PBS 0,1M pH7,4 Triton X-100 al 0,2% (Sigma) y suero bovino fetal al 10%) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.

Después del bloqueo el tejido fue incubado con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo a la concentración de uso correspondiente (Tabla 2) durante toda la noche a 4C en cámara húmeda.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron con PBS 0,1M pH7,4 tres veces durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo diluidos en tampón de bloqueo a su concentración de uso (Tabla 3) durante 45 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Para la detección de PBX2 se recurrió al método de revelado en triple capa para amplificar la señal, para lo cual tras los lavados del anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotilado (diluido en tampón de bloqueo a 1:300) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 0,1M pH7,4 y a continuación, se incubó con estreptavidina conjugada a un fluoróforo (diluido en tampón de bloqueo a 1:300) en condiciones de oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se tiñeron los núcleos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) (2µg/ml, Sigma) a una dilución 1:5000 en H2O destilada durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras varios lavados con PBS 0,1M pH7,4, las secciones se sometieron a un proceso de deshidratación con alcoholes de concentración ascendente (70, 96o y 100o) (Panreac) durante 2 minutos seguidamente, se sumergieron dos veces (en recipientes distintos) durante 5 minutos en xileno (Panreac) y finalmente se montaron en medio de montaje entellan (Millipore) para preservar la fluorescencia de las tinciones.

### 2.4.1. Análisis inmunohistoquímico

En los experimentos de electroporación *in vivo*, las imágenes de las inmunotinciones fueron realizadas con un microscopio de fluorescencia vertical (Zeiss Axioplan 2) mientras que para el resto de estudios, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio con-

focal (Leica TCSOSP8). La captura de las imágenes de las secciones teñidas se realizó excitando de forma secuencial los diferentes fluoróforos empleados. Los recuentos de las diferentes poblaciones marcadas se realizaron con el soporte del programa LAS AF Lite de Leica junto con Image J64. Las imágenes se editaron con el programa Adobe Photoshop CS5.1.

## 2.5. Hibridación *in situ* de fluorescencia

### 2.5.1. Obtención de la sonda

La sonda que se utilizó para los ensayos de detección del mRNA de TH fue sintetizada en el propio laboratorio a partir de DNA genómico de ratón salvaje (CD1). En primer lugar, se amplificó una región del gen *Th* de 700bp (comprobar el tamaño exacto) al que se añadió la secuencia sp6 (GCGATTTAGGTG) por PCR siguiendo las condiciones que se muestran a continuación: una etapa de desnaturalización a 94C durante 2 minutos, una etapa de anillamiento a 94C durante 30 segundos y una etapa de extensión de 58,5C durante 30 segundos. Después de una reacción de 35 ciclos, el producto de amplificación es de 705bp. Los cebadores utilizados son:

**oLX29 : 5'–AATGCTGTTCTCAACCTGCTC–3'**

**oLX30 : 5'–GCGATTAGGTGACACTATAGAGATGCAAGTCCAATGTCCTG–3'**

El producto de amplificación de la PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X (EDTA 1mM, ácido acético glacial 20mM y Trizma base 40mM pH7.6). Tras comprobar que únicamente se amplificó la banda esperada de 705bp se purificó el producto de PCR siguiendo las instrucciones del kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

A continuación, como molde para la síntesis de la sonda de mRNA se usaron 750ng de DNA del producto purificado de PCR en un volumen de reacción de 30µl que contenía 3µl de Transcription Buffer 10X (Roche), 3µl de dNTPs conjugados con digoxigenina 10X (Roche), 0,9µl de inhibidor de RNAsa 2000u (Roche), 1,8µl de la RNapolimerasa SP6 (Roche) y H2O DEPC (H20d tratada con Diethyl dicarbonate, Diethyl oxydiformate, Ethoxyformic acid anhydride(Sigma) 1:1000 durante toda la noche y autoclavada al día siguiente con el fin de eliminar las RNAsas).

Tras homogeneizar bien la solución, la muestra se incubó a 37C durante 2 horas. Posteriormente, se purificó la sonda y para ello se empleó el kit comercial NucleoSpin RNA clean-up (Cultek).

### 2.5.2. Detección del mRNA

Para la detección del mRNA del gen *Th* en el bulbo olfatorio de ratones de la cepa *Nes-tin-CRE* se emplearon secciones con tejido post-fijado en PFA 4% durante toda la noche. En primer lugar, se dejaron atemperar las muestras sobre la bancada (10 minutos) seguidamente, se sumergieron en PBS 0,1M pH7,4 DEPC durante 10 minutos para retirar de

la muestra posibles restos de O.C.T. Después, se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados de 3 minutos con PBS 0,1M pH7,4 DEPC a temperatura ambiente y en agitación.

Tras los lavados, se digirió el tejido con una solución que contenía proteinasa k (1 µg/ml, Sigma) diluida 1:1000 en PBS 0,1M pH7,4 DEPC durante 5 minutos, se volvió a fijar el tejido con PFA 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBT (PBS 0,1M pH7,4 DEPC y Tween-20 al 0.01% (Sigma)) a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las muestras se incubaron en una solución de hibridación ( 50% de formamida (Sigma), 10% de dextran sulfato (Sigma), 0,2% de tRNA (Invitrogen), Denhart's 1X (Sigma), solución salina (Salt solution) 1X (NaCl 2M(-Sigma), Tris 0,1M(Sigma), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM(Sigma), EDTA 50mM a pH 7,5(Sigma)) durante 2 horas a 62C en una cámara húmeda (25ml 5X SSC (Sigma), 25ml H<sub>2</sub>O destilada y 50ml de formamida(Sigma)).

Tras la incubación, se añadió la solución con la sonda (75µl/porta), se cubrieron las muestras con cubres (Fisher) y se dejaron toda la noche a 62C en una cámara húmeda (25ml 5X SSC (Sigma)) precintada. Para la preparación de la solución con la sonda, en primer lugar, se descongeló la sonda en hielo, se desnaturalizó a 80C durante 5 minutos y se devolvió al hielo. Después se añadió 1µl (351.4 ng/ul) de sonda a 100µl de buffer de hibridación y se incubó la solución a 65C durante al menos 5 minutos.

Al día siguiente, las muestras se sumergieron en una solución de lavado con formamida (Sigma) al 50%, SSC (Sigma) al 5X y 0.1% Tween-20 (Sigma) durante 15 minutos a 62C y se retiraron los cubres de los portaobjetos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 30 minutos a 62C con una solución de lavado con formamida (Sigma) al 50%, SSC (Sigma) al 5X y 0.1% Tween-20 (Sigma).

Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación con una solución con ácido maleico (Panreac) 0.1M, NaOH (Sigma) 0.2M, NaCl (Sigma) 0.2M Tween-20 (Sigma) al 0.01% (MABT) pH7.4. Tras los lavados, el bloqueo de las uniones inespecíficas se llevó a cabo incubando el tejido en una solución de tampón bloqueo (blocking reagent (Roche) al 10%, suero de oveja (Sigma) al 10% diluido en MABT) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después del bloqueo, el tejido fue incubado con el anticuerpo primario anti-digoxigenina (Sigma) a una dilución 1:3500 durante toda la noche a 4C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron 10 lavados de 30 minutos a temperatura ambiente en agitación con MABT. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente en agitación con Tris-HCl (Sigma) 0.1M pH 8.2 y se incubaron las muestras con la solución de revelado ( Fast Red Tablets (Roche)) durante 3-5 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Posteriormente, para detener la reacción de revelado, las muestras se sumergieron en Tris-HCl y se volvieron a fijar con PFA al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la fijación, la muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos en Tris-HCl a temperatura ambiente en agitación y en oscuridad. Finalmente, se tiñeron los núcleos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) (2µg/ml Sigma) diluido en H<sub>2</sub>O des-

tilada (1:5000) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se montaron las muestras con Fluorsave (Calbiochem) para preservar la fluorescencia de las tinciones.

Alternativamente, para los casos en los que después de la *in situ* se realizó una inmunohistoquímica el proceso de detección del mRNA fue el mismo que el anterior excepto en la post-fijación del paso previo a la tinción con DAPI. En ese caso, en vez de post-fijar, las muestras se lavaron varias veces (mínimo 3) durante 5 minutos en solución Tris-HCl a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. A continuación, se realizaron varios lavados (mínimo 3) durante 15 minutos en PBS 0,1M pH7,4 a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad.

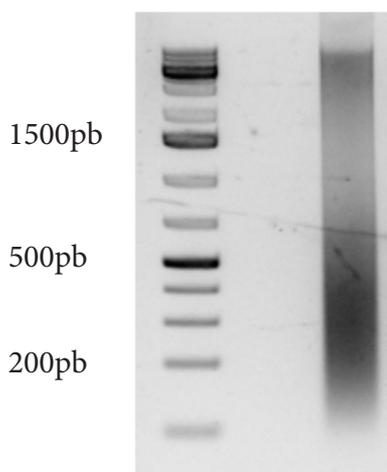
Finalmente, las muestras se bloquearon y se incubaron con los anticuerpos siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior con la única variación de concentrar el anticuerpo primario al doble.

### 3 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

Para los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina se emplearon 3 ratones machos por cada experimento independiente, de la cepa CD1 de 2 meses de edad sacrificados por dislocación cervical.

Seguidamente, se extrajo el cerebro, se diseccionaron los dos bulbos olfatorios, se trocearon en 3-4 partes en PBS 1X 0,1M pH7,4 se transfirieron a un vaso de precipitado y se añadieron 7ml de solución (BSA(-)) que contenía NaCl 5M (Sigma), KCl 1M (Sigma), MgCl<sub>2</sub> 1M (Sigma), CaCl<sub>2</sub> 1M (Sigma), Glucosa 1M (Sigma), y HEPES 1M (Sigma). A continuación se añadieron (2mg) de papaína (Sigma), (10mg) de L-cisteína (Acros Organics) y se incubaron en un baño durante 50 minutos a 37C.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados con la solución BSA (+) (solución BSA(-) con BSA al 10% (Sigma) y 3 lavados con la solución BSA (-). Finalmente, se retiró la solución BSA (-) y se añadieron 500 µl de PBS 1X 0,1M pH7,4 en hielo con inhibidor de proteasas 1X (Roche).



◀ **Figura M3.** Tras sonicar el DNA se obtuvieron fragmentos de entre 200 y 600bp. Imagen del gel de agarosa donde se muestra el tamaño del DNA sonificado.

Después, se procedió a la disociación mecánica disgregando el tejido en un homogenizador de vidrio previamente enfriado. Se resuspendió el disgregado celular en un volumen final de 1ml PBS 1X 0,1M pH7,4 con inhibidores de proteasas 1x para proceder al conteo celular en una cámara de Neubauer. A continuación, se fijaron las células con paraformaldehído al 1% (Sigma) durante 15 minutos en agitación rotatoria a temperatura ambiente.

A continuación la reacción se detuvo con glicina (Sigma) 0.125M mediante una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente en agitación rotatoria. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS 1X 0,1M pH7,4 centrifugando 5 minutos a 1500rpm a 4C. Tras el último lavado, se añadió la solución de lisis con inhibidor de proteasas 1x (1ml por cada 5x10<sup>6</sup> células) que contenía NaCl 1M (Sigma), Tris-HCl 20mM pH8(Sigma), EDTA 10mM (Sigma) y SDS al 20% (Sigma) y se incubó durante 10 minutos en agitación rotatoria a 4C. Se eliminó el sobrenadante tras una centrifugación de 5 minutos a 4C a 1500rpm.

Las células se resuspendieron en solución de inmunoprecipitación ( 2 partes del tampón de lisis y una de solución de triton (NaCl 1M (Sigma), Tris-HCl 0.1M pH8(Sigma), EDTA 10mM (Sigma) y Triton al 10%) en el mismo volumen que se añadió de solución de lisis, y se incubaron durante 10 minutos en hielo. A continuación, se sonicaron las muestras con Bioruptor (Diagenode) durante 5 minutos con ciclos de 30 segundos ON y 30 segundo OFF, salvo 30ul que se reservaron como control no sonificado. La calidad de la sonicación (fragmentos entre 200-900pb) se testó, rompiendo el entrecruzamiento de 30ul de la muestra sonicada y el control no sonificado tras centrifugar para eliminar restos celulares (3 minutos, 4C, 13000rpm) añadiendo 1,5 ul de NaCl 5M e incubando a 65C durante toda la noche.

Al día siguiente se añadió 1 µl de RNAsa A (QIAGEN) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37C. A continuación, se añadió 1 µl de proteinasa k (Roche), se incubaron durante 1-2h a 45C y posteriormente se purificó la muestra por columna siguiendo el protocolo de la casa comercial (QIAquick PCR Purification Kit ,QIAGEN).

Finalmente, con el fin de comprobar el tamaño de los fragmentos del DNA sonificado, los productos purificados, se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% en TAE 1X (EDTA 1mM, ácido acético glacial 20mM y Trizma base 40mM pH7.6) en el que se usó bromofenol con glicerol al 30% como tampón de carga (Figura M3).

Una vez comprobada la calidad de la sonicación, se procedió a la inmunoprecipitación de la cromatina. Los anticuerpos contra PBX1, RNAPolII e IgG (Tabla2) (2µg/ condición) se incubaron en 300µl de PBT (PBS 1X 0,1M pH7,4 con Tween-20 al 0.02%(Sigma)) a 4C durante toda la noche, con 30 µl de Dynabeads Protein G (Invitrogen) previamente lavadas con PBT (PBS 1X 0,1M pH7,4 con Tween-20 al 0.02% (Sigma)).

Al día siguiente, se realizaron dos lavados con PBT (PBS 1X0,1M pH7,4 con Tween-20 al 0.02% (Sigma)) . Paralelamente, se diluyó (2:1) el material sonificado (cromatina) con solución de dilución (Triton X-100 al 1.1% (Sigma), EDTA 1.2mM (Sigma), Tris-HCl 16.7mM pH8(Sigma) y NaCl 167mM (Sigma)). A continuación, se separaron 50 µl de muestra, que se utilizaron como control del experimento (INPUT), se repartió el resto entre las diferentes condiciones (viales con bolitas magnéticas y el anticuerpo) y se incubaron a 4C en agitación rotatoria toda la noche.

Tras la incubación, se realizaron varios lavados de 10 minutos a 4C en agitación rotatoria y con la ayuda del estante magnético. Dos lavados de 10 minutos a 4C con una solución que contenía 0.1% SDS , 1% TritonX-100 (Sigma) , 2mM EDTA (Sigma), 20 mM Tris-HCl pH8 (Sigma), 150 mM NaCl (Sigma) dos lavados con una solución que contenía 0.1% SDS (Sigma), 1% TritonX-100 (Sigma), 2mM EDTA (Sigma), 20 mM Tris-HCl pH8 (Sigma), 500 mM NaCl (Sigma) y un lavado con solución de LiCl (0.25M LiCl (Sigma), 1% NP40(Sigma), 1% ácido deoxicólico (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 10mM Tris-HCl pH8(Sigma)).

Por último se realizaron dos lavados con solución TE (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8). A continuación se eluyó la muestra con SDS 10%, 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) en dd-H<sub>2</sub>O (100µl /muestra) incluyendo los 50 µl de muestra separados previamente (INPUT) mediante incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en agitación, recogiendo el sobrenadante a un tubo limpio al colocar los tubos en un estante magnético. Este procedimiento se repitió 2 veces Seguidamente, se añadieron 8 µl de NaCl 5M (Sigma) y se

incubaron a 65C durante toda la noche para eliminar el retrocruzamiento. Al día siguiente se añadió 1 µl de RNAsa A (QIAGEN) y se incubó durante 30 minutos a 37C. A continuación se añadieron 4 µl de EDTA 0,5M (Sigma), 8 µl tris-HCl 1M pH6,8 (Sigma), 0,5 µl proteinasa K (Sigma) y se incubaron durante 1-2 horas a 45C. Por último se purificaron las muestras siguiendo el protocolo de la casa comercial (QIAGEN) y se guardaron a -20C.

Las muestras se analizaron mediante PCR cuantitativa. La reacción de PCR cuantitativa se realizó con el reactivo Fast Syber Green (Applied Biosystems), la concentración final de los oligonucleótidos fue 1µM y las muestras se analizaron en el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El programa consistió en 10 minutos a 95C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95C y 60 segundos a 60C. Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación:

**thprom**                    **-3500: fwd: 5'– GAT AAG GCA GCA GCT TCC AC – 3'**  
                                 **rev: 5'– CCTCTTTCAGCACGGTGTTT–3'**

**thprom fwd:**            **5'–GTC TCC TGT CCC AGA ACA CC – 3'**  
                                 **rev: 5'– AGG CAC CTG CCT CTG AAT C – 3'**

**hppt fwd:**              **5'– AGC AGG TGT TCT AGT CCT GTG G – 3'**  
                                 **rev: 5'– ACG CAG CAA CTG ACA TTT CTA A – 3'**

## 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism (versión 6.0d). Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó si la distribución era normal, y se aplicó el Test de Levene para evaluar la homocedasticidad. Para la determinación de la significancia de las diferencias entre dos grupos experimentales se aplicó la prueba de la “t” de Student.

Para los casos de las comparaciones múltiples, primero se aplicó la prueba ANOVA para estudiar si existían diferencias entre los grupos experimentales y posteriormente, mediante el Test de Tukey se determinó la significancia de las diferencias. En el conjunto de los análisis los valores  $p < 0,05$  se han considerado estadísticamente significativos. Todos los valores obtenidos se han expresado como la media  $\pm$  error estándar de la media (sem), en los diferentes grupos descritos. Se ha representado  $p < 0,05$  como \*,  $p < 0,01$  como \*\*,  $p < 0,001$  como \*\*\*.

**Tabla M2.** Anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario	Especie <sup>1</sup>	Dilución	Casa comercial y referencia	Aplicación
Pbx1a	Ms	1:250	Santa Cruz (sc-101851)	IF
Pbx1b	Ms	1:100	Santa Cruz (sc-101852)	IF
Pbx2	Ms	1:100	Santa Cruz (sc-890)	IF
Pbx3	GP	1:16000	Santa Cruz (sc-891)	IF
TH	Shp	1:1000	Peel-freez (P60101-0)	IF
TH	Rb	1:1000	Peel-freez (P40101-0)	IF
TH	Ms	1:500	Millipore (MAB318)	IF
CR	Ms	1:3000	Millipore (AB5054)	IF
CR	Rb	1:2000	Millipore (MAB1568)	IF
CB	Ms	1:3000	Sigma (C9848)	IF
CB	Rb	1:5000	Swant (CB38)	IF
Er81	Rb	1:1000	Abcam (ab81086)	IF
Pax6	Rb	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank (AB_528427)	IF
GAD67	MS	1:500	Chemicon (AB1511)	IF
COUP-TF1	Ms	1:500	Persus proteomics (H8132)	IF
GFP	Chk	1:1000	Aves lab (GFP-1020)	IF
BrdU	rata	1:400	Abcam (ab6326)	IF
Ki67	Rb	1:150	Abcam (ab15580)	IF
DCX	Gt	1:100	Santa Cruz (sc-8066)	IF
DIG	Shp	1:3500	Roche (11093274910)	ISH
Pbx1	Rb	6,6x10 <sup>-3</sup> µg/µl	Cell signaling (4342)	IP
IgG	Ms	6,6x10 <sup>-3</sup> µg/µl	Santa Cruz (sc-2025 )	IP
RNApol II	Ms	6,6x10 <sup>-3</sup> µg/µl	Santa Cruz (sc-13583)	IP

Rb: anticuerpo policlonal obtenido en conejo; Ms: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón; Gt: anticuerpo policlonal obtenido en cabra, GP: anticuerpo policlonal obtenido en conejo de indias, Chk: anticuerpo policlonal obtenido en pollo, Shp: anticuerpo policlonal obtenido en oveja.

**Tabla M3.** Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo secundario	Especie <sup>1</sup>	Dilución	Casa comercial y referencia	Aplicación
Alexa 555 anti-Ms	Dk	1:500	Invitrogen (A31570)	IF
Alexa 488 anti-Ms	Dk	1:500	Invitrogen (A21202)	IF
Alexa 633 anti-Ms	Gt	1:500	Molecular probes (A21052)	IF
Alexa 555 anti-Rb	Dk	1:500	Invitrogen (A31572)	IF
Alexa 488 anti-Rb	Dk	1:500	Invitrogen (A21206)	IF
Alexa 633 anti-Rb	Gt	1:500	Invitrogen (A21071)	IF
Alexa 555 anti-rat	Gt	1:500	Invitrogen (A21434)	IF
Alexa 555 anti-GP	Dk	1:500	Jackson Immunoresearch (706-586-148)	IF
Alexa 488 anti-Chk	Gt	1:500	Invitrogen (A-11039)	IF
Alexa 647 anti-GP	Gt	1:500	Life technologies molecular probes (A-21450)	IF
Alexa 488 anti-Gt	Dk	1:500	Invitrogen (A-11055)	IF
Alexa 488 anti-Shp	Dk	1:500	Invitrogen (A11015)	IF
Alexa-555 Estreptavidina	—	1:300	Jackson Immunoresearch (JAC-016-160-084)	IF
Alexa-647 Estreptavidina	—	1:300	Jackson Immunoresearch (016-600-084)	IF
Biot. Anti -Ms	caballo	1:300	Vector (BA-1100)	IF

Gt: anticuerpo obtenido en cabra, Dk: anticuerpo obtenido en burro.



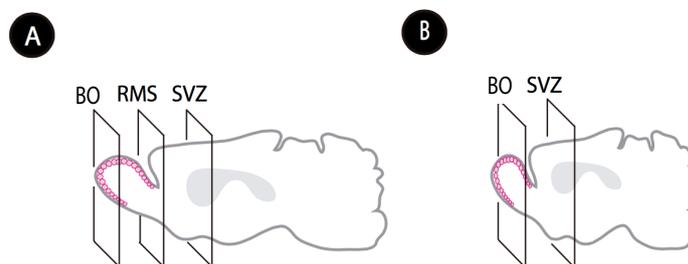
**resultados**



## 1 ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA PBX

Como se ha explicado en la introducción, en mamíferos, la familia de los factores de transcripción (FT) PBX está formada por 4 miembros: PBX1, PBX2, PBX3 y PBX4 con distintas isoformas para cada uno de ellos. Sin embargo, desafortunadamente, no existen anticuerpos ni para todos los FT ni para todas las isoformas. Concretamente, en este trabajo se utilizaron anticuerpos para las dos isoformas de PBX1: PBX1a y PBX1b, únicamente distintos entre si en la parte c- terminal, PBX2 y PBX3.

En el presente capítulo se analizará el patrón de expresión de los factores PBX1 (la isoforma PBX1a, PBX1b que difieren en su región carboxi-terminal pero no en su región de unión al DNA), PBX2 y PBX3 en la zona subventricular (SVZ), en el camino migrador rostral (RMS del inglés Rostral Migratory Stream) y en el bulbo olfatorio (BO) de ratones adultos (C57BL6) de dos meses de edad (Figura R1 A). Además, también se estudiará su expresión en la zona subventricular y en el bulbo olfatorio de ratones neonatos (P0) (C57BL6) (Figura R1 B).



▲ **Figura R1 (A)** Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del BO, RMS y SVZ se realizaron los recuentos. **(B)** Diagrama de un cerebro de ratón post- natal (P0) donde se indica aproximadamente a que altura del BO y SVZ se realizaron los recuentos.

## 1.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en cerebro adulto de ratón

### 1.1.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la zona subventricular

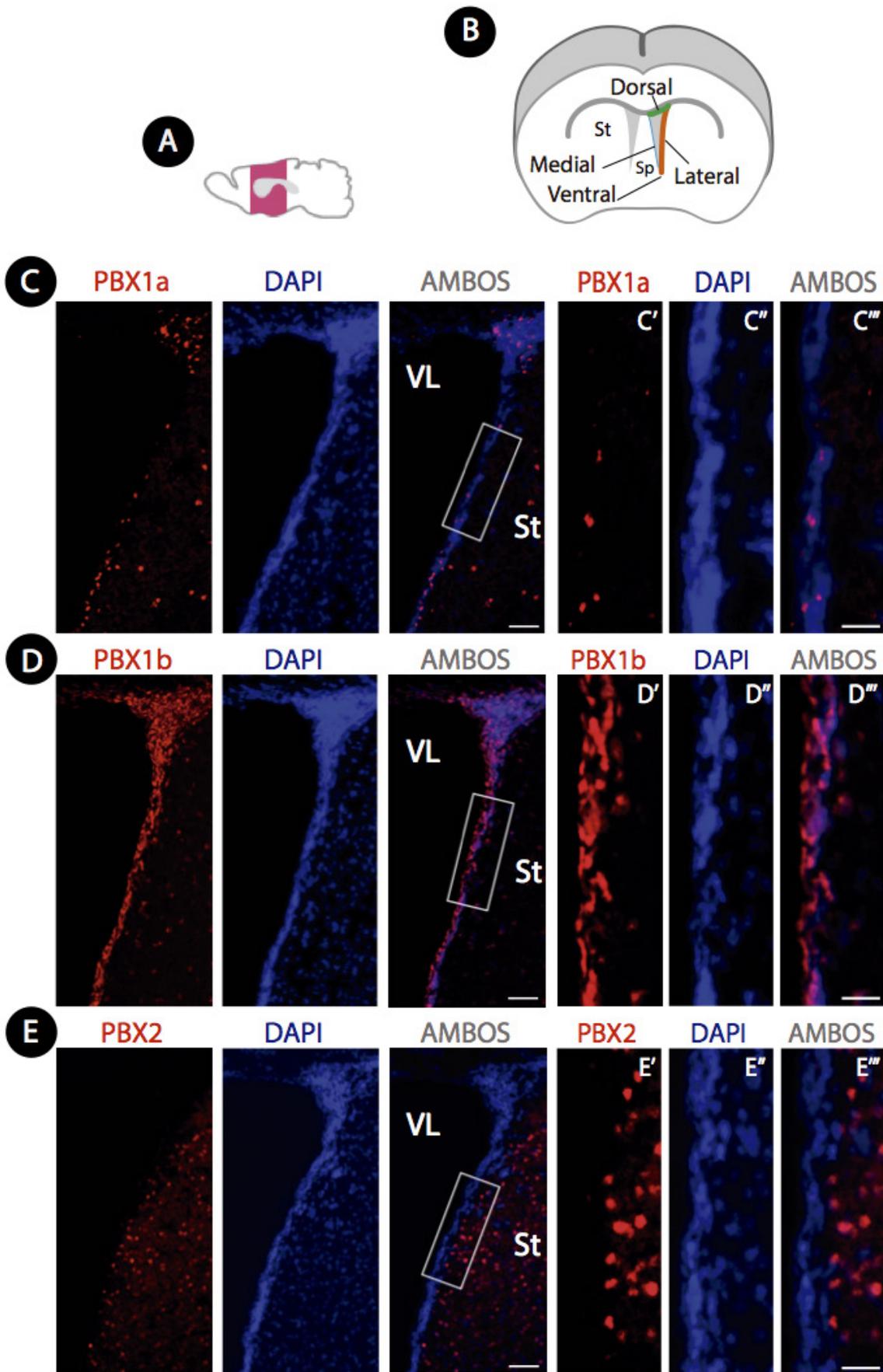
En primer lugar, para estudiar la expresión de PBX1a, PBX1b, PBX2 y PBX3 en la zona subventricular (SVZ) (dorsal y lateral) se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para cada uno de los factores de transcripción en secciones de la SVZ de animales control (C57BL6) de dos meses de edad. (Figura R2). El análisis por microscopía confocal de las secciones reveló que PBX1a, PBX1b y PBX2 se expresan en SVZ aunque cada factor muestra un patrón de expresión diferente (Figura R2). Por el contrario, no observamos expresión de PBX3 en SVZ (no mostrado).

La expresión de PBX1a y PBX1b queda principalmente restringida a células cercanas a las paredes del ventrículo (SVZ) con un mayor número de células PBX1b positivas en comparación con las células PBX1a (Figura R2 C y D). Por otra parte, PBX2 se expresa en un gran número de células del estriado y apenas pueden apreciarse células positivas para PBX2 en las paredes del ventrículo (Figura R2 E).

#### Figura R2: PBX1a, PBX1b y PBX2 se expresan en SVZ pero con distintos patrones de expresión.

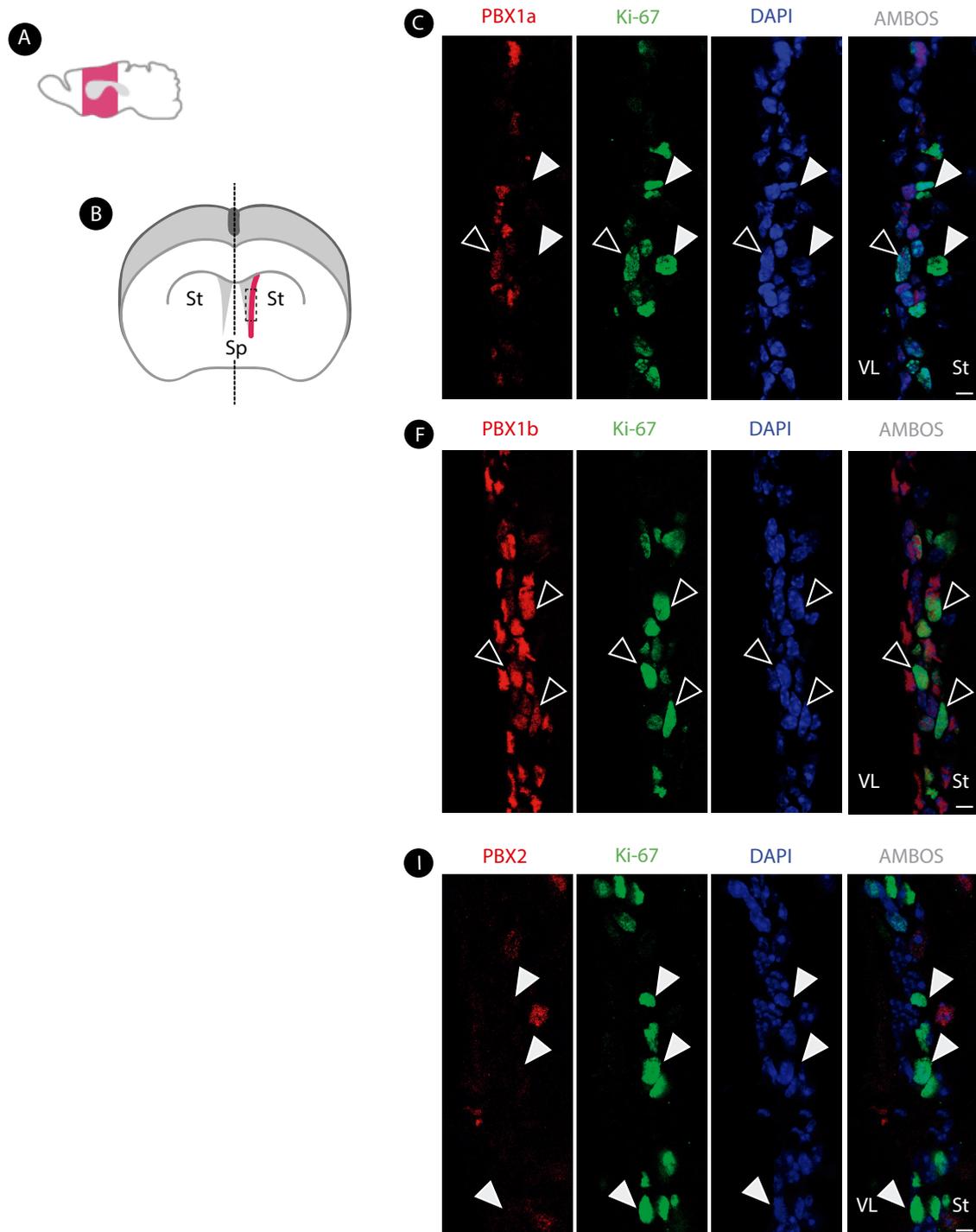
(A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura de la SVZ se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de cerebro adulto de ratón donde se representan las diferentes regiones de la SVZ (verde) dorsal; (naranja) lateral y ventral; (azul) medial. Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008. (C-E) Imagen panorámica de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción PBX1a, PBX1b y PBX2 respectivamente (rojo) de

una sección coronal de la SVZ adulta de animales control C57BL6 de 2 meses. (C) PBX1a se expresa en las zonas dorsal y lateral del ventrículo en un número reducido de células y en el inicio del RMS en mayor número. (D) PBX1b se expresa en las células cercanas a la pared del ventrículo (dorsal y lateral) y en células del inicio del RMS. (E) PBX2 apenas se expresa en las células cercanas a la pared del ventrículo dorsal y lateral y tampoco en el inicio del RMS. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 50µm en C, D, E y 25µm en C',C'',C''',D',D'',D''',E',E'',E'''. LV ventrículo lateral, St estriado. ►



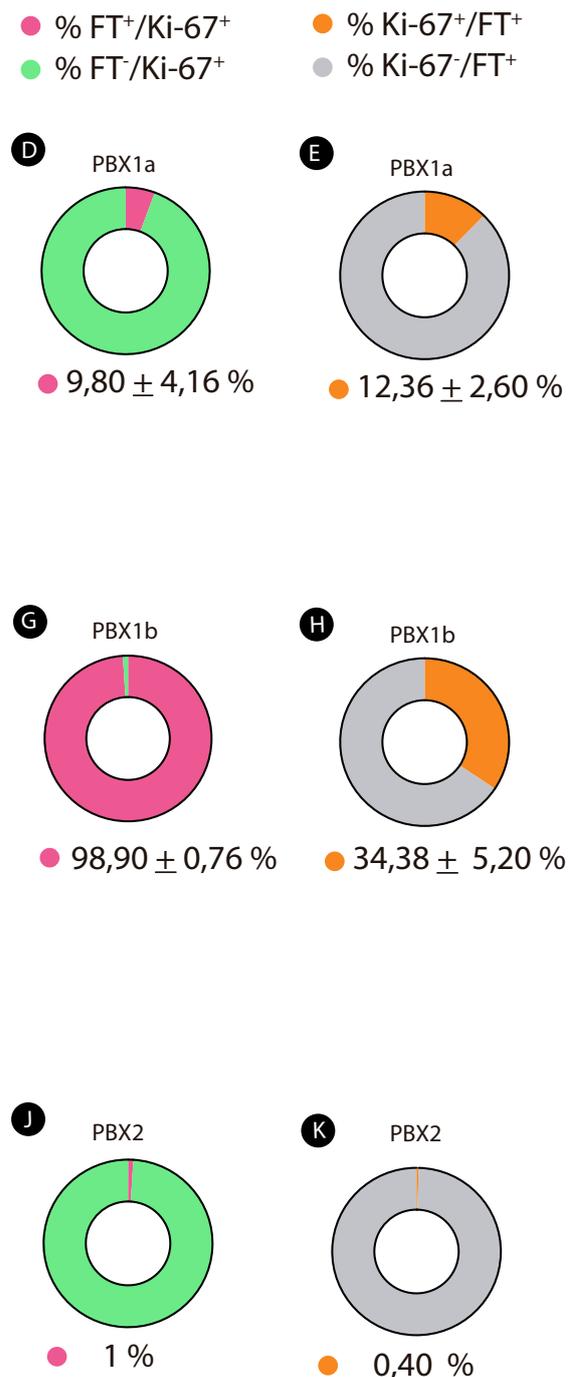
A continuación, se caracterizó si la expresión en la SVZ de PBX1a y PBX1b correspondía a progenitores neuronales. Para ello se realizó un estudio de co-localización con Ki-67 (marcador de proliferación) (Gerdes *et al.*, 1984) en los ventrículos dorsal y lateral mediante una doble inmunohistoquímica de fluorescencia contra cada uno de los FT y Ki-67 en secciones de la SVZ (Figura R3).

Los recuentos de las inmunotinciones revelaron que alrededor del 10% de las células positivas para Ki-67 co-expresan PBX1a (Figura R3 C-D) mientras que la gran mayoría



co-expresan PBX1b (Figura R3 F-G). Como era de preveer por la falta de expresión de PBX2 en la SVZ, nuestros análisis revelaron que tan sólo un 1% de la población de células proliferantes de la SVZ lo expresa. (Figura R3 I-J).

Además, también se analizó el porcentaje de células positivas para cada uno de los FT que expresaban Ki-67 en SVZ. Los resultados mostraron que el 12% de las células PBX1a+ expresaban Ki-67 mientras que para PBX1b el porcentaje incrementó hasta el 34%. Sin embargo, menos del 1% de las células PBX2+ co-localizaban con el marcador de proliferación.



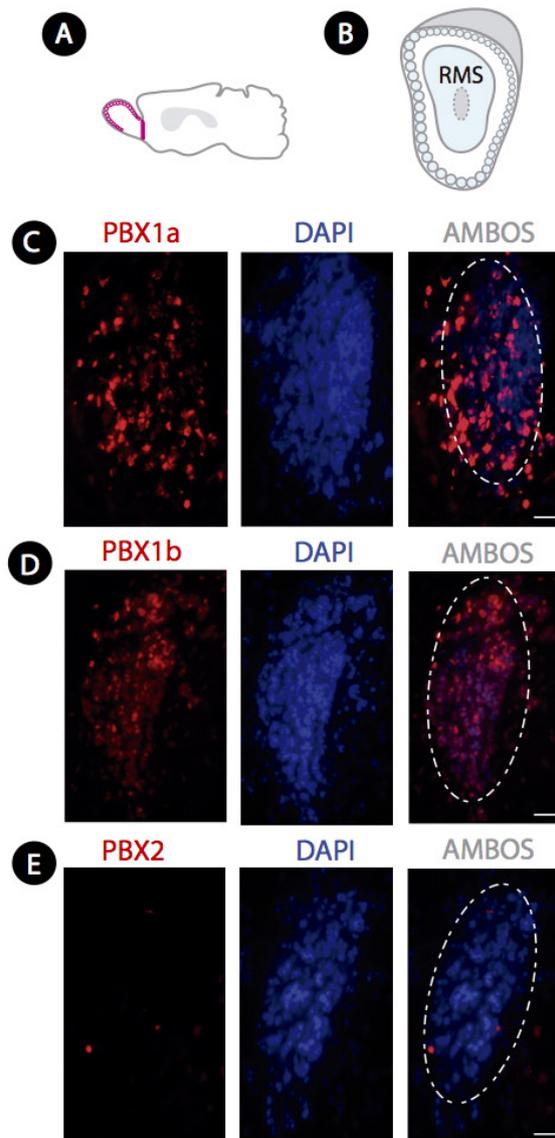
◀ **Figura R3. La gran mayoría de las células Ki-67+ expresan PBX1b y son negativas para PBX1a y PBX2.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura de la SVZ se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de cerebro adulto de ratón donde se indica mediante trazo discontinuo la región aproximada de la SVZ en la que se tomaron las imágenes. Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008. (C,F,I) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C), PBX1b (F) y PBX2 (I) y Ki-67 (verde) de una sección coronal de la SVZ adulta de animales control C57BL6 de 2 meses. (C) Microfotografía confocal de la SVZ donde se aprecia el reducido número de células positivas para Ki-67 (verde) que co-localiza con PBX1a (rojo). (F) Microfotografía confocal de la SVZ donde se muestra que la población de células en proliferación (verde) expresa PBX1b (rojo). (I) Microfotografía confocal de la SVZ en la que se indica que PBX2 (rojo) no co-localiza con el marcador Ki-67 (verde). (D, G, J) Análisis cuantitativo de las regiones dorsal y lateral de la SVZ del porcentaje de células positivas para Ki-67 que co-localizan con cada FT. (D) El 9,80% ± sem 4,16 de las células ki67+ expresan PBX1a (n=2). (G) El 98,90% ± sem 0,76 de las células ki67+ expresan PBX1b (n=2). (J) El 1% de las células ki67+ expresan PBX2 (n=1). (E,H,K) Análisis cuantitativo de las regiones dorsal y lateral de la SVZ del porcentaje de células positivas para cada FT (rojo) que co-localizan con Ki-67 (verde). (E) El 12,36% ± sem 2,60 de las células PBX1a+ expresan Ki-67 (n=2). (H) El 34,38% ± sem 5,20 de las células PBX1b+ expresan Ki-67 (n=2). (K) El 0,40% de las células PBX2+ expresan Ki-67 (n=1). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos negros de las figuras señalan células Ki-67+/FT+. Los triángulos blancos de las figuras señalan células Ki-67-/FT-. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 5µm en C,F,I. LV ventrículo lateral, St estriado.

### **1.1.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en neuroblastos migradores**

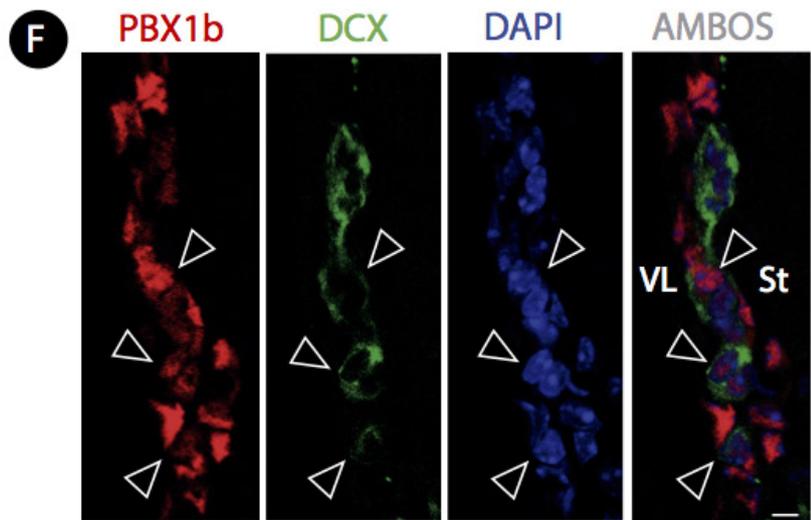
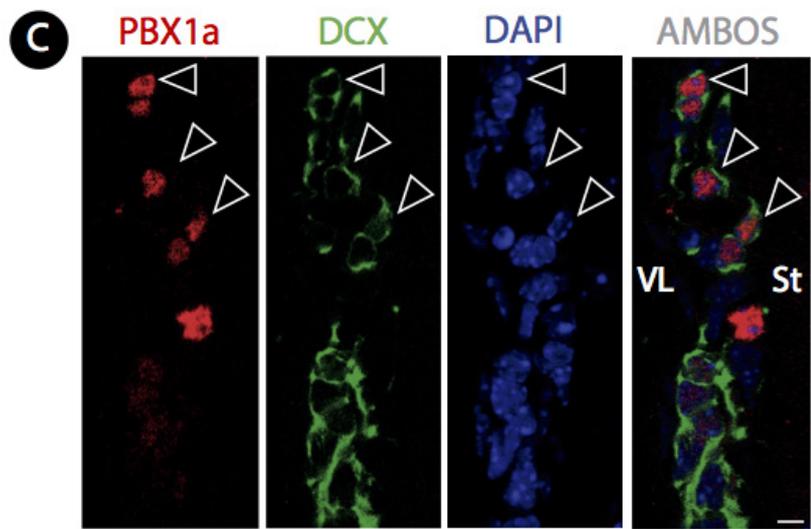
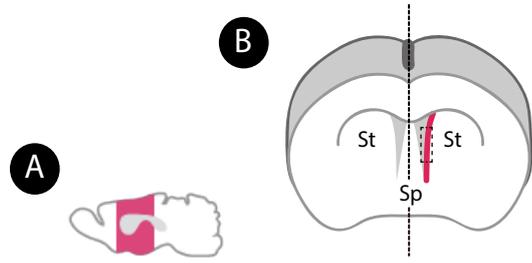
Una vez generados, los neuroblastos postmitóticos migran en forma de cadenas por las paredes de la SVZ hasta que coalescen en un único gliotubo que desemboca en la parte más profunda del bulbo olfatorio (llamado RMS). Curiosamente, nuestros análisis de expresión muestran una intensa marca tanto de PBX1a (Figura R4 C) como de PBX1b (Figura R4 D) pero no de PBX2 (Figura R4 E) en el RMS. Por eso, nos propusimos estudiar la expresión de estos factores en neuroblastos en migración mediante el uso del marcador DCX (doublecortin). Este marcador de neuronas inmaduras permite identificar a los progenitores neuronales en migración (neuroblastos).

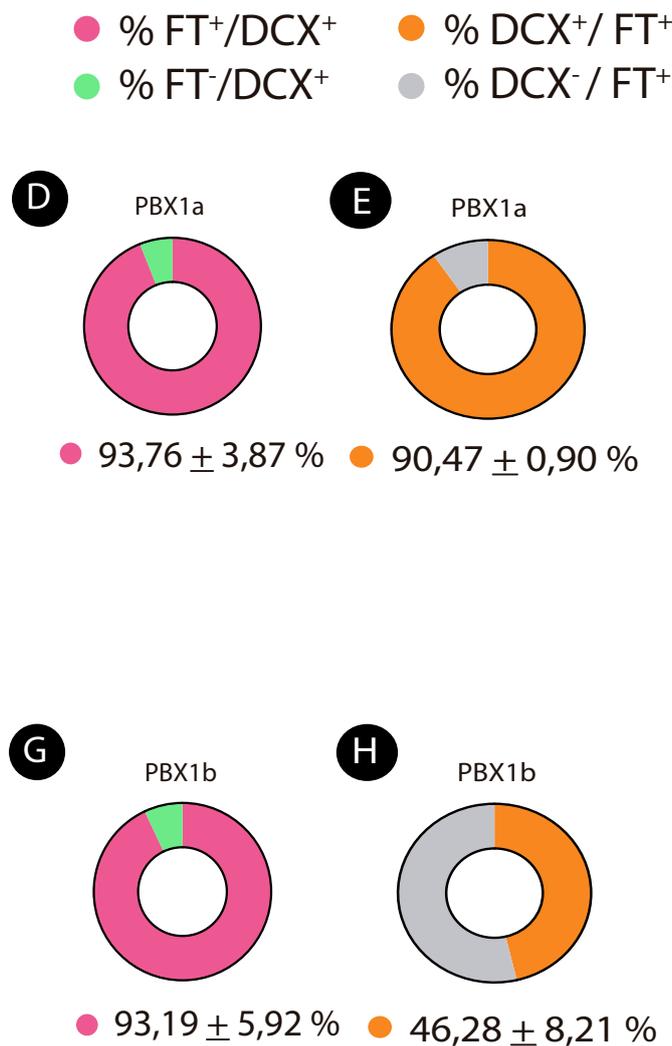
Para el análisis se realizó una doble inmunofluorescencia contra PBX1a, PBX1b y el marcador citoplasmático de neuroblastos DCX en secciones de la SVZ de animales control (C57BL6) de dos meses de edad (Figura R5).

Los recuentos mostraron que un 94% de los neuroblastos migradores expresaba PBX1a (Figura R5 D) y que un 93% PBX1b (Figura R5 G). Sin embargo, tan sólo el 3% expresaban PBX2 (no mostrado). El análisis también reveló que la mayor parte de las células PBX1a+ (90%) co-localizaban con la señal de DCX (Figura R5 E) mientras que menos de la mitad (46%) de las PBX1b+ expresaban el marcador (Figura R5 H).



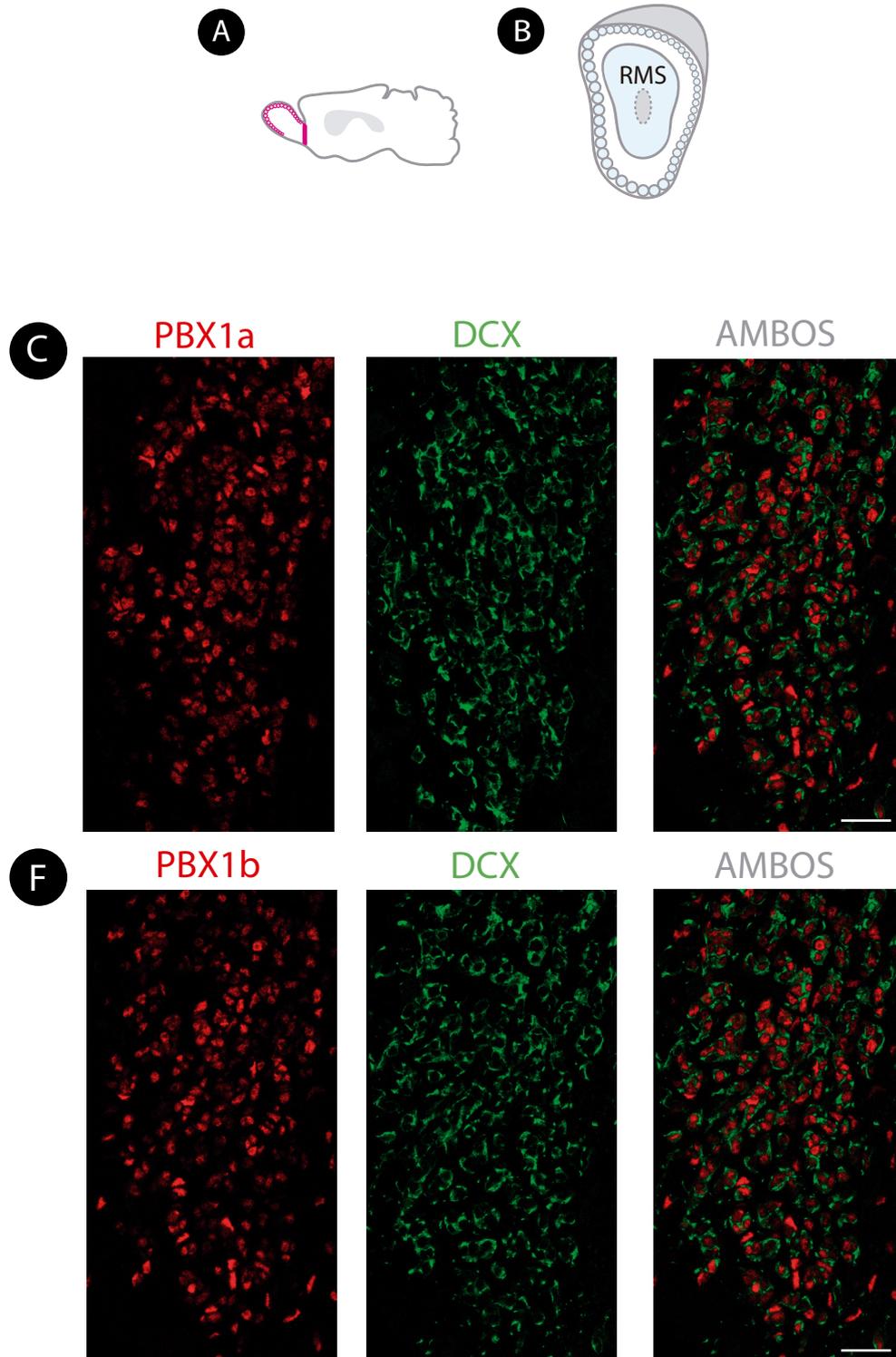
▲ **Figura R4: El RMS muestra niveles elevados de expresión de PBX1a y PBX1b pero no de PBX2.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del RMS se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de BO adulto de ratón donde se representa la región donde se han tomado las imágenes. (C-E) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de PBX1a (C) (rojo), PBX1b (D) (rojo) y PBX2 (E) (rojo) de una sección coronal caudal del BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 20 $\mu$ m.

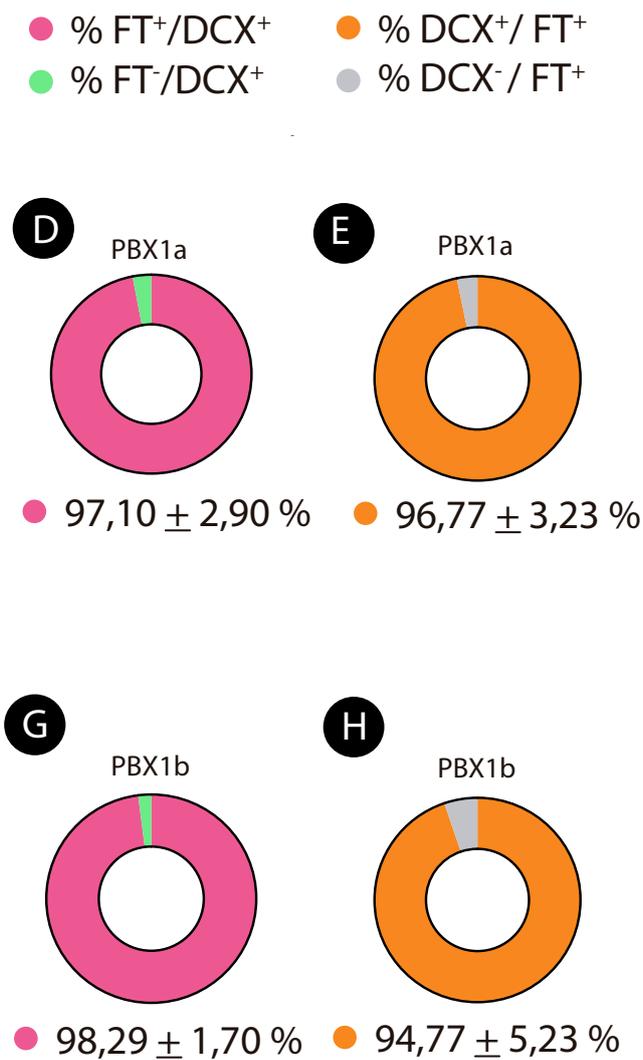




◀ **Figura R5: Las células DCX<sup>+</sup> en SVZ co-localizan con PBX1a y PBX1b.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura de la SVZ se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de cerebro adulto de ratón donde se indica mediante trazo discontinuo la región aproximada de la SVZ en la que se tomaron las imágenes. Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008. (C,F) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C) y PBX1b (F) y del marcador de neuroblastos migradores DCX (verde) de una sección coronal de la SVZ adulta de animales control C57BL6 de 2 meses. (D, G) Análisis cuantitativo de las regiones dorsal y lateral de la SVZ del porcentaje de células positivas para DCX (verde) que co-localizan con cada FT (rojo). (D) El 93,76% ± sem 3,87 de las células DCX<sup>+</sup> expresan PBX1a (n=3). (G) El 93,19% ± sem 5,92 de las células DCX<sup>+</sup> expresan PBX1b (n=3) (E, H) Análisis cuantitativo de las regiones dorsal y lateral de la SVZ del porcentaje de células positivas para cada FT (rojo) que co-localizan con DCX (verde). (E) El 90,47% ± sem 0,90 de las células PBX1a<sup>+</sup> expresan DCX (n=3). (H) El 46,28% ± sem 8,21 de las células PBX1b<sup>+</sup> expresan DCX (n=3). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos negros de las figuras señalan células DCX<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup>. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 5µm. LV ventrículo lateral, St estriado.

El análisis del RMS en el BO (zona más rostral y por tanto de neuroblastos migradores más maduros) reveló un escenario muy parecido al encontrado en la SVZ (Figura R6): el 97% de los neuroblastos migradores del RMS expresan PBX1a (Figura R6 D) y el 96% expresan PBX1b (Figura R6 G). Al mismo tiempo, los resultados mostraron que un 97% de las células PBX1a+ y que un 95% de las células PBX1b expresaban DCX en la zona más rostral del camino migrador (Figura R6 E,H).



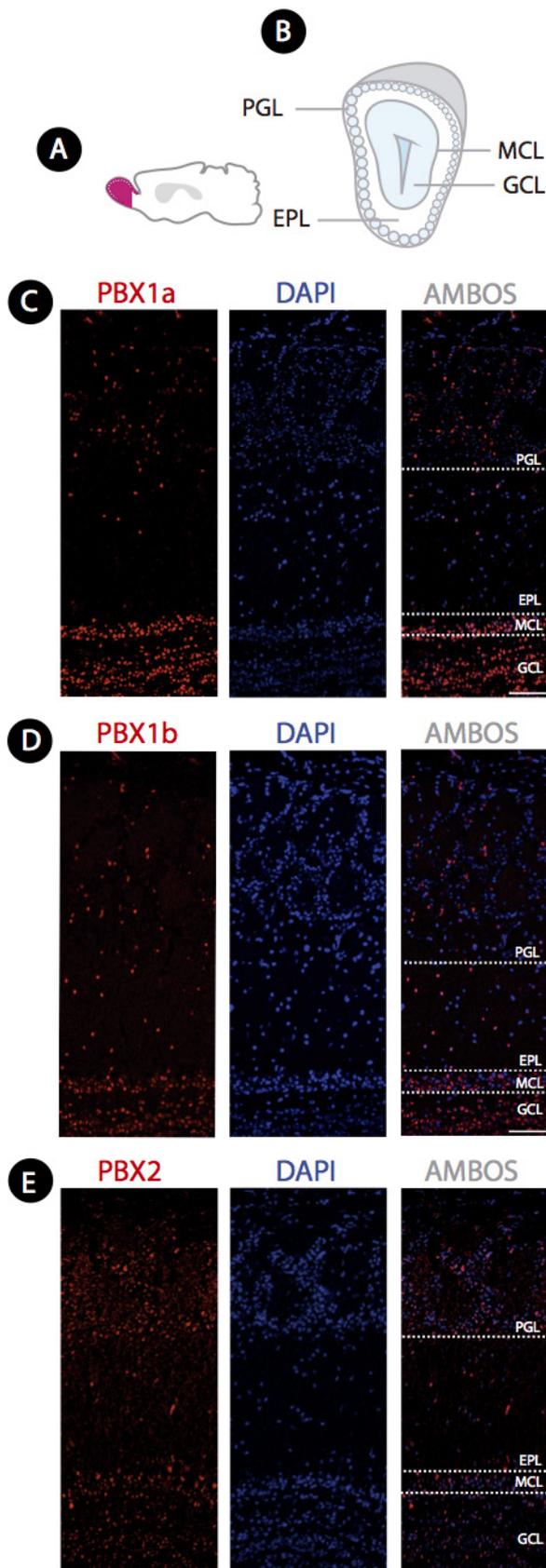


◀ **Figura R6: Los neuroblastos migradores expresan PBX1a y PBX1b en la región más caudal del BO.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del RMS se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de BO adulto de ratón donde se representa la región donde se han tomado las imágenes. (C, F) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C) y PBX1b (F) y del marcador de neuroblastos migradores DCX (verde) de una sección coronal caudal del BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. Microfotografía confocal del último tramo del RMS donde se muestra el elevado número de células DCX<sup>+</sup> (verde) que co-localizan con PBX1a (rojo) (C) y PBX1b (rojo) (F). La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. (D, G) Análisis cuantitativo del RMS del porcentaje de células positivas para DCX (verde) que co-localizan con cada FT (rojo). (D) El 97,10% ± sem 2,90 de las células DCX<sup>+</sup> expresan PBX1a (n=2). (G) El 98,29% ± sem 1,70 de las células DCX<sup>+</sup> expresan PBX1b (n=2). (E, H) Análisis cuantitativo del RMS del porcentaje de células positivas para cada FT (rojo) que co-localizan con DCX (verde). (E) El 96,77% ± sem 3,23 de las células PBX1a<sup>+</sup> expresan DCX (n=3). (H) El 94,77% ± sem 5,23 de las células PBX1b<sup>+</sup> expresan DCX (n=3). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Escala: 25µm.

### **1.1.3. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la capa periglomerular del bulbo olfatorio**

Tal y como ya se ha descrito en la Introducción, el BO presenta una organización laminar dispuesta a modo de capas concéntricas en las cuales se distribuyen los diferentes tipos de neuronas. Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de los FT de la familia PBX en el OB, se realizó una inmunohistoquímica de fluorescencia contra PBX1a, PBX1b, PBX2 y PBX3 (no mostrado) en secciones del BO de animales control C57BL6 de dos meses de edad Figura R7.

Las imágenes por microscopía confocal de las secciones revelaron que todos ellos se expresan en el BO pero con distinto patrón de expresión. En cuanto a PBX1a, como puede apreciarse en la Figura R7 C, se expresa en un elevado número de células de la capa granular (GCL del inglés Granule Cell Layer) sin embargo, apenas se observan células positivas en las capas plexiforme externa (EPL del inglés External Plexiform Layer) y mitral (MCL del inglés Mitral Cell Layer). También se observó un abundante número de células positivas para PBX1a en la PGL (del inglés PeriGlomerular Layer). PBX1b también se expresa de forma generalizada en la capa GCL y de forma más reducida en la PGL. En las capas EPL y MCL se observó un número muy reducido de células que expresaban PBX1b Figura R7D. Finalmente, el análisis para PBX2 mostró que, como en el caso de PBX1b se expresaba en la capa GCL. Además, PBX2 se expresaba de forma muy pronunciada en la PGL pero su señal en las capas EPL y MCL fue mínima (Figura R7 E).



◀ **Figura R7: PBX1a, PBX1b y PBX2 se expresan en las diferentes capas del BO.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del BO se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de un cerebro adulto de ratón donde se representan las diferentes capas del BO. (C-E) Imagen panorámica de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción PBX1a (rojo) (C), PBX1b (rojo) (D) y PBX2 (rojo) (E) respectivamente de una sección coronal de BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. (C) PBX1a se expresa en un elevado número de células de la GCL pero su expresión en la MCL y en la EPL disminuye drásticamente y vuelve a expresarse en PGL. (D) Las capas GCL y PGL muestran un alto número de células positivas para PBX1b sin embargo la señal en MCL y EPL es mucho menor. (E) PBX2 se expresa en células de la GCL y PGL y es casi imperceptible en las capas MCL y EPL. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. El trazo discontinuo separa las diferentes capas en las que se organiza el OB. GCL capa granular, ML capa mitral, EPL capa plexiforme externa, PGL capa periglomerular. Escala: 75µm.

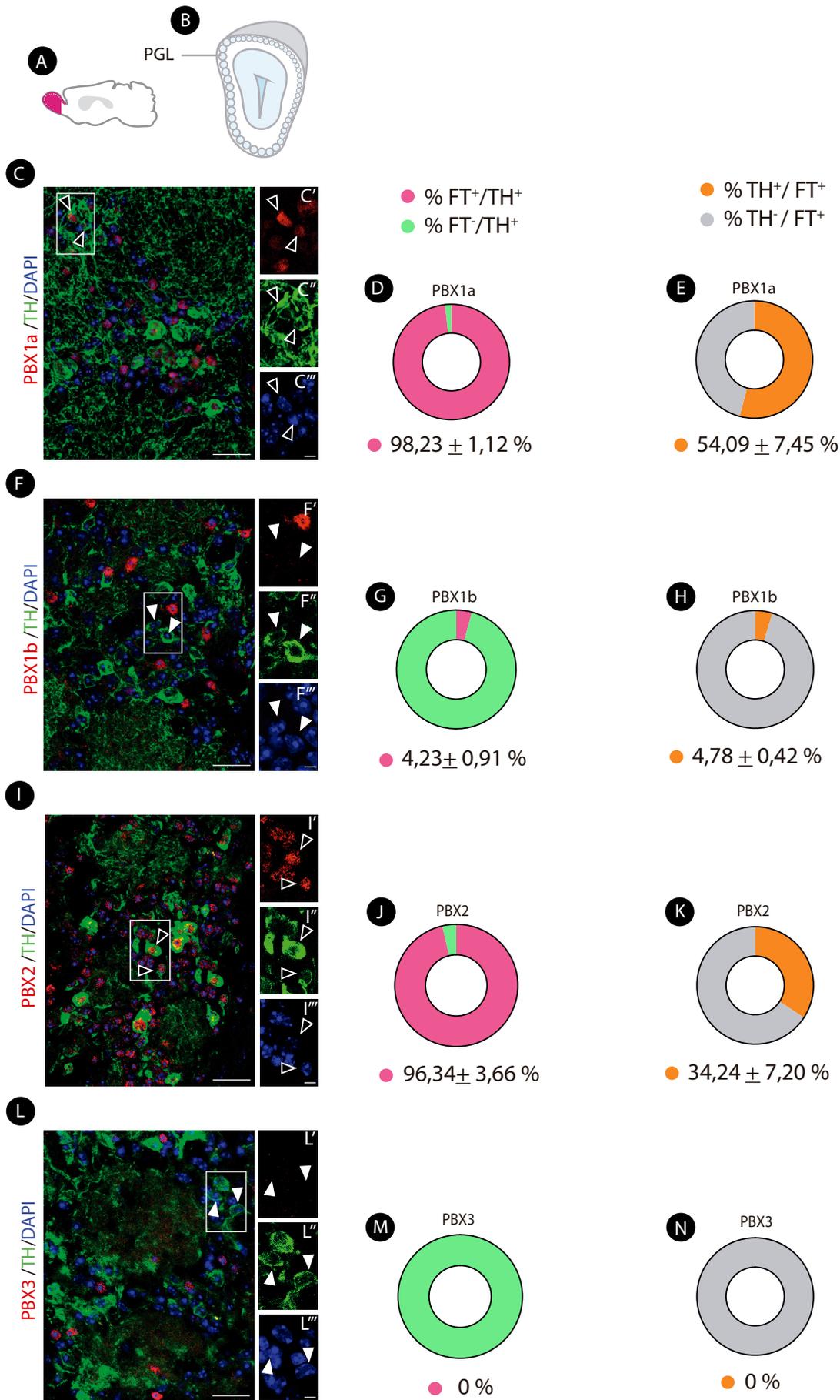
Como el interés principal de esta tesis es el estudio de los factores PBX en relación a su posible papel en diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del bulbo, los experimentos se focalizaron en caracterizar las poblaciones de la PGL puesto que es en esa zona donde se localizan las neuronas DA maduras. En los experimentos que se muestran a continuación se analizó el patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en referencia a las tres subpoblaciones de interneuronas de la PGL: en las neuronas DA y en los otros dos tipos de interneuronas de la PGL las calretininas (CR) y calbindinas (CB).

En primer lugar, para los estudios de expresión en las neuronas DA del BO se realizó una doble inmunohistoquímica fluorescente contra el FT y la Tirosina hidroxilasa (TH), enzima citoplasmática que cataliza el paso de L-tirosina a DOPA (precursor de la DA) y que es comunmente empleada para marcar la población de neuronas DA. TH se expresa en todas las neuronas catecolaminérgicas del sistema nervioso (dopaminérgicas, adrenérgicas y noradrenérgicas), sin embargo, como el BO carece de poblaciones adrenérgicas o noradrenérgicas podemos usar TH como marcador innequivoco de DA del bulbo.

Para llevar a cabo el experimento, se emplearon animales control C57BL6 de dos meses de edad. El análisis por microscopía confocal de las secciones reveló que un alto porcentaje de las neuronas DA del bulbo olfatorio eran positivas para PBX1a (98%) y PBX2 (100%) (Figura R8 D,J). Por el contrario, los recuentos mostraron que tan sólo el 4% de las DA expresaban PBX1b y que ninguna expresaba PBX3 (Figura R8 G,M). El análisis también mostró que ninguno de los FT es exclusivo para neuronas DA. Únicamente la mitad de las células PBX1a+, un 5% de las PBX1b y un 35% de las PBX2+ expresaban TH (Figura R8 E,H,K,N).

**Figura R8: Las neuronas DA del BO expresan PBX1a y PBX2 pero son negativas para PBX1b y PBX3.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del BO se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de BO adulto de ratón donde se indica la capa del BO en la que se tomaron las imágenes. (C, F, I, L) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C), PBX1b (F) PBX2 (I) y PBX3 (L) y TH (verde) de la PGL de una sección coronal del BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. (C) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de TH (verde) y PBX1a (rojo). (C'),(C''),(C''') Ampliación de dos células TH+/PBX1a+. (F) Microfotografía confocal en la que se aprecia como las dopaminérgicas (verde) del BO no expresan PBX1b (rojo). (F'),(F''),(F''') ampliación de dos células TH+/PBX1b-. (I) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de TH (verde) y PBX2 (rojo). (I'),(I''),(I''') ampliación de dos células TH+/PBX2+. (L) Microfotografía confocal en la que se aprecia que las DA del BO son PBX3-

(L'),(L''),(L''') ampliación de dos células TH+/PBX3-. (D,G,J,M) Análisis cuantitativo de la PGL del porcentaje de células positivas para TH (verde) que expresan el FT. (D) El 98,23%  $\pm$  sem 1,12 de las células TH+ expresan PBX1a (n=4). (G) El 4,23%  $\pm$  sem 0,91 de las células TH+ expresan PBX1b (n=4). (J) El 96,34%  $\pm$  sem 3,66 de las células TH+ expresan PBX2 (n=2). (M) El 0% de las células TH+ expresan PBX3 (n=1). (E,H,K,N) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para cada FT (rojo) que expresan TH (verde). (E) El 54,09%  $\pm$  sem 7,45 de las células PBX1a+ expresan TH (n=4). (H) El 4,78%  $\pm$  sem 0,42 de las células PBX1b expresan TH (n=4). (K) El 34,24%  $\pm$  sem 7,20 de las células PBX2+ expresan TH (n=2). (N) El 0% de las células TH+ expresan TH (n=1). Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos blancos de las figuras señalan células TH+/FT-. Los triángulos negros de las figuras señalan células TH+/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25 $\mu$ m en C, F, I, L y 5 $\mu$ m en C', C'', C''', F', F'', F''', I', I'', I''', L', L'', L'''. ▶



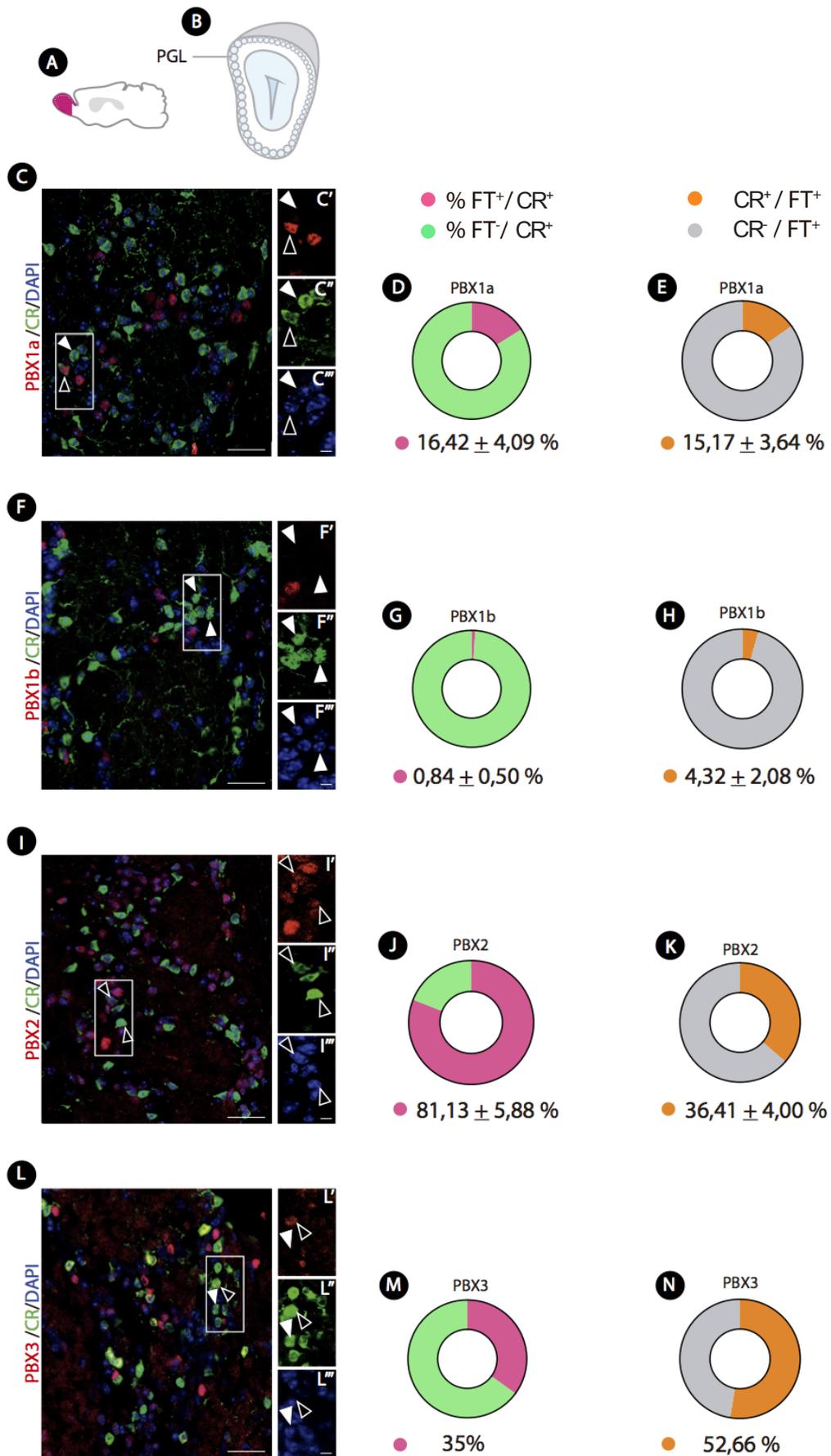
Para los estudios de expresión en la población de calretinininas se realizó una doble inmunohistoquímica fluorescente contra el FT y CR en secciones del BO de animales control C57BL6 de dos meses de edad.

Las imágenes de microscopía confocal de las secciones mostraron que un elevado porcentaje de CR (87%) expresaban PBX2 y en menor cantidad, también expresaban PBX3 (35%) y PBX1a (15%) pero apenas se encontraron CR positivas para PBX1b (1%) (Figura R9 D, G, J, M). Además, los resultados también mostraron que un 15% de la población de células PBX1a+, un 4% de las PBX1b+, un 36% de las PBX2 y un 53% de las PBX3+ era positiva para CR (Figura R9 E, H, K, N).

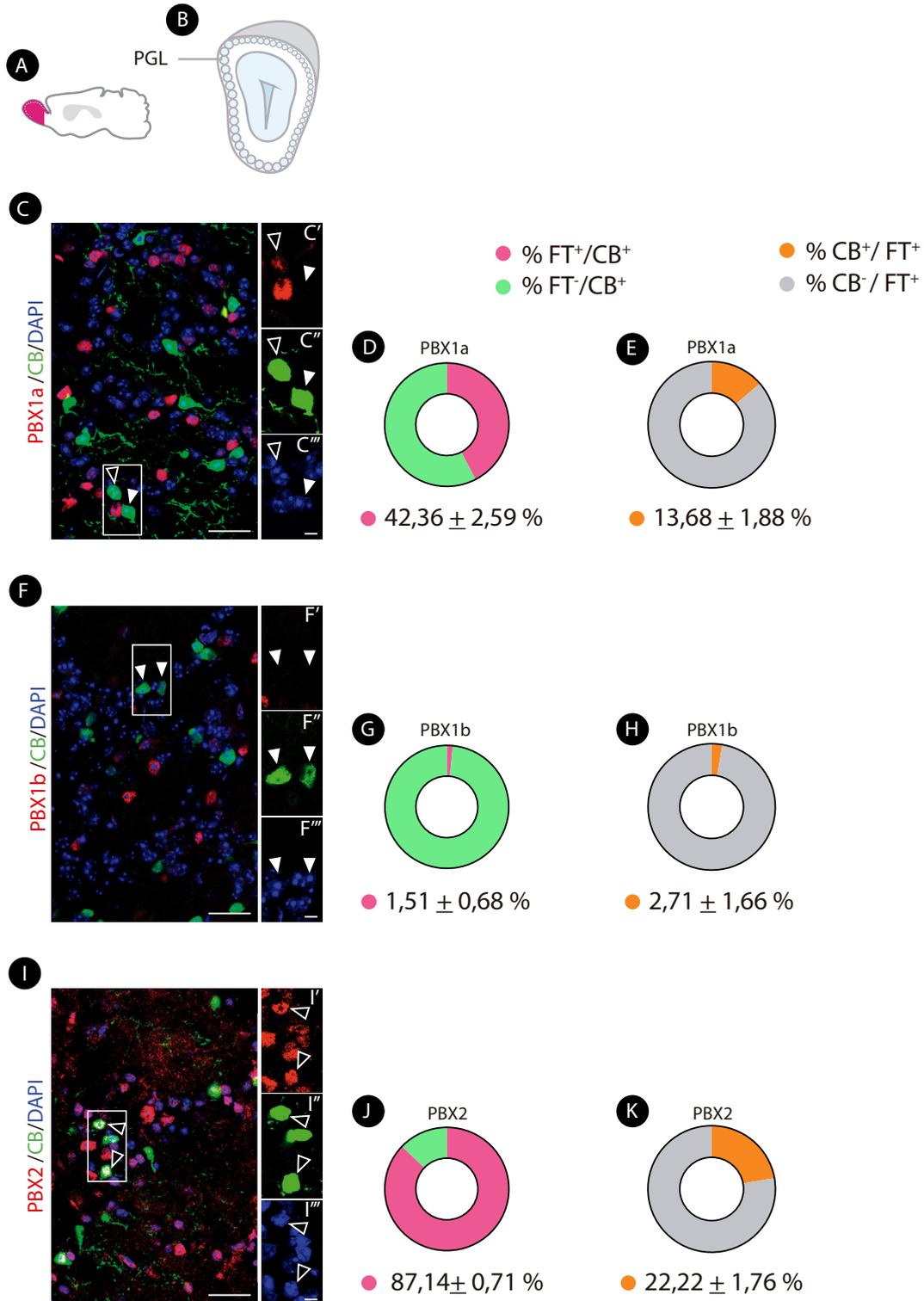
Por tanto, tal y como sucedía con la población dopaminérgica, ninguno de los FT era expresado de forma exclusiva en las neuronas calretinina positivas.

**Figura R9: PBX1a, PBX2 y PBX3 se expresan en células CR positivas.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del BO se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de BO adulto de ratón donde se indica la capa del BO en la que se tomaron las imágenes. (C, F, I, L) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C), PBX1b (F) PBX2 (I) y PBX3 (L) y CR (verde) de la PGL de una sección coronal del BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. -. (C) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de algunas CR (verde) y PBX1a (rojo). (C', C'', C''') ampliación de dos células CR+ una PBX1a+ y otra PBX1a-. (F) Microfotografía confocal en la que se aprecia como las CR (verde) del BO no expresan PBX1b (rojo). (F'),(F''),(F''') ampliación de dos células TH+/PBX1b-. (I) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de CR (verde) y PBX2 (rojo). (I'),(I''),(I''') ampliación de dos células CR+/PBX2+. (L) Microfotografía confocal en la que se aprecia co-localización de algunas células CR+ y PBX3. (L'),(L''),(L''') ampliación de dos

células CR+ una PBX3+ y otra PBX3. (D,G,J,M) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para CR (verde) que expresan el FT. (D) El 16,42%  $\pm$  4,09 de las células CR+ expresan PBX1a (n=4). (G) El 0,84%  $\pm$  sem 0,50 de las células CR+ expresan PBX1b (n=4). (J) El 81,13%  $\pm$  sem 5,88 de las células CR+ expresan PBX2 (n=2). (M) El 35% de las células CR+ expresan PBX3 (n=1). (E,H,K,N) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para cada FT (rojo) que expresan CR. (E) El 15,17%  $\pm$  3,64 de las células PBX1a+ expresan CR (n=4). (H) El 4,32%  $\pm$  sem 2,08 de las células PBX1b+ expresan CR (n=4). (K) El 36,41%  $\pm$  sem 4,00 de las células PBX2+ expresan CR (n=2). (N) El 52,66% de las células CR+ expresan CR (n=1). Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos blancos de las figuras señalan células CR+/FT. Los triángulos negros de las figuras señalan células CR+/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25 $\mu$ m en C, F, I, L y 5 $\mu$ m en (C'),(C''),(C'''), (F'),(F''),(F'''), (I'),(I''),(I'''), (L'),(L''),(L'''). ►



Finalmente, para estudiar el último tipo de interneuronas, se llevó a cabo una doble inmunohistoquímica fluorescente contra el FT y CB en secciones del BO de animales control C57BL6 de dos meses de edad. Tras analizar la imágenes de microscopía confocal se descubrió que las células positivas para CB expresan PBX2 en un alto porcentaje (87%) y que casi la mitad expresaba PBX1a (41%) (Figura R10 J,D). Sin embargo, este tipo de interneuronas no expresaba PBX3 (no mostrado). También se observó que el 14% de las células PBX1a+, 3% de las PBX1b+ y el 22% de las PBX2+ expresaban CB (Figura R10 E, H, K). Por tanto, estos recuentos confirman una vez más que los FT analizados no eran exclusivos ni de DA, ni de CR ni de CB.



En conclusión, el patrón de expresión para los factores PBX1, PBX2 y PBX3 en el sistema del BO en el adulto se resumen en la tabla R1. Los progenitores expresan mayoritariamente y de forma exclusiva PBX1 isoforma b, los neuroblastos migradores mantienen esta expresión pero además encienden la expresión de la isoforma a, por el contrario, las neuronas dopaminérgicas maduras expresan PBX1a y PBX2.

El perfil de expresión de los factores PBX en las interneuronas calretinina positivas no es tan definido como las DA, ya que, aunque la mayoría son PBX2, tan solo un 16% de ellas expresa PBX1a, además hay un porcentaje importante (35%) que expresa PBX3. Igualmente, las interneuronas CB positivas son también heterogeneas en su expresión de factores PBX, como las DA y CR la gran mayoría expresan Pbx2 pero tan solo el 40% expresa PBX1a. Esta heterogeneidad de expresión de factores PBX en CR y CB puede estar reflejando una diversidad de subtipos CR y CB que no ha sido descrita con anterioridad.

**Tabla R1:** Patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en SVZ, RMS y PGL en animales adultos y SVZ, VZ y PGL en animales adultos.

	Progenitores	Neuroblastos migradores		PGL		
	Ki-67	DCX (SVZ)	DCX (RMS)	TH	CR	CB
PBX1a	9,8%	93,76%	97,10%	98,23%	16,42%	42,36%
PBX1b	98,90%	93,19%	98,29%	4,23%	0,84%	41,03%
PBX2	1%	0%	0%	96,34%	81,13%	87,14%
PBX3	0%	0%	0%	0%	35%	0%

◀ **Figura R10: Las células CB+ expresan PBX1a y PBX2 pero son PBX1b negativas.** (A) Diagrama de un cerebro adulto de ratón donde se indica aproximadamente a que altura del BO se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de BO adulto de ratón donde se indica la capa del BO en la que se tomaron las imágenes. (C, F, I) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (C), PBX1b (F) y PBX2 (I) y CB (verde) de la PGL de una sección coronal del BO adulto de animales control C57BL6 de 2 meses. (C) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de algunas CB (verde) con PBX1a (rojo). (C'),(C''),(C''') ampliación de dos células CB+ una PBX1a+ y otra PBX1a-. (F) Microfotografía confocal en la que se aprecia como las CB (verde) del BO no expresan PBX1b (rojo). (F'),(F''),(F''') ampliación de dos células CB+/PBX1b-. (I) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de CB (verde) con PBX2 (rojo). (I'),(I''),(I''') am-

pliación de dos células CB+/PBX2+. (D,G,J) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para CB (verde) que expresan el FT. (D) El 42,36%  $\pm$  2,59 de las células CB+ expresan PBX1a (n=4). (G) El 1,51%  $\pm$  sem 0,68 de las células CB+ expresan PBX1b (n=3). (J) El 87,14%  $\pm$  sem 0,71 de las células CB+ expresan PBX2 (n=2). (E,H,K) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para cada FT (rojo) que expresan CB (verde). (E) El 13,68%  $\pm$  1,88 de las células PBX1a+ expresan CB (n=4). (H) El 2,71%  $\pm$  sem 1,66 de las células PBX1b+ expresan CB (n=3). (K) El 22,22%  $\pm$  sem 1,76 de las células PBX2+ expresan CB (n=2). Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos blancos de las figuras señalan células CB+/FT-. Los triángulos negros de las figuras señalan células CB+/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25 $\mu$ m en C, F, I y 5 $\mu$ m en C', C'', C''', F', F'', F''' I', I'', I'''.

## 1.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en cerebro de ratones neonatos (P0)

Como se ha explicado en la Introducción, una parte de las neuronas dopaminérgicas del BO se generan durante el desarrollo embrionario y expresan TH desde estadios postnatales tempranos (P0). Las neuronas DA embrionarias, tienen su origen en la eminencia ganglionar dorso lateral de la zona subventricular (Hinds JW, 1968), estructura anatómica que da lugar a la SVZ en el adulto, y curiosamente, los progenitores DA adultos también se localizan en la zona dorsal de la SVZ .

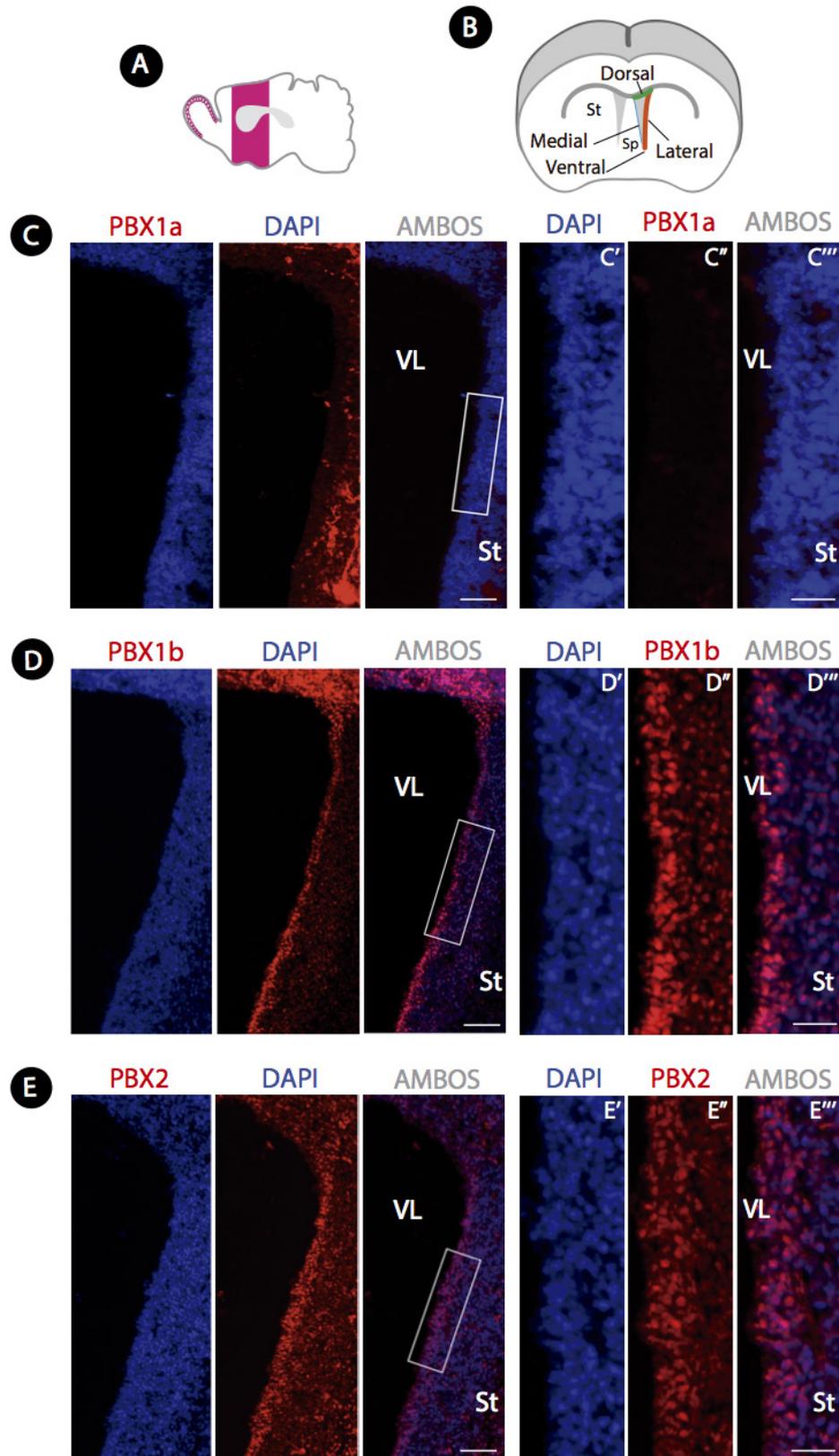
Aunque a P0 las eminencias ganglionares (Eminencia Ganglionar Lateral y Medial) ya no pueden distinguirse de forma separada la SVZ tampoco ha finalizado su proceso de maduración por tanto, se consideró interesante estudiar si los miembros de la familia de los PBX expresados en SVZ adulta mostraban un patrón de expresión similar a P0.

### 1.2.1. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la zona ventricular y subventricular de una SVZ inmadura

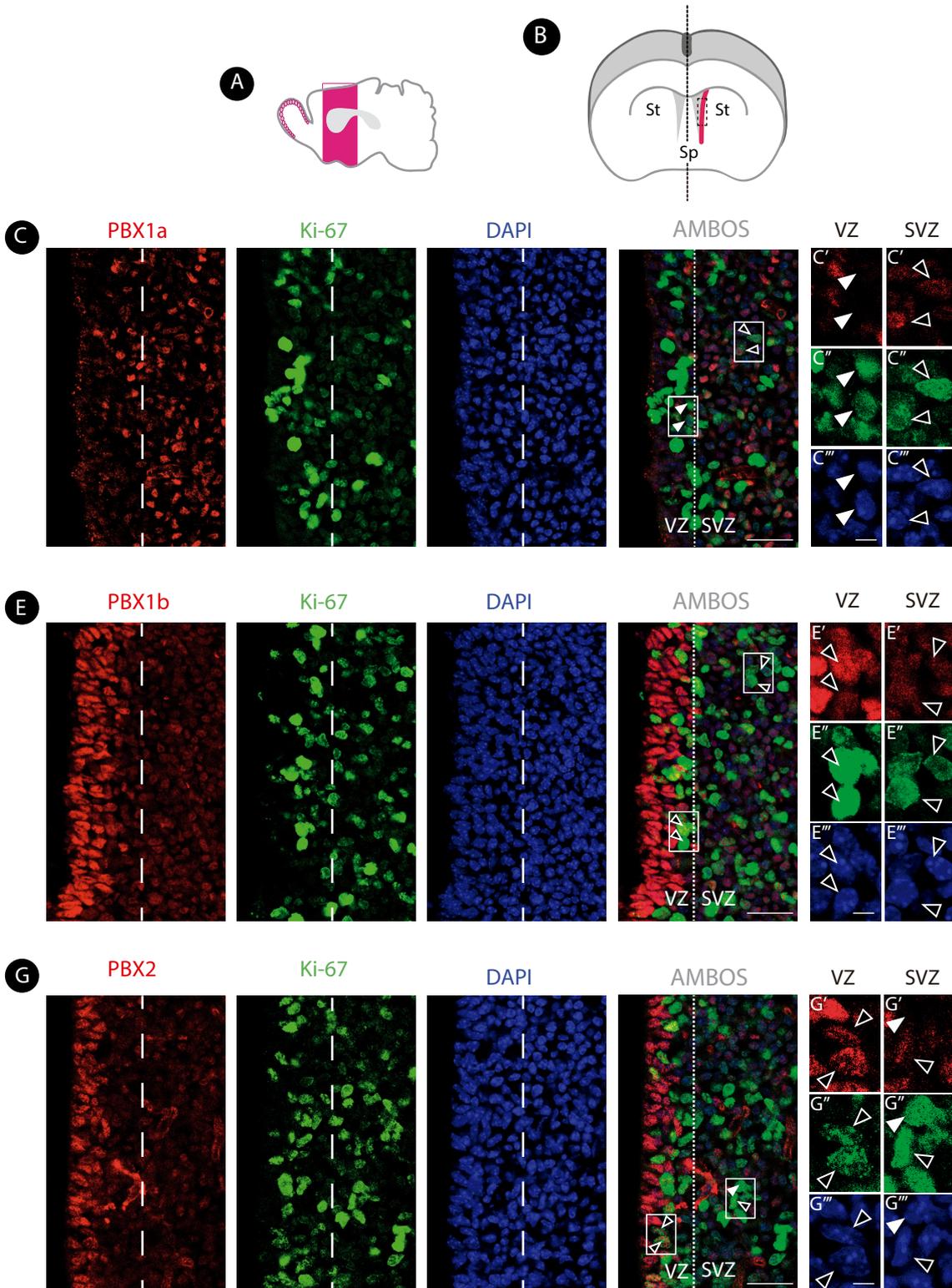
Para llevar a cabo los experimentos, se realizó una inmunohistoquímica fluorescente contra los miembros de la familia PBX (PBX1a, PBX1b y PBX2) en secciones de SVZ de ratones control C57BL6 neonatos. Tal y como muestra la Figura R11, la zona del ventrículo lateral fue dividida en dos sub-zonas: la VZ (zona ventricular), más cercana al ventrículo y formada por una estructura de epitelio pseudoestratificado y la SVZ (zona subventricular), zona más cercana al estriado, para facilitar su análisis. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que los tres FT analizados se expresaban pero con distintos patrones de expresión. PBX1b y PBX2 se expresan en ambas zonas sin embargo, es en la VZ donde se aprecia una mayor intensidad (Figura R11 D, E). Por el contrario, PBX1a se expresa en células de la SVZ pero apenas se detectan células positivas para el FT en la VZ Figura R11 C).

**Figura R11: PBX1a, PBX1b y PBX2 se expresan en VZ y SVZ a P0.** (A) Diagrama de un cerebro de ratón a P0 donde se indica aproximadamente a que altura de la SVZ se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de un cerebro de ratón a P0 donde se representan las diferentes regiones de la SVZ (verde) dorsal; (naranja) lateral y ventral; (azul) medial. Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008. (C, D, E) Imagen panorámica de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción PBX1a, PBX1b y PBX2 respecti-

vamente (rojo) de una sección coronal de la SVZ de animales control C57BL6 a P0. (C) PBX1a (rojo) se expresa en células de la SVZ y sólo en algunas de la VZ. PBX1b (rojo) (D) y PBX2 (rojo) (E) se expresan en ambas regiones y los dos muestran mayor intensidad en las células de la VZ. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 100µm en C, D, E y 25µm en C', C'', C''', D', D'', D''', E', E'', E'''. LV ventrículo lateral, St estriado, VZ zona ventricular, SVZ zona subventricular. ►

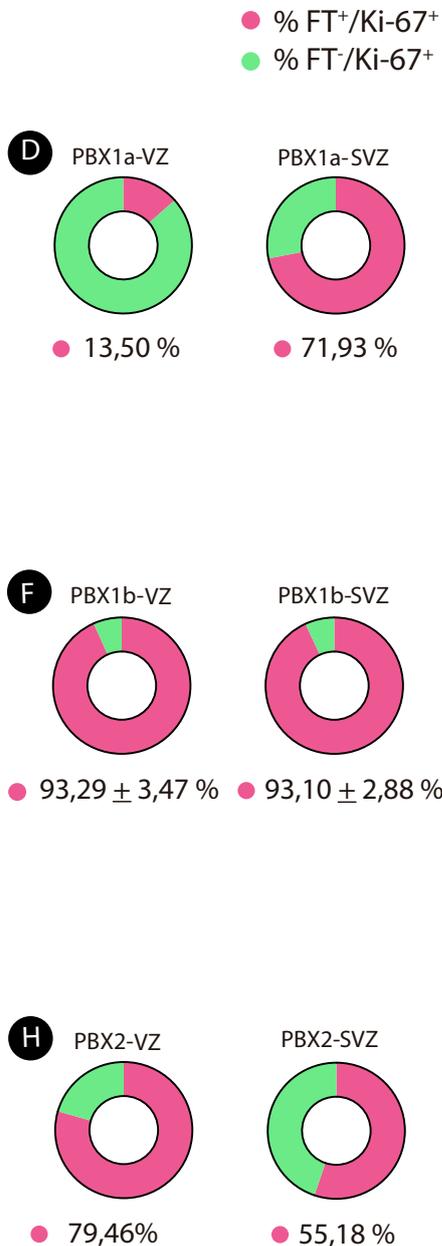


A continuación, se analizó si la señal de los FT estudiados anteriormente co-localizaba con el marcador de proliferación Ki-67 en el ventrículo lateral de neonatos. Para ello se realizó una doble inmunohistoquímica de fluorescencia contra cada uno de los FT y Ki-67 en secciones de la SVZ de animales P0 (Figura R12).



Los recuentos de las inmunotinciones revelaron que PBX1a tan sólo co-localizaba en un 10% de las células proliferantes de la VZ y en un 72% en las de la SVZ (Figura R12 D). Sin embargo, alrededor del 100% de las células positivas para Ki-67 co-expresaban PBX1b tanto en VZ como en SVZ (Figura R12 F). Finalmente, los análisis mostraron que un 79% de la población de células proliferantes de la VZ expresaban PBX2 mientras que en la zona subventricular lo expresaban un 55% (Figura R12 H).

Por tanto, no solo parece que los progenitores neonatales expresan un complemento distinto de factores PBX que en el adulto (además de PBX1b expresan en distinta medida PBX1a y PBX2) sino que además, la expresión de factores PBX es distinta según los progenitores neonatales se encuentren en la VZ o la SVZ dando una idea de nuevo de heterogeneidad de poblaciones.



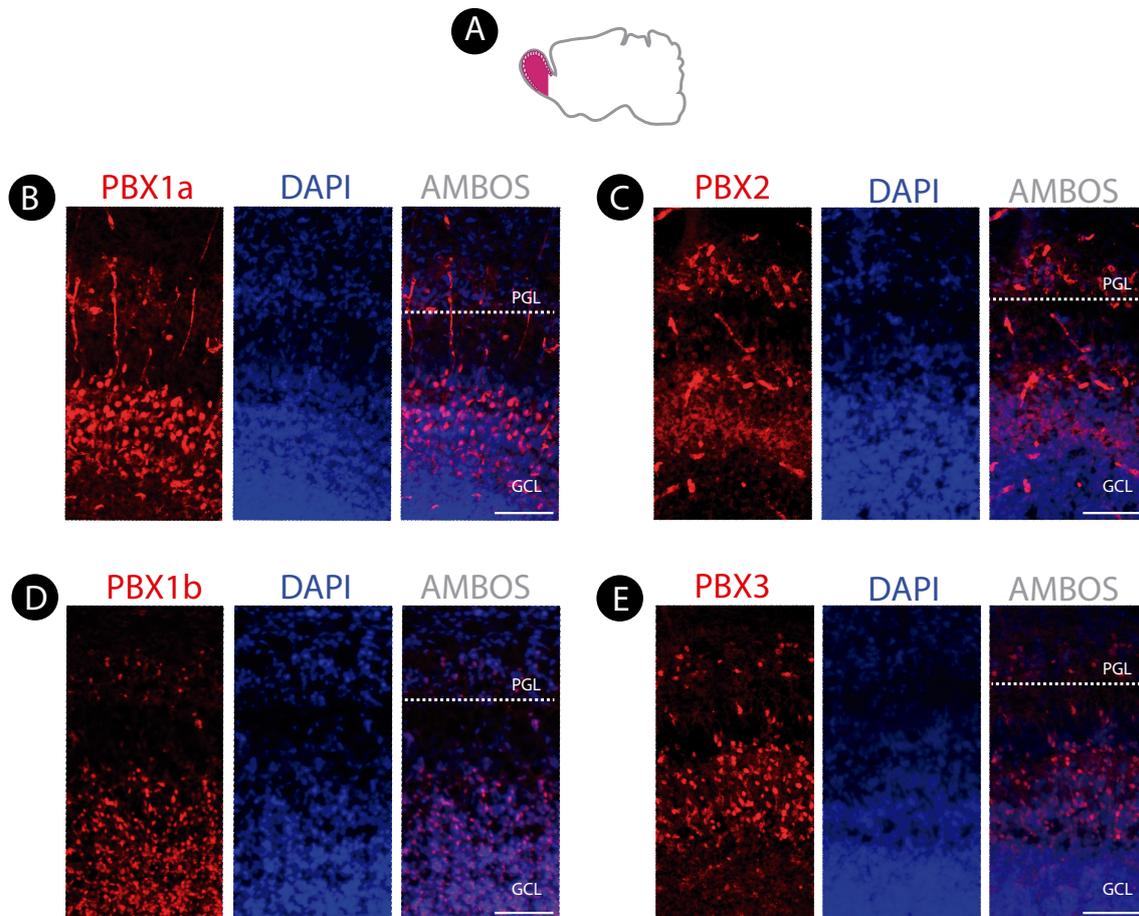
◀ **Figura R12: Los progenitores neonatales de la VZ y SVZ expresan un complemento distinto de factores PBX.** (A) Diagrama de un cerebro de ratón a P0 donde se indica aproximadamente a que altura de la SVZ se tomaron las imágenes. (B) Diagrama de una sección coronal de cerebro a P0 de ratón donde se indica mediante trazo discontinuo la región aproximada de la SVZ en la que se tomaron las imágenes. Modificado de Alvarez-Buylla y cols., 2008. (C, E, G) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción PBX1a (rojo) (C), PBX1b (rojo) (E) y PBX2 (rojo) (G) y Ki-67 (verde) de una sección coronal de la SVZ de animales control C57BL6 a P0. (C) Microfotografía confocal donde se muestra un reducido numero de células ki-67 (verde) positivas para PBX1a (rojo) en la región VZ y un incremento de co-localización en SVZ. (C'),(C''),(C''') ampliación de dos células Ki-67+/PBX1a+. Microfotografía confocal de la SVZ y VZ en la que puede observarse el elevado número de células Ki-67 (verde) que expresan PBX1b (rojo). (E'),(E''),(E''') ampliación de dos células Ki-67+/PBX1b+. (G) Microfotografía confocal donde se muestra la co-localización de las células en proliferación (verde) y PBX2 (rojo) de la SVZ y la ligera disminución del número de células Ki-67+ (verde) que expresan PBX2 (rojo) en VZ. (G'),(G''),(G''') ampliación de dos células Ki-67+ una PBX2+ y otra PBX2-. El trazo discontinuo separa la región ventricular de la subventricular. (D,F,H) Análisis cuantitativo de la región lateral de la SVZ del % de células positivas para Ki-67 que co-localizan con cada FT. (D) El 13,50% de las células Ki-67+ de la VZ (n=1) y el 72% de la SVZ expresan PBX1a (n=1). (F) El 93,29% ± sem 3,47 de las células ki67+ de la VZ (n=2) y el 93,10% ± sem 2,88 de la SVZ expresan PBX1b (n=2). (H) El 79,46% de las células Ki-67+ de la VZ (n=1) y el 55,18% de la SVZ expresan PBX2 (n=1). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos blancos de las figuras señalan células Ki-67+/FT-. Los triángulos negros de las figuras señalan células Ki-67+/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul.Escala: 25µm en C, E, G y 5µm en C', C'', C''', E', E'', E''', G', G'', G'''. SVZ zona subventricular, VZ zona ventricular.

### **1.2.2. Estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio**

Tal y como sucede con la SVZ, el BO de ratones neonatos no ha adquirido su completa maduración y las capas no están todavía totalmente estructuradas. No obstante, se decidió analizar si la expresión de los miembros de la familia PBX mostraba patrones de expresión similares a los de adulto.

Para el estudio se realizó una inmunohistoquímica fluorescente contra los miembros de la familia PBX (PBX1a, PBX1b, PBX2 Y PBX3) en secciones de BO de ratones control C57BL6 neonatos (Figura R13). Los resultados mostraron que todos ellos se expresan en el BO con patrones de expresión muy similares a los observados en adulto a excepción de PBX3 que se expresa en neuronas DA en neonatos pero no en adultos.

En cuanto a PBX1a, como puede apreciarse en la Figura R13 B, se expresa en un elevado número de células de la GCL y en menor número en la PGL. PBX1b también se expresa de forma generalizada en la capa GCL y de forma más reducida en la PGL (Figura R13 D). El análisis para PBX2 muestra que, como en el caso de PBX1b se expresa en la capa GCL. Además, PBX2 se expresa de forma muy pronunciada en la PGL (Figura R13 C). Finalmente, PBX3 con un patrón de expresión similar al de PBX1b exhibe una abundante expresión en GCL, y en un modesto número de células positivas en la PGL (Figura R13 E).



▲ **Figura R13: PBX1a, PBX1b, PBX2 y PBX3 se expresan en las diferentes capas del BO a P0.** (A) Diagrama de un cerebro de ratón neonato donde se indica aproximadamente a qué altura del BO se tomaron las imágenes. (B-E) Imagen panorámica de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción PBX1a (rojo) (B), PBX1b (rojo) (D), PBX2 (rojo) (C) y PBX3 (rojo) (E) respectivamente de una sección coronal de BO de animales control C57BL/6 a P0. (B) PBX1a se ex-

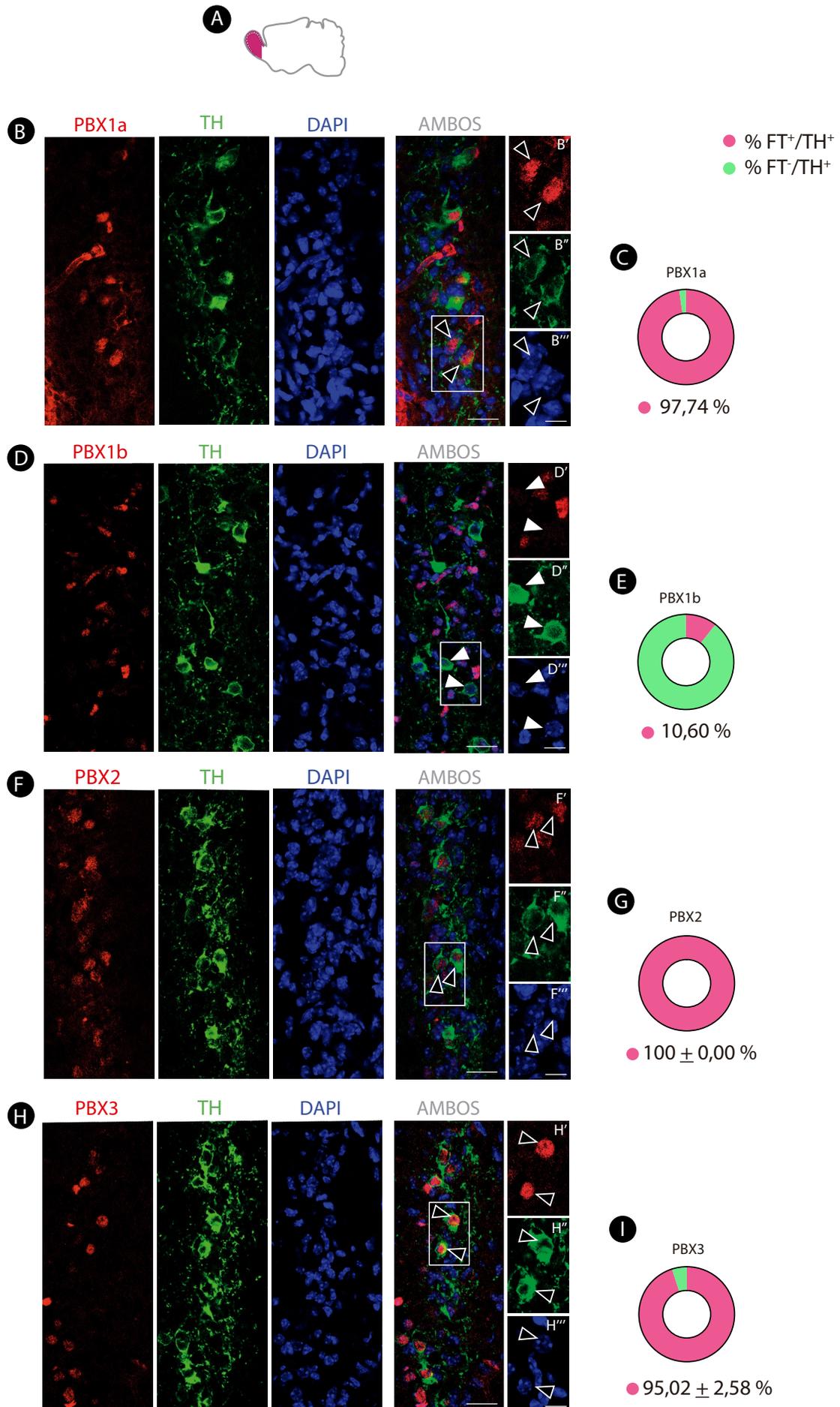
presencia en un elevado número de células de la GCL y en menor número en PGL. (C) PBX2 se expresa en un elevado número de células de la GCL y PGL. (D) Las capas GCL y PGL muestran un alto número de células positivas para PBX1b. (E) PBX3 se expresa con intensidad en las capas PGL y GCL. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 100µm. El trazo discontinuo separa las diferentes capas en las que se organiza el OB. GCL: capa granular y PGL: capa periglomerular.

Además, también se analizó el patrón de expresión de los FT en las neuronas DA del BO en animales neonatos con el objetivo de comparar su expresión con la observada en animales adultos. (Figura R14).

Tras el recuento de las imágenes de microscopía confocal se observó que los patrones de expresión de PBX1a, PBX1b y PBX2 eran muy similares a los de adulto (97%, 10%, y 100% respectivamente) sin embargo, PBX3 modificó por completo sus porcentajes, si bien en adulto las DA del BO no expresaban el FT, ahora, un 95% de las células DA en animales neonatales son positivas para PBX3 (Figura R14 D, F, H, J).

**Figura R14: Las neuronas DA del BO a P0 expresan PBX1a, PBX2 y PBX3 pero no PBX1b.** (A) Diagrama de un cerebro de ratón neonato donde se indica aproximadamente a que altura del BO se tomaron las imágenes. (B, D, F, H) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de los factores de transcripción (rojo) PBX1a (B), PBX1b (D) PBX2 (F) y PBX3 (H) y TH (verde) de la PGL de una sección coronal del BO de animales control C57BL6 a P0. (B) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de TH (verde) y PBX1a (rojo). (B'),(B''),(B''') ampliación de dos células TH+/PBX1a+. (D) Microfotografía confocal en la que se aprecia como las dopaminérgicas (verde) del BO no expresan PBX1b (rojo). (D'),(D''),(D''') ampliación de dos células TH+/PBX1b-. (F) Microfotografía confocal en la que se muestra la co-localización de TH (verde) y PBX2 (rojo). (F'),(F''),(F''') ampliación de dos cé-

lulas TH+/Pbx2+. (H) Microfotografía confocal en la que se aprecia que las DA del BO también son PBX3+. (H'),(H''),(H''') ampliación de dos células TH+/PBX3+. (C, E, G, I) Análisis cuantitativo de la PGL del % de células positivas para TH (verde) que expresan el FT. (C) El 97,74% de las células TH+ expresan PBX1a (n=1). (E) El 10,60% de las células TH+ expresan PBX1b (n=1). (G) El 100%  $\pm$  sem 0,00 de las células TH+ expresan PBX2 (n=2). (I) El 95,02%  $\pm$  2,58 sem de las células TH+ expresan PBX3 (n=3). Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del número de células doble positivas. Los triángulos blancos de las figuras señalan células TH+/FT-. Los triángulos negros de las figuras señalan células TH+/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5 $\mu$ m en C, E, G, I y 6,25 $\mu$ m en C', C'', C''', E', E'', E''', G', G'', G''', I', I'', I'''. ►



## 2 ANÁLISIS DE LAS NEURONAS DA DEL BO A E17,5 EN MUTANTES *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*; *Nestin-CRE*

Nuestros resultados del estudio del patrón de expresión de los miembros de la familia PBX revelaron que las neuronas DA del OB de animales adultos expresaban tanto PBX1a como PBX2. Por tanto, el siguiente paso fue estudiar si ratones mutantes para estos factores muestran defectos en la población dopaminérgica del bulbo. Los mutantes convencionales (knock out) para PBX1 mueren alrededor del día embrionario 15 por hipoplasia o aplasia severa de múltiples órganos, (Selleri *et al.*, 2001), por tanto para poder estudiar la función de PBX1 en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio se tuvieron que analizar mutantes condicionales, en los que en ambos alelos *Pbx1* el exón 3 se encuentra flanqueado por secuencias LoxP reconocidas por la CRE- recombinasa (detallado en Material y Métodos).

Como primera opción, se decidió usar ratones transgénicos que expresaban la CRE-recombinasa bajo el promotor de *Nestina*. La *Nestina* es un filamento intermedio del tipo VI que se expresa en progenitores neurales del sistema nervioso central y periférico desde estadios embrionarios tempranos (E7,75) (Dahlstrand *et al.*, 1995). Decidimos llevar a cabo esta estrategia ya que así evitamos los efectos de la falta de PBX1 en otros órganos, y pensábamos que seríamos capaces de analizar animales adultos.

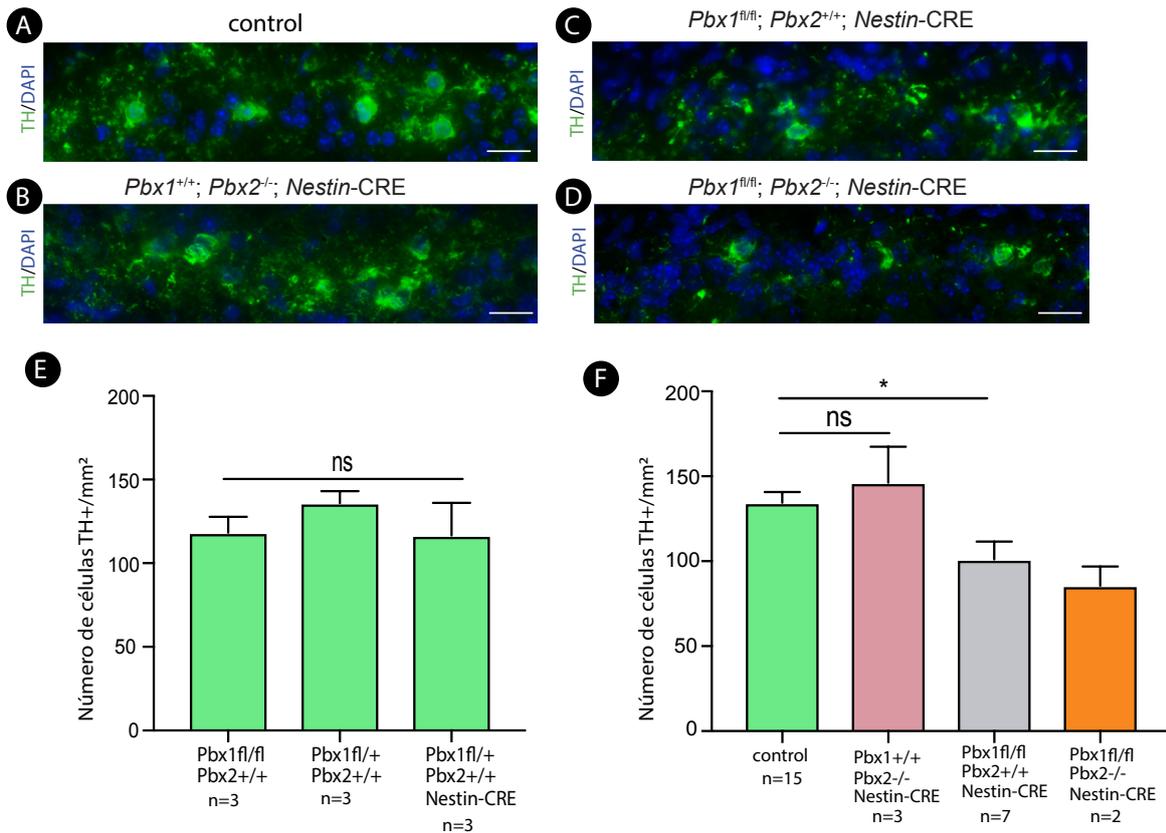
Sin embargo, desafortunadamente, los ratones *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Nestin-CRE* mostraron letalidad en estadios perinatales. En nuestros análisis de expresión observamos que PBX1 se expresa de forma muy generalizada en el sistema nervioso, incluyendo corteza cerebral, hipotálamo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal. Es posible que su papel sea fundamental para la correcta especificación de algunas de estas poblaciones (o del SN periférico) lo que explicaría la letalidad perinatal. Por tanto, aunque esta estrategia no nos permitió analizar animales adultos, se analizaron en el último día de gestación (E17,5).

Para estudiar la función de PBX2 se recurrió al KO convencional puesto que estos son viables y alcanzan la vida adulta. Se ha descrito que en ocasiones los miembros de la familia PBX pueden ser redundantes y sólo el doble mutante muestra fenotipo (Selleri *et al.*, 2004). Como las neuronas dopaminérgicas del BO expresan tanto PBX1 como PBX2 decidimos también analizar animales dobles mutantes.

Además, aunque no se han descrito fenotipos asociados a la mera presencia de los sitios LoxP flanqueando el exón 3 de PBX1, quisimos analizar si esto era así en nuestro sistema y también si los animales heterocigotos con un único alelo para *Pbx1* presentaban fenotipo *per se*. Con este fin comparamos el número de TH+ en la PGL de cada genotipo. Tras analizar el número de neuronas DA del BO en animales con los dos alelos del gen *Pbx1* flanqueados por secuencias LoxP (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*), con sólo un alelo flanqueado (*Pbx1<sup>fl/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*) y heterocigotos para *Pbx1* (*Pbx1<sup>fl/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*; *Nestin-CRE*) se observó que no existían diferencias significativas entre ellos, por tanto cualquiera de estos genotipos fueron considerados como animales control en los experimentos. (Figura R15 E) .

## 2.1. Cuantificación de células positivas para TH proteína del BO a E17,5 en mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*; *Nestin-CRE*

Para estudiar posibles defectos en la población de neuronas DA del OB de animales mutantes para PBX1 y PBX2 se llevó a cabo una cuantificación del número de células TH positivas de la PGL. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia contra la enzima TH en secciones coronales de OB de animales control, mutantes para PBX1, PBX2 y dobles mutantes de E17,5 días de gestación. (Figura R15).



▲ **Figura R15: Los mutantes condicionales para PBX1 *Nestin-CRE* muestran una reducción del número de neuronas DA del BO a E17,5.** (A-D) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de TH (verde) de una sección coronal de la PGL del BO a E17.5 de animales control (A), animales mutantes para PBX2 (B), mutantes para PBX1 (C) y dobles mutantes (D). (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para TH (verde) del BO en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>* ( $118,30 \pm 0,10$ ;  $n=3$ ), *Pbx1<sup>fl/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>* ( $135,80 \pm 0,07$ ;  $n=3$ ) y *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*; *Nestin-CRE* ( $166,60 \pm 0,20$ ;  $n=3$ ). (F) Cuantificación del número promedio de células positivas para TH (verde) del BO en animales control, mutantes para PBX2, mutantes

para PBX1 y dobles mutantes. El número de células obtenido en animales mutantes para PBX2 ( $146,20 \pm 0,21$ ;  $n=3$ ) no presentaba diferencias significativas respecto a los controles ( $134,40 \pm 0,06$ ;  $n=15$ ). La cuantificación de los mutantes para PBX1 ( $101,1 \pm 0,10$ ;  $n=7$ ) muestra una reducción en el número de neuronas DA de la PGL en comparación a los animales control. Además los dobles mutantes ( $85,5 \pm 0,11$ ;  $n=2$ ) aunque no pueden analizarse estadísticamente, mantuvieron un número similar al de los mutantes simples para PBX1. Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de células TH positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$ . La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 40 $\mu$ m.

Tras el análisis por microscopía confocal de las secciones se observó que no existían diferencias significativas entre los animales control y los mutantes para PBX2. Por el contrario, animales mutantes para PBX1 presentan una reducción en el número de neuronas TH positivas. Este defecto no parece incrementarse de forma significativa en los animales dobles mutantes (aunque nuestra n en este caso se limita a dos animales con lo que no podemos establecer si hay diferencias estadísticamente significativas o no) (Figura R15 F). Por tanto, PBX1 parece necesario para una correcta especificación de neuronas DA del BO mientras que PBX2 parece prescindible.

## 2.2. Cuantificación de células positivas para mRNA de *Th* del BO a E17,5 en mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Nestin-CRE*

Tras observar que los mutantes para PBX2 no mostraban fenotipo y que los dobles mutantes no incrementaban de forma destacada el fenotipo de PBX1, los estudios posteriores se han centrado en el mutante simple PBX1.

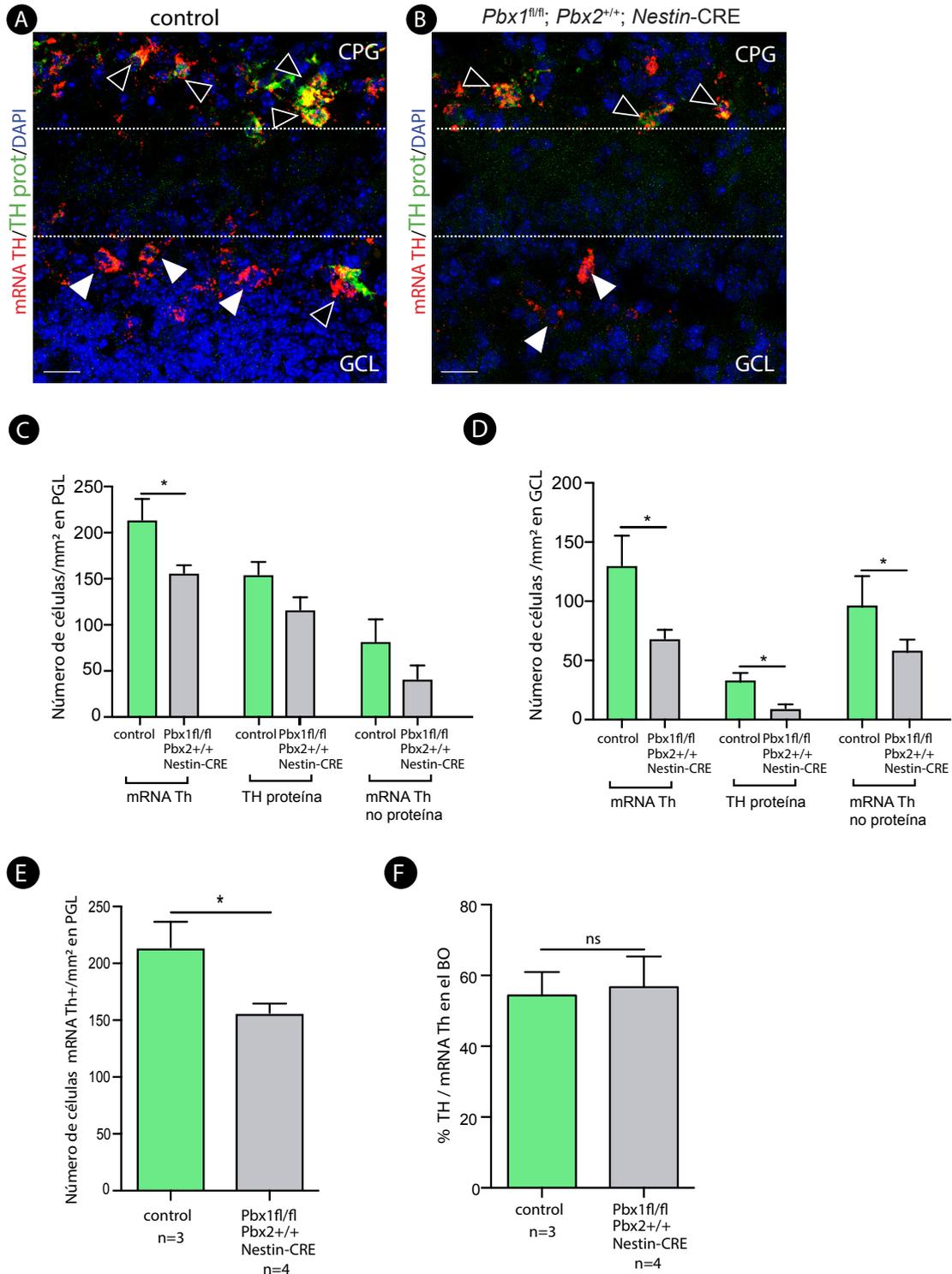
Se ha descrito que, en el bulbo olfatorio, la expresión de la proteína TH no correlaciona totalmente con el ARN mensajero de *Th* pudiéndose encontrar células *Th* positivas en la capa granular externa, donde no se detectan células TH positivas (Baker *et al.*, 1993). Para caracterizar mejor este fenómeno, realizamos una doble tinción con inmunohistoquímica para TH e hibridación *in situ* para mRNA de *Th*.

Nuestros experimentos no solo reproducen los resultados ya publicados sino que, además, observamos que también existen células *Th* mRNA positivas pero TH proteína negativas en la capa periglomerular (Figura R16). Por tanto, nos interesó estudiar si PBX1 participa en la regulación de la expresión del gen *Th* y/o en la traducción del mensajero a TH proteína.

**Figura R16: El número de células positivas para el mRNA de *Th* y TH proteína disminuye en mutantes para *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Nestin-CRE*.** (A, B) Imagen panorámica de microscopía confocal de la *in situ* para TH (rojo) y de la inmunohistoquímica para TH (verde) de una sección coronal del OB a E17.5 de animales control (A) y animales mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*; *Nestin-CRE*) (B). (C) Cuantificación del número promedio de células positivas para mRNA de *Th* (rojo) en controles ( $214,20 \pm 0,23$ ; n=3) en mutantes para PBX1 ( $156,50 \pm 0,08$ ; n=4), de células positivas para TH proteína en controles ( $154,6 \pm 0,14$ ; n=3) y mutantes PBX1 ( $116,50 \pm 0,13$ ; n=4) y de células positivas para mRNA y negativas para proteína de TH en controles ( $82,20 \pm 0,24$ ; n=3) y mutantes para PBX1 ( $41,30 \pm 0,15$ ; n=4), de la PGL. (D) Cuantificación del número promedio de células positivas para mRNA de *Th* (rojo) en controles ( $130,40 \pm 0,25$ ; n=3) en mutantes para PBX1 ( $68,60 \pm 0,07$ ; n=4), de células positivas para TH proteína en controles ( $33,80 \pm 0,08$ ; n=3) y mutantes PBX1 ( $9,60 \pm 0,03$ ; n=4) y de células po-

sitivas para mRNA y negativas para proteína de TH en controles ( $97 \pm 0,26$ ; n=3) y mutantes para PBX1 ( $59 \pm 0,10$ ; n=4) de la GCL. Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de células mRNA *Th* positivas, TH proteína positivas y mRNA+ proteína de TH negativas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para mRNA de *Th* (rojo) en la PGL. (F) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para mRNA *Th* que expresan TH proteína en el BO. El  $54,36 \% \pm 6,58$  sem de las células mRNA *Th* + en controles expresan TH proteína (n=3) y en los mutantes para PBX1 el  $56,73 \% \pm 8,61$  sem (n=4) T-Student de dos colas: \* p < 0,05 en C. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05 en D y E. El trazo discontinuo separa las diferentes capas en las que se organiza el OB. GCL capa granular, PGL capa periglomerular. Los triángulos blancos indican células positivas para el mRNA de *Th*. Los triángulos negros indican células positivas para el mRNA y proteína de TH. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5 $\mu$ m. ►

Para ello se realizó la técnica de hibridación *in situ* seguida de una inmunohistoquímica para TH en animales control y mutantes para PBX1. Dado que el mRNA de *Th* se detecta en capas más profundas a la PGL para este análisis se analizó todo el BO (Figura R16). Debido a que el BO a este estadio aún no ha adquirido su completa maduración, las capas no están totalmente estructuradas y por ello, se decidió dividir el OB en dos únicas capas: la PGL y la GCL para su análisis.



Además, en los experimentos también se analizaron células TH positivas que a diferencia de lo descrito en adultos, pueden detectarse en la PGL pero también en la región más superficial de la GCL de animales embrionarios a 17,5.

Las imágenes de microscopía confocal revelaron que los mutantes para PBX1 exhibían un número menor de células positivas para el mRNA de *Th* en comparación a los animales control tanto en la PGL como en la GCL (Figura R16 C, D, E). Los resultados también mostraron una disminución en el número de células doble positivas para mRNA y proteína de TH en la PGL en animales mutantes para PBX1 pero debido al reducido número de la muestra y la variabilidad entre animales las diferencias no fueron significativas (no mostrado). Sin embargo, tal y como se observa en la Figura R15, del experimento anterior, al incrementar el número de la muestra las diferencias en el número de células TH positivas entre controles y mutantes fueron significativas.

Finalmente, la cuantificación del número de células positivas para el mRNA y negativas para la proteína de TH reveló una disminución en animales mutantes tanto en la capa PGL como en la GCL (Figura R16 C, D). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células TH positivas respecto del total de células mRNA *Th* del BO indicando que la proporción de mRNA *Th* que se traduce a TH proteína se mantiene entre animales control y mutantes lo que sugiere que PBX1 no participaría en el bloqueo de la traducción del mensajero a TH proteína sino en la transcripción del gen.

En conjunto, estos resultados sugieren que PBX1 es necesario para una correcta transcripción del gen *Th* pero no para su traducción, sin embargo, como PBX1 se expresa en progenitores y en nuestro modelo animal deletamos *Pbx1* de forma temprana también en progenitores, una explicación alternativa e igualmente posible es que PBX1 es necesario para la proliferación de los progenitores que dan lugar a las células DA.

### 3 ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DA DEL BO EN MUTANTES *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>; TH-ires-CRE*

Los resultados obtenidos con la cepa *Nestin-CRE* sugerían que PBX1 era importante para la generación y/o diferenciación de las neuronas DA embrionarias del OB, sin embargo, por una parte la letalidad temprana nos impedía estudiar el papel de PBX1 en diferenciación DA en adultos, y por otra, la delección de *Pbx1* desde estadios tempranos en progenitores nos impedía diferenciar entre el papel de PBX1 en proliferación versus diferenciación. Por tanto se planteó una segunda estrategia y se utilizó una nueva línea de ratones que expresaban la CRE recombinasa en el locus endógeno de Tirosina hidroxilasa. A diferencia de la línea *Nestin-CRE* la línea TH-ires-CRE (TH-CRE) tiene una expresión mucho más restringida en el espacio y en el tiempo. Por una parte su expresión queda limitada a células catecolaminérgicas (que expresan TH), por otra, al ser un marcador terminal, esta nueva estrategia mantiene intacta la expresión de PBX1 en progenitores y neuroblastos en migración. Al usar el locus de un marcador terminal, lo esperado sería que *Pbx1* se deplecionara tras la diferenciación DA, y por tanto, más que analizar un papel de PBX1 en establecimiento del fenotipo DA estaríamos estudiando su papel en mantenimiento del destino celular correcto. Sin embargo, existen algunas evidencias de que el gen de la *Th* podría expresarse en las neuronas del linaje DA en estadios muy tempranos de su diferenciación: por una parte, experimentos de hibridación *in situ* para *Th* en el laboratorio han demostrado que en la región más superficial de la capa granular existen células que expresan el mRNA de *Th* y por otra parte en animales transgénicos TH-GFP se detecta GFP en capas más profundas a la PGL y en otras poblaciones del bulbo. Por tanto, lo primero fue caracterizar la expresión de la TH-CRE en el bulbo y que linajes celulares se ven afectados.

#### 3.1. Análisis de la expresión de la CRE recombinasa en la línea knock in TH-ires-CRE en el BO de animales adultos

Con el objetivo de caracterizar la expresión de la CRE recombinasa se generó una nueva cepa de animales mediante el cruce de los animales de la cepa TH-ires-CRE con la línea reportera RCE. Estos ratones tienen insertada la proteína verde de fluorescencia aumentada (eGFP del inglés enhancedGFP) en el locus del gen Rosa26 precedida por una secuencia STOP flanqueada por sitios LoxP. Por tanto, en presencia de la CRE recombinasa, la secuencia STOP es escindida y la eGFP puede expresarse. De modo que las células que en algún momento han expresado el gen *Th* quedan permanentemente marcadas con la proteína verde fluorescente (Figura R17 A).

En primer lugar, tal y como se esperaba, se detectaron células GFP+ en la PGL y que todas las células TH son GFP. Sin embargo, el número de células positivas para GFP era visiblemente superior al número de células TH positivas lo que sugería que otros tipos celulares además de las DA expresaban o habían expresado la CRE recombinasa. Por ello, se realizaron dobles inmunohistoquímicas para GFP y los otros dos tipos de interneuronas de la PGL: calretinina y calbindina pero el análisis no mostró co-localización del GFP en ninguna de las dos poblaciones. También se observaron células GFP+ TH proteína negativas en la zona más superficial de la granular, curiosamente, un porcentaje importante de

las células GFP de esta capa co-localizan con una la proteína calretinina. Estos resultados coinciden en parte con la caracterización de la expresión de mRNA de *Th* en comparación con TH proteína, donde encontramos que hay células que expresan el mensajero pero no la proteína tanto en la capa externa granular como la periglomerular. Por tanto parecen haber varias poblaciones de células del linaje Th: células dopaminérgicas maduras (TH positivas), células que expresan el mRNA de *Th* pero no TH proteína que podrían ser DA inmaduras o una población alternativa y células que expresan o han expresado *Th* en algún momento y que son positivas para CR.

Finalmente, se analizó el patrón de expresión de los miembros de la familia PBX en la población de células GFP+ de la PGL. Tal y como se representa en el esquema de la Figura R17 B el perfil de expresión, fue muy similar al obtenido en el análisis de las DA del BO: un 72% de las GFP expresaban PBX1a, un 8% expresaban PBX1b y un 71% expresaban PBX2. Estos resultados indican que a pesar de que no todas las células GFP son TH positivas, las células del linaje dopaminérgico que se encuentran en la PGL presentan un patrón de expresión de factores PBX similar al de las neuronas DA maduras del BO.

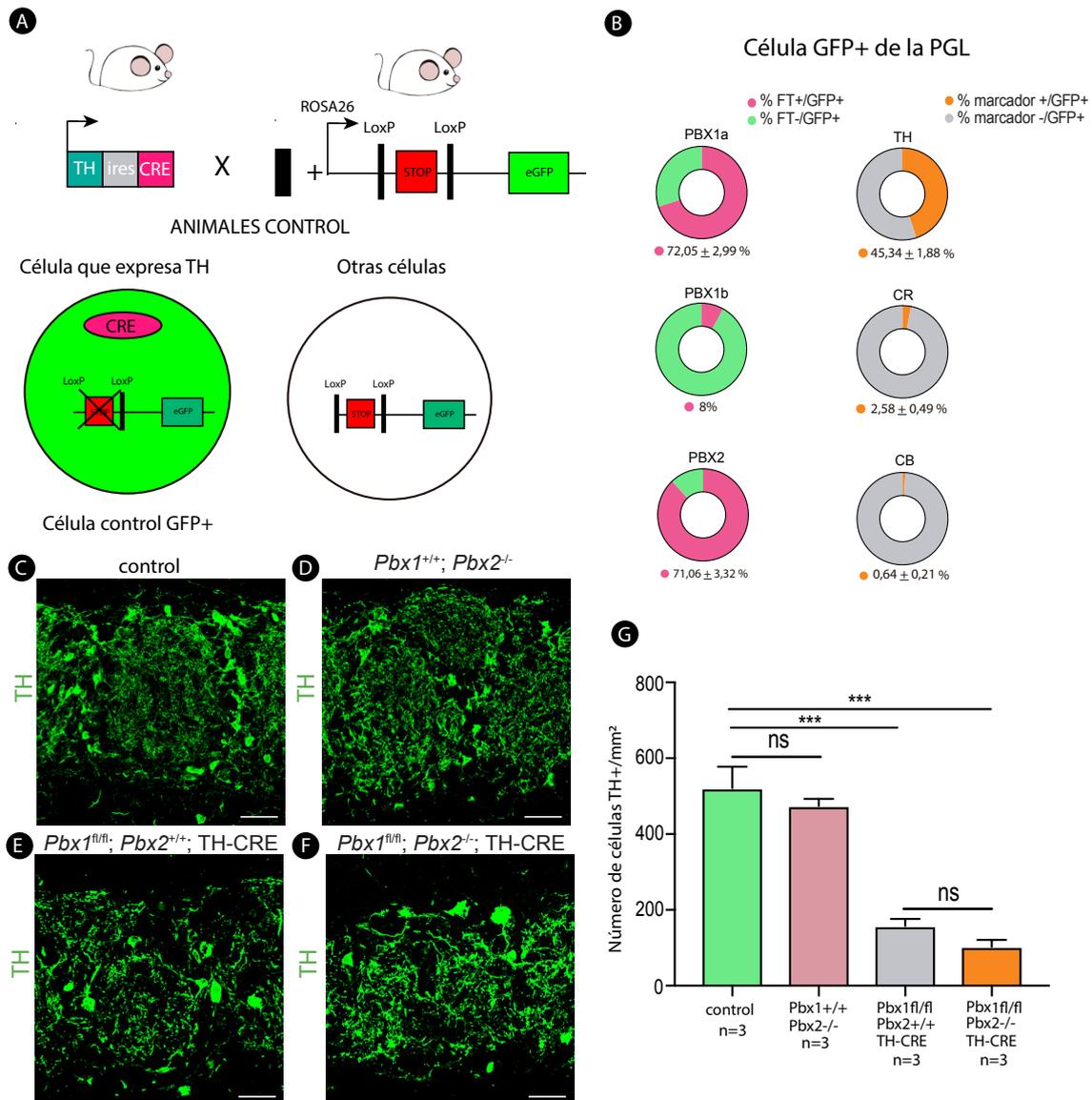
Es importante mencionar que esta expresión de CRE en células no TH positivas es específica del gen *Th*, ya que la misma estrategia pero utilizando la CRE recombinasa en el locus del transportador de dopamina (DAT), que marca células DA maduras, produce una colocalización del 100% entre la proteína TH y GFP (datos de nuestro laboratorio no publicados). Por tanto, en su conjunto, estos resultados sugieren, que la cepa TH-ires-CRE podría expresarse de forma temprana en neuronas DA inmaduras.

### **3.2. Análisis de la expresión de la Tirosina Hidroxilasa del BO adulto en mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*; TH-ires-CRE**

Con el propósito de analizar la función de PBX1 y PBX2 en la diferenciación y/o mantenimiento de las neuronas DA del BO, se realizó una inmunohistoquímica frente TH en secciones coronales de BO de animales control (*Pbx1<sup>fl/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*), mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*; TH-CRE), mutantes para PBX2 (*Pbx1<sup>+/+</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*; TH-CRE) y dobles mutantes de 2 meses de edad (Figura R17 C-F).

Después de analizar las imágenes de microscopía confocal se observó que los mutantes para PBX2 no presentaban diferencias significativas en comparación a los animales control tal y como sucedía con los mutantes condicionales *Nestin-CRE*. Por tanto, una vez más PBX2 parece no tener un papel importante en la diferenciación terminal a neurona DA del BO. Por el contrario, los mutantes para PBX1 exhibían una dramática disminución, en el número de neuronas DA del BO que no se ve exacerbada en los dobles mutantes (Figura R17 G).

En conclusión, estos resultados demostraron que PBX1, pero no PBX2, tiene un papel fundamental para la correcta diferenciación y/o mantenimiento de las neuronas DA del OB adulto. En consecuencia, el resto de los experimentos de esta tesis se centraron en el estudio de los mutantes para PBX1.



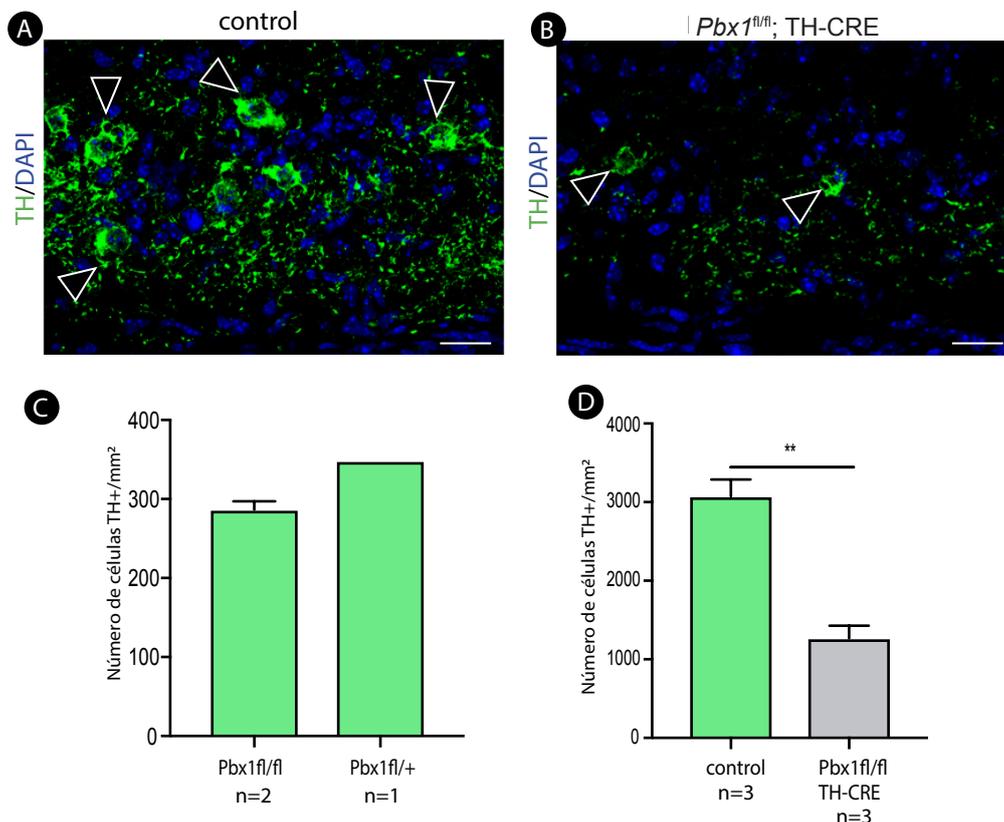
▲ **Figura R17: Los mutantes condicionales para *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-ires-CRE muestran una dramática reducción en el número de neuronas DA del BO adulto.** (A) Esquema del cruce entre ratones que expresan la CRE recombinasa en el locus endógeno de Tirosina hidroxilasa y animales con la línea reportera RCE. Las dos figuras inferiores representan células del linaje dopaminérgico (verde) y el resto de células de un animal control tras la activación de la CRE recombinasa. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con cada FT y con cada marcador en la PGL de animales control. El 72,05 % ± 2,99 sem de las células GFP+ expresan PBX1a (n=3), el 8 % de las células GFP+ expresan PBX1b (n=1) y el 71,06% ± 3,32 sem de las células GFP+ expresan PBX2 (n=3). El 45,34% ± 1,88 sem de las células GFP+ expresan TH (n=3), el 2,58% ± 0,49 sem de las células GFP+ expresan CR (n=3) y el 0,64% ± 0,21 sem de las células GFP+ expresan CB (n=3). (C-F) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de

TH (verde) de una sección coronal de la PGL del OB de animales control (C), animales mutantes para PBX2 (*Pbx1<sup>+/+</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>*) (D), mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup>; TH-CRE*) (E) y dobles mutantes (F) de 2 meses de edad. (G) Cuantificación del número promedio de células positivas para TH (verde) del BO. El número de células obtenido en animales mutantes para PBX2 ( $470,45 \pm 0,20$ ; n=3) no presentaba diferencias significativas respecto a los controles ( $520,07 \pm 0,57$ ; n=3). La cuantificación de los mutantes para PBX1 ( $150,76 \pm 0,19$ ; n=3) muestra una reducción en el número de neuronas DA de la PGL en comparación a los animales control. Los dobles mutantes a pesar de no incrementar el fenotipo de los mutantes para PBX1, ( $30,63 \pm 0,63$ ; n=3) también muestran una disminución de neuronas DA respecto a los animales control. Los datos representan el promedio ± sem del número de células TH positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \*\*\* p < 0,001. Escala: 20µm .

### 3.3. Análisis de la expresión de la Tirosina Hidroxilasa en el BO de mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-ires-CRE neonatos

Como se ha explicado, en el BO adulto existen dos poblaciones de neuronas DA, las de origen post-natal y las embrionarias (Hinds JW, 1968), y nuestros resultados muestran que ambas expresan PBX1. Por tanto, una vez detectado un fenotipo de pérdida de expresión de TH en el BO de ratones adultos mutantes para PBX1 quisimos ver si ese fenotipo estaba ya presente en estadios postnatales tempranos. Para ello, se realizó una inmunohistoquímica frente TH en secciones coronales de BO de animales control y de mutantes para PBX1 (Figura R18).

En primer lugar, el análisis mostró que no existían diferencias significativas en el número de células TH positivas entre los genotipos *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* y *Pbx1<sup>fl/+</sup>* tal y como muestra la Figura R18 C y que por tanto, ambos genotipos podían considerarse control. En segundo lugar, las imágenes de microscopía confocal revelaron que los mutantes para PBX1 exhibían una reducción en el número de neuronas DA del BO confirmando así que la diferenciación terminal a neurona DA embrionaria también requiere de la expresión de PBX1.



▲ **Figura R18: Los mutantes para PBX1 exhiben una reducción en el número de células TH+ en el BO a P0.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de TH (verde) de una sección coronal de la PGL del BO de animales control (A) y mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-CRE) (B) a P0. (C) Cuantificación del número promedio de células positivas para TH (verde) en animales control con genotipo *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* (280,65 ± 0,11; n=2) y *Pbx1<sup>fl/+</sup>* (340,83; n=1) en la PGL. (D) Cuantificación del número promedio de células positivas para TH (verde)

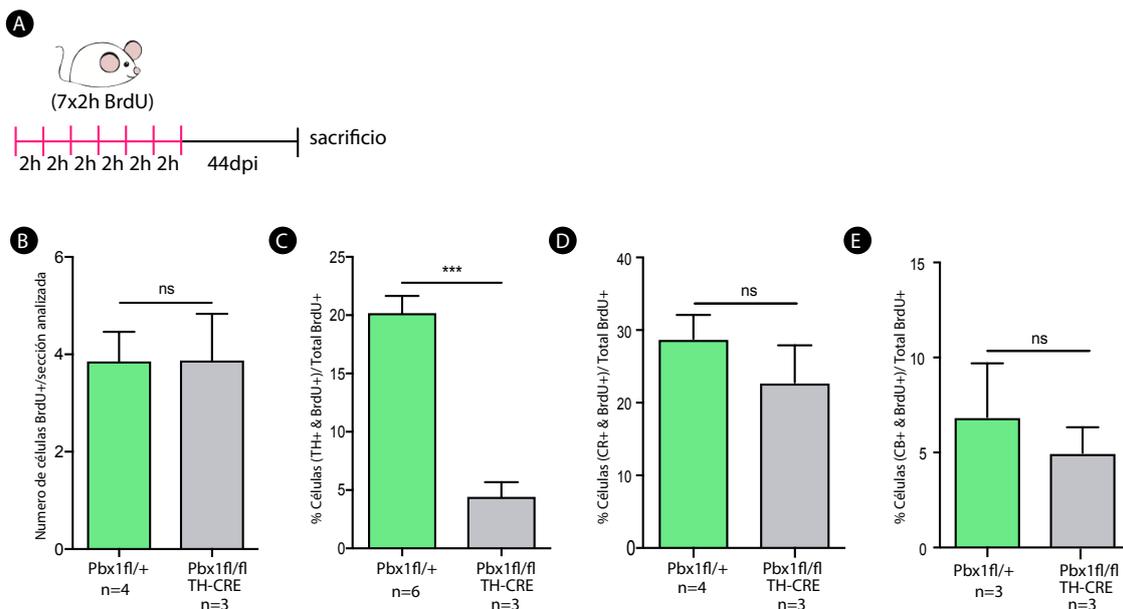
de la PGL. Tras la cuantificación se observó una reducción significativa en el número de neuronas DA en los animales mutantes para PBX1 (1200,69 ± 016; n=3) en comparación a los animales control (3000,71 ± 0,22; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células TH positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas: \*\* p < 0,01. Los triángulos indican células TH+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5µm .

## 4 CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-ires-CRE EN ESTADIO ADULTO

### 4.1. Análisis de la supervivencia de las células mutantes para PBX1

Dado que los resultados anteriores muestran una reducción en el número de células TH positivas en el BO de mutantes para PBX1 tanto en animales adultos como a P0, nuestro siguiente objetivo fue determinar qué ocurría con las células del linaje DA que carecían de expresión de PBX1, y quisimos establecer si morían o si las células permanecían en la PGL parcialmente diferenciadas a DA pero sin expresar TH o si tal vez si se diferenciaban a otro tipo celular.

Para ello, se realizó un ensayo basado en la utilización del marcador de proliferación celular BrdU. Dicho ensayo, consistió en la administración de 7 inyecciones de BrdU a intervalos de dos horas, tanto a los animales control como a los mutantes para PBX1 de 2 meses de edad y, pasados 44 días de la última inyección, se procedió al sacrificio y procesamiento de los animales (Figura R19 A).



**▲ Figura R19: Los mutantes para PBX1 disminuyen el número de células TH pero no el total de células BrdU+ de la PGL.** (A) Diagrama del diseño del experimento realizado para estudiar si las células mutantes para PBX1 permanecen en la PGL. El estudio se efectuó con animales control (*Pbx1<sup>fl/+</sup>*) y mutantes (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-CRE) a los que se les administró BrdU a los dos meses de edad (7 pinchazos cada 2 horas) y transcurridos 44 días después del último pinchazo se sacrificaron los animales. (B) Cuantificación del número promedio de células positivas para BrdU de la PGL por sección analizada. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de células BrdU+ por sección analizada entre animales control ( $3.84 \pm 0.62$ ;  $n=4$ ) y mutantes para PBX1 ( $3.86 \pm 0.98$ ;  $n=3$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$

sem del número de células BrdU positivas obtenido por sección analizada. T-Student de dos colas. (C) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para BrdU que expresan TH en la PGL. El  $20.11\% \pm 1.54$  sem de las células BrdU+ en controles expresan TH ( $n=6$ ) mientras que en los mutantes para PBX1 el número se reduce significativamente al  $4.35\% \pm 1.33$  sem ( $n=3$ ). (D) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para BrdU que expresan CR en la PGL. El  $28.78\% \pm 3.32$  sem de las células BrdU+ expresan CR ( $n=4$ ) en controles y un  $22.78\% \pm 5.14$  sem ( $n=3$ ) en mutantes. (E) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para BrdU que expresan CB en la PGL. El  $6.85\% \pm 2.84$  sem de las células BrdU+ expresan CB ( $n=3$ ) en controles y el  $4.97\% \pm 1.36$  sem ( $n=3$ ) en

Se esperaron 44 días para permitir que las células de la SVZ que habían incorporado BrdU y que, por tanto, estaban en proceso de proliferación el día que se administraron los pinchazos tuvieran tiempo suficiente para llegar al BO y diferenciarse. A continuación, se realizó una inmunohistoquímica en secciones coronales del BO de animales control y mutantes para marcar las células BrdU+.

Una vez realizados los recuentos de la PGL, se observó que no existían diferencias significativas entre el número de células BrdU positivas por sección analizada de animales control y mutantes para PBX1 (Figura R19 B). Por tanto, la disminución de neuronas TH positivas del BO en los mutantes para PBX1 no parece deberse a una muerte de esta población, o a defectos de migración o defectos de proliferación de SVZ (que son poco probables ya que la delección de *Pbx1* ocurre a estadios tardíos).

Como era de esperar, la proporción de células BrdU+/TH+ del total de células BrdU es mayor en controles que en mutantes para PBX1 (Figura R19 C). Como ya hemos descrito, además de las neuronas DA (que son también GABAérgicas), en la PGL encontramos otras dos poblaciones de interneuronas (IN) GABA, las IN CR y las CB. Estas 3 poblaciones son excluyentes y viajan juntas a través del RMS desde SVZ hasta el BO (Kosaka *et al.*, 1998; Doetsch *et al.*, 1996). Por ello, quisimos analizar las otras poblaciones de interneuronas de la PGL cuyo linaje no se ve afectado por la expresión de la CRE (neuronas CR y CB) para ver si la pérdida de PBX1 en el linaje DA producía algún defecto no autónomo celular. Tras los análisis se observó que no existían diferencias significativas en la proporción de células BrdU+/CR+ y BrdU+/CB+ del total de células BrdU entre animales control y mutantes (Figura R19 D,E).

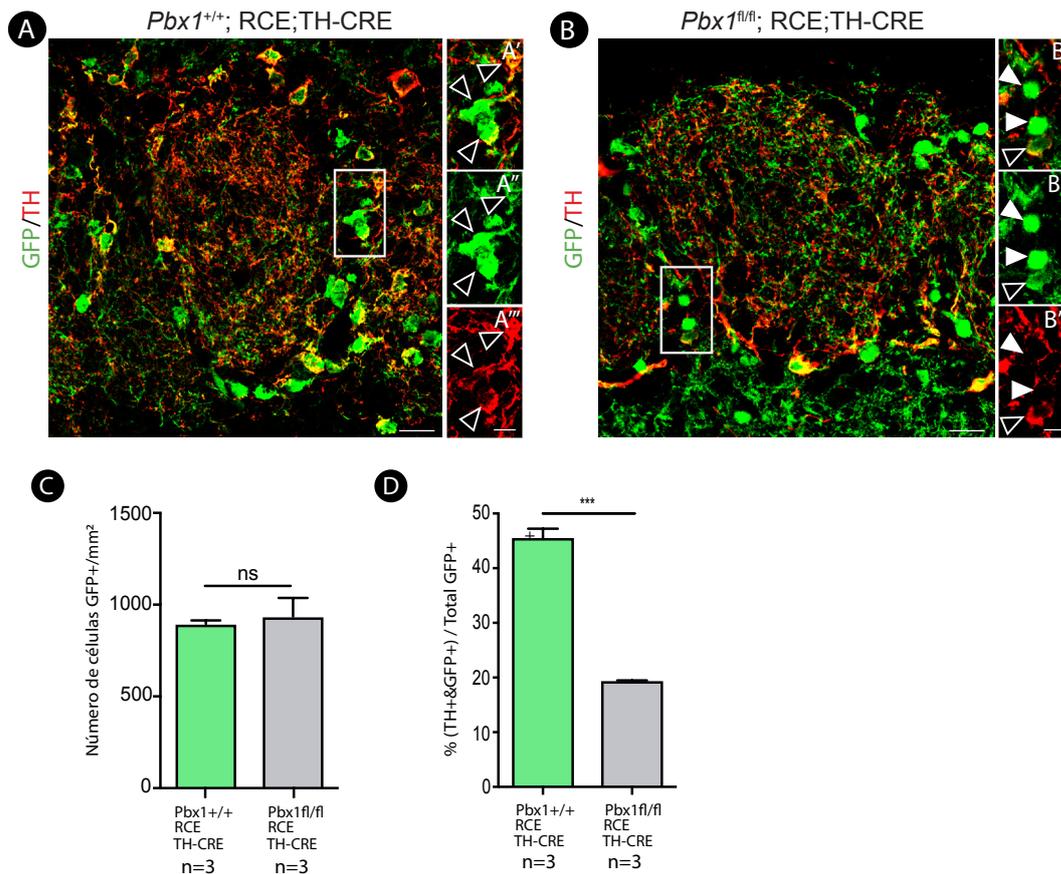
En conjunto, los resultados obtenidos demostraron la importancia de PBX1 en la diferenciación a neurona DA, post-natal y embrionaria, del OB. Además, la falta de función de PBX1 en el linaje dopaminérgico produce una disminución en la expresión de TH sin embargo estas células parece que permanecen en el BO y no mueren.

#### **4.2. Análisis de linaje dopaminérgico en el BO adulto de mutantes para *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; TH-ires-CRE**

Nuestros resultados sugieren que las células del linaje DA que carecen de PBX1 fallan en la diferenciación DA pero se mantienen en el BO. Con el propósito de caracterizar mejor el fenotipo de estas células generamos una nueva cepa de animales mediante el cruce de los animales de la cepa *Pbx1*; TH-ires-CRE con línea reportera RCE. De modo que tal y como se ha descrito en apartados anteriores, las neuronas del linaje dopaminérgico quedaron permanentemente marcadas con la proteína verde fluorescente. En los animales mutantes, las neuronas del linaje dopaminérgico además de ser GFP+ también son deficientes para PBX1, mientras que en los animales control, las células GFP+ siguen expresando PBX1 (Figura R20).

Se realizó una doble inmunohistoquímica para GFP y TH en secciones coronales del BO de animales control y mutantes para PBX1 de 2 meses de edad. (Figura R21). Nuestros análisis mostraron que no existen diferencias significativas entre el número de células



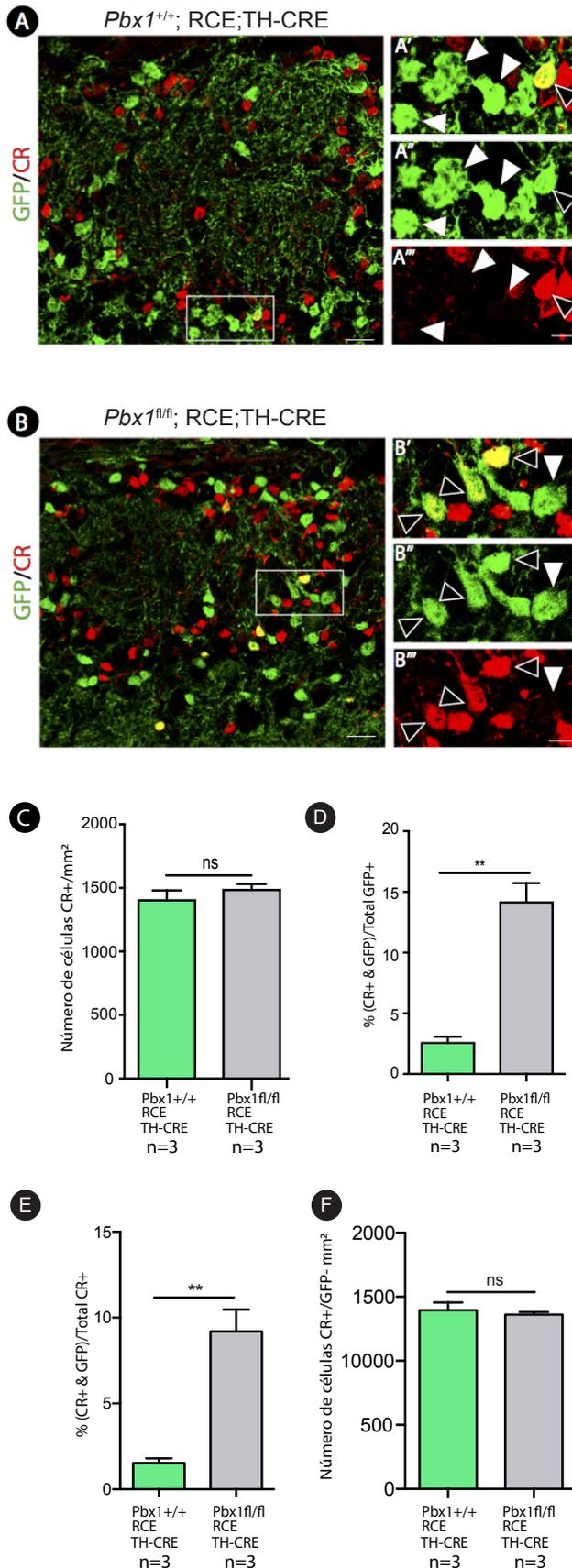


▲ **Figura R21: Las células mutantes para PBX1 permanecen en la PGL pero no se diferencian a neurona DA.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia para GFP (verde) y TH (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y animales mutantes para PBX1 (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de 2 meses de edad. (A'),(A''),(A''') ampliación donde se muestran células GFP+(verde) positivas para TH (rojo). (B'),(B''),(B''') ampliación donde se muestran la reducción de células GFP+ (verde) positivas para TH (rojo). (C) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de células GFP+ entre animales control (890,50 ±

0,19; n=3) y mutantes para PBX1 (930,53 ± 1,02; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas. (D) Cuantificación del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH. El 45.34% ± 1.88 sem de las células GFP+ expresan TH (n=3) mientras que en los mutantes para PBX1 el número se reduce significativamente al 19,15% ± 0,33 sem (n=3). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \*\*\* p < 0,001. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/TH-. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''.

### 4.3. Análisis de las poblaciones calretinina y calbindina en el BO adulto en mutantes para PBX1

Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar mejor la población del linaje DA que en los mutantes para PBX1 carece de expresión del gen *Th*. Para ello, se analizaron mutantes *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-ires-CRE los otros dos tipos de interneuronas de la PGL, CR y CB. En animales salvajes, como ya se ha explicado CR y CB no se co-expresan con TH ni tampoco con células del linaje DA de la PGL.



◀ **Figura R22: Un pequeño porcentaje de células GFP+ expresan ectópicamente CR en mutantes para PBX1.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia para GFP (verde) y CR (rojo) de una sección coronal de la PGL del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y animales mutantes para PBX1 (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de 2 meses de edad. (A'), (A''), (A''') ampliación donde se muestra que la gran mayoría de células GFP+(verde) son negativas para CR (rojo). (B'), (B''), (B''') ampliación donde se muestra el incremento de células GFP+(verde) positivas para CR (rojo) (C) Cuantificación del número promedio de células positivas para CR de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de células CR+ entre animales control ( $1410,70 \pm 0,64$ ;  $n=3$ ) y mutantes para PBX1 ( $1500 \pm 0,31$ ;  $n=3$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de células CR positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas. (D) Cuantificación del porcentaje de células positivas para GFP que expresan CR. El  $2,58\% \pm 0,49$  sem de las células GFP+ expresan CR ( $n=3$ ) mientras que en los mutantes para PBX1 el número incrementa significativamente al  $14,16\% \pm 1,57$  sem ( $n=3$ ). (E) Cuantificación del porcentaje de células positivas para CR que expresan GFP. El  $1,53\% \pm 0,28$  sem de las células CR+ expresan GFP ( $n=3$ ) en animales control mientras que en los mutantes para PBX1 el número incrementa significativamente al  $9,20\% \pm 1,27$  sem ( $n=3$ ). Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T- Student de dos colas. (F) Cuantificación del número promedio de células negativas para GFP que expresan CR de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas entre animales control ( $1300,96 \pm 0,60$ ;  $n=3$ ) y mutantes para PBX1 ( $1300,61 \pm 0,19$ ;  $n=3$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de células GFP negativas que expresan CR por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas: \*\*  $p < 0,01$ . Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/CR-. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/CR+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5  $\mu$ m en A, B y 5  $\mu$ m en A', A'', A''', B', B'', B'''.

Sin embargo, las imágenes de microscopía confocal de la doble inmunohistoquímica para GFP y CR de las secciones del BO mostraron que un pequeño porcentaje de neuronas GFP+ expresaban de forma anómala CR en los mutantes para PBX1. El incremento de células CR/GFP en realidad, es una mínima parte del total de células CR (9%) y por eso no se aprecian diferencias en el total de células CR entre controles y mutantes (Figura R22).

A continuación, se realizó una doble inmunohistoquímica para GFP y CB en secciones coronales del BO de animales control y mutantes para PBX1 (Figura R23) de 2 meses de edad. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que el porcentaje de células GFP+ que expresaban CB era menor en comparación a las que expresaban CR en los mutantes para PBX1 pero significativamente superior al porcentaje expresado en los animales control (Figura R23 D).

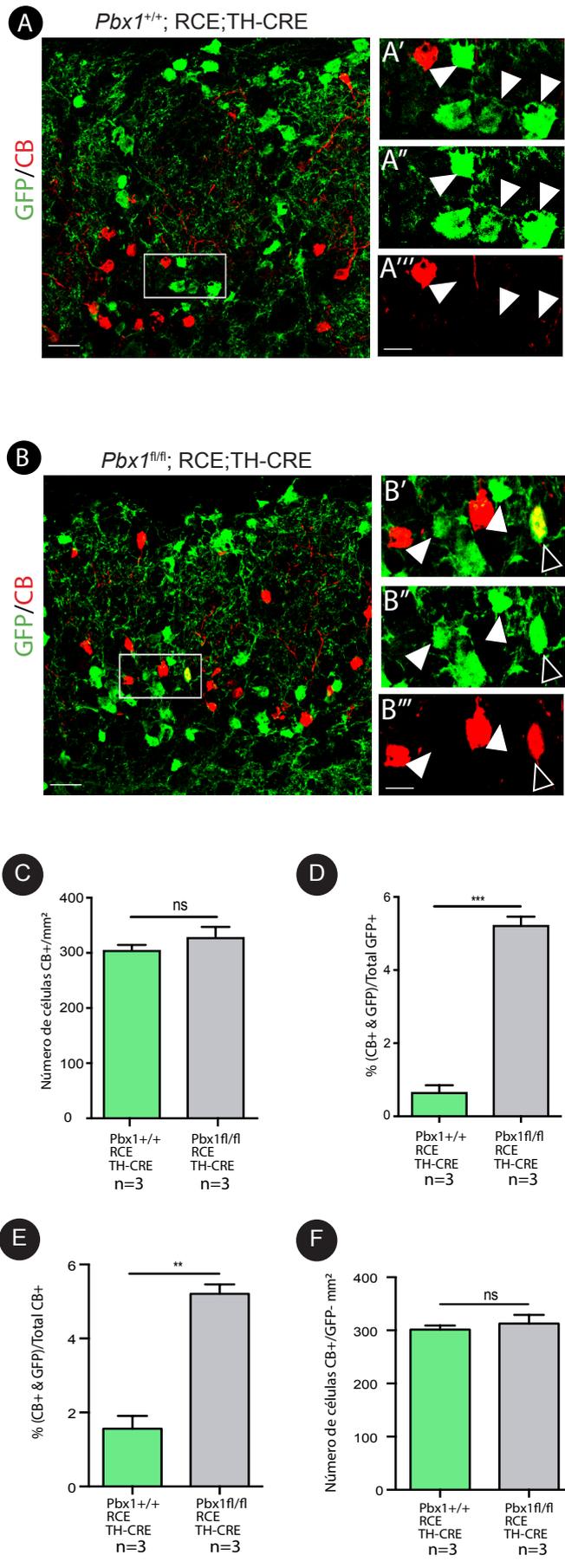
Al igual que en el caso de las neuronas CR, las CB/GFP son una mínima parte del total de CB (16%), por tanto al calcular el total de células CB no existían diferencias significativas en entre animales control y mutantes (Figura R23 C). Finalmente, tal y como sucedía con la población de CR+, tampoco existen diferencias significativas en entre el número de células GFP- que expresan CR entre controles y mutantes (Figura R23 F).

En conjunto, estos análisis mostraron que un pequeño porcentaje de las neuronas del linaje DA en mutantes PBX1, no sólo no eran capaces de activar la expresión del gen dopaminérgico TH, sino que expresaban de forma anómala CR y CB. El número de células con expresión ectópica de CR y CB es inferior al número de células que dejan de expresar TH. Por tanto, aunque estos resultados sugerían un cambio de destino celular de las células mutantes para el factor PBX1 de DA a CR y CB este cambio no se da en toda la población lo que sugiere que una parte de las neuronas mutantes para PBX1 permanecen en un estado indiferenciado o alternativamente podrían cambiar a otro fenotipo distinto a CR o CB.

#### **4.4. Análisis de la población de células GAD67 positivas en mutantes PBX1**

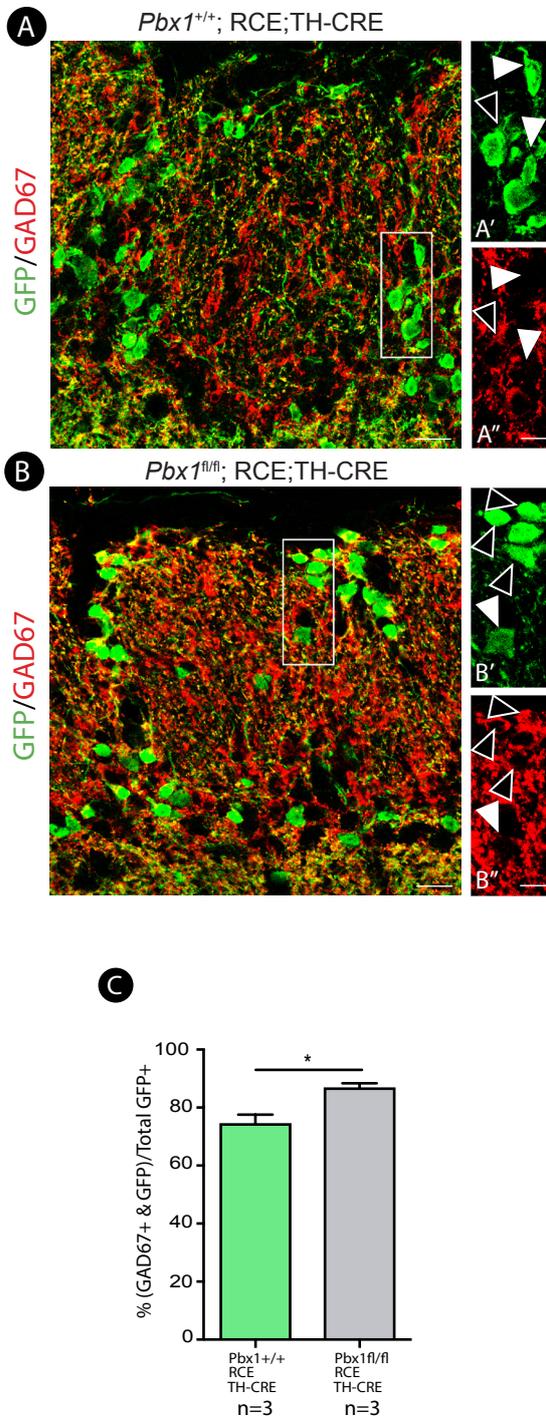
Varias publicaciones han demostrado que las neuronas DA también son GABAérgicas (Gall *et al.*, 1987) (Baker *et al.*, 1988) y que la mayoría (97%) expresan la enzima glutamato decarboxilasa Gad1 (también conocida como Gad67) (Kiyokage *et al.*, 2010). Por tanto quisimos estudiar si PBX1 no sólo era necesario para la inducción y/o mantenimiento de la expresión de TH sino también para el fenotipo GABAérgico.

Para ello, se realizó una doble inmunohistoquímica en animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) y mutantes para PBX1 (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) en secciones del BO de animales de 2 meses de edad contra GFP y GAD67 (Figura R24 A, B). En animales control, el 70% de las células GFP son GAD67 positivas (entre este 70% se encuentran todas las células TH positivas que suponen alrededor de un 45% del total de GFP). Sorprendentemente, en ratones PBX1 mutantes se observó un incremento en el porcentaje de células del linaje dopaminérgico positivas para GAD67 (Figura R24 C). Estos resultados sugieren que PBX1 podría actuar directa o indirectamente reprimiendo GAD67 en algunos contextos celulares pero no en otros.



◀ **Figura R23: Una reducida población de células GFP+ expresa ectópicamente CB en mutantes para PBX1.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia para GFP (verde) y CB (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y animales mutantes para PBX1 (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de 2 meses de edad. (A'),(A''),(A''') ampliación donde se muestran células GFP+(-verde) negativas para CB (rojo). (B'),(B''),(B''') ampliación donde se muestran células GFP+(verde) negativas para CB (rojo) y la expresión ectópica de una célula GFP+/CB+. (C) Cuantificación del número promedio de células positivas para CB de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de células CB+ entre animales control (300,64 ± 0,08; n=3) y mutantes para PBX1 (320,99 ± 0,17 n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células CB positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas. (D) Cuantificación del porcentaje de células positivas para GFP que expresan CB. El 0,64% ± 0,21 sem de las células GFP+ expresan CB (n=3) mientras que en los mutantes para PBX1 el número incrementa al 5,21% ± 0,25 sem (n=3), cinco veces superior que el obtenido en controles. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. (E) Cuantificación del porcentaje de células positivas para CB que expresan GFP. El 1,56% ± 0,35 sem de las células CB+ expresan GFP (n=3) en animales control mientras que en los mutantes para PBX1 el número incrementa significativamente al 5,21% ± 0,25 sem (n=3). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas. (F) Cuantificación del número promedio de células negativas para GFP que expresan CB de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas entre animales control (301,5 ± 0,08; n=3) y mutantes para PBX1 (312,8 ± 0,17; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP negativas que expresan CR por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas: \*\* p < 0,01. T- Student de dos colas: \*\*\* p < 0,001. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/CR-. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/CR+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''.

Dado que aproximadamente un 10% de las células GFP positivas son PBX1b positivas, y que esta subpoblación corresponde a células TH negativas, es tentador especular si la isoforma PBX1b podría estar inhibiendo la expresión de GAD67. Sería interesante determinar si en controles, la población GFP+/PBX1b+ corresponde a la población GAD67-.



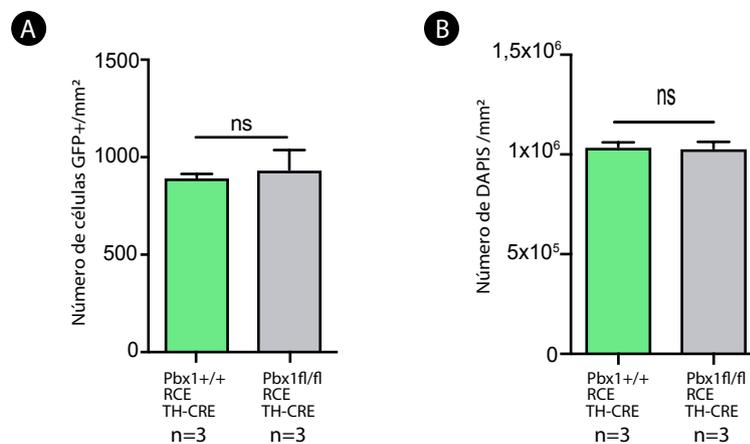
◀ **Figura R24: Los mutantes para PBX1 incrementan la expresión de GAD67 en el linaje dopaminérgico del BO.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia de GAD67 (rojo) y GFP (verde) de una sección coronal del BO de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A), y mutantes (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de 2 meses de edad. (A'),(A'') ampliación donde se muestran células GFP+(verde) negativas y positivas para GAD67 (rojo). (B'),(B'') ampliación donde se muestra el incremento de células GFP+(verde)/GAD67+ (rojo). (C) Análisis cuantitativo de la PGL del OB del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con GAD67. El 74,29% ± 3,27 sem de las células GFP+ (n=3) expresan GAD67 en animales control mientras que los animales mutantes control incrementa al 86,59% ± 1,79 sem (n=3). Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \* p < 0,05. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+ que no co-localizan con GAD67. Los triángulo negro de las figuras señalan células GFP+ que co-localizan con GAD67. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 12,5µm en A, B y 5µm en A', A'', B', B''.

#### 4.5. Análisis de la expresión de otros factores de transcripción implicados en la diferenciación a neurona DA del BO en mutantes PBX1

El marcaje con GFP del linaje dopaminérgico nos permite estudiar no solo si los genes efectores están afectados por la pérdida de PBX1 sino también si PBX1 regula la expresión de otros FT necesarios en diferenciación DA. Mutantes para PAX6, COUP-TF1, MEIS2, ER81 y DLX2 también muestran defectos en las poblaciones DA del BO (Kohwi, 2005; Hack *et al.*, 2005; Agoston *et al.*, 2014; Bovetti *et al.*, 2013; Flames *et al.*, 2009; Brill *et al.*, 2008). Por ello, nuestro siguiente objetivo fue analizar si los mutantes para PBX1 tienen afectada su expresión.

En primer lugar, antes de analizar la expresión de los FT quisimos estudiar mediante el conteo de dapis si la densidad de células entre controles y mutantes era equivalente. Como muestra la Figura R25 B, el número de dapis totales entre controles y mutantes no presentaba diferencias significativas es decir, el número de células de la PGL era el mismo en animales control que en mutantes.

Resultados anteriores habían revelado que el número de células GFP+ entre controles y mutantes tampoco mostraba diferencias (Figura R25 A). Por tanto, las células mutantes para PBX1 permanecían en la PGL sin expresar TH y al mismo tiempo estos defectos de expresión no parecen generar cambios no autónomos celulares en el número de células de otras poblaciones de la PGL.



▲ **Figura R25: Los mutantes para PBX1 mantienen el mismo número de dapis y células GFP+ que los animales control.** (A) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de células GFP+ entre animales control ( $895,0 \pm 0,19$ ;  $n=3$ ) y mutantes para PBX1 ( $935,3 \pm 1,02$ ;  $n=3$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de cé-

lulas GFP positivas por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas. (B) Cuantificación del número promedio de dapis de la PGL. Tras la cuantificación no se observaron diferencias significativas en el número de dapis entre animales control ( $1,03 \times 10^6 \pm 2,35$ ;  $n=3$ ) y mutantes para PBX1 ( $1,03 \times 10^6 \pm 3,27$ ;  $n=3$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de dapis por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas.

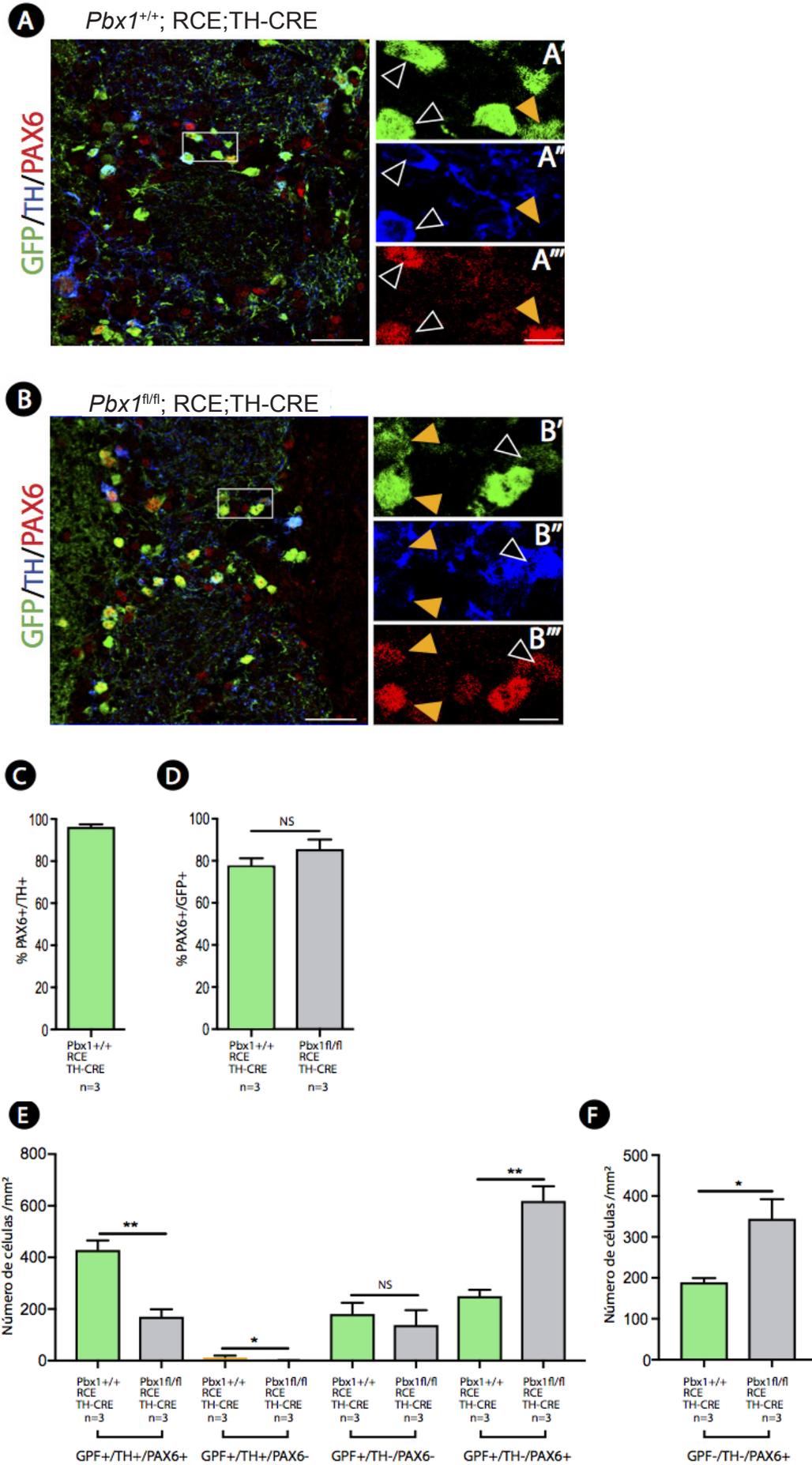
A continuación, se realizaron triples inmunohistoquímicas para GFP, TH y los factores de transcripción: PAX6 (Figura R26), MEIS2 (Figura R27) COUP-TF1 (Figura R28), ER81 (Figura R29) y PBX2 (Figura R30) en secciones del BO de animales de 2 meses de edad control (*Pbx1<sup>+/+</sup>*; RCE; TH-CRE) y mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; RCE; TH-CRE) y los resultados obtenidos para cada FT se detallan a continuación:

PAX6 se expresa en las capas granular y periglomerular del BO (Stoykova *et al.*, 1994; Dellovade *et al.*, 1998), en la mayoría de progenitores de la SVZ y únicamente en una subpoblación de neuroblastos migradores en cerebro adulto. (Kohwi, 2005). Estudios previos en animales heterocigotos para Pax6 (*Pax6<sup>Sey/+</sup>*) mostraron una reducción significativa en el número de células DA en la PGL (Dellovade *et al.*, 1998). Publicaciones posteriores (Kohwi, 2005) demostraron que PAX6 es esencial para la generación así como para la supervivencia de las células DA en el BO (Ninkovic *et al.*, 2010).

Nuestros experimentos mostraron que en controles un 96% de las DA expresan PAX6 (Figura R26 C). Por otra parte, los análisis revelaron que el 80% de las células del linaje dopaminérgico (GFP) co-localizaban con el FT y este porcentaje no cambia significativamente entre controles y mutantes (Figura R26 D). Como era de esperar, los mutantes para PBX1 exhibieron una reducción en el número de células GFP+/TH+/PAX6+ debido a la disminución en el número de células TH+. Esto va acompañado de un mayor número de células GFP+/TH-/PAX6+. Por tanto, en mutantes para PBX1, las células GFP+ pierden la expresión de TH pero mantienen la expresión de PAX6, lo que sugiere que en el linaje DA PBX1 no regula la expresión de PAX6 y lo que podría en parte explicar porqué estas células no mueren.

**Figura R26: La expresión de PAX6 es independiente de PBX1.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la triple inmunofluorescencia de GFP (verde), TH (azul) con PAX6 (rojo) de una sección coronal del BO de animales control (*Pbx1<sup>+/+</sup>*; RCE; TH-CRE) (A) y mutantes (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; RCE; TH-CRE) (B) de dos meses de edad. (A'), (A''), (A''') ampliación de células GFP+(verde)/TH+(azul)/ PAX6+(rojo) y una célula GFP+(verde)/TH-/ PAX6+(rojo) en animales control. (B'), (B''), (B''') ampliación de una célula GFP+(verde)/TH+(azul)/ PAX6+(rojo) y un par de células GFP+(verde)/TH-/ PAX6+(rojo) en mutantes para PBX1. (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para TH que co-localizan con PAX6. Los resultados mostraron que un 96,4% ± 0,94 sem de las células TH+ (n=3) expresaban PAX6 en animales control. (D) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con PAX6. Los resultados mostraron que un 78,06% ± 3,15 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban PAX6 en animales control y un 85,81% ± 4,33 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban PAX6 en animales mutantes. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o PAX6+/PAX6- de la PGL. La cuantificación mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH+/

PAX6+ entre animales control (430,6 ± 3,47; n=3) y mutantes para PBX1 (171,7 ± 2,71; n=3); en el número de células GFP+/TH+/PAX6- entre animales control (14,7 ± 0,47; n=3) y mutantes para PBX1 (0,90 ± 0,09; n=3) y en el número de células GFP+/TH-/PAX6+ entre animales control (251,5 ± 2,26; n=3) y mutantes para PBX1 (620,1 ± 5,57; n=3). La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/PAX6- entre animales control (182,6 ± 4,17; n=3) y mutantes para PBX1 (139,4 ± 5,64; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas y/o TH+/TH- y/o PAX6+/PAX6- por mm<sup>2</sup> de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. (F) Cuantificación del número promedio de células GFP-/TH-/PAX6+ de la PGL. La cuantificación mostró diferencias significativas en el número de células GFP-/TH-/PAX6+ entre animales control (190,1 ± 0,92; n=3) y mutantes para PBX1 (345,6 ± 4,69; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP-/TH-/PAX6+ por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas: \* p < 0,05. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT-. Los triángulos naranjas de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''. ►



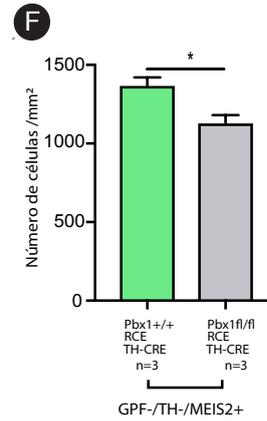
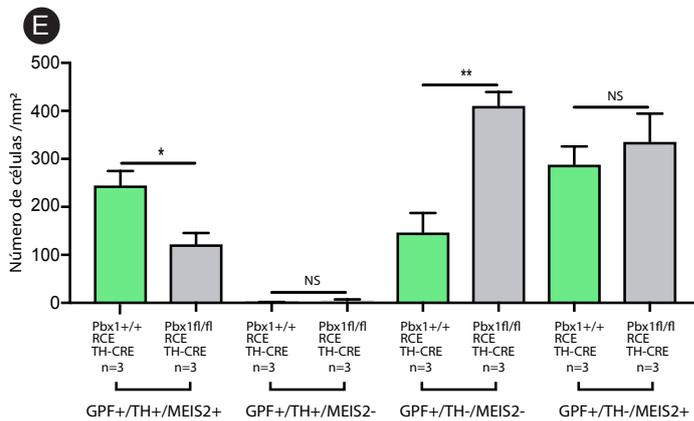
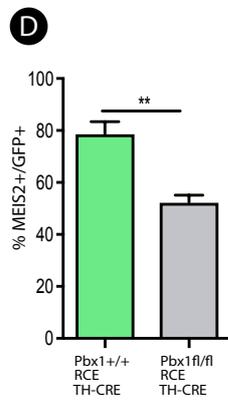
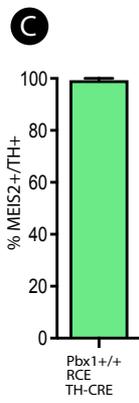
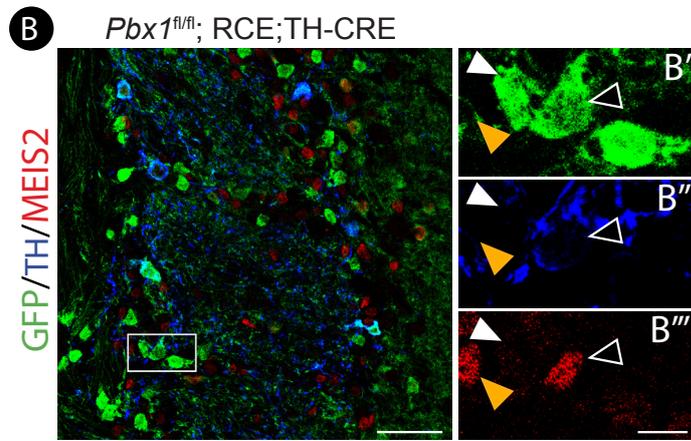
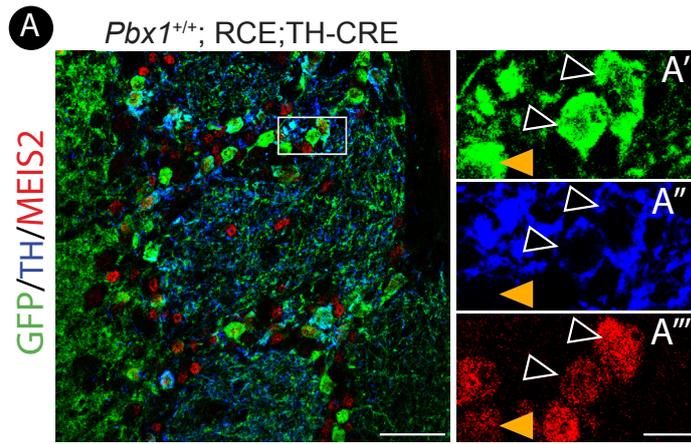
Curiosamente, en animales mutantes, el número de células GFP-/ PAX6+ incrementa significativamente. Dado que la densidad de células no varía, estos resultados revelan que en mutantes para PBX1 existe una tendencia en células que no pertenecen al linaje DA (y que por tanto no han sido modificadas en su expresión de PBX1) a expresar PAX6 (Figura 26 F). Por tanto, estos resultados muestran por una parte que PBX1 no regula la expresión de PAX6 en el linaje DA del BO y por otra que los mutantes incrementan la expresión de PAX6 de manera no autónoma celular.

MEIS2 se expresa en los neuroblastos de la SVZ y del RMS y en algunas interneuronas del BO. Se ha publicado también que el bloqueo de la expresión de MEIS2 con retrovirus en el RMS, produce una reducción de la población DA del BO demostrando la importancia de MEIS2 para la diferenciación de DA en la PGL. (Agoston *et al.*, 2014)

Nuestros resultados mostraron que el 99% de las células TH+ expresan MEIS2 (Figura R27 C). Paralelamente, los análisis revelaron que en animales mutantes, el porcentaje de células GFP+ que expresa MEIS2 es menor que en controles, es decir, la delección de *Pbx1* provoca una disminución significativa en la expresión de MEIS2 en células GFP+ (Figura R27 D). Por tanto, PBX1 regula a MEIS2 en el linaje DA.

**Figura R27: PBX1 regula la expresión de MEIS2 en el linaje dopaminérgico.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la triple inmunofluorescencia de GFP (verde), TH (azul) con MEIS2 (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y mutantes (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de dos meses de edad. (A'), (A''), (A''') ampliación de células GFP+(verde)/TH+(azul)/MEIS2+(rojo) y una célula GFP+(verde)/TH-/MEIS2+(rojo) en animales control. (B'),(B''),(B''') ampliación donde se aprecia la disminución de células GFP+(verde)/TH+(azul)/ MEIS2+(rojo), una célula GFP+(verde)/TH-/MEIS2- y una célula GFP+(verde)/TH-/MEIS2+(rojo) en animales mutantes. (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para TH que co-localizan con MEIS2. Los resultados mostraron que el 99,5% ± 0,50 sem de las células TH+ (n=3) expresaban MEIS2 en animales control. (D) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con MEIS2. El análisis reveló que el 78,73% ± 4,67 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban MEIS2 en animales control y un 52,37% ± 2,75 sem de las células GFP+ (n=3) expresan MEIS2 en animales mutantes. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o MEIS2+/MEIS2- de la PGL. La cuantificación mostró dife-

rencias significativas en el número de células GFP+/TH+/MEIS2+ entre animales control (245,5 ± 2,95; n=3) y mutantes para PBX1 (123,2 ± 2,23; n=3) y en el número de células GFP+/TH-/MEIS2- entre animales control (157,8 ± 3,94; n=3) y mutantes para PBX1(411,3 ± 2,79; n=3). La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH+/MEIS2- entre animales control (0,9 ± 0,09; n=3) y mutantes para PBX1(5,7± 0,16; n=3) ni en el número de células GFP+/TH-/MEIS2+ entre animales control (289,1 ± 3,70; n=3) y mutantes para PBX1 (336,4 ± 5,80; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas y/o TH+/TH- y/o MEIS2+/MEIS2- por mm2 de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. (F) Cuantificación del número promedio de células GFP-/TH-/MEIS2+ de la PGL. La cuantificación mostró diferencias significativas en el número de células GFP-/TH-/MEIS2+ entre animales control (1369,0± 5,15; n=3) y mutantes para PBX1 (1131,0 ± 5,03; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP- /TH-/MEIS2+ por mm2 de sección analizada. T-Student de dos colas: \* p < 0,05. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT-. Los triángulos naranjas de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B''' . ►



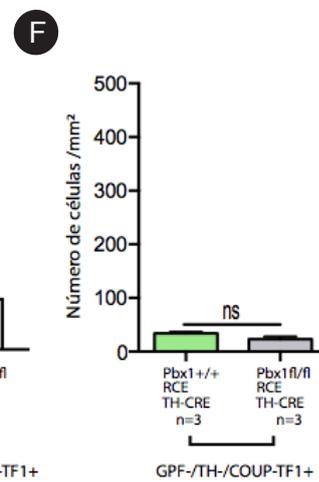
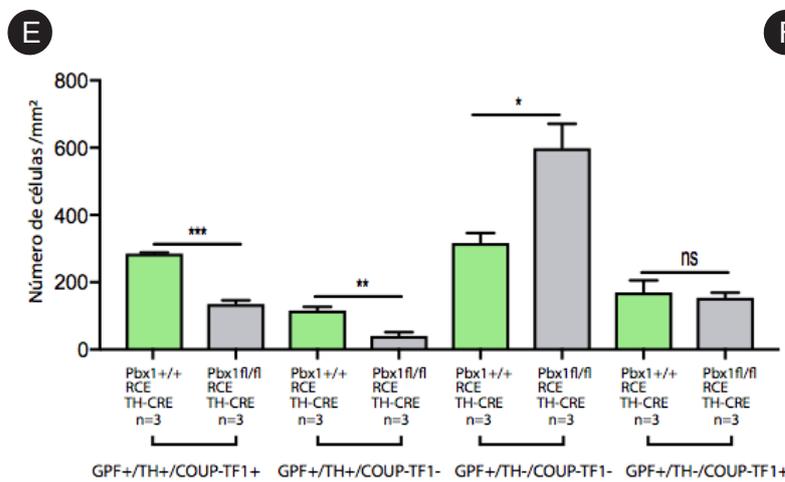
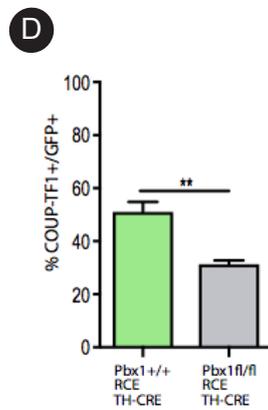
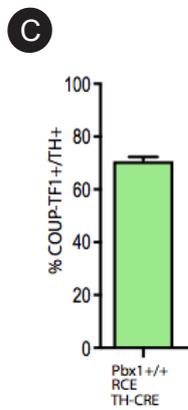
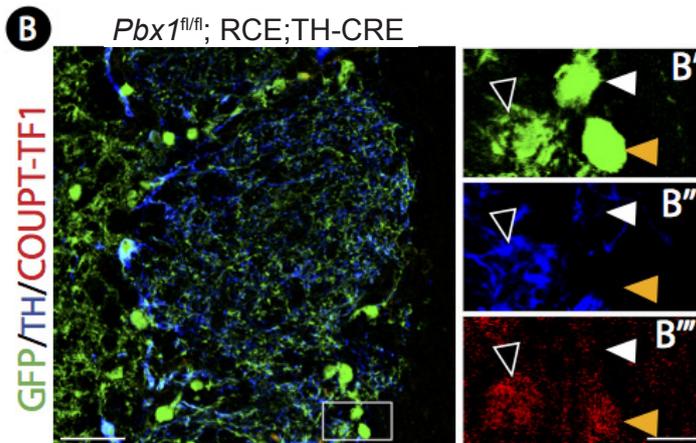
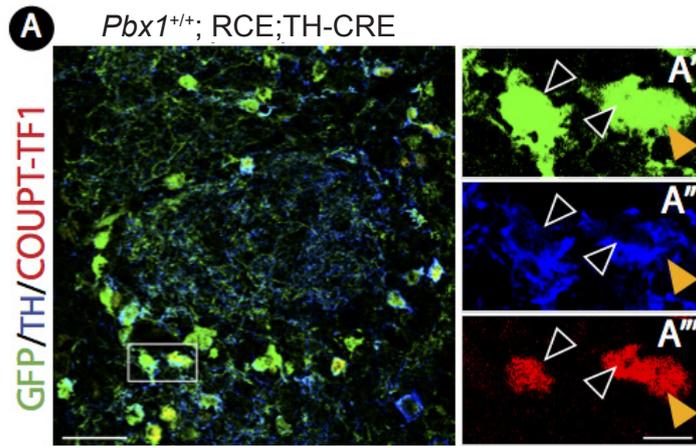
Los mutantes disminuyen el número de células GFP+/TH+/MEIS2+ por la disminución en el número de células TH+. Este cambio va acompañado de un incremento en el número de células GFP+/TH-/MEIS2- (Figura R27 E). Por tanto, estos datos demuestran que PBX1 regula la expresión de MEIS2 en el linaje DA del BO.

Por otra parte, los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/MEIS2+, esto es interesante porque indicaría que el efecto de PBX1 en la expresión de MEIS2 se restringe a la población de células DA maduras (TH+). Finalmente, también se observó una disminución en la expresión de MEIS2 en la población de células GFP- (Figura R27 F). Por tanto, contrariamente a lo observado en PAX6, PBX1 regula la expresión de MEIS2 y los mutantes para PBX1 exhiben un fenotipo no autónomo celular en el que células que no pertenecen al linaje DA también disminuyen la expresión de MEIS2.

COUP-TF1 se expresa en la PGL y a diferencia del resto de FT que se analizan en este apartado es específico de neuronas DA post-natales (Bovetti *et al.*, 2013). Estudios de privación del olor demostraron que, además de una reducción en la expresión de TH, como ya se conocía, también se producía una disminución en la expresión de COUP-TF1 en la PGL. La misma publicación demostró que la inactivación condicional de COUP-TF1 causa una reducción en el número de células TH.

**Figura R28: PBX1 regula la expresión de COUP-TF1 en el linaje dopaminérgico.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la triple inmunofluorescencia de GFP (verde), TH (azul) con COUP-TF1 (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y mutantes (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de dos meses de edad. (A'), (A''), (A''') ampliación de células GFP+(-verde)/TH+(azul)/COUP-TF1+(rojo) y una célula GFP+(verde)/TH-/COUP-TF1+ (rojo) en animales control. (B'), (B''), (B''') ampliación de una célula GFP+(verde)/TH+(azul)/COUP-TF1+(rojo), una célula GFP+(verde)/TH-/COUP-TF1+(rojo) y una célula GFP+(verde)/TH-/COUP-TF1- en mutantes para PBX1. (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para TH que co-localizan con COUP-TF1. Los resultados mostraron que el 70,87% ± 1,45 sem de las células TH+ (n=3) expresaban COUP-TF1 en animales control. (D) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con COUP-TF1. Los resultados mostraron que el 51,29% ± 3,52 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban COUP-TF1 en animales control y que el 31,55% ± 1,23 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban COUP-TF1 en animales mutantes para PBX1. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \*\* p < 0,01. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o COUP-TF1+/COUP-TF1- de la PGL. La cuantifi-

cación mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH+/COUP-TF1+ entre animales control (287,3 ± 0,11; n=3) y mutantes para PBX1 (136,8 ± 0,94; n=3); en el número de células GFP+/TH+/COUP-TF1- entre animales control (117,9 ± 0,90; n=3) y mutantes para PBX1 (42,1 ± 0,97; n=3) y en el número de células GFP+/TH-/COUP-TF1- entre animales control (318,1 ±; n=3) y mutantes para PBX1 (600,6 ± 7,03; n=3). La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/COUP-TF1+ entre animales control (171,8 ± 3,38; n=3) y mutantes para PBX1 (155,8 ± 1,32; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas y/o TH+/TH- y/o COUP-TF1+/COUP-TF1- por mm<sup>2</sup> de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. (F) Cuantificación del número promedio de células GFP-/TH-/COUP-TF1+ de la PGL. La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP-/TH-/COUP-TF1+ entre animales control (33,8 ± 0,27; n=3) y mutantes para PBX1 (23,1 ± 0,45; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP-/TH-/COUP-TF1+ por mm<sup>2</sup> de sección analizada. T-Student de dos colas. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT-. Los triángulos naranjas de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''.



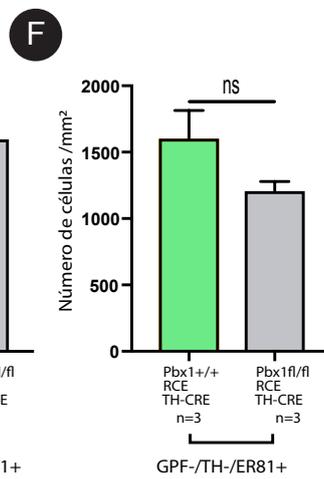
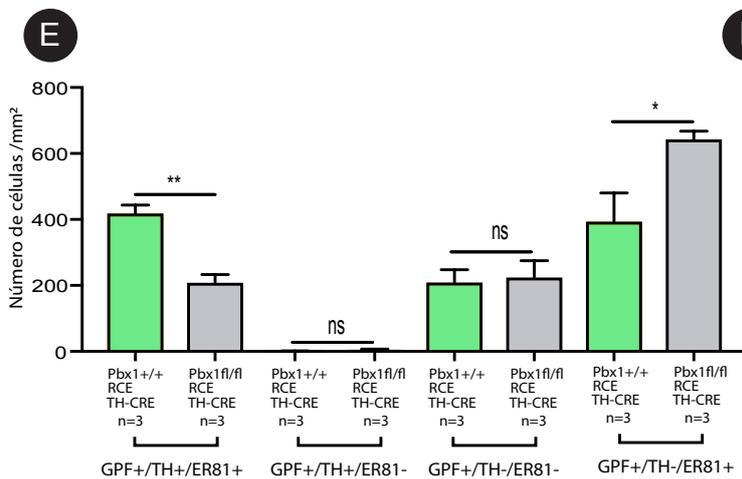
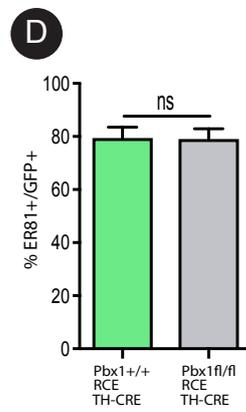
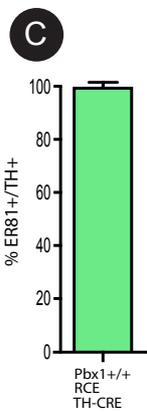
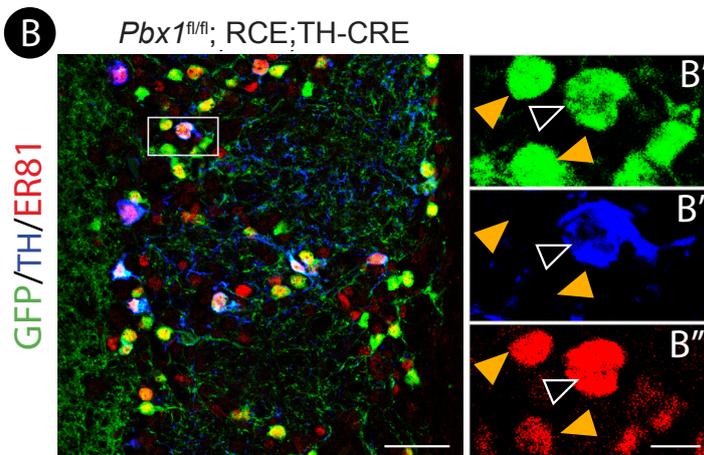
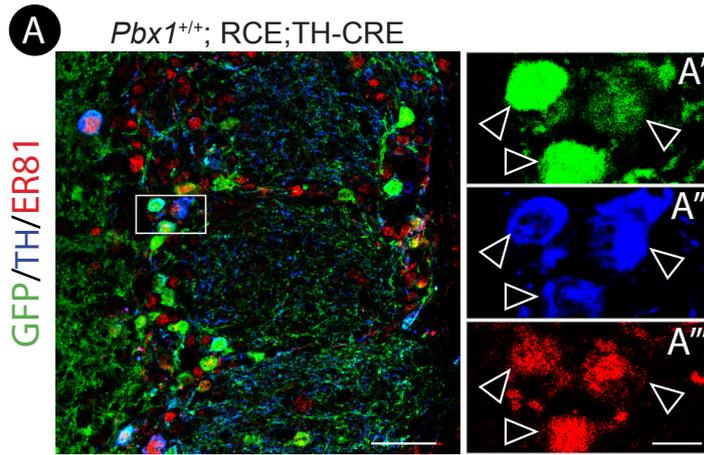
Finalmente, experimentos en los que delecionaron COUP-TF1 en interneuronas adultas mediante lentivirus, demostraron que COUP-TF1 es importante tanto para la diferenciación como para el mantenimiento DA. (Bovetti *et al.*, 2013)

Como era de esperar, nuestros resultados revelaron que la mayoría de las células TH+ expresaban COUP-TF1 (Figura R28 C). Los análisis revelaron que los mutantes para PBX1, exhiben un menor porcentaje de células GFP+ que expresan el FT (Figura R28 D) en comparación a los animales control sugiriendo que PBX1 regula la expresión de COUP-TF1 en el linaje DA del BO. Tal y como se observó en el estudio de PAX6 y MEIS2, los mutantes para PBX1 muestran una disminución en el número de células GFP+/TH+/COUP-TF1+ como consecuencia de la disminución de la células TH+. Esta disminución va acompañada de un aumento de células GFP+/TH-/COUP-TF1- (Figura 28 E).

Además, los mutantes para PBX1 muestran un menor número de células GFP+/TH+/COUP-TF1- debido a que las TH+ embrionarias no expresan COUP-TF1 y los mutantes para PBX1 disminuyen tanto la población DA adulta como la embrionaria. Por otra parte, los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/COUP-TF1+, esto es interesante porque indicaría que el efecto de PBX1 en la expresión de COUP-TF1 se restringe a la población de células DA maduras (TH+).

**Figura R29: La expresión de ER81 es independiente de PBX1.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la triple inmunofluorescencia de GFP (verde), TH (azul) con ER81 (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1<sup>+/+</sup>*; RCE; TH-CRE) (A) y mutantes (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; RCE; TH-CRE) (B) de dos meses de edad. (A'),(A''),(A''') ampliación de células GFP+(verde)/TH+(azul)/ER81+(rojo) en animales control. (B'),(B''),(B''') ampliación donde se observa una reducción en el número de células GFP+(verde)/TH+(azul)/ER81+(rojo) y un par de células GFP+(verde)/TH-/ER81+ (rojo) en animales mutantes. (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para TH que co-localizan con ER81. Los resultados mostraron que el 99,8% ± 0,20 sem de las células TH+ (n=3) expresaban ER81 en animales control. (D) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con ER81. Los resultados mostraron que el 79,02% ± 4,45 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban ER81 en animales control y un 79,22% ± 3,66 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban ER81 en animales mutantes. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o ER81+/ ER81- de la PGL. La cuantificación mostró diferencias significativas en el

número de células GFP+/TH+/ ER81+ entre animales control (419,9 ± 2,39; n=3) y mutantes para PBX1 (209,5 ± 2,33; n=3) y en el número de células GFP+/TH-/ ER81+ entre animales control (395,2 ± 8,54; n=3) y mutantes para PBX1 (644,5 ± 2,30; n=3). La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH+/ ER81- entre animales control (0,9 ± 0,09; n=3) y mutantes para PBX1 (4,7 ± 0,25; n=3) ni en el número de células GFP+/TH-/ ER81- entre animales control (210,4 ± 3,70; n=3) y mutantes para PBX1 (225,6 ± 4,92; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas y/o TH+/TH- y/o ER81+/ ER81- por mm2 de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. (F) Cuantificación del número promedio de células GFP-/TH-/ER81+ de la PGL. La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP-/TH-/ER81+ entre animales control (1605,0 ± 20,82; n=3) y mutantes para PBX1 (1211,0 ± 6,75; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP- /TH-/ ER81+ por mm2 de sección analizada. T-Student de dos colas. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos naranjas de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''. ►



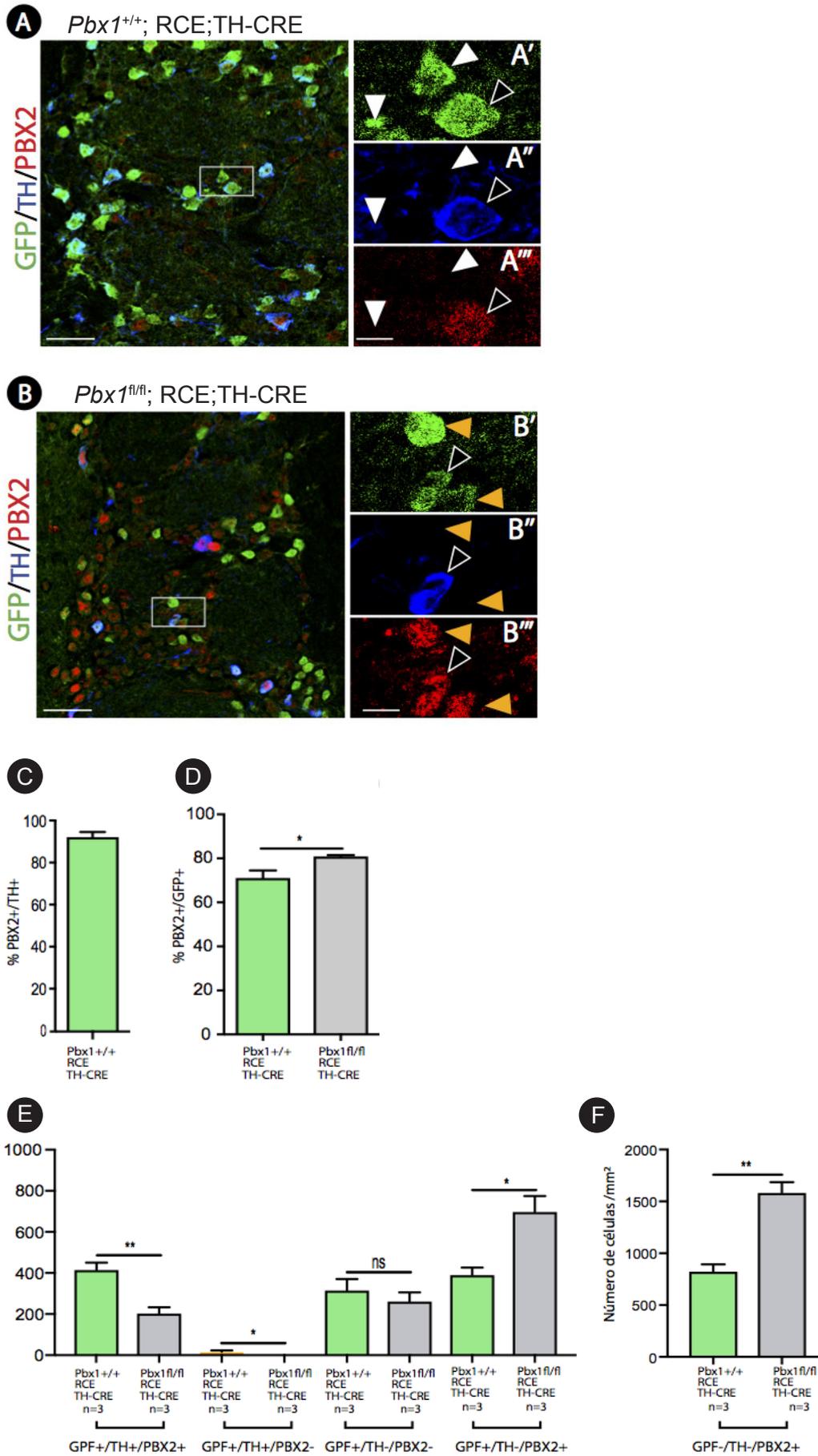
ER81 se expresa en las DA del BO pero no de forma específica como puede observarse en la Figura R29 A. Mutantes nulos para ER81 exhiben una dramática reducción en el número de células TH+ en la PGL. Además, ER81 activa directamente la región *cis* reguladora del locus de *Th* in vitro (Flames & Hobert, 2009). Ensayos posteriores de inmunoprecipitación de la cromatina confirmaron que ER81 se une a una región cercana al promotor de *Th* (John W. Cave, *et al.* 2010).

Las imágenes de microscopía confocal mostraron que las células DA expresan ER81 (100%). (Figura R29 C). A diferencia de lo observado en MEIS2 y COUP-TF1, los resultados no mostraron diferencias significativas entre controles y mutantes en el porcentaje de células GFP+ que expresaban ER81 (Figura R29 D). Por tanto, los datos sugieren que PBX1 no regula la expresión de ER81 en el linaje DA del OB. Los mutantes para PBX1 debido a la reducción en el número de células TH+ también mostraron una disminución en el número de células GFP+/TH+/ER81+. Esta disminución va acompañada por un incremento significativo en el número de células GFP+/TH-/ER81+ que confirmaría que PBX1 no regula la expresión de ER81.

Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de ER81 en las células GFP- por la variabilidad entre animales control a pesar de haber una tendencia a la disminución de la expresión de ER81 en las células GFP-.

**Figura R30: PBX1 reprime la expresión de PBX2.** (A, B) Imagen de microscopía confocal de la triple inmunofluorescencia de GFP (verde), TH (azul) con PBX2 (rojo) de una sección coronal del OB de animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) (A) y mutantes (*Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; TH-CRE) (B) de dos meses de edad. (A'), (A''), (A''') ampliación de células GFP+(verde)/TH+(azul)/PBX2- y una célula GFP+(verde) /TH+(azul)/PBX2+(rojo) en animales control. (B'), (B''), (B''') ampliación donde se aprecia el incremento de células GFP+(verde)/TH-/PBX2+(rojo) y una célula GFP+(verde)/TH+(azul)/PAX6+(rojo) en mutantes para PBX1. (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para TH que co-localizan con PBX2. Los resultados mostraron que el 92,61% ± 2,27 sem de las células TH+ (n=3) expresaban PBX2 en animales control. (D) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que co-localizan con PBX2. Los resultados mostraron que el 32,62% ± 3,44 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban PBX2 en animales control y un 68% ± 0,54 sem de las células GFP+ (n=3) expresaban PBX2 en animales mutantes. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \* p < 0,05. (E) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o PBX2+/PBX2- de la PGL. La cuantificación mostró diferencias signifi-

cativas en el número de células GFP+/TH+/PBX2+ entre animales control (416,1 ± 3,46; n=3) y mutantes para PBX1 (204,7 ± 2,85; n=3); en el número de células GFP+/TH+/PBX2- entre animales control (17,0 ± 0,59; n=3) y mutantes para PBX1 (0 ± 0; n=3) y en el número de células GFP+/TH-/PBX2+ entre animales control (391,4 ± 3,45; n=3) y mutantes para PBX1 (698,5 ± 7,61; n=3). La cuantificación no mostró diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/PBX2- entre animales control (316,5 ± 5,42; n=3) y mutantes para PBX1 (262,5 ± 4,28; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP positivas y/o TH+/TH- y/o PBX2+/ PBX2- por mm2 de sección analizada. Tukey's test de comparación múltiple: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. (F) Cuantificación del número promedio de células GFP-/TH-/ PBX2+ de la PGL. La cuantificación mostró diferencias significativas en el número de células GFP-/TH-/ PBX2+ entre animales control (826,4 ± 6,56; n=3) y mutantes para PBX1 (1586,0 ± 10,04; n=3). Los datos representan el promedio ± sem del número de células GFP-/TH-/ PBX2+ por mm2 de sección analizada. T-Student de dos colas: \*\* p < 0,01. Los triángulos negros de las figuras señalan células GFP+/TH+/FT+. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT-. Los triángulos naranjas de las figuras señalan células GFP+/TH-/FT+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala: 25µm en A, B y 5µm en A', A'', A''', B', B'', B'''. ►



Como hemos observado en este trabajo, PBX2, se expresa en el BO de manera generalizada tanto en la GCL como en la PGL. Contrariamente al resto de FT, PBX2 parece ser un FT prescindible para la diferenciación a neurona DA del BO no obstante, quisimos analizar su expresión en mutantes para PBX1.

Los resultados mostraron que las células TH+ son PBX2+ (93%) (Figura R30 C) y que mutantes para PBX1 incrementan ligeramente el porcentaje de células GFP+ que lo expresan (Figura R30 D). Por tanto, estos resultados sugieren que PBX1 en animales control reprime parcialmente la expresión de PBX2 en el linaje DA del BO.

Como en el caso de la sobreexpresión de GAD67, y ya que PBX1a y PBX2 se co-expresan de forma generalizada en las neuronas DA, es posible que el papel represor de PBX1 sobre PBX2 se restrinja exclusivamente a PBX1b, el cual está expresado en alrededor de un 10% de neuronas del linaje DA (GFP+). Sin embargo, como muestra la Figura R30E, no se detectaron diferencias significativas en el número de células GFP+/TH-/PBX2-, por tanto el papel represor de PBX1b sobre PBX2 estaría limitado a la población TH+, la cual hemos determinado que aproximadamente un 5% expresa PBX1b. Habrá que realizar experimentos adicionales para profundizar en el papel represor de PBX1.

Sorprendentemente, los resultados mostraron también un incremento en el número de células que expresaba PBX2 en la población de células GFP- en animales mutantes para PBX1. Por tanto, los análisis mostraron que PBX1 reprime la expresión de PBX2 y que mutantes para PBX1 incrementan la expresión de PBX2 en el linaje no DA de manera no autónoma celular.

El factor de transcripción DLX2 también está implicado en diferenciación DA (Brill *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente no existen anticuerpos específicos para DLX2 que funcionen en tejido, por ello no pudimos estudiar si PBX1 afecta la expresión de DLX2. Actualmente estamos tratando de analizar este posible papel mediante hibridación *in situ* para *Dlx2*.

En conjunto estos resultados revelaron que PBX1 regula la expresión de MEIS2 y COUP-TF1 y reprime a PBX2 en el linaje DA del OB. Además también sugieren que de manera no autónoma celular PBX1 incrementa la expresión de PAX6 y PBX2 mientras que disminuye la de MEIS2 en animales mutantes.

## 5 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE PBX1 EN DIFERENCIACIÓN DA DEL BO MEDIANTE ELECTROPORACIONES *IN VIVO*

PBX1 se expresa de manera amplia en el cerebro (Roberts *et al.*, 1995), entre las poblaciones neuronales que expresan PBX1 se encuentran las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Villaescusa *et al.*, 2016). Durante la realización de esta tesis se publicó un artículo que describe que PBX1 es necesario para la diferenciación de esta población de neuronas. Por otra parte, se sabe que la dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en el estriado actúa como señal de proliferación para los progenitores de la zona subventricular (O’Keeffe *et al.*, 2009). Por tanto, cabe la posibilidad de que en nuestros mutantes condicionales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-ires-Cre, la proliferación en SVZ, se vea afectada debido a los defectos DA del mesencéfalo.

Aunque nuestros experimentos con inyecciones de BrdU indican que no hay defectos obvios en proliferación y/o migración en el BO de mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; TH-ires-Cre, para poder concluir inequívocamente si PBX1 tiene una función autónoma en diferenciación DA del bulbo, paralelamente a los experimentos anteriormente descritos se recurrió a la técnica de la electroporación *in vivo* en animales neonatos para marcar progenitores DA (Inoue *et al.*, 2001; Barnabé-Heider *et al.*, 2008). Además estos experimentos se complementaron con rescates específicos mediante la electroporación de distintas isoformas de *Pbx1*.

### 5.1. Análisis de la pérdida de función de PBX1 mediante la electroporación de la CRE-recombinasa

Estos experimentos se realizaron en paralelo a los análisis de los mutantes *Pbx1*; *Pbx2*; TH-ires-CRE por tanto aun no conocíamos si PBX2 tenía un papel en diferenciación DA por lo que decidimos realizar las electroporaciones en el doble mutante *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*.

Para llevar a cabo los experimentos, se electroporó un plásmido de expresión constitutiva de la CRE-recombinasa fusionada a GFP, en los progenitores de la zona subventricular dorsal (donde residen los progenitores DA), en animales neonatales control y animales KO para PBX2 con el gen *Pbx1* flanqueado por las secuencias LoxP (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*) (Tabla M1 de material y métodos). Los animales se analizaron a los 31 días después de la electroporación.

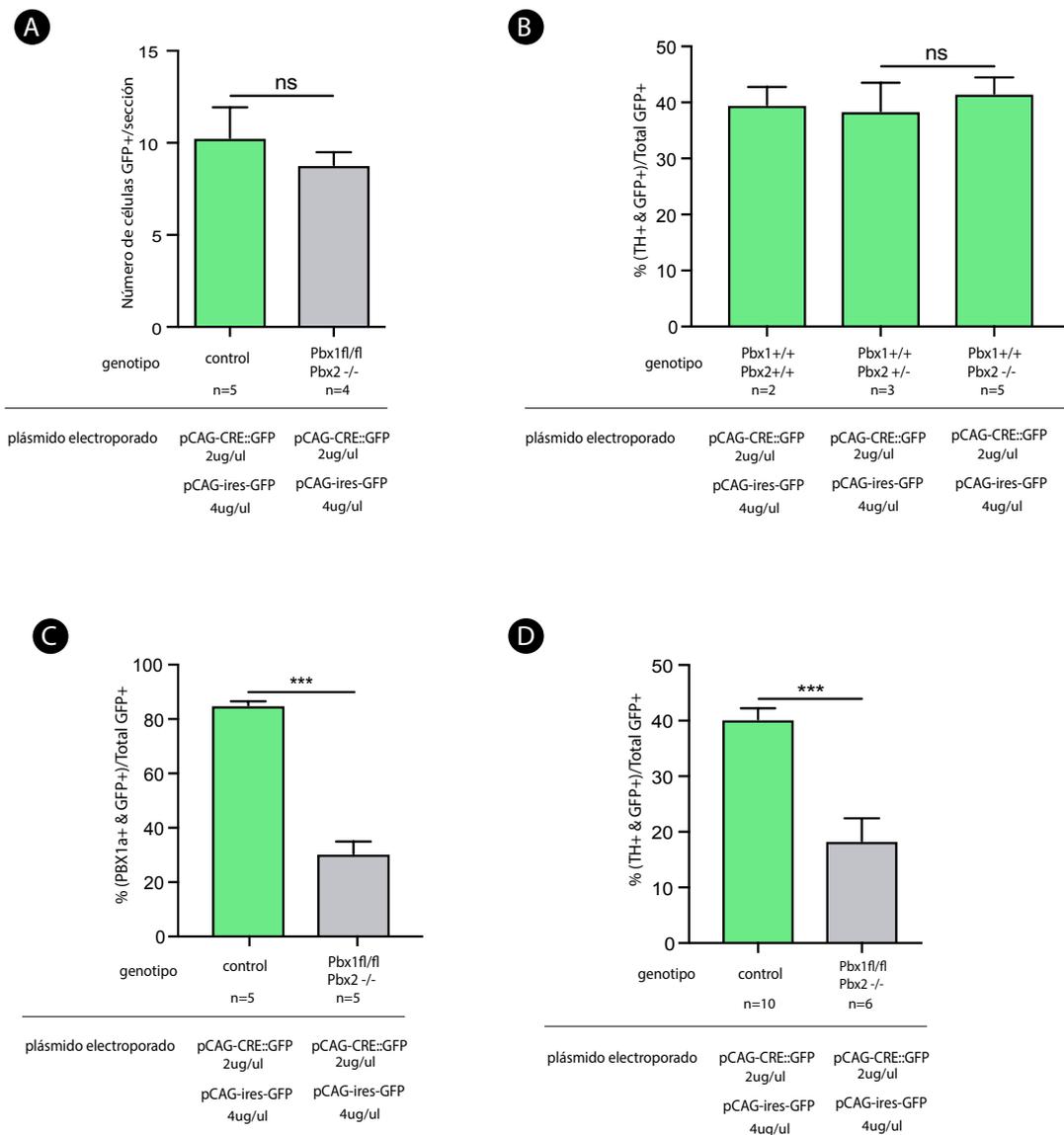
Se ha publicado que la delección en progenitores de *Pbx1* mediante retrovirus produce muerte celular (Grebbin *et al.*, 2016), como la CRE inyectada se expresa de forma constitutiva, el primer paso fue analizar el número de células GFP positivas que llegaban al BO en controles y dobles mutantes.

Como se aprecia en la Figura R31 A no encontramos diferencias significativas en el número de células GFP en la capa PGL, por tanto nuestro diseño experimental no parece producir muerte celular. Con el objetivo de descartar posibles diferencias entre los genotipos *Pbx2<sup>+/+</sup>*; *Pbx1<sup>+/+</sup>*, *Pbx2<sup>+/-</sup>*; *Pbx1<sup>+/+</sup>* y *Pbx2<sup>-/-</sup>*; *Pbx1<sup>+/+</sup>*, se co-electroporaron los plásmidos de expresión constitutiva de la CRE-recombinasa fusionado a GFP y el plásmido de expresión constitutiva de GFP en los progenitores de la SVZ dorsal en animales neonata-

les a cada uno de los distintos genotipos. Como muestra la Figura R31 B. Los tres genotipos presentaron un porcentaje similar de células GFP+ diferenciadas a DA. Por tanto, cualquiera de ellos podía ser usado como genotipo control en los próximos experimentos.

A continuación quisimos comprobar que la electroporación de la CRE era capaz de eliminar de forma efectiva la presencia de PBX1 en las células electroporadas. Como muestra la gráfica de R31 C, la electroporación de la CRE produce una disminución de las células positivas para PBX1a .

Una vez comprobado que el diseño experimental era correcto se realizó una doble inmunohistoquímica contra GFP y TH en secciones coronales del BO y se cuantificaron el número de células verdes que se habían diferenciado a dopaminérgicas en la PGL. Tras el análisis se observó que en los animales dobles mutantes el porcentaje de células doble positivas para TH y GFP era significativamente inferior al de los animales control (Figura R31 D).



## 5.2. Experimentos de rescate del fenotipo

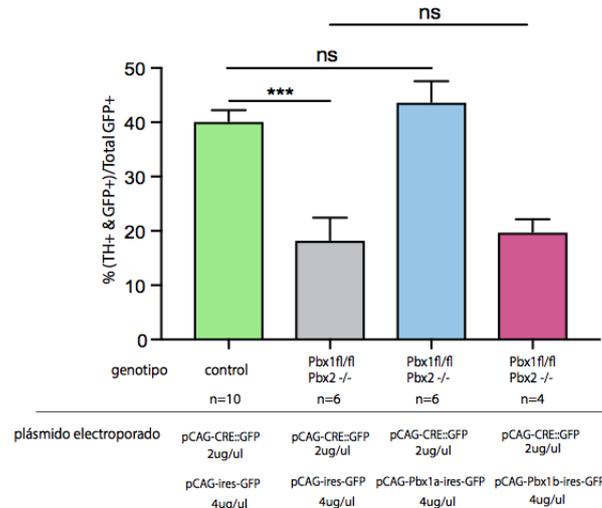
Las electroporaciones *in vivo* nos ofrecen una manera rápida y sencilla de modificar genéticamente las células. Por tanto, una vez establecido el fenotipo que produce la pérdida de función de PBX1 de forma autónoma celular, se decidió realizar experimentos de rescate de función con dos de las isoformas de *Pbx1*: PBX1a y PBX1b.

Como se ha descrito con anterioridad, ambas isoformas contienen el mismo dominio de unión a DNA pero difieren en su Ct, además nuestros análisis demostraron que PBX1a pero no PBX1b se expresa en las neuronas DA del bulbo. En los experimentos de rescate se co-electroporó por una parte la CRE recombinasa y por otra un plásmido que expresaba el factor de transcripción seguido de IRES GFP, ambos de expresión constitutiva (Tabla M1 de material y métodos).

Pasados los 31 días después de la electroporación se sacrificó al animal y se realizó una doble inmunohistoquímica contra GFP y TH en secciones coronales del BO de animales de un mes de edad. Tras la cuantificación los resultados mostraron que los animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con CRE y PBX1a presentaban un porcentaje similar de células TH/GFP al control mientras que los animales co-electroporados con CRE y PBX1b mantenían porcentajes similares a los dobles mutantes (Figura R32). Por tanto estos resultados sugieren que la isoforma PBX1a y no PBX1b participa en la diferenciación a neurona DA del BO.

◀ **Figura R31: Experimentos de electroporación *in vivo* demuestran que PBX1 es necesario para la expresión del gen Th.** (A) Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP del BO en animales control y *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. Los animales control ( $10,56 \pm 2,00$ ; n=5) y mutantes ( $8,53 \pm 0,56$ ; n=4) no muestran diferencias significativas. Los datos representan el promedio  $\pm$  sem del número de células GFP positivas por sección analizada. T-Student de dos colas. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH en la PGL de animales control con genotipo *Pbx1<sup>+/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*, *Pbx1<sup>+/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/-</sup>*, *Pbx1<sup>+/-</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El  $39,57\% \pm 3,20$  sem de las células GFP+ expresan TH (n=2) en animales *Pbx1<sup>+/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/+</sup>*. El  $38,46\% \pm 5,06$  sem de las células GFP+ expresan TH (n=3) en animales *Pbx1<sup>+/+</sup>*; *Pbx2<sup>+/-</sup>*. El  $41,58\% \pm 2,90$  sem de las células GFP+ expresan TH (n=5) en animales *Pbx1<sup>+/-</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*. Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del

porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas. (C) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que expresan PBX1a en la PGL de animales control y *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El  $85,07\% \pm 1,47$  sem de las células GFP+ expresan PBX1a (n=5) en animales control. El  $30,47\% \pm 4,50$  sem de las células GFP+ expresan PBX1a (n=5) en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*. Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \*\*\* p < 0,001. (D) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH en la PGL de animales control y *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El  $40,24\% \pm 2,00$  sem de las células GFP+ expresan TH (n=10) en animales control. El  $18,37\% \pm 4,06$  sem de las células GFP+ expresan TH (n=6) en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*. Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \*\*\* p < 0,001.



▲ **Figura R32: PBX1a pero no PBX1b rescata el fenotipo en los dobles mutantes.** Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH en la PGL de animales control co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP, animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP, animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-Pbx1a-ires-GFP y animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-Pbx1b-ires-GFP. El 40,24% ± 2,00 sem de las células GFP+ expresan TH (n=10) en animales control co-electroporados

con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El 18,37% ± 4,06 sem de las células GFP+ expresan TH (n=6) en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El 43,76% ± 3,80 sem de las células GFP+ expresan TH (n=6) en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* pCAG-CRE::GFP y pCAG-Pbx1a-ires-GFP. El 19,85% ± 2,28 sem de las células GFP+ expresan TH (n=4) en animales *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* pCAG-CRE::GFP y pCAG-Pbx1b-ires-GFP. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. Tukey's test de comparación múltiple: \*\*\* p < 0,001.

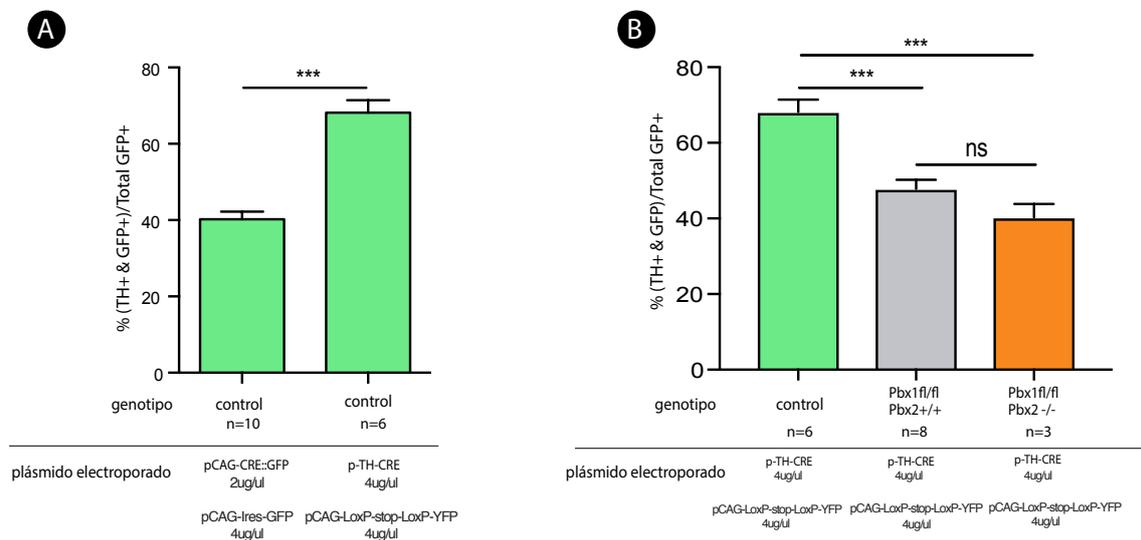
### 5.3. Análisis de la pérdida de función de PBX1 específica de linaje dopaminérgico

Finalmente, con el objetivo de poder estudiar la función de PBX1 en la diferenciación terminal a neurona DA, afectando únicamente al linaje dopaminérgico de forma exclusiva en el BO y de forma más terminal, se decidió utilizar un plásmido de expresión más restringida. Para ello se clonó la región de 5 kilobases aguas arriba del inicio de transcripción de *Th* frente a la CRE. Otra modificación con respecto al experimento anterior, fue la co-electroporación de un plásmido con la secuencia LoxP-stop-LoxP::YFP en vez de un vector que expresara GFP constitutivamente para poder detectar de entre las células electroporadas, solo aquellas en las que la CRE había funcionado. La electroporación de este plásmido muestra un patrón de expresión más específico del linaje dopaminérgico que la electroporación con GFP de expresión constitutiva (Figura R33 A).

En base a los resultados anteriores, se electroporó este plásmido en controles y mutantes tanto *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* como dobles mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>*. Pasados 31 días después de la electroporación, se sacrificaron los animales y se realizó una doble inmunohistoquímica contra GFP y TH en secciones coronales del BO de animales control, mutantes para PBX1 y dobles mutantes.

Los resultados mostraron como en animales *Pbx1*<sup>fl/fl</sup> inyectados con CRE el porcentaje de células dobles TH/GFP era significativamente inferior al de los animales control. Por otra parte, los análisis también revelaron que no existían diferencias significativas entre el porcentaje de células dobles TH/GFP de animales mutantes para PBX1 y dobles mutantes, lo que coincide con nuestro análisis de los mutantes con la línea transgénica TH-ires-CRE (Figura R33 B).

Por tanto, en conjunto, estos resultados confirmaron una vez más que PBX2 es prescindible para la diferenciación terminal a neurona DA del BO. Además, también demostraron que el fenotipo observado en el bulbo olfatorio no es un efecto indirecto de defectos en la proliferación y que la reducción en el número de neuronas dopaminérgicas se debía a la pérdida de *Pbx1* en la neurona en diferenciación.



▲ **Figura R33: Electroporaciones *in vivo* de la CRE recombinasa bajo el promotor de *Th* muestran un patrón de expresión más específico de linaje dopaminérgico del BO y reducen significativamente el número de células TH+ en la PGL.** (A) Análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH en la PGL de animales control co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP y animales control co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. El 40,24% ± 2,00 sem de las células GFP+ expresan TH (n=10) en animales control co-electroporados con el plásmido pCAG-CRE::GFP y pCAG-ires-GFP. El 68,14% ± 3,28 sem de las células GFP+ expresan TH (n=6) en animales control co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas:

\*\*\* p < 0,001. (B) Análisis cuantitativo del % de células positivas para GFP que expresan TH en la PGL de animales control, *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; *Pbx2*<sup>+/+</sup>, *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup> co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. El 68,14% ± 3,28 sem de las células GFP+ expresan TH (n=6) en animales control co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. El 47,83% ± 2,38 sem de las células GFP+ expresan TH (n=8) en animales *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; *Pbx2*<sup>+/+</sup> co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. El 40,29% ± 3,50 sem de las células GFP+ expresan TH (n=3) en animales *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup> co-electroporados con el plásmido pTH-CRE y pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP. Los valores representan el promedio ± del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. Tukey's test de comparación múltiple: \*\*\*p<0,001.

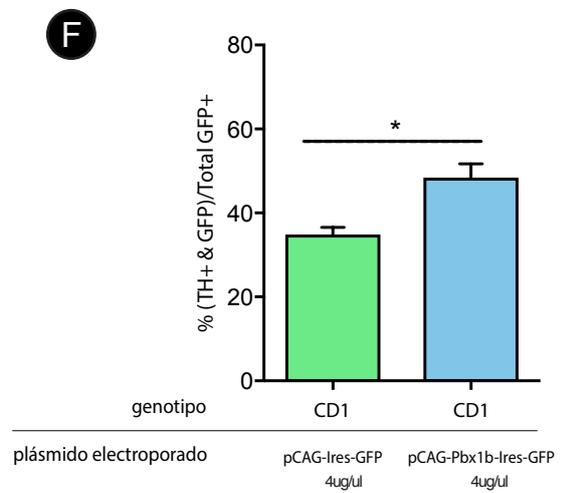
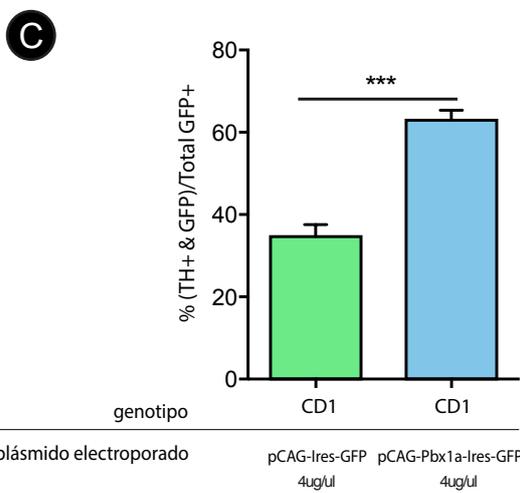
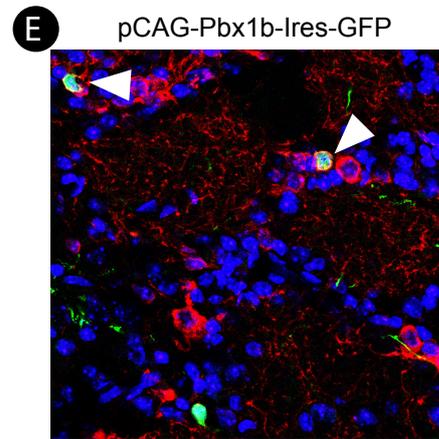
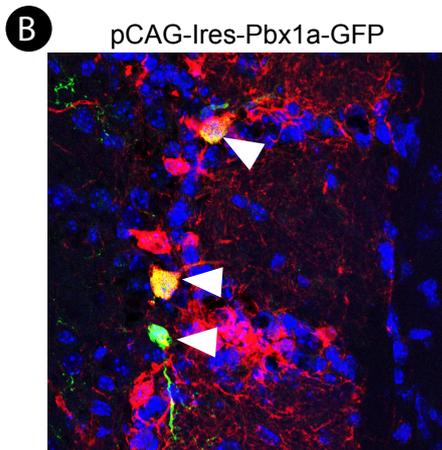
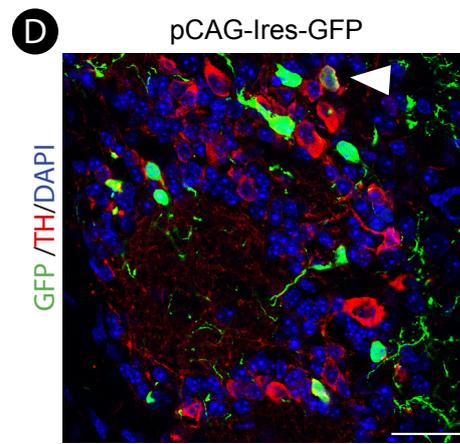
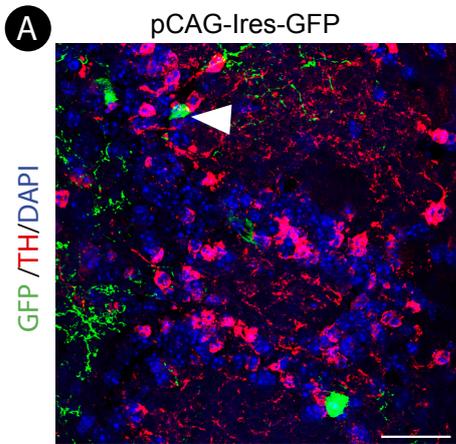
#### 5.4. Análisis de la sobreexpresión de los factores de transcripción PBX1a y PBX1b

Finalmente, se realizaron experimentos de ganancia de función con el objetivo de estudiar si la sobreexpresión de los FT PBX1a y PBX1b incrementaba el número de neuronas DA del OB. Para ello, se electroporaron animales CD1 con el plásmido pCAG-Ires-GFP como control y el plásmido pCAG-FT-Ires-GFP con el FT correspondiente (Tabla M1 de material y métodos). Debido a la variabilidad existente entre los distintos experimentos los resultados de cada FT se compararon con sus controles correspondientes.

Pasados los 31 días después de la electroporación, se sacrificaron y se realizó una doble inmunohistoquímica para GFP y TH en animales control y en animales con sobreexpresión del FT correspondiente (Figura R34). Tras la cuantificación, los resultados mostraron que la sobreexpresión de los dos factores incrementaba significativamente el número de células GFP+/TH+, con respecto a la sobreexpresión del plásmido control, siendo mayores los aumentos en el caso de PBX1a. Estos datos sugieren que PBX1a y PBX1b participan en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del BO.

**Figura R34: La sobreexpresión de PBX1a y PBX1b incrementa el número de células TH+ en el BO.** (A, B, D, E) Imagen de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia para GFP (verde) y TH (rojo) de una sección coronal del BO de animales CD1 electroporados con el plásmido pCAG-Ires-GFP (A), (D), pCAG-Pbx1a-Ires-GFP (B) y pCAG-Pbx1b-Ires-GFP (E). (C) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH. Los resultados mostraron que el  $34,67\% \pm 2,91$  sem de las células GFP+ (n=3) expresaban TH en animales CD1 electroporados con pCAG-Ires-GFP y un  $59,30\% \pm 2,35$  sem (n=7) en animales electroporados con pCAG-

Pbx1a-Ires-GFP. (F) Análisis cuantitativo de la PGL del BO del porcentaje de células positivas para GFP que expresan TH. Los resultados mostraron que el  $34,67\% \pm 2,91$  sem de las células GFP+ (n=3) expresaban TH en animales CD1 electroporados con pCAG-Ires-GFP y un  $48,03\% \pm 3,66$  sem (n=3) en animales electroporados con pCAG-Pbx1b-Ires-GFP. Los valores representan el promedio  $\pm$  del error estándar de la media (s.e.m) del porcentaje de células doble positivas. T-Student de dos colas: \* p < 0,05. \*\*\*p<0,001. Los triángulos blancos de las figuras señalan células GFP+TH+. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Escala 25 $\mu$ m. ►

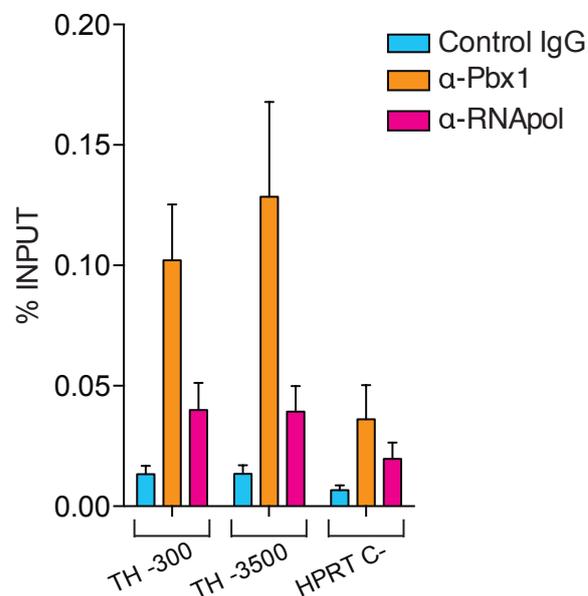


## 6 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA CON PBX1

Los experimentos de pérdida de función de PBX1 muestran que es necesario para la expresión de TH. Por ello, quisimos analizar si PBX1 regulaba la expresión de *Th* mediante la unión directa a su región promotora.

Dado que se había publicado que MEIS2 (FT necesario para la diferenciación DA) se unía a 3500 y a 300pb (pares de bases) aguas arriba del codón de inicio del gen *Th*, que además en esas regiones habían sitios de unión del tipo homeodominio (Agoston *et al.*, 2014) y que adicionalmente se ha visto que a estas dos regiones también se une ER81 (John W. Cave *et al.*, 2010), decidimos analizar esas dos regiones como posibles sitios de unión de PBX1. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) seguidos de una PCR cuantitativa (qPCR) de células del BO de animales CD1 de 2 meses de edad.

Paralelamente a la realización de los experimentos, se publicó que PBX1 se unía a 3500 pb (pares de bases) aguas arriba del codón de inicio del gen *Th* (Grebbin *et al.*, 2016) tal y como también demuestran nuestros resultados. Sin embargo, nuestros análisis no sólo confirmaron los resultados ya publicados sino que además revelaron un nuevo sitio de unión de PBX1 a 300pb aguas arriba del codón de inicio del gen *Th* (Figura R35).



▲ **Figura R35: PBX1 se une a la región promotora de *Th* en el BO.** La unión específica de PBX1 a las regiones -300 y -3500 aguas arriba del codón de inicio del gen *Th* se detectó mediante un análisis de inmunoprecipitación de cromatina seguido de una PCR cuantitativa de células del BO de animales CD1 de dos meses de edad (n=4). La región 3' UTR del gen *Hprt* se utilizó como control negativo.





**discusión**



El sistema nervioso está dotado de una amplia variedad de neuronas con morfologías y funciones distintas que vienen dadas por la expresión específica de una batería de genes efectores. Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que, en *C.elegans*, la expresión de gran parte de los genes efectores de las neuronas dopaminérgicas está regulado por la combinación de tres factores de transcripción: un factor ETS (AST-1), un factor DLL (CEH-43) y un factor PBX (CEH-20/CEH-40) (Doitsidou *et al.*, 2013; Flames *et al.*, 2009).

Estudios en ratones muestran que el homólogo para el factor ETS (la proteína ER81) y para el factor DLL (la proteína DLX2) son necesarios para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del BO (Brill *et al.*, 2008; Flames *et al.*, 2009) revelando una posible conservación evolutiva de la lógica de regulación de los genes de la vía de la DA.

Sin embargo, el papel de los PBX en especificación dopaminérgica ha sido poco estudiado hasta la fecha. Por ello, en este trabajo hemos centrado nuestro interés en analizar la función de los factores de transcripción de la familia PBX en la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas en el BO de ratón.

### **Las isoformas de *Pbx1* se expresan de forma diferencial en los distintos estadios de diferenciación dopaminérgica.**

Recientemente se ha descrito la expresión de PBX1 en los progenitores de la zona subventricular (Grebbin *et al.*, 2016), en nuestros experimentos de expresión hemos determinado que los progenitores son negativos para PBX1a y que la expresión de PBX1 corresponde específicamente a la isoforma PBX1b.

Por otra parte, el análisis de la población DCX+ en la SVZ (correspondiente a los neuroblastos en migración) reveló que los neuroblastos expresan ambas isoformas, PBX1a y PBX1b. Recientemente se ha publicado que la proteína de unión a RNA PTBP1, inhibe la expresión del exón 7 específico de la isoforma PBX1a. Este trabajo utiliza células madre embrionarias de ratón (mESC) que diferencian a precursores neuronales y más tarde a moto-neuronas. La expresión de PTBP1 es elevada en mESC y al inicio de la diferenciación a precursor neuronal inhibiendo la expresión de PBX1a. Además, una expresión temprana de PBX1a en mESC altera los perfiles de expresión e induce la diferenciación temprana mediante la expresión de genes neuronales (Linares *et al.*, 2015).

Sería interesante determinar si la expresión de PTBP1 en la SVZ es homóloga a la observada *in vitro* y si PTBP1 también tiene un papel en la regulación del equilibrio de expresión de las isoformas *Pbx1* en los progenitores y neuroblastos de la SVZ así como en el control del equilibrio entre proliferación y diferenciación.

Por otra parte, hemos observado que los neuroblastos, una vez alcanzan su destino final en el BO y maduran cambian de nuevo su complemento de factores PBX. Un elevado porcentaje de células TH+ expresa PBX1a (98%) y PBX2 (96,34%) pero son PBX1b (4%) y PBX3 (0%) negativas. De hecho, considerando las tres poblaciones maduras mayoritarias de la capa periglomerular (TH, CR y CB) observamos que todas ellas expresan PBX2, el cual no es expresado por los neuroblastos migradores.

Por tanto, mientras que la expresión de PBX2 coincidiría con las neuronas maduras, de manera complementaria, la expresión de PBX1b, presente en todos los neuroblastos en migración desaparece casi por completo de las neuronas maduras (CR, CB y TH) con lo que la presencia de 1b, correlaciona con bloqueo de la diferenciación. En base a estos perfiles de expresión sería interesante determinar los sitios de unión en el genoma de las distintas isoformas de *Pbx1* y de *Pbx2* en los diferentes estadios de diferenciación dopaminérgica del bulbo.

Paralelamente, otra conclusión interesante de los resultados del análisis de expresión es que ninguno de los factores de transcripción de la familia PBX es exclusivo de un único tipo celular, apoyando la idea de que la especificidad celular no está determinada por un solo factor de transcripción sino por la combinación de varios de ellos. En este sentido, es importante mencionar que hemos observado que, en el BO, la expresión solapada de PBX1a junto con la expresión de ER81 (factor necesario para diferenciación DA tanto en *C. elegans* como en ratón) sí es exclusiva de neuronas DA maduras.

Finalmente, hemos observado que la expresión de factores PBX en el BO adulto es diferente a la neonatal. Por una parte, PBX1a y PBX2, que no se expresan en progenitores adultos, se expresan en la capa proliferativa a P0. Por otra parte, PBX3, que no se expresa en neuronas DA en el adulto se detecta en las neuronas DA presentes a P0. Estos datos sugieren que los programas genéticos que regulan tanto los progenitores como la diferenciación neuronal del bulbo de neonatos y adultos podrían ser diferentes.

Existen otros casos que describen diferencias de expresión entre estadios perinatales y adultos del bulbo, se sabe por ejemplo que la expresión del factor de transcripción COUP-TF1 en el bulbo empieza alrededor del día postnatal 14 y marca de forma exclusiva las neuronas dopaminérgicas del bulbo con lo que se ha sugerido que el papel de COUP-TF1 se limita a la diferenciación de neuronas DA adultas (Bovetti *et al.*, 2013).

### **La expresión de PBX1 en precursores neuronales es esencial para la viabilidad del embrión.**

Los mutantes convencionales para PBX1 mueren alrededor del día embrionario 15 debido a problemas generalizados de organogénesis (Selleri *et al.*, 2001), lo que impide su uso para el estudio de la neurogénesis del BO, por ello decidimos recurrir a mutantes condicionales con el alelo para *Pbx1* flanqueado por secuencias LoxP reconocidas por la CRE recombinasa.

En nuestra primera aproximación decidimos utilizar la CRE recombinasa expresada específicamente en progenitores neurales (*Nestina*-CRE). Para nuestra sorpresa, estos ratones condicionales también son letales, aunque a estadios un poco más tardíos, ya que pudimos establecer que mueren poco después de nacer aunque no determinamos la causa de la muerte. Por tanto, los animales tuvieron que ser analizados el último día de gestación (E17,5). PBX1 se expresa en todas las áreas de cerebro incluyendo córtex cerebral, hipocampo, estriado, tálamo, cerebelo, mesencéfalo y rombencéfalo. Por tanto es muy posible que tenga un papel en especificación de distintas subpoblaciones neuronales (actuando

con co- factores específicos de tipo celular) y que por ello, la delección global en el sistema nervioso sea letal.

A pesar de la mortalidad temprana, pudimos determinar que mutantes *Nestina-CRE*, *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* muestran una reducción en la población dopaminérgica del BO sugiriendo que PBX1 es necesario para la generación y/o diferenciación a neurona dopaminérgica embrionaria del BO olfatorio. Contrariamente a lo observado en mutantes para PBX1, los experimentos de inmunotinción en animales mutantes para PBX2 analizados a E17,5 no mostraron defectos en la población dopaminérgica sugiriendo que, o bien PBX2 no es necesario para la diferenciación dopaminérgica embrionaria del BO o bien que PBX1 es capaz de compensar la falta de PBX2 y que por tanto los factores podían ser redundantes entre sí como ya se había descrito anteriormente en otros tejidos (Licia Selleri *et al.*, 2004). Sin embargo, el estudio de la población dopaminérgica en los dobles mutantes *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*; *Pbx2<sup>-/-</sup>*; *Nestina-CRE*, reveló que el fenotipo observado era el mismo que en los mutantes simples para PBX1 descartando por tanto, una posible redundancia entre los dos factores de transcripción.

### **El gen tirosina hidroxilasa se expresan en otras células además de las neuronas DA maduras.**

En nuestra segunda aproximación, decidimos utilizar la recombinasa expresada en el locus endógeno de la enzima Tirosina Hidroxilasa (enzima de la vía de la síntesis de catecolaminas expresada en el cerebro en neuronas DA, noradrenérgicas y adrenérgicas). Esta estrategia deleciona *Pbx1* de manera mucho más restringida en tiempo y en espacio y por tanto esperamos evitar la letalidad.

Se ha descrito que la expresión del gen *Th* en el BO (analizada mediante la presencia de mRNA por hibridación *in situ*) no siempre coincide con la presencia de la proteína TH (Baker *et al.*, 1993; McLean *et al.*, 1988). De hecho se detectan células mRNA *Th* positivas/TH proteína negativas en la zona granular externa (Baker *et al.*, 2001 y nuestras propias observaciones).

En base a estas observaciones decidimos caracterizar la expresión de GFP en nuestro ratón RCE;TH-ires-CRE. Coincidiendo con los datos observados previamente, vemos que por un lado, como es de esperar todas las células TH son GFP pero que además existen células GFP adicionales TH negativas en la capa granular externa y la periglomerular. Es importante mencionar que no se observan células GFP ni en la SVZ ni en el camino migrador rostral, por tanto podemos descartar que estemos delecionando *Pbx1* en progenitores o en neuroblastos migradores.

Un estudio un poco más detallado de las células GFP positivas TH negativas muestra que, en la capa periglomerular, se trata de células en su gran mayoría GAD67 positivas (78%) pero CR y CB negativas, por tanto hay dos posibilidades, o bien se trata de células del linaje dopaminérgico inmaduras que aún no han encendido la expresión de TH o bien se trata de una población de interneuronas GABAérgica adicional aún no descrita.

Por otra parte, nuestros análisis han mostrado que algunas de las células GFP positivas de la capa granular superficial expresa el marcador CR, por tanto en este caso podemos decir que el linaje DA (definido como aquel linaje que en algún momento ha encendido la expresión de TH) también da lugar a este tipo celular no dopaminérgico.

En resumen, nuestros resultados muestran al menos 5 subpoblaciones distintas dentro del linaje DA (definido como aquel formado por células que en algún momento de su historia han expresado el gen *Th*): dos subpoblaciones en la capa granular superficial, una CR+ y la otra CR-, una subpoblación de la capa PGL TH proteína positiva (y PBX1a positiva) y por último dos subpoblaciones de la capa PGL en la que no se detecta la proteína TH [una caracterizada por la expresión de PBX1a (el 40%) y otra por carecer de expresión de PBX1a (el 60% de las GFP no TH)].

En base a estas observaciones, parece probable que *in vivo*, la expresión del gen *Th* sea bastante temprana en el proceso de diferenciación DA y que parte de las células que encienden su expresión luego la apagan y se diferencian a otros tipos celulares no DA mientras que otra parte inicia el proceso de maduración total a dopaminérgica traduciendo el mRNA a TH proteína y encendiendo la expresión del transportador de DA (DAT).

Coincidiendo con este modelo, hemos observado que en la cepa RCE; DAT-CRE la expresión de GFP solapa al 100% con la proteína TH y no hay células verdes que no sean TH proteína, por tanto la expresión del gen *Th* sería más amplia, y probablemente también más temprana a la expresión del gen *Dat*. Si esto es cierto, entonces nuestra estrategia estaría delecionando *Pbx1* en estadios de diferenciación temprana de las neuronas DA (*Th* mRNA positiva/ *Dat* mRNA negativas) y por tanto estaríamos estudiando un papel de PBX1 en diferenciación tardía de linaje DA.

Alternativamente, es posible que la deleción efectiva de *Pbx1* tenga lugar ya en neuronas DA maduras (que ya habían iniciado la expresión de DAT) y por tanto nuestro modelo animal estaría analizando el papel de PBX1 en mantenimiento de identidad y no en diferenciación.

Para distinguir entre estas dos posibilidades actualmente estamos llevando a cabo dos estrategias complementarias: por una parte estamos realizando inyecciones a distintos tiempos de BrdU en animales RCE;TH-ires-CRE para estudiar la dinámica de expresión de GFP y proteína TH en el tiempo y determinar si realmente las células son primero GFP no TH y más tarde GFP/TH. Por otra parte hemos generado la cepa *Pbx1*<sup>fl/fl</sup>; RCE; DAT-CRE, en la cual estamos analizando de forma inequívoca el papel de PBX1 en mantenimiento de identidad neuronal.

### **PBX1 pero no PBX2 es necesario para la especificación de neuronas DA en el BO.**

Como esperábamos la deleción de *Pbx1* mediante TH-ires-CRE produce animales viables. Nuestro análisis del BO muestra un descenso dramático en el número de células DA (determinado por las células TH positivas). Por el contrario, mutantes para PBX2 no muestran defectos de identidad en el BO (en las poblaciones TH, CR o CB), además el fenotipo de los dobles mutantes PBX1,PBX2 es similar al de mutantes simples para PBX1,

por tanto, al igual que habíamos visto en nuestro análisis embrionario de ratones *Nestin-CRE*, PBX2 no parece tener efectos compensatorios ni redundantes con PBX1 en este contexto.

Nuestros resultados sugieren que PBX1 tiene un papel en la diferenciación DA del BO y dados los distintos patrones de expresión que muestran las isoformas de *Pbx1* quisimos analizar si este papel era específico de isoforma o no.

Ambas isoformas se expresan en neuroblastos inmaduros pero sólo la expresión de PBX1a se mantiene en neuronas DA maduras. Se ha descrito que muchos de los factores necesarios para diferenciación tardía se requieren también de forma continuada para mantener la identidad celular (Deneris *et al.*, 2014). Nuestros experimentos de rescate con PBX1a y PBX1b muestran que es la isoforma PBX1a la que tiene un papel en diferenciación DA coincidiendo con su expresión continuada en estas neuronas. Sería interesante estudiar en un futuro si PBX1a interacciona de forma específica con otros factores de transcripción (por ejemplo si PBX1a interacciona con ER81 y esta interacción esta mediada por el dominio específico de PBX1a no presente en PBX1b).

De manera complementaria, nuestros experimentos de sobreexpresión de PBX1a mediante electroporaciones muestran que este factor es suficiente para inducir diferenciación DA en ciertos contextos celulares. En estos experimentos PBX1b también es capaz de incrementar el número de células electroporadas TH+ y una posible explicación sería que al sobreexpresar el factor en niveles altos, junto con la presencia de niveles endógenos de PBX1a resulte suficiente para inducir la diferenciación DA.

Finalmente, quisimos analizar si el papel de PBX1 en la expresión del gen *Th* podría ser directo. Técnicamente no nos ha sido posible realizar experimentos de ChIP con anticuerpos específicos de isoforma, por tanto no podemos distinguir si la unión que analizamos es de PBX1a, PBX1b o ambos.

Nuestros experimentos muestran que PBX1 se une al menos a dos regiones reguladoras del gen *Th* (una a - 3.5 Kb y otra a -250 bp). Recientemente se ha publicado el mismo resultado en referencia al sitio distal (Grebbin *et al.*, 2016), esta región coincide con una zona de unión para MEIS2, un co-factor clásico de PBX y que también es necesario para la diferenciación da del BO (Agoston *et al.*, 2014). Por otra parte, el nuevo sitio que hemos determinado, de unión de PBX1 a la zona proximal de *Th* coincide con un sitio de unión para el factor ER81, el cual es también necesario para la diferenciación DA (Brouwer *et al.*, 2007).

Por tanto parece que PBX1a podría unirse de forma amplia a las secuencias reguladoras activas de los genes selectores de las neuronas DA del BO. Sería interesante, en el futuro determinar el perfil de unión de PBX1a en las neuronas DA el bulbo así como el perfil de secuencias reguladoras activas en estas células para conocer mejor como ejerce PBX1a su función.

Nuestros datos muestran el papel clave de PBX1 (probablemente PBX1a) en la expresión del gen *Th*. Sin embargo, en general los factores de transcripción no regulan un único gen sino que tienen varias dianas, además, según el modelo de FT selectores terminales, estos regulan de forma global la expresión de genes efectores de una célula (Hobert, 2011).

De hecho, CEH-20, el homólogo en *C.elegans* de PBX, es necesario para la expresión no sólo del gen *Th* sino también de otros genes de la vía de síntesis de dopamina (como el transportador *Dat*, el transportador de vesicular *Vmat* o las enzimas GTPciclo hidrolasa y dopamina decarboxilasa). Sería importante establecer si la ausencia de PBX1 afecta la expresión de estos genes en las neuronas DA del BO. Desafortunadamente no existen buenos anticuerpos para estas proteínas, actualmente estamos analizando defectos de expresión mediante hibridación *in situ*. Estos resultados nos permitirán establecer si PBX1 tiene un papel más amplio en diferenciación DA que no se limita al gen *Th*.

### **La delección tardía de *Pbx1* no produce muerte neuronal.**

Recientemente se ha publicado que la delección en neuroblastos migradores de *Pbx1* produce la muerte de estas células (Grebbin *et al.*, 2016). Por tanto, quisimos estimar que sucedía con las células PBX1 mutantes en la cepa *Pbx1<sup>f/f</sup>*; TH-ires-Cre donde la delección del gen se produce de forma más tardía.

En primer lugar realizamos inyecciones de BrdU para marcar una cohorte de células y analizamos su presencia a los 44 días (tiempo suficiente para que las células lleguen al BO y maduren a neuronas DA). Nuestros resultados muestran que el número de células totales BrdU es similar en controles y mutantes y sugieren que la falta de PBX1 no produce muerte neuronal en el linaje DA. Como era de esperar, sí observamos una reducción en el porcentaje de células BrdU/TH positivas, apoyando de nuevo el papel de PBX1 en especificación DA.

Las inyecciones de BrdU marcan todas la células que se generan en la SVZ en el momento de las inyecciones y no solo el linaje DA. Por tanto, para tener un análisis más fino de nuestro fenotipo, nos servimos del alelo RCE que marca de forma permanente las células mutantes mediante la expresión de GFP.

Confirmando lo observado en los ensayos con inyecciones de BrdU, tampoco se detectaron diferencias en el número de células GFP+ entre controles y mutantes demostrando de manera directa, que las células mutantes para PBX1 permanecían en la PGL. Del mismo modo que en el experimento anterior, como era de esperar, la proporción TH/GFP del total de células positivas para GFP disminuyó en mutantes.

En resumen, estos resultados contrastan con una publicación previa en el que la delección de *Pbx1* en neuroblastos migradores produce muerte neuronal. Así pues, PBX1 podría tener funciones pro-supervivencia en estadios tempranos (quizás mediados por la isoforma PBX1b que está expresada en estos estadios y no en neuronas maduras) mientras que en neuronas en diferenciación tardía o ya diferenciadas la acción de PBX1 no sería necesaria para la supervivencia pero sí para dirigir o mantener la identidad celular.

### **PBX1 no es necesario para establecer la identidad GABAérgica de las células DA.**

Las interneuronas DA del BO tienen la capacidad de usar como neurotransmisor tanto DA como GABA, por tanto son interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. La capacidad de sintetizar GABA les viene dada por la expresión del gen ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Existen dos genes *Gad* (*Gad1* o *Gad67* y *Gad2* o *Gad65*) aproximadamente el 85% de las dopaminérgicas del BO expresan GAD67 (Parrish-Aungst *et al.* 2007). Por tanto, una misma neurona expresa tanto los genes efectores de la vía de la DA como los genes efectores GABAérgicos.

En este trabajo hemos analizado si PBX1 tiene un papel exclusivo en diferenciación DA o si por el contrario también afecta otras características de estas células. Para ello hemos determinado la expresión de GAD67 en células del linaje DA mutantes para PBX1.

Nuestros resultados muestran que PBX1 no es necesario para la expresión de GAD67 y por tanto sugieren que PBX1 es prescindible en la determinación GABAérgica. Curiosamente, no solo no vemos defectos de expresión de GAD67 en las células mutantes sino que su expresión podría estar regulada al alza en los mutantes sugiriendo un papel represor de PBX1 en la expresión de este gen.

### **La ausencia de PBX1 induce la expresión de genes efectores de otros linajes.**

Las interneuronas GABAérgicas de la capa periglomerular comprenden tres poblaciones no solapantes (DA, CR y CB). Para nuestra sorpresa, hemos observado que células del linaje DA mutantes para PBX1 expresan de forma ectópica el gen *Cr* o el gen *Cb*. Aunque este fenotipo ocurre en un porcentaje relativamente bajo (aproximadamente un 10-15%) es estadísticamente muy significativo.

Por otra parte, este bajo porcentaje indica que la mayor parte de las neuronas mutantes para PBX1 permanecen en un estado indiferenciado o alternativamente podrían cambiar a otro fenotipo aún por determinar. Finalmente, como el incremento CR/GFP y el CB/GFP representa una mínima parte del total de células CR y CB respectivamente, no se aprecian diferencias en el total de células CR y CB entre controles y mutantes.

Existen al menos dos escenarios que explican la expresión ectópica de genes efectores de otros linajes en el linaje DA:

1) Por una parte PBX1 podría tener un papel dual e inducir de forma directa la identidad DA (mediante su unión a regiones reguladoras de *Th* y otros genes) así como reprimir también de forma directa la expresión de genes efectores de otros linajes (CR y CB por ejemplo). Si esto es así, y lo que se está produciendo en el mutante PBX1 es una desrepresión global de genes no DA y no tanto un cambio de destino celular es posible que no solo existan células de expresión ectópica CR y CB sino que, existan células positivas para ambos marcadores (algo que no ocurre nunca en controles). Actualmente estamos determinando si, en efecto células mutantes PBX1 co- expresan CR y CB.

2) Alternativamente, PBX1 podría por una parte inducir diferenciación DA y a la vez estar inhibiendo destinos alternativos mediante la represión de los factores de transcripción inductores de esas identidades (por ejemplo SP8 y ZIC1 inductores de identidad CR así como FOXP2 inductor de CB). De hecho, en la región del mesencéfalo, donde se ha descrito recientemente que PBX1 regula la diferenciación dopaminérgica, también se ha observado la expresión ectópica del factor de transcripción ONECUT2, que de forma normal se expresa en una población dorsal a las células DA (Villaescusa *et al.*, 2016).

Actualmente estamos analizando si los FT responsables de la diferenciación CR y CB, (SP8, ZIC1, FOXP2) se expresan de forma ectópica en el bulbo olfatorio en células mutantes para PBX1 y si la expresión ectópica de ONECUT2 es específica del mesencéfalo o también se produce en el bulbo.

Aunque inicialmente se asignó un papel fundamental de los selectores terminales es la activación transcripcional de sus genes diana, en los últimos años se está viendo que la represión de programas genéticos alternativos es importante para acabar de definir el transcriptoma activo de una célula. En *C.elegans* se ha descrito que, en la especificación de los distintos subtipos de motoneuronas colinérgicas, los selectores terminales actúan junto con otros FT y reprimen la expresión de los genes que no corresponden a su subtipo específico (Kerk *et al.*, 2017).

También recientemente, el mismo grupo ha descrito que los selectores terminales inducen, no se sabe si directa o indirectamente, la compactación de la cromatina de los genes que no pertenecen al programa genético controlado por esos selectores terminales para así silenciar su posible expresión (Patel *et al.*, 2017).

En mamíferos también existen ejemplos del papel fundamental de la represión en el control del destino celular. La expresión combinada de *Ascl1*, *Brn2* y *Myt1l* es capaz de reprogramar fibroblastos en neuronas. Recientemente se ha visto que aunque *Ascl1* y *Brn2* actúan como activadores mientras que el papel principal de *Myt1l* es reprimir la expresión de genes no neuronales (Mall *et al.*, 2017). En la zona subventricular de las eminencias ganglionares, *Nkx2.1*, factor fundamental en especificación de las interneuronas, actúa como represor en la zona ventricular (Sandberg *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha sugerido que en la médula espinal los progenitores neuronales adquieren sus identidades por represión de destinos alternativos más que por inducción de un programa propio (Kutejova *et al.*, 2016).

En conclusión, parece que activación y represión actúan conjuntamente en especificación neuronal con el fin último de producir programas de transcripción robustos. Nuestros resultados apoyan esta idea y además sugieren que un mismo factor puede actuar simultáneamente como represor y activador. Sería interesante en un futuro determinar qué controla este doble papel de PBX1.

**PBX1 regula la expresión de factores de transcripción necesarios para la diferenciación DA del bulbo olfatorio.**

A lo largo de estos últimos años, se han descrito varios factores de transcripción necesarios para la correcta generación y/o especificación de las neuronas dopaminérgicas del BO como por ejemplo ER81, DLX2, PAX6, COUP-TF1 y MEIS2 (Agoston *et al.*, 2014; Bovetti *et al.*, 2013; Brill *et al.*, 2008; Flames *et al.*, 2009; Ninkovic *et al.*, 2010). Por ello, quisimos investigar si alguno de los factores de transcripción necesarios para la especificación dopaminérgica tienen afectada su expresión en los mutantes condicionales para PBX1.

Nuestros resultados muestran que PBX1 se requiere (no sabemos si directa o indirectamente) para la correcta expresión de COUP-TF1 y MEIS2, mientras que es dispensable para la expresión de PAX6 y ER81. Curiosamente, la falta de PBX1 provoca un ligero aumento en la expresión de PBX2, aunque ese aumento no parece suficiente para compensar el fenotipo dopaminérgico que causa la pérdida de PBX1.

En otros tejidos se ha descrito que la falta de un factor PBX promueve la expresión de otros miembros de la familia, en el mesencéfalo por ejemplo, la falta de PBX1 es compensada por la expresión de PBX3 (Villaescusa *et al.*, 2016). Sorprendentemente, nuestros resultados también sugieren que la falta de PBX1 podría generar cambios importantes a nivel no-autónomo celular ya que en la población independiente al linaje dopaminérgico se observó una disminución en la expresión de MEIS2 así como un aumento de células PAX6 y PBX2.

Estos cambios en perfiles de expresión de FT en el linaje no DA no va acompañado de un aumento en el número de células en el BO (analizado por cuantificación de DAPI) ni por un aumento o disminución de la otras poblaciones de IN mayoritarias el BO (CR y CB), por tanto, aunque parece que hay reajustes importantes en las poblaciones residentes en respuesta a la falta de PBX1, es difícil estimar cual es la consecuencia funcional de estos reajustes. El efecto no autónomo celular de la delección de FT está muy poco estudiado, aunque existen algunos precedentes: el FT inducible por hipoxia (HIF1) es capaz de inducir proliferación de forma no autónoma celular (Pugh *et al.*, 2003), p53 puede actuar de supresor de tumores también de forma no autónoma celular (Lujambio *et al.*, 2013), finalmente, se ha descrito que el factor de la familia bZIP LCR-F1 es esencial en la formación del mesodermo pero que no actúa de forma autónoma celular (Farmer S *et al.*, 1997).

Sería interesante en el futuro explorar cuáles son los mecanismos de la acción no autónoma celular de PBX1 en la especificación del BO para entender mejor la comunicación existente entre distintos tipos de neuronas.

### **Homología profunda en el programa de especificación Dopaminérgico.**

La motivación inicial de este proyecto de tesis era analizar si los factores PBX tienen un papel conservado en diferenciación terminal DA [ al igual que el observado en *C.elegans* (Doitsidou *et al.*, 2013)].

Nuestros resultados demuestran que los factores PBX, junto con DLL (DLX1/2 en ratones, CEH-43 en *C.elegans*) y ETS (ER81 en ratón , AST-1 en *C.elegans*) son necesarios para la especificación terminal de las neuronas DA en ambos organismos. Esto sugiere que el programa genético está conservado y que por tanto existe homología profunda entre estos dos tipos neuronales. La homología profunda es un concepto de la biología evolutiva que se aplica a estructuras que utilizan los mismo programas genéticos en su especificación, un ejemplo clásico de homología profunda es el ojo de vertebrados e invertebrados que requieren el factor de transcripción Pax6 (H. Li *et al.*, 1994).

Nuestros resultados muestran que las neuronas DA del bulbo en mamíferos y las DA de *C. elegans* comparten homología profunda. Como se ha explicado en la introducción otros FT tienen un papel en diferenciación DA en mamíferos incluyendo PAX6, MEIS2 o COUP-TF1. En nuestro laboratorio hemos explorado la posibilidad de que homólogos de estos factores en *C. elegans* también participen en diferenciación DA. Curiosamente hemos visto que homólogos de estos 3 factores (*vab-3*, *unc-62* y *unc-55* respectivamente) se expresan en las neuronas DA de *C.elegans* y que son necesarios para su correcta especificación lo que sugiere que otros miembros del programa genético están también conservados (Ángela Jimeno y Nuria Flames sin publicar).

Esta homología podría deberse a que ambas poblaciones comparten un tipo celular ancestral, sin embargo, al no tener datos de otros grupos de animales (e.g moluscos o insectos) otra explicación posible es que ambas poblaciones neuronales comparten el programa genético por convergencia.

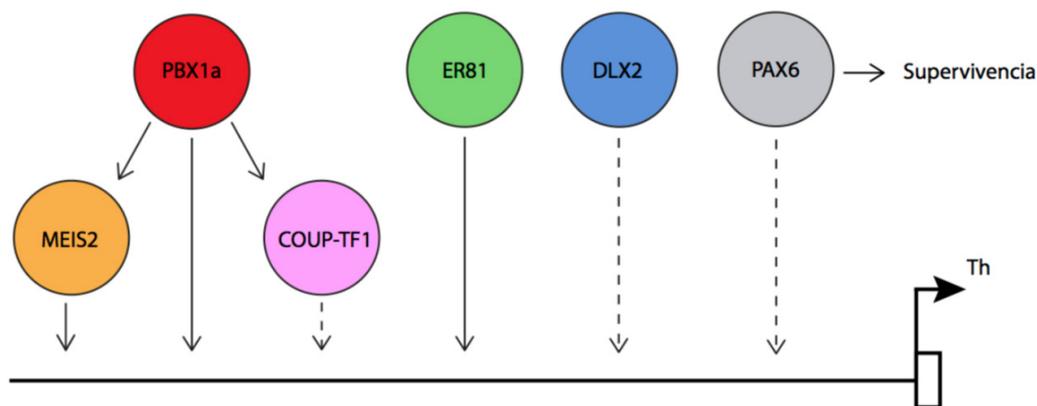
### **El factor PBX1 es un regulador global de la identidad dopaminérgica en las distintas subpoblaciones del cerebro.**

Estudios recientes del laboratorio de Ernest Arenas han demostrado que PBX1, en concreto la isoforma 1a, también se expresa en la población dopaminérgica del mesencéfalo y que es necesario para la diferenciación de esta población (Villaescusa *et al.*, 2016). Los resultados de este trabajo tienen analogía con los nuestros: por una parte es la isoforma 1a la que tiene un papel directo en la expresión del gen *Th* y la expresión de PBX1 en neuronas DA del mesencéfalo se mantienen durante toda la vida del animal, al igual que en el BO. Además, en el perfil de unión de PBX1 al genoma observan que éste se une mayoritariamente cerca de los sitios de inicio de la transcripción lo que coincide con nuestra observación de unión de PBX1 a *Th* y al modelo de selectores terminales.

También observan que la falta de PBX1 induce expresión ectópica de factores no propios del linaje DA. Por tanto, parece que PBX1 es requerido tanto en mesencéfalo como en bulbo para la especificación DA. Sin embargo, el programa genético mesencefálico no es igual al del bulbo, en el mesencéfalo se expresa PITX3 que es necesario para la dife-

renciación terminal DA mientras que DLX, PAX6 o ER81 no se expresen en esta región. Por tanto PBX1 tendría un papel global en diferenciación terminal DA pero ejercería dicha función acompañado de distintos cofactores dependiendo de la región. Sería interesante determinar si PBX1 se expresa también en las neuronas DA del hipotálamo y si también allí es necesario para la correcta especificación DA.

En conclusión, el trabajo recogido en esta tesis muestra que, PBX1 junto con otros factores de transcripción, participa en la regulación de la diferenciación y/o mantenimiento del fenotipo dopaminérgico, mediante la unión directa a las secuencias *cis* reguladoras del gen *Th* así como la regulación de la expresión de otros factores de transcripción que también participan en la diferenciación DA en el bulbo olfatorio de ratón. De esta forma, nuestros resultados revelan una homología profunda en el programa genético de especificación dopaminérgico entre gusano y ratón en el que PBX1a actuaría como homólogo funcional de CEH- 20 en *C.elegans*.



▲ **Figura D1: Modelo de la acción combinada del código de factores de transcripción que regulan la diferenciación DA del BO de ratón.** En las neuronas DA del BO, los FT MEIS2, PBX1a, COUP-TF1, ER81 PAX6 y DLX2 participan en la regulación de la transcripción del gen *Th* y promueven la supervivencia de la célula (PAX6). Las flechas de trazo continuo representan unión directa del FT a la región promotora del gen y las flechas de trazo discontinuo representan uniones aun por estudiar.



**conclusiones**



1. PBX1 pero no PBX2 es necesario para la diferenciación y/o mantenimiento del fenotipo dopaminérgico embrionario y postnatal.
2. PBX2 no puede compensar la falta de PBX1 puesto que el doble mutante no incrementa el fenotipo del mutante simple para PBX1.
3. Las células mutantes para PBX1 permanecen en el BO pero no llevan a cabo su correcta diferenciación a neurona DA.
4. Un pequeño porcentaje de las neuronas del linaje DA en mutantes para PBX1 expresa ectópicamente CR y/o CB sugiriendo un cambio de destino celular o una de-represión parcial de genes no pertenecientes al linaje DA.
5. En el linaje DA, PBX1 es necesario para la expresión de MEIS2 y COUP-TF1 pero no para la expresión de ER81 y PAX6. Por otra parte, PBX1 reprime a PBX2.
6. La falta de PBX1 parece producir efectos no autónomos celulares en el linaje no dopaminérgico de la capa periglomerular del bulbo ya que disminuyen las células que expresan MEIS2 y ER81 e incrementan las células positivas para PAX6 y PBX2.
7. Electroporaciones *in vivo* de la CRE recombinasa en la SVZ de animales con el gen *Pbx1* flanqueado por secuencias LoxP demuestran que el fenotipo observado en el bulbo olfatorio no es un efecto indirecto debido a defectos en la población DA del mesencéfalo.
8. PBX1a pero no PBX1b rescata el fenotipo DA cuando se co-electropora con la CRE recombinasa en la SVZ de animales *Pbx1* floxeados.
9. La sobreexpresión de PBX1a y en menor medida de PBX1B incrementa el número de células GFP+/TH+ en el BO, apoyando el papel de PBX1 en la diferenciación de las neuronas DA.
10. PBX1 se une a regiones reguladoras del gen *Th* lo que apoya el papel directo de este FT en su transcripción.
11. El programa genético de regulación DA está conservado entre nematodos y mamíferos: ER81 (AST-1 en *C.elegans*), DLX2 (CEH-43 en *C.elegans*) y PBX1 (CEH-20 en *C.elegans*). Lo que sugiere que existe homología profunda en estos tipos celulares entre estos dos organismos.



**conclusions**



1. PBX1 but not PBX2 is necessary for the differentiation and / or maintenance of the embryonic and postnatal dopaminergic phenotype.
2. PBX2 can not compensate for the lack of PBX1 since the double mutant does not increase the single PBX1 mutant phenotype.
3. PBX1 mutant cells remain in the OB but they are unable to properly differentiate into a DA neuron.
4. A small percentage of the DA lineage neurons in mutants for PBX1 ectopically express CR and / or CB suggesting a change in cell fate or a partial de-repression of genes not belonging to the DA lineage.
5. In the DA lineage, PBX1 is required for MEIS2 and COUP-TF1 expression but not for ER81 and PAX6 expression. On the other hand, PBX1 represses PBX2.
6. The lack of PBX1 seems to produce non-cell autonomous effects in the non- dopaminergic lineage of the periglomerular layer of the bulb as cells expressing MEIS2 and ER81 decrease and cells positive for PAX6 and PBX2 increase.
7. *In vivo* CRE recombinase electroporations in the SVZ in animals with the *Pbx1* gene flanked by LoxP sequences demonstrate that the phenotype observed in the olfactory bulb is not indirectly due to defects in the DA population of the mesencephalon.
8. PBX1a but not PBX1b rescues the DA phenotype when is co-electroporated with CRE recombinase in the SVZ of floxed *Pbx1* animals.
9. Overexpression of PBX1A and to a lesser extent PBX1b increases the number of TH + cells in the OB, supporting the role of PBX1 in the differentiation of DA neurons.
10. PBX1 binds to regulatory regions of the *Th* gene which supports a direct role in its transcription.
11. The DA genetic regulatory program is conserved between nematodes and mammals: ER81 (AST-1 in *C.elegans*), DLX2 (CEH-43 in *C.elegans*) and PBX1 (CEH-20 in *C. elegans*). Suggesting that there is deep homology between these cell types in these two organisms.



# **bi**bliografía



Abrous, D. N., Koehl, M., & M.L., M. (2005). **Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology.** *Physiological Reviews*, 85(322), 523–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2003>.

Agoston, Z., Heine, P., Brill, M. S., Grebbin, B. M., Hau, A.-C., Kallenborn-Gerhardt, W., ... Schulte, D. (2014). Meis2 is a Pax6 co-factor in neurogenesis and dopaminergic periglomerular fate specification in the adult olfactory bulb. *Development (Cambridge, England)*, 141(1), 28–38. <https://doi.org/10.1242/dev.097295>

Allen, Z. J., Waclaw, R. R., Colbert, M. C., & Campbell, K. (2007). **Molecular identity of olfactory bulb interneurons: Transcriptional codes of periglomerular neuron subtypes.** *Journal of Molecular Histology*, 38(6), 517–525. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9115-4>

Alvarez-Buylla, A., & Lois, C. (1995). **Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates.** *STEM CELLS*, 13(3), 263–272. <https://doi.org/10.1002/stem.5530130307>

Arnold, H. H., & Winter, B. (1998). **Muscle differentiation: More complexity to the network of myogenic regulators.** *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80008-7)

Asahara, H., Dutta, S., Kao, H. Y., Evans, R. M., & Montminy, M. (1999). **Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner.** *Mol. Cell Biol.*, 19(12), 8219–8225. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84906/pdf/mb008219.pdf>

Aungst, J. L., Heyward, P. M., Puche, A. C., Karnup, S. V, Hayar, A., Szabo, G., & Shipley, M. T. (2003). **Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli.** *Nature*, 426(6967), 623–629. <https://doi.org/10.1038/nature02185>

Bailey, J. S., Rave-Harel, N., McGillivray, S. M., Coss, D., & Mellon, P. L. (2004). **Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1.** *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0442>

Baker, H., Kawano, T., Margolis, F. L., & Joh, T. H. (1983). **Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat.** *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 3(1), 69–78. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/3/1/69.full.pdf>

Baker, H., Liu, N., Chun, H. S., Saino, S., Berlin, R., Volpe, B., & Son, J. H. (2001). **Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb.** *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(21), 8505–8513. <https://doi.org/21/21/8505> [pii]

Baker, H., Morel, K., Stone, D. M., & Maruniak, J. A. (1993). **Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb.** *Brain Research*, 614, 109–116.

- Baker, H., Towle, A. C., & Margolis, F. L. (1988).** Differential afferent regulation of dopaminergic and GABAergic neurons in the mouse main olfactory bulb. *Brain Research*, 450, 69–80. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/0006899388915454/1-s2.0-0006899388915454-main.pdf?\\_tid=2bc1f15a-0fe2-11e7-95c8-00000aac-b360&acdnat=1490285153\\_21784399fc43eaa2bbca52a155ced6e1](http://ac.els-cdn.com/0006899388915454/1-s2.0-0006899388915454-main.pdf?_tid=2bc1f15a-0fe2-11e7-95c8-00000aac-b360&acdnat=1490285153_21784399fc43eaa2bbca52a155ced6e1)
- Barnabé-Heider, F., Meletis, K., Eriksson, M., Bergmann, O., Sabelström, H., Harvey, M. A., ... Frisén, J. (2008).** Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by *in vivo* electroporation. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1174>
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., & Fishell, G. (2008).** The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes. *Journal of Neuroscience*, 28(15), 3966–3975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5625-07.2008>
- Berkes, C. A., Bergstrom, D. A., Penn, B. H., Seaver, K. J., Knoepfler, P. S., & Tapscott, S. J. (2004).** Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Molecular Cell*, 14(4), 465–477. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00260-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00260-6)
- Bovetti, S., Bonzano, S., Garzotto, D., Giannelli, S. G., Iannielli, A., Armentano, M., ... De Marchis, S. (2013).** COUP-TFI controls activity-dependent tyrosine hydroxylase expression in adult dopaminergic olfactory bulb interneurons. *Development (Cambridge, England)*, 140(November), 4850–4859. <https://doi.org/10.1242/dev.089961>
- Brill, M. S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R. D., Ozen, I., Yang, R., ... Götz, M. (2009).** Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature Neuroscience*, 12(12), 1524–33. <https://doi.org/10.1038/nn.2416>
- Brill, M. S., Snapyan, M., Wohlfrom, H., Ninkovic, J., Jawerka, M., Mastick, G. S., ... Gotz, M. (2008).** A Dlx2- and Pax6-Dependent Transcriptional Code for Periglomerular Neuron Specification in the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 28(25), 6439–6452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0700-08.2008>
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., & Ericson, J. (2000).** A Homeodomain Protein Code Specifies Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in the Ventral Neural Tube. *Cell*, 101, 435–445. Retrieved from [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80853-3.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80853-3.pdf)
- Brouwer, J. R., Mientjes, E. J., Bakker, C. E., Nieuwenhuizen, I. M., Severijnen, L. A., Van der Linde, H. C., ... Willemsen, R. (2007).** Differential regulation of dopaminergic gene expression by Er81. *Experimental Cell Research*, 313(2), 244–253. <https://doi.org/10.1115/1.3071969>. Automating
- Bürglin, T. R. (1997).** Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research*, 25(21). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147054/pdf/254173.pdf>

Capellini, T. D., Di Giacomo, G., Salsi, V., Brendolan, A., Ferretti, E., Srivastava, D., ... Selleri, L. (2006). **Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression.** *Development (Cambridge, England)*, 133(11), 2263–73. <https://doi.org/10.1242/dev.02395>

Capellini, T. D., Zewdu, R., Di Giacomo, G., Ascitti, S., Kugler, J. E., Di Gregorio, A., & Selleri, L. (2008). **Pbx1/Pbx2 govern axial skeletal development by controlling Polycomb and Hox in mesoderm and Pax1/Pax9 in sclerotome.** *Developmental Biology*, 321(2), 500–514. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.005>

Cave, J. W., & Baker, H. (2009). **Dopamine systems in the forebrain.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 651, 15–35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8_2)

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* 263:802–5

Chang, C. P., Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Largman, C., & Cleary, M. L. (1995). **Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins.** *Genes and Development*, 9(6), 663–674. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.663>

Chess, A., Simon, I., Cedar, H., & Axel, R. (1994). **Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression.** *Cell*, 78(5), 823–834. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90562-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90562-2)

Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). **Dopaminergic neurons.** *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>

Chinta, S. J., Andersen, J. K., & Andersen, J. K. (2005). **Cell in focus Dopaminergic neurons.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>

Dahlstrand, J., Lardelli, M., & Lendahl, U. (1995). **Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system.** *DfVllkOg~glatk M ELSEVIER Developmental Brain Research*, 84, 109–129. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/016538069400162S/1-s2.0-016538069400162S-main.pdf?\\_tid=fb929c74-0e50-11e7-ba45-00000aab0f27&acdnat=1490112843\\_919fcb0da14060af0f4b5a1f0aed842a](http://ac.els-cdn.com/016538069400162S/1-s2.0-016538069400162S-main.pdf?_tid=fb929c74-0e50-11e7-ba45-00000aab0f27&acdnat=1490112843_919fcb0da14060af0f4b5a1f0aed842a)

Dassule, H. R., & McMahon, a P. (1998). **Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth.** *Developmental Biology*, 202(2), 215–27. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8992>

**De Marchis, S., Bovetti, S., Carletti, B., Hsieh, Y.-C., Garzotto, D., Peretto, P., ... Rossi, F. (2007).** Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(3), 657–64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2870-06.2007>

**Dellovade, T. L., Pfaff, D. W. and Schwanzel-Fukuda, M. (1998),** Olfactory bulb development is altered in small-eye (Sey) mice. *J. Comp. Neurol.*, 402: 402–418. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981221)402:3<402::AID-CNE8>3.0.CO;2-0

**Deneris, E. S., & Hobert, O. (2014).** Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. *Nature Neuroscience*, 17(7), 899–907. <https://doi.org/10.1038/nn.3731>

**Dennis, E., & Berg, P. (1985).** Transcription from a plant gene promoter in animal cells. *Nucleic Acids Res*, 13(22), 7945–7957. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC322102/pdf/nar00316-0041.pdf>

**Dimartino, J. F., Selleri, L., Traver, D., Firpo, M. T., Rhee, J., Warnke, R., ... Cleary, M. L. (2001).** The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood*, 98(3), 618–626. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.618>

**Doetsch, F., & Alvarez-Buylla, A. (1996).** Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Neurobiology Communicated by Fernando Nottebohm*, 93, 14895–14900. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/93/25/14895.full.pdf>

**Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999).** Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11619–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11619>

**Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, a. (1997).** Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 5046–5061.

**Doitsidou, M., Flames, N., Topalidou, I., Abe, N., Felton, T., Remesal, L., ... Hobert, O. (2013).** A combinatorial regulatory signature controls terminal differentiation of the dopaminergic nervous system in *C. elegans*. *Genes and Development.*, 15;27(12): <https://doi.org/10.1101/gad.217224.113>

**Eastman, C., Horvitz, H. R., & Jin, Y. (1999).** Coordinated transcriptional regulation of the unc-25 glutamic acid decarboxylase and the unc-47 GABA vesicular transporter by the Caenorhabditis elegans UNC-30 homeodomain protein. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(15), 6225–6234. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/19/15/6225.full.pdf>

Eisenstat, D. D., Liu, J. K., Mione, M., Zhong, W., Yu, G., Anderson, S. A., Ghattas, I., Puelles, L. and Rubenstein, J. L.R. (1999), **DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation.** *J. Comp. Neurol.*, 414: 217–237. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991115)414:2<217::AID-CNE6>3.0.CO;2-I

Farber, P. J., & Mittermaier, A. (2011). **Concerted dynamics link allosteric sites in the PBX homeodomain.** *Journal of Molecular Biology*, 405(3), 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.11.016>

Fernández, M. E., Croce, S., Boutin, C., Cremer, H., & Raineteau, O. (2011). **Targeted electroporation of defined lateral ventricular walls: a novel and rapid method to study fate specification during postnatal forebrain neurogenesis.** *Neural Development*, 6(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-13>

Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B., & Raineteau, O. (2015). **Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis.** *Development*, 142(12), 2109–2120. <https://doi.org/10.1242/dev.119966>

Flames, N., & Hobert, O. (2009a). **Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation.** *Nature*, 458(7240), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature07929>

Flames, N., & Hobert, O. (2009b). **Gene regulatory logic of dopaminergic neuron differentiation.** *Nature*, 458(7240), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature07929>. Gene

Flames, N., & Hobert, O. (2011). **Transcriptional control of the terminal fate of monoaminergic neurons.** *Annual Review of Neuroscience*, 34(May), 153–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113824>

Frank, C. L., Liu, F., Wijayatunge, R., Song, L., Biegler, M. T., Yang, M. G., ... West, A. E. (2015). **Regulation of chromatin accessibility and Zic binding at enhancers in the developing cerebellum.** *Nature Neuroscience*, 18(5), 647–656. <https://doi.org/10.1038/nn.3995>

Galant, R., Walsh, C. M., & Carroll, S. B. (2002). **Hox repression via monomer sites.** *Development*, 129: 3115-. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/development/129/13/3115.full.pdf>

Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW. **Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb.** *J Comp Neurol.* 1987; 266:307–318. [PubMed:2891733]

Gerdes, S. J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., Gerdes, J., ... Stein, H. (1984). **Cell cycle analysis of a cell CELL CYCLE ANALYSIS OF A CELL PROLIFERATION-ASSOCIATED HUMAN NUCLEAR ANTIGEN DEFINED BY THE MONOCLONAL ANTIBODY Ki-67'. J Immunol The Journal of Immunology by Guest on February THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, 133(4), 1710–1715. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/133/4/1710>

**Golonzhka, O., Nord, A., Tang, P. L. F., Lindtner, S., Ypsilanti, A. R., Ferretti, E., ... Rubenstein, J. L. R. (2015). Pbx Regulates Patterning of the Cerebral Cortex in Progenitors and Postmitotic Neurons. *Neuron*, 88(6), 1192–1207. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.045>**

**Grebbin, B. M., Hau, A.-C., Groß, A., Anders-Maurer, M., Schramm, J., Koss, M., ... Schulte, D. (2016). Pbx1 is required for adult SVZ neurogenesis. *Development (Cambridge, England)*, dev.128033. <https://doi.org/10.1242/dev.128033>**

**Greer CA. Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. *J Comp Neurol* 1987 Mar 15;257(3):442-52.**

**Guillemot, F. (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development*, 134(21), 3771–3780. <https://doi.org/10.1242/dev.006379>**

**Haba, H., Nomura, T., Suto, F., & Osumi, N. (2009). Subtype-specific reduction of olfactory bulb interneurons in Pax6 heterozygous mutant mice. *Neuroscience Research*, 65(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.011>**

**Hack, M. a, Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.- M., & Götz, M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 8(7), 865–872. <https://doi.org/10.1038/nn1479>**

**Halász N (1990). The Vertebrate Olfactory System: Chemical Neuroanatomy, Function and Development. Académiai Kiado, Budapest**

**Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D., & Deneris, E. S. (1999). The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(23), 10348–10356. <https://doi.org/10575032>**

**Hendricks, T. J., Fyodorov, D. V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E. A., Yamamoto, B., ... Deneris, E. S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron*, 37(2), 233–247. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01167-4)**

**Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L. M., Ton, C. C. T., Saunders, G. F., Hanson, I. M., ... Heyningen, V. van. (1991). Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*, 354(6354), 522–525. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/354522a0>**

**Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* 1968;134(3):287–304. [PubMed: 5721256]**

**Hobert, O. (2011). Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 681–96.** <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154226>

**Hobert, O., Carrera, I., & Stefanakis, N. (2010). The molecular and gene regulatory signature of a neuron. *Trends in Neurosciences*, 33(10), 435–445.** <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.006>

**Huang, H. S., Redmond, T. M., Kubish, G. M., Gupta, S., Thompson, R. C., Turner, D. L., ... Thompson, R. C. (2015). Transcriptional Regulatory Events Initiated by *Ascl1* and *Neurog2* During Neuronal Differentiation of P19 Embryonic Carcinoma Cells. *J Mol Neurosci*, 55, 684–705.** <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0408-2>

**In der Rieden PM, Mainguy G, Woltering JM, D. A. (2004). Homeodomain to hexapeptide or PBC-interaction-domain distance: size apparently matters. *Trends Genet*.** <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.007>

**Inoue & Krumlauf. (2001). An impulse to the brain— using *in vivo* electroporation. *Science Neuron J. Mol. Pharmacol. J. Neurosci. Cell*, 87(12), 1663–1667.** Retrieved from <http://www.nature.com.csic.debiblio.com/neuro/journal/v4/n11s/pdf/nn1101-1156.pdf>

**Jackson E, L, Alvarez-Buylla A, Characterization of Adult Neural Stem Cells and Their Relation to Brain Tumors. *Cells Tissues Organs* 2008;188:212-224**

**Jankovski, A. & Sotelo, C., 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: Cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *Journal of Comparative Neurology*, 371(3), pp.376–396.**

**Jessel, T. M. (2000). NEURONAL SPECIFICATION IN THE SPINAL CORD: INDUCTIVE SIGNALS AND TRANSCRIPTIONAL CODES, 20(1).** Retrieved from [http://www.nature.com.csic.debiblio.com/nrg/journal/v1/n1/pdf/nrg1000\\_020a.pdf](http://www.nature.com.csic.debiblio.com/nrg/journal/v1/n1/pdf/nrg1000_020a.pdf)

**John W. Cave, Yosuke Akiba, Kasturi Banerjee, Shivraj Bhosle, RoseAnn Berlin, H. B. (2010). Differential regulation of dopaminergic gene expression by *Er81*. *Experimental Cell Research*, 30(13): 47.** <https://doi.org/10.1115/1.3071969>.Automating

**Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2009). Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neuroscience Research*.** <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.12.001>

**Kerk, S. Y., Kratsios, P., Hart, M., Mourao, R., & Hobert, O. (2017). Diversification of *C.elegans* Motor Neuron Identity via Selective Effector Gene Repression. *Neuron*, 93(1), 80–98.** <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.036>

- Kim, S. K., Selleri, L., Lee, J. S., Zhang, A. Y., Gu, X., Jacobs, Y., & Cleary, M. L. (2002). Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *Ipf1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 30(4), 430–5. <https://doi.org/10.1038/ng860>**
- Kiyokage, E., Pan, Y.-Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., ... Shipley, M. T. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(3), 1185–1196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3497-09.2010>**
- Kohwi, M. (2005). Pax6 Is Required for Making Specific Subpopulations of Granule and Periglomerular Neurons in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 25(30), 6997–7003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1435-05.2005>**
- Kohwi, M., Petryniak, M. a, Long, J. E., Ekker, M., Obata, K., Yanagawa, Y., ... Alvarez-Buylla, A. (2007). A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from *Emx1*- and *Dlx5/6*-expressing progenitors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26), 6878–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0254-07.2007>**
- Kosaka, K., & Kosaka, T. (2005). Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: Compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anatomical Science International*, 80, 80–90.**
- Kosaka, K., & Kosaka, T. (2007). Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb, 1(4), 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.087>**
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y., & Kosaka, T. (1998). How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neuroscience Research*, 30, 101–110.**
- Kutejova, E., Sasai, N., Shah, A., Gouti, M., Correspondence, J. B., & Briscoe, J. (2016). Neural Progenitors Adopt Specific Identities by Directly Repressing All Alternative Progenitor Transcriptional Programs. *Developmental Cell*, 36, 639– 653. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.013>**
- Laguna, A., Schintu, N., Nobre, A., Alvarsson, A., Volakakis, N., Jacobsen, J. K., ... Perlmann, T. (2015). Dopaminergic control of autophagic-lysosomal function implicates *Lmx1b* in Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 18(6), 826–835. <https://doi.org/10.1038/nn.4004>**
- L T Peltenburg, C. M. (1996). Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *The EMBO Journal*, 15(13), 3385. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC451902/pdf/emboj00013-0179.pdf>**

- Laurent, A., Bihan, R., Deschamps, S., Guerrier, D., Dupé, V., Omilli, F., ... Pellerin, I. (2007). Identification of a new type of PBX1 partner that contains zinc finger motifs and inhibits the binding of HOXA9-PBX1 to DNA. *Mechanisms of Development*, 124(5), 364–376. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.01.008>
- Laurent, A., Bihan, R., Omilli, F., Deschamps, S., & Pellerin, I. (2008). PBX proteins: Much more than Hox cofactors. *International Journal of Developmental Biology*, 52(1), 9–20. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072304al>
- Li, H. S., Yang, J. M., Jacobson, R. D., Pasko, D., & Sundin, O. (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev Biol.* <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1077>
- Linares, A. J., Lin, C.-H., Damianov, A., Adams, K. L., Novitch, B. G., Black, D. L., ... Black, D. (2015). The splicing regulator PTBP1 controls the activity of the transcription factor Pbx1 during neuronal differentiation. *eLife*, 4, e09268. <https://doi.org/10.7554/eLife.09268>
- Liu, C., Maejima, T., Wyler, S. C., Casadesus, G., Herlitze, S., & Deneris, E. S. (2010). Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1190–8. <https://doi.org/10.1038/nn.2623>
- Lledo, P., Alonso, M., & M, G. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179–193. <https://doi.org/10.1038/nrn1867>
- Lois, C., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, a. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5251), 978–981. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.978>
- Long, J. E., Swan, C., Liang, W. S., Cobos, I., Potter, G. B., & Rubenstein, J. L. R. (2009). Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Journal of Comparative Neurology*, 512(4), 556–572. <https://doi.org/10.1002/cne.21854>
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., ... Lowe, S. W. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*, 153(2), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020>
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173–189. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90281-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90281-U)
- Mall, M., Kareta, M. S., Chanda, S., Ahlenius, H., Perotti, N., Zhou, B., ... Wernig, M. (2017). Myt1l safeguards neuronal identity by actively repressing many non-neuronal fates. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature21722>

- Manley, N. R., Selleri, L., Brendolan, A., Gordon, J., & Cleary, M. L. (2004).** Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in *Pbx1* knockout mice mimic loss of *Hox3* paralogs. *Developmental Biology*, 276(2), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.030>
- Marei, H. E. S., Ahmed, A.-E., Michetti, F., Pescatori, M., Pallini, R., Casalbore, P., ... Elhadidy, M. (2012).** Gene expression profile of adult human olfactory bulb and embryonic neural stem cell suggests distinct signaling pathways and epigenetic control. *PloS One*, 7(4), e33542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033542>
- McLean, J. H., & Shipley, M. T. (1988).** Postmigrational Olfactory Bulb Dopaminergic Expression Neurons of Tyrosine Hydroxylase in Olfactory Bulb Dopaminergic Neurons. *Methods*, 8(October), 3658–3669. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/8/10/3658.full.pdf>
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., & Alvarez-Buylla, A. (2006).** Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(30), 7907–7918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006>
- Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Bérenger, H., Pradel, J., & Graba, Y. (2003).** The hexapeptide and linker regions of the *AbdA Hox* protein regulate its activating and repressive functions. *Developmental Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00126-6)
- Merkle, F. T., Fuentealba, Luis C., Kessar, N., & Alvarez-buylla, A. (2014).** Previously Unknown Interneuron Types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>. Adult
- Merkle, F. T., Fuentealba, L. C., Sanders, T. A., Magno, L., Kessar, N., & Alvarez-Buylla, A. (2014).** Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-buylla, A. (2007).** Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5836), 381–4. <https://doi.org/10.1126/science.1144914>
- Milech, N., Kees, U. R., & Watt, P. M. (2001).** Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes Chromosomes and Cancer*, 32(3), 275–280. <https://doi.org/10.1002/gcc.1190>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2008).** Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 11(3(3)), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>. Neural

- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., ... Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675–686. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81387-2)
- Monica, K., Galili, N., Nourse, J., Saltman, D., & Cleary, M. L. (1991). PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Molecular and Cellular Biology*, 11(12), 6149–57. <https://doi.org/10.1128/MCB.11.12.6149>. Updated
- Moss, J. B., Price, A. L., Raz, E., Driever, W., & Rosenthal, N. (1996). Green fluorescent protein marks skeletal muscle in murine cell lines and zebrafish. *Gene*, 173(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00729-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00729-6)
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(September), 98. <https://doi.org/10.3389/fn-cir.2014.00098>
- Ninkovic, J., Pinto, L., Petricca, S., Lepier, A., Sun, J., Rieger, M. A., ... Götz, M. (2010). The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons via crystallin  $\alpha$ A. *Neuron*, 68(4), 682–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.030>
- Nord, A. S., Blow, M. J., Attanasio, C., Akiyama, J. A., Holt, A., Hosseini, R., ... Visel, A. (2013). Rapid and pervasive changes in genome-wide enhancer usage during mammalian development. *Cell*, 155(7), 1521–1531. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.033>
- Nowakowski RS, Lewin SB y Miller MW. (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.*, 18, 311-318.
- O’Keeffe, G. C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J. W., Barker, R. A., & Caldwell, M. A. (2009). Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), 8754–8759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803955106>
- Okano, H., & Sawamoto, K. (2008). Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 363(1500), 2111–2122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.2264>
- Orona E, Rainer EC, Scott JW. Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1984 Jul 1;226(3):346- 56.
- Panzanelli, P., Perazzini, A.-Z., Fritschy, J.-M., & Sassoè-Pognetto, M. (2005). Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.20440>

- Parrish-Aungst, Shipley, M. T., Erdelyi, F., Szabo, G., & Puche, A. C. (2007).** *Quantitative Analysis of Neuronal Diversity in the Mouse Olfactory Bulb*, 836(June 2006), 825–836. <https://doi.org/10.1002/cne>
- Patel, T., & Hobert, O. (2017).** Coordinated control of terminal differentiation and restriction of cellular plasticity. *eLife*, 6, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.24100.001>
- Pattabiraman, K., Golonzhka, O., Lindtner, S., Nord, A. S., Taher, L., Hoch, R., ... Rubenstein, J. L. R. (2014).** Transcriptional regulation of enhancers active in protodomains of the developing cerebral cortex. *Neuron*, 82(5), 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.014>
- Peers, B., Sharma, S., Johnson, T., Kamps, M., & Montminy, M. (1995).** The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 7091–7. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC230964/pdf/157091.pdf>
- Pennartz, S., Belvindrah, R., Tomiuk, S., Zimmer, C., Hofmann, K., Conradt, M., ... Cremer, H. (2004).** Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 25(4), 692–706. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.12.011>
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971a).** THE NEURON TYPES OF THE GLOMERULAR LAYER OF THE OLFACTORY BULB. *J. Cell Sci*, 9, 305–345. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/joces/9/2/305.full.pdf>
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971b).** THE NEUROPIIL OF THE PERIGLOMERULAR REGION OF THE OLFACTORY BULB. *J. Cell Sci*, 9, 379–409. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/joces/9/2/379.full.pdf>
- Piper, D. E., Batchelor, A. H., Chang, C.-P., Cleary, M. L., & Wolberger, C. (1999).** Structure of a HoxB1–Pbx1 Heterodimer Bound to DNA: Role of the Hexapeptide and a Fourth Homeodomain Helix in Complex Formation length and sequence among different Hox proteins and. *Cell*, 96, 587–597. Retrieved from [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80662-5.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80662-5.pdf)
- Pöpperl, H., Rikhof, H., Chang, H., Haffter, P., Kimmel, C. B., & Moens, C. B. (2000).** Lazarus is a novel pbx gene that globally mediates hox gene function in zebrafish. *Molecular Cell*, 6(2), 255–267. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00027-7)
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003).** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine*, 9(6), 677–684. <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>
- Qiu, M., Bulfone, A., & Martinez, S. (1995).** Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of rostral first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes & Development*, 2523–2538. <https://doi.org/10.1101/gad.9.20.2523>

- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: Evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 79(7), 1245–1255. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90015-9)
- Rhee, J. W., Arata, A., Selleri, L., Jacobs, Y., Arata, S., Onimaru, H., & Cleary, M. L. (2004). Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *The American Journal of Pathology*, 165(4), 1343–1350. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63392-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63392-5)
- Ryoo, H. D., & Mann, R. S. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by extradenticle. *Genes and Development*, 13(13), 1704–1716. <https://doi.org/10.1101/gad.13.13.1704>
- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., & Mann, R. S. (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development (Cambridge, England)*, 126(22), 5137–48. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/126/22/5137.full.pdf>
- S.A. Anderson, O. Marin, C. Horn, K. Jennings, J. L. R. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, 128, 353–3. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/128/3/353.full.pdf>
- S, F., C, S., G, C. S., Winnier, E., & Hogan, B. L. M. (1997). The bZIP transcription factor LCR-Fl is essential for mesoderm formation in mouse development. *Genes & Development*, 786–798. <https://doi.org/10.1101/gad.11.6.786>
- Saino-Saito, S., Berlin, R. and Baker, H. (2003), *Dlx-1* and *Dlx-2* expression in the adult mouse brain: Relationship to dopaminergic phenotypic regulation. *J. Comp. Neurol.*, 461: 18–30. doi:10.1002/cne.10611
- Sandberg, M., Flandin, P., Silberberg, S., Su-Feher, L., Price, J. D., Hu, J. S., ... Rubenstein, J. L. R. (2016). Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of Forebrain GABAergic Neurons HHS Public Access. *Neuron*, 91(6), 1260–1275. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.020>
- Sawada, M., Kaneko, N., Inada, H., Wake, H., Kato, Y., Yanagawa, Y., ... Sawamoto, K. (2011). Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(32), 11587–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0614-11.2011>
- Schnabel, C. A., Selleri, L., Jacobs, Y., Warnke, R., & Cleary, M. L. (2001). Expression of Pbx1b during mammalian organogenesis. *Mech Dev*, 100, 131–135. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/S0925477300005165/1-s2.0-S0925477300005165-main.pdf?\\_tid=f9c970b2-1c7d-11e7-8eba-00000aab0f01&acdnat=1491671484\\_06ade63bc03e7d12a449a8bd1c7fff5](http://ac.els-cdn.com/S0925477300005165/1-s2.0-S0925477300005165-main.pdf?_tid=f9c970b2-1c7d-11e7-8eba-00000aab0f01&acdnat=1491671484_06ade63bc03e7d12a449a8bd1c7fff5)

- Selleri, L., Depew, M. J., Jacobs, Y., Chanda, S. K., Tsang, K. Y., Cheah, K. S., ... Cleary, M. L. (2001). Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 128(18), 3543–57. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/128/18/3543.abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566859>
- Selleri, L., & DiMartino, J. (2004). The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5324–5331. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5324>
- Sgadò, P., Ferretti, E., Grbec, D., Bozzi, Y., & Simon, H. H. (2012). The atypical homeoprotein Pbx1a participates in the axonal pathfinding of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neural Development*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-24>
- Shanmugam, K., Green, N. C., Rambaldi, I., Saragovi, H. U., & Featherstone, M. S. (1999). PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7577–7588. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84774/pdf/mb007577.pdf>
- Shen, W. F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Köm ves, L. G., Lawrence, H. J., & Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 3051–3061. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84099/pdf/mb003051.pdf>
- Silberberg, S. N., Taher, L., Lindtner, S., Sandberg, M., Nord, A. S., Vogt, D., ... Rubenstein, J. L. R. (2016). Subpallial Enhancer Transgenic Lines: a Data and Tool Resource to Study Transcriptional Regulation of GABAergic Cell Fate. *Neuron*, 92(1), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.027>
- Song, N. N., Xiu, J. B., Huang, Y., Chen, J. Y., Zhang, L., Gutknecht, L., ... Ding, Y. Q. (2011). Adult raphe-specific deletion of Lmx1B leads to central serotonin deficiency. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015998>
- Stenman, J., Toresson, H., & Campbell, K. (2003). Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci*, 23(1), 167–174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2311-03.2003> [pii]
- Stoykova, a, & Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/14/3/1395.full.pdf>
- Tahayato, A., Sonnevile, R., Pichaud, F., Wernet, M. F., Papatsenko, D., Beaufils, P., ... Desplan, C. (2003). Otd/Crx, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the Drosophila retina. *Developmental Cell*, 5(3), 391–402. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00239-9)

- Takács-Vellai, K., Vellai, T., Chen, E. B., Zhang, Y., Guerry, F., Stern, M. J., & Müller, F. (2007). Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in *C. elegans*. *Developmental Biology*, 302(2), 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.049>
- Tatti, R., Bhaukaurally, K., Gschwend, O., Seal, R. P., Edwards, R. H., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2014). A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nature Communications*, 5(May), 3791. <https://doi.org/10.1038/ncomms4791>
- Tobin, V. A., Hashimoto, H., Wacker, D. W., Takayanagi, Y., Langnaese, K., Caquineau, C., ... Ludwig, M. (2010). An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature*, 464(7287), 413–417. <https://doi.org/10.1038/nature08826>
- Toresson, H., Parmar, M., & Campbell, K. (2000). Expression of Meis and Pbx genes and their protein products in the developing telencephalon: Implications for regional differentiation. *Mechanisms of Development*, 94(1–2), 183–187. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00324-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00324-5)
- Tucker, E. S., Polleux, F., & LaMantia, A. S. (2006). Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Developmental Biology*, 297(2), 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.009>
- Villaescusa, J. C., Li, B., Toledo, E. M., Rivetti di Val Cervo, P., Yang, S., Stott, S. R., ... Arenas, E. (2016). A PBX1 transcriptional network controls dopaminergic neuron development and is impaired in Parkinson's disease. *The EMBO Journal*, 1–16. <https://doi.org/10.15252/embj.201593725>
- Visel, A., Taher, L., Girgis, H., May, D., Golonzhka, O., Hoch, R. V., ... Rubenstein, J. L. R. (2013). A high-resolution enhancer atlas of the developing telencephalon. *Cell*, 152(4), 895–908. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.041>
- V.J. Roberts, M.A. van Dijk, C. Murre. Localization of Pbx1 transcripts in developing rat embryos. *Mech. Dev.*, 51 (1995), pp. 193–198
- Vlachakis, N., Ellstrom, D. R., & Sagerström, C. G. (2000). A novel pbx family member expressed during early zebrafish embryogenesis forms trimeric complexes with meis3 and hoxb1b. *Developmental Dynamics*, 217(1), 109–119. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200001\)217:1<109::AID-DVDY10>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200001)217:1<109::AID-DVDY10>3.0.CO;2-8)
- Wachowiak, M., & Shipley, M. T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(4), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.04.007>
- Waclaw, R. R., Allen, Z. J., Bell, S. M., Erdélyi, F., Szabó, G., Potter, S. S., & Campbell, K. (2006). The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron*, 49(4), 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.018>

**Wagner, K., Mincheva, A., Korn, B., Lichter, P., & Pöpperl, H. (2001). Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mechanisms of Development*, 103(1–2), 127–131. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00349-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00349-5)**

**Wan, M., Shi, X., Feng, X., & Cao, X. (2001). Transcriptional Mechanisms of Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoprotegrin Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10119–10125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006918200>**

**Wenick, A. S., & Hobert, O. (2004). Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*. *Developmental Cell*, 6(6), 757–770. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.004>**

**Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., & Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development (Cambridge, England)*, 128(19), 3759–3771. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/128/19/3759.full.pdf>**

**Yang Z. Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular inter- neurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 2008 Jan 10;506(2):347-58.**

**Young, K. M., Fogarty, M., Kessar, N., & Richardson, W. D. (2007). Subventricular Zone Stem Cells Are Heterogeneous with Respect to Their Embryonic Origins and Neurogenic Fates in the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8286–8296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0476-07.2007>**

**Yozu, M., Tabata, H., & Nakajima, K. (2005). The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain. *The Journal of Neuroscience*, 25(31), 7268–7277. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2072-05.2005>**

**Yun, K., Potter, S., & Rubenstein, J. L. R. (2001). Gsh2 and Pax6 pattern the telen- cephalon, 1–13. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/128/2/193.full.pdf>**

