

# Estudio del papel de PBX1 como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio

Doctorado en Neurociencias de la Universidad de Valencia  
Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

Isabel Roger Baynat

Directora de tesis: Dra. Nuria Flames Bonilla  
Valencia, Noviembre de 2020

**ibv** INSTITUT DE  
BIOMEDICINA DE  
VALÈNCIA





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 e Isabel Fariñas Gómez catedrática de la Universidad del Departamento de Biología Celular,

CERTIFICAN:

Que Isabel Roger Baynat, graduada en Biología en la Universidad de Valencia ha realizado bajo nuestra supervisión la Tesis doctoral titulada “Estudio del papel de PBX1 como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio de ratón”.

En Valencia, 23 de octubre de 2020

Firmado por FLAMES BONILLA NURIA -  
DNI 45633115B el día 23/10/2020  
con un certificado emitido por AC  
Administración Pública

MARIA ISABEL FARIÑAS GÓMEZ  
- NIF:36562901P

Firmado digitalmente por  
MARIA ISABEL FARIÑA  
GÓMEZ - NIF:36562901P  
Fecha: 2020.10.23 14:38:09  
+02'00'

Directora de la tesis  
Dra. Nuria Flames Bonilla

Tutora académica  
Dra. Isabel Fariñas Gómez



*Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida*

Santiago Ramón y Cajal

Me harían falta muchas más páginas para poder agradecer lo suficiente a todas esas personas que se han cruzado en mi camino haciendo que esta tesis sea posible. Yo siempre digo que la vida se compone de pequeños pasos y circunstancias, que muchas veces parece que no son importantes, y la suma de las cuales conforman lo que somos cada uno.

Antes que nada, me gustaría agradecer a Sacri por abrirme la primera puerta al mundo de la investigación. A Carolina Rausell y Loles por su apoyo en el TFG. El destino quiso que ese fuera un gran verano y conociera a esos *Inclivers* que me demostraron que hacer un doctorado no está reñido con no perderse ni una fiesta. Tras mis andanzas por medicina decidí cruzar la acera de Jaume Roig y pedir hacer prácticas en el laboratorio de Nuria Flames. Gracias Nuria por darme la oportunidad, por tu comprensión a lo largo de estos años y por tirar del carro a mi lado en el final de esta tesis haciendo que me sintiera acompañada en el proceso.

Hace 5 años llegué a un laboratorio en el que el buen rollo y sus *Ninas* me enamoraron. A vosotras os debo parte de todo lo que he vivido, porque me hicisteis parte de nuestra bonita familia. Quiero agradecerle, Carla, tenderme la mano nada más llegar, por tu dulzura, y ser un ejemplo de curranta en toda regla (no he visto a nadie más comer en el micro como tú). A Miren por tus consejos sabios y por tu energía positiva y cariño. A Carlos por tus troleadas, debates y por esa visión del mundo tan característica. A Ángela, por darme tus sabios consejos, apoyarme y animarme a no decaer hasta el final de la escritura. A Reme por enseñarme que en el animalario las horas vuelan y por tus audios de 5 minutos que no tienen precio. A Mireia, por ser mi mentora y dejar un trocito de tu paz y de tu corazón en mí. A Rebe, por inundarme de tus conocimientos, por mantenerme con parte de la comida de Conchi, por tu sinceridad y por demostrarme que la edad es muuuy relativa. A Elia por tu humor loco, por no pasar ni una sin post-it y porque me debes un Dominos en Mallorca para celebrar mi tesis. Desearía poder volver a reunirnos en un Don Blasco como marca tradición, así que queda pendiente.

Y llegan mis ratoneras, ese equipo que se ha mantenido ahí hasta el final. Isa, tocaya, ¡por fin serás la única ISA! Gracias por tu fuerza, por siempre darle ese toque optimista a la vida. Yo creo que el euromillón me ha tocó a mí al tenerte trabajando codo con codo a mi lado. Y, por último, pero evidentemente no menos importante, a ti, Laura. Aunque sabes que no voy a poder decírtelo con palabras, quiero agradecerle ser más que mi compañera de la bancada de al lado, por ser mi segunda madre. Por tener la paciencia día a día de escuchar todas mis dudas, todos mis problemas y tener tus brazos abiertos para abrazarme y comprenderme. Por todas las charlas de café y las despolarizaciones. Por estar en las buenas y en las malas. Sabes que sin ti no hubiera sobrevivido ni el primer año.

No soy la misma que entré en el laboratorio, ni el laboratorio es el mismo que cuando entré. He ido viendo como las *Ninas* dejaban el laboratorio y como nuevos miembros llegaban a él. Y aunque el listón había quedado muy alto, ahora está llena de gente maravillosa. Así que gracias también a vosotros. A Ainara, por abrirnos los ojos a un nuevo mundo que ahora compartimos. A Noemi, por tu dulzura y tu constancia. A Erick, por estar siempre dispuesto a ayudarme con cualquier cosa. A Pilar, por tus clases de tuerking en la bancada. Y, por cierto, sé que dejo en buenas manos la defensa de Castellón. A Andrea, por ser una perfecta compañera de detalles y por poner el corazón en todo lo que haces. Habéis formado una nueva familia Flames, cuidadla y apoyaros recordando que por muy duro que sea os tenéis los unos a los otros.

Han sido muchos años y, mi mochila está llena de maravillosos momentos. Lanzamiento de cuchillos, tiro con arco, comidas en Don Blasco (cualquier excusa es más que suficiente), Bicorp, mudanza de laboratorio, la publicación del paper... Pero sin duda, no ha sido un camino de rosas y esta tesis es fruto de sacrificios, constancia, pasión por la Neurociencia, frustraciones y decepciones. En toda esta montaña rusa me he superado a mí misma, pero esto no hubiera sido posible sin mis padres. Vosotros siempre decís que vuestra herencia serán los estudios, y aquí lo tenéis; mi doctorado es gracias a vosotros. y a vuestro esfuerzo. Mamá, eres la razón de que haya llegado hasta aquí. Verte luchar y alcanzar tu objetivo luchando por perseguir tu pasión inculcándome el trabajo a partir del ejemplo. Papá, siempre me has hecho preguntarme el porqué

de las cosas, haciendo que perdiera mis miedos para aventurarme a investigar lo que la naturaleza alberga. Así que, soy lo que soy y he llegado hasta aquí gracias a vosotros y no hay agradecimientos suficientes por todo lo que me habéis dado. Además, también creo que parte de la culpa de que emprendiera el camino de la investigación es tuya, abuelito Salvador. Creo que, aunque no te conociera, me has transmitido esa pasión por ir más allá. Me he pasado horas admirando tus colecciones interminables de insectos y tu impresionante colección de revistas *Natures*. De alguna manera, tu sigues aquí entre nosotros.

Por supuesto a mis hermanitas, Ana y Belén. Uno de mis mayores pilares, gracias por apoyarme en todas mis decisiones y por darme ese toque de realidad que a veces necesito y que sólo vosotras sabéis comprender. Tengo la suerte de tener una tercera hermana, que, aunque no es de sangre actúa como tal. Quina sort tindre't al meu costat i poder compartir les nostres alegries i tristors juntes. Gràcies pels teus ànims quan les frustracions podien en mí. I como no, a Edu, Rosa y Toni, gracias per fer-me sentir com a casa. Especialmente a Rosa, per donar tot de tú i esforçar-te cada dia en que estiga a gust.

Tengo la gran suerte de tener una familia enorme (no todos tienen 17 primos), en la que, a pesar de vernos un poco menos, seguimos queriéndonos y estamos ahí todos para todos. El Clan Roger como lo llaman algunos, gracias por todo vuestro apoyo incondicional. De igual manera, mi familia Baynat a la que adoro. Y, como no, a mis dos supermujeres luchadoras. Abuelita Mariñita, gracias por ser ejemplo de superación y de sacrificio a los demás. A mi madrina, eres energía pura, felicidad y el mejor ejemplo de que la vida esta para disfrutarla. Me muero de orgullo al decir que tú eres mi abuela.

No me olvido de mis colaboradores. Gracias a Diego por esa portada increíble. Y sin duda, a Miguel. Gracias por toda vuestra paciencia y por ayudar a que no perdiera la cabeza y a que esta tesis sea más bonita. A Raquel y María, por esos almuerzos en panaria, arepas cualquier día y esas charlitas tan necesarias. A Julia, Noelia, Esther, Raquel, Sofia, Carla, Alba y mis paraguayos. Ese pilar fundamental que hace que se me borren las preocupaciones y que haya cogido fuerzas los findes para lo que me venía durante la semana. A Ferran, Manoli y Rafa, por acogerme en la UJI y preocuparse de que estuviera a gusto en todo momento.

Por último, a mi compañero de vida, de aventuras, de viajes, de series, de buceo, de música, de comilonas y ahora, mi marido Toni. Gracias por tu paciencia, tu comprensión, por ayudarme a gestionar mis frustraciones y a encontrar mis fuerzas cuando creía que no podía más. Has estado día a día en cada paso de esta tesis, en los días en los que las decepciones de los experimentos me hacían tirar la toalla, y me ayudabas a sacar lo mejor de mí y a encontrarme de nuevo a mí misma. Porque contigo la vida es más bonita y porque formamos el mejor equipo.

Me siento muy afortunada y orgullosa del título de Doctora, pero también de todas las personas que lo habéis hecho posible estando ahí en este largo proceso. Gracias a todos, esta tesis va por vosotros.



La realización de este trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral del programa de Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España.

La investigación ha sido financiada por los siguientes Proyectos de Investigación: “Programas de regulación transcripcional asociados a enfermedades genéticas” Ministerio de Economía y Competitividad. Plan Nacional I+D (SAF2017-84790-R) y “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).

# RESUMEN

La especificación neuronal es un proceso que se inicia con la determinación de los progenitores hacia su destino neuronal y que culmina con la generación de las neuronas maduras y funcionales. Los factores de transcripción (FT) tienen un papel crucial en el proceso de activación del transcriptoma específico de cada tipo neuronal que es el encargado de conferir sus funcionalidades concretas. Los selectores terminales son FT que regulan de manera directa y coordinada la expresión de los genes necesarios para la adquisición de las características fenotípicas de cada tipo de neurona madura (genes efectores). Estos FT mantienen su expresión a lo largo de la vida de la neurona siendo necesarios, no solo para el establecimiento, sino también para el mantenimiento del perfil de expresión génica de la neurona.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del programa de diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas (DA). Las neuronas DA sintetizan y usan el neurotransmisor dopamina. En mamíferos, este tipo de neuronas tiene gran importancia en el sistema nervioso central ya que regulan muchos de los circuitos cerebrales, siendo la alteración de la homeóstasis de la DA una de las causas relacionadas con trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia o la depresión; por ello, es de vital importancia estudiar cómo se adquieren las características de estas neuronas. Las neuronas DA están presentes en todos los grupos animales. Además, los genes efectores encargados de la biosíntesis y captación de DA están también filogenéticamente muy conservados. Estudios en el nemátodo *C. elegans* han revelado que la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas (DA) necesita, al menos, tres FT que actúan como selectores terminales: CEH-20 (Familia homeodominio PBX), AST-1 (Familia ETS) y CEH-43 (Familia *homeodominio distalless*).

En mamíferos, diferentes núcleos del mesencéfalo, diencefalo y el bulbo olfatorio (BO) contienen neuronas DA. Sin embargo, las que se encuentran en el BO constituyen evolutivamente las más ancestrales y, por tanto, podrían considerarse las más cercanas a *C. elegans*. Añadiremos que, presentan una característica importante y es que se generan a lo largo de toda la vida de los mamíferos mediante neurogénesis adulta. Investigaciones previas han descrito la expresión y funcionalidad de los ortólogos de AST-1 y CEH-43 (ER81 y DLX2, respectivamente) en la diferenciación terminal de estas neuronas. En cambio, al comienzo del presente trabajo, no se había descrito ortólogos de CEH-20, el tercer FT descrito en el nemátodo, que lleven a cabo la misma función en vertebrados. El principal objetivo de esta tesis es, en consecuencia, determinar si PBX1 (homólogo de CEH-20) ejerce como selector terminal de las neuronas DA del BO de ratón

Para ello usamos un modelo de ratón condicional que elimina *Pbx1* de las células del linaje DA en el periodo de diferenciación terminal pero no en progenitores ni durante la migración. Nuestras investigaciones confirman que la eliminación de *Pbx1* durante los últimos estadios no altera la neurogénesis ni la migración de los neuroblastos. Sin embargo, durante la caracterización en profundidad de estos animales, encontramos fenómenos de recombinación inespecífica debidos a una actividad recombinasa durante la formación de las células germinales, más acrecentado en las hembras, así como una actividad transitoria de la CRE recombinasa en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario. Afortunadamente, mediante estrategias de fenotipado y genotipado hemos sido capaces de detectarlas y descartar estos animales para nuestros experimentos posteriores. Los análisis de estos mutantes muestran que la eliminación de *Pbx1* disminuye drásticamente el número de neuronas que expresan la proteína tirosina hidroxilasa (*Th*), imprescindible en la producción de dopamina. Así mismo, identificamos que este FT parece regular la diferenciación terminal tanto de las neuronas DA que se generan durante la embriogénesis, como

las que se producen mediante neurogénesis en la etapa adulta. Determinamos, igualmente, que las células que carecen de *Pbx1* en estadios de diferenciación terminal y dejan de expresar la proteína TH, no mueren. Es decir, *Pbx1* es necesario para la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO, pero no para su supervivencia. Además, hemos observado que un pequeño porcentaje de las células mutantes que carecen de *Pbx1* expresan ectópicamente Calretinina, un marcador de otra subpoblación de interneuronas del BO, sugiriendo un papel represor de este FT, lo que evita el destino celular hacia otros linajes cercanos y no deseados.

Por otra parte, hemos analizado los FT implicados en la adquisición del fenotipo DA, COUP-TF1, PAX6 y MEIS2, incluyendo los dos selectores terminales previamente descritos DLX2 y ETV1. Los resultados de las triples inmunohistoquímicas revelan que *Pbx1* no es necesario para la expresión de ninguno de estos factores, indicando que: o bien actúa en paralelo, o posteriormente a estos factores. La excepción es MEIS2 co-factor clásico de PBX1 que necesita a este factor para estabilizarse y no ser degradado, tal y como se ha descrito en otros sistemas.

Así mismo, hemos podido demostrar que PBX1 ejerce como selector terminal de las neuronas DA del BO, ya que los mutantes de *Pbx1* presentan defectos de expresión en la mayoría de los genes efectores de la DA, y no específicamente de *Th*. De igual modo, el ChIP revela la unión directa de PBX1 a regiones reguladores del gen *Th*.

Adicionalmente, hemos detectado alteraciones morfológicas en las neuronas mutantes de *Pbx1* que parecen ser más simples e inmaduras, lo que asigna a los selectores terminales un papel determinante para establecer una correcta morfología neuronal. Finalmente, hemos realizado estudios comportamentales que revelan que los déficits en diferenciación DA en el BO provocado por la ausencia de PBX1 durante su diferenciación terminal originan una alteración funcional de la olfacción, de modo que son incapaces de detectar los olores a las concentraciones a las que un ratón control es capaz.

En definitiva, concluimos que *Pbx1* actúa como un selector terminal de las neuronas DA del BO de ratón, sugiriéndolo como homólogo funcional de CEH-20 en *C. elegans*. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que el papel de los FT PBX en la diferenciación DA está conservado a lo largo de la evolución. Adicionalmente, nuestros resultados amplían las funciones de los selectores terminales, requeridos en este caso para la maduración morfológica, así como para reprimir linajes alternativos.

# ABSTRACT

Neuronal specification is a protracted process that begins with progenitor commitment and culminates with the generation of mature and functional neurons. Transcription factors (TF) are the main orchestrators in the acquisition of neuron type-specific transcriptomes which confer neuron-type specific functionalities. Terminal selectors are TF that directly activate the expression of the genes that allow for neuron-type-specific functions such as ion channels, neurotransmitter receptors, biosynthesis enzymes (called effector genes). Terminal selector expression is necessary throughout the life of the neuron not only for the establishment, but also for the maintenance of the neuronal gene expression profile.

In this work, we studied dopaminergic (DA) neuron terminal differentiation. DA neurons synthesize and use dopamine as neurotransmitter. In mammals, these cells have a crucial role in the central nervous system regulating several cerebral circuits, thereby alteration of this homeostasis result in psychiatric disorders such as schizophrenia or depression. DA neurons are present in all animal groups, and their effector genes are also phylogenetically conserved. Studies in the nematode *C. elegans* have shown that least three terminal selectors are needed for DA terminal differentiation; CEH-20 (PBX Homeodomain family), AST-1 (ETS transcription factor family) and CEH-43 (*Distalless* homeodomain family).

In mammals, DA neurons are located in the midbrain, diencephalon and the telencephalic structure known as the olfactory bulb (OB). OB dopaminergic neurons are the most ancestral in evolution. Importantly, these neurons have the particularity of being, generated throughout the life of the animals by adult neurogenesis. Previous work described the expression and function of AST-1 and CEH-43 orthologs (ER81 and DLX2 respectively) in the differentiation of OB DA neurons. Here we aimed to test if mammalian orthologs for CEH-20, the third terminal selector for nematode DA neuron specification, are involved in DA terminal specification in the OB.

We used conditional mutant mice which preserve PBX1 expression in progenitors and migrating neuroblast but not in terminally differentiating DA neurons. We confirmed that late *Pbx1* removal didn't affect neurogenesis or neuroblast migration. However, we found unspecific recombination events due to germ line CRE recombinase activity, and transient recombinase activity in specific tissues during embryonic development. Fortunately, we were able to detect them combining different phenotyping and genotyping strategies and discarded unspecifically recombined animals from our experiments. Mutant analysis showed a drastic reduction in tyrosine hydroxylase (*Th*) positive neurons, a marker for DA neurons in the OB. We found that *Pbx1* controls both, embryonic and adult-generated OB DA-neuron differentiation, and its function is dispensable for survival of these neurons. PBX1 removal leads to ectopic expression of Calretinin, another interneuron OB subpopulation, suggesting a new role of terminal selectors repressing alternative neuron fates, and therefore avoiding acquisition of close lineages.

Analysis of expression of other TFs required for DA specification, such as COUP-TF1, PAX6, MEIS2, and the two terminal selectors DLX2 and ETV1 shows that *Pbx1* acts downstream of or in parallel to these TFs. Additionally, we found MEIS2, a classic PBX1 co-factor, requires PBX1 for protein stability but not for mRNA expression.

*Pbx1* mutants had a dramatic decrease in DA effector genes expression, supporting its role as terminal selector. Moreover, ChIP analysis showed the direct binding of *Pbx1* to *Th* regulatory regions.

Notably, we found morphological defects in *Pbx1* mutant DA neurons, as they are more immature and simpler, suggesting a new role for terminal selectors in morphological acquisition. Finally, *Pbx1* mutants display altered olfactory function demonstrating the important role of DA interneurons in olfaction.

In summary, our results show that *Pbx1* acts as a terminal selector of DA OB mice neurons, suggesting a phylogenetically conserved role for PBX TFs in DA terminal specification. Furthermore, our data expand the known repertoire of terminal selection actions not only in the direct activation of effector genes but also in the morphological maturation and repression of alternative fates.



# ÍNDICE

# Estudio del papel que ejerce *Pbx1* como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>16</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>17</b>
<b>CLAVE DE ABREVIATURAS</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>20</b>
<b>1. EL BULBO OLFATORIO DE RATÓN</b>	<b>21</b>
1.1 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL BULBO OLFATORIO ADULTO	21
1.2 CIRCUITOS NEURONALES DEL BO	25
1.3 IMPLICACIÓN DE LAS NEURONAS DA DEL BO EN LA OLFACCIÓN	27
1.4 NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA DE LAS INTERNEURONAS OLFATIVAS	29
1.5 NEUROGÉNESIS ADULTA DE LA ZONA SUBVENTRICULAR	30
<b>2. PROGRAMAS GENÉTICOS DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL</b>	<b>33</b>
2.1 DIFERENCIACIÓN TERMINAL NEURONAL	35
<b>3. DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS</b>	<b>39</b>
<b>4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA <i>Pbx</i></b>	<b>43</b>
<b>5. ESTADO DE LA CUESTIÓN</b>	<b>45</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>54</b>
<b>1. MODELOS ANIMALES</b>	<b>55</b>
1.1 CEPAS MURINAS	55
1.2 GENOTIPADO DE ANIMALES	57
<b>2. TÉCNICAS <i>IN VIVO</i></b>	<b>60</b>
2.1 INYECCIÓN DE ANÁLOGOS DE LA TIMINA.	60
2.2 ELECTROPORACIÓN POSTNATAL <i>IN VIVO</i>	60
<b>3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS</b>	<b>62</b>
3.1 OBTENCIÓN Y FIJACIÓN DEL TEJIDO	62
3.2 POSTFIJACIÓN DEL TEJIDO	62
3.3 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO	62
3.4 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	63
<b>4. CUANTIFICACIONES HISTOLÓGICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>65</b>
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS TINCIONES DE INMUNOHISTOQUÍMICA	65
4.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROYECCIONES NEURONALES DEL INTERIOR DE LOS GLOMÉRULOS DEL BO	66
4.3 RECONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA NEURONAL CON <i>NEURON STUDIO</i>	66
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
<b>5. ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO</b>	<b>67</b>
5.1 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ANSIEDAD MEDIANTE EL TEST DE LAS CANICAS ( <i>MARBLE TEST</i> )	67
5.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN NIGROESTRIATAL CEREBRAL MEDIANTE LA PRUEBA DE POSTE ( <i>POLE TEST</i> )	67

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y DE LA ANSIEDAD MEDIANTE LA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO	67
5.4 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN OLFATIVA	69
<b>6. ANÁLISIS qRT-PCR</b>	<b>70</b>
6.1 AISLAMIENTO DEL ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN	70
6.2 qPCR Y ANÁLISIS	71

---

## **RESULTADOS** **74**

<b>1. VALIDACIÓN DEL MODELO TRANSGÉNICO DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE <i>Pbx1</i></b>	<b>75</b>
1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD RECOMBINASA EN EL BO EN ANIMALES <i>Th:CRE</i> Y DE SU ACCIÓN SOBRE EL LOCUS <i>Pbx1</i> FLOXEADO	76
<b>2. ESTUDIO Y DETECCIÓN DE RECOMBINACIONES INESPECÍFICAS EN LA LÍNEA <i>Pbx1<sup>Th-RCE</sup></i></b>	<b>80</b>
<b>3. <i>PBX1</i> ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO, PERO NO PARA SU SUPERVIVENCIA</b>	<b>86</b>
3.1 <i>PBX1</i> , PERO NO <i>PBX2</i> , ES NECESARIO PARA LA CORRECTA LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO	86
3.2 LA ELIMINACIÓN TARDÍA DE <i>Pbx1</i> NO AFECTA LA SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO	87
3.3 <i>PBX1</i> ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN TANTO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EMBRIONARIAS, COMO DE LAS GENERADAS DURANTE LA ETAPA ADULTA	89
<b>4. <i>PBX1</i> ACTÚA POSTERIORMENTE O EN PARALELO A OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DOPAMINÉRGICA</b>	<b>93</b>
4.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE COUP-TF1 EN MUTANTES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	93
4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ETV1 EN MUTANTES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	95
4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PAX6 EN MUTANTES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	97
4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PANDLX EN MUTANTES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	99
4.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MEIS2 EN MUTANTES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	101
<b>5. <i>PBX1</i> ACTÚA COMO UN SELECTOR TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO.</b>	<b>103</b>
5.1 LOS MUTANTES DE <i>Pbx1</i> PRESENTAN UNA REDUCCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE DOPAMINA	104
<b>6. <i>PBX1</i> TIENE UN PAPEL EN LA MADURACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO</b>	<b>105</b>
6.1 LOS MUTANTES DE <i>Pbx1<sup>Th</sup></i> EXHIBEN UNA REDUCCIÓN EN LA DENSIDAD DE FIBRAS DOPAMINÉRGICAS EN EL INTERIOR DE LOS GLOMÉRULOS	105
6.2 LAS NEURONAS DEFICIENTES EN <i>Pbx1</i> PRESENTAN DEFECTOS MORFOLÓGICOS	107
<b>7. <i>PBX1</i> REPRIME DESTINOS CELULARES NO DOPAMINÉRGICOS EN EL LINAJE DOPAMINÉRGICO</b>	<b>110</b>
7.1 <i>PBX1</i> REPRIME LA EXPRESIÓN DE GAD67.	110
7.2 <i>PBX1</i> REPRIME LA EXPRESIÓN DE CALRETININA EN EL LINAJE DOPAMINÉRGICO	111
7.3 <i>Pbx1</i> NO REPRIME LA EXPRESIÓN DE FT QUE DETERMINAN EL LINAJE DE LAS INTERNEURONAS CR POSITIVAS	113
<b>8. LOS MUTANTES DE <i>Pbx1<sup>Th</sup></i> MUESTRAN DÉFICITS EN EL COMPORTAMIENTO OLFATIVO</b>	<b>115</b>
8.1 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO NO OLFATIVO DE LOS ANIMALES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	116
8.2 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO OLFATIVO DE LOS ANIMALES <i>Pbx1<sup>Th</sup></i>	118

---

## **DISCUSIÓN** **124**

LA UTILIZACIÓN DE CEPAS CRE REQUIERE LA COMPROBACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE SU ESPECIFICIDAD DE FUNCIÓN	125
LA CEPA <i>Pbx1<sup>Th</sup></i> ELIMINA <i>Pbx1</i> ESPECÍFICAMENTE EN LOS ESTADIOS TARDÍOS DE DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA	127

PBX1 ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NEURONAS DA DEL BO PERO NO PARA SU SUPERVIVENCIA	128
PBX1 ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN TANTO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EMBRIONARIAS, COMO DE LAS GENERADAS DURANTE LA ETAPA ADULTA	129
PBX1 ACTÚA POSTERIORMENTE O EN PARALELO A OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DOPAMINÉRGICA.	129
PBX1 EJERCE COMO SELECTOR TERMINAL DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO	130
PBX1 TIENE UN PAPEL EN LA MADURACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL BULBO OLFATORIO.	131
PBX1 REPRIME DESTINOS CELULARES NO DOPAMINÉRGICOS EN EL LINAJE DOPAMINÉRGICO	132
LOS MUTANTES DE <i>Pbx1<sup>Th</sup></i> MUESTRAN DÉFICITS EN EL COMPORTAMIENTO OLFATIVO	134
CONSERVACIÓN EVOLUTIVA DE LOS PROGRAMAS DE DIFERENCIACIÓN TERMINAL NEURONAL	136
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>138</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>142</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>158</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura I1.....	21
Figura I2.....	23
Figura I3.....	25
Figura I4.....	27
Figura I5.....	30
Figura I6.....	31
Figura I7.....	34
Figura I8.....	36
Figura I9.....	38
Figura I10.....	40
Figura I11.....	47

## MATERIAL Y MÉTODOS

Figura M1.....	56
Figura M2.....	58
Figura M3.....	61
Figura M4.....	69
Figura M5.....	70

## RESULTADOS

Figura R1.....	76
Figura R2.....	77
Figura R3.....	79
Figura R4.....	79
Figura R5.....	84
Figura R6.....	85
Figura R7.....	87
Figura R8.....	88
Figura R9.....	89
Figura R10.....	90
Figura R11.....	91
Figura R13.....	96
Figura R14.....	98
Figura R15.....	100
Figura R16.....	102
Figura R17.....	103
Figura R18.....	104
Figura R19.....	106
Figura R20.....	107
Figura R21.....	108
Figura R23.....	111
Figura R24.....	112
Figura R25.....	114

Figura R26 .....	115
Figura R27 .....	117
Figura R28 .....	120
Figura R29 .....	120

# ÍNDICE DE TABLAS

## MÉTODOS

Tabla M1 .....	59
Tabla M2 .....	64
Tabla M3 .....	65

# 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>	<i>External plexiform layer</i> / Capa plexiforme externa
<b>ETC</b>	<i>External tufted cells</i> / Células en penacho externas
<b>FT</b>	Factor de Transcripción
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GAD</b>	Ácido glutámico descarboxilasa
<b>GCL</b>	<i>Granular cell layer</i> / Capa granular
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i> / Proteína fluorescente verde
<b>IPL</b>	<i>Internal plexiform layer</i> / Capa plexiforme interna
<b>JGC</b>	<i>Juxtglomerular cells</i> /Células yuxtglomerulares
<b>MC</b>	<i>Mitral cells</i> / Células mitrales
<b>MCL</b>	<i>Mitral cell layer</i> / Capa mitral
<b>NC</b>	Neurocalcina
<b>NPC</b>	<i>Neural progenitor cell</i> /Célula progenitora neural
<b>OSN</b>	<i>Olfactory sensory neurons</i> / Neuronas olfativas sensoriales
<b>PB</b>	<i>Phosphate buffer</i> / Tampón fosfato
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PG</b>	Periglomerular
<b>PGC</b>	<i>Periglomerular cells</i> / Células periglomerulares
<b>PGL</b>	<i>Periglomerular layer</i> / Capa periglomerular
<b>PV</b>	Parvoalbumina
<b>RMS</b>	<i>Rostral migratory stream</i> / Camino migrador rostral
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i> / Error estándar de la media
<b>SEZ</b>	<i>Subependimal zone</i> / Zona subependimaria
<b>SN</b>	Sustancia negra
<b>sSA</b>	Células superficiales de axón corto
<b>TC</b>	<i>Tufted cells</i> / Células en penacho
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa



# **INTRODUCCIÓN**

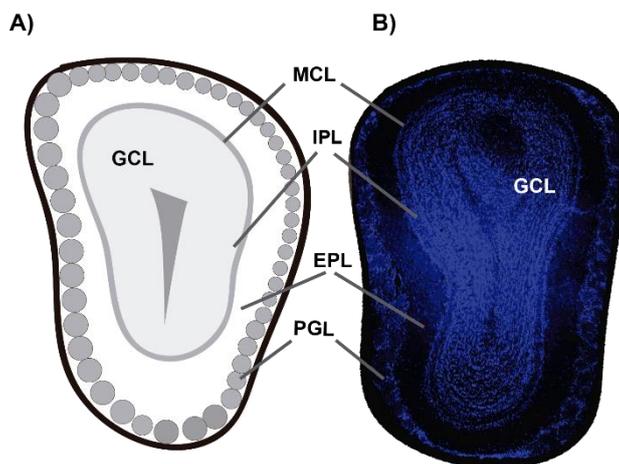
# 1. El bulbo olfatorio de ratón

La olfacción es uno de los sistemas sensoriales más ancestrales mediante el cual los seres vivos reciben información de las moléculas volátiles de su entorno y guían gran variedad de comportamientos como la alimentación o el apareamiento. Las moléculas que contiene el aire se introducen en la cavidad nasal donde son detectadas por las células del epitelio nasal (neuronas receptoras olfativas), esta información se integra en el bulbo olfatorio y, posteriormente, se interpreta en la corteza olfativa u otros núcleos cerebrales.

El bulbo olfatorio está subdividido en dos estructuras, por una parte, el bulbo principal (BO) y, por otra, el bulbo accesorio, ambos implicados en la percepción de olores. El BO tiene especial relevancia en el estudio de los mecanismos implicados en el procesamiento de la información sensorial, puesto que es el lugar donde se integra la información obtenida por las neuronas olfativas sensoriales (OSN) y se transfiere mediante las proyecciones de las células mitrales del BO al córtex olfativo. Otra de las razones por las que ha sido ampliamente estudiado es porque, junto con el hipocampo, es una de las zonas del cerebro en las que se produce neurogénesis adulta. Es decir, las interneuronas del BO son generadas continuamente durante la etapa postnatal y adulta (Kosaka & Kosaka, 2016).

## 1.1 Estructura y organización del bulbo olfatorio adulto

En cuanto a su estructura histológica, el BO presenta una organización laminar dispuesta en capas concéntricas. Desde una perspectiva histológica se definen 5 capas de superficial a profunda (**Figura 11**): la capa periglomerular (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*) (Parrish-Aungst, Shipley, Erdelyi, Szabo, & Puche, 2007).



**Figura 11. Arquitectura celular del BO.** A) Representación esquemática de una sección coronal de BO de ratón adulto. B) Tinción nuclear de una sección coronal de BO de ratón adulto obtenida de Parrish-Aungst et al., 2007. PGL, capa periglomerular; EPL, capa plexiforme externa; MCL, capa mitral; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa granular.

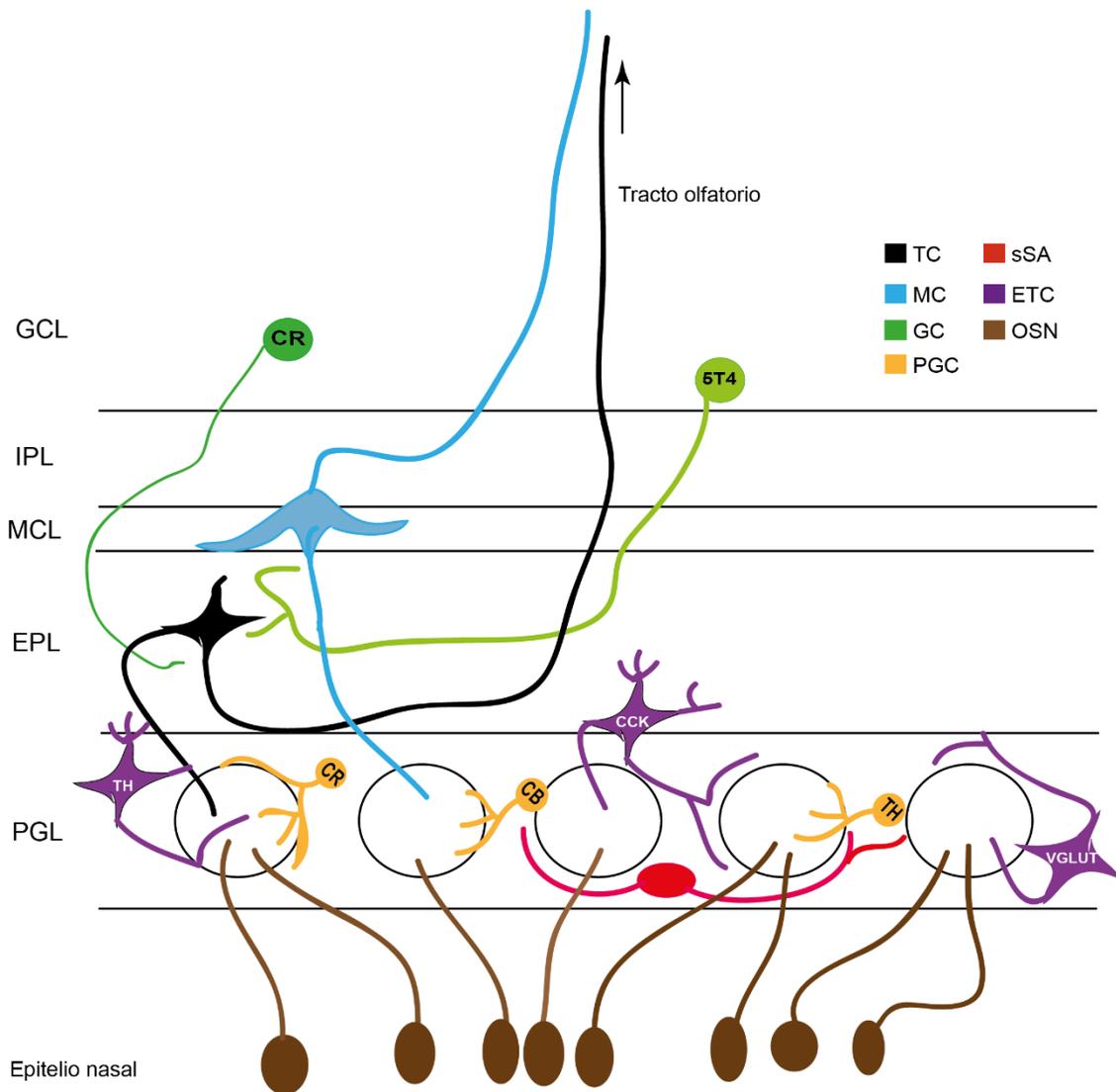
El BO presenta gran variedad de tipos neuronales, clásicamente definidos según su morfología (basada en tinciones de Golgi) y según las capas en las que se encontraban sus cuerpos neuronales. Así pues, se diferencian, las células yuxtglomerulares (JGC del inglés *Juxtglomerular cells*), mitrales (MC del inglés *Mitral Cells*), en penacho (TC del inglés *Tufted cells*) y granulares (**Figura I2**) (Pinching y Powell, 1971; Price & Powell, 1970a, 1970b); así como células con menos representación como las de Blanes, Golgi, Cajal o las células horizontales. Sin embargo, a lo largo de los años se ha hecho más patente que esta clasificación morfológica infravalora la diversidad neuronal existente, pues existe gran heterogeneidad dentro de los grupos clásicamente definidos. En efecto, recientemente se siguen definiendo nuevos tipos celulares del BO (Merkle, Fuentealba, Luis C.Kessarlis, & Alvarez-buylla, 2014).

Las células granulares son las interneuronas más abundantes del BO, presentan un soma pequeño y establecen conexiones dendro-dendríticas con las MC y las TC (Price & Powell, 1970b) en las que reciben inputs glutamatérgicos y devuelven outputs inhibitorios a estas mismas neuronas (Whitman & Greer, 2007). A lo largo de los años se han descrito hasta cinco subtipos en base a la morfología, mientras que, según la expresión génica, se definen dos grandes grupos de células granulares (**Figura I2**). Por un lado, las neuronas que expresan el antígeno 5T4 correspondiente al gen *Trophoblast Glycoprotein*, situadas cercanas a la IPL y que contactan con las células excitatorias de la capa superficial de la EPL (Imamura et al., 2006). Y, por otro lado, las situadas en la GCL positivas para Calretinina (CR) y GABA las cuales establecen sinapsis con las neuronas en penacho de proyección (Batista-Brito, Close, Machold, & Fishell, 2008).

Las MC son glutamatérgicas, tienen su soma localizado en la MCL y se han definido diferentes subtipos en base a sus características morfológicas y/o electrofisiológicas (Angelo et al., 2012; Padmanabhan & Urban, 2010). Los somas de las TC, que son también glutamatérgicas, residen en la EPL y, junto con las MC, constituyen las neuronas de proyección del BO hacia la corteza olfativa (**Figura I2**). Se diferencian 3 subtipos basados en la localización de su soma; profundas, mediales y externas.

Por su parte, las células JGC, con un soma situado alrededor de los glomérulos, fueron divididas inicialmente en 3 subtipos morfológicamente diferenciados: las neuronas periglomerulares (PGC), las células en penacho externas (ETC) y las células superficiales de axón corto (sSA). Generalmente, las células PGC y las ETC proyectan a un único glomérulo, mientras que las sSA conectan varios glomérulos (**Figura I2**). De estos tres subtipos, las células ETC presentan el soma más grande y se clasifican en dos grupos: las que presentan dendritas secundarias, cuyo soma se localiza entre la capa PGL y la EPL, y las que carecen de dendritas secundarias, con su soma ubicado en el espacio interglomerular. Las primeras, utilizan colecistoquinina como neurotransmisor (Liu & Shipley, 1994), mientras que las segundas son glutamatérgicas y expresan VGLUT1 y VLGUT3 aunque también presentan diferencias electrofisiológicas (Antal, Eyre, Finklea, & Nusser, 2006). Además, una pequeña parte de las ETC son positivas para la enzima tirosina hidroxilasa (*Th*), necesaria en la síntesis de dopamina y, en consecuencia, se consideran dopaminérgicas (DA), aunque representan una minoría del

total de células TH del bulbo. Por su parte, las células sSA son, en su mayoría, glutamatérgicas, siendo las responsables de las conexiones excitatorias de los circuitos interglomerulares (**Figura I2**) (Aungst et al., 2003).



**Figura I2. Representación esquemática de los tipos neuronales del BO.** PGL, capa periglomerular; EPL, capa plexiforme externa; MCL, capa mitral; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa granular; CR, Calretinina; CB, Calbindina; TH, Tirosina hidroxilasa; CCK, colecistoquinina; 5T4, Glicoproteína de trofoblasto; TC, célula en penacho; MC, célula Mitral; GC, célula granular; PGC, célula periglomerular; sSA, célula de axón corto; ETC, célula en penacho externa; OSN, neurona olfativa sensitiva.

Las PGC presentan el soma más pequeño de todas las JGC y son las responsables de la inhibición intraglomerular (Wachowiak & Shipley, 2006). Todas ellas son interneuronas inhibitorias, es decir, que utilizan como neurotransmisor el ácido γ-aminobutírico (GABA),

derivado del ácido L-glutámico mediante la acción del enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). En el cerebro adulto existen dos genes que codifican distintas formas de la proteína GAD, una con 65 kDa (GAD65) y otra con 67 kDa (GAD67), siendo esta última la más abundante en el BO (Sheikh, Martin, & Martin, 1999).

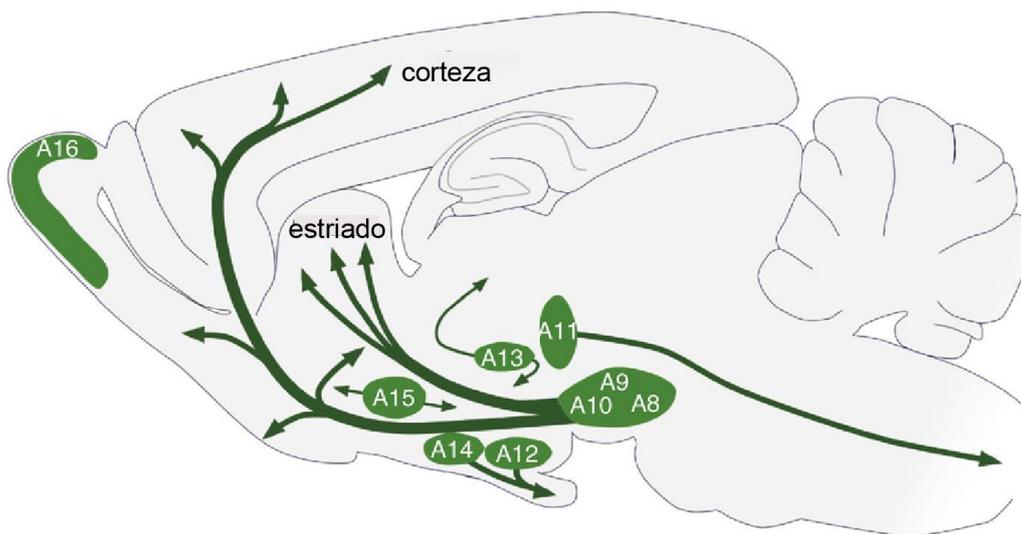
La expresión de las proteínas de unión a calcio, entre las que se incluyen la calbindina (CB), calretinina (CR), neurocalcina (NC) y parvalbumina (PV) han sido ampliamente utilizadas para distinguir algunas de las poblaciones neuronales del BO. Algunas de las neuronas JG expresan CB, CR o NC. Muchas de las EPL expresan PV mientras que ciertas MC y granulares son positivas para CR. Las células PG se dividen en 3 subtipos, no superpuestos entre ellos, basados en la expresión de CR, CB y TH (K. Kosaka et al., 1995). Aunque los tres subtipos son GABAérgicos, las neuronas positivas para TH también utilizan dopamina como neurotransmisor. Estas neuronas DA del BO constituyen un 10% de las células yuxtglomerulares y se diferencian del resto de neuronas PG por la expresión de la enzima limitante de la biosíntesis de las catecolaminas, TH (ya que son las únicas neuronas catecolaminérgicas del BO). Además, estas neuronas co-expresan preferentemente GAD67 (Parrish-Aungst, Shipley, Erdelyi, Szabo, & Puche, 2007).

La correlación entre clasificaciones moleculares y morfologías no es del todo clara y es especialmente confusa en el caso de las neuronas DA. Clásicamente se han diferenciado dos subtipos principales interneuronas DA en el BO basadas en criterios de tamaño y morfología: las grandes y las pequeñas (Kosaka & Kosaka, 2012; Nagayama, Homma, & Imamura, 2014). Las más grandes eran consideradas como células ETC, mientras que las pequeñas formaban parte de las células PG. Kiyokage et al. (2010) propusieron una clasificación alternativa que diferenciaba entre interneuronas DA oliglomerulares y poliglomerulares, sugiriendo que todas las interneuronas DA del BO son sSA. Años después se ha demostrado que algunas neuronas PG DA poseen segmento inicial del axón (AIS) y un tamaño superior, mientras que otras carecen de AIS y son de tamaño inferior (Chand, Galliano, Chesters, & Grubb, 2015). Curiosamente, cada uno de estos dos tipos de neuronas se generan en diferentes momentos: las que presentan AIS durante la etapa embrionaria, mientras que las que no lo presentan durante la etapa adulta (Galliano et al., 2018).

Finalmente, la gran heterogeneidad de las neuronas JGC DA-GABAérgicas ha hecho replantearse la clasificación actual y, recientemente, se han definido 5 subtipos DA en base a morfología (Kosaka, Pignatelli, & Kosaka, 2019). El primer grupo, las PGC grandes que presentan ramas dendríticas similares a las ETC y cuyos axones se extienden a glomérulos distantes, por lo que participan en las conexiones interglomerulares. El segundo grupo, las PGC pequeñas que incluyen tanto a las axónicas como a las anaxónicas, siendo estas últimas las que probablemente fueron consideradas en su día las clásicas interneuronas DA periglomerulares. Las células transglomerulares constituirían el tercer grupo, caracterizadas por extender sus procesos dendríticos a 2 o más glomérulos, mientras que las células incrustadas cuyas dendritas se extenderían principalmente a la periferia del glomérulo constituiría el cuarto. Por último, se

establece un quinto grupo reservado para las neuronas que no entran dentro de los anteriores grupos (Kosaka et al., 2019). Actualmente se carece de marcadores moleculares que distingan estos 5 grupos.

Además de las neuronas DA del BO, en los mamíferos existen otras subpoblaciones de neurona DA en el cerebro (**Figura I3**), que se caracterizan por la expresión de TH y síntesis de DA. Se clasifican en diferentes núcleos, comprendidos entre el A8 al A16, basados en su diversidad (Björklund & Dunnett, 2007). Las neuronas DA del BO pertenecen al grupo A16 y representan el mayor sistema DA del cerebro anterior (Cave & Baker, 2009) (**Figura I3**).



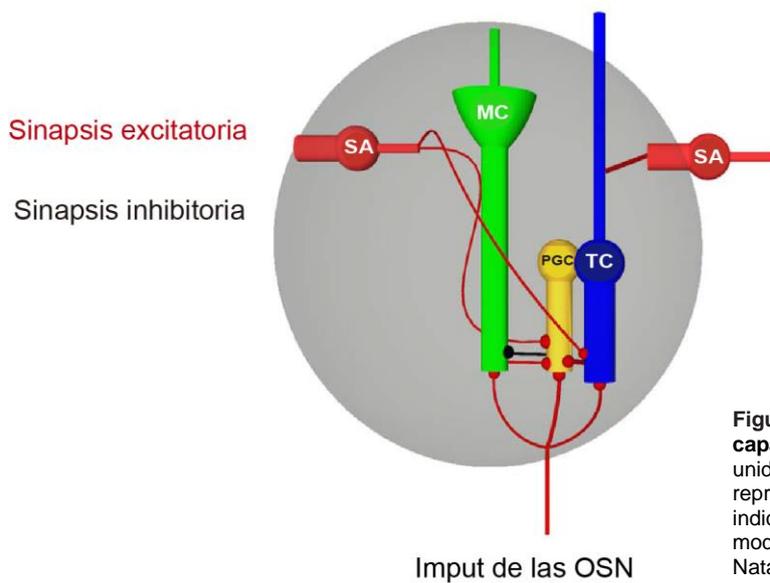
**Figura I3. Distribución de los núcleos dopaminérgicos en el cerebro adulto de un roedor.** Representación esquemática de la visión sagital del cerebro en el que figuran los 9 grupos del A8 al A16 definidos por Fuxe en 1965 y válidos en la actualidad. Las flechas representan proyecciones dopaminérgicas de los núcleos. Figura adaptada de (Björklund & Dunnett, 2007).

## 1.2 Circuitos neuronales del BO

El circuito por el que la información olfativa llega a los centros superiores es diferente al de otras modalidades sensoriales. En el epitelio olfativo de la nariz, las OSN se activan debido a la unión de las moléculas olorosas a sus receptores olfativos. En los mamíferos, cada OSN expresa exclusivamente un único receptor olfativo de los más de mil descritos hasta el momento (Barnes et al., 2020; Malnic, Hirono, Sato, & Buck, 1999), fenómeno ampliamente estudiado así como el mecanismo genético que lo permite (Serizawa et al., 2003; Zapiec & Mombaerts, 2020). Es más, se sabe que las OSN que expresan un receptor concreto están repartidas de manera aleatoria por todo el epitelio, por lo que, al contrario que otros sentidos como la visión, éstas no se distinguen por la posición espacial que ocupan, sino por el receptor que la neurona expresa y que le confiere una identidad molecular y conectividad concreta (Vassar et al., 1994; Zapiec &

Mombaerts, 2020). La presencia de tal variedad de receptores olfativos permite a los mamíferos detectar millones de sustancias. Se sabe que las OSN que expresan el mismo receptor olfativo inervan con sus axones dos glomérulos por BO formando un mapa de activación de los glomérulos específico de cada olor (Mombaerts et al., 1996; Zou, Chesler, & Firestein, 2009). En consecuencia, el reconocimiento de los olores se basa en un código combinatorio donde un olor activa múltiples receptores olfativos y las respectivas OSN activan, a su vez, determinados glomérulos del BO. Es decir, cada olor activa una combinación única de glomérulos que permite al cerebro de los mamíferos discriminar y detectar gran cantidad de olores (Mori, Takahashi, Igarashi, & Yamaguchi, 2006). A nivel del BO, los axones que provienen de las OSN sinaptan con las dendritas de las neuronas secundarias de proyección (las MC y TC) en unas estructuras esféricas denominadas glomérulos (Mombaerts et al., 1996). En cada glomérulo, además de las OSN, MC y TC, también encontramos las JGC que modulan de manera colectiva los outputs de las neuronas de proyección (**Figura I4**). Concretamente, las ETC coordinan la activación del microcircuito glomerular y constituyen el principal impulso excitador de las MC a través de una excitación en feedforward. Las dendritas de las MC/TC proyectan a un único glomérulo donde reciben los inputs de las neuronas OSN. Al mismo tiempo, los axones de las OSN también sinaptan con las interneuronas PGL que modulan localmente el input recibido, estas interneuronas, a su vez, son activadas por la liberación de glutamato de las MC y las TC originando una retroinhibición de los glomérulos (**Figura I4**). Por este motivo, el papel de las células PGL es de especial importancia en este circuito (T Kosaka, Deans, Paul, & Kosaka, 2005). Así mismo, la actividad de las MC, TC y las interneuronas también está sujeta a neuromodulación por parte de otros centros cerebrales, pues el BO recibe proyecciones noradrenérgicas del locus cerúleo, colinérgicas de la zona de Broca y serotoninérgicas de la zona medial y dorsal del rafe (Bendahmane, Ogg, Ennis, & Fletcher, 2016; Huang, Thiebaud, & Fadool, 2016). En esta misma línea, se ha descrito, recientemente, como las aferencias serotoninérgicas del rafe modulan la respuesta olfativa del bulbo, mediante la regulación de la actividad de las interneuronas de la zona PG mediante los receptores 5-HT<sub>2</sub> (J. Brill, Shao, Puche, Wachowiak, & Shipley, 2016; Brunert, Tsuno, Rothermel, Shipley, & Wachowiak, 2016) y la inhibición de las MC mediante los receptores 5-HT<sub>1</sub> (Huang et al., 2017).

Llama la atención que, a pesar de lo que conocemos sobre el procesamiento de olores, a día de hoy no se sabe con detalle qué propiedades de los olores son importantes en la olfacción y los detalles de todo su procesamiento cerebral. Efectivamente, estudios recientes intentaron establecer un patrón entre los glomérulos activados por un compuesto oloroso, así como los conjuntos de ETC y MC que se activan. Los resultados sugieren que ni siquiera la estructura físico-química de los compuestos olorosos puede proporcionar una predicción del patrón de activación bulbar (Chae et al., 2019). Es decir, es necesario profundizar en el tema con nuevas investigaciones que nos ayuden a comprender mejor la relación entre la estructura del compuesto químico y los patrones de actividad neuronales tanto espaciales como temporales.



**Figura 14. Modelo de conectividad de la capa glomerular.** Arquitectura de una unidad glomerular. Las bolas negras representan sinapsis inhibitorias y las rojas indican sinapsis excitatorias. Imagen modificada de Polese, Martinelli, Marco, Natale, & Gutierrez-Galvez, 2014.

Tras la integración de los inputs y la modulación de estos, las neuronas eferentes de proyección, proyectan a las estructuras olfatorias secundarias (fuera del BO) y estas, a su vez, conectan con las estructuras olfativas terciarias que, por último, mandan de vuelta conexiones a las células de la capa granular. En consecuencia, el sistema olfatorio está formado por complejas conexiones recíprocas, directas e indirectas con otras áreas cerebrales (Marin et al., 2018). En esta línea, se ha descrito como la activación de las neuronas DA podría producirse por parte de las proyecciones aferentes colinérgicas mediante la activación de los receptores muscarínicos de las neuronas DA (Pignatelli & Belluzzi, 2008). Otros estudios recientes indican que las células mitrales y en penacho transmiten paralelamente información complementaria sobre los olores y que ambas son moduladas de manera similar en la capa glomerular, aunque su regulación difiere en las capas más profundas. Además, ambas son coordinadas en última instancia por las células de axón corto profundas previamente al input que envían hacia el córtex olfativo (piriforme) (Cavarretta et al., 2018). Otros estudios de imágenes de calcio de las células mitrales, revelan que los eventos olfativos previos a la olfacción de un olor influye en la percepción del olor (Vinograd, Livneh, & Mizrahi, 2017) reforzando la idea ya expuesta de que el BO presenta una plasticidad asociada a los estímulos externos (Livneh & Mizrahi, 2012; Marks, Cheng, Cummings, & Belluscio, 2006).

### 1.3 Implicación de las neuronas DA del BO en la olfacción

Desde un punto de vista funcional, los primeros indicios de la implicación de las neuronas DA en olfacción fueron observados en ratones que carecían de receptores y transportadores de

la dopamina. Existen dos tipos de receptores de dopamina los D1 y los D2 y las células mitrales expresan ambos receptores. Una de las primeras observaciones que relacionaron la función inhibitoria de las neuronas DA en las células mitrales fue la disminución *in vitro* de la transmisión sináptica de las neuronas mitrales al activar el receptor de DA (Hsia, Vincent, & Lledo, 1999). Más tarde, estudios en ratas revelaron que el bloqueo específico de los receptores D2 mediante antagonistas, a diferencia de los D1, altera la discriminación de los olores de una manera dosis-dependiente (Escanilla, Yuhas, Marzan, & Linster, 2009). Estos resultados están en consonancia con los que se obtienen con los mutantes específicos para el receptor D2 y los mutantes para DAT, en los que se observa un déficit en la discriminación olfativa, aunque su habituación, su sensibilidad o su memoria de reconocimiento no difiere de la que se observa en un animal control (Tillerson et al., 2006). Conviene resaltar que, la activación de los receptores D2 recapitula los resultados comportamentales que se obtienen al disminuir las concentraciones de los olores, mientras que el bloqueo de estos receptores recapitula el comportamiento observado en los ratones al incrementar la concentración. Es decir, se ha propuesto que la DA del BO podría funcionar como control de la ganancia del sistema optimizando la sensibilidad olfativa (Wei, Linster, & Cleland, 2006). Así mismo, al bloquear la adición de células DA que ocurre de manera natural se observan alteraciones en la memoria olfativa a corto plazo. Por tanto, además del procesamiento de la información olfativa (Banerjee et al., 2015; S. Liu, Plachez, Shao, Puche, & Shipley, 2013), parece que las interneuronas DA del BO ejercen también una función destacada en la discriminación olfativa asociada al control que ejercen en el output de las neuronas de proyección (Escanilla et al., 2009; Tillerson et al., 2006).

Una de las razones por las que también se ha estudiado el papel de las neuronas DA en la olfacción ha sido el deterioro olfativo que aparece previamente a los síntomas motores en la enfermedad del Parkinson (PD del inglés *Parkinson Disease*). Este síntoma no motor está considerado un marcador clínico que precede en años al avance de la neurodegeneración de la SN, siendo la razón por la que los estudios se han centrado en aumentar el conocimiento sobre estas neuronas con el objetivo de encontrar nuevas posibilidades de tratamiento previas al desarrollo de la enfermedad (Piffl et al., 2017).

Los modelos animales que recapitulan esta enfermedad neurodegenerativa se inducen mediante la inyección de 6-OHDA en la Sustancia Negra (SN). Siete días después de la inyección de este compuesto, no se observa alteración del comportamiento motor aunque sí en los olfativos, y el análisis electrofisiológico muestra una hiperactividad anormal de las células mitrales del BO (Zhang et al., 2019). Esto podría deberse a una alteración de la actividad DA del BO, ya que estudios electrofisiológicos en los que se disminuyen específicamente el número de neuronas DA del BO revelan un aumento de los outputs de las células mitrales del BO (Sasajima, Miyazono, Noguchi, & Kashiwayanagi, 2015). Y, a la inversa, la hiperactivación de las neuronas DA en el BO altera el circuito aumentando la respuesta de las células ETC que, a su vez, inhiben el circuito intraglomerular disminuyendo, en última instancia, las señales que transmiten las células mitrales/en penacho (Liu, Plachez, Shao, Puche, & Shipley, 2013). Además, lo expuesto anteriormente, se ve apoyado por el hecho de que las células DAT+ están acopladas mediante

sinapsis químicas y eléctricas a las células en ETC que regulan el output de la respuesta que generan las células de proyección (Banerjee et al., 2015). La hipótesis de que la hiposmia es generada por el aumento de las células TH positivas del BO o de su actividad (Huisman, Uylings, & Hoogland, 2004; Mundiñano et al., 2011) también se ve apoyada por experimentos recientes en los que este aumento de interneuronas DA generado al inyectar 6-OHDA en la SN se ve compensado a los 14 días por la inyección directa de 6-OHDA en el BO (disminuye las células TH positivas del BO) (Ilkiw et al., 2019).

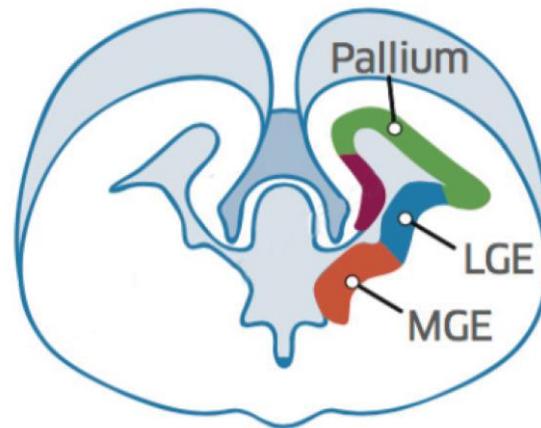
Así mismo, se han descrito otras enfermedades en las que se ve alterada la olfacción. Algunos estudios muestran que la depresión en animales reduce la sensibilidad olfativa (Negoiias et al., 2010) y reduce la neurogénesis adulta reduciendo la cantidad de neuroblastos migradores hacia el BO. De forma concomitante, la disminución de las neuronas DA PGL debido a la reducción de la neurogénesis induce comportamientos depresivos y produce la alteración olfativa (Ilkiw et al., 2019).

#### 1.4 Neurogénesis embrionaria de las interneuronas olfativas

En el cerebro de ratones, la neurogénesis embrionaria empieza con la transformación de las células neuroepiteliales en células de glía radial (RGC del inglés *Radial glial cells*). Inicialmente, éstas se comportan como progenitores neurales (NPC del inglés *Neuron Progenitor Cells*) con un destino restringido generando directamente neuronas o progenitores neurales intermediarios, que, a su vez, dan lugar a neuroblastos postmitóticos mediante mitosis simétricas (Götz & Huttner, 2005). Por último, en el desarrollo más tardío, las RGC producen células gliales como astrocitos u oligodendrocitos.

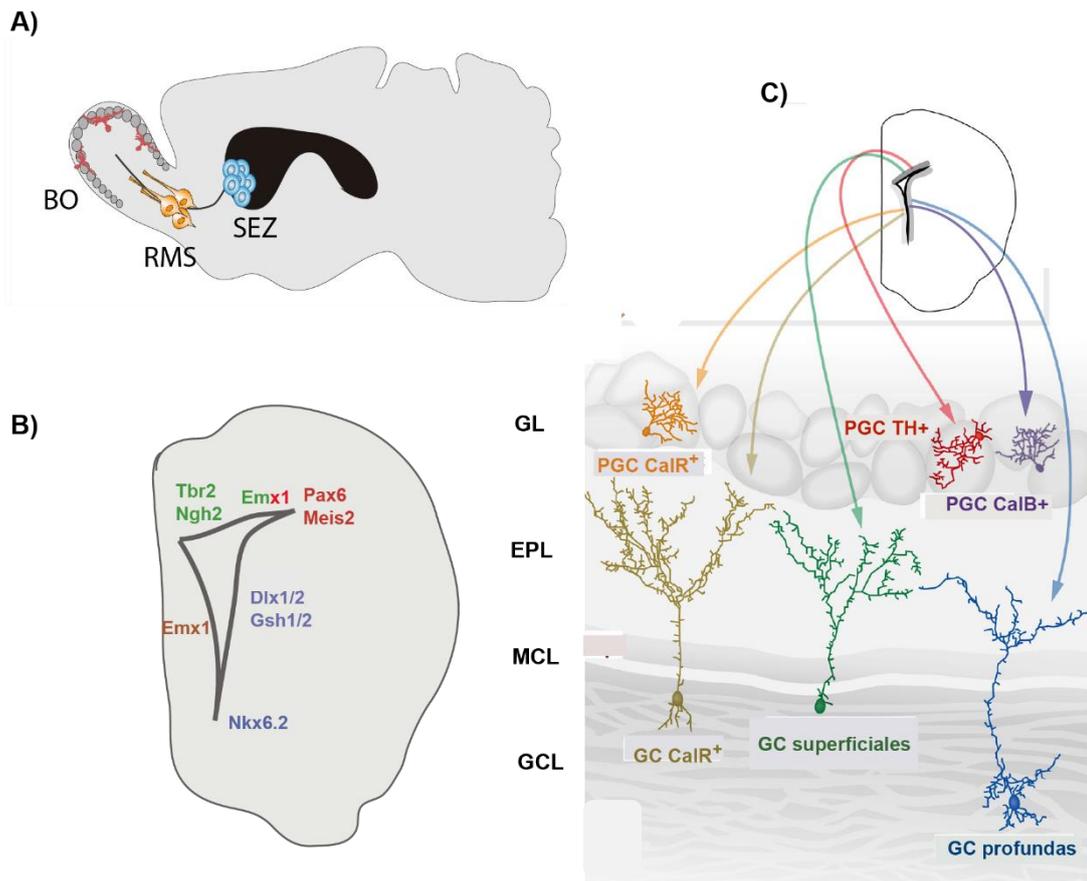
La producción de interneuronas del BO empieza en el día embrionario (E) 14 (Wichterle, Turnbull, Nery, Fishell, & Alvarez-Buylla, 2001). Las interneuronas del BO originadas durante el periodo embrionario provienen de las NPC localizadas en las eminencias ganglionares del subpallium o parte ventral del telencéfalo. Se diferencian 3 eminencias ganglionares: la eminencia ganglionar medial (MGE), la eminencia ganglionar lateral (LGE) y la eminencia ganglionar caudal (CGE) (**Figura I5**) (Alvarez-Buylla, Kohwi, Nguyen, & Merkle, 2008). Las interneuronas granulares y PGL del BO provienen de la migración tangencial de los precursores situados en la LGE (**Figura I5**), mientras que el resto de neuronas del BO se generan a partir de las células neuroepiteliales locales (Anderson, Marin, Horn, Jennings, & Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 2001). Las neuronas DA grandes nacen embrionariamente antes que las pequeñas, y previamente al comienzo de la población del BO por parte del resto interneuronas (Alvarez-Buylla et al., 2008). Clásicamente se había determinado que empiezan a generarse a E13.5 (Vergaño-Vera et al., 2015), sin embargo, en un artículo reciente encontraron neuronas DA nacidas a E12 (Galliano et al., 2018).

**Figura 15: Eminencias ganglionares de ratón.** Representación coronal del cerebro embrionario de ratón en la que figuran la eminencia ganglionar lateral (LGE), medial (MGE) y el palio. Modificada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2008.



### 1.5 Neurogénesis adulta de la zona subventricular

Además de por sus funciones olfativas, otra de las razones por las que el BO de los mamíferos ha sido ampliamente estudiado es porque, junto con el hipocampo, es una de las zonas del cerebro en las que se generan neuronas durante la vida adulta (Kosaka y Kosaka, 2016). Cada día las células madre neurales adultas (NSC del inglés *Neural Stem Cells*) de los roedores, situadas en la zona subependimaria (SEZ) a lo largo de los ventrículos laterales, dan lugar a miles de neuroblastos que migran durante aproximadamente 15 días una gran distancia (3-8mm en ratones) a través de la ruta migratoria rostral (RMS) hasta llegar al BO (**Figura 16A**) (Belluzzi, Benedusi, Ackman, & LoTurco, 2003; Carleton, Petreanu, Lansford, Alvarez-Buylla, & Lledo, 2003; Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Una vez en el BO, migran de manera radial desde el centro hacia la zona periférica, donde maduran y se integran en el circuito preexistente como interneuronas (Whitman & Greer, 2007). La migración radial en el bulbo es controlada por dos glicoproteínas; la reelina y la tenascina-R (David, Schachner, y Saghatelian, 2013; Hack, Bancila, Loulier, Carroll, & Cremer, 2002; Saghatelian, de Chevigny, Schachner, & Lledo, 2004). El 95% de las células del bulbo originadas durante la etapa adulta (ABN del inglés *ADult Borneoed Neurons*) se diferencian como GC y la mayoría del 5% restante se diferencian en PGC (Lledo, Alonso, & Grubb, 2006). Las evidencias indican que en humanos también hay neurogénesis adulta y se observa, así como un aumento de neuronas a lo largo de la vida de las personas (Alizadeh *et al.*, 2015).



**Figura 16. Neurogénesis adulta de las neuronas del BO.** **A)** Representación sagital del cerebro adulto de ratón. En azul se muestran los progenitores situados en la SEZ. Los neuroblastos (en amarillo) migran a través del RMS hacia el BO. Una vez alcanzado el bulbo, las neuronas migran radialmente hacia las capas donde van a diferenciarse en neuronas granulares y periglomerulares (en naranja). **B)** Heterogeneidad espacial de la SEZ que muestra la expresión diferencial de FT en las distintas zonas. Figura modificada de (Fiorelli, Azim, Fischer, y Raineteau, 2015). Progenitores que dan lugar a PGL TH+ (rojo), PGL CalB+ y GC profundas (morado-azul), PGL CalR+ y GC CalR+ (marrón) y GC superficiales (verde). **C)** Organización regional de las NSC en la SEZ y las neuronas a las que dan lugar los progenitores de cada región. Modificada de (Takahashi, Yoshihara, & Tsuboi, 2018).

Las NSC también denominadas células de tipo B se localizan en las paredes de los ventrículos, en la llamada SEZ y son las que dan lugar a las nuevas interneuronas olfativas (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Estos progenitores se generan a partir de las células de glía radial entre el día embrionario (E) 13.5 y E15.5 aunque se mantienen quiescentes hasta que son reactivadas postnatalmente (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Los factores extrínsecos o intrínsecos que promueven la quiescencia y la activación de estas NSC aún son en gran parte desconocidos. Sin embargo, se sabe que las neuronas que se integran en el BO durante las 8 primeras semanas después del nacimiento (el denominado periodo crítico), presentan mayores niveles de plasticidad morfológica y funcional en comparación a su etapa de maduración posterior (Kelsch, Lin, Mosley, & Lois, 2009; Lemasson, Saghatelian, Olivo-Marin, & Lledo, 2005; Mizrahi, 2007; Yamaguchi & Mori, 2005).

Cada zona de la pared del ventrículo deriva de diferentes regiones del telencéfalo embrionario pudiendo dividirse varios dominios claramente identificados por la expresión de factores de transcripción (FT) altamente conservados que especifican el fenotipo de los progenitores alojados en cada región (**Figura I6B**) (Fujiwara & Cave, 2016). Los progenitores que dan lugar a las interneuronas DA se sitúan en la región dorsal del ventrículo lateral que deriva del palio, progenitores de esta misma región también dan lugar a una pequeña proporción de células yuxtglomerulares glutamatérgicas (Fernández, Croce, Boutin, Cremer, & Raineteau, 2011; Merkle, Mirzadeh, & Alvarez-Buylla, 2007; Young, Fogarty, Kessar, & Richardson, 2007). Esta región se caracteriza por la expresión del FT *Pax6* (Brill et al., 2008; Merkle et al., 2007), proteína requerida para el correcto desarrollo de fenotipo DA (Brill et al., 2008; Dellovade & Pfaff, 1998; Haba, Nomura, Suto, & Osumi, 2009; Kohwi et al., 2007) y ampliamente utilizado como marcador de estas interneuronas. De hecho, la sobreexpresión de este FT en los precursores genera un aumento significativo del número de neuronas DA generadas (Hack et al., 2005). Además los progenitores DA expresan *Emx1* evidenciando su origen palial (Agoston et al., 2014; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007) (**Figura I6 B-C**). Por su parte, las CB+ provienen de las células madre localizadas en la pared lateral del ventrículo que proviene del subpalio que expresan marcadores como *Dlx1/2*, *Gsh1/2* o *Nkx6.2* y cuyas células también dan lugar, durante la neurogénesis adulta, a algunas interneuronas profundas de la GC (**Figura I6 B-C**) (Merkle et al., 2014; Young et al., 2007). Un estudio publicado recientemente, revela que estos progenitores de CB+ expresan el FT *Vax1* responsable de la inhibición de *Pax6* a través de la activación del microRNA *miR-7*, de manera que se evita el linaje DA (Coré et al., 2020). Por último, las CR+, tanto GC como PGC, derivan de los progenitores de la pared medial que proviene del septum caracterizadas por la expresión de *Emx1* (**Figura I5 B-C**) (Fernández et al., 2011; Merkle et al., 2014; Merkle et al., 2007). Además de los progenitores de la SEZ, algunos estudios recientes señalan que algunos de los progenitores que dan lugar a las neuronas DA del BO se encuentran en la RMS (Schweyer et al., 2019).

El paradigma establecido hasta el momento sobre la neurogénesis adulta del BO se basa en dos principios. El primero es que la integración neuronal de las células nuevas que llegan al BO es un proceso competitivo por el que existe un periodo crítico de entre dos a ocho semanas después de llegar al bulbo en el que la mitad de las células que lo alcanzan mueren por apoptosis. El segundo principio consiste en que el BO representa un sistema de reemplazo en el que las nuevas células que se integran reemplazan a las antiguas dando lugar a un número estable de neuronas a lo largo del tiempo. Sin embargo, experimentos muy recientes que han estudiado las cohortes de neuronas postnatales, así como las adultas desde su llegada al BO hasta 6 meses, han revelado que la dosis de análogos de la timidina clásicamente utilizados para llevar a cabo el rastreo de las neuronas generadas induce muerte celular. Los autores han demostrado que las concentraciones de BrdU (Bromodeoxiuridina) clásicamente utilizada (50 mg/kg) provocan la muerte a largo plazo del 40% de estas células, en cambio concentraciones más reducidas como 5mg/kg evitan este efecto dañino. Por esta razón, se recomienda utilizar análogos como el EdU que puedan ser utilizados a menos de 50mg/kg. Mediante el estudio de las nuevas neuronas y

evitando su muerte por toxicidad, se ha demostrado que, en realidad, las neuronas generadas a lo largo de la vida adulta de los animales se van añadiendo al circuito preexistente, por lo que no existe ningún proceso de reemplazo, sino que el BO está en permanente crecimiento (Platel et al., 2019). Estos datos se apoyan también en observaciones anteriores que indican un aumento de la población DA a lo largo del tiempo (Adam & Mizrahi, 2011), mientras que las granulares mantienen una población estable a partir de los 2 meses. Por consiguiente, el nivel de muerte celular observado durante la etapa adulta de los roedores es mucho menor al considerado previamente.

El papel que ejercen específicamente las neuronas nacidas en la etapa adulta en el sentido del olfato es controvertido, sobre todo determinar si ayudan a los animales a distinguir olores y en qué circunstancias. Algunos estudios han mostrado que son esenciales en la discriminación y en la memoria olfativa (Moreno et al., 2009; Sakamoto et al., 2014), mientras que otros no han encontrado diferencias en los comportamientos olfativos de animales que presentan la neurogénesis adulta suprimida aunque sí se observen cambios en los circuitos bulbares (Breton-Provencher, Lemasson, Peralta, & Saghatelyan, 2009). Un estudio más reciente, muestra que los ratones que carecen de neurogénesis adulta discriminan correctamente olores muy distintos, pero son incapaces de diferenciar entre olores parecidos. Es interesante destacar que esta falta de discriminación se atribuye a la aparición de un patrón ambiguo de activación de la células mitrales en comparación con los controles y sorprendentemente sólo se observa cuando los animales están implicados activamente en una tarea (W. Li et al., 2018).

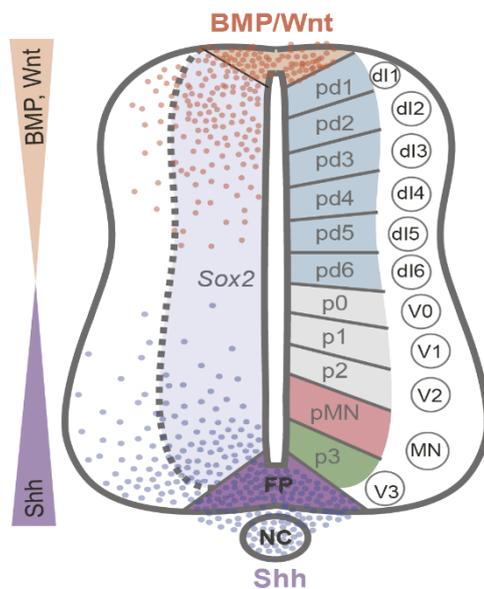
## **2. Programas genéticos de diferenciación neuronal**

En el primer apartado de la introducción de este trabajo hemos ofrecido una visión de la diversidad celular presente en el BO, sus circuitos y su funcionalidad. En esta segunda parte de la introducción se explicarán algunos conceptos básicos y generales del neurodesarrollo y la especificación neuronal. Estos conceptos ayudarán a comprender mejor el siguiente capítulo, centrado específicamente en los procesos de diferenciación dopaminérgica.

El sistema nervioso es uno de los tejidos más complejos, en cuanto a estructura y diversidad celular. A nivel funcional, controla comportamientos muy diferentes, desde los básicos como respirar, hasta los más sofisticados, como la memoria o el aprendizaje. Para poder llevar a cabo esta complejidad funcional es necesario un alto nivel de especialización que llevan a cabo una gran cantidad de tipos neuronales diferentes descritos hace más de cien años por Santiago Ramón y Cajal (Cajal, 1899). En la actualidad, a pesar de disponer de herramientas de análisis a nivel molecular, funcional o de imagen, muchos de los mecanismos y factores genéticos responsables de controlar el desarrollo y mantenimiento estructural y funcional del sistema nervioso central aún son desconocidos. Hoy en día, se estima que el cerebro humano contiene entre 86-100 mil millones de neuronas divididas en más de 10.000 tipos neuronales diferentes

(Azevedo et al., 2009; Muotri & Gage, 2006; Zeng & Sanes, 2017). La gran diversidad celular que conforma el cerebro es generada en momentos específicos y en regiones y circunstancias concretas. Por ello, la comprensión de los procesos que dan lugar a esta gran diversidad en un organismo es uno de los retos más ambiciosos y fascinantes de la biología.

Los estudios clásicos en vertebrados se han centrado en identificar y manipular los factores reguladores, tales como FT o proteínas de señalización (morfógenos) con el objetivo de estudiar su papel en la generación de distintos tipos neuronales. Los factores de transcripción son proteínas que se unen a regiones específicas del genoma controlando la actividad de los genes diana. Por su parte, los morfógenos son moléculas sintetizadas durante el desarrollo embrionario que se distribuyen a lo largo de los tejidos en forma de gradientes de concentración y median sus efectos en las células mediante la activación de FT específicos denominados FT dependientes de señal (**Figura 17**).



**Figura 17. Especificación del destino celular a lo largo del tubo neural de vertebrados mediante la acción de morfógenos.** A lo largo del eje dorso-ventral se establece la identidad de los progenitores (p0-p3, pMN, pd1-pd6) basada en el patrón del gradiente de morfógenos secretado: *Shh* proveniente del polo ventral (NC, notocorda) y la señalización dorsal de Wnt y BMP. Además, el eje antero-posterior es especificado por otros morfógenos como el ácido retinoico. Cada uno de estos dominios de progenitores da lugar a poblaciones neuronales concretas (dl1-6, V0-3 y MN). Modificada de Briscoe & Small, 2015.

En la actualidad se conocen multitud de cascadas moleculares y redes genéticas responsables de la diferenciación específica de las neuronas. Por ejemplo, se sabe que durante el desarrollo temprano, una serie de morfógenos como FGF, Shh, Wnt, BMP, PDGF, ácido retinoico, etc. son secretados en el embrión formando gradientes de concentración responsables de la regionalización del sistema nervioso central (SNC) (**Figura 17**) (Briscoe, Pierani, Jessell, & Ericson, 2000). En respuesta a estos gradientes, cada célula expresa un conjunto de factores de transcripción diferente que le confiere sus características definitorias. Por ejemplo, la expresión genes proneurales en los progenitores los compromete hacia una diferenciación neural. Gran parte de los genes proneurales pertenecen al tipo hélice-bucle-hélice (*bHLH*), entre los que se incluyen las *Neurogeninas* o *Ascl1*, FT evolutivamente conservados e imprescindibles para la diferenciación hacia el linaje neural (Baker & Brown, 2018). Otros FT inducen destinos

específicos y mantienen relaciones inhibitorias recíprocas para definir regiones de progenitores que dan lugar a poblaciones homogéneas de neuronas.

Una vez establecido el destino neural de los progenitores, estos se dividirán para dar lugar a los neuroblastos postmitóticos que migran y se diferencian. Durante el desarrollo el SNC crece en complejidad y en tamaño, de manera que los diferentes tipos neuronales migran desde diferentes orígenes hasta coordenadas específicas (Marín, Valiente, Ge, & Tsai, 2010). Durante este complejo proceso las neuronas ya van adquiriendo algunas de las características propias de cada tipo neuronal.

## 2.1 Diferenciación terminal neuronal

La adquisición del transcriptoma específico de un tipo neuronal es un proceso prolongado que empieza con el compromiso de los progenitores, seguido por la migración de los neuroblastos y la culminación del proceso en lo que se llama la diferenciación terminal, donde finalmente se activa el transcriptoma de la neurona madura (Rubenstein & Rakic, 2013). A parte de su función en la selección inicial y especificación de las células progenitoras, los FT son también los principales reguladores de la diferenciación terminal (Hobert, 2008).

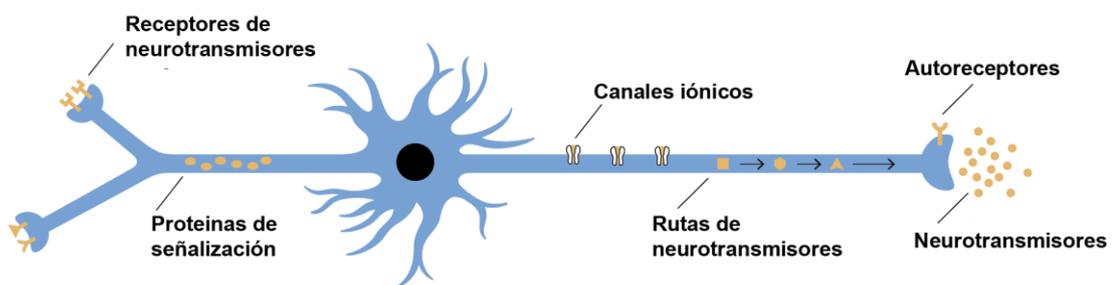
Los diferentes tipos de neuronas que encontramos en el sistema nervioso pueden clasificarse en función de sus características anatómicas, electrofisiológicas o moleculares. En las últimas décadas, los estudios genómicos de expresión han permitido definir de manera más específica cada subtipo neuronal en base a la expresión de un conjunto de genes específicos para cada tipo celular (Zeng & Sanes, 2017). Los genes cuya expresión caracteriza el fenotipo de un tipo de neurona madura funcional se denominan genes efectores (**Figura 18**). Estos genes codifican para las proteínas que confieren las características propias de cada tipo neuronal. Entre ellas se encuentran los receptores de neurotransmisores, canales iónicos, genes relacionados con la ruta de síntesis de un neurotransmisor, proteínas estructurales, etc (**Figura 18**). La expresión de un conjunto de genes efectores concreto genera una firma molecular que define de manera única la identidad y funcionalidad de la neurona siendo una parte importante del transcriptoma de una neurona madura (Hobert, 2008). De hecho, en el desarrollo, poco después de convertirse en células postmitóticas, las interneuronas ya exhiben un transcriptoma similar al que presentan en los últimos estadios de diferenciación (Mi et al., 2018).

La batería de genes definitorias de un tipo neuronal es combinatoria. Es decir, las propiedades características de cada neurona no están definidas por la expresión de unos genes expresados únicamente en ese tipo neuronal, sino por una combinación de genes específica. Generalmente, cada gen individualmente se expresa en varios tipos de neuronas (Hobert, 2016).

En los años ochenta y noventa, se iniciaron los primeros estudios sobre la regulación de los genes de diferenciación terminal, mediante el uso de genes reporteros expresados en líneas celulares o en cultivos primarios (Martie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994). Sin embargo,

estos estudios *ex vivo* no tenían en cuenta el contexto celular en el organismo. En este respecto, el desarrollo de modelos animales modificados genéticamente y la introducción de reporteros de la expresión de los genes, como la proteína fluorescente verde (GFP), supuso un antes y un después en el estudio *in vivo* de la regulación de la diferenciación. El ratón ha sido utilizado como modelo animal de experimentación durante mucho tiempo, sin embargo, los estudios *in vivo* de la diferenciación neuronal en este organismo presentan una gran dificultad y tienen un coste técnico elevado. Además, la complejidad del desarrollo del sistema nervioso, con múltiples etapas de especificación de progenitores neuronales, y largas etapas de migración, dificulta el estudio directo de la diferenciación neuronal terminal en roedores.

### Características terminales de una neurona madura



**Figura 18. Genes efectores de una neurona madura.** Cada neurona se caracteriza por la expresión de una serie de genes efectores, también llamados características terminales) que definen la identidad y funcionalidad de la neurona madura. Entre estos encontramos toda la maquinaria implicada en la síntesis de los neurotransmisores, receptores, canales iónicos, autoreceptores y proteínas de señalización. Figura adaptada del *manuscrito de tesis de Carla Lloret*.

Complementando a los modelos de ratón, existen otros modelos animales más sencillos, que permiten una manipulación genética rápida y eficaz como por ejemplo *Caenorhabditis elegans*. La sencillez experimental de este nemátodo junto con su corto ciclo de vida y su bien caracterizado sistema nervioso ofrece grandes ventajas en el estudio de los mecanismos reguladores de la diferenciación terminal. Por ello, ha sido en este modelo animal donde se han realizado estudios más detallados de la diferenciación neuronal terminal (Doitsidou et al., 2013; Flames & Hobert, 2011; Patel & Hobert, 2017). No obstante, cabe destacar que los mismos mecanismos utilizados en *C. elegans* se encuentran conservados entre este nemátodo y otros organismos modelo como el ratón hasta los humanos (Hobert & Kratsios, 2019).

En cada tipo neuronal, el conjunto de los genes efectores es regulado específicamente por FT referidos como selectores terminales (Hobert, 2008). El término es una extensión del concepto original de gen selector originalmente propuesto por García-Bellido en 1975 (García-Bellido,

1975) que designa a los genes responsables de la identidad de los órganos. Los selectores terminales son genes imprescindibles en la diferenciación terminal de un tipo neuronal, puesto que sin la expresión de ellos el fenotipo de la neurona no se adquiere correctamente. Es importante recalcar que su acción se restringe a los últimos eventos de la diferenciación, actuando directamente sobre los genes efectores, de modo que los FT que ejercen su función en las etapas tempranas del desarrollo y que comprometen los progenitores hacia un destino neuronal específico no son considerados como selectores terminales. Su definición también añade que los selectores terminales regulan de manera directa de la expresión de los genes efectores y su expresión se mantiene a lo largo de la vida de una neurona sin la que se altera el estado diferenciado de la célula (**Figura I9**). Estos FT, en consecuencia, son responsables no solo de iniciar sino también de mantener activamente la expresión de las características terminales (o genes efectores) de cada tipo neuronal (Deneris & Hobert, 2014). Por el contrario, las características panneuronales, como pueden ser las relacionadas con las vesículas sinápticas, no se ven alteradas en los mutantes para los selectores terminales (Hobert, 2016) (**Figura I9**).

Los selectores terminales actúan como un conjunto. En la actualidad se ha avanzado en el conocimiento e identificación de estos conjuntos que seleccionan tipos neuronales específicos. Por ejemplo, sabemos que UNC-3 junto con LIN-39 establecen las características terminales únicas de las neuronas colinérgicas (Feng et al., 2020). Así mismo, Lloret-Fernández y colaboradores (2018) identificaron seis factores de transcripción responsables de la diferenciación terminal de la neurona serotoninérgica HSN de *C. elegans*. Llama la atención, que la combinación de selectores terminales de este nemátodo es homóloga a la de los FT que en ratones controla la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe de ratones, sugiriendo la conservación filogenética de estos programas y conjuntos en la diferenciación terminal serotoninérgica.

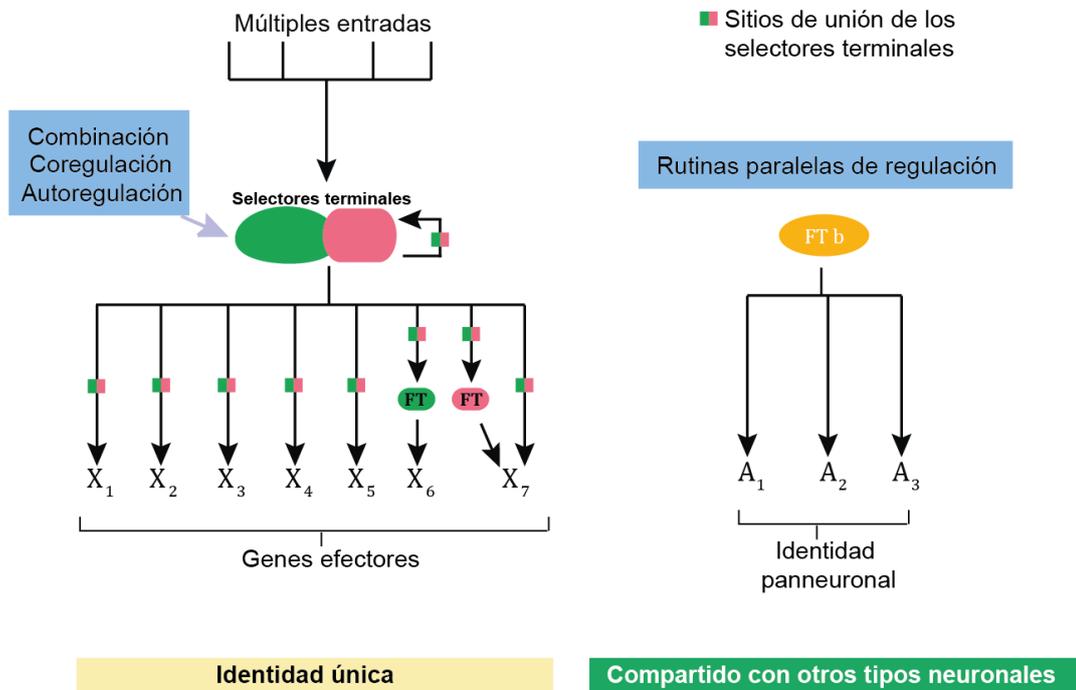
Generalmente, un FT no regula la expresión de los genes efectores de un único tipo neuronal, sino que diferentes tipos neuronales comparten algunos de estos efectores y es una combinación específica de selectores terminales la que determina de forma exclusiva la activación del conjunto de genes efectores de cada tipo de neurona (Hobert, 2016). Por ejemplo, *lim-4* opera junto a *sox-2* en *C. elegans* especificando neuronas sensoriales olfatorias (Alqadah et al., 2015) y también actúa, independientemente de *sox-2* y junto a otros FT, en la adquisición de la identidad de neuronas motoras colinérgicas (Kim et al., 2015). Así mismo, la expresión de un mismo gen es regulada en distintos tipos de neuronas mediante módulos reguladores paralelos que reciben el input de los selectores terminales que actúan en cada tipo neuronal (**Figura I9B**).

A lo largo de los años, se han descrito muchos FT cuya eliminación resulta en el desarrollo fallido de un tipo neuronal concreto y que cumplen con los requisitos para ser considerados selectores terminales, tanto en *C. elegans* como en mamíferos. Por ejemplo, la implicación de *Lhx2* (un gen de homeodominio LIM) en la adquisición de características definitorias de las neuronas receptoras olfatorias (Monahan et al., 2017), el papel crítico de *Pet-1* en la

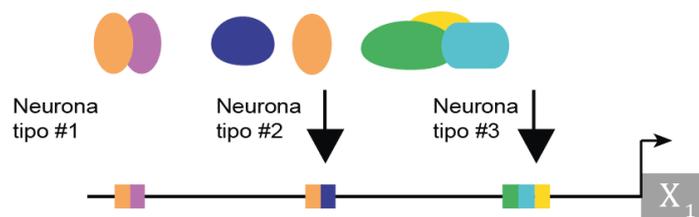
diferenciación de las neuronas serotoninérgicas (Liu et al., 2010) o el papel de *Brn3a* en la especificación de las neuronas habenuclares mediales del ratón (Serrano-Saiz, Leyva-Díaz, De La Cruz, & Hobert, 2018).

## Programas de expresión genética en neuronas maduras

### A) Acción de selectores terminales



### B) Regulación diferencial de los genes efectoros



**Figura 19. Modo de acción de los selectores terminales.** A) Rutinas paralelas integran la regulación génica de las características neuronales. Los rectángulos coloreados ilustran la unión de los selectores terminales a las regiones reguladoras de los genes efectoros. B) Los selectores terminales actúan en combinaciones, dando lugar a una firma específica y única para cada tipo neuronal. Se muestra un ejemplo de un gen efector ( $X_1$ ) común en tres tipos neuronales distintos, cuya expresión es regulada por distintas combinaciones de selectores terminales en cada uno de los tres tipos neuronales. Figura adaptada del *manuscrito de tesis de Ángela Jimeno*.

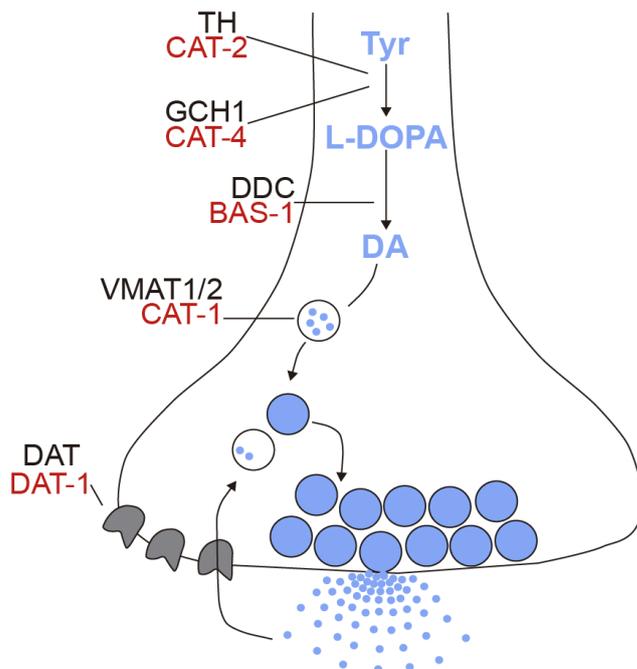
### 3. Diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas

Las neuronas dopaminérgicas tienen gran importancia en el sistema nervioso central ya que regulan muchos circuitos cerebrales, siendo la alteración de la homeóstasis de la dopamina una de las causas que se especula que subyacen a trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos como la esquizofrenia o el Parkinson (Grace, 2016). Como ya se ha comentado con anterioridad, en el cerebro de mamíferos encontramos tres poblaciones de neuronas dopaminérgicas localizadas en el diencéfalo, mesencéfalo y en el BO que presentan características anatómicas y funcionales distintas (**Figura I2**) (Chinta & Andersen, 2005). Por un lado, las neuronas DA mesencefálicas localizadas en la sustancia negra coordinan la locomoción y su pérdida dan lugar al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Bissonette & Roesch, 2016; Kravitz et al., 2010). Por otro lado, las situadas en el área ventral tegmental, controlan la cognición y el sistema de recompensa cuyo desbalance puede producir conductas adictivas (Keiflin y Janak, 2015). Por último, las del BO son necesarias para el procesamiento de la información olfativa procedente de las neuronas olfatorias receptoras.

La dopamina es un neurotransmisor incluido dentro de la familia de las catecolaminas, junto con la noradrenalina y la adrenalina. Estos tres neurotransmisores se sintetizan a partir del mismo precursor -la tirosina- y comparten parte de la ruta sintética. Independientemente de su localización anatómica, todas las neuronas DA se caracterizan por expresar un grupo de genes conocidos como los “genes de la vía de la dopamina” implicados en la síntesis, liberación y recaptación de la dopamina; estos genes pueden ser considerados como genes efectores de las neuronas DA (**Figura I10**). Los genes implicados en la biosíntesis de dopamina están altamente conservados a lo largo de la evolución (Flames & Hobert, 2011) e incluyen las enzimas codificadas por CAT-4/*Gch1* (del inglés GTP cyclohydrolase), CAT-2/*Th* (del inglés Tyrosine Hydroxylase) y BAS-1/*Ddc* (del inglés aromatic-L-amino-acid decarboxylase). En el transporte vesicular destaca CAT-1/*Vmat1/2* (del inglés Vesicular Monoamine Transporter) y, finalmente, DAT-1/*Dat* (del inglés Dopamine Transporter) para su recaptación (**Figura I10**).

La diferenciación terminal de las neuronas DA, es decir los FT que directamente activan la expresión coordinada de los genes de la vía de la dopamina, ha sido ampliamente estudiada en *C. elegans* y se ha visto que todas las neuronas que forman parte del sistema DA del nemátodo comparten un motivo regulador cuya activación es necesaria para la expresión de los genes de la vía de la dopamina (Flames & Hobert, 2009). Este mismo trabajo, fue el que describió a uno de los selectores terminales de todas las neuronas DA de este organismo -AST-1- un FT perteneciente a la familia con dominio ETS que se une a esta región reguladora y cuya eliminación afecta al fenotipo DA de las neuronas. Por añadidura, los mismos autores describieron que el mutante para el gen ortólogo a AST-1 en ratón -*Etv-1* (también denominado como *Er81*)- exhibe defectos específicamente en las neuronas DA del BO mientras que el resto

de poblaciones de esta región anatómica, así como la proliferación o la densidad, no se ve alterada (Flames & Hobert, 2009). Otros indicios de la conservación de esta función a lo largo de la evolución es el hecho de que *Er81* se une directamente a la región reguladora del gen *Th* (Cave et al., 2010) así como el rescate del fenotipo mutante de *AST-1* mediante la expresión de *Etv-1* en gusanos (Flames & Hobert, 2009). Posteriormente, se han identificado otros dos FT que cooperan junto a *AST-1* en la diferenciación terminal DA y cuyos mutantes presentan defectos en todas las neuronas DA de *C. elegans*; *CEH-43* (FT de la familia con homeodominio DLX) y *CEH-20* (FT de la familia PBX) (Doitsidou et al. 2013).



**Figura 110. Ruta de biosíntesis de la dopamina.** Representación esquemática de la conservación de la ruta de biosíntesis de la dopamina. En negro figuran los nombres de las proteínas de ratón, mientras que en rojo se muestran los ortólogos en *C. elegans*. TH/CAT-2, tirosina hidroxilasa; GCH1/CAT4, GTP ciclohidroxilasa 1; DDC/BAS-1, descarboxilasa aromática de aminoácidos L; VMAT/CAT-1, transportador de monoaminas vesicular; DAT/DAT-1, transportador de dopamina; Tyr, Tirocina; L-DOPA, L-dopamina; DA, dopamina. Modificada de Flames & Hobert 2011.

Sorprendentemente, el programa regulador de las neuronas DA en *C. elegans* parece estar conservado, al menos en parte, con el programa de especificación DA del BO, que coincide con que es la población DA evolutivamente más ancestral del cerebro, como se explica más adelante en este mismo capítulo.

De entre las distintas poblaciones DA del cerebro de mamíferos, la especificación terminal de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de ratón ha sido la más estudiada debido a su implicación en patologías muy extendidas como el Parkinson. Se han descrito algunos selectores terminales para estas neuronas, como *Nurr1*, *Pitx3*, o *Lmx1b* cuyos mutantes exhiben una gran disminución en el número de células TH positivas de este núcleo cerebral y regulan directamente la expresión de los genes de la vía de la dopamina entre otros (Hoekstra, Mesman, de Munnik, & Smidt, 2013; Jacobs et al., 2009). Además, se han descrito otros FT también implicados en la especificación de estas neuronas, como *Otx2*, *Pax2*, *Pax5* o *En1/En2*, de los que queda por determinar si se trata de FT que regulan directamente a los genes efectores de estas neuronas

o su papel está limitado a la especificación de los progenitores dopaminérgicos (Simon, Bhatt, Gherbassi, Sgado, & Alberí, 2003).

Respecto a la especificación de neuronas DA del bulbo, se han descrito una serie de FT implicados en algunos de los procesos de diferenciación de estas neuronas de entre los que destacan DLX1 y DLX2, PAX6, ETV1, COUPTF1 y MEIS2.

Los primeros FT relacionados con el fenotipo DA del BO fueron los FT homeodominio *Dlx*. Por una parte, *Dlx1* y *Dlx2* son considerados reguladores maestros del desarrollo de las neuronas GABAérgicas del cerebro anterior (Lindtner et al., 2019), entre las que se encuentran las neuronas DA del BO. Durante el desarrollo DLX1, -2 y -5 se expresan en los progenitores, en las células migradoras y en las neuronas maduras del BO (Eisenstat et al., 1999). Este patrón de expresión se mantiene también durante la etapa adulta (Allen, Waclaw, Colbert, & Campbell, 2007; Brill et al., 2008; Saino-Saito et al., 2004). Tanto *Dlx1* como *Dlx2* son requeridos para la adquisición del fenotipo GABAérgico, controlando la expresión de genes imprescindibles en este fenotipo como *Gad65*, *Gad67*, o *Vgat*. En la misma línea, se ha demostrado la unión directa de *Dlx2* a la región promotora de estos genes (Le et al., 2017; Pla et al., 2018). Los mutantes constitutivos *Dlx1/2*<sup>-/-</sup> carecen de gran parte de las interneuronas corticales (Anderson, Eisenstat, Shi, & Rubenstein, 1997), y, además, los niveles de GAD67, entre otros, se ven reducidos a la mitad en estos mutantes (Pla et al., 2018). Y, a la inversa, la sobreexpresión de este FT induce la producción ectópica de interneuronas del BO que expresan GAD67 (Guo et al., 2019).

Además de este papel general en progenitores de interneuronas GABAérgicas, los factores *Dlx* parecen actuar específicamente en diferenciación DA del BO. Concretamente, los mutantes de *Dlx2*, presentan un fenotipo con una pérdida dramática del número de células TH positivas (Qiu et al., 1995). La inyección de DLX2 en ratones adultos mediante retrovirus induce un incremento de la diferenciación de las nuevas células generadas hacia el fenotipo dopaminérgico, mientras que la eliminación de este FT genera el efecto contrario (Brill et al., 2008). Destacamos que, los mutantes para *Dlx1/2* exhiben deficiencias en otros núcleos de neuronas dopaminérgicas diencefálicas, de modo que este FT parece ejercer un papel en la diferenciación DA no sólo del BO sino también de otras poblaciones DA (Mayer et al., 2018).

Por su parte PAX6 es un FT de la familia de los homeodominio *paired box* cuya expresión se observa en los progenitores de las interneuronas del BO, en una subpoblación de neuroblastos migradores y en interneuronas de la PGL, principalmente las TH positivas (Haba et al., 2009; Stoykova & Gruss, 1994). Este FT es imprescindible en la neurogénesis y su eliminación genera un exceso de neurogénesis temprana (Hack et al., 2005; Sansom et al., 2009). Además, también parece tener un papel en la diferenciación de las neuronas DA, puesto que una pérdida parcial o total de PAX6 causa una reducción en el número de neuronas DA del BO (Brill et al., 2008; Haba et al., 2009; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007), así como la expresión ectópica de interneuronas en el neocortex (Guo et al., 2019). Otros estudios han demostrado que este FT es necesario en neuronas postmitóticas, dado que promueve la supervivencia de las interneuronas que ya han llegado al BO mediante la activación de la

cristalina  $\alpha$  (Ninkovic et al., 2010). Recientemente, los análisis de secuenciación de RNA confirman que los mutantes de *Pax6* exhiben una reducción drástica de la expresión de los genes característicos de neuronas maduras DA (*Th*) así como del resto de interneuronas (CB y CR) (Guo et al., 2019). Estos datos concuerdan con los observados en otro estudio, en el que se determinó que PAX6, junto con otros FT de transcripción relacionados con la dopamina (NURR1, PITX3, FOXA2 y MEIS2), se une a una región 11 kb aguas arriba del inicio del gen *Th* en nueve especies de mamíferos diferentes (Wang, Fones, & Cave, 2018). En consecuencia, y de manera análoga a DLX2, parece que PAX6 tiene tanto funciones más generales en especificación de progenitores neurales (tanto de BO como de la corteza) como más específicas en la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO.

ETV-1 (también conocido como ER81 y perteneciente a la familia de FT ETS) se encuentra expresado en todas las células TH positivas y algunas CB de la PGL del BO. Este factor también se co-expresa junto a *Dlx* de manera específica en los progenitores de la SEZ que dan lugar a interneuronas del BO (Stenman, Toresson, & Campbell, 2003). Parece que ETV1 tiene gran importancia en la diferenciación terminal, concretamente de las interneuronas DA, dado que los mutantes para este factor presentan una dramática reducción del número de neuronas DA del BO mientras que el resto de interneuronas no se ven alteradas (Cave et al., 2010; Flames & Hobert, 2009). Además, ETV-1 parece no sólo requerido sino ser suficiente, en algunos contextos celulares, en el proceso de diferenciación, dado que la expresión ectópica de este FT en cultivos primarios de BO incrementa el número de células que expresan TH (Flames & Hobert, 2009). Esto se debe a que se une directamente a la región *cis* reguladora del gen de *Th* (Flames & Hobert, 2009), concretamente a una región cercana al promotor (Cave et al., 2010). Por último, cabe destacar que la función de este FT parece estar evolutivamente conservada dado que el fenotipo de los mutantes para el homólogo (AST-1) en *C. elegans* puede ser rescatado mediante la expresión inducida de ETV-1, aunque su función se restringe a la población DA del BO de mamíferos (Flames & Hobert, 2009).

Otro de los FT relacionados con la diferenciación DA es COUPTF-1, también conocido como NR2F1, un FT perteneciente a la familia de receptores nucleares de hormonas. Su expresión se localiza en la PGL del BO, específicamente en las neuronas DA postnatales, en este sentido, se ha descrito que el 80% de las células TH positivas co-expresan este FT (Bonzano, Bovetti, Gendusa, Peretto, & De Marchis, 2016). Los análisis realizados muestran que, no sólo tiene importancia en la diferenciación de estas neuronas -puesto que la inactivación de COUPTF-1 reduce el número de células TH positivas del BO- sino también en el mantenimiento del fenotipo DA. La eliminación de este FT en neuronas DA maduras también provoca una disminución de células DA en el BO (Bovetti et al., 2013; Zhou et al., 2015). Así mismo, estudios de co-localización con animales transgénicos *Gad67-GFP* mostraron que todas las células COUP-TF1 son GFP positivas. Finalmente, la expresión de este FT se ve fuertemente afectada por la actividad y, a su vez controla la expresión de *Th* (Bovetti et al., 2013).

Por último, MEIS2 es una proteína perteneciente a la familia de homeodominio atípico TALE. Se expresa en neuroblastos de la SEZ y del RMS, así como en algunas interneuronas del BO. Parece que participa junto con PAX6 en la regulación de la expresión de *Th* y de *Dcx*, dado que el bloqueo de su expresión en los migradores de la RMS mediante retrovirus da lugar a una reducción de la población DA del BO (Agoston et al., 2014). Otro estudio más reciente muestra que este FT se une, junto con PBX1 y PAX6, a un sitio regulador a 7kb aguas arriba del gen *Th* de ratón (Wang et al., 2018).

Al igual que con otros tipos neuronales, el estudio de las neuronas DA no se ha limitado únicamente a los mamíferos. Se han realizado análisis del programa regulatorio de este tipo neuronal en peces cebra, que revelan grandes similitudes con algunos de los FT descritos en mamíferos como *Nurr1* (Luo, Chen, Li, Liu, & Le, 2008). Así mismo, en *Drosophila* también se identificaron dos FT necesarios para la correcta expresión la enzima de la ruta de biosíntesis de la dopamina; *Ddc*, *Cf1a* -perteneciente a la familia de los homeodominio POU- y *Islet* -perteneciente a la familia de los LIM homeodominio- (Johnson & Hirsh, 1990; Thor & Thomas, 1997). Más recientemente, estudios de secuenciación de todo el genoma de moscas parkinsonianas revelaron que la pérdida de *Nus1*, un receptor transmembrana, reduce el número de neuronas DA e induce la enfermedad, aunque se desconoce como modula este gen la transcripción de genes efectores de las neuronas DA (Guo et al., 2018).

Aunque como hemos explicado previamente, existen tres poblaciones diferenciadas de neuronas DA en los mamíferos, las que se localizan en el BO constituyen las más ancestrales evolutivamente hablando, y, por tanto, podrían considerarse como las más cercanas a las DA en *C. elegans*. Además, los trabajos previos indican expresión y funcionalidad de los homólogos de dos de estos FT, *Er81* y *Dlx2* en estas neuronas. Por esta razón, los estudios realizados en esta tesis se han centrado en esta población DA, siendo uno de los objetivos de este trabajo estudiar el papel de los factores *Pbx* como selectores terminales de las neuronas DA del BO de ratón, proyecto iniciado previamente en la tesis doctoral de la Dra. Laura Remesal (2017).

## 4. Factores de transcripción de la familia *Pbx*

Los PBX (del inglés *Pre-B cell leukaemia transcription factors*) son FT pertenecientes a la superclase de proteínas con homeodominio TALE (del inglés *Three- Aminoacid-Loop-Extension*). Todas las proteínas TALE tienen una característica en común, un homeodominio atípico de unión al DNA de 63 aminoácidos que se pliega en forma de hélice-bucle-hélice dando lugar a tres alfa hélices. Además, entre la primera y la segunda hélice presentan una inserción adicional de tres aminoácidos que las diferencia del clásico homeobox, característica por la que se les asignó su nombre y gracias a la cual se forma una unión flexible que da lugar a un bolsillo hidrofóbico (Bürglin y Affolter, 2016; Mukherjee y Bürglin, 2007). Esta superfamilia se divide en varias familias entre las que encontramos a los PBC. Esta última incluye cuatro proteínas PBX en vertebrados

(PBX1-4), Extradenticle (*Exd*) en *Drosophila melanogaster* y CEH-20, CEH-40 y CEH-60 en *C. elegans*.

Las proteínas PBX comparten una gran homología de secuencia en los dominios de unión al ADN (Monica, Galili, Nourse, Saltman, & Cleary, 1991) y suelen actuar en complejos multiméricos activando o reprimiendo la transcripción dependiendo de los FT a los que se encuentran asociados (Selleri, Zappavigna, & Ferretti, 2019). Por ejemplo, forman con frecuencia complejos con las proteínas HOX junto con los factores de la familia MEIS (Merabet & Mann, 2016). Los motivos de unión a ADN de estos FT están altamente conservados a lo largo de la evolución, aunque presentan variación en las propiedades de unión según los otros FT con los que se asocian. Una de las funciones bien caracterizadas de los FT PBX es la de oncogenes en diferentes tipos de cáncer, como el colorrectal o la leucemia (Aspland, Bendall, & Murre, 2001; Li et al., 2014).

*Pbx1* fue el primer gen TALE en ser estudiado. En ratón, este FT forma dímeros principalmente con PREP1 uniéndose preferencialmente a promotores (Penkov et al., 2013). También se han descrito otros cofactores para *Pbx*. Cuando heterodimeriza con MEIS, forma complejos multiméricos con proteínas HOX uniéndose a potenciadores, regiones intergénicas e intragénicas. Los análisis ontogénicos indican que los genes a los que se une PBX1/MEIS están relacionados directamente con aspectos del desarrollo como especificación, morfogénesis vascular y del sistema nervioso, mientras que a los que se une el dímero PBX1/PREP se asocian a funciones basales celulares como modificación de histonas, transporte de proteínas o transducción de señales (Merabet & Mann, 2016; Penkov et al., 2013). Las funciones de este FT son muy variadas desde la regulación de la adaptación vascular pulmonar durante el nacimiento (McCulley et al., 2018) hasta la regulación de la proliferación en el cáncer de ovario (Jung et al., 2016). De manera que su delección provoca letalidad en E15.5 con una hipoplasia o aplasia en múltiples órganos así como defectos generalizados en el esqueleto axial y apendicular (Selleri et al., 2001).

En relación al sistema nervioso, durante el desarrollo PBX1 se expresa en el prosencéfalo (Toresson, Parmar, y Campbell, 2000) promoviendo la diferenciación del córtex frontal mediante la inhibición de genes que promueven la diferenciación dorso-caudal. La eliminación específica de PBX1 en el linaje *Nex1* y *Emx1* provoca la hipoplasia del córtex frontal así como la inversión de sus capas (Golonzhka et al., 2015). En el mesencéfalo, *Pbx1* forma parte de la red transcripcional responsable del fenotipo DA y los mutantes nulos para este FT, aunque son letales embrionarios, muestran defectos axonales en las proyecciones del mesencéfalo al estriado (Sgadò, Ferretti, Grbec, Bozzi, & Simon, 2012; Villaescusa et al., 2016). De hecho, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina combinados con secuenciación de RNA revelan que en las neuronas DA del mesencéfalo, PBX1 reprime la expresión de *Onecut2* -evitando otros destinos celulares, y activa *Nfe211* promoviendo la supervivencia-(Villaescusa et al., 2016). La sobreexpresión de PBX1 mediante lentivirus en células madre humanas demuestra que este FT es suficiente para promover la diferenciación a neurona DA del mesencéfalo. Así mismo, estudios

recientes han establecido que PBX1 controla la neurogénesis temprana y la migración a través de la regulación directa de la doblecortina (*Dcx*) (Grebbin et al., 2016). En cultivos de progenitores neurales indiferenciados PBX1 se une al potenciador promotor/proximal de *Dcx* cuando el ADN aún esta compactado por histonas y previamente a que sea marcado para modificar su estado. Es decir, mucho antes de que el gen vaya a expresarse. Una vez iniciada la diferenciación, MEIS se une al PBX1 ya unido a la cromatina activando la maquinaria necesaria para la transcripción, y, por tanto, facilitando el acceso a la cromatina (Hau et al., 2017). En conclusión, parece ser que las proteínas PBX1 preparan los genes para la activación en gran variedad de sistemas pudiendo unirse a sus dianas cuando la cromatina está aún compactada. Dado que esta función se atribuye a los factores pioneros, algunos autores ya le han asignado este papel a PBX1, aunque otros piden cautela sobre este aspecto (Selleri et al., 2019).

Aunque PBX1 es de entre todos los miembros de la familia PBX el más estudiado, también se ha caracterizado las funciones de otros PBX. Durante el desarrollo, PBX2 se expresa principalmente en las células neurales y epiteliales. Sin embargo, los mutantes para este FT no exhiben problemas en la organogénesis ni en la viabilidad de los embriones, hecho que se atribuyó a una redundancia funcional entre los miembros de la familia PBX (Selleri et al., 2004). Sorprendentemente, los dobles mutantes (*Pbx1* y *2*) mueren antes que los mutantes para PBX1 y presentan una mayor alteración del fenotipo, por lo que se piensa que PBX2 es capaz de compensar la función de PBX1 únicamente en ciertos contextos (Capellini et al., 2008).

Los mutantes para PBX3 son viables, aunque mueren horas después del nacimiento debido a la actividad anormal de las neuronas inspiratorias de la médula (Rhee et al., 2004). Durante el desarrollo, este FT se expresa en niveles altos en parte del tálamo, cerebelo, medula, ganglios dorsales y neuronas ventrales y dorsales de la médula espinal. Aunque también se expresa en niveles más bajos en otros sistemas diferentes al nervioso, como en miocitos del musculo liso del intestino, condrocitos o células linfoides (Milech, Kees, & Watt, 2001; Rhee et al., 2004).

Por último, se ha descrito la expresión de PBX4 en los espermatoцитos de los testículos (Wagner, Mincheva, Korn, Lichter, & Pöpperl, 2001) y su mutación en pez cebra provoca alteraciones en la diferenciación antero-posterior del rombencéfalo y el tronco anterior (Pöpperl et al., 2000).

En definitiva, como hemos visto los FT PBX desarrollan funciones cruciales y muy variadas en los organismos, entre ellas procesos de diferenciación celular y, todos ellos, excepto PBX4, se expresan en el cerebro.

## 5. Estado de la cuestión

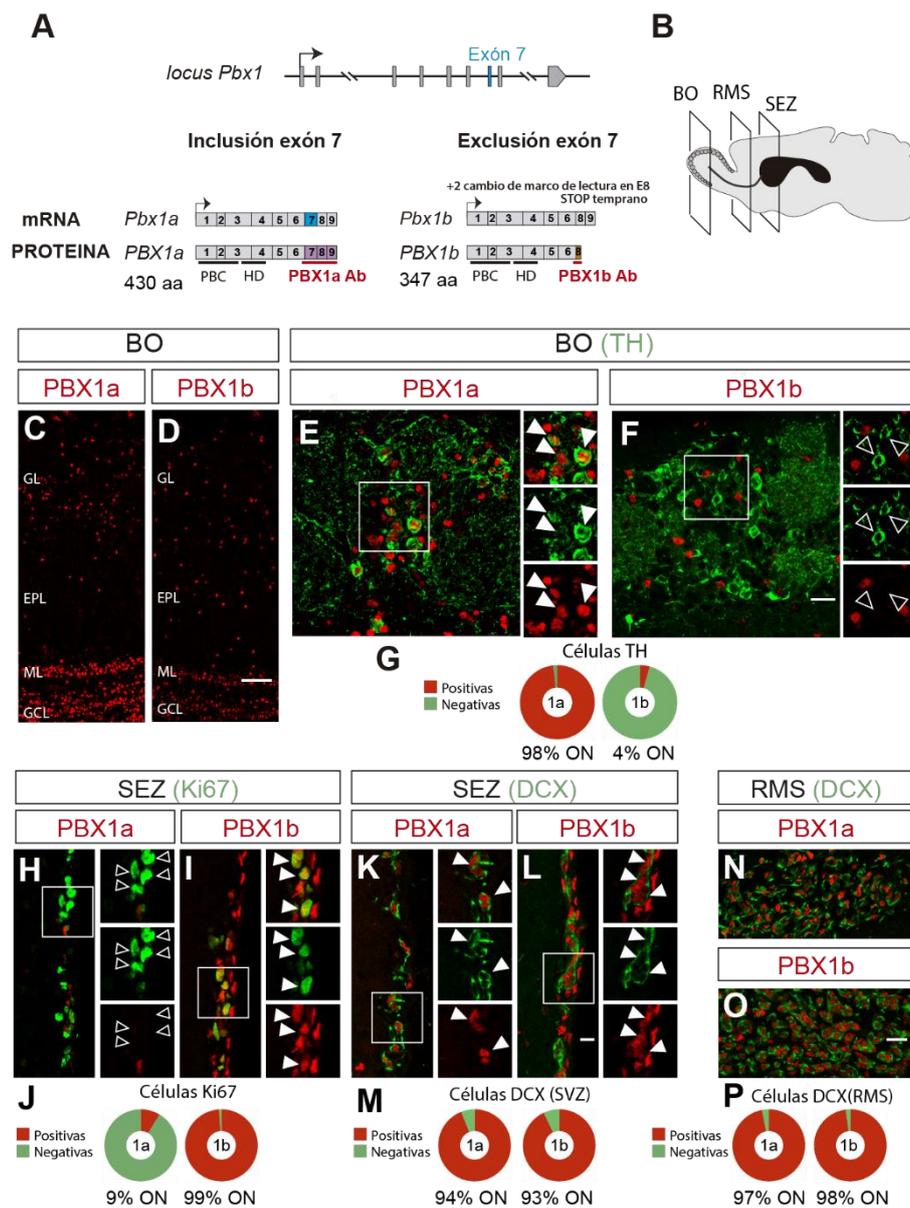
Tal y como se ha comentado previamente, los estudios realizados en las neuronas dopaminérgicas de *C. elegans*, establecieron que CEH-20 (un FT de la familia de los PBX) actúa

en conjunto con otros dos FT, AST-1 (de la familia ETS, homólogo de ETV1) y CEH-43 (de la familia Homeodominio, homólogo de DLX2), como selector terminal de este tipo neuronal. Tal y como se ha afirmado anteriormente, ETV1 y DLX2 son necesarios para la correcta diferenciación de las neuronas DA del BO de ratón y, (al menos para ETV1) se ha demostrado que su papel es directo sobre la activación del gen de *Th* (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010; Flames & Hobert, 2009; Qiu et al., 1995). Es por ello que parte de la presente tesis se ha centrado en finalizar el trabajo iniciado por la doctora Remesal durante su tesis doctoral, cuyo objetivo era dilucidar si alguno de los homólogos de ratón de la familia de los FT PBX actúa también como selector terminal de las neuronas DA del BO.

Previamente a la citada tesis, durante la etapa predoctoral de la Dra. Laura Remesal, se estudió la expresión de los miembros de la familia PBX en animales C57BL6. 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. PBX1, 2 y 3 pero no PBX4 se expresan en el cerebro. La Dra. Remesal analizó la expresión de estos componentes de la familia de PBX en la SEZ, en la RMS y en el BO de animales adultos y neonatos (P0).

Sus análisis mostraron que PBX3 se expresa en el BO adulto, pero no en neuronas TH positivas. PBX1 tiene dos isoformas (PBX1a y PBX1b), que se diferencian en la región carboxi-terminal pero no en el dominio de unión al ADN. Concretamente, la forma *Pbx1a* incluye todos los exones codificantes, mientras que la isoforma b pierde el exón 7, de manera que es una proteína más corta con un Ct distinto, lo que ha permitido el diseño de anticuerpos específicos para cada isoforma (**Figura I11A**). Prácticamente todos los precursores situados en la zona subependimaria, positivos para el marcador Ki67, expresan PBX1b, pero no PBX1a ni PBX2 (**Figura I11 H-J**). Por otro lado, las células que emprenden la migración hacia el bulbo olfatorio a través de la RMS (positivas para el marcador DCX) co-expresan ambas isoformas de PBX1 y no expresan PBX2 (**Figura I11 K-P**). Finalmente, las neuronas dopaminérgicas diferenciadas del BO y en consecuencia positivas para la enzima TH expresan tanto PBX1a como PBX2, pero no PBX1b (**Figura I11 C-F**). En conclusión, los estudios de expresión de la Dra. Remesal revelaron una expresión diferencial de las dos isoformas de PBX1 a lo largo de la diferenciación de las neuronas DA del BO observándose una regulación temporal de inclusión del exón 7 a lo largo de la diferenciación de este tipo neuronal. Además, se determinó que PBX2 se expresa en neuronas DA maduras, pero no en neuroblastos en migración. Por consiguiente, tanto *Pbx1* como *Pbx2* son genes candidatos a tener un papel en la especificación de las neuronas DA del BO. La Dra. Remesal realizó además un análisis preliminar de mutantes *Pbx1* y *Pbx2*.

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo central de la presente tesis ha sido profundizar en dichos análisis funcionales para caracterizar el papel de los factores PBX en la diferenciación terminal del fenotipo DA del BO.



**Figura 11. Patrón de omisión del exón 7 de *Pbx1* a lo largo del proceso de neurogénesis, migración y diferenciación de las neuronas DA del BO.** **A)** Representación esquemática del locus de *Pbx1* y de las isoformas que se generan mediante *splicing* alternativo del exón 7 (en azul). Las barras negras indican la localización de los dominios de unión al ADN y las barras rojas representan el dominio reconocido por los anticuerpos específicos de cada isoforma. Las cajas moradas y naranja de la región codificadora de la proteína representan diferencias de aminoácidos entre las dos isoformas. Ab; anticuerpo. HD; homeodominio de unión al ADN. PBC; dominio de unión a ADN. **B)** Representación de los niveles coronales analizados en las micrografías. BO; bulbo olfatorio. RMS; Ruta migratoria rostral. SEZ; zona subependimaria. **C, D)** Análisis de la expresión de PBX1a y PBX1b en el BO de adulto mediante anticuerpos específicos para cada isoforma. Escala: 75  $\mu$ m. EPL; capa plexiforme externa. GCL; capa granular. GL; capa glomerular. ML; capa mitral. **E, F)** Doble inmunohistoquímica de TH, PBX1a y PBX1b. Escala: 25  $\mu$ m. **G)** Cuantificación de la expresión de PBX1a y PBX1b en células DA del BO. **H, I)** Análisis de la expresión de PBX1a y PBX1b en la SEZ de progenitores marcados con el anticuerpo de Ki67. **J)** Cuantificación de la expresión de PBX1a y PBX1b en las células proliferativas de la SEZ. **K, L)** Análisis de la expresión de PBX1a y PBX1b en neuroblastos migradores de la SEZ marcados con DCX. Escala: 10  $\mu$ m. **M)** Cuantificación de la doble inmunohistoquímica de DCX con PBX1a y PBX1b en los neuroblastos migradores de la RMS marcados con DCX. Escala: 20  $\mu$ m. **N, O)** Análisis de la expresión de PBX1a y PBX1b en neuroblastos migradores de la RMS marcados con DCX. **P)** Cuantificación de la doble inmunohistoquímica de DCX con PBX1a y PBX1b en la RMS. Figura de Remesal et al., 2020 (Anexo).





# **OBJETIVOS**



El objetivo global de esta tesis es el de estudiar el papel de Pbx1 como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio de ratón.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** Caracterizar el modelo transgénico de pérdida de función de *Pbx1*. *Pbx1<sup>flx/flx</sup>; Th:CRE*.
- **Objetivo 2:** Estudiar si la expresión de FT relacionados con la diferenciación DA está regulada por PBX1.
- **Objetivo 3:** Analizar la expresión de los genes efectores de las neuronas DA en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*.
- **Objetivo 4:** Analizar la morfología de las neuronas DA en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*.
- **Objetivo 5:** Determinar si la pérdida de *Pbx1* repercute en la función olfativa.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 1. Modelos animales

## 1.1 Cepas murinas

Para la realización de esta tesis se han utilizado ratones neonatos (P0) y adultos, con edades comprendidas entre 1 y 5 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. Todos los experimentos se han llevado a cabo siguiendo protocolos aprobados por el Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en concordancia con las regulaciones españolas y europeas.

**Cepa *Pbx1*<sup>flx/flx</sup>:** Los mutantes nulos convencionales para PBX1 mueren el día embrionario 15 (E15) por hipoplasia o aplasia severa de múltiples órganos y defectos generalizados en el patrón del esqueleto axial y apendicular (Selleri et al., 2001). Por esta razón, para estudiar el papel de PBX1 en estadio adulto se utilizaron mutantes condicionales. Estos ratones fueron cedidos por la Dra. Licia Selleri (*Biomedical Sciences Graduate Program* in University of California, San Francisco, USA). Se trata de 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). En virtud de lo cual, únicamente en presencia de CRE recombinasa, se escindirá el exón 3 de *Pbx1* generando la pérdida de expresión de PBX1 (**Figura M1A**). No se han descrito defectos de expresión de *Pbx1* asociados a la inserción de las secuencias *LoxP* *per se* (Koss et al., 2012). A su vez, esta cepa de ratón fue cruzada con otras cepas dando lugar a las cepas que describiremos a continuación.

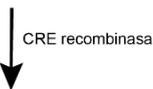
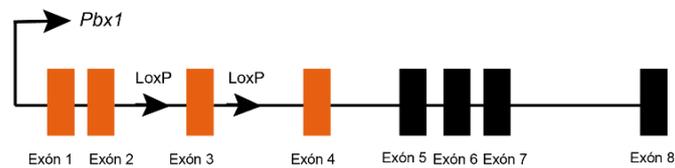
**Cepa TH-ires-CRE (Abreviada como *Th*<sup>CRE</sup>):** Los ratones fueron comprados a *European Mutant Mice Association* (EMMA Strain name B6.129X1-Th<sup>tm1(cre)Te</sup>/Kieg; Strain ID EM:00254). Se trata de un *knock-in* que expresa la CRE recombinasa bajo el gen endógeno *tirosina hidroxilasa*. Concretamente, la recombinasa se encuentra tras la secuencia codificante del gen *Th* y se traduce por la presencia de una secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES), asegurando de esta manera que la expresión de *Th* no se vea alterada (**Figura M1B**). Los niveles de expresión de *Th* no se ven alterados en estos ratones y el fondo genético de dicha cepa es C57BL/6J.

**Cepa RCE (Rosa26-CMV-Enhanced GFP):** Los ratones fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Oscar Marín (*King's College of London*, UK), previamente comprados en *The Jackson Laboratory* (Gt (ROSA)26Sortm1.1 (CAG-EGFP) Fsh/Mmjax; Strain ID 32037 JAX; RCE:LoxP). Estos ratones tienen insertado el gen que codifica para la proteína verde de fluoresceína aumentada (eGFP) regulado bajo el promotor ubicuo pCAG (enhancer del cytomegalovirus (CMV) y fusionado con el promotor de beta-actina de pollo) en el locus del gen Rosa26. La secuencia eGFP está precedida por una secuencia STOP flanqueada por sitios *LoxP*, de manera que en condiciones normales el gen eGFP no se expresa (**Figura M1C**). En presencia de la CRE recombinasa, la secuencia STOP es escindida dando lugar a una expresión estable de la eGFP

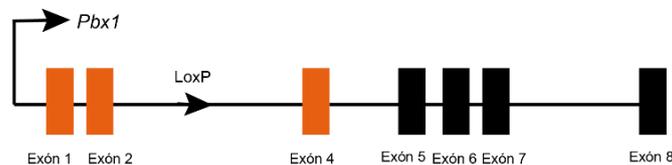
que, a partir de ese momento, es independiente de la presencia de CRE. De modo que, en estos ratones, la expresión de la eGFP depende del patrón expresión del promotor que genera la CRE recombinasa.

**A) Cepa *Pbx1*<sup>flx/flx</sup>**

Alelo condicional de *Pbx1*



Alelo nulo de *Pbx1* específico de tejido



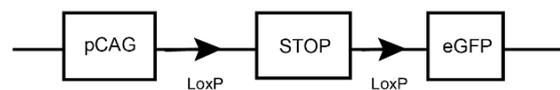
**B) Cepa *Th*<sup>CRE</sup>**

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



**C) Cepa RCE**

Locus ROSA 26



**Figura M1. Esquema de la construcción de las cepas *Pbx1*<sup>flx/flx</sup>, *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 8 exones (rectángulos) 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 naranjas representan los exones que codifican para el dominio PBC de unión al DNA. Adaptado de Koss et al., 2012. **B)** Representación esquemática del locus de *Th* tras la inserción del cassette CRE recombinasa. **C)** Representación esquemática del locus ROSA 26 tras la inserción del cassette que codifica para la proteína verde de fluorescencia aumentada (eGFP) precedida de un codón stop flanqueado por secuencias *LoxP*.

**Cepa *Pbx2*<sup>-/-</sup>:** Los ratones fueron cedidos por la Dra. Licia Selleri (*Biomedical Sciences Graduate Program in University of California, San Francisco, USA*). Presentan una delección del exón 3 de *Pbx2* y por tanto son mutantes nulos convencionales para PBX2 (Selleri et al., 2004). Los animales deficientes en PBX2 no tienen problemas de viabilidad, por ello, pueden analizarse en estadio adulto (**Figura M1D**).

**Cepas *Th-ires-CRE; Pbx1<sup>flx/flx</sup>* (abreviada como *Pbx1<sup>Th</sup>*), cepa *Th-ires-CRE; Pbx1<sup>flx/flx</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>* (abreviada como *Pbx1/2<sup>-/-</sup>*) y cepa *Th-ires-CRE; RCE; Pbx1<sup>flx/flx</sup>* (abreviada como *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*):** Los ratones fueron generados en el propio Instituto de Biomedicina de Valencia entrecruzando varias generaciones de las cepas anteriores.

## 1.2 Genotipado de animales

El genotipado se realizó a partir de DNA genómico extraído de un fragmento de dedo de ratón. El tejido se digirió en tampón de lisis [proteínasa K (Fermentas) a 200 µg/ml en el tampón Tris-HCl pH8 a 100 mM (Sigma), EDTA a 5 mM (Sigma), SDS a 2% y 200 mM NaCl (Sigma)] durante toda la noche a 55°C en agitación. A continuación, se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos. Posteriormente se añadieron 450 µl de isopropanol (Panreac) y se invirtieron los tubos varias veces hasta conseguir visualizar el ADN. Seguidamente, se centrifugaron a 18400 xg durante 2 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 180 µl de etanol al 70% (Panreac) y se volvieron a centrifugar a 18400 xg durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejaron secar durante 20 minutos a 37°C. Por último, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua de PCR (Sigma) dejándose en agitación 2 horas a 42°C.

Para las reacciones de PCR se empleó la enzima Go Tag G2 DNA polimerasa (Promega), y las condiciones y cebadores utilizados para cada cepa de animales se especifican en los apartados siguientes. Los productos de amplificación de las distintas PCRs se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% para la cepa *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* y al 1% para el resto de las cepas preparado en tampón TAE 1X (EDTA 1 mM, ácido acético glacial 20 mM y Trizma base 40 mM pH7.6). Para teñir el ácido nucleico se utilizó Gel red® (Biogen) a 3 µl/100 ml y como tampón de carga se empleó el que incluye el kit 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.

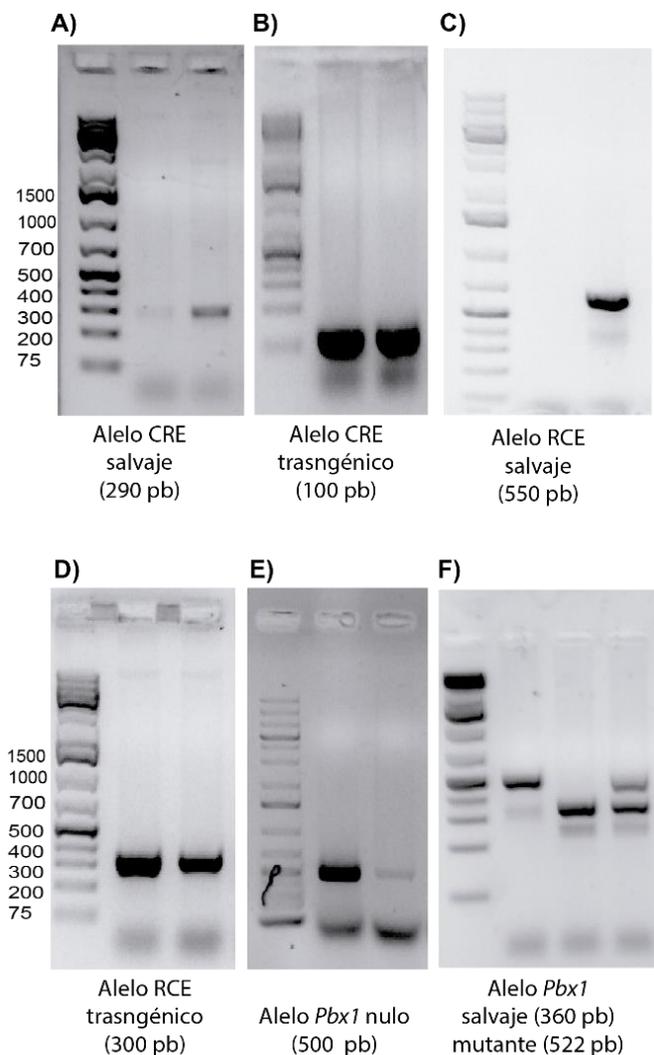
### Genotipado de la cepa *Pbx1<sup>flx/flx</sup>*

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* fueron las que siguen: una etapa de desnaturalización a 98°C durante 30 segundos una etapa de anillamiento a 98°C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 62°C durante 1 minuto y 30 segundos. Después de una reacción de 32 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje

es de 360 pb y el del alelo mutante era de 522 pb (**Figura M2**). Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**. La identificación del evento de recombinación del alelo se identificó mediante una PCR con las condiciones siguientes: una etapa de desnaturalización a 98°C durante 30 segundos una etapa de anillamiento a 98°C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 55.3°C durante 1 minuto. Tras una reacción de 32 ciclos, el producto de amplificación es de 500pb (**Figura M2**), apareciendo en los que ha ocurrido una recombinación, pero no en los animales con los sitios *LoxP* no escindidos. Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**.

### Genotipado de la cepa Th-ires-CRE

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo Th-ires-CRE fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94°C durante 45 segundos y una etapa de extensión a 53.8°C durante 45 segundos. Después de una reacción de 30 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 100 pb y el del alelo transgénico es de 430 pb (**Figura M2**). Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**.



**Figura M2. Geles de electroforesis de los genotipados de las cepas.** **A)** Gel de agarosa que muestra el genotipado de un animal que contiene el alelo CRE salvaje apareciendo una banda de 290 pb. **B)** Gel de agarosa que muestra el genotipado de un animal que contiene el alelo CRE transgénico apareciendo una banda de 100 pb. **C)** Gel de agarosa que muestra el genotipado de un animal que contiene el alelo RCE salvaje apareciendo una banda de 550 pb. **D)** Gel de agarosa que muestra el genotipado de un animal que contiene el alelo RCE transgénico apareciendo una banda de 300 pb. **E)** Gel de agarosa que muestra el genotipado de un animal que contiene el alelo *Pbx1* nulo apareciendo una banda de 500 pb. **F)** Gel de agarosa que muestra el genotipado en el que el primer animal tiene el alelo *Pbx1* mutante, el segundo es homocigoto para el alelo salvaje, mientras que el último es un heterocigoto que tiene las dos bandas.

## Genotipado de la cepa RCE

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo salvaje de Rosa26 fueron las que siguen: una etapa de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94°C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 56°C durante 1 minuto. Después de una reacción de 40 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 550 pb (**Figura M2**). Para el genotipado del alelo transgénico RCE las condiciones fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, una etapa de anillamiento a 94°C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 64.5°C durante 1 minuto. Después de una reacción de 30 ciclos, el producto de amplificación del transgén es de 300 pb (**Figura M2**). Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**

Tabla M1. Listado de cebadores utilizados para el genotipado de ratones.

Genotipado		Nombre y secuencia del cebador
<b><i>Pbx1</i> (detección de inserto <i>Flox</i>)</b>		oNF952: 5' - ATC AGT GCC ATT TCT CCA GCC - 3'
		oNF953: 5'- TGG GTA TCC ATT CCA AAG GTG G - 3'
<b>Detección recombinación <i>Pbx1</i></b>		oNF953: 5'- TGG GTA TCC ATT CCA AAG GTG G - 3'
		P5: 5'-GAG TTT GTC AGA GGA TTT TGT AGA TCT CAG-3'
<b>Detección del alelo Th-IRES-CRE</b>	wt	TH-5': 5' CAC CCT GAC CCA AGC ACT 3'
		TH-3': 5' CTT TCC TTC CTT TAT TGA GAT 3'
	mut	oNF981: GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC
		oNF982: GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT
<b>Detección alelo RCE</b>	wt	oLR14: 5' AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT 3'
		oLR15: 5' GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG 3'
	mut	1488: 5'- CCC AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT C
		1490: 5'- CCAGGCGGGCCATTTACCGTAAG
<b>Detección alelo salvaje <i>Pbx2</i><sup>+</sup></b>		oLR6:5' - TCT GTT TGC CTG CCT GCT AG - 3'
		oLR7:5' - GCT TGC TGC GAT AGT CTG AGT G-3'
<b>Detección alelo mutante <i>Pbx2</i><sup>-</sup></b>		<i>Pbx2</i> sense: 5' - TCC TTA AGT CTG TTT GCC TCG CTG - 3'
		<i>Pbx1</i> Neo: 5' - CTA TCA GGA CAT AGC GTT GG - 3'

## Genotipado de la cepa *Pbx2*<sup>-</sup>.

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx2*<sup>+</sup> fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 98°C durante 30 segundos, una etapa de anillamiento a 98°C durante 10 segundos y una etapa de extensión a 58.5°C durante 30 segundos. Después de una reacción de 30 ciclos, el producto de amplificación del alelo salvaje es de 218 pb, el alelo mutante *Pbx2*<sup>-</sup> no genera banda en estas condiciones. Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**.

Las condiciones de amplificación de la PCR para el genotipado del alelo *Pbx2*<sup>-</sup> fueron las que siguen: una etapa de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, una etapa de anillamiento a 95°C durante 30 segundos y una etapa de extensión a 61.5°C durante 45 segundos. Después de una reacción de 35 ciclos, el producto de amplificación del alelo mutante era de 800 pb, el alelo salvaje no produce banda en estas condiciones. Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla M1**.

## 2. Técnicas *in vivo*

### 2.1 Inyección de análogos de la timina.

En estos experimentos se utilizó un análogo estructural del nucleótido timidina: 5-bromo-2 desoxiuridina (BrdU). Esta molécula, se incorporan al DNA de las células que se encuentran en fase S del ciclo de división en el momento de la inyección y, una vez las células han incorporado el nucleótido, puede detectarse inmunohistoquímicamente con anticuerpos específicos. En los experimentos realizados, se administró BrdU (Sigma) en un régimen de 7 inyecciones intraperitoneales repartidas cada dos horas en un periodo de 12 horas (Nowakowski et al., 1989), a una dosis de 50 mg/kg de animal. Todas las inyecciones se realizaron en animales de 2 meses de edad que fueron sacrificados en los días indicados tras las inyecciones, mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4%.

### 2.2 Electroporación postnatal *in vivo*

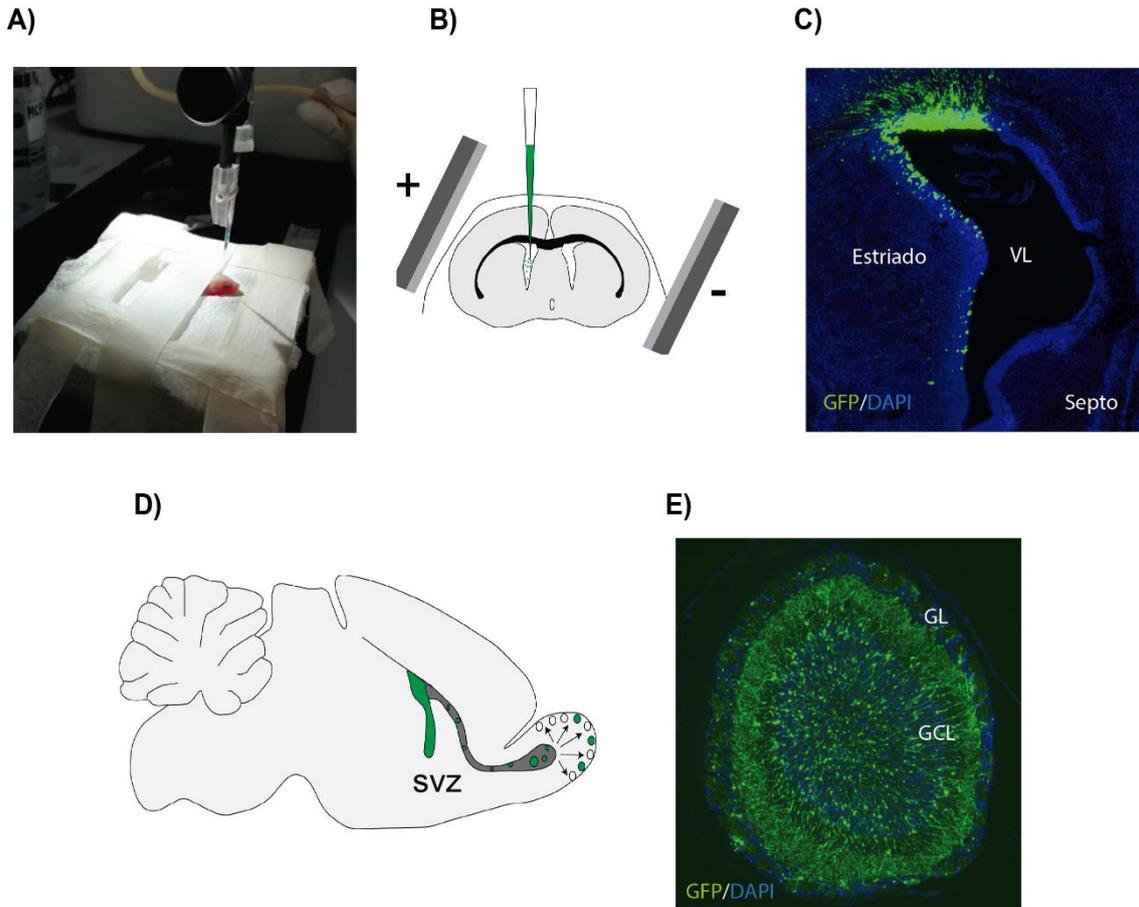
Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen Cucarella de la unidad de patología metabólica experimental del Instituto de Biomedicina de Valencia. Con el objetivo de electroporar los plásmidos deseados, se anestesiaron ratones neonatos mediante hipotermia (3 minutos en hielo) y se fijaron con cinta adhesiva sobre un soporte. Las inyecciones se realizaron en la luz del ventrículo lateral izquierdo (**Figura M3**). Se inyectó 1  $\mu$ l de solución compuesta por los plásmidos de interés 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. Tras la inyección, el neonato fue colocado bajo una fuente de luz para comprobar que el colorante verde había sido inoculado correctamente en el ventrículo lateral del cerebro: si la inyección es correcta, el líquido inunda todo el ventrículo y produce una forma de banana fácil de reconocer (**Figura M3**), mientras que si la inyección no es correcta se produce una mancha borrosa redonda, por lo que el animal se descarta del experimento.

A continuación, con el objetivo de introducir el DNA plasmídico en las células de la pared del ventrículo de los neonatos, se colocaron 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 modelo ECM830). Finalmente, los neonatos fueron reanimados unos minutos sobre una placa calefactora a 37°C y fueron devueltos con su madre. Las construcciones que se utilizaron para los experimentos de electroporación se detallan a continuación:

- **pNF365: p-TH-CRE** (generado en el propio laboratorio pNF365) Expresa la CRE recombinasa bajo la secuencia reguladora del gen *Th* (5kb aguas arriba del inicio de la transcripción).
- **pNF320: pCAG-LoxP-stop-LoxP-YFP** (Addgene). Expresa YFP en presencia de la CRE recombinasa.

## Material y métodos

Se co-electroporaron el pNF320 junto con el pNF365, ambos a 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en animales *Pbx1<sup>+/-</sup>* y *Pbx1<sup>flx/flx</sup>*.



**Figura M3: Electroporación postnatal del ventrículo lateral *in vivo*.** **A)** Fotografía en la que se muestra el momento de la inyección del neonato **B)** Representación esquemática de la inyección del plásmido y la posición de los electrodos para apuntar a la pared más dorsal del ventrículo lateral. **C)** Imagen representativa de la inmunofluorescencia contra GFP 24 horas post electroporación. **D)** Representación sagital del cerebro que muestra las células electroporadas en el ventrículo lateral, su migración a través de la RMS hasta su diferenciación en el BO. **E)** Imagen representativa de la inmunofluorescencia contra GFP 31 días después de la electroporación.

### 3. Técnicas histológicas

#### 3.1 Obtención y fijación del tejido

Para todos los estudios de histología se utilizaron animales de 2-3 meses o neonatos. Los animales se perfundieron con paraformaldehído (PFA) al 4% (Panreac) en tampón fosfato sódico (PBS) 0.1M pH7,4. Para ello, previamente se los anestesió con Doletal (1/10) a una dosis de 5,5 µl/g vía intraperitoneal.

En la perfusión intracardiaca, se llevó a cabo una toracotomía tras la que se cateterizó el ventrículo izquierdo del corazón y se realizó un corte en la aurícula derecha, permitiendo así la salida de la sangre, sustituida por 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 50 ml de PBS 0,1M pH7,4 para desplazar la sangre de los vasos sanguíneos y, posteriormente se administró 50ml de PFA al 4%.

En el caso de la obtención de los bulbos olfatorios de neonatos (P0) se empleó la misma técnica que se ha descrito, a excepción de que los animales fueron anestesiados en hielo (3 minutos) previamente a la perfusión, y que la cateterización del ventrículo se realizó con jeringas de 2 ml (BD *Plastipak*) y agujas de 30G (BD *Microlance*), administrándose 2 ml PBS 0,1M pH7,4 y de solución fijadora.

#### 3.2 Postfijación del tejido

Después de la perfusión, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en PFA al 4% durante 2 horas o toda la noche a 4°C en agitación (en el caso del tejido utilizado para realizar la hibridación *in situ*). Tras este tiempo, los cerebros se sometieron a tres lavados con PBS 0,1 M pH7,4 a 4°C en agitación y se prepararon para ser procesados en el criostato. En el caso de las electroporaciones, se descartó el hemisferio derecho que no está electroporado.

#### 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 crioprotectados. Se sumergieron en una solución de sacarosa, primero al 15% y después del 30%, en PBS 0,1M pH7 a 4°C hasta que el tejido se hundió para reemplazar el agua del tejido por la sacarosa de modo que evitase la formación de cristales. Una vez crioprotectados, los bulbos y el resto del cerebro se embebieron en solución de congelación (O.C.T, Tissue-Tek Embedding Medium for frozen tissue specimens) y se situaron y orientaron en un molde específico de congelación (Electron Microscopy Sciences). Finalmente, el tejido fue congelado sumergiendo el molde en nitrógeno líquido (-196°C) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Por último, se realizaron secciones coronales (criostato Leica CM1900) de 10 µm de grosor. Estas se recogieron en portaobjetos (Super Frost, Fisher) en series paralelas (10 portas/serie) con el fin de obtener una representación rostro-

## Material y métodos

caudal del bulbo olfatorio, de la RMS y de la SEZ. Posteriormente, las secciones se guardaron a -20°C hasta su uso (a -80°C en el caso del tejido utilizado para realizar la hibridación *in situ*).

Por otro lado, para realizar el estudio de la morfología de las neuronas, el tejido se procesó mediante un microtomo de deslizamiento (Leica SM3010R) para obtener secciones flotantes de 50 µm. Estas secciones fueron almacenadas en 5 series paralelas que contenían una representación rostro-caudal del cerebro a -20°C, en una solución de etilenglicol (Sigma) 30% y glicerol (Panreac) 30% en PBS.

### 3.4 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 y del experimento. Los cortes destinados a la detección de la BrdU, se sometieron a un tratamiento previo con HCl, para desnaturalizar el ADN y facilitar el reconocimiento por el anticuerpo. El tratamiento consistió en la incubación de los portas con HCl 2N en agua miliQ a 37°C 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 0,1 M pH7,4. Para la detección de PBX2, Ki67 y GAD67 también se llevó a cabo un tratamiento previo en el que las secciones se sumergieron en una solución de citrato sódico a 10 mM 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 PBS 0,1 M pH7,4.

En el resto de estudios de inmunohistoquímica sin tratamientos previo se empezó el proceso en este paso, bloqueando las uniones inespecíficas del anticuerpo con 500 µL de solución bloqueo (0,2% Tritón X-100 (Sigma), 1% albumina de suero bovino (BSA) en PBS 0,1 M) durante 1 hora. Después del bloqueo, el tejido fue incubado con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo a la concentración de uso correspondiente (**Tabla M2**) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron con PBS 0,1 M pH7,4 tres veces durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo diluidos en tampón de bloqueo a su concentración de uso (**Tabla M3**). Para la detección de PBX2 se recurrió al método de revelado en triple capa para amplificar la señal, de modo que, tras los lavados del anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (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) (0.4 mg/ mL, Sigma) 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°, 96° y 100°) (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.

En el caso del estudio de la morfología, previamente a la inmunohistoquímica de los cortes flotantes, se hicieron varios lavados de PBS 0,1 M para eliminar la solución de etilenglicol en el que estaban conservados a -20°C. La inmunohistoquímica, se llevó a cabo incubando los cortes flotantes de 50 µm durante 1 hora con solución bloqueo (0,3 % Tritón X-100 (Sigma), 1% albumina de suero bovino (BSA) en PBS 0,1 M. Esta solución fue sustituida por 200 µL de solución bloqueo que contenía los anticuerpos primarios a la concentración mostrada en la **Tabla M2** incubándose a 4°C durante 2 noches aproximadamente. Tras la incubación del primario se realizaron múltiples lavados con PBS 0,1 M en movimiento suave y se incorporaron de nuevo 200 µL de solución bloqueo con los anticuerpos secundarios, conjugados con diferentes fluoróforos, a la concentración mostrada en la **Tabla M3** durante 3 horas. Seguidamente, se volvieron a lavar los cortes con PBS 0,1 M un par de veces dando paso a la tinción de los núcleos con (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI, 0.4 mg/ mL, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Por último, los cortes flotantes se montaron en portaobjetos aplicando una solución de gelatina (0,02 g/mL de gelatina en agua destilada con Tris-HCl 1 M pH 7,5).

**Tabla M2. Anticuerpos primarios utilizados y sus características.** Rb: anticuerpo policlonal obtenido en conejo; Ms: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón; Gt: anticuerpo policlonal obtenido en cabra, Chk: anticuerpo policlonal obtenido en pollo, Shp: anticuerpo policlonal obtenido en oveja.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia
<b>BrdU</b>	rata	1:400	Abcam (ab6326)
<b>CB</b>	Rb	1:2000	Swant (CB38)
<b>Coup-TF1</b>	Ms	1:500	Persus proteomics (H8132)
<b>CR</b>	Rb	1:2000	Millipore (MAB1568)
<b>CR</b>	Ms	1:3000	Millipore (AB50504)
<b>DCX</b>	Gt	1:100	Santa Cruz (sc-8066)
<b>PanDlx</b>	Rb	1:500	Cedido por Sean Carroll (Wisconsin)
<b>Er81</b>	Rb	1:1000	Cedido por T. Jessel (Columbia)
<b>Gad67</b>	Ms	1:500	Millipore (MAB5406)
<b>GFP</b>	Chk	1:1000	Ave slab (GFP-1020)
<b>Ki67</b>	Rb	1:150	Abcam (ab15580)
<b>Meis2</b>	Ms	1:1000	Sigma-Aldrich (AV34684)
<b>Pax6</b>	Rb	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank (AB-528427)
<b>Pbx1a</b>	Ms	1:200	Santa Cruz (sc-101851)
<b>Pbx1</b>	Rb	1:600	Cell signaling (4342)
<b>Pbx2</b>	Ms	1:100	Santa Cruz (sc-890)
<b>TH</b>	Rb	1:1000	Peel-Freez (P4010-0)
<b>TH</b>	Ms	1:500	Millipore (MAB318)
<b>TH</b>	Shp	1:1000	Peel-Freez (P60101-0)
<b>Sp8</b>	Rb	1:1000	Millipore (AB15260)
<b>Zic2</b>	Rb	1:1000	Cedido por Eloisa Herrera (Instituto de Neurociencias de Alicante)

**Tabla M3. Anticuerpos secundarios utilizados y sus características.** Gt: anticuerpo obtenido en cabra, Dk: anticuerpo obtenido en burro.

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia	Aplicación
Alexa 555 anti-Ms	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A31570)	IF
Alexa 488 anti-Ms	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A21202)	IF
Alexa 647 anti-Ms	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A31571)	IF
Alexa 555 anti-Rb	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A31572)	IF
Alexa 488 anti-Rb	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A21206)	IF
Alexa 633 anti-Rb	Gt	1:600	Thermo Fisher Scientific (A21071)	IF
Alexa 555 anti-rat	Gt	1:600	Thermo Fisher Scientific (A21434)	IF
Alexa 488 anti-Chk	Gt	1:600	Thermo Fisher Scientific (A11039)	IF
Alexa 647 anti-Gt	Dk	1:600	Thermo Fisher Scientific (A21447)	IF

## 4. Cuantificaciones histológicas y análisis estadístico

### 4.1 Cuantificación de las tinciones de inmunohistoquímica

En cada experimento de esta tesis se especifica el número independiente de animales o células analizadas indicadas como *n*. En los experimentos en los que se analizó toda la PGL del BO (recuentos de células BrdU positivas), los recuentos de las inmunotinciones fueron realizados con un microscopio de fluorescencia vertical (Zeiss Axioplan 2). Se analizaron, al menos, 16 secciones distribuidas a lo largo de todo el eje rostro-caudal del BO, estudiando un mínimo de 100 células positivas para el análogo de la timina por animal y se determinó el % de colocalización con distintos marcadores (TH, CR o CB). Para el resto de estudios de la PGL de BO, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal (Leica TCS-SP8). Se tomó una imagen aleatoria a 63 aumentos de la región dorsal, ventral, lateral y medial de la zona PGL de mínimo 6 secciones representativas de todo el eje rostro-caudal del BO. Se analizaron todas las células inmunopositivas presentes en el área de la foto (184 x 184 μM<sup>3</sup>), y siempre se analizó un mínimo de 400 células GFP positivas (*th:CRE*; RCE) en los análisis de coexpresión con factores de expresión.

Para el estudio de la expresión de *Pbx1* en la SVZ se analizaron 5 secciones representativas de esta región por animal. Para los recuentos del número de células positivas para Ki67 y DCX por área, se analizaron, al menos, 3 secciones, correspondiendo a un mínimo de 300 células positivas en el caso de Ki67 y de 200 en el caso de DCX.

Los recuentos de las diferentes poblaciones marcadas se realizaron con *Image J*. Las imágenes se editaron con el programa Adobe Photoshop CS5.1.

## 4.2 Cuantificación de las proyecciones neuronales del interior de los glomérulos del BO

Con el objetivo de analizar las proyecciones de las neuronas del linaje *Th* en el interior de los glomérulos, se midieron los niveles de fluorescencia de ratones controles *Th: CRE RCE Pbx1<sup>+/+</sup>* y ratones mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* tras la inmunohistoquímica contra GFP para detectar esta marca. Se analizó el contorno interior de 26 glomérulos de cada uno de los 3 animales por condición experimental puesto que en estos no hay cuerpos celulares. El área se delimitó mediante *ImageJ*. Se realizó un estudio previo en el que se midió el fondo sin señal medio de la inmunohistoquímica de todos los animales a analizar, determinando que el valor mínimo de intensidad para considerar expresión positiva de GFP era 20 en la escala de gris 0-256. Por lo tanto, se consideró un pixel positivo para GFP (y, por tanto, que pertenecía a una fibra) aquel que tuviera un valor mayor a 20. Los resultados se expresaron como el porcentaje de pixels positivos para GFP respecto al total de pixel del área analizada.

## 4.3 Reconstrucción y análisis de la morfología neuronal con *Neuron Studio*

El análisis morfológico se realizó en las neuronas electroporadas GFP positivas que estuvieran íntegras en los cortes analizados, de modo que estuviera toda la neurona en las 50 micras de la sección y que no se entrecruzara con ninguna otra neurona GFP. Se analizaron 3 animales de cada condición experimental (*Pbx1<sup>+/+</sup>* y *Pbx1<sup>fix/fix</sup>*). Las fotografías fueron tomadas mediante *Z-stacks* en un microscopio confocal (Leica TCS-SP8) a 63X aumentos cada imagen separada por 0,75  $\mu\text{m}$ , y se confirmó que las células GFP positivas también eran PBX1a y TH positivas en los animales electroporados *Pbx1<sup>+/+</sup>* o *PBX1a* y TH negativas en los animales electroporados *Pbx1<sup>fix/fix</sup>*.

Para poder analizar los parámetros morfológicos se abrieron todas las imágenes de cada neurona en *ImageJ* con el objetivo de generar un único *stack* con todas las imágenes juntas y únicamente en el canal del GFP. Se ajustó el brillo y contraste de manera arbitraria. Tras esto, se guardó un archivo en formato TIFF que, posteriormente, fue utilizado mediante el paquete de software *Neuron Studio*. Previamente al análisis definitivo, se realizaron pruebas piloto para establecer los parámetros de las neuronas de estudio que pide el programa por defecto. Finalmente, tras establecer el soma de la neurona, se llevó a cabo un análisis de morfología con el que estudiamos los siguientes parámetros morfológicos: número de dendritas primarias, número de intersecciones con los anillos de *Sholl*, longitud de las dendritas, volumen de las dendritas, número total de bifurcaciones, así como el radio máximo.

## 4.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron efectuados 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 \*\*\*.

## 5. Estudios del comportamiento

Para analizar el comportamiento se llevaron a cabo diferentes ensayos con la colaboración de la doctora Ana Pérez Villalba de la Universidad de Valencia. Todos ellos fueron realizados en machos de entre 2 y 5 meses de edad.

### 5.1 Análisis de los niveles de ansiedad mediante el test de las canicas (*marble test*)

Previamente al experimento ningún macho había estado solo, de manera que, dos horas antes de este experimento los machos fueron separados para que los resultados del test no fueran debidos a la ansiedad generada al encontrarse solos y para que se acostumbraran a la jaula del ensayo. Esta jaula, tenía más serrín que las jaulas en las que habían estado previamente. A continuación, se sacó al animal de la jaula durante 20 segundos, durante los que se distribuyeron aleatoriamente 5 canicas de vidrio en el serrín de la jaula del animal (**Figura M4A**). Seguidamente, se introdujo de nuevo al animal en la jaula y, tras 10 minutos, se realizó una foto del estado de la jaula. Posteriormente, se analizó la cantidad de canicas que al finalizar los 10 minutos estaban totalmente enterradas (1 punto) o medio enterradas (0,5) (**Figura M4A**).

### 5.2 Evaluación de la función nigroestriatal cerebral mediante la prueba de poste (*pole test*)

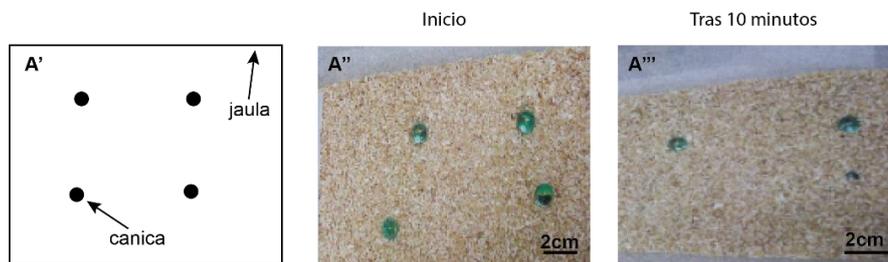
Con el objetivo de analizar la correcta función motora nigroestriatal en los animales, se realizaron ensayos de *Pole test* o prueba de poste. Los machos se situaron en la cima de un palo de madera vertical, de 1cm de diámetro y 45 cm de altura, de manera que el vientre del animal estuviera en contacto con el final del palo (**Figura M4B**). Se analizó el tiempo que cada animal tardaba en descender hasta la base de palo, considerando tiempo final el momento en el que las cuatro patas del animal estaban en la superficie horizontal. Se realizaron 3 tres repeticiones de la prueba a cada ratón y se utilizó el tiempo medio de estos tres ensayos por animal para el análisis de resultados.

### 5.3 Evaluación de la actividad locomotora y de la ansiedad mediante la prueba de campo abierto

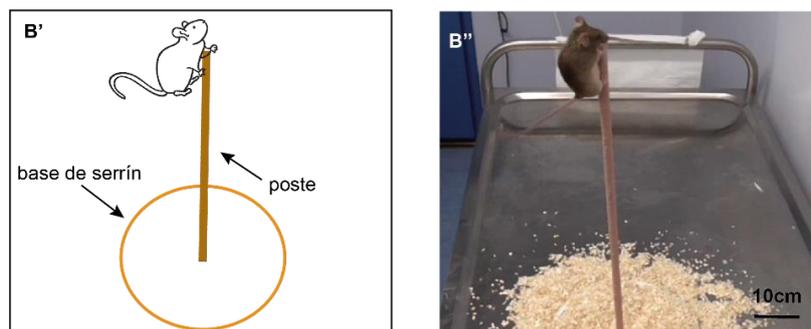
Para analizar la función locomotora de los animales, se realizó la prueba de campo abierto (*Open -field*). Para ello, se utilizó una caja gris de Plexiglas de 40 cM3 (Panlab) que se muestra

en la **Figura M4C**. El campo abierto se iluminó de manera homogénea e indirectamente con una luz situada a 1,5 metros sobre el suelo. Cada animal se situó siempre al inicio de la prueba en la esquina superior izquierda. Tras la prueba de cada sujeto experimental, se procedió a la limpieza del campo con alcohol del 80%, esperando a que se evaporara antes de proceder con el siguiente. Se grabaron los movimientos del ratón dentro de la caja de estudio durante 20 minutos que, posteriormente, fueron analizados mediante el software *Smart tracking video* (Panlab, Harvard Apparatus). Las áreas del perímetro y del centro de la caja fueron establecidas automáticamente por el programa, diferenciando un cuadrado central (rojo), que delimitaba el perímetro central del resto, y otro exterior (azul) que marcaba la periferia externa de la interna (**Figura M4C**). Para todos los ratones se establecieron las mismas áreas. Los primeros 3 segundos después de introducir el animal en el campo abierto no se tuvieron en cuenta para el análisis. El software Smart estableció automáticamente las variables que se analizaron: velocidad media (cm/s), distancia total recorrida (cm) así como el tiempo y el número de entradas realizadas en cada área.

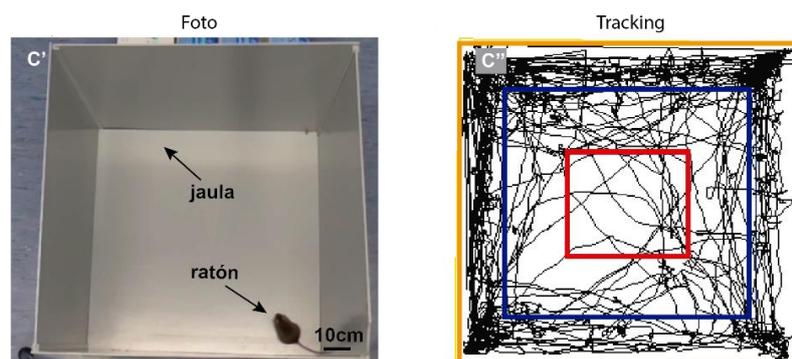
**A) TEST DE LAS CANICAS**



**B) PRUEBA DEL POSTE**



**C) CAMPO ABIERTO**



**Figura M4. Ensayos comportamentales no olfativos.** **A)** Fotografía en la que se muestra un ejemplo del test de las canicas realizado para medir los niveles de ansiedad. A', esquema del ensayo. Fotografías que muestra el antes (A'') y el después (A'''). **B)** Fotografía en la que se muestra un ensayo del poste realizado para el estudio de la función motora nigroestriatal cerebral. B', esquema del ensayo y fotografía real B''. **C)** Fotografía que muestra un animal realizando el ensayo del campo abierto (C') y el tracking realizado por el software de análisis (C''). Se diferencia un cuadrado central (rojo) que delimita el perímetro central del resto. El cuadrado azul delimita la periferia externa de la interna, mientras que el amarillo delimita el área de análisis.

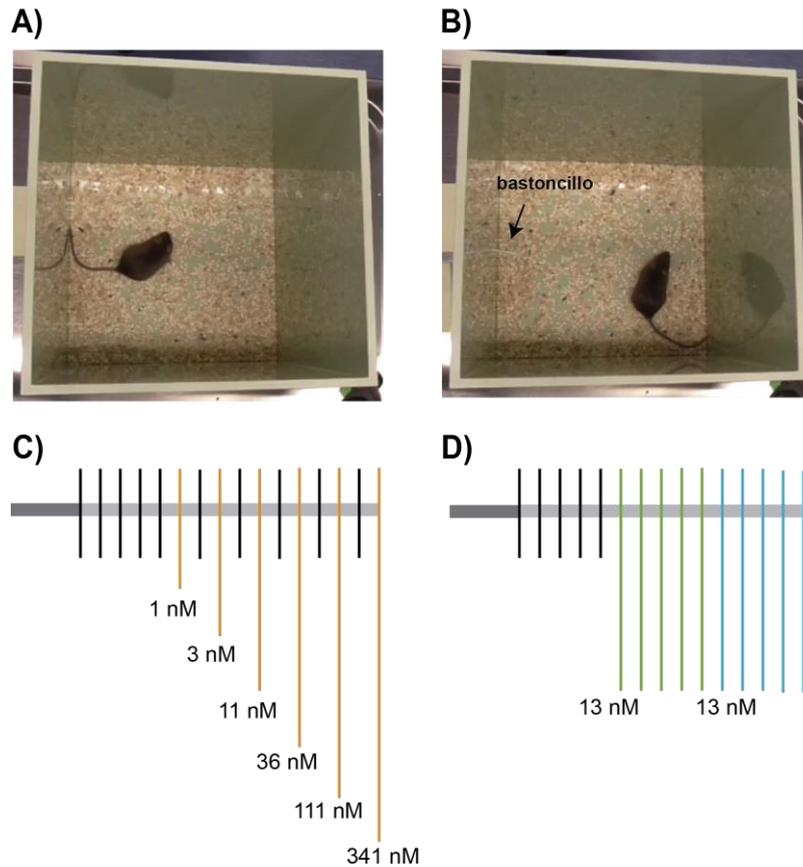
---

### 5.4 Análisis de la función olfativa

Con el objetivo de analizar si la función olfativa estaba afectada en los mutantes de *Pbx1<sup>Th</sup>*, realizamos un ensayo para determinar el umbral olfativo de los animales (Perez-Villalba et al., 2018). Se utilizó una caja abierta de Plexiglas de 22,5 cm<sup>3</sup> con serrín y con un agujero de 1 cm de diámetro apto para introducir un bastoncillo, en la que se situó al animal de estudio. Tras 3 minutos de exploración y adaptación a la caja (**Figura M5A**) se introdujo un bastoncillo de algodón empapado con 20 µl de aceite mineral durante 1 minuto (**Figura M5B**). Se repitió el mismo procedimiento en intervalos de 1 minuto hasta exponer 5 bastoncillos empapados en aceite, de manera que el ratón se habituara a él y comprobando que dejaba de ser un objeto novedoso. En consecuencia, las exploraciones posteriores del animal con el bastoncillo no se debieron a una exploración por tratarse de un objeto novedoso. Tal y como muestra la **Figura M5C**, tras los 5 bastoncillos de aceite mineral se fueron introduciendo bastoncillos empapados con 20 µl de concentraciones crecientes de la sustancia olorosa (geraniol) Entre el minuto de exposición de una concentración y la siguiente se intercaló un minuto de exposición de un bastoncillo con aceite mineral, hasta exponer al animal a la máxima concentración. Se partió de 1 nM y se expuso al animal hasta una concentración de 341 nM según aparece en la **Figura M5C**.

Para realizar el estudio de la habituación olfativa, se realizó una habituación al bastoncillo idéntica a la realizada para la evaluación del umbral, exponiendo 5 bastoncillos a intervalos de 1 minuto cada uno. A continuación, se fueron exponiendo 5 bastoncillos a intervalos de 1 minuto empapados con 20 µl de menta fresca a (Sigma). Seguidamente a la exposición a la menta, se expusieron otros 5 bastoncillos a intervalos de 1 minuto empapados con 20 µl de eugenol (Sigma) (**Figura M5D**).

Para el análisis de los comportamientos olfativos de todos los sujetos de estudio se midió el tiempo que el ratón empleaba en oler el bastoncillo, considerando tiempo de olfacción el olfateo a distancia o el contacto físico con el bastoncillo dentro de un perímetro de 5 cm<sup>2</sup> alrededor del bastoncillo trazado con el software *Smart*.



**Figura M5. Ensayos del comportamiento olfativo.** **A)** Fotografía tomada durante el periodo de adaptación a la caja donde se realizó el umbral olfativo. Nótese la ausencia de bastoncillo. **B)** Fotografía de momentos del ensayo de umbral olfativo en el que se expone el ratón al bastoncillo. La flecha blanca indica el bastoncillo. **C)** Representación esquemática del proceso realizado en el análisis del umbral olfativo con geraniol. Cada línea representa la presentación de un bastoncillo. Las líneas negras indican bastoncillos empapados con aceite mineral, mientras que los naranjas representan bastoncillos empapados con geraniol a la concentración indicada. **D)** Representación esquemática del proceso realizado en el estudio de la habituación olfativa con menta fresca y eugenol. Cada línea representa un bastoncillo. Las líneas negras indican bastoncillos empapados con aceite mineral, mientras que los verdes y azules representan bastoncillos empapados con menta fresca y eugenol respectivamente

## 6. Análisis qRT-PCR

### 6.1 Aislamiento del ARN y retrotranscripción

Los bulbos olfatorios utilizados para la qPCR se extrajeron en fresco y se congelaron en nitrógeno líquido para ser almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ARN. Se extrajo un bulbo olfatorio por animal. Con el objetivo de extraer el ARN de los bulbos olfatorios, se introdujo 1 mL de Trizol (Invitrogen) en cada eppendorf que contenía un OB que había sido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se utilizaron unas pequeñas mazas de plástico para romper el tejido en trozos más pequeños que fueron disgregados mediante pipeteo con una pipeta de 1000  $\mu\text{l}$ . Esta solución reposó durante 2 minutos a temperatura ambiente, tras los que se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de 1-Bromo-3-Cloropropano (Sigma) y se vorteo a máxima potencia durante 15 segundos. Tras 10

## Material y métodos

minutos de espera a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g y 4°C durante 15 minutos. Seguidamente, se recuperó la fase acuosa que, mezclada con 500 µl de isopropanol mediante inmersión y reposada 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g y 4°C durante 10 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con 1 mL de etanol al 80% y se centrifugó durante 5 minutos a 7500g y 4°C. Finalmente, se eliminó el etanol y el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua comercial libre de RNAsas (Ambion) que se dejó en agitación durante 10 minutos a 55°C. Por último, la cantidad y calidad del ARN fue cuantificado utilizando un NanoDrop 2000 y se almacenaron las muestras a -80°C.

Una vez extraído el ARN, se llevó a cabo la retrotranscripción de 1 µg de cDNA mediante el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) y cebadores aleatorios. Por lo que se ajustaron las reacciones según los microlitros necesarios para retrotranscribir ese microgramo. Tras este proceso, a los 20 µl finales de reacción obtenidos, se añadieron 180 µl de agua de PCR, para obtener una concentración de 5 ng/ µl y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 6.2 qPCR y análisis

La PCR cuantitativa se llevó a cabo mediante el sistema de PCR de tiempo real de *Applied Biosystems QuantStudio5*. Las reacciones de amplificación de la PCR fueron las mismas en todas las condiciones, 10 µl de TaqMan Gene Expression Master Mix 2× (Applied Biosystems), 1 µl de la sonda TaqMan 20x específica para el gen, 4 µl de cDNA (5 ng/µl) y agua hasta un volumen de reacción final de 20 µl por reacción. Las sondas TaqMan específicas empleadas para cada gen de ratón se obtuvieron de *Applied Biosystems* y son las siguientes: *Th* (Mm00447557 m1), *Slc6a3* (Mm00438388 m1), *Slc18a2* (Mm00553058 m1), *Gch1* (Mm01322973 m1), *Ddc* (Mm01192100m1), *Meis2* (Mm00487748 m1) y *Gapdh* (Mm99999915 g1). Este último fue el gen utilizado como control endógeno en el experimento. Para cada muestra se realizó el análisis por triplicado siguiendo un sistema de reacción *singleplex*, además, se incluyó un control negativo en cada reacción en el que no se incluía el ADN de molde comprobando así que la amplificación era específica.

Los niveles de expresión del ARNm de los genes analizados se calcularon aplicando el método cíclico de niveles comparativos ( $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), donde RQ se refiere a la cuantificación relativa (del inglés *relative quantification*) y  $\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre los valores del umbral de los ciclos entre el gen y el control (Ct, del inglés *cycle threshold*), normalizándose respecto al gen *Gapdh*. Los datos de las gráficas representan por lo tanto cantidades relativas (RQs) respecto a este control.





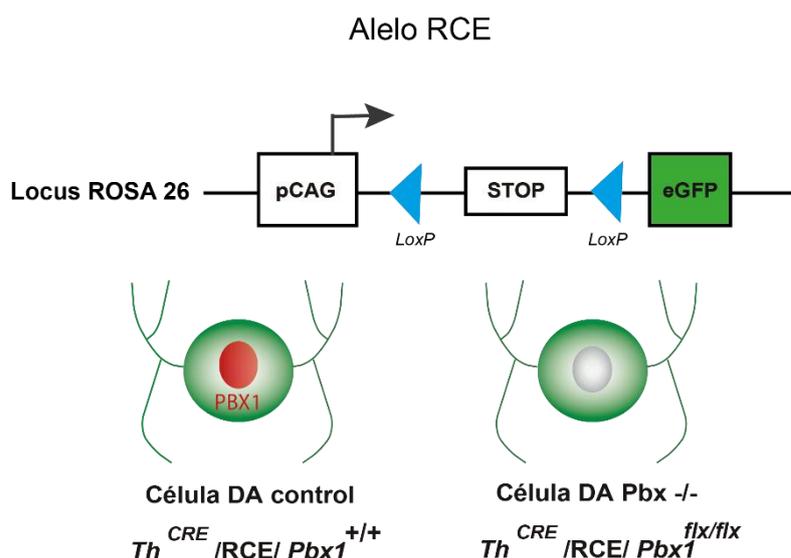
# RESULTADOS

## 1. Validación del modelo transgénico de pérdida de función de *Pbx1*

Como se ha explicado previamente, los análisis realizados por la Dra. Remesal durante su doctorado mostraron que, de entre todos los factores de la familia PBX, únicamente PBX1 y PBX2 se expresaban en las células dopaminérgicas del BO. Es por ello, que nuestros estudios han centrado en estos dos candidatos.

Para el estudio de la función de PBX2 se recurrió al *knock out* convencional para este FT puesto que estos mutantes son viables y alcanzan la vida adulta. En cambio, los mutantes convencionales (*knockout*) para PBX1 mueren alrededor del día embrionario 15 por hipoplasia o aplasia severa de múltiples órganos (Licia Selleri et al., 2001). En consecuencia, 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 (**Figura M1A**). Se ha descrito que PBX1 es necesario para la neurogénesis adulta en el BO y la supervivencia de los neuroblastos en migración (Grebbin et al., 2016). Puesto que queríamos estudiar el papel de *Pbx1* en la diferenciación terminal, decidimos eliminar PBX1 en el estadio terminal de la diferenciación manteniendo la expresión de *Pbx1* intacta en progenitores y neuroblastos migradores. Para ello nos decantamos por utilizar la expresión de la CRE recombinasa bajo la regulación de uno de los genes que se transcriben en neuronas dopaminérgicas en diferenciación; la enzima Tiroxina Hidroxilasa (TH), cuya expresión aparece cuando los neuroblastos dopaminérgicos migradores alcanzan la capa granular externa (Saino-Saito et al., 2004). Por ello, se generó la cepa *Pbx1<sup>Th</sup>* en la que PBX1 es eliminado cuando la célula comienza a expresar *Th*, ya que la CRE recombinasa está integrada en el locus endógeno de *Th* (Cepa *Th<sup>CRE</sup>* detallada en métodos). De aquí en adelante, para simplificar nos referiremos a ella como *Pbx1<sup>Th</sup>*.

Con el objetivo de visualizar las células en las que se eliminaba el factor de transcripción, cruzamos la cepa *Pbx1<sup>Th</sup>* con una cepa reportera fluorescente R26 CAG-boosted EGFP *LoxP allele* (RCE:*LoxP*). De esta manera, en las células en las que actúa la CRE recombinasa y por tanto se elimina PBX1, también se elimina el codón de stop y quedan marcadas expresando la proteína fluorescente verde EGFP de forma permanente (**Figura R1**). Nos referiremos a ella como *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*.



**Figura R1. Diagrama del alelo RCE.** Las células que expresan la CRE recombinasa quedan marcadas con GFP de manera permanente, si además la célula contiene en gen *Pbx1* floxeado la previsión es que las células GFP positivas carezcan de expresión de PBX1.

### 1.1 Caracterización de la actividad recombinasa en el BO en animales $Th^{CRE}$ y de su acción sobre el locus *Pbx1* floxeado

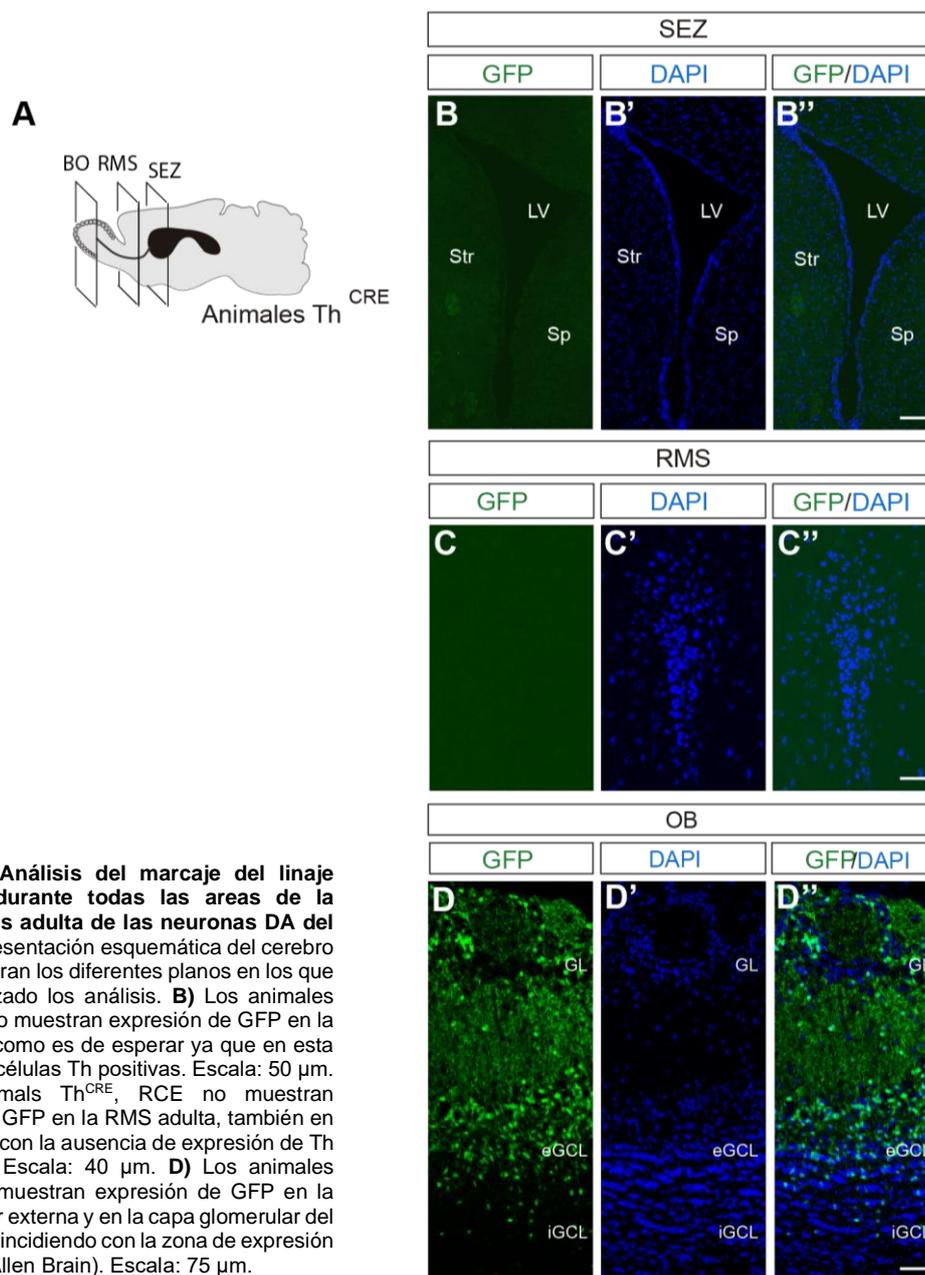
En primer lugar, se caracterizó la actividad de la CRE recombinasa en la cepa  $Th^{CRE}$  en las distintas etapas de la neurogénesis adulta de las neuronas dopaminérgicas mediante el análisis de expresión de GFP en la cepa  $Th^{CRE}/RCE$  (**Figura R2**). Se observó que no había células GFP positivas ni en la SEZ ni en el camino migrador; tal y como se esperaba según lo descrito en la literatura (Baker et al., 2001) solo se observaron células GFP en la capa granular externa y en la capa periglomerular (**Figura R2**). Estos resultados coinciden con la transcripción de *Th* (*Allen brain atlas*) y, por consiguiente, la expresión de la CRE recombinasa en las células se activa en los últimos estadios de migración de los neuroblastos, una vez las neuronas inmaduras han alcanzado la capa granular externa del BO.

En segundo lugar, quisimos comprobar la eficiencia y especificidad de la cepa en la eliminación de PBX1 del linaje dopaminérgico. Para ello, realizamos una inmunohistoquímica para PBX1 en las distintas etapas de la neurogénesis adulta de las neuronas DA. Se observó que en animales  $Pbx1^{Th-RCE}$  los progenitores de la SEZ (células Ki67 positivas) seguían expresando PBX1 sin presentar ninguna diferencia con los controles (**Figura R3 A-B**). Así mismo, los neuroblastos migradores en estos mutantes (células DCX positivas) mostraban también expresión de la proteína PBX1 (**Figura R3 C-D**). En cambio, las neuronas dopaminérgicas del BO (TH positivas) de los mutantes  $Pbx1^{Th}$  no expresaban PBX1, mientras que los animales controles sí que lo hacían (**Figura R3 E-F**).

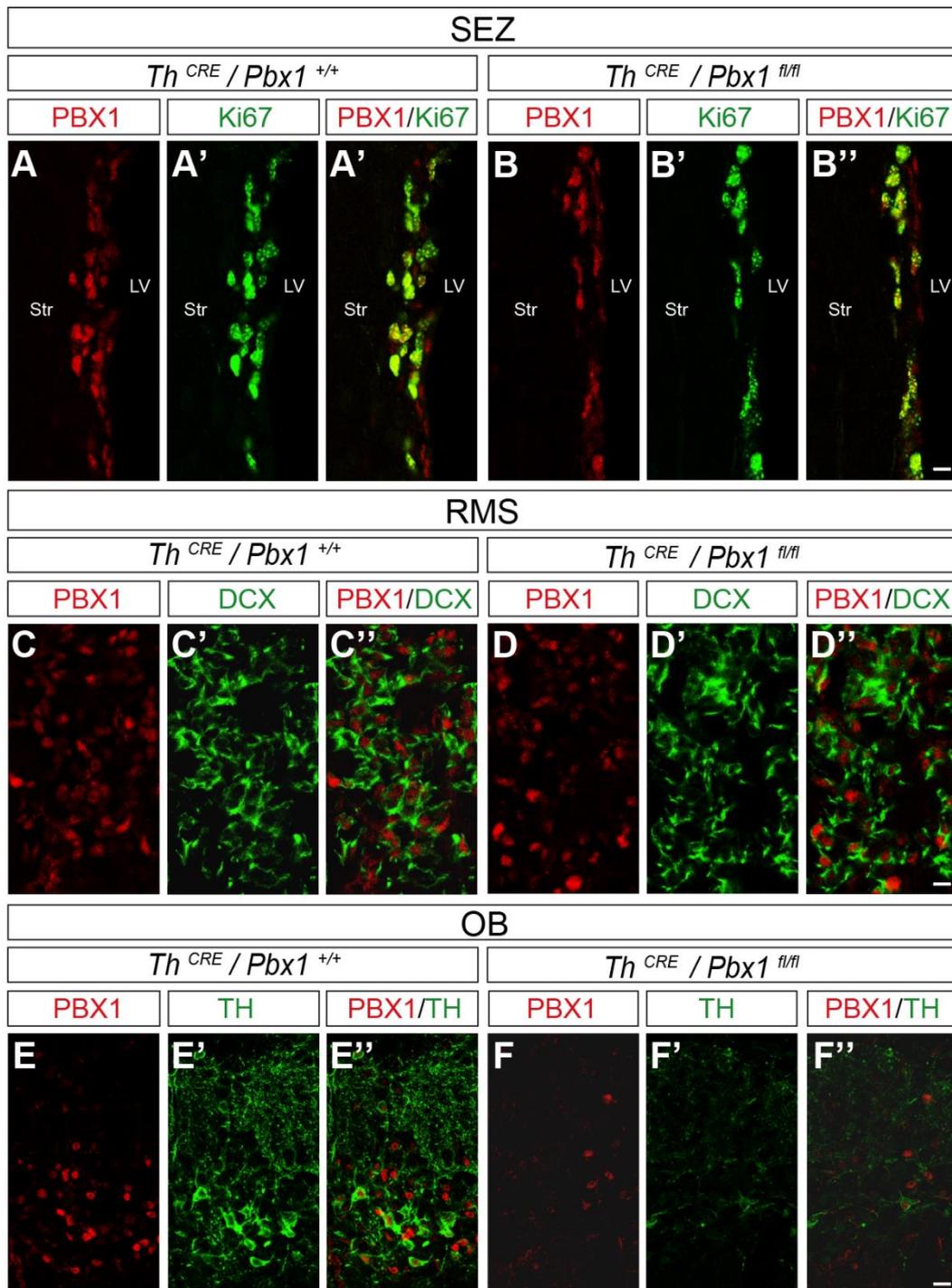
Por último, también comprobamos que en la cepa  $Pbx1^{Th}$  la eliminación tardía de PBX1 no provoca ninguna afectación en los progenitores ni en los neuroblastos migradores. Con este objetivo se analizó el número de células positivas para Ki67 (un marcador de células en

## Resultados

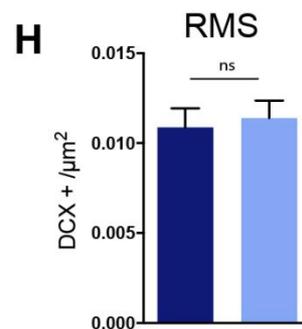
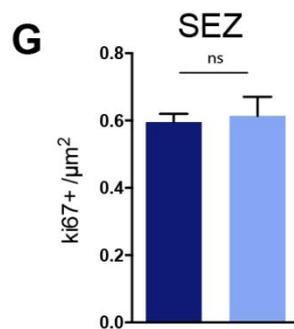
proliferación) en la SEZ de animales mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* y controles. Como se puede observar en la **Figura R3 A-B y G**, no encontramos diferencias en el número de progenitores entre los animales control y los animales mutantes de nuestra cepa (control  $0.59 \pm 0.02$  Ki67+ / $\mu\text{m}^2$ ; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $0.61 \pm 0.06$  Ki67+ / $\mu\text{m}^2$ ). Así mismo, también se estudiaron los neuroblastos migradores de la RMS que se caracterizan por expresar DCX. Tal y como muestra la **Figura R3 C-D y H**, en los mutantes condicionales *Pbx1<sup>Th</sup>* el número de neuroblastos migradores no es diferente al de los controles (control  $0.011 \pm 0.001$  DCX+/ $\mu\text{m}^2$ ; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $0.011 \pm 0.0009$  DCX+/ $\mu\text{m}^2$ ). Con todo esto, podemos concluir que en esta cepa la eliminación de PBX1 ocurre específicamente en las últimas etapas de diferenciación de las neuronas DA del BO y no se afectan ni los progenitores y los neuroblastos en migración.



**Figura R2. Análisis del marcaje del linaje *Th<sup>CRE</sup>/RCE* durante todas las áreas de la neurogénesis adulta de las neuronas DA del BO. A)** Representación esquemática del cerebro en el que figuran los diferentes planos en los que se han realizado los análisis. **B)** Los animales *Th<sup>CRE</sup>/RCE* no muestran expresión de GFP en la SEZ adulta, como es de esperar ya que en esta zona no hay células Th positivas. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . **C)** Los animales *Th<sup>CRE</sup>, RCE* no muestran expresión de GFP en la RMS adulta, también en consonancia con la ausencia de expresión de Th en el RMS. Escala: 40  $\mu\text{m}$ . **D)** Los animales *Th<sup>CRE</sup>, RCE* muestran expresión de GFP en la capa granular externa y en la capa glomerular del BO adulto, coincidiendo con la zona de expresión del gen Th (Allen Brain). Escala: 75  $\mu\text{m}$ .

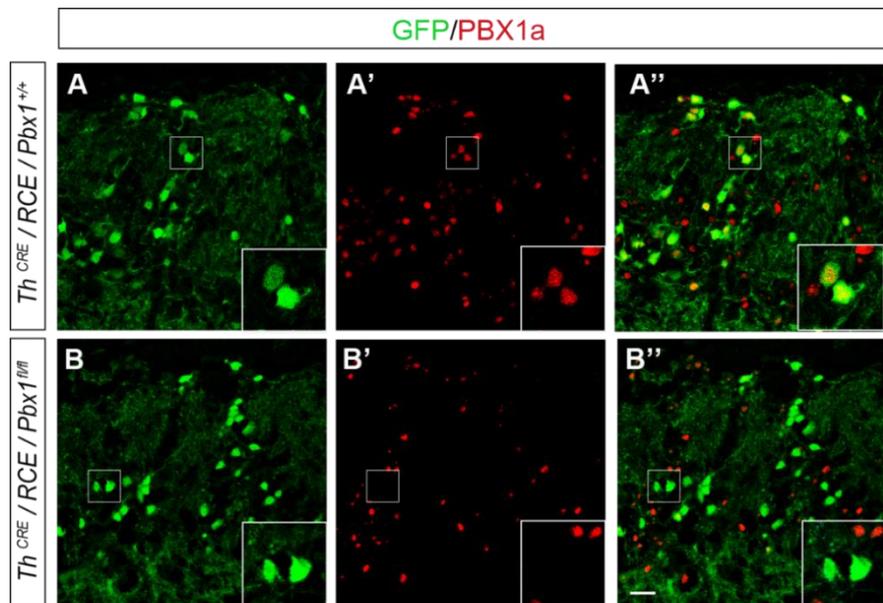


■ Control  
■ *Pbx1<sup>Th</sup>*

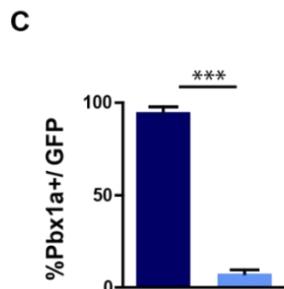


**Figura R3. Los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* eliminan *Pbx1* específicamente de las neuronas dopaminérgicas del BO en proceso de diferenciación. A)** Expresión de PBX1 en los progenitores que están proliferando en la SEZ (Ki67 positivos) en animales controles *Th<sup>CRE</sup>, RCE, Pbx1<sup>+/+</sup>*. **B)** Expresión de PBX1 en los progenitores que están proliferando en la SEZ (Ki67 positivos) en animales mutantes *Pbx1<sup>Th-CRE</sup>*. **C)** Expresión de PBX1 en neuroblastos migradores de la RMS (DCX positivos) en animales controles *Th<sup>CRE</sup>, RCE, Pbx1<sup>+/+</sup>*. **D)** Expresión de PBX1 en neuroblastos migradores de la RMS (DCX positivos) en animales mutantes *Th<sup>CRE</sup>, RCE, Pbx1<sup>flx/flx</sup>*. **E)** Expresión de PBX1 en células del BO pertenecientes al linaje DA marcadas con TH en animales controles *Th<sup>CRE</sup>, RCE, Pbx1<sup>+/+</sup>*. **F)** La expresión de PBX1 se reduce drásticamente en los BO de los animales mutantes *Pbx1<sup>Th-CRE</sup>*. **G)** Cuantificación de los progenitores proliferando (Ki67 positivos) en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.78. **H)** Cuantificación de los neuroblastos migradores de la RMS (DCX positivos) en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.73. Escala: 10  $\mu$ m.

Así mismo, caracterizamos la eficiencia de la eliminación de PBX1 en las células del BO en los animales mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. Observamos que, mientras que en los controles prácticamente todas las células GFP positivas (*Th<sup>CRE</sup>/RCE*) de la PGL co-expresaban *Pbx1a* ( $94.8 \pm 2.8\%$ ), en los mutantes tan sólo el  $7.6 \pm 1.9\%$  presentaban coexpresión de las dos proteínas (**Figura R4**). Con estos datos, establecimos que nuestro modelo animal funcionaba correctamente. Cabe destacar que, a parte de estos análisis, en todos los animales utilizados para los experimentos y que habían sido previamente genotipados por PCR, se comprobó que el genotipo era correcto mediante inmunotinción frente a PBX1. Es decir, que los animales control mantenían la expresión de PBX1 en las células dopaminérgicas y que los mutantes no lo hacían.



**Figura R4. Los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* eliminan *Pbx1* eficientemente de las células pertenecientes al linaje dopaminérgico del BO. A)** Coexpresión de GFP y PBX1a en animales controles *Th<sup>CRE</sup>, RCE, Pbx1<sup>+/+</sup>*. **B)** La coexpresión de GFP y PBX1a en animales *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* muestra defectos en la expresión de PBX1 en el linaje DA. Escala: 25  $\mu$ m. **C)** Cuantificación del porcentaje de células GFP positivas que coexpresan PBX1a en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor < 0.001. Escala: 25  $\mu$ m.



## 2. Estudio y detección de recombinaciones inespecíficas en la línea *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*

La posibilidad de crear un modelo animal en el que se pudiera controlar espacial y/o temporalmente la modificación genética mediante la CRE recombinasa supuso un gran avance para la investigación en los distintos campos de la biología, dado que resolvía problemas como la letalidad embrionaria, los efectos no autónomos celulares, la aparición de mecanismos de compensación temprana o la interferencia por inactivación en otros tejidos. Estos animales son los llamados mutantes condicionales. Aunque existen diferentes sistemas para generarlos, el más extendido es el sistema CRE/*LoxP*, puesto que es de los sistemas con mayor efectividad en los estudios *in vivo*.

Este sistema está formado por una integrasa perteneciente a la familia de integrasas  $\lambda$ , la CRE recombinasa. Esta enzima cataliza la reacción de recombinación entre dos elementos *LoxP* (secuencias cortas de 34 nt), produciendo la escisión de la región genómica flanqueada por dichos sitios. De esta manera, cuando se cruza un ratón que expresa CRE bajo un promotor específico de tejido con otro ratón que contiene un gen floxeado (es decir, un gen con un exón crítico flanqueado por dos *LoxP* intrónicos) se obtendrá un individuo *knock-out* condicional que expresará el gen en todo el organismo excepto en aquellas células que estén expresando CRE, en las que se habrá producido la recombinación y, por tanto, el gen habrá quedado inactivado. El éxito del sistema depende totalmente de la actividad del promotor en el tejido diana y de que su expresión sea específica del tejido a estudiar (Yarmolinsky y Hoess, 2015).

Desafortunadamente el sistema no es perfecto. Los laboratorios Jackson publicaron en 2012 una caracterización exhaustiva de las líneas CRE más solicitadas, en la que se revelaba que la mayoría de cepas CRE muestran un grado de actividad recombinasa inespecífica. Por consiguiente, se evidenció la importancia de caracterizar en profundidad la actividad recombinasa de las cepas que se utilizan, de manera que se tenga en consideración las precauciones necesarias al tratar con un modelo animal de este tipo (Heffner et al., 2012).

Se han descrito tres situaciones en las que podemos encontrar una expresión de CRE inespecífica, es decir, en tejidos distintos al tejido diana. El primer escenario se presenta en una situación en la que la CRE se expresa en el tejido germinal de uno de los progenitores o de los dos, que se conoce como delección germinal. Si coexisten la CRE y el alelo floxeado en los precursores de los gametos, se puede producir la recombinación del alelo floxeado previamente a la meiosis, generando gametos recombinados que darían lugar a animales en los que un alelo de todas sus células haya recombinado y esté delecionado. Es importante tener en cuenta que este fenómeno será independiente de que la cría sea o no portadora de la CRE, dado que se trata de un proceso premeiótico (**Figura R5A**). En determinadas ocasiones este efecto puede producirse exclusivamente en uno de los dos tipos de progenitores, bien sea en los machos o en las hembras, o tener distinto grado de afectación según el sexo. Para evitar esta situación o minimizar las consecuencias, se recomiendan estrategias de cruce en las que el parental con

## Resultados

menor grado de afectación por la CRE. Un caso extremo es la línea *Cathepsin-Cre*, utilizada para producir mutantes condicionales en osteoclastos en la que se ha descrito una expresión fuerte de CRE tanto en oocitos como en espermatozoides maduros, cuestionando la utilización de esta cepa (Winkeler, Kladney, Maggi, & Weber, 2012). En el segundo escenario se produce una recombinación global inesperada que afecta a todas las células de un organismo incluso aunque no exista coexistencia de CRE y *Flox* en las células germinales de los progenitores. El mecanismo propuesto en la mayoría de los casos es la persistencia en el citoplasma del oocito de CRE en forma de mRNA o proteína, debido a lo que ocurre cuando la CRE es de origen materno (**Figura R5B**). Al igual que en el caso anterior, el efecto es independiente de que el embrión resultante sea genéticamente portador o no de la CRE puesto que proviene de la expresión de la CRE del genoma materno, aunque, a diferencia del anterior, la recombinación puede no afectar a todas las células y generar un mosaico. Uno de los primeros casos descritos fue en la cepa CAG-Cre, aunque se han descrito muchos otros (Cucarella, 2019). El último de los casos consiste en la expresión transitoria del promotor bajo el que se encuentra regulada la expresión de la CRE durante el desarrollo embrionario en algún tejido no esperado, conocida como recombinación mosaico-somática. Como ya hemos comentado, debido a la irreversibilidad de la recombinación, esta actividad fugaz de CRE quedará fijada de forma permanente, provocando la presencia de alelos recombinados en tipos celulares inesperados (**Figura R5C**). El porcentaje de células afectadas por la recombinación, dependerá del estadio embrionario en el que se activa la recombinasa, de modo que cuanto más temprana sea la expresión de CRE (por ejemplo, en las primeras divisiones) mayor será el número de células y/o tejidos afectados. A diferencia de los casos anteriores, este efecto sólo ocurrirá en animales con genoma CRE positivos.

Por todo ello, debido al problema que plantean estas líneas, es necesario incluir como parte de la estrategia general de genotipado de las cepas además de la detección del alelo floxeado y/o la recombinasa la detección sistemática del alelo recombinado (nulo) (Song y Palmiter, 2018).

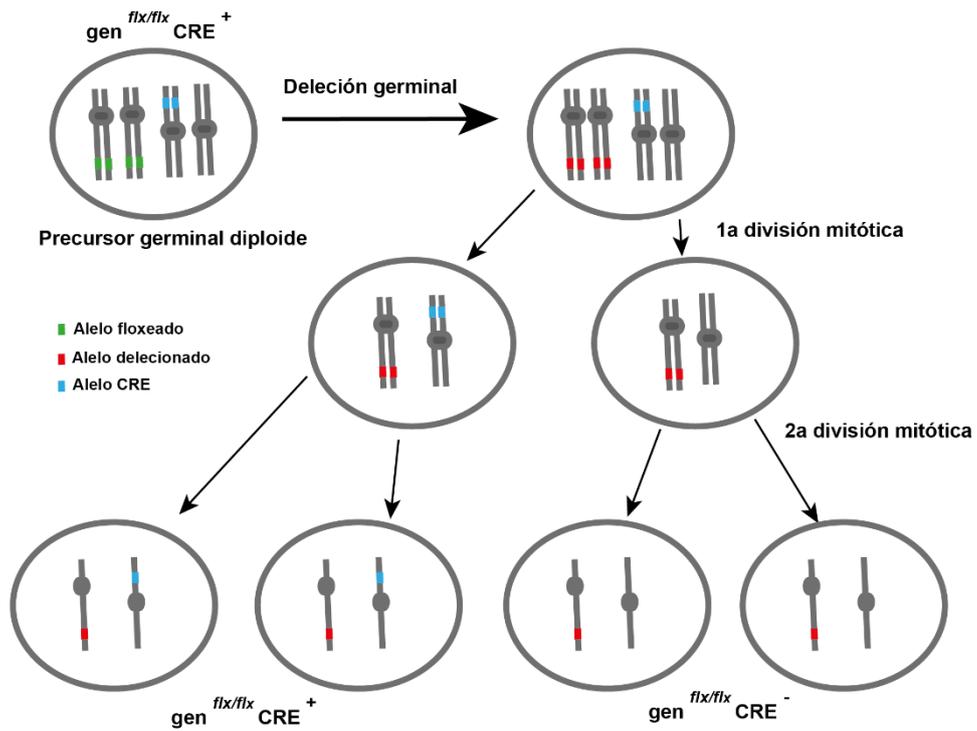
En la línea *Th<sup>CRE</sup>* utilizada en esta tesis se describió, previamente, la delección germinal en un 100% de los casos cuando la CRE es de origen materno, mientras que cuando la CRE proviene del macho el porcentaje se reduce a menos del 20% de afectados (Lindeberg et al., 2004). Para minimizar la cantidad de animales con recombinación inespecífica (los llamaremos nulos para diferenciarlos de la recombinación correcta) en todos nuestros cruces el macho era heterocigoto para el gen de la CRE mientras que las hembras eran salvajes para este gen. Aun así, no podíamos separar el alelo floxeado del alelo CRE en los cruces porque necesitábamos animales homocigotos para el alelo floxeado y, por tanto, los machos eran *Th<sup>CRE</sup>, Pbx1<sup>flx/flx</sup>*. La cepa que utilizamos, además, incluye la construcción RCE que, como hemos comentado en el apartado de métodos, permite detectar las células en las que ha habido actividad recombinasa porque quedan marcadas con la proteína fluorescente GFP.

En consecuencia, los cruces que utilizamos para obtener mutantes fueron hembras homocigotas para el alelo floxeado, heterocigotas para RCE y salvajes para el alelo CRE. Estas hembras se cruzaron con machos homocigotos para el alelo floxeado y heterocigotos para RCE y CRE en los cruces destinados a la obtención de animales mutantes. Los respectivos controles se obtuvieron a partir de cruces en los que las hembras eran heterocigotas para el alelo RCE y salvajes tanto para el alelo *Pbx1* floxeado como CRE, y los machos eran heterocigotos para el alelo RCE y CRE y salvajes para el alelo *Pbx1* floxeado. Los linajes de controles y mutantes nunca se mantuvieron separados más de 5 generaciones para evitar diferencias inespecíficas debidas a deriva genética. Por ello, periódicamente se han cruzado hembras provenientes de los cruces para generar mutantes, con machos provenientes de los cruces para generar controles. Los animales de estos cruces, heterocigotos para el alelo floxeado, se cruzaron entre ellos para generar los animales de experimentación.

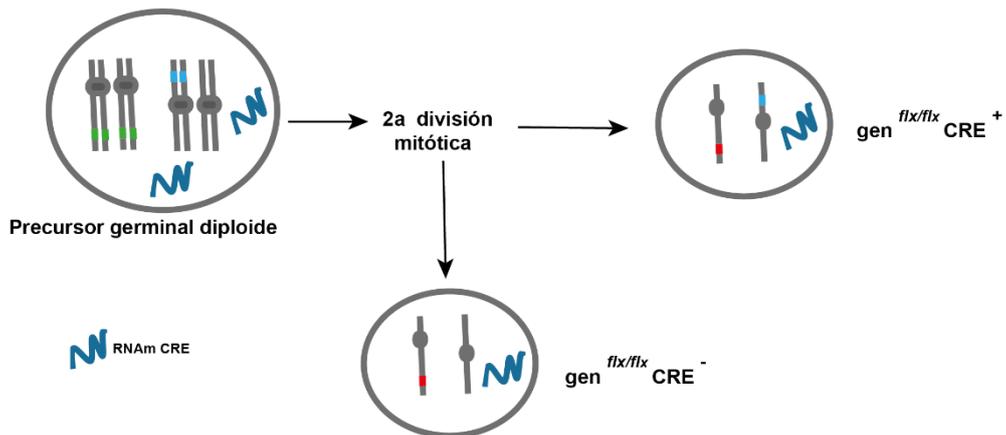
En nuestras manos, encontramos que un 18% de los animales que provenían de cruces en los que el padre aportaba la CRE, presentaban fluorescencia verde en todas sus células, y por tanto recombinación germinal paterna. Estos datos concuerdan con los aportados por Lindeberg (2004). La fluorescencia se apreciaba al observar el tejido obtenido para el genotipado (un dedo) bajo la lupa de fluorescencia. Este hecho, indicaba que en estos animales había ocurrido una deleción germinal que afectaba a todas sus células. En consecuencia, los animales que presentaban este fenotipo eran descartados y sacrificados. Con el objetivo de testar si el hecho de encontrar animales en los que todas las células expresaban el GFP se debía a la deleción germinal, genotipamos animales con este fenotipo que provenían de camadas en las que ambos progenitores presentaban el alelo RCE en homocigosis, siendo el padre el portador del alelo CRE en heterocigosis. Comprobamos que había animales tanto portadores como no portadores de la CRE que presentaban el alelo delecionado y sus células verdes, hecho que coincidía con una recombinación en la línea germinal.

Otro aspecto a tener en cuenta es que, a parte de la deleción germinal, la bibliografía muestra que en la cepa *Th<sup>CRE</sup>* también produce recombinación mosaico-somática. Es decir, hay una expresión transitoria de *Th* en tejidos diferentes al tejido diana durante el desarrollo embrionario. Concretamente, Lindeberg (2004) describió la expresión transitoria de la *Th* en el ganglio de la retina, folículos de las vibrisas, esófago, glándulas sudoríparas, ovario y en el epidídimo de machos de dos meses de edad, entre otros. En cambio, los estudios en el cerebro confirman una especificidad total, exclusiva de las neuronas DA (Lindeberg et al., 2004).

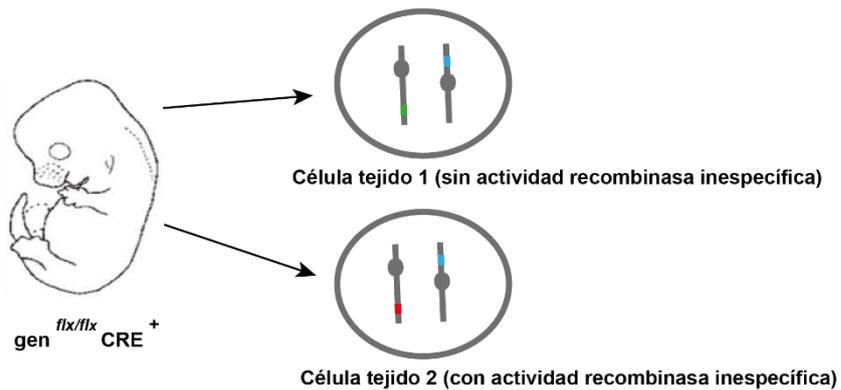
**A) Actividad recombinasa inespecífica en la línea germinal**



**B) Actividad recombinasa inespecífica post-fecundación**



**C) Actividad recombinasa inespecífica durante el desarrollo embrionario**

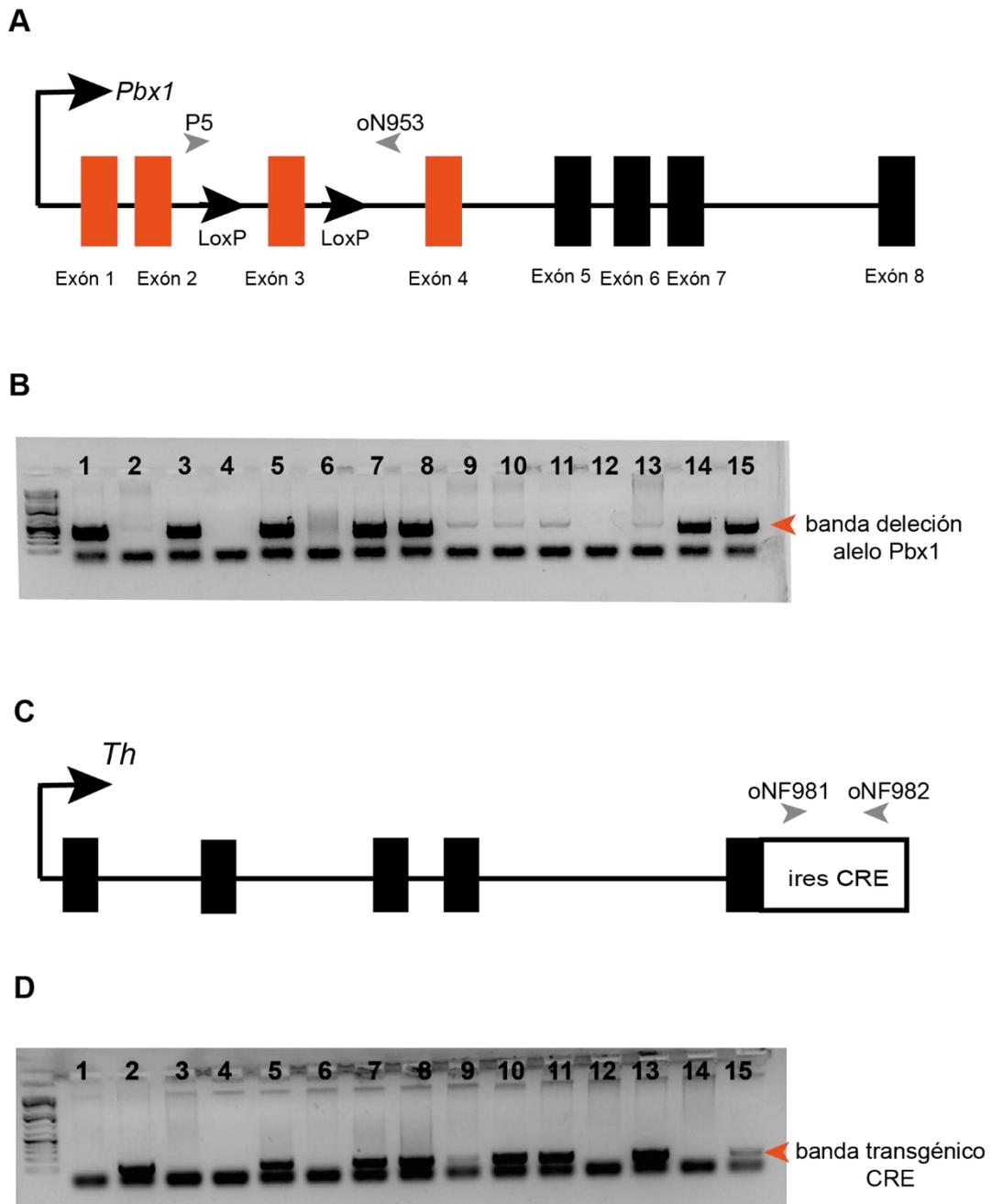


**Figura R5. Diagrama de las tres situaciones en las que podemos encontrar una expresión de Cre inespecífica.** **A)** La delección ocurre en la línea germinal estando presente en gametos que no han heredado CRE (Adaptado de Cucarella, 2019). **B)** El ARNm CRE se traspa a los gametos, una vez se traduce provoca la delección en gametos que aún si no han heredado la CRE en el genoma. **C)** Algunos tejidos expresan el gen promotor de la CRE transitoriamente durante el desarrollo embrionario.

---

En cualquier caso, además de descartar los animales con recombinación general (nulos) mediante fenotipado en la lupa de fluorescencia, se incluyó una PCR en la que se detectaba la recombinación del alelo mutante ya delecionado *Pbx1* (los detalles se muestran en el apartado de métodos) propuesta por Koss (2012), cuyos cebadores se pueden observar en la **Figura R6A**. Como la muestra tomada para el genotipado era un dedo, este tejido no debía contener células recombinadas inespecíficas según la bibliografía, de modo que, si encontrábamos la delección en ese ADN, se trataba de un animal en el que había ocurrido una recombinación germinal. La electroforesis de la PCR nula desvelaba que, a pesar de realizar la técnica con la misma cantidad de ADN, encontramos animales que tenían mucha cantidad del alelo nulo (una banda muy intensa) y otros en los que aparecía muy poca cantidad (banda muy tenue). Esto nos llevó a pensar que los aquellos en los que encontrábamos una banda tenue, eran animales en los que había habido una expresión transitoria de la CRE en forma de mosaico, es decir, que algunas células del dedo habían recombinado (recombinación mosaico-somática), mientras que aquellos que presentaban una banda muy intensa eran animales con una recombinación en todas las células, debido a una delección germinal. Para comprobarlo, testeamos si todos los animales con banda nula tenue eran portadores de la CRE (como sería de esperar si la recombinación es por expresión inespecífica de tejido de la CRE). Tal y como se muestra en la **Figura R6**, los datos confirmaron esta hipótesis. Entre los animales con la banda intensa encontrábamos no portadores de la CRE, pero los que tenían una banda tenue eran todos portadores de la CRE. Por ejemplo, el animal 13 presenta una banda tenue en la PCR nula y es positivo para la CRE. En cambio, el animal 1 o 3 presenta una banda intensa en la PCR nula pero no exhibe banda para la CRE. En nuestros genotipados encontramos que, tras descartar los animales *verdes* comentados anteriormente, un 6% de los restantes presentaban una banda nula intensa, estos fueron también descartados, aunque desconocemos si la banda intensa es debido a mosaico muy penetrante o a delección germinal.

En base a todos estos resultados, los animales seleccionados para experimentación fueron comprobados, tanto por fenotipado GFP en lupa como por genotipado del alelo nulo e inmunotinción de PBX1, para confirmar que los controles mantienen la expresión de PBX1 y los mutantes la pierden específicamente de las células TH positivas.



**Figura R6. A)** Representación esquemática del alelo floreado de *Pbx1*. Se muestra el locus de *Pbx1* con los 8 exones (rectángulos), el exón 3 flanqueado por las secuencias *LoxP* que serán reconocidas por la CRE recombinasa. Las cabezas de flechas grises representan los cebadores empleados para determinar el alelo resultante de la recombinación, si ha tenido lugar la recombinación se amplifica una banda de 500 pb y si no ha ocurrido no se amplifica ninguna banda. **B)** Gel de electroforesis del genotipado del alelo nulo. El animal 4 y 12 no ha habido recombinación. Nótese la diferencia entre las bandas tenues (animal 2, 9, 10, 11 y 13) e intensas (1, 3, 5, 7, 8, 14, 15). Los animales con bandas tenues fueron incluidos en los análisis posteriores, pero no los animales con bandas intensas. **C)** Representación esquemática del locus de *Th* tras la inserción del cassette CRE recombinasa. Se muestran los cebadores utilizados para el genotipado de los animales que presentan este alelo. **D)** Gel de electroforesis del genotipado de la presencia de la CRE recombinasa en los mismos animales que la detección de la deleción del alelo *Pbx1*. Los animales 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13 y 15 son positivos para el alelo CRE. Nótese que la presencia o ausencia de CRE no correlaciona con la presencia de banda intensa para el alelo delecionado pero que todos los animales con banda tenue presentan el alelo CRE.

### 3. PBX1 es necesario para la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio, pero no para su supervivencia

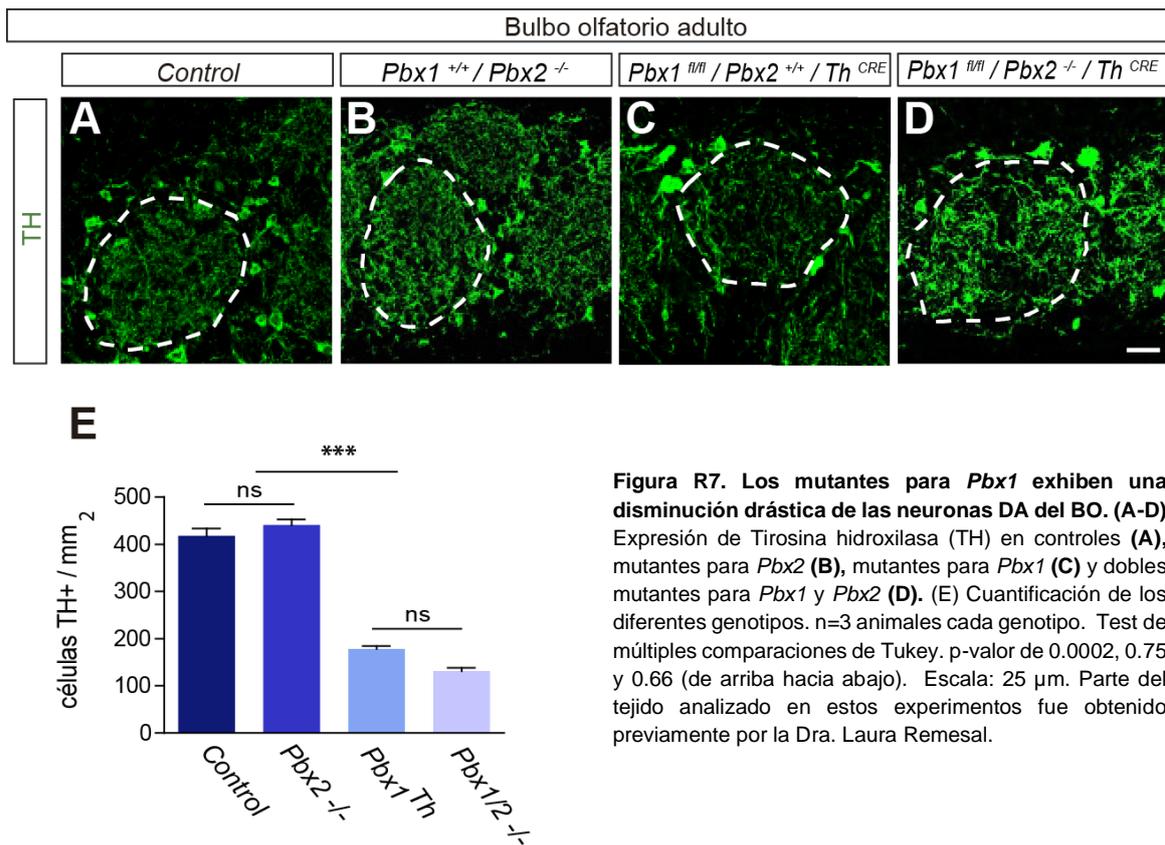
Una vez hechas las comprobaciones para saber que la cepa *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* funcionaba correctamente y que nuestro genotipado era correcto, estudiamos el papel de los FT *Pbx* en la diferenciación terminal de las neuronas DA. Los únicos dos FT de la familia de PBX que se expresan en las neuronas DA del ratón son PBX1 y PBX2 (datos obtenidos por la Dra. Remesal). Por esta razón, quisimos analizar el efecto que tenía la eliminación de cada una de estas proteínas en las neuronas dopaminérgicas del BO mediante el uso de las cepas de ratón ya mencionadas.

#### 3.1 PBX1, pero no PBX2, es necesario para la correcta la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio

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>+/+</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup>, Th<sup>CRE</sup>*), mutantes para PBX1 (*Pbx1<sup>flx/flx</sup>; Pbx2<sup>+/+</sup>, Th<sup>CRE</sup>*) y mutantes para PBX2 (*Pbx1<sup>+/+</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>; Th<sup>CRE</sup>*) de 2 meses de edad (**Figura R7**). Se ha descrito que, en ocasiones, los miembros de la familia PBX pueden ser redundantes y, en estos casos, sólo el doble mutante muestra fenotipo o el fenotipo es mucho más exacerbado en el doble mutante (Selleri et al., 2004). Como las neuronas dopaminérgicas del BO expresan tanto PBX1 como PBX2 decidimos analizar también animales dobles mutantes *Pbx1<sup>flx/flx</sup>; Pbx2<sup>-/-</sup>; Th<sup>CRE</sup>*.

Tras cuantificar las imágenes de microscopía confocal se observó que los mutantes para *Pbx2* no presentaban diferencias significativas en el número de células TH positivas en comparación con los animales control (control  $418 \pm 16$  células TH positivas /mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx2<sup>-/-</sup>*  $441 \pm 12$  células TH positivas /mm<sup>2</sup>, n=3 animales por genotipo), descartando un papel importante de PBX2 en la diferenciación terminal a neurona DA del BO (**Figura R7 A-B, E**). Por el contrario, los mutantes para *Pbx1* exhiben una dramática disminución en el número de neuronas DA del BO ( $178 \pm 6$  células TH positivas /mm<sup>2</sup>, n=3 animales) que no se ve exacerbada en los dobles mutantes ( $131 \pm 7$  células TH positivas /mm<sup>2</sup>, n=3 animales) (**Figura R7**).

En conclusión, estos resultados muestran que PBX1, pero no PBX2, tiene un papel fundamental en la correcta diferenciación, supervivencia y/o mantenimiento de las neuronas DA del OB adulto. Por esta razón, el resto de los experimentos de esta tesis se centraron en la caracterización de los mutantes para *Pbx1*.

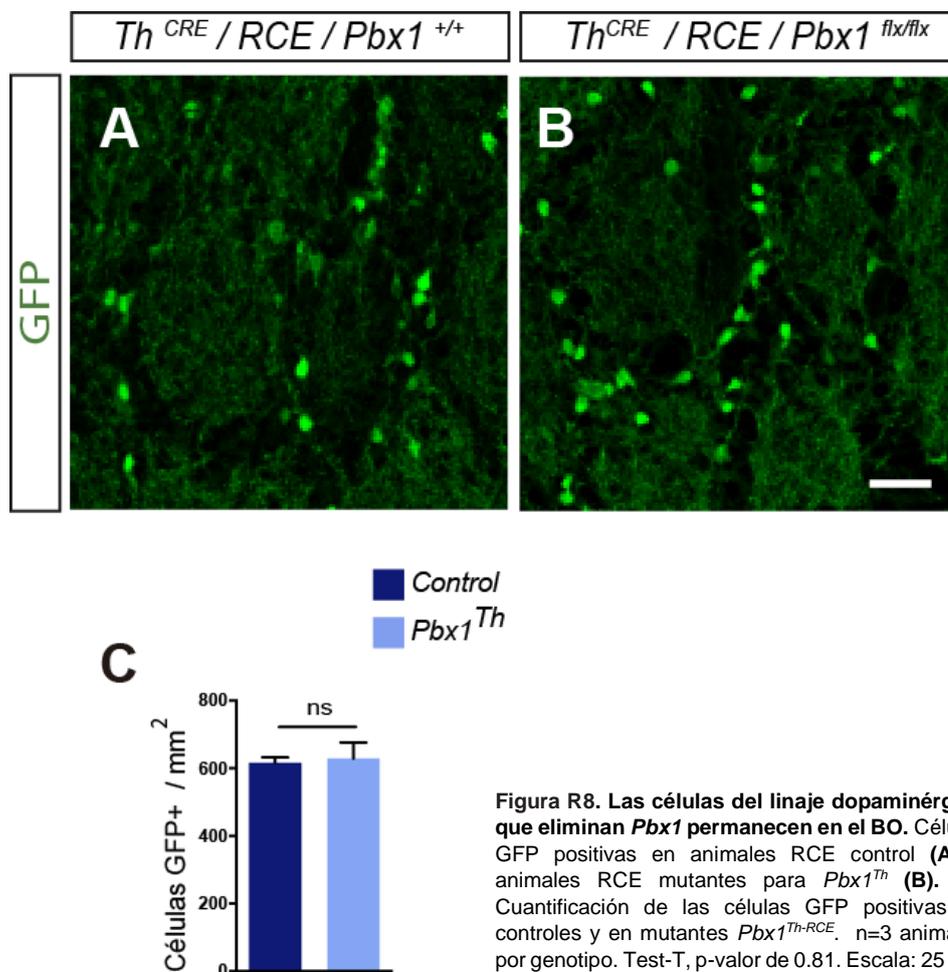


### 3.2 La eliminación tardía de *Pbx1* no afecta la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio

Una vez observada la reducción en el número de neuronas TH positivas en los mutantes de *Pbx1*, quisimos determinar que ocurría con las neuronas mutantes que carecían de expresión de PBX1. Por un lado, podía tratarse de un problema de supervivencia, en el que la ausencia de PBX1 produce la muerte de la célula al igual que ocurre al eliminar *Pbx1* de los neuroblastos migradores (Grebbin et al., 2016) y por ello detectábamos una disminución de células TH positivas. Por otro lado, podía tratarse de una incorrecta diferenciación terminal en la que las células permanecieran en la PGL parcialmente diferenciadas a neuronas, pero sin expresar TH o tal vez se diferenciaban a otro tipo celular.

Para dilucidar en cuál de estas situaciones nos encontramos, utilizamos los animales que incorporan el alelo RCE junto con los alelos *Pbx1*<sup>Flox</sup> y *Th*<sup>CRE</sup> (Cepa abreviada como *Pbx1*<sup>Th-RCE</sup>). Tal y como se explica en el apartado de caracterización de las cepas (Figura R1 y R2) y en métodos, los ratones RCE tienen insertada la proteína verde de fluorescencia aumentada (eGFP del inglés *enhanced GFP*) en el locus del gen *Rosa26* precedida por una secuencia de parada (STOP) flanqueada por sitios *LoxP*. Por ello, en presencia de la CRE recombinasa, la secuencia STOP es escindida y la eGFP puede expresarse de forma permanente y, a partir de ese

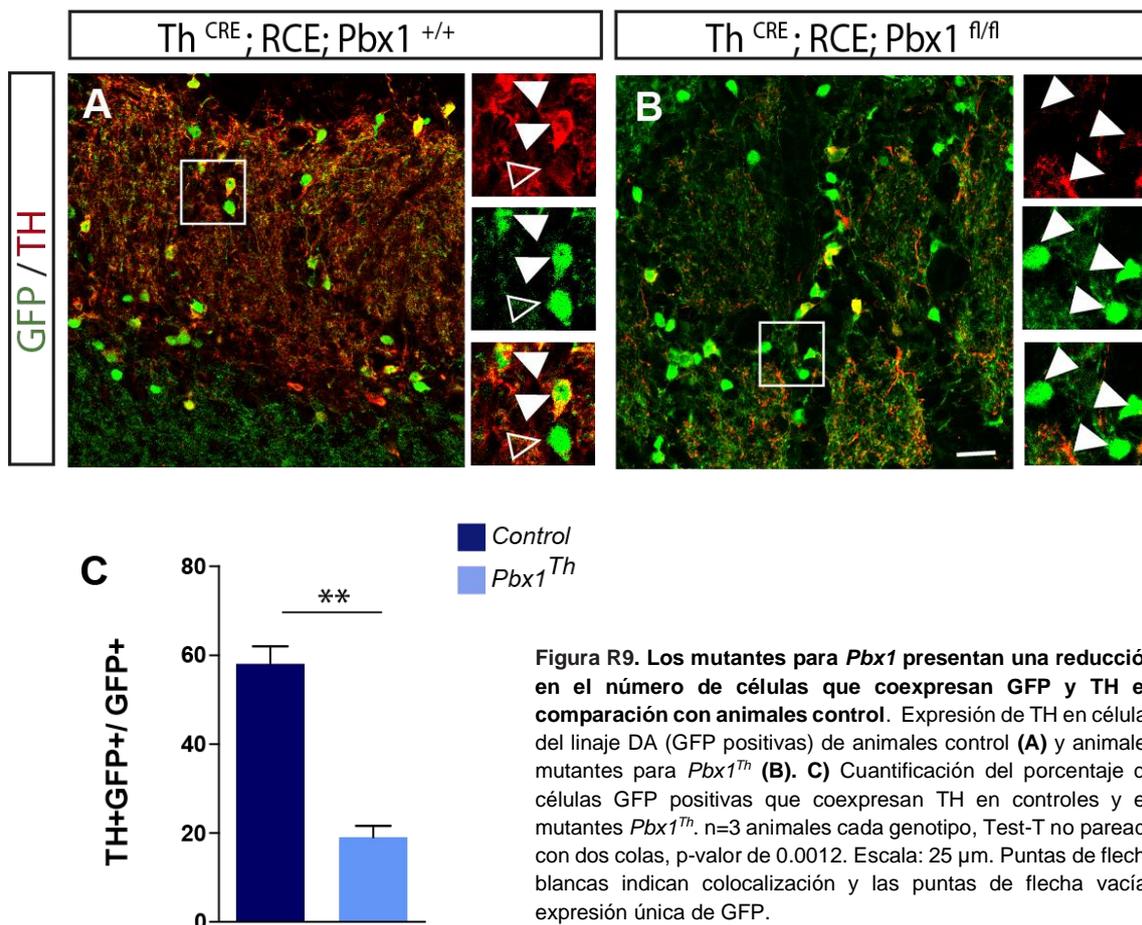
momento, independientemente de la presencia de la CRE. De modo que las células que en algún momento han expresado el gen *Th* quedan permanentemente marcadas con la proteína verde fluorescente (**Figura R1**). Las cuantificaciones muestran que no hay diferencias entre la cantidad de células que expresan GFP entre los animales *Pbx1<sup>Th</sup>* y los controles (controles  $616 \pm 17$  células GFP+/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $628 \pm 48$  células GFP+/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales) (**Figura R8A-C**). Es decir, las células que han eliminado *Pbx1* y han quedado marcadas con GFP (*Th:CRE/RCE*) no mueren, sino que siguen estando en la PGL del BO, aunque sin expresar TH. Por consiguiente, en conjunto, estos resultados muestran que, aunque la acción temprana de *Pbx1* en neuroblastos en migración y progenitores es necesaria para la supervivencia de estas células (Grebbin et al., 2016), en estadios más tardíos no lo es para la supervivencia de las neuronas DA del BO.



Es importante mencionar también que observamos que todas las células TH positivas co-expresan GFP en los controles. Sin embargo, del total de células GFP (*Th:CRE/RCE*) tan solo el

## Resultados

58±3.9% de las células GFP positivas son TH positivas en los controles (**Figura 9**). Y, tal y como era de esperar, observamos una reducción considerable del número de células que co-expresan GFP y TH en los controles (19±2.5% TH+ GFP+/GFP+, n= 3 animales). Es decir, parece que en animales salvajes existe una población de células que en algún momento expresa el gen *Th* pero que posteriormente no maduran a células dopaminérgicas (positivas para la proteína TH). Resultados obtenidos por la Dra. Remesal muestran que estas células GFP positivas, pero TH negativas son GABAérgicas (expresan GAD67) pero no expresan marcadores de otras interneuronas del PGL como calbindina o calretinina. Desconocemos si representan una población de interneuronas electrofisiológicamente maduras o no.



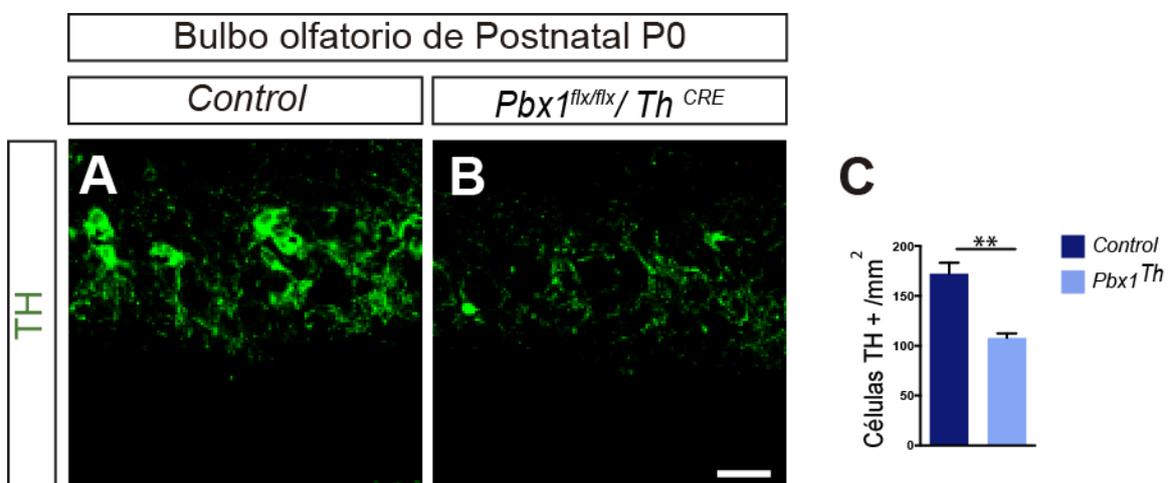
**Figura R9.** Los mutantes para *Pbx1* presentan una reducción en el número de células que coexpresan GFP y TH en comparación con animales control. Expresión de TH en células del linaje DA (GFP positivas) de animales control (A) y animales mutantes para *Pbx1*<sup>Th</sup> (B). C) Cuantificación del porcentaje de células GFP positivas que coexpresan TH en controles y en mutantes *Pbx1*<sup>Th</sup>. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.0012. Escala: 25  $\mu$ m. Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

### 3.3 PBX1 es necesario para la diferenciación tanto de las neuronas dopaminérgicas embrionarias, como de las generadas durante la etapa adulta

La población de neuronas DA del BO se clasifica en dos subpoblaciones que se diferencian en las propiedades morfológicas y electrofisiológicas. Estas dos poblaciones se generan en dos momentos distintos del desarrollo. Las neuronas dopaminérgicas generadas durante los estadios

embrionarios se caracterizan por un tamaño mayor, una morfología compleja y un axón largo con segmento inicial (AIS. Del inglés, *axon initial segment*). Mientras que el otro subtipo presenta un axón corto que carece de AIS y se generan durante la neurogénesis adulta (Galliano et al., 2018).

Con el objetivo de analizar el papel de PBX1 en las neuronas DA del BO generadas durante la etapa embrionaria, analizamos este tipo neuronal en animales mutantes neonatos. Para ello, se realizó una inmunohistoquímica frente TH en secciones coronales de BO de animales neonatos control y de mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* (**Figura R10**). La cuantificación de las imágenes de microscopía reveló que a día postnatal 0 (P0) los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* ya exhibían una reducción significativa en el número de neuronas DA del BO (controles  $172 \pm 8$  células TH+/mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $109 \pm 7$  células TH+/mm<sup>2</sup>, n=3 animales), confirmando así que PBX1 se requiere para la correcta diferenciación terminal de este tipo neuronal generado durante el periodo embrionario (**Figura R10**).



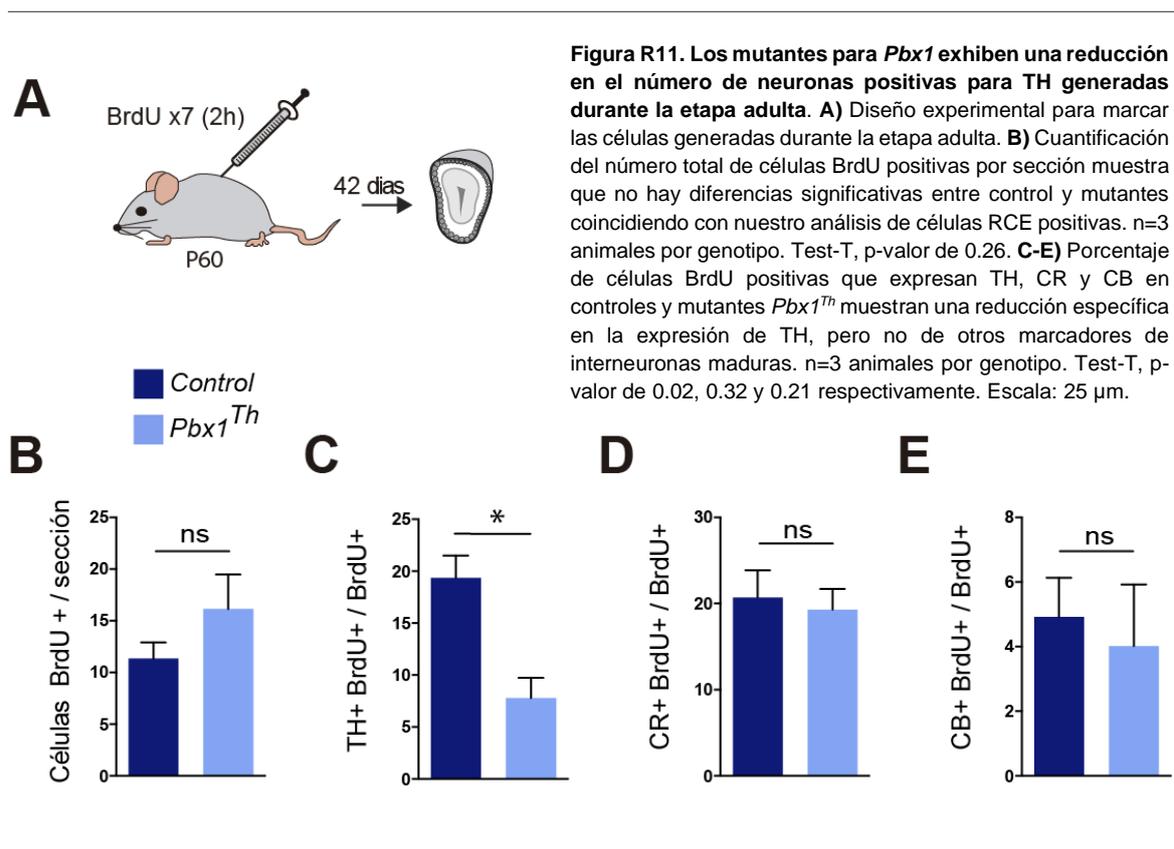
**Figura R10. Los mutantes para *Pbx1* exhiben una reducción en el número de neuronas DA generadas durante el periodo embrionario.** Expresión de TH en el día postnatal 0 (p0) en controles (A) y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* (B). C) Cuantificación del número de células TH positivas para cada genotipo. n=3 animales cada genotipo. Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.006.

En base a estos resultados, el descenso en el número de células TH positivas observado en adultos (**Figura R7**), podría ser debida únicamente a los defectos en la especificación de las neuronas DA generadas durante la etapa embrionaria. Para poder dilucidar si el fenotipo observado en adultos se debe únicamente al papel observado de *Pbx1* en la generación de neuronas DA durante la etapa embrionaria, o, por el contrario, si este FT también es importante en la generación del segundo subtipo dopaminérgico, analizamos directamente esta última subpoblación de neuronas.

## Resultados

Una de las maneras para analizar las neuronas generadas en un momento determinado, es la de incorporar una marca en el ADN de las células que se replican mediante la adición de un análogo de un nucleótido. Este análogo se encuentra marcado de manera que puede detectarse inmunohistoquímicamente con un anticuerpo específico, revelando las células que se generaron en el momento de las inyecciones del análogo. El más utilizado para experimentos *in vivo* es un análogo de la timina, la bromodeoxiuridina (BrdU).

Con el objetivo de analizar si PBX1 también es necesario en la diferenciación de las neuronas DA del BO de la etapa adulta, realizamos inyecciones de BrdU en animales controles y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*. Se administraron 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. Pasados 42 días de la última inyección, se procedió al sacrificio y procesamiento del material histológico (**Figura 11 A**).



El sacrificio se realizó tras 42 días de manera que las células de la SEZ 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 positivas.

Tal y como se muestra en la **Figura 11 B**, no se detectaron diferencias significativas entre el número de células BrdU positivas por sección analizada de animales control y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* (controles  $11 \pm 2$  células BrdU+/sección, n=3 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $16 \pm 3$  células BrdU+/sección, n=3 animales). Lo que confirma nuestros datos previos de que *Pbx1* no se necesita para la supervivencia de las células DA (**Figura R3 G-H**). Así mismo, sí que encontramos una reducción de la proporción de células positivas para BrdU y TH del total de células BrdU positivas en mutantes en comparación con los controles (controles  $19 \pm 2$  células TH+ BrdU+ / BrdU+, n=3 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $8 \pm 2$  células TH+ BrdU+ / BrdU+, n=3 animales), esto indica que *Pbx1* es también necesario en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas generadas en etapa adulta (**Figura R11 C**).

Como ya hemos descrito, además de las neuronas DA (que son también GABAérgicas), en la PGL encontramos otras dos poblaciones de interneuronas (IN) GABAérgicas que se generan durante toda la vida del animal: las IN CR y las CB. Estas 3 poblaciones son excluyentes, se generan en zonas diferentes de la SEZ y viajan juntas a través del RMS desde SEZ hasta el BO. Se observó que no existían diferencias significativas en la proporción de células CR+ y CB+ del total de células BrdU positivas entre animales control y mutantes (controles  $21 \pm 3\%$  CR+ BrdU+ /BrdU+ and  $5 \pm 1\%$  CB+ BrdU+ /BrdU+, n=3 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*:  $19 \pm 2\%$  CR+ BrdU+ /BrdU+ and  $4 \pm 2\%$  CB+ BrdU+ /BrdU+, n=3 animales) (**Figura R11 D-E**).

En conjunto, los resultados obtenidos indican un papel para PBX1 en la diferenciación de las dos poblaciones de neuronas DA del BO, tanto las generadas en el periodo embrionario como las generadas en la neurogénesis adulta. Además, la falta de función de PBX1 en el linaje dopaminérgico produce una disminución en la expresión de TH, sin embargo, estas células permanecen en el BO y no mueren.

## 4. PBX1 actúa posteriormente o en paralelo a otros factores de transcripción implicados en la especificación dopaminérgica

El alelo RCE que incorporamos en la cepa, nos permite marcar el linaje dopaminérgico y estudiar el efecto de la mutación de *Pbx1* en las células. Previamente a esta tesis, se han descrito otros FT necesarios para la correcta diferenciación de las neuronas DA, incluyendo los homólogos para los selectores terminales dopaminérgicos descritos en *C. elegans*, DLX2 y ETV1 (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010), así como COUP-TFF1, PAX6, y MEIS2 (Agoston et al., 2014; Bovetti et al., 2013; Hack et al., 2002; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007; Zhou et al., 2015). Por este motivo, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si PBX1 regulaba la expresión de alguno de estos FT.

Se realizaron triples inmunohistoquímicas para RCE/GFP marcando el linaje DA, TH y los factores de transcripción: COUP-TF1, ETV1, PAX6, panDLX (ya que no se dispone de un anticuerpo específico DLX2), y MEIS2 en secciones del BO de animales de 2 meses de edad controles (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) y mutantes para PBX1 (*Pbx1*<sup>fix/fix</sup>; RCE; TH-CRE). Se detallan a continuación los resultados obtenidos para cada FT.

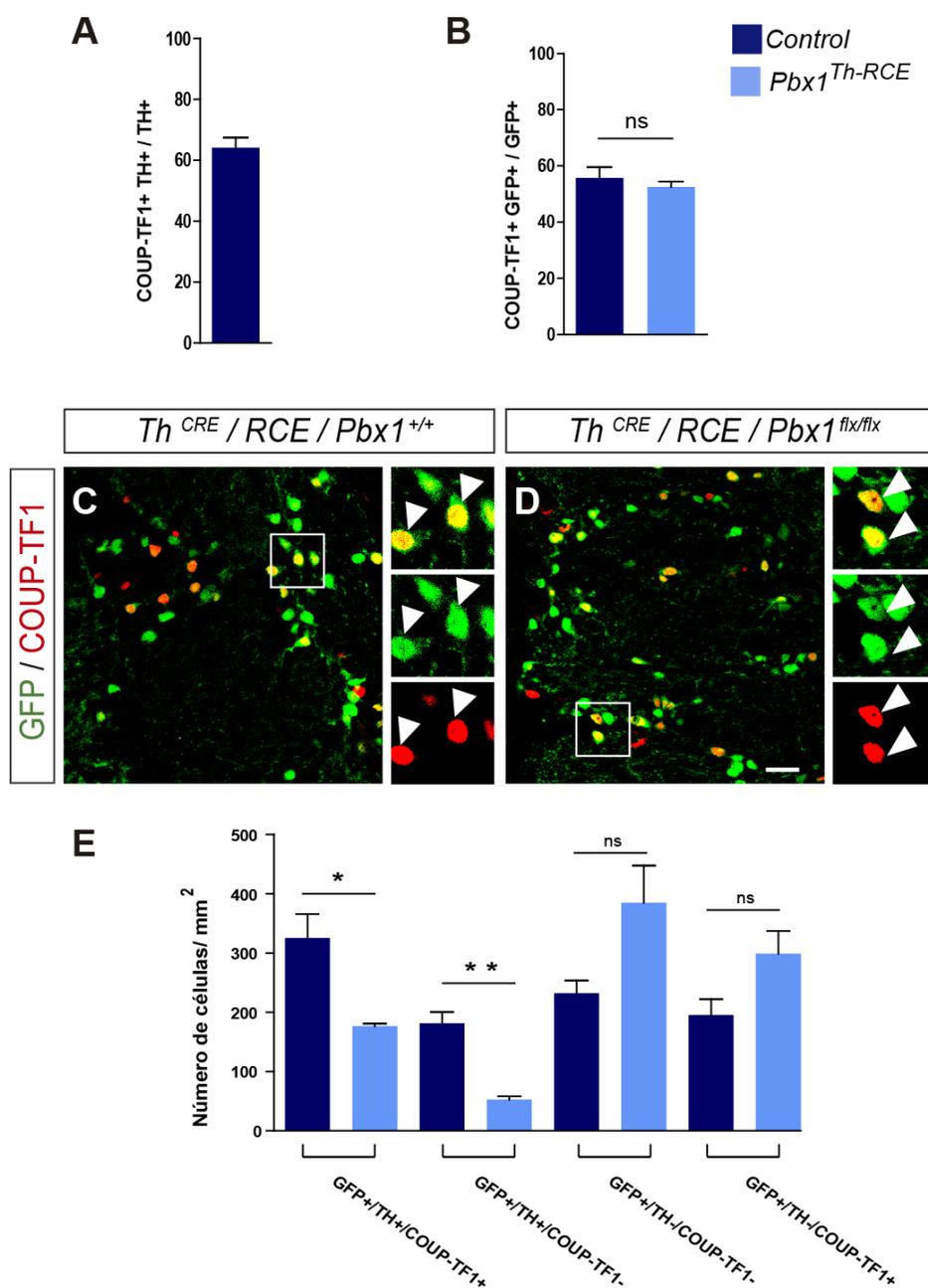
### 4.1 Análisis de la expresión de COUP-TF1 en mutantes *Pbx1*<sup>Th</sup>

COUP-TF1, también conocido como NR2F1, es un FT perteneciente a la familia de receptores nucleares de hormonas, se expresa en la PGL del BO. Estudios de privación del olor demostraron que, además de una reducción en la expresión de TH, como ya se conocía, la falta de estímulos olfativos 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 positivas (Bovetti et al., 2013). Estudios posteriores han confirmado que la inactivación de COUP-TF1 provoca la disminución de la expresión de *Th* y que esto genera un aumento de la expresión de COUP-TF2 en la SEZ, RMS o en la capa granular del BO. Es más, los mutantes para este FT presentan una acumulación ectópica de interneuronas CR positivas (Zhou et al., 2015).

En primer lugar, observamos que, en animales salvajes, alrededor de más de la mitad (64±3%) de las células TH positivas son COUP-TF1+ (**Figura R12 A**). En segundo lugar, los resultados del análisis de expresión de COUP-TF1 en mutantes *Pbx1*<sup>Th</sup> revelan que la expresión de este factor de transcripción es independiente a la actividad de *Pbx1*, puesto que no encontramos diferencias significativas en la expresión de COUP-TF1 entre las células que han eliminado PBX1 y las que no (controles 56±4 células COUP-TF1+ GFP+/ GFP+, n=3 animales; *Pbx1*<sup>Th</sup> 53±2 células COUP-TF1+ GFP+/ GFP+, n=3 animales) (**Figura R12 B-D**). Por otro lado, cuando comparamos los controles con los mutantes, observamos que estos últimos exhiben una reducción en el número de células que co-expresan las tres proteínas (controles 325±40 células

GFP+ TH+ COUP-TF1+/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx1*<sup>Th</sup> 177±4 células GFP+ TH+ COUP-TF1+/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales) como consecuencia de la disminución del número de TH+, mientras que no se ve afectado el número de células que expresan únicamente GFP (controles 232± 21 células GFP+ TH- COUP-TF1-/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx1*<sup>Th</sup> 385±63 células GFP+ TH- COUP-TF1-/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales) (**Figura R12 E**).

Además, los mutantes para *Pbx1* presentan un menor número tanto de células GFP+/TH+/ COUP-TF1- (controles 182±16 células GFP+ TH+ COUP-TF1-/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales; *Pbx1*<sup>Th</sup> 53± 6 células GFP+ TH+ COUP-TF1-/ mm<sup>2</sup>, n=3 animales) como de células GFP+/TH+/ COUP-TF1+ (**Figura 12 E**). Esto sugiere que *Pbx1* es necesario para la diferenciación de las dos subpoblaciones de neuronas DA TH positivas, las que son positivas para COUP-TF1 y las que no.

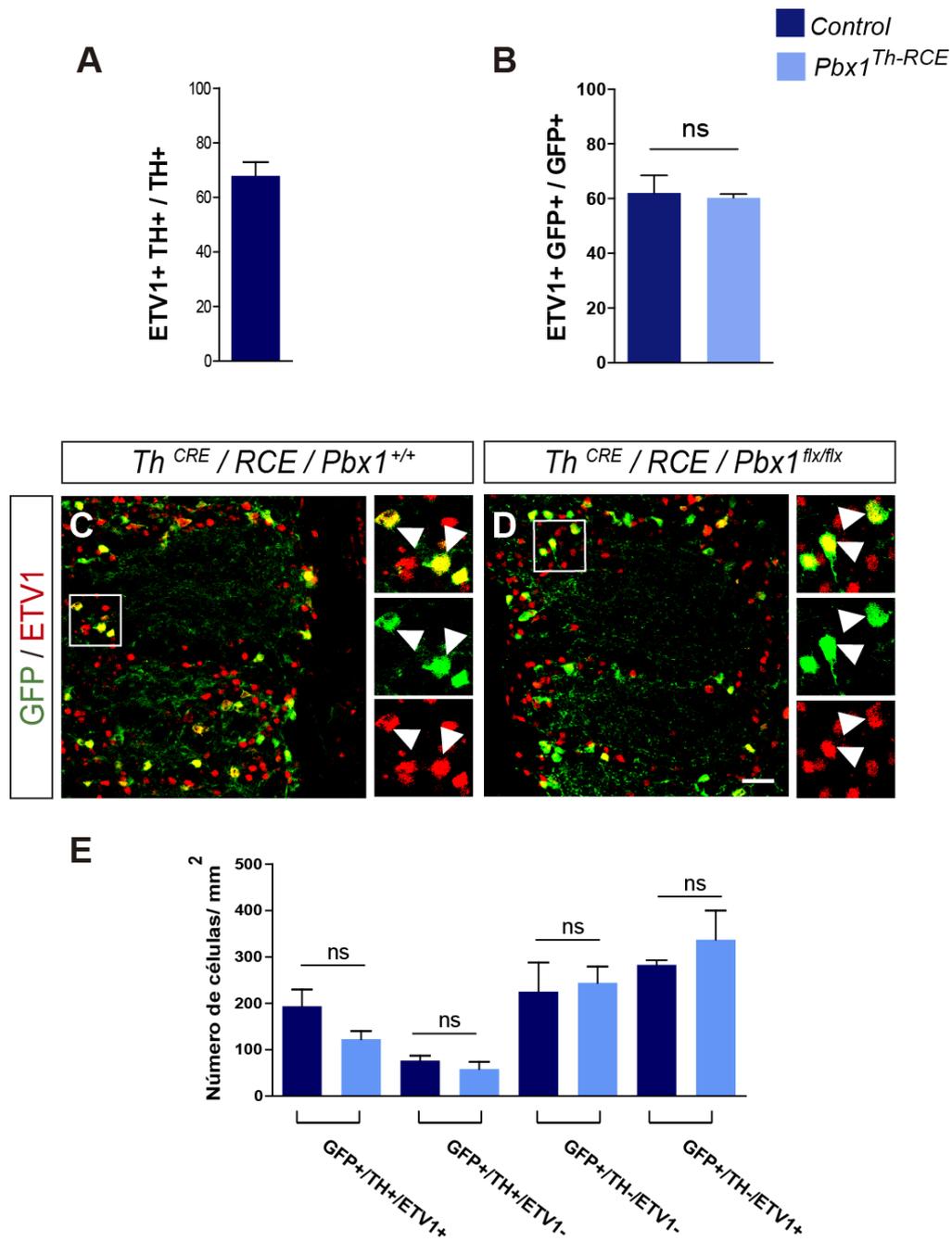


**Figura R12. La expresión de COUP-TF1 no se ve afectada por la eliminación de *Pbx1*.** **A)** Cuantificación del número de células DA (TH positivas) que expresan COUPTF-1 en animales control. n=3 animales. **B)** Porcentaje de células GFP positivas del linaje DA (RCE,ThCRE) que coexpresan COUPTF-1 en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.49. **C, D)** Expresión de COUP-TF1 en las células del linaje DA en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. Escala: 25  $\mu$ m. **E)** Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o COUP-TF1+/COUP-TF1- de la PGL. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.02, 0.003, 0.08, 0.09 respectivamente. Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

## 4.2 Análisis de la expresión de ETV1 en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*

ETV1 (también conocido como ER81) se expresa en las neuronas DA del BO así como otras neuronas de la PGL, tal y como se muestra en la **Figura R13 A-D**. Anteriormente se ha descrito su implicación en el correcto desarrollo de este tipo neuronal, puesto que los mutantes nulos para ETV1 exhiben una dramática reducción en el número de células TH+ en la región PGL del BO. Además, este factor activa directamente la región *cis* reguladora del locus de *Th* in vitro (Flames & Hobert, 2009). Posteriormente al estudio anterior, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina confirmaron la unión de ETV1 a una región cercana al promotor de *Th* (Cave et al., 2010). Así mismo, el homólogo en *C elegans*, AST-1, es considerado un selector terminal del fenotipo dopaminérgico en esta especie (Doitsidou et al., 2013).

En primer lugar, determinamos que más de un 70% ( $67 \pm 5$ ) de las células TH expresan ETV1 en animales salvajes (**Figura R13A**). En la comparativa del linaje DA con animales mutantes, las imágenes de microscopía confocal muestran que, al igual que COUP-TF1, no existen diferencias significativas en la expresión de ETV1 entre las células que han eliminado PBX1 y las que no (controles  $62 \pm 6$  células ETV1+ GFP+/ GFP+, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>*  $60 \pm 1$  células ETV1+ GFP+/ GFP+, n=3 animales) (**Figura R13 B-D**). Por lo tanto, la expresión de ETV1 no parece estar controlada por PBX1. Sorprendentemente, aunque se observa una tendencia a disminución en células que coexpresan las tres proteínas en los mutantes (controles  $194 \pm 36$  células GFP+ TH+ ETV1+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>*  $126 \pm 18$  células GFP+ TH+ ETV1+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales) esta no es significativa, debido a la variabilidad entre individuos (**Figura R13 E**). Respecto a las células GFP+/TH+/ETV1-, la disminución en mutantes es apenas imperceptible debido, probablemente, al pequeño porcentaje de células Th que son negativas para ETV1 tanto en controles como en mutantes (controles  $76 \pm 11$  células GFP+ TH+ ETV1- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>*  $58 \pm 15$  células GFP+ TH+ ETV1- / mm<sup>2</sup>, n=3 animales). Alternativamente, esto podría sugerir que en los mutantes *Pbx1*, a diferencia de lo que ocurre con COUPTF1, se ven más afectadas las células dopaminérgicas que expresan ETV1 que las que no lo expresan.

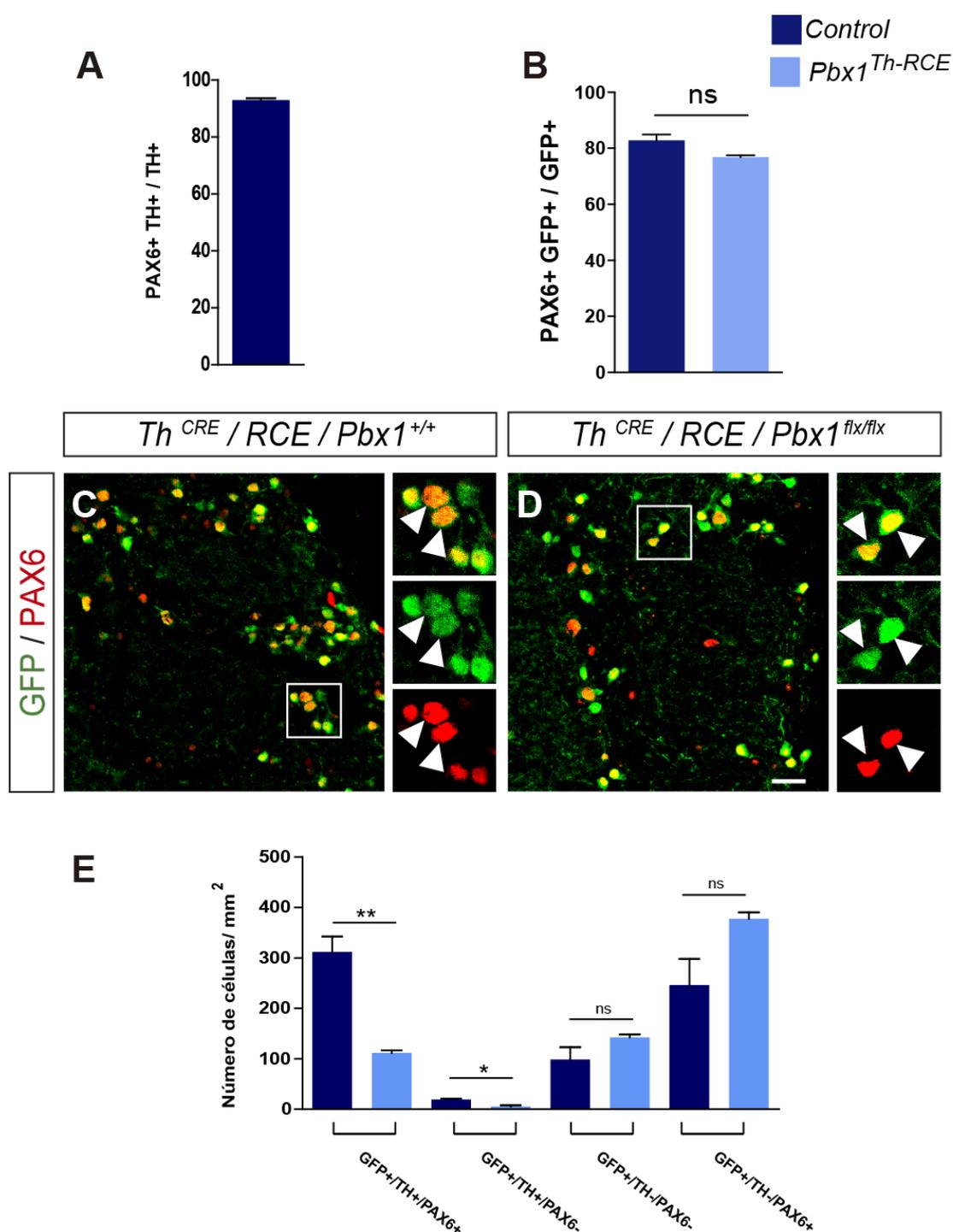


**Figura R13. La expresión de ETV1 no se ve afectada por la eliminación de *Pbx1*.** **A)** Cuantificación del número de células que expresan ETV-1 del total de células DA (TH positivas) en animales control. n=3 animales. **B)** Porcentaje de células GFP positivas que co-expresan ETV1 en controles y en mutantes *Pbx1*<sup>Th-RCE</sup>. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.80. **C, D)** Expresión de ETV1 en las células del linaje DA en controles y mutantes *Pbx1*<sup>Th-RCE</sup>. Escala: 25  $\mu$ m. **E)** Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o ETV1+/ETV1- de la PGL. n=3 animales por genotipo. Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.15, 0.38, 0.80, 0.43 respectivamente. Puntas de flecha blancas indican co-localización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

### 4.3 Análisis de la expresión de PAX6 en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*

Por su parte, PAX6 es un FT que se expresa tanto en la capa granular como en la PGL del BO (Dellovade y Pfaff, 1998; Stoykova y Gruss, 1994), como en la mayoría de progenitores de la SEZ y únicamente en una subpoblación de neuroblastos migradores en cerebro adulto (Kohwi et al., 2007). Ejerce un papel clave en la supervivencia y generación de los precursores neuronales así como la correcta adquisición del fenotipo DA (Hack et al., 2005; Ninkovic et al., 2010). Además, los mutantes heterocigotos para *Pax6* (*Pax6<sup>Sey/+</sup>*) muestran una reducción en el número de células DA en la PGL (Dellovade y Pfaff, 1998). Por este motivo, decidimos analizar si *PBX1* ejerce algún efecto en la expresión de este FT.

Nuestros experimentos muestran que, en controles, el 93% de las neuronas DA expresan PAX6 (93±0.6 células PAX6+ TH+/ TH+) (**Figura R14 A**). Por otra parte, los análisis revelan que el 80% de las células del linaje dopaminérgico (GFP) co-localizan con el FT en controles y este porcentaje no cambia significativamente entre controles y mutantes (controles 83±2 células PAX6+ GFP+/ GFP+, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 77±0.7 células ETV1+ GFP+/ GFP+, n=3 animales), de modo que *Pbx1* no es necesario para la expresión de PAX6 (**Figura R14 B-D**). Como era de esperar, los mutantes para *Pbx1* exhiben una reducción en el número de células GFP+/TH+/PAX6+ debido a la disminución en el número de células TH+ (controles 312±30 células GFP+ TH+ PAX6+ /mm<sup>2</sup> y 19±2 células GFP+ TH+ PAX6- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 111±5 células GFP+ TH+ PAX6+ / mm<sup>2</sup> y 5±3 células GFP+ TH+ PAX6- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales). Esto va acompañado de una tendencia al incremento del número de células GFP+/TH-/ PAX6+ en mutantes (controles 245±52 células GFP+ TH- PAX6+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 377±12 células GFP+ TH- PAX6+ / mm<sup>2</sup>, n=3 animales) que no llega a ser significativa debido a la variabilidad exhibida por los controles (**Figura R14 E**). Además, también existe una reducción significativa en el número de células GFP+/TH+/PAX6- en mutantes lo que sugiere que *Pbx1* regula tanto la diferenciación DA en neuronas PAX6 positivas como en el pequeño porcentaje de células DA que no expresan PAX6.



**Figura R14. La expresión de PAX6 no se ve afectada por la eliminación de *Pbx1*.** **A)** Cuantificación del número de células que expresan PAX6 del total de células DA (TH positivas) en animales control. n=3 animales. **B)** Porcentaje de células GFP (*RCE/Th<sup>CRE</sup>*) positivas que co-expresan PAX6 en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.06. **C, D)** Expresión de PAX6 en las células del linaje DA en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. Escala: 25  $\mu$ m. **E)** Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o PAX6+/PAX6- de la PGL. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.028, 0.01, 0.16, 0.07 respectivamente. Puntas de flecha blancas indican co-localización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

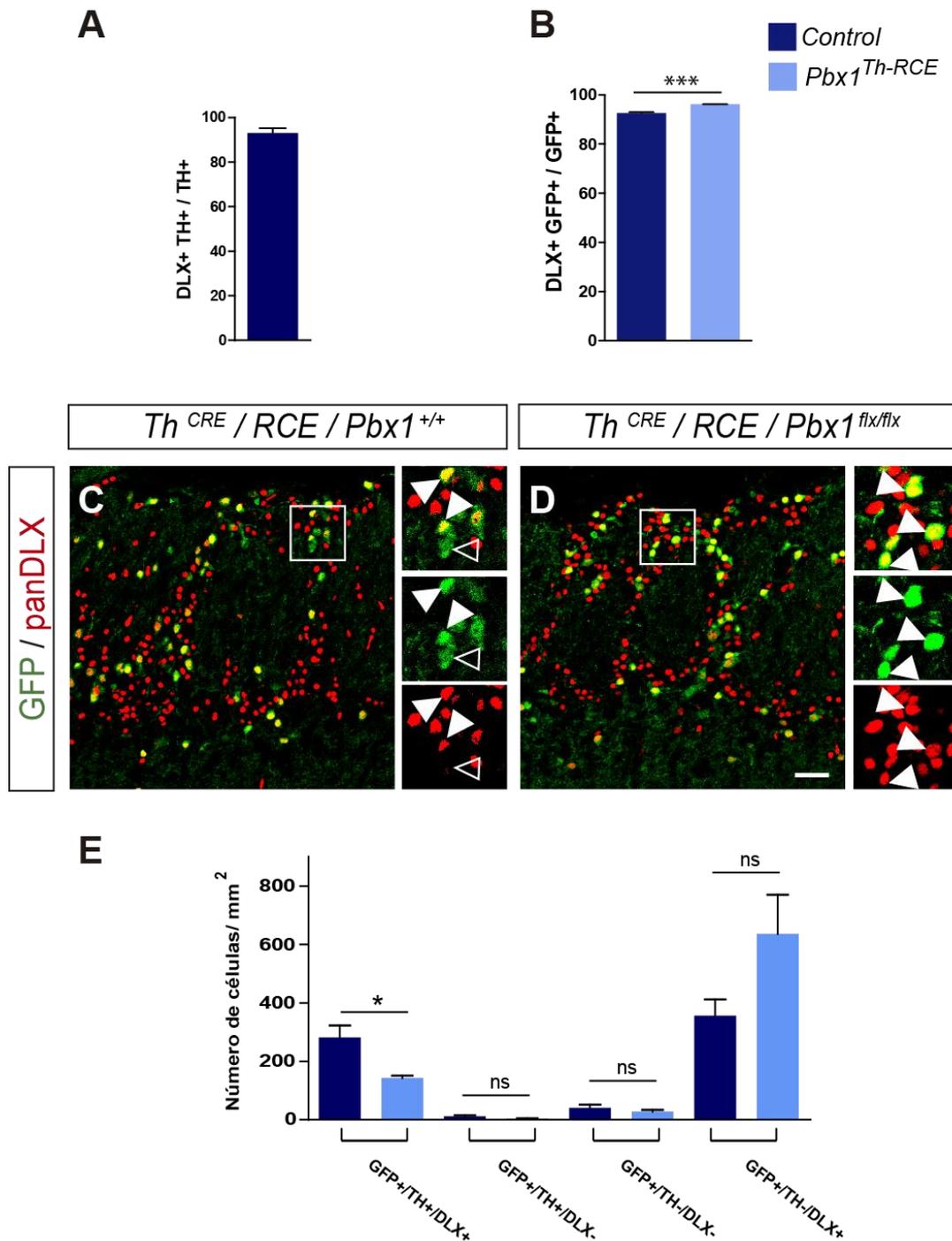
#### 4.4 Análisis de la expresión de panDLX en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*

Estudios de hace más de dos décadas dilucidaron el papel de la familia de FT *Distal-less*, incluidos en los genes *homeobox*, en el desarrollo del sistema nervioso (Qiu et al., 1995). Más adelante, mediante el uso de vectores retrovirales, se demostró que tanto DLX1 como DLX2 son necesarios en la neurogénesis de las interneuronas del BO, entre las que se incluyen las neuronas DA. Además, la especificación de este tipo neuronal, requiere de la acción conjunta de DLX2 con PAX6 (Brill et al., 2008). A estos datos cabe añadir que el homólogo en *C. elegans*, CEH-43, es considerado un selector terminal del fenotipo dopaminérgico en esta especie (Doitsidou et al., 2013). Por esta razón, y puesto que uno de nuestros objetivos es determinar si PBX1 es un selector terminal de las neuronas DA del BO de ratón, quisimos estudiar si este PBX1 ejerce algún tipo de regulación sobre otro de los selectores terminales como es DLX2.

Debido a que, en nuestras manos, no conseguimos obtener una buena inmunohistoquímica con los anticuerpos específicos para DLX2. Realizamos el estudio con un anticuerpo panDLX, que reconocía todos los genes de la familia *distal less*, incluido *Dlx1*, 2, 5, 6 que se expresan en el BO.

En primer lugar, determinamos que en ratones salvajes la gran mayoría de células TH (93±2 %) expresan algún factor DLX (**Figura R15 A**). Sorprendentemente encontramos un aumento de células positivas para DLX y GFP en mutantes, a pesar de que la diferencia en el número de células que coexpresan DLX y GFP entre ambos genotipos es muy pequeña (controles 93±0.3 células DLX+ GFP+/ GFP+, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 96±0.04 células DLX+ GFP+/ GFP+, n=3 animales), la estadística considera estas cifras estadísticamente significativa (**Figura R15 B-D**), aunque no estamos seguros de que estos resultados se deban a las diferencias reales entre las condiciones dado que la variabilidad de estos recuentos es muy inferior a la encontrada en el resto de recuentos realizados o de que en cualquier caso tengan alguna relevancia biológica.

Por otro lado, tal y como era de esperar, se observa una reducción en el número de células positivas para los tres marcadores debido a la disminución de neuronas DA en los mutantes (controles 281±41 células GFP+ TH+ DLX6+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 143±8 células GFP+ TH+ DLX+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales), acompañada con una tendencia a un mayor número de células GFP+/TH- /DLX+ (controles 356±56 células GFP+ TH- DLX6+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 635±134 células GFP+ TH- DLX+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales). Por último, el número de células GFP+/TH+/DLX- y GFP+/TH-/DLX- no se ve alterado en estos mutantes (controles 11±3 células GFP+ TH+ DLX- /mm<sup>2</sup> y 40±11 células GFP+ TH- DLX- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th</sup>* 4±0.7 células GFP+ TH+ DLX- /mm<sup>2</sup> y 27±6 células GFP+ TH- DLX- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales). (**Figura R15 E**). Estos resultados indican que, de forma similar a lo encontrado con *Etv1*, *Pbx1* afecta la expresión de TH mayoritariamente en células que expresan DLX, pero no en el escaso número de células que carecen de este factor. Nuestros resultados de nuevo apoyan la hipótesis de que estos tres factores, al igual que ocurre en *C. elegans* actúan en paralelo para activar la expresión de *Th*.



**Figura R15. La expresión de los FTs DLX no se ve afectada por la eliminación de *Pbx1*.** **A)** Cuantificación del número de células que expresan DLX del total de células DA (TH positivas) en animales controles  $n=3$  **B)** Porcentaje de células GFP positivas (RCE/Th<sup>CRE</sup>) que coexpresan DLX en controles y en mutantes *Pbx1*<sup>T-RCEh</sup>.  $n=3$  animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.0007. **C, D)** Expresión de DLX en las células del linaje DA en controles y mutantes *Pbx1*<sup>T-RCEh</sup>. Escala: 25  $\mu$ m. **E)** Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o DLX+/DLX- de la PGL.  $n=3$  animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.03, 0.1, 0.38, 0.13 respectivamente. Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

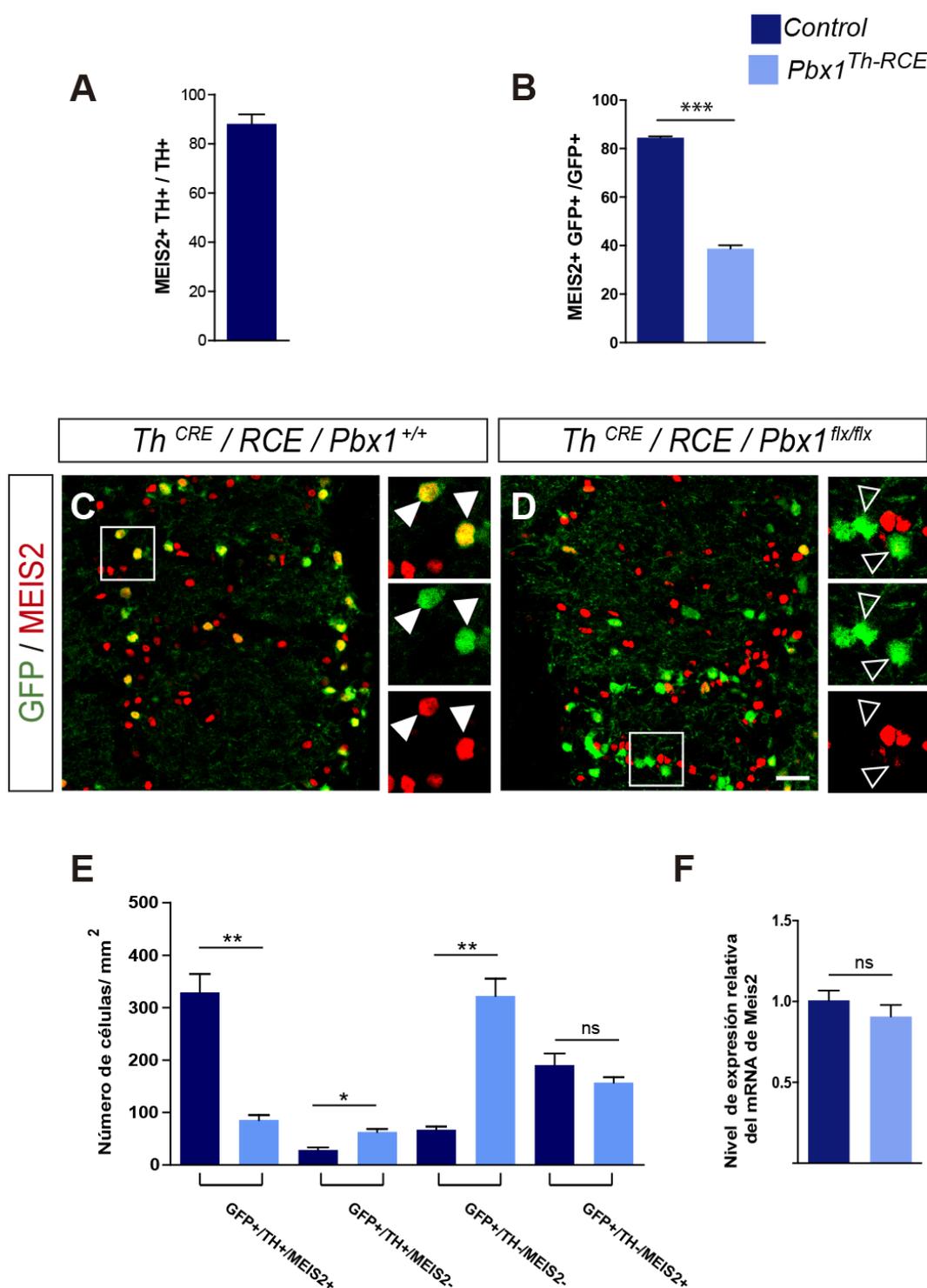
#### 4.5 Análisis de la expresión de MEIS2 en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*

MEIS2 se expresa en los neuroblastos de la SEZ y del RMS, así como en algunas interneuronas del BO. El bloqueo de la expresión de *Meis2* mediante retrovirus en los neuroblastos migradores de la RMS produce una reducción de la población DA del BO. Además, parece que MEIS2 participa junto con PAX6 de forma directa en la regulación de la expresión de *Th* y de *Dcx* (Agoston et al., 2014). Además, los factores MEIS actúan conjuntamente con los factores PBX en la especificación de muchos tejidos (Longobardi et al., 2014). Dada la importancia de este FT en la diferenciación DA y los datos previos de interacción de MEIS2 con PBX1 decidimos analizar su expresión en los mutantes para *Pbx1*.

Tal y cómo muestra la **Figura R16 A**, la mayoría de células TH positivas, expresan también MEIS2 en controles (88±4%). A diferencia del resto de FT analizados, las células en las que eliminamos PBX1 exhiben un descenso drástico en la expresión de MEIS2 (controles 84±0.6 células MEIS2+ GFP+/ GFP+, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* 39±1 células MEIS2+ GFP+/ GFP+, n=3 animales), lo que sugiere que PBX1 es necesario para la transcripción o estabilidad de MEIS2 (**Figura R16 B-D**). Así mismo, en los mutantes para *Pbx1* se observa una disminución en el número de células que co-expresan los tres marcadores (controles 329±35 células GFP+ TH+ MEIS2+ /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* 86±10 células GFP+ TH+ MEIS2+ / mm<sup>2</sup>, n=3 animales) acompañado de un aumento de las células GFP+/TH+/MEIS2- (controles 29±5 células GFP+ TH+ MEIS2- /mm<sup>2</sup>, n=3 animales, *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* 63±6 células GFP+ TH+ MEIS2- / mm<sup>2</sup>, n=3 animales) que corrobora un efecto de PBX1 en expresión tanto de *Th* como de *Meis2*.

Estudios anteriores indican que cuando PBX1 y MEIS2 se co-expresan en la misma célula actúan como un complejo proteico (Longobardi et al., 2014). Se ha publicado que, en diferentes tejidos y organismos, los FT PBX y MEIS interaccionan físicamente para co-regular la expresión de muchos genes diana (Penkov et al., 2013). Es más, en estudios sobre tumorigénesis se ha observado como en ausencia de PBX1 la estabilidad de MEIS1 disminuye y estudios en leucemia describen que PBX3 inhibe la ubiquitinación de MEIS1 (Dardaei, Longobardi, y Blasi, 2014; Garcia-Cuellar, Steger, Füller, Hetzner, y Slany, 2015). Sin embargo, no se ha reportado previamente que ningún factor PBX regule la transcripción de factores *Meis*.

Para estudiar si el descenso que observábamos a nivel de proteína en MEIS2 (**Figura R16 B-D**) se debía a defectos en la proteína MEIS2 y o a la transcripción del gen, realizamos un análisis de los niveles de mRNA de *Meis2* en mutantes y controles. Tal y como se muestra en la **Figura R16 F**, los niveles de expresión del mensajero no se ven alterados en los mutantes de *Pbx1* (controles 1±0.06, n=4 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>* 0.91±0.07 n=3 animales) Esto nos da a entender que la disminución en los niveles de proteína se debe al aumento de la degradación de la proteína, tal y como se ha reportado en otros contextos, de modo que PBX1 no regula la expresión de MEIS2 en el linaje DA pero sí su estabilidad. Alternativamente este defecto podría deberse a déficits en la traducción de *Meis2* mRNA, sin embargo, no se ha descrito que los factores PBX regulen directamente la traducción de un gen.



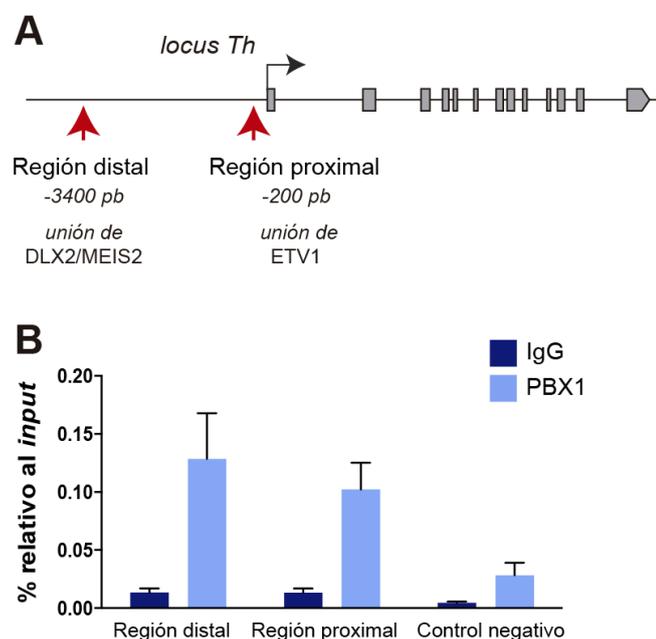
**Figura R16. PBX1 no regula la transcripción de MEIS2 en el linaje DA, pero sí su traducción y/o estabilidad. A)** Cuantificación del número de células que expresan MEIS2 del total de células DA (TH positivas) en animales control. n=3 animales. **B)** Porcentaje de células GFP positivas (RCE/Th<sup>CRE</sup>) que coexpresan MEIS2 en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor <0.001. **C, D)** Expresión de MEIS2 en las células del linaje DA en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. Escala: 25  $\mu$ m. **E)** Cuantificación del número promedio de células positivas para GFP y/o TH+/TH- y/o MEIS2+/MEIS2- de la PGL. n=3 animales por genotipo. Test-T, p-valor de 0.002, 0.01, 0.002, 0.24 respectivamente. **F)** Niveles de expresión de mRNA de *Meis2* en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* cuantificados mediante qRT-PCR. n=4 animales (controles) y n=3 animales (*Pbx1<sup>Th</sup>*). Test-T no pareado de dos colas, p valor de 0.34. Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

## 5. PBX1 actúa como un selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio.

Los estudios en *C. elegans* mostraron que CEH-20, actúa como selector terminal de las neuronas DA de este modelo animal (Doitsidou et al., 2013), es decir CEH-20 activa de forma directa la transcripción de la batería de genes efectores de las neuronas dopaminérgicas. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la regulación de la diferenciación dopaminérgica neuronal terminal esta conservada desde los nemátodos a los mamíferos, de modo que PBX1 sería el homólogo funcional de CEH-20. Por consiguiente, PBX1 debe cumplir las características establecidas para un selector terminal. Tal y como se ha comentado en la introducción, un selector terminal es un FT o combinación de varios que inicia y mantiene la expresión de genes efectores, de manera que debe unirse directamente a ellos para regularlos.

Previamente al estudio sobre la expresión de los genes de la vía de la dopamina, en nuestro laboratorio la Dra. Miren Maicas llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para estudiar si PBX1 se une al promotor de la *Th*. Los resultados indican que PBX1 se une a dos regiones, tanto a la que se une DLX y MEIS2 referida como región distal (situada 3400 pb antes del condón de iniciación de *Th*), como a la que se une ETV1 referida como región proximal (situada 200 pb antes del condón de iniciación de *Th*) (**Figura R17**). Por esta razón, PBX1 podría formar parte del conjunto de FT selectores terminales de la DA, junto con MEIS2, DLX y ETV1, de manera muy similar a la forma en la que describió para *C. elegans* con los FT homólogos (Doitsidou et al., 2013). Además, el hecho de que PBX1 se una a ambas regiones (**Figura R17 B**) sugiere que la unión de este FT podría mediar la correcta interacción física entre el promotor y el potenciador (enhancer) distal de *Th*.

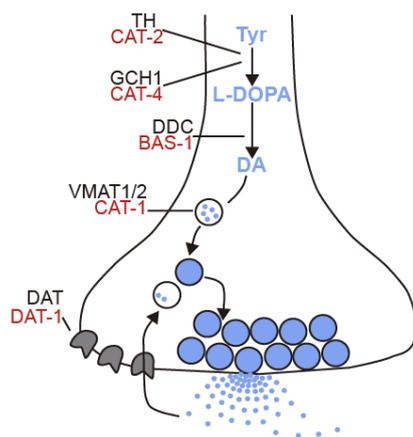
**Figura R17. PBX1 se une a la región distal y proximal de la región reguladora de la tirosina hidroxilasa. A)** Representación esquemática de los sitios de unión de MEIS2, ETV1 y DLX en el locus de la tirosina hidroxilasa. **B)** El ChIP qPCR de tejido de bulbo olfatorio muestra la unión de PBX1 a ambas regiones. La especificidad de la unión de PBX1 se testó con la región de unión negativa *untr 17*. Datos obtenidos por la Dra. Miren Maicas.



## 5.1 Los mutantes de *Pbx1* presentan una reducción en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de dopamina

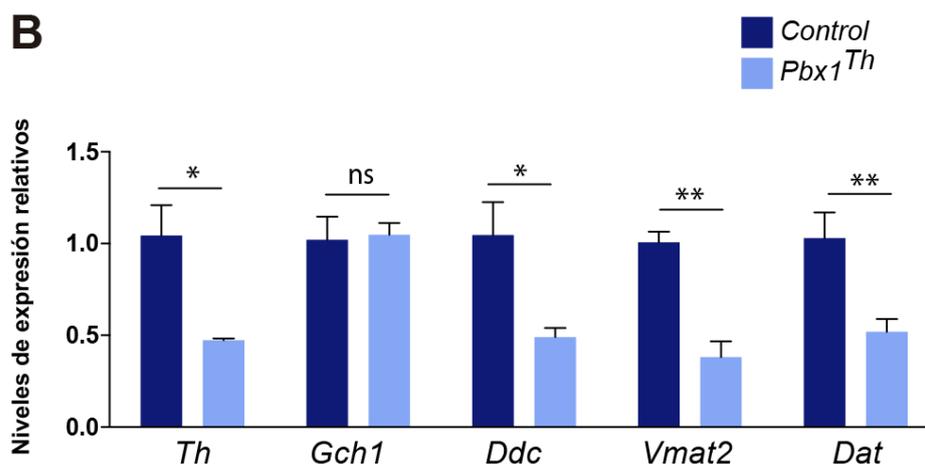
Tal y como se ha comentado anteriormente, los selectores terminales se caracterizan por regular los genes necesarios para la especificación del subtipo neuronal. Los genes implicados en la adquisición del fenotipo DA son los conocidos como “genes de la vía de la dopamina”. Los principales genes que constituyen la vía son: por un lado, las enzimas implicadas en la síntesis de la dopamina, codificadas por tirosina hidroxilasa (*Th*), GTP ciclohidroxilasa1 (*Gch1*) y la descarboxilasa aromática de aminoácidos L (*Ddc*). Por otro lado, el transportador vesicular de monoaminas (*Vmat2*), que es el transportador encargado de formar las partículas que contienen el neurotransmisor. Mientras que el transportador de DA, (*Dat*), por su parte, es el responsable de la recaptación de dopamina del medio extracelular para su reutilización (**Figura R18 A**) (Flames y Hobert, 2011). Los genes de la vía de la dopamina están muy conservados evolutivamente y en *C. elegans* CEH-20/PBX es necesario para la correcta expresión de “los genes de la vía de la dopamina” en este organismo, de manera que cumple las funciones de selector terminal. Por esta razón quisimos estudiar los niveles de expresión de los genes mencionados en animales *Pbx1<sup>Th</sup>*.

### A Ruta de biosíntesis de la dopamina



**Figura R18. Los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* exhiben unos niveles reducidos de mRNA de los genes de la vía de la dopamina. A)** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de la dopamina. Los nombres de los genes de ratón figuran en negro, mientras que los de *C. elegans* figuran en rojo. TH/CAT-2, tirosina hidroxilasa; GCH1/CAT4, GTP ciclohidroxilasa 1; DDC/BAS-1, descarboxilasa aromática de aminoácidos L; VMAT/CAT-1, transportador de monoaminas vesicular; DAT/DAT-1, transportador de dopamina; Tyr, Tirosina; L-DOPA, L-dopamina; DA, dopamina. **B)** Niveles de expresión de mRNA de los genes de la ruta de biosíntesis de la dopamina en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* cuantificados mediante qRT-PCR. n=4 animales (controles) y n=3 animales (*Pbx1<sup>Th</sup>*). Test-T no pareado de dos colas, p valor de 0.034 (*Th*), 0.88 (*Gch1*), 0.049 (*Ddc*), 0.002 (*Vmat2*), 0.003 (*Dat*).

### B



## Resultados

*Ddc*, *Gch1*, *Vmat2* y *Dat*, se expresan en niveles muy bajos en comparación con las poblaciones DA hipotalámicas y del mesencéfalo, debido a lo cual no son detectables mediante tinción inmunohistoquímica o hibridación *in situ* (Weihe, Depboylu, Schütz, Schäfer, & Eiden, 2006). En el BO de ratón, estos genes se expresan únicamente en las neuronas DA, de manera que cuantificamos los niveles de mRNA del BO de estos genes mediante qRT-PCR.

Como era de esperar y en consonancia con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, los animales *Pbx1<sup>Th</sup>* presentan unos niveles de mRNA de *Th* reducidos significativamente en comparación con los animales control (control  $1 \pm 0.2$ , n=4 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $0.5 \pm 0.01$ , n=3 animales, niveles de expresión relativa), corroborando el papel de *Pbx1* en la transcripción del gen *Th*. Así mismo, los niveles de *Ddc*, *Vmat2* y *Dat* también se encuentran significativamente disminuidos en los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* (controles *Ddc*  $1 \pm 0.2$ , *Vmat2*  $1 \pm 0.1$ , *Dat*  $1 \pm 0.1$ , n=4 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>* *Ddc*  $0.5 \pm 0.05$ , *Vmat2*  $0.4 \pm 0.1$ , *Dat*  $0.5 \pm 0.1$ , n=3 animales, niveles de expresión relativa), mientras que los de *Gch1* no se ven alterados (controles  $1 \pm 0.1$ , n=4 animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $1 \pm 0.1$ , n=3 animales, niveles de expresión relativa) (**Figura R18 B**). En conjunto, estos datos respaldan el papel de PBX1 como un selector terminal de las neuronas DA.

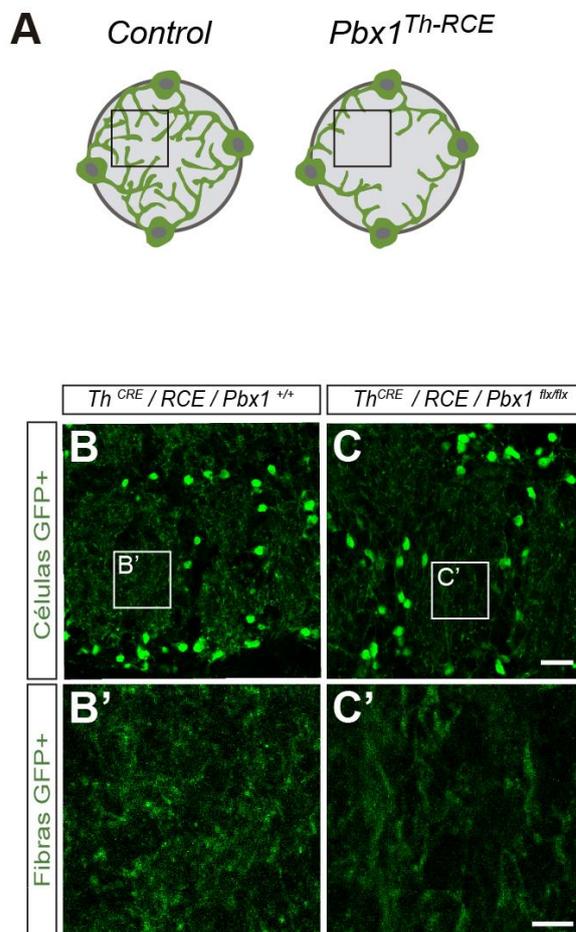
## 6. PBX1 tiene un papel en la maduración morfológica de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio

Tal y como hemos comentado previamente, tanto en *C elegans* como en mamíferos, está bien descrito que los selectores terminales tienen un papel directo en la regulación transcripcional de los genes efectores específicos del subtipo neuronal (Flames & Hobert, 2011). Sin embargo, no queda claro si pueden ejercer también un papel en la regulación de otras características madurativas de las células, como pueden ser la morfología celular o las proyecciones dendríticas. Algunos estudios recientes apuntan a que este puede ser el caso. Por ejemplo, *Lmx1b*, considerado uno de los selectores terminales de las neuronas serotoninérgicas, es igualmente responsable de la correcta arborización de estas neuronas (Donovan et al., 2019). Del mismo modo, *Fezf2* es responsable de la correcta diferenciación de las neuronas motoras corticoespinales del ratón, controlando la activación de los genes responsables de la identidad de ese tipo neuronal así como sus proyecciones neuronales (Chen, Schaevitz, & McConnell, 2005; Lodato et al., 2014). En base a estos resultados, nos propusimos explorar si la morfología de las neuronas dopaminérgicas está afectada en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*.

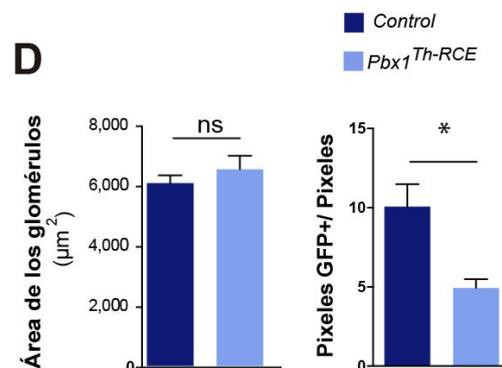
### 6.1 Los mutantes de *Pbx1<sup>Th</sup>* exhiben una reducción en la densidad de fibras dopaminérgicas en el interior de los glomérulos

Durante los estudios inmunohistoquímicos de la expresión de los FT con la cepa mutante para PBX1 (*Pbx1<sup>Th-CRE</sup>*) captó nuestra atención una ligera disminución de las fibras GFP positivas

(*Th:CRE/RCE*) en el interior de los glomérulos de los mutantes (**Figura R19 A-C**). Por consiguiente, decidimos realizar un análisis de estas fibras mediante la cuantificación de los niveles de GFP en el interior de los glomérulos. Las diferencias observadas a simple vista fueron confirmadas con estos estudios, puesto que tal y como muestra la **Figura R19 D**, las cuantificaciones revelan que los pixeles GFP positivos en la misma área se ven disminuidos significativamente en los animales *Pbx1<sup>Th</sup>* en comparación con los controles (controles  $10 \pm 1.4\%$  pixeles GFP positivos por campo,  $n=3$  animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $5 \pm 0.5\%$  pixeles GFP positivos por campo,  $n=3$  animales). Dado que el número de células GFP positivas en los glomérulos no varía entre los dos genotipos de estudio (controles  $616 \pm 17$  células GFP+ /mm<sup>2</sup>,  $n=3$  animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $628 \pm 48$  células GFP+ /mm<sup>2</sup>,  $n=3$  animales) (**Figura R19**), que el nivel de expresión de GFP una vez actúa la CRE es controlada bajo un promotor ubicuo fuerte (pCAG) y que el área de los glomérulos no varía en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* (controles  $6050 \pm 267$  μm<sup>2</sup>,  $n=3$  animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*  $6514 \pm 448$  μm<sup>2</sup>,  $n=3$  animales) (**Figura R19 D**), la explicación más plausible de la reducción observada de fibras GFP se deba a defectos morfológicos en las neuronas dopaminérgicas deficientes en *Pbx1*.

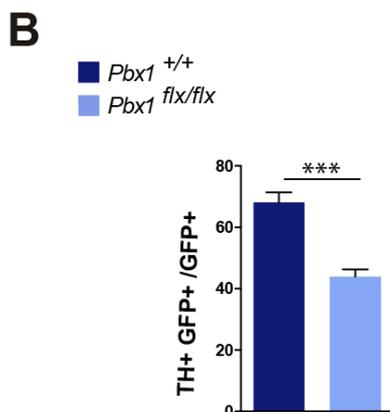
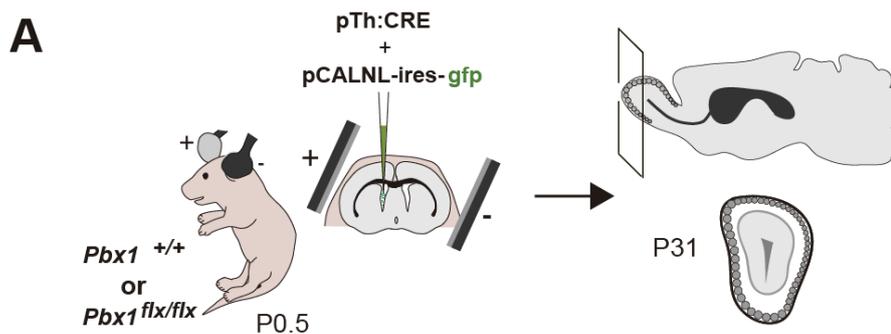


**Figura R19.** Los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* exhiben una reducción en la densidad de fibras *Th:CRE/RCE* GFP positivas. **A)** Representación esquemática de las neuronas DA rodeando los glomérulos del BO en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. **B-C')** Seguimiento del linaje DA mediante el alelo RCE. Escala: 25 μm (B, C); 5 μm (B', C'). **D)** Cuantificación del área de los glomérulos y de las fibras del interior de animales control y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*.  $n=3$  animales por genotipo. Test-T no pareado de dos colas,  $p$  valor de 0.42 (área por glomérulo) y 0.03 (pixeles GFP positivos).



## 6.2 Las neuronas deficientes en *Pbx1* presentan defectos morfológicos

Para estudiar directamente la morfología de células individuales no pudimos utilizar animales  $Pbx1^{Th-RCE}$  puesto que muchas células quedaban marcadas con GFP en un mismo glomérulo haciendo imposible la identificación de las dendritas y proyecciones pertenecientes a una única neurona. Por esta razón, realizamos electroporaciones postnatales *in vivo* para marcar un número reducido de neuronas. Los progenitores de la SEZ de animales control ( $Pbx1^{+/+}$ ) y mutantes  $Pbx1^{flx/flx}$  fueron coelectroporados con un plásmido que expresaba la CRE bajo el promotor de *Th* (pTh:CRE) y otro plásmido que induce la expresión de GFP solo en presencia de la CRE (pCALNL-ires-gfp) (**Figura R20 A**). En estos experimentos, solamente las células electroporadas son marcadas con GFP, y en los animales mutantes concomitantemente se elimina el gen *Pbx1*. De esta manera, podíamos llevar a cabo un estudio morfológico mediante la expresión de GFP, tanto en células control como en aquellas que eliminaban *Pbx1*. Y, puesto que la cantidad de células positivas en las electroporaciones es mucho menor a las que se modifican en los animales mutantes  $Pbx1^{Th-RCE}$ , donde toda célula que expresa *Th* en algún momento queda marcada con GFP, podemos estudiar neuronas aisladas de manera que todas las dendritas verdes corresponden a una única neurona.

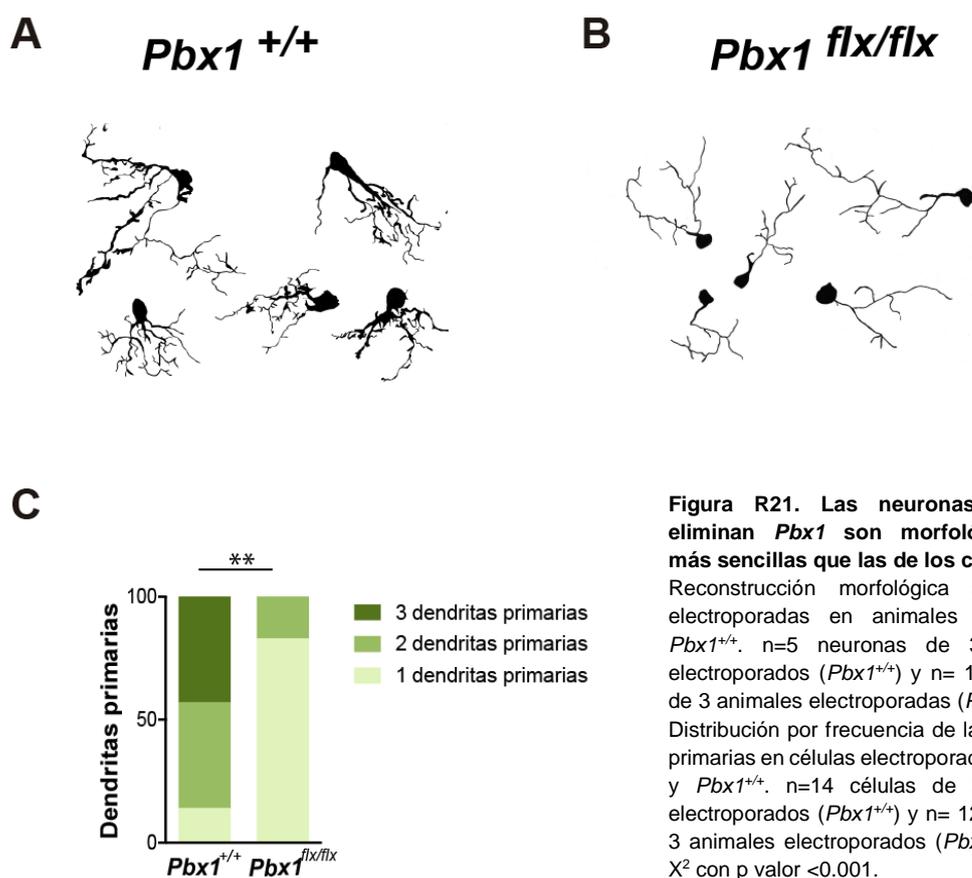


**Figura R20.** Los animales electroporados  $Pbx1^{flx/flx}$  exhiben una disminución en el número de neuronas positivas para TH respecto a los controles. **A)** Diseño experimental de las electroporaciones postnatales *in vivo*. Los animales  $Pbx1^{+/+}$  y  $Pbx1^{flx/flx}$  se co-electroporaron con un plásmido que induce la expresión de la CRE bajo el promotor de *Th* y un plásmido con una GFP flanqueada por secuencias *Flox*. Los animales fueron analizados pasados 31 días desde la electroporación. **B)** La delección de *Pbx1* inducida por la electroporación *in vivo* provoca un descenso del número de células electroporadas que co-expresan TH, recapitulando el efecto observado en los mutantes  $Pbx1^{Th-RCE}$ . n=5 animales electroporados ( $Pbx1^{+/+}$ ) y n= 12 animales electroporados ( $Pbx1^{flx/flx}$ ). Test-T no pareado de dos colas, p valor de <0.001.

Previamente al estudio morfológico, comprobamos que la mayoría ( $68\pm 3\%$ ,  $n=5$  animales) de las neuronas electroporadas y que expresaban GFP en los animales control eran positivas para TH. Sin embargo, las mismas electroporaciones en animales *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* generaban un número significativamente menor de neuronas TH positivas ( $44\pm 2\%$ ,  $n=12$  animales) (**Figura R20 B**). De modo que este análisis recapitula el efecto observado en los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* y, por tanto, valida las electroporaciones como método para estudiar el papel de *Pbx1* en diferenciación terminal dopaminérgica.

Una vez comprobado el sistema y puesta a punto la triple inmunohistoquímica en cortes de  $50\ \mu\text{m}$  (detallado en el apartado de Métodos) para PBX1A, TH y GFP, se realizaron los estudios morfológicos de las neuronas con *Neuron Studio*. Se analizaron un total de 14 neuronas mutantes provenientes de 3 animales mutantes y 12 neuronas control provenientes de 3 animales control. Todas ellas eran neuronas en las que podíamos distinguir su inicio y final en el corte y, además, estaban situadas en la PGL del BO.

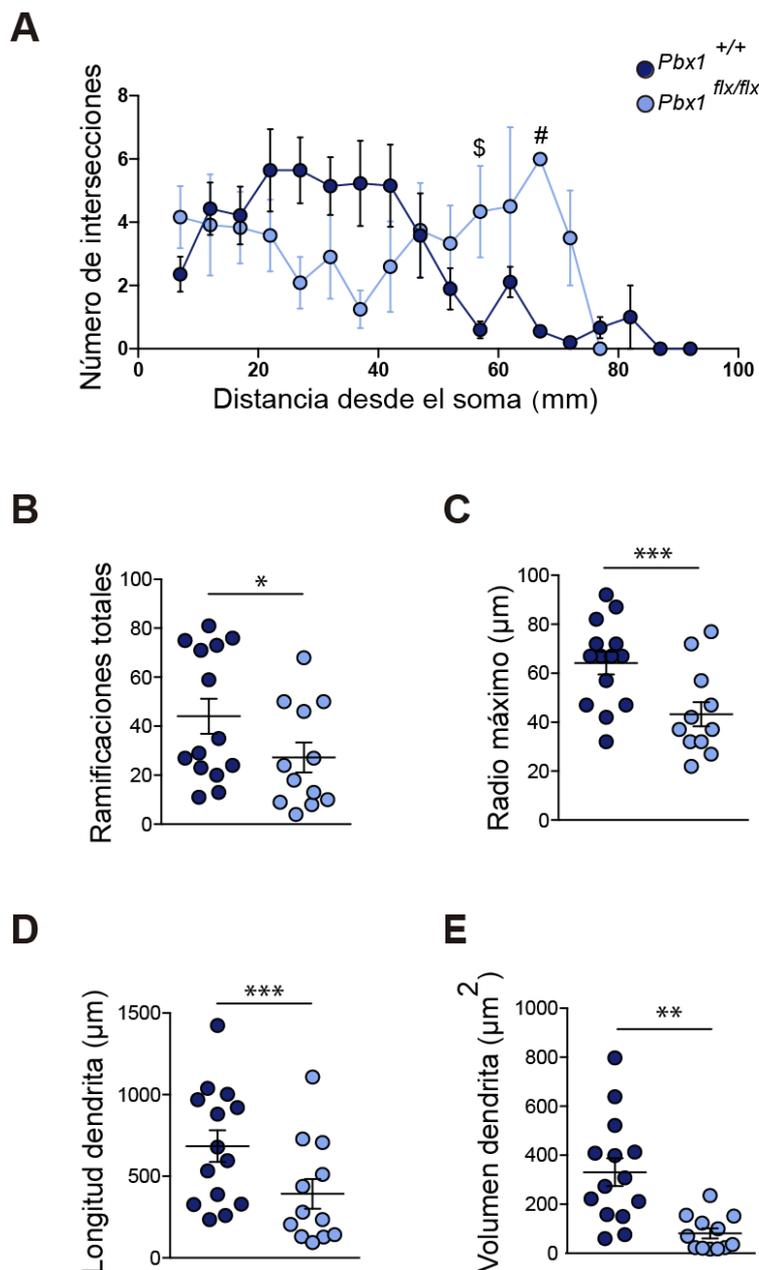
Las reconstrucciones neuronales de las células individuales electroporadas revelan diferencias notables en la morfología (**Figura R21 A-B**). Las células electroporadas *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* (GFP+, PBX1-, TH-) son morfológicamente más sencillas que los controles. El análisis del número de dendritas primarias, es decir, aquellas que emergen directamente del soma, revela un número significativamente menor en las células que han eliminado PBX1 (**Figura R21 C**).



**Figura R21. Las neuronas DA que eliminan *Pbx1* son morfológicamente más sencillas que las de los controles A)** Reconstrucción morfológica de células electroporadas en animales *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* y *Pbx1<sup>+/+</sup>*.  $n=5$  neuronas de 3 animales electroporados (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) y  $n=12$  neuronas de 3 animales electroporados (*Pbx1<sup>flx/flx</sup>*). **B)** Distribución por frecuencia de las dendritas primarias en células electroporadas *Pbx1<sup>flx/flx</sup>* y *Pbx1<sup>+/+</sup>*.  $n=14$  células de 3 animales electroporados (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) y  $n=12$  células de 3 animales electroporados (*Pbx1<sup>flx/flx</sup>*). Test  $\chi^2$  con  $p$  valor  $<0.001$ .

## Resultados

Así mismo, analizamos otros parámetros morfológicos. Por una parte, la distribución de las ramificaciones parece estar afectado en las neuronas mutantes. Puesto que, el análisis Sholl muestra que mientras que los controles presentan una disminución del número de intersecciones al aumentar la distancia con el soma, los mutantes tienen significativamente más ramificaciones que los anteriores al superar las 60 micras de distancia al soma (**Figura R22 A**). Sin embargo, las ramificaciones totales de la neurona son significativamente menores en las neuronas  $Pbx1^{flx/flx}$  que en las  $Pbx1^{+/+}$  ( $Pbx1^{+/+}$ :  $44 \pm 7$ ,  $n=14$  células de 3 animales diferentes,  $Pbx1^{flx/flx}$ :  $27 \pm 6$ ,  $n=12$  células de 3 animales diferentes (**Figura R22 B**).



**Figura R22. Las neuronas DA que eliminan  $Pbx1$  presentan una morfología más simple en comparación a los controles. A)** Análisis morfológico de Sholl que muestra diferencias en la distribución de las ramificaciones entre las células electroporadas  $Pbx1^{+/+}$  y  $Pbx1^{flx/flx}$ .  $n=14$  células de 3 animales electroporados ( $Pbx1^{+/+}$ ) y  $n=12$  células de 3 animales electroporados ( $Pbx1^{flx/flx}$ ). Test-T múltiple no pareado, con p valor ajustado Holm-Sidak de 0.001 (\$) y  $<0.001$  (#). **B-E)** Cuantificación morfológica de la longitud, el volumen de las dendritas, los puntos de ramificación y radio máximo en células electroporadas  $Pbx1^{+/+}$  y  $Pbx1^{flx/flx}$ .  $n=14$  células de 3 animales electroporados ( $Pbx1^{+/+}$ ) y  $n=12$  células de 3 animales electroporados ( $Pbx1^{flx/flx}$ ). Test-T no pareado de dos colas para la longitud, el volumen y el radio con p valor de 0.04,  $<0.001$  y  $<0.001$  respectivamente. Test  $\chi^2$  para el análisis de los puntos de ramificación con p valor de 0.005.

Otra de las diferencias morfológicas a destacar es la longitud de las dendritas, que es menor en células que carecen de *Pbx1*, (*Pbx1*<sup>+/+</sup>: 684±97 µm, n=14 células de 3 animales distintos; *Pbx1*<sup>fix/fix</sup> 392±91 µm, n=12 células de 3 animales distintos) y el radio máximo de la distribución de la neurona, también significativamente menor en células mutantes (*Pbx1*<sup>+/+</sup>: 64±5 µm, n=14 células de 3 animales distintos, *Pbx1*<sup>fix/fix</sup> 43±5 µm n=12 células de 3 animales distintos) (**Figura R22 C-D**). Además, cabe destacar que a simple vista las neuronas mutantes tenían una apariencia con dendritas más delgadas o finas (**Figura 21 A-B**). coincidiendo con los datos obtenidos que indican que las dendritas de las neuronas sin *Pbx1* exhiben menor volumen que las de las neuronas DA control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>: 331±57 µm<sup>2</sup>, n=14 células de 3 animales distintos, *Pbx1*<sup>fix/fix</sup> 81±21 µm<sup>2</sup>, n=12 células de 3 animales distintos) (**Figura R22 E**).

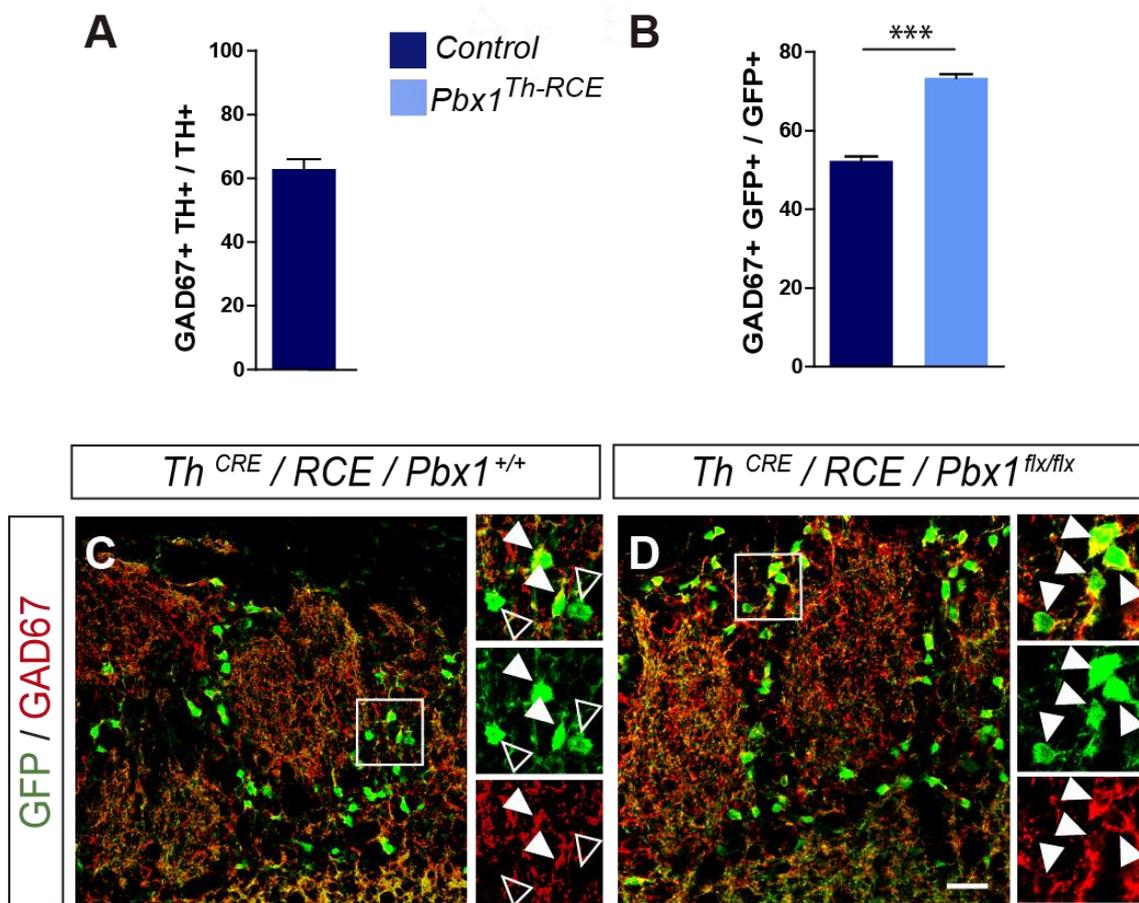
Por consiguiente, los análisis descritos nos permiten concluir que PBX1 es necesario para la correcta maduración morfológica de las células DA del BO.

## 7. PBX1 reprime destinos celulares no dopaminérgicos en el linaje dopaminérgico

### 7.1 PBX1 reprime la expresión de GAD67.

Las interneuronas DA del BO de ratón utilizan tanto DA como ácido γ-aminobutírico (GABA) como neurotransmisores (Borisovska, Bensen, Chong, & Westbrook, 2013). Por esta razón, quisimos analizar si PBX1, que habíamos determinado que regulaba la expresión de los genes necesarios para la síntesis de DA, regula también la adquisición del fenotipo GABAérgico de estas neuronas. En la ruta metabólica de GABA, este neurotransmisor se sintetiza a partir del glutamato mediante la acción de las enzimas glutamato descarboxilasas GAD1 (también conocida como GAD67) y GAD2 (también conocida como GAD65). En las neuronas DA del BO la enzima expresada predominantemente es GAD67 (Kiyokage et al., 2010).

Con el objetivo de analizar si PBX1 es necesario para la inducción y/o mantenimiento del fenotipo GABAérgico, además del dopaminérgico, analizamos, en primer lugar, la cantidad de células del linaje DA que expresaban esta enzima, y observamos que en controles el 63±3 % de las células TH+ también expresan GAD67 (**Figura R23 A**). A continuación, realizamos una doble inmunohistoquímica en animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) y mutantes para *Pbx1* (*Pbx1*<sup>fix/fix</sup>; RCE; TH-CRE) en secciones del BO de animales de 2 meses de edad contra GFP y GAD67. Sorprendentemente, estos ratones presentaron un incremento significativo en el número de células que co-expresaban GFP y GAD67 en comparación con animales control (Controles 52±1, n=3 animales; *Pbx1*<sup>Th</sup> 73±1 n= 3 animales) (**Figura R23 B-D**). Estos datos sugieren que PBX1 parece actuar, de algún modo, como represor del fenotipo neuronal GABAérgico.

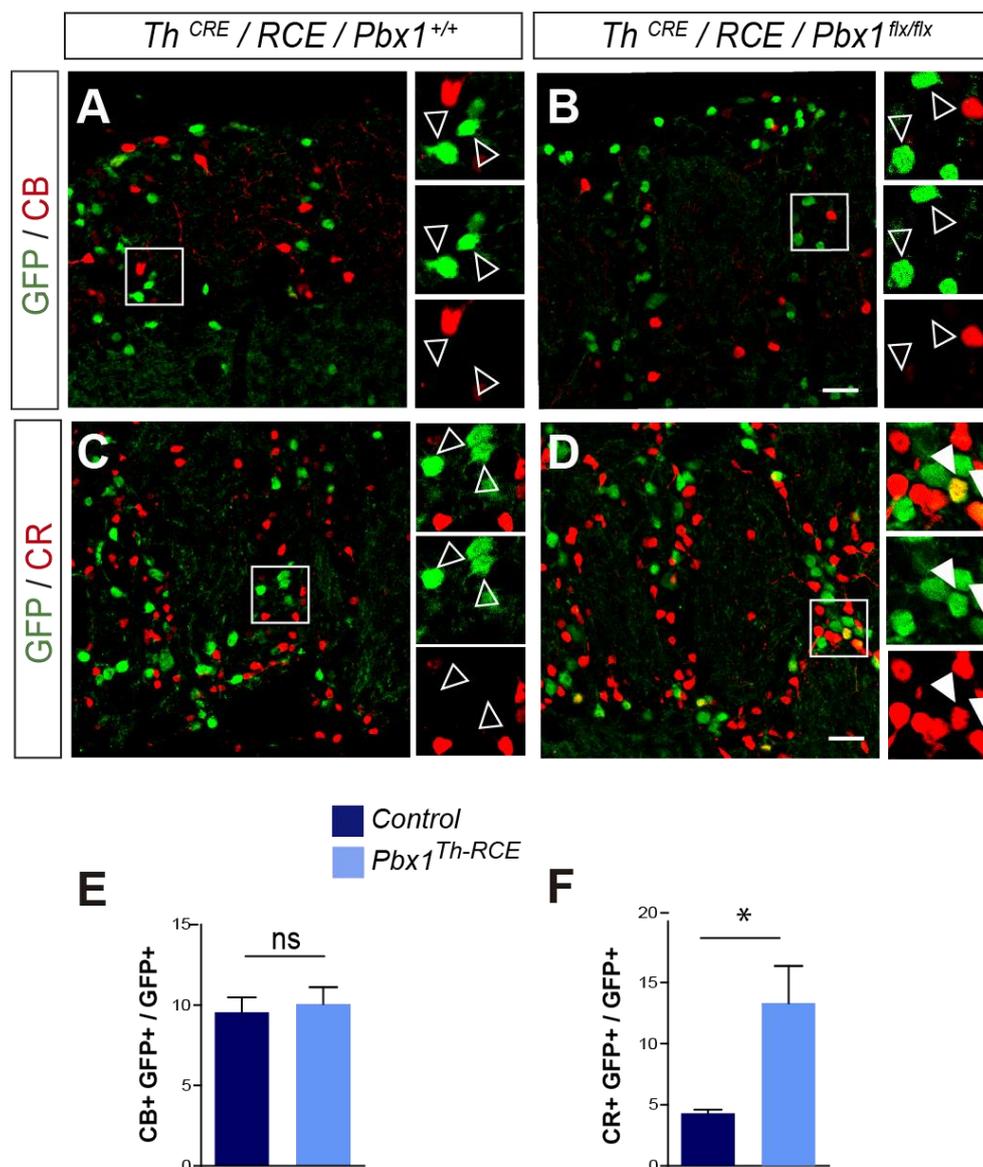


**Figura R23. La eliminación de *Pbx1* afecta el fenotipo GABAérgico de las neuronas del linaje DA.** **A)** Cuantificación del número de células que co-expresan GAD67 del total de células DA (TH positivas).  $n=3$  animales. **B)** Porcentaje de células GFP (*Th:CRE/RCE*) positivas que coexpresan GAD67 en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*.  $n=3$  animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas,  $p$ -valor  $<0.001$ . **C-D)** Micrografías representativas de la expresión de GAD67 en células del linaje DA de animales control (C) y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* (D). Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP. Escala: 25  $\mu$ m.

## 7.2 PBX1 reprime la expresión de Calretinina en el linaje dopaminérgico

Durante el proceso de neurogénesis adulta en el BO los diferentes progenitores situados en la SEZ dan lugar a tres subpoblaciones no solapantes de interneuronas GABAérgicas clasificadas por la expresión de TH, CR y CB (Merkle, Mirzadeh, & Alvarez-Buylla, 2007). En animales salvajes, la expresión de CB y CR se observa en muy pocas células del linaje DA, constituyendo menos de un  $10\pm 1\%$  y un  $4\pm 0.3\%$  del total de células GFP positivas (*Th:CRE/RCE*) en controles (**Figura R24 A-F**). En los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*, el porcentaje de células que co-expresan GFP y CB no se ve alterado (control:  $10\pm 1\%$ ,  $n=3$  animales; *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*:  $10\pm 1\%$ ,  $n=3$  animales) (**Figura R24 A-B, E**). Sin embargo, las imágenes de microscopía confocal de la doble inmunohistoquímica para GFP y CR revelan un aumento en la proporción de las células que co-expresan ambos marcadores (control:  $4\pm 0.3\%$ ,  $n=3$  animales; *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*:  $13\pm 3\%$ ,  $n=3$  animales) (**Figura R24 C-D, F**). La expresión ectópica de CR en el linaje DA de los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*

indica que al perder la expresión de PBX1 se produce una de-represión de CR. Debemos resaltar que los selectores terminales en *C. elegans* son conocidos por disminuir la plasticidad celular inhibiendo otros fenotipos (Patel y Hobert, 2017), de manera que PBX1 podría estar restringiendo los fenotipos alternativos como en este caso la CR. Aun así, cabe destacar que el porcentaje de células que expresan ectópicamente CR (un 10% más) es inferior al número de células que dejan de expresar TH (un 40% menos), sugiriendo que una parte de las neuronas mutantes para PBX1 permanecen en un estadio indiferenciado y parece que tan solo un pequeño porcentaje podrían cambiar a fenotipo CR.



**Figura R24. PBX1 reprime la expresión de Calretinina en el linaje DA. A-B)** Expresión de Calbindina en células del linaje DA de animales control (A) y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* (B). Escala: 25  $\mu$ m. **C)** Cuantificación del porcentaje de células GFP positivas que coexpresan Calbindina en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor 0.73. **D-E)** Expresión de Calretinina en células del linaje DA en animales control (D) y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* (E). Escala: 25  $\mu$ m. **F)** Porcentaje de células GFP positivas que coexpresan Calretinina en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor 0.04. Puntas de flecha blancas indican colocalización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

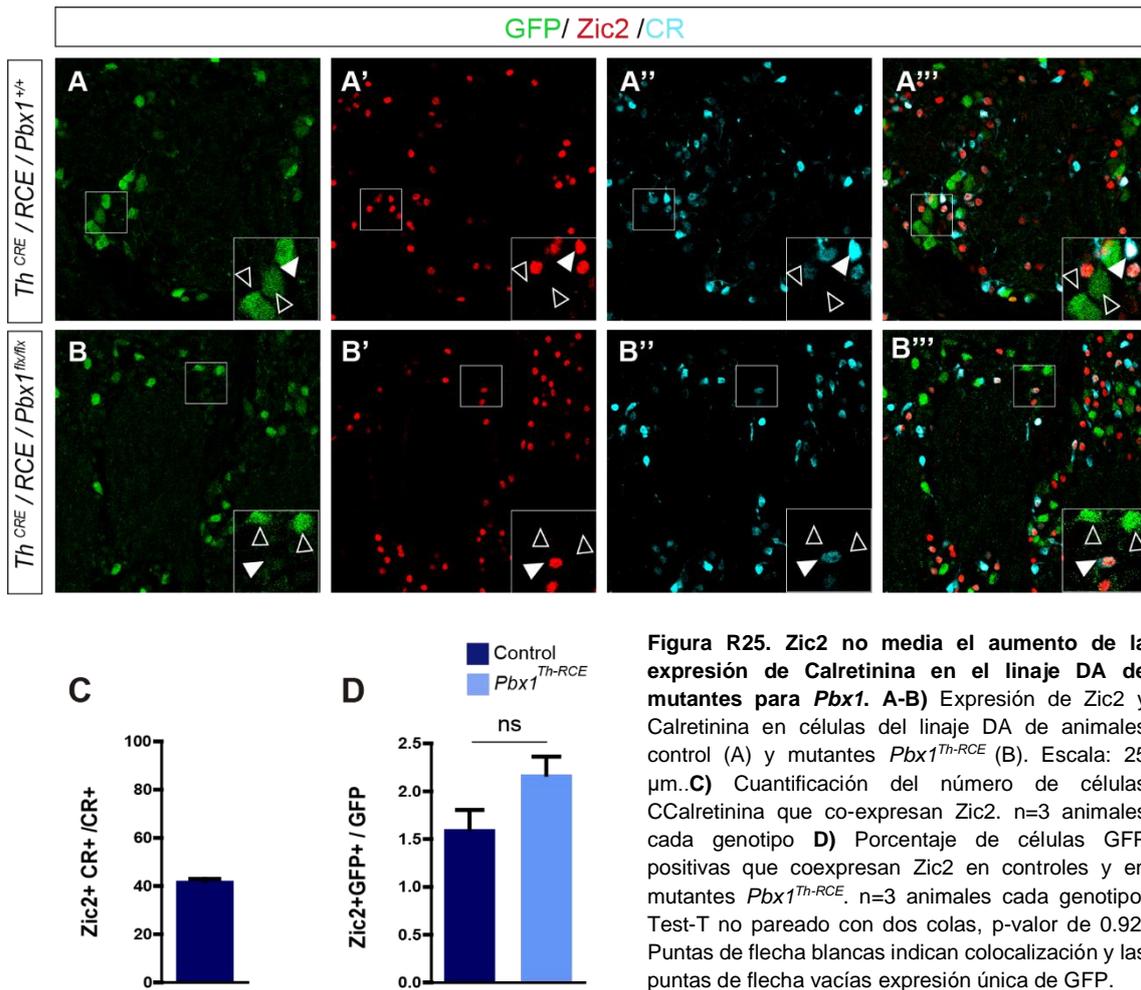
### 7.3 *Pbx1* no reprime la expresión de FT que determinan el linaje de las interneuronas CR positivas

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo por el que la ausencia de PBX1 genera una expresión ectópica de CR en las interneuronas del linaje DA del bulbo quisimos analizar la expresión de *Zic2* y *Sp8*, dos factores de transcripción necesarios para la generación de las neuronas CR. Nuestra hipótesis fue que quizás *Pbx1* reprime la expresión de estos factores en el linaje DA y, por tanto, la expresión de CR.

*Zic1* y *Zic2* regulan el balance fenotípico entre las subpoblaciones GABAérgicas CR positivas y TH positivas del bulbo olfatorio. Los estudios de ganancia y pérdida de función revelan que ambos FT promueven la diferenciación de las neuronas del BO al subtipo CR al mismo tiempo que inhiben la diferenciación dopaminérgica (Tiveron et al., 2017). La desregulación del balance fenotípico que promueven estas proteínas podría tener una relación clara con los fenotipos que encontramos en nuestros mutantes, una disminución de las neuronas DA del BO y un aumento de las CR. En base a esta idea, decidimos realizar un análisis de la expresión de las proteínas *Zic* en los mutantes para *Pbx1*.

El anticuerpo disponible para *Zic1* no funcionó en nuestras manos, e incluso las pruebas con este anticuerpo con la técnica de hibridación *in situ* realizadas en el laboratorio, no dieron resultado. Por esta razón, realizamos los estudios con el anticuerpo disponible para *Zic2*. Llevamos a cabo una triple inmunohistoquímica en animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; TH-CRE) y mutantes para *Pbx1* (*Pbx1*<sup>flx/flx</sup>; RCE; TH-CRE) en secciones del BO de animales de 2 meses de edad contra GFP, CR y ZIC2 (**Figura R25 A-B**). Tal y como se observa en la **Figura R25 C**, en nuestras manos un 42±0.7% de las células CR positivas de los controles co-expresan *Zic2*. En cambio, cuando analizamos el linaje DA, tan sólo un 1,6±0.2% de las células GFP (*Th*:CRE/RCE) expresan este FT. Este porcentaje presenta una pequeña tendencia al alza en el caso de los animales mutantes *Pbx1*<sup>Th</sup> (2±0.2%) (**Figura 25 E**), aunque no es estadísticamente significativo. En consecuencia, parece que la sobreexpresión de *Zic2* no interviene en la expresión ectópica de CR en el linaje DA característica de las células mutantes para *Pbx1*.

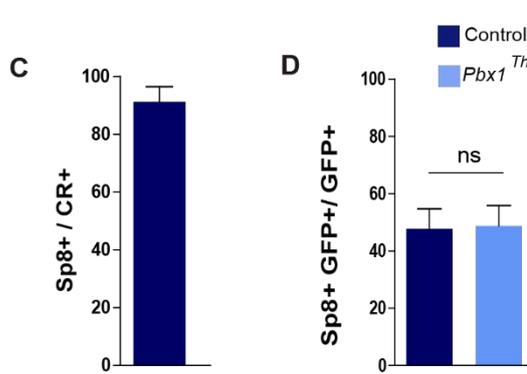
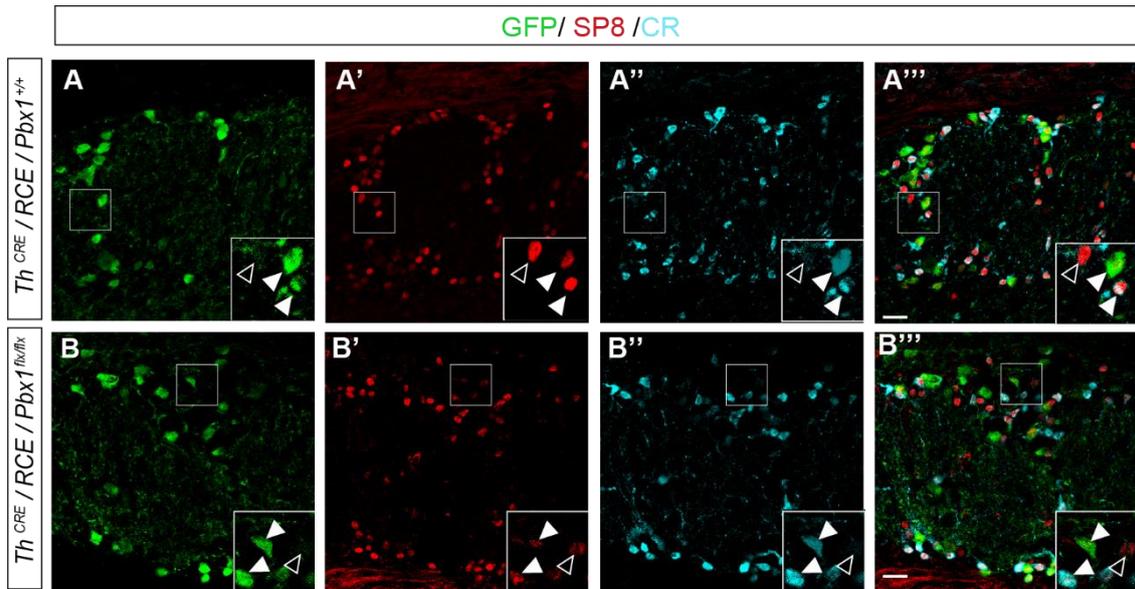
El FT *Sp8* se expresa en casi todas las interneuronas CR positivas y en gran parte de las neuronas DA del BO (Kosaka & Kosaka, 2012). Varios estudios indican que SP8 ejerce un papel esencial en la neurogénesis de las interneuronas CR positivas del BO (Li et al., 2018; Waclaw et al., 2006) . Más recientemente, se ha descrito su papel esencial durante la proliferación de todos los linajes del BO, mientras que a largo plazo, su expresión se mantiene únicamente en las CR positivas siendo necesario para su supervivencia (Gaborieau, Hurtado-Chong, Fernández, Azim, & Raineteau, 2018). Basándonos en esta información, analizamos si la expresión ectópica de este FT podría estar relacionado con el fenotipo de expresión de CR observado en los mutantes para *Pbx1*.



Llevamos a cabo una triple inmunohistoquímica en animales control (*Pbx1*<sup>+/+</sup>; RCE; *Th*-CRE) y mutantes para *Pbx1* (*Pbx1*<sup>Th-RCE</sup>) en secciones del BO de animales de 2 meses de edad contra GFP, CR y SP8 (Figura R26 A-B). En primer lugar, pudimos observar que en animales control prácticamente todas las células positivas para CR expresaban también SP8 (91 $\pm$ 5%) (Figura R26 C). Dado que, tal y como se ha comentado anteriormente, se ha descrito la expresión de este FT en el proceso de generación de otras interneuronas del BO a parte de las CR, no nos extrañó que un 48 $\pm$ 7% de las células del linaje dopaminérgico fueran positivas para SP8 en controles (Figura R26 A, D). Observamos que este porcentaje se mantiene inalterado en los animales *Pbx1*<sup>Th-RCE</sup> (49 $\pm$ 7%), de modo que podemos concluir que la expresión ectópica de SP8 no es el responsable de la inducción de CR en las células DA mutantes para *Pbx1* del BO (Figura R26 A-B, D).

En resumidas cuentas, los resultados de la presente sección nos permiten concluir que *Pbx1* no parece inhibir la expresión de selectores terminales del destino CR. Alternativamente, *Pbx1* podría reprimir de forma directa la expresión de CR en el linaje DA, sin embargo, para determinar

si la acción represora de *Pbx1* sobre CR es directa sería necesario efectuar experimentos adicionales como ChIPseq.



**Figura R26. Sp8 no media el aumento de la expresión de Calretinina en el linaje DA de mutantes para *Pbx1*.** A-B) Expresión de SP8 y Calretinina en células del linaje DA de animales control (A) y mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* (B). Escala: 25  $\mu$ m. C) Cuantificación del número de células CCalretinina que co-expresan SP8. n=3 animales cada genotipo D) Porcentaje de células GFP positivas que co-expresan SP8 en controles y en mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. n=3 animales cada genotipo, Test-T no pareado con dos colas, p-valor de 0.92. Puntas de flecha blancas indican co-localización y las puntas de flecha vacías expresión única de GFP.

## 8. Los mutantes de *Pbx1<sup>Th</sup>* muestran déficits en el comportamiento olfativo

Los defectos en la diferenciación de tipos específicos de neuronas repercuten, a menudo, en los comportamientos asociados a las neuronas correspondientes. Por ejemplo, la ausencia del FT *Foxp1* en el cerebro origina neuronas con reducida excitabilidad en el hipocampo que dan lugar a déficits cognitivos y sociales asociados al autismo (Bacon et al., 2015). Otros FT como *RunX1* desarrollan un papel fundamental en la percepción del dolor y sus comportamientos asociados (Chen et al., 2006), mientras que la ausencia de *Pet1* afecta a las neuronas serotoninérgicas generando alteraciones en el control de la ansiedad (Liu et al., 2010).

A nivel funcional, el papel de las neuronas DA del BO en el procesamiento del olor aún no es del todo conocido (Pignatelli & Belluzzi, 2017). Estudios en mutantes para los receptores dopaminérgicos D2 indican que su función parece más relacionada con la discriminación de olores que con la detección de un olor per se (Kruzich & Grandy, 2004). Además, los ratones mutantes para el transportador DAT, que no pueden reciclar correctamente la DA, presentan déficits en la discriminación olfativa (Tillerson et al., 2006). Específicamente, la función de las neuronas DA en circuito bulbar se asocia a la regulación de los impulsos de las células *Tufted* y las mitrales, controlando la proyección de estas a centros superiores. De hecho, la actividad de las neuronas DA del BO es directamente proporcional a las concentraciones de los olores y el silenciamiento de estas mediante optogenética reduce la respuesta *in vivo* a los olores de las células mitrales y las neuronas en penacho (Banerjee et al., 2015). A pesar de que el papel de las neuronas DA en olfacción no está bien definido, quisimos estudiar si el mutante *Pbx1<sup>Th</sup>*, que muestra defectos en especificación DA del BO, presenta déficits comportamentales relacionados con la olfacción. Los experimentos comportamentales que se detallan a continuación fueron realizados con la colaboración de la Dra. Ana Pérez de la Universidad de Valencia. En algunos experimentos preliminares a los que se muestran en esta tesis y que no han sido incluidos en la presente memoria, participó también la Dra. Laura Remesal.

### 8.1 Análisis del comportamiento no olfativo de los animales *Pbx1<sup>Th</sup>*

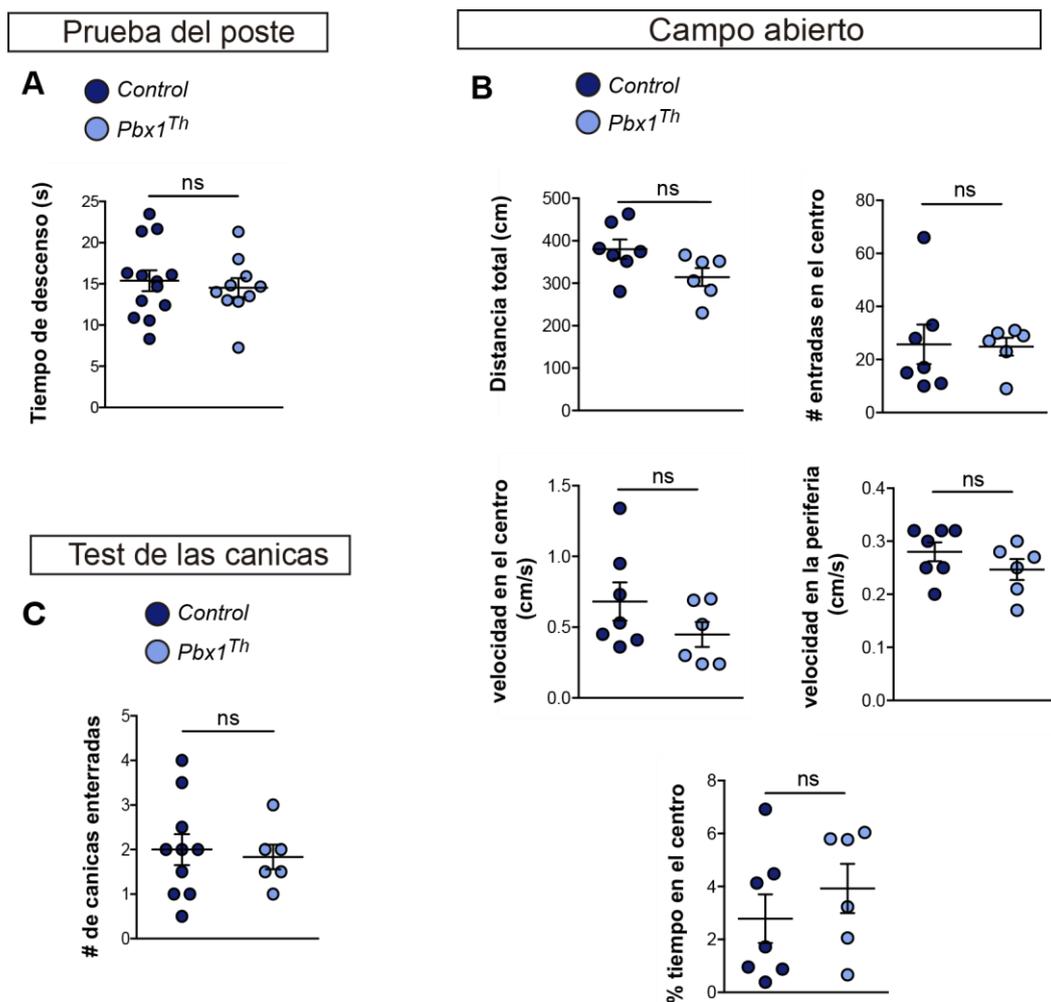
Previamente a los estudios comportamentales relacionados con la olfacción realizamos ensayos para testar diversos aspectos más generales de la cepa utilizada dado que los paradigmas comportamentales utilizados para estudiar la olfacción tienen asociados un componente locomotor y explorador importante. En consecuencia, se hace necesario estimar la locomoción y exploración no asociada a olfacción en estos animales antes de realizar un estudio olfativo completo.

PBX1 se expresa en las neuronas DA del mesencéfalo y la pérdida de este FT en dichas células produce una regulación al alza de *Pbx3*. Dobles mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>/Pbx3* exhiben neurodegeneración en estas neuronas (Villaescusa et al., 2016) que no se observa en el mutante simple *Pbx1<sup>Th</sup>*. En cualquier caso, con el objetivo de descartar que el mutante *Pbx1<sup>Th</sup>* pudiera tener déficits motores debido a una afectación de la función nigroestriatal cerebral y que, por lo tanto, afectasen a la exploración que se analiza en los experimentos de olfacción, se testaron los ratones en el paradigma de la prueba del poste (*Pole test*). Los detalles sobre esta prueba se encuentran recogidos en el apartado de material y métodos de este manuscrito. Los resultados del ensayo muestran que los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* emplean la misma cantidad de tiempo en bajar del poste que los controles (controles  $15.4 \pm 1.3$  s para bajar,  $n=13$  animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*:  $14.5 \pm 1.2$  s para bajar,  $n=10$  animales), de modo que descartamos la posibilidad de que los mutantes exhiban un déficit motor (**Figura R27 A**).

Así mismo, otra manera de estudiar si estos animales presentan alguna alteración en la locomoción, así como en niveles alterados de ansiedad, es mediante el test del campo abierto.

## Resultados

En este ensayo, analizamos diversas variables. La distancia total recorrida durante la prueba (control:  $380 \pm 23$  cm,  $n=7$  animales;  $Pbx1^{Th}$ :  $315 \pm 21$  cm,  $n=6$  animales) y la velocidad media del desplazamiento (controles  $0.68 \pm 0.13$  cm/s en el centro,  $0.28 \pm 0.02$  cm/s en la periferia,  $n=7$  animales;  $Pbx1^{Th}$ :  $0.45 \pm 0.09$  cm/s en el centro,  $0.25 \pm 0.02$  cm/s en la periferia,  $n=6$  animales) no presenta diferencias entre las dos condiciones (**Figura R27 B**), por lo que reafirmamos que los ratones  $Pbx1^{Th}$  no exhiben alteración en el comportamiento locomotor. Por otro lado, en esta misma prueba analizamos, igualmente, la ansiedad mediante la comparación del tiempo y del número de entradas entre el centro y la periferia del campo abierto (control:  $26 \pm 7$  entradas, 2.8% del tiempo en el centro,  $n=7$  animales;  $Pbx1^{Th}$ :  $25 \pm 3$  entradas, 3.9% del tiempo en el centro,  $n=6$  animales). Los análisis de estas variables confirman que los animales mutantes para  $Pbx1$  no presentan unos niveles de ansiedad diferentes a los de los controles (**Figura R27 B**).



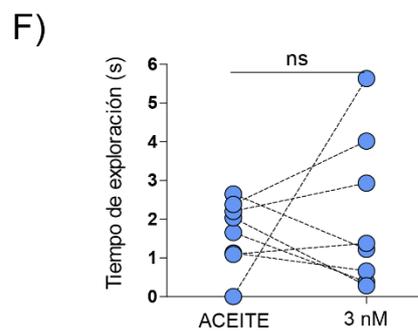
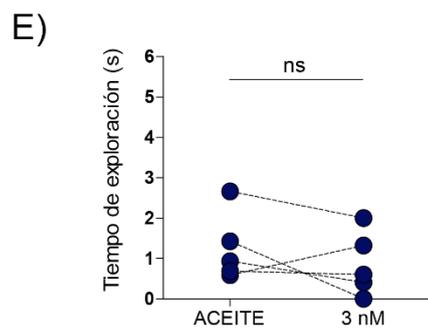
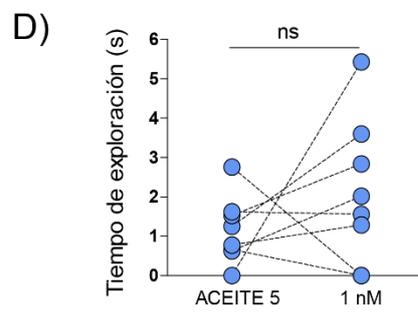
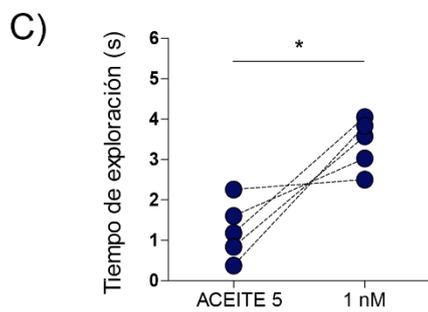
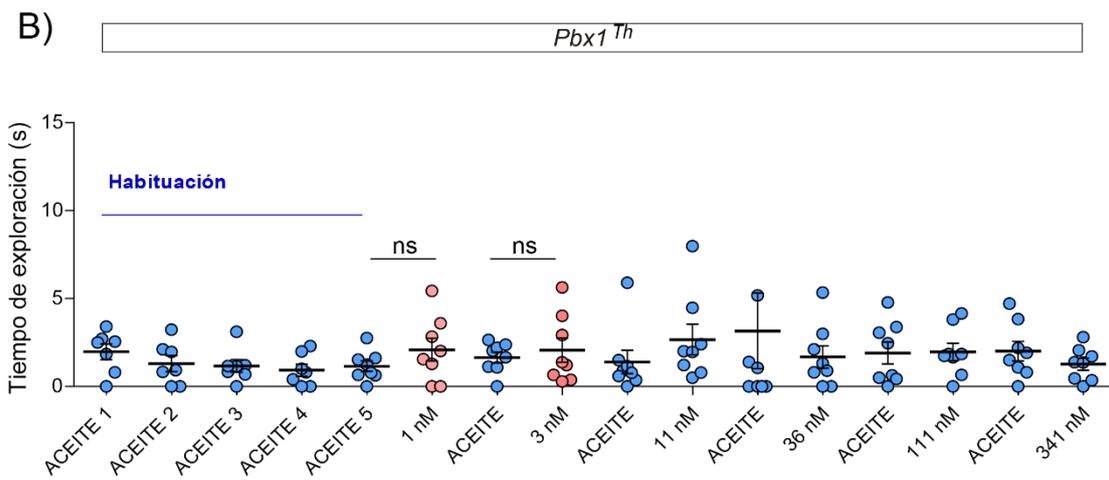
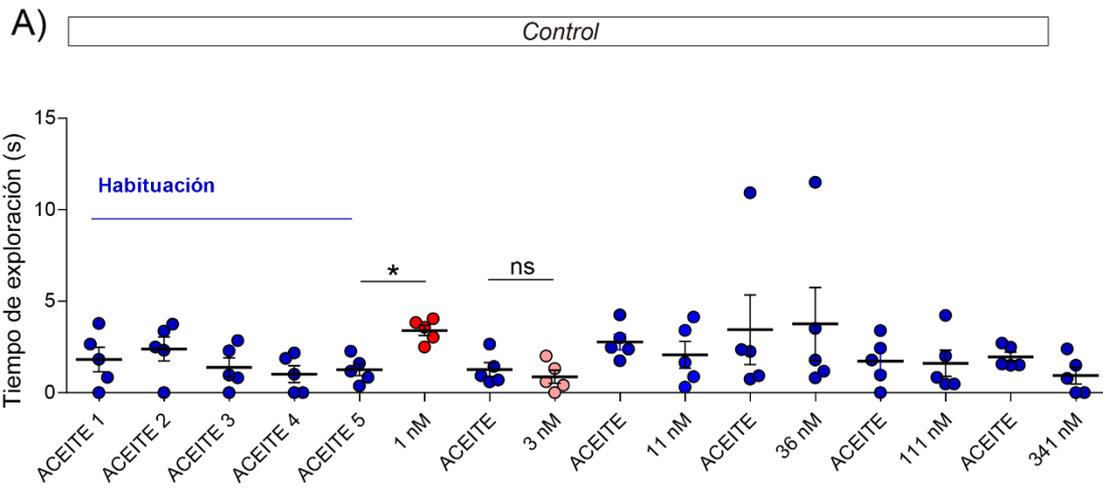
**Figura R27. Los mutantes  $Pbx1^{Th}$  no presentan alteración en comportamientos locomotores, de exploración o ansiedad. A)** Resultados de la prueba del poste. Cuantificación del tiempo requerido para descender por un poste vertical por parte de animales control y mutantes  $Pbx1^{Th}$ .  $n=13$  animales (control) y  $n=10$  animales ( $Pbx1^{Th}$ ). Test-T no pareado de dos colas,  $p$  valor de 0.63 **B)** Análisis del comportamiento motor asociado a un campo abierto de animales control y mutantes  $Pbx1^{Th}$ .  $n=7$  animales (control) y  $n=6$  animales ( $Pbx1^{Th}$ ). Test-T no pareado de dos colas,  $p$  valor de 0.062 (distancia total), 0.92 (entradas al centro), 0.19 (velocidad en el centro), 0.24 (velocidad en la periferia) y 0.40 (tiempo en el centro). **C)** Cuantificación del número de canicas que permanecen enterradas en animales control y mutantes  $Pbx1^{Th}$ .  $n=10$  animales (control) y  $n=6$  animales ( $Pbx1^{Th}$ ). Test-T no pareado de dos colas,  $p$  valor de 0.74. En todos los casos se indican los puntos indican datos individuales correspondientes a un animal.

Por último, dado que los experimentos olfativos requieren la utilización de un bastoncillo, quisimos evaluar si la exposición a un objeto novedoso producía unos niveles de ansiedad diferentes en los animales mutantes y en los controles. Se llevó a cabo el test de las canicas (*marble test*), que consiste en evaluar la cantidad de canicas que son enterradas tras 10 minutos de exposición a ellas. Esta prueba permite detectar trastornos obsesivo-compulsivos y comportamientos estereotípicos asociados a la ansiedad. Los resultados obtenidos, evidencian que no existen diferencias entre el número de canicas enterradas por los animales *Pbx1<sup>Th</sup>* y los controles (controles  $2\pm 0.35$  canicas enterradas,  $n=10$  animales; *Pbx1<sup>Th</sup>*:  $2\pm 0.27$  canicas enterradas,  $n=6$  animales) de modo que los niveles de ansiedad de los animales mutantes para *Pbx1* tienen los niveles de ansiedad inalterados (**Figura R27 C**).

## 8.2 Análisis del comportamiento olfativo de los animales *Pbx1<sup>Th</sup>*

Con el objetivo de analizar si los animales *Pbx1<sup>Th</sup>* presentaban alguna alteración en los comportamientos olfativos, realizamos experimentos para analizar el umbral olfativo de los animales mediante la exposición a concentraciones crecientes de geraniol ( $C_{10}H_{18}O$ ). Este, es un olor sintético que carece de componente emocional en los ratones, por ello es ampliamente utilizado en este tipo de ensayos. El umbral olfativo es la concentración mínima de un determinado estímulo que un individuo es capaz de diferenciar de una muestra en blanco (sin olor). En otras palabras, es el límite de sensibilidad olfativa.

En el apartado de métodos de este manuscrito se detallan los procedimientos utilizados en nuestros experimentos. Los análisis de estos ensayos muestran que los animales control exhiben una respuesta homogénea en la que se observa un aumento significativo de su exploración al exponer la primera concentración del olor (Aceite #5,  $1.2\pm 0.3$  segundos; Geraniol 1nM  $3.4\pm 0.2$  segundos,  $n=5$  animales) (**R28 A, C**). Por ello interpretamos que son capaces de detectar el geraniol a la concentración más baja utilizada en nuestro experimento (1nM), mientras que la exposición de la misma concentración en los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* no genera ninguna diferencia en los niveles de exploración respecto al bastoncillo con aceite anterior (Aceite #5,  $1.2\pm 0.3$  segundos; Geraniol 1nM  $2\pm 0.6$  segundos,  $n=8$  animales) (**Figura R28B, D**). De hecho, una vez detectado el olor, en la segunda exposición, los controles vuelven a un nivel de exploración basal debido a una habituación al olor (Controles, Aceite:  $1.2\pm 0.3$  segundos, Geraniol 3nM:  $0.9\pm 0.4$  segundos,  $n=5$  animales) (**Figura R28 A, E**) mientras que los mutantes presentan mayor variabilidad en la respuesta (**Figura R28 B, F**). Algunos animales parecen responder, sin embargo, la mayoría no lo hacen y ni siquiera a una concentración mayor presentan diferencias significativas entre tiempo de exploración del aceite y del geraniol (Mutantes Aceite:  $1.6\pm 0.3$  segundos, Geraniol 3nM:  $2\pm 0.7$  segundos,  $n=8$  animales) (**Figura R28 B, F**). En definitiva, parece que los mutantes exhiben un umbral de detección alterado en relación a los controles presentando una gran variabilidad en sus respuestas.

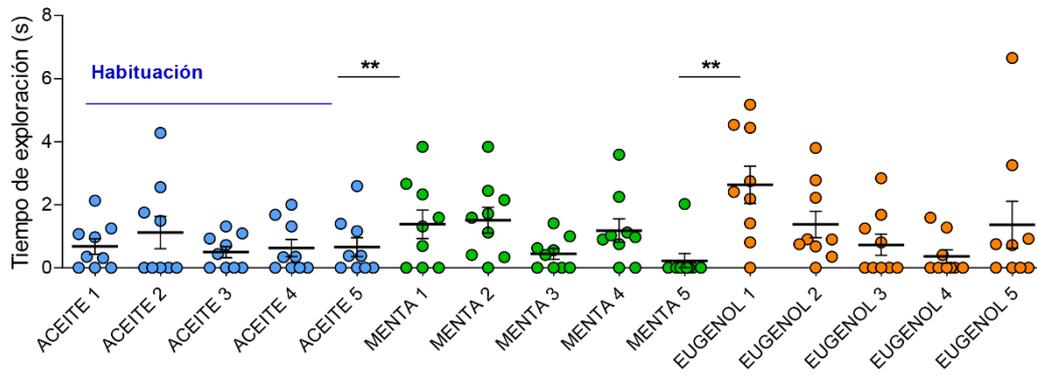


**Figura R28. Los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* presentan déficits en el umbral de detección olfativa.** En el paradigma del umbral olfativo, los ratones se habitúan a la presencia del bastoncillo sin estímulo olfativo. (ACEITE 1 a ACEITE 5) y se analiza su reacción tras la exposición a concentraciones crecientes de geraniol. **A)** Prueba de umbral olfativo realizada a animales control. n=5 animales. Test-T pareado de dos colas, p valor 0.02 (entre aceite 5 y 1nM), y 0.3 (entre aceite y 3nM), lo que indica que los ratones controles ya detectan el olor a la concentración más baja. **B)** Prueba de umbral olfativo realizada a animales mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* n=8 animales. Test-T no pareado de dos colas, p valor de 0.3 (entre aceite 5 y 1nM), y 0.6 (entre aceite y 3nM). **C, E)** Detalle de la gráfica A), donde se distingue cada animal individualmente entre Aceite 5 y 1nM (C), y Aceite y 3nM (E). Las líneas de puntos unen los valores de un mismo animal. **D, F)** Detalle de la gráfica B) donde se distingue cada animal individualmente entre Aceite 5 y 1nM (D), y Aceite y 3nM (F). Las líneas de puntos unen los valores de un mismo animal.

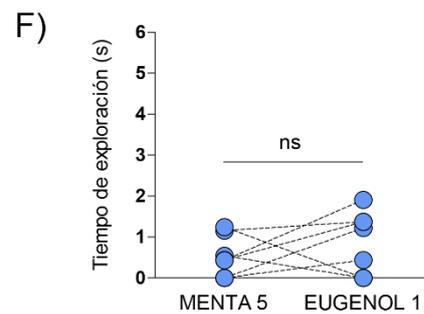
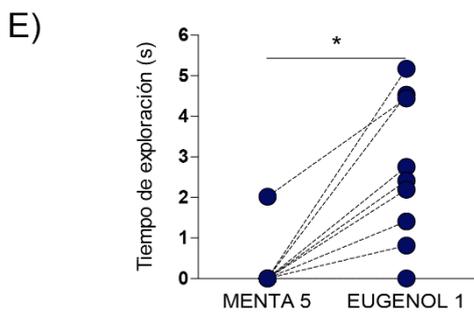
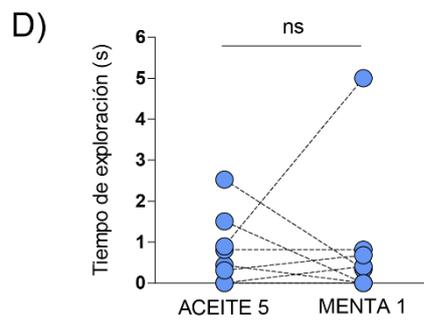
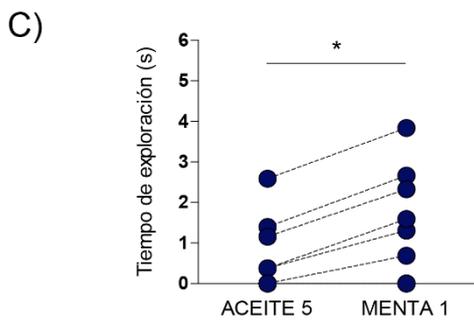
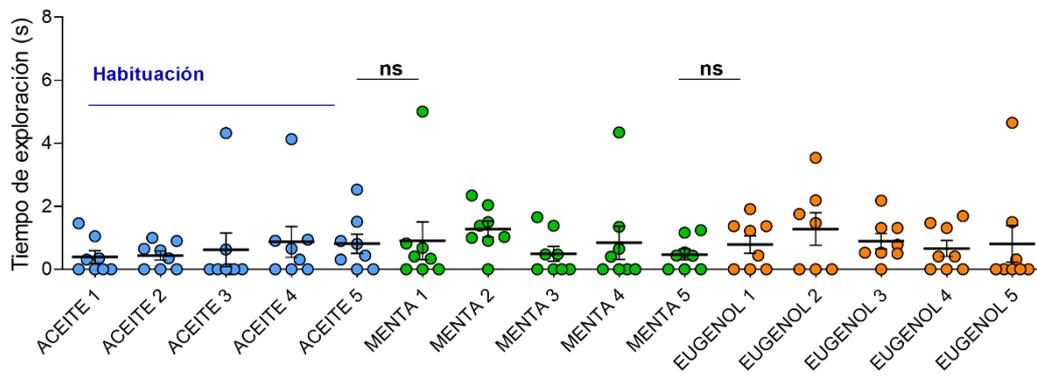
Otro de los comportamientos olfativos que quisimos testar fue el de la habituación a un olor y la discriminación entre olores. Dado que vimos defectos en umbral en mutantes decidimos utilizar una concentración elevada de olor en estos ensayos, los controles detectan a 1nM y, por tanto, decidimos usar un orden de magnitud mayor en ambos casos para geraniol y otros olores (13nM). Los ensayos olfativos realizados se realizaron con dos compuestos diferentes al geraniol: la menta y el eugenol. Tal y como muestra la **Figura 29**, los controles presentan un aumento en la exploración al introducir el primer olor (Aceite5,  $0.7 \pm 0.3$  segundos; Menta1  $1.3 \pm 0.5$  segundos, n=9 animales) (**Figura 29 C**) y esta exploración disminuye en exposiciones posteriores debido a una habituación al olor (**Figura 29 A**). Además, los animales controles son capaces de discriminar entre dos olores ya que existe un aumento en la exploración cuando se introduce el eugenol (Menta5,  $0.2 \pm 0.2$  segundos; Eugenol1  $2.6 \pm 0.6$  segundos, n=9 animales) (**Figura 29 E**), lo que demuestra que, como era de esperar para animales controles, detectan los olores, se habitúan a ellos rápidamente y son capaces de discriminar si son diferentes. En cambio, los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* tienen un comportamiento muy alejado al de los controles, parecen no ser capaces de detectar la menta ni el eugenol, incluso a estas concentraciones tan elevadas (Aceite5,  $0.8 \pm 0.3$  segundos; Menta1  $0.9 \pm 0.6$  segundos; Menta5,  $0.5 \pm 0.2$  segundos; Eugenol1  $0.8 \pm 0.3$  segundos n=8 animales) (**Figura 29 B, D, F**). En consecuencia, al no producirse una reacción a estos olores no pudimos analizar si discriminan entre los olores o presentan un proceso de habituación.

**Figura R29. Ensayos de habituación y discriminación olfativa en controles y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*.** A) Prueba de habituación olfativa realizada a animales control. n=9 animales. Test-T pareado con p valor de 0.0053 (entre Aceite #5 y Menta #1), y 0.0023 (entre Menta#5 y Eugenol #1). B) Prueba de habituación olfativa realizada a animales mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* n=8 animales. Test-T pareado con p valor de 0.89 (entre Aceite 5 y Menta 1), y 0.365 (entre Aceite y Eugenol 1). **C, E)** Detalle de la gráfica A), donde se distingue cada animal individualmente entre Aceite 5 y 1nM (C), y Aceite y 3nM (E). Las líneas de puntos unen los valores de un mismo animal. **D, F)** Detalle de la gráfica B) donde se distingue cada animal individualmente entre Aceite 5 y 1nM (D), y Aceite y 3nM (F). Las líneas de puntos unen los valores de un mismo animal.

A) Control



B) *Pbx1<sup>Th</sup>*







# DISCUSIÓN

La especificación neuronal es un proceso complejo y prolongado en el tiempo en el que los FT ejercen un papel imprescindible. Hasta la fecha se han descrito numerosas funciones de estas proteínas durante la especificación de progenitores en el desarrollo embrionario, sin embargo, el papel que realizan dichas proteínas durante la diferenciación terminal neuronal es menos conocido. Por ello, en este trabajo hemos pretendido caracterizar el papel de PBX1 específicamente como selector terminal de las neuronas DA del BO de ratón, basándonos en resultados previos obtenidos en *C. elegans* que revelan que su homólogo en este organismo (CEH-20) ejerce de selector terminal en las neuronas DA del nemátodo.

Los progenitores de las neuronas DA del BO se localizan en la zona subventricular constituyendo un nicho neurogénico durante la vida adulta (Bonzano et al., 2016). Estas células madre y los neuroblastos migradores expresan PBX1, y este FT es necesario para inducir la neurogénesis en las primeras así como la supervivencia en los segundos (Grebbin et al., 2016). Sin embargo, aún no se ha estudiado su papel en la diferenciación terminal de estas neuronas. En este trabajo hemos eliminado *Pbx1* específicamente en el momento de la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO mediante del sistema inducible CRE-LOX. Los resultados han mostrado que este FT es necesario para la correcta expresión de muchos de los genes efectores de la dopamina de este subtipo neuronal, de modo que puede considerarse como un selector terminal. Los experimentos revelan igualmente que la falta de neuronas DA de los mutantes para este factor, provoca una deficiencia funcional en el comportamiento olfativo. Además, nuestro trabajo expande las funciones hasta ahora establecidas para un selector terminal, puesto que observamos que PBX1 también es necesario para la maduración morfológica, así como para reprimir destinos celulares alternativos.

### **La utilización de cepas CRE requiere la comprobación genotípica y fenotípica de su especificidad de función**

La eliminación de un gen en tejido específico mediante el sistema CRE ha sido ampliamente utilizado en investigación. Desde el inicio de su utilización, tradicionalmente, el genotipado se realizaba testando la presencia de CRE así como de los alelos *floxeados* en el genoma del ratón, sin embargo, no se testa de forma rutinaria la presencia de recombinaciones inespecíficas. En los últimos años se ha visto que las recombinaciones inespecíficas en algunas cepas CRE son más comunes de lo que se creía (Heffner et al., 2012). Es decir, se podían estar analizando animales genotipados erróneamente como controles o como CRE específicos que realmente contenían deleciones ubicuas del gen (Song & Palmiter, 2018).

En el transcurso de este proyecto, iniciado por la Dra. Laura Remesal, detectamos efectos inespecíficos en la CRE que daban lugar a ratones que expresaban GFP de forma generalizada en todo el cerebro (GFP proveniente del alelo RCE: LOX-STOP-LOX: GFP que es un alelo reportero de la actividad CRE), cuando esperábamos que fuera específica de las neuronas DA. En consecuencia, reexaminamos los animales ya analizados llegando a la conclusión de que

algunos de los ratones que creíamos homocigotos mutantes de *Pbx1* específicos de las neuronas DA portaban el alelo deleciónado de *Pbx1* de forma ubicua. Del mismo modo, ratones controles genotipados como salvajes para *Pbx1* eran, en realidad, heterocigotos para este alelo. A partir de ese momento, pusimos a punto el genotipado/fenotipado con el objetivo de detectar deleciones inespecíficas. Este trabajo ha supuesto una tarea extra en el diseño de cruces para tratar de minimizar recombinaciones en línea germinal, así como en el genotipado que nos permite, sin embargo, poder llegar a conclusiones sólidas sobre nuestra investigación.

Con todo esto, y tal y como se muestra en los resultados, todos los animales utilizados en los experimentos que contenían el alelo RCE fueron testados, en primer lugar, mediante el análisis del tejido de genotipado bajo la lupa de fluorescencia. De esta manera, previamente al genotipado, se descartaron aquellos que expresaban GFP de forma ubicua. Se trataba de animales en los que el locus RCE había sido recombinado en todas sus células, es decir, la CRE se había expresado en línea germinal y afectado a todas las células. Puesto que encontramos animales *GFP* con y sin CRE en su genotipo, podemos descartar que se trate de una recombinación inespecífica durante el desarrollo embrionario. Lindeberg y sus colaboradores describieron recombinación inespecífica en la línea germinal en esta cepa, coincidiendo con nuestros resultados (Lindeberg et al., 2004). Sin embargo, sin hacer un estudio más detallado, no podemos descartar la posibilidad de que también esté ocurriendo una recombinación inespecífica post-fecundación, de modo que podríamos estar observando la suma de estos dos efectos.

Lindeberg et al. reportaron también que la recombinación ocurría más frecuentemente en los ovocitos que en las espermatogonias, razón por la que desde ese momento todos nuestros cruces se realizaron con hembras que no portaban la CRE en su genotipo, y la recombinasa era aportada a la progenie por el padre. Además, testamos los eventos de recombinación inespecífica mediante PCR para el alelo deleciónado. Esto ha diferenciado dos tipos de animales recombinados inespecíficamente, aquellos que presentan una banda intensa y los que la tienen tenue. Dado que todos los animales que presentan la banda tenue son siempre portadores de la CRE, concluimos que los animales con esta banda provienen de una situación en la que aparece una actividad inespecífica mosaico durante el desarrollo embrionario. Esta recombinación no es un dato nuevo, puesto que en la descripción de la cepa *Th<sup>CRE</sup>* ya se describió la expresión transitoria del promotor de *Th* en tejidos como los folículos pilosos o las glándulas sudoríparas (Lindeberg et al., 2004). Por otro lado, dado que la banda intensa aparece en animales con o sin CRE, pensamos que se trata de animales en los que ha habido una recombinación en la línea germinal dando lugar a que todas las células del animal genotipado presenten la deleción, hecho que provoca que haya más amplificación de la banda nula (más intensa) en la PCR, en comparación con animales mosaico en los que la recombinación sólo ha ocurrido en algunas células del tejido genotipado. Basándonos en el razonamiento expuesto anteriormente, todos los animales con una banda nula tenue deberían presentar CRE. Sin embargo, no todos los animales CRE presentaban alelo deleciónado. Esto puede ser debido a la estocasticidad del fenómeno o a encontrarnos en condiciones limitantes, ya que hay pocas células que expresan

transitoriamente la *Th* durante el desarrollo del dedo y en consecuencia estaríamos en el límite de detección de la PCR.

Por último, es importante mencionar que, a pesar de haber descartado todos aquellos animales que bajo la lupa de fluorescencia expresaban de forma ubicua GFP (y por tanto la CRE se había activado en la línea germinal), en el posterior genotipado para la delección del alelo PBX aún encontramos animales que, a pesar de no ser positivos para GFP bajo la lupa presentaban delección de *Pbx1* en tejido de dedo, donde no hay expresión de *Th*. El hecho de encontrar animales en los que no haya recombinado el locus del RCE pero sí el del *Pbx1* (animales *no verdes* pero con banda en la PCR nula) puede deberse a las diferencias en la longitud de las secuencias entre los sitios *LoxP* que flanquean los dos locis, a la localización cromosómica, a las modificaciones epigenéticas o a la accesibilidad de la CRE a ese ADN (Luo et al., 2020). A pesar de que, en general, la recombinación en los genes situados en el ROSA26 suele tener mejores tasas de recombinación que otros genes, nuestro caso no es un caso aislado. Estudios realizados con la Dlx5/6-Cre en animales con el gen *Clstn3* floxeado y el reportero *Ai32* en el locus *Rosa 26* (similar al de nuestra cepa) muestran un porcentaje en la recombinación de un 85.3% en el caso del gen *Clstn3* y un 46.2% en el caso del *Ai32* (Luo et al., 2020). Es decir que, al igual que en nuestra cepa, se observa un porcentaje menor en el caso del reportero que en el otro gen floxeado. Además, también se ha reportado que incluso en el mismo locus (*ROSA 26*), la recombinación para dos reporteros es distinta en función de la longitud que separa las secuencias *Flox* (Van Hove et al., 2020), de modo que nuestra cepa no es un caso aislado.

En resumen, nuestros resultados son un ejemplo de la importancia de comprobar y caracterizar bien las cepas *Cre-LoxP*, incluyendo de manera sistemática, la detección de la recombinación inespecífica en los genotipados y adoptando estrategias de cruce que reduzcan al máximo estos fenómenos.

### **La cepa *Pbx1<sup>Th</sup>* elimina *Pbx1* específicamente en los estadios tardíos de diferenciación dopaminérgica**

La bibliografía muestra que la transcripción de *Th* se activa en los últimos estadios de migración de los neuroblastos, por lo tanto, es lógico que no encontráramos células GFP positivas (del alelo recombinado RCE) ni en la SEZ ni en el RMS, aunque sí en el BO. Además, también pudimos comprobar que en nuestro modelo animal la eliminación de *Pbx1* está ocurriendo en las etapas terminales de la diferenciación y se mantiene su expresión en progenitores y neuroblastos en migración. En consecuencia, comprobamos que no hay diferencias en el número de células progenitoras (KI67 positivas) y migradoras (DCX positivas) entre animales control y animales mutantes (Grebbin et al., 2016). Así mismo, el constructo del alelo floxeado funciona como se esperaba, puesto que las células GFP (alelo recombinado RCE) en los animales con el gen *Pbx1* floxeado presentaban una reducción muy drástica en la

expresión de PBX1a. En definitiva, se demuestra que nuestra estrategia es adecuada para estudiar específicamente el papel de *Pbx1* en la diferenciación terminal dopaminérgica.

### **PBX1 es necesario para la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO pero no para su supervivencia**

La expresión de *Pbx1* se mantiene durante todo el proceso neurogénico de las neuronas DA del BO, desde progenitores hasta neuronas diferenciadas. El estudio de los mutantes de *Pbx2*, y *Pbx1* condicional mostró que es específicamente *Pbx1*, y no *Pbx2*, el que además de tener un papel imprescindible en el desarrollo temprano de la neuronas (Grebbin et al., 2016), también lo tiene en la diferenciación así como en el mantenimiento del fenotipo DA. A pesar de que en otros contextos actúan ambos de una manera redundante (Capellini et al., 2008; Ferretti et al., 2011; Grebbin et al., 2016; Koss et al., 2012), concluimos que en el caso de la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO, *Pbx2* no parece tener un papel imprescindible.

Por otra parte, los estudios del linaje nos indican que la gran mayoría de las neuronas que eliminan *Pbx1* no mueren, al contrario de lo que ocurre con la delección de *Pbx1* en los progenitores (Grebbin et al., 2016). Es decir, al eliminar *Pbx1* en los estadios finales de diferenciación, las neuronas dejan de expresar TH, pero permanecen ahí, dado que encontramos el mismo número de células GFP (alelo RCE reportero) positivas entre controles y mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*.

La ausencia de muerte en mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* fue comprobada de forma alternativa mediante inyecciones de BrdU en animales adultos. Los datos obtenidos en este experimento muestran que no hay variación en el número de células BrdU positivas entre las dos condiciones, controles y mutantes. Esto concuerda con los análisis realizados al linaje dopaminérgico, en cuyos resultados observamos que las células que dejan de expresar TH no mueren. En la mayoría de los mutantes para FT que especifican las neuronas DA del bulbo no se ha determinado si la neurona permanece allí. La excepción la constituye *Pax6*, puesto que en mutantes condicionales en los que se elimina el factor de forma tardía se observa una disminución de cristalina  $\alpha 1$ , responsable de la inhibición de la activación de la procaspasa3 y, por lo tanto, las neuronas sí que mueren (Ninkovic et al., 2010). Es decir, a diferencia de *Pax6*, *Pbx1* no es necesario para la supervivencia de las neuronas DA del BO. Llama la atención que estos datos contrastan también con los encontrados para *Pbx1/3* en las neuronas DA del mesencéfalo, dado que en los dobles mutantes además de defectos en especificación DA existe una muerte neuronal exacerbada (Villaescusa et al., 2016). Esto coincide con los efectos observados en pacientes de Parkinson, donde hay defectos de neurona DA en sustancia negra pero no en el bulbo, aunque se presentan defectos funcionales en ambas zonas (Pifl et al., 2017).

Así mismo, los resultados obtenidos generan nuevas preguntas como las que siguen: ¿Cuáles son los mecanismos por los que *Pbx1* regula la supervivencia en neuroblastos migradores, pero no lo hace en neurona maduras? ¿Por qué no se expresa *Th* hasta los estadios finales de migración a pesar de que *Pbx1* y otros FT necesarios en su especificación como *Dlx*, *Pax6*, u otros se expresen antes? A fecha de hoy no tenemos respuestas a estas preguntas, una hipótesis es que el contexto celular es diferente, es decir, que el neuroblasto en migración puede expresar otros FT u otras proteínas distintas al neuroblasto en diferenciación o neurona madura, y estos lo hacen más o menos dependientes de la acción de *Pbx1*. Otra hipótesis no mutuamente excluyente, es que distintas isoformas de *Pbx1* medien distintas acciones. De hecho, los resultados obtenidos por la Dra. Remesal en nuestro laboratorio sugieren, en parte, que esto puede ser de este modo. Los progenitores situados en la SEZ expresan *Pbx1b* pero no *Pbx1a*. Sin embargo, los neuroblastos migradores positivos para DCX expresan ambas isoformas, mientras que las neuronas maduras DA dejan de expresar *Pbx1b*, pero mantienen *Pbx1a*. Además, el fenotipo observado en los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>* es rescatado específicamente por la isoforma *Pbx1a* y no por la *Pbx1b* (ANEXO, Remesal et al., 2020).

### **PBX1 es necesario para la diferenciación tanto de las neuronas dopaminérgicas embrionarias, como de las generadas durante la etapa adulta.**

El estudio de las neuronas DA del BO generadas durante la etapa embrionaria reveló que en el día del nacimiento (P0) ya se observa un descenso de las células TH positivas. Es decir, las neuronas embrionarias necesitan la expresión de *Pbx1* para poder diferenciarse correctamente. Esta disminución podría ser suficiente para explicar el descenso del número de células DA observado en adultos, sin embargo, los análisis de las neuronas provenientes de la neurogénesis adulta (mediante inyecciones de BrdU) revelan que estas también se ven reducidas al eliminar PBX1. Es decir, a pesar de generarse en momentos diferentes y tener morfologías y propiedades electrofisiológicas distintas, *Pbx1* es imprescindible para la diferenciación terminal de ambos tipos de neuronas DA del BO. Además, los análisis del resto de interneuronas indican que la eliminación de este FT no tiene efectos celulares no-autónomos en los linajes CR y CB.

### **PBX1 actúa posteriormente o en paralelo a otros factores de transcripción implicados en la especificación dopaminérgica.**

Trabajos previos han descrito varios FT implicados en la adquisición del fenotipo DA en el BO, COUP-TF1, DLX1/2, ER81, PAX6 y MEIS2 (Agoston et al., 2014; Bovetti et al., 2013; Hack, et al., 2002; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007; Zhou et al., 2015; Brill et al., 2008; Cave et al., 2010). En consecuencia, decidimos investigar si PBX1 ejercía algún tipo de regulación sobre estos FT analizando la expresión de estas proteínas en los mutantes para *Pbx1*. Nuestros resultados muestran que *Pbx1* no es necesario para la expresión de ninguno de estos factores,

indicando que actúa o bien en paralelo o posteriormente. La única excepción es el factor MEIS2, nuestros datos indican que *Pbx1* no es necesario para su transcripción, pero sí para su estabilidad de forma similar a lo previamente descrito en otros sistemas.

Las secuencias reguladoras son activadas por combinaciones complejas de FT, en este trabajo hemos determinado que PBX1 se une a distintas regiones aguas arriba de la transcripción de *Th*, así mismo, se ha determinado con anterioridad que *Pax6*, *Meis2*, *Er81* y *Dlx* también se unen a regiones reguladoras de *Th*, por tanto, en base a estos resultados proponemos un modelo en el que la combinación de, al menos, estos 6 FT (PBX1, COUP-TF1, ER81, PAX6, DLX y MEIS2) actúa en paralelo y regula de forma directa la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO. Recientemente se han descrito combinaciones igualmente complejas en la regulación terminal de la neurona serotoninérgica HSN del gusano (Lloret-Fernández et al., 2018).

Además, nuestro análisis detallado de la expresión de estos FT en el mutante de *Pbx1* nos permitió obtener algunas conclusiones adicionales. Se ha descrito que COUP-TF1 se expresa mayoritariamente en las neuronas DA generadas en la etapa postnatal (Bovetti et al., 2013). Dado que en mutantes *Pbx1* disminuyen las células, tanto GFP+/TH+/COUP-TF1 como de células GFP+/TH+/ COUP-TF1+, concluimos que las células que eliminan *Pbx1* dejan de expresar TH independientemente de la expresión de COUP-TF1. En otras palabras, la pérdida de PBX1 en las células no puede ser compensada por la presencia de este FT. Estos resultados están de acuerdo con nuestra observación de que *Pbx1* es necesario para la especificación tanto de las neuronas DA embrionarias como de las adultas. (Bovetti et al., 2013).

Por otra parte, hemos observado que en mutantes para *Pbx1* las células GFP+ (linaje DA) no pierden la expresión de PAX6 que, a su vez, regula la expresión de cristalina  $\alpha$ , necesaria para la supervivencia de las neuronas DA del OB (Ninkovic et al., 2010). Por lo tanto, estos resultados podrían explicar, en parte, por qué las células del linaje DA no mueren en los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*. Además, hemos observado que los mutantes de *Pbx1* muestran también un menor número de células GFP+/TH+/ PAX6- lo que indica que de forma similar a la población COUP-TF1 negativa, *Pbx1* es necesario para la expresión de TH tanto en la población de células PAX6 positivas como en el 20% de células dopaminérgicas en las que no detectamos la expresión de PAX6.

### **PBX1 ejerce como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio.**

Estudios previos realizados en *C. elegans* han determinado que los selectores terminales se unen directamente a las regiones reguladoras activando la expresión de los genes efectores de cada tipo neuronal (Flames & Hobert, 2009). Los datos obtenidos por la Dra. Miren Maicas sobre la unión de *Pbx1* en ambas regiones reguladoras del gen de *Th*, al igual que otros selectores terminales, indica que este FT regula la expresión de *Th* de manera directa (ANEXO, Remesal et al., 2020). Esta observación coincide con lo que se ha determinado en *C. elegans*,

donde CEH-20/PBX1, AST-1/ETV1 y CEH43/DLX actúan conjuntamente para activar directamente la expresión del gen *Th* (Doitsidou et al., 2013). Por esta razón, no es de extrañar que el análisis de los niveles de ARNm muestre que la disminución observada a nivel de proteína viene precedida por la disminución en sus niveles de ARNm de *Th*.

En base al modelo de terminal selector, nuestra predicción era que la pérdida de función de *Pbx1* afectaría de forma general la expresión de varios genes efectores de las neuronas DA. En efecto, nuestros análisis de qPCR mostraron que además de *Th*, la mayoría de genes de la vía de la dopamina (*Ddc*, *Vmat2* y *Dat*) ven mermados sus niveles de expresión en ausencia de *Pbx1*, reforzando la idea de que actúa como selector terminal en estas neuronas. La excepción a esta disminución la presenta *Gch1* cuya expresión no se ve afectada en los mutantes *Pbx1<sup>Th</sup>*. Se ha descrito previamente una expresión muy baja de este gen, prácticamente indetectable en comparación al resto de genes de la vía de la dopamina (Cave et al., 2010; Ichinose et al., 1994). Por esta razón, pensamos que es posible que no seamos capaces de detectar las diferencias con esta técnica. Así mismo, estos datos pueden deberse, igualmente, a que este gen sea el único de la ruta que no sea regulado por *Pbx1* o a que otros FT actuando en las secuencias reguladoras de *Gch1* puedan compensar la falta de *Pbx1*.

Es importante mencionar que nuestros resultados son el primer ejemplo que muestra coregulación de los genes de la vía de DA por un FT, dado que en estudios anteriores o bien todo el análisis se centraba exclusivamente en el efecto sobre *Th* (Agoston et al., 2014; Bovetti et al., 2013; Brill et al., 2008; Ninkovic et al., 2010) o bien no se encontró diferencias en la expresión de otros genes de la vía de DA excepto *Th* (Cave et al., 2010). Por consiguiente, estos resultados confirman el papel de *Pbx1* como selector terminal de las neuronas DA del BO.

### **PBX1 tiene un papel en la maduración morfológica de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio.**

La morfología de las neuronas es esencial a la hora de determinar cómo funcionan, cómo se comunican y cómo procesan la información (Poirazi & Mel, 2001). Por esta razón, determinar los mecanismos que regulan la adquisición de estas características nos acerca más al conocimiento de la función cerebral y, con ello, a poder entender algunas patologías que pueden tener grandes repercusiones sociales. Actualmente se conoce muy poco sobre los FT que regulan la morfología de las neuronas y cuales con sus dianas en el genoma. En *C. elegans*, se ha estudiado en detalle la acción directa de los selectores terminales en la activación de la expresión de genes efectores como receptores de neurotransmisores, canales iónicos o enzimas de biosíntesis de neurotransmisores, sin embargo, no se ha estudiado con detalle si también regulan la morfología neuronal.

En nuestro trabajo hemos observado que PBX1 es necesario para la correcta adquisición de una morfología madura en las neuronas DA del BO, puesto que las neuronas de los mutantes

*Pbx1<sup>Th</sup>* exhiben menos dendritas primarias, menos ramificaciones totales, una menor longitud, un menor volumen y una distribución diferente de las ramificaciones. En definitiva, a grandes rasgos parece que en ausencia de *Pbx1* las neuronas son más sencillas, delgadas e inmaduras. Estos datos concuerdan con la disminución de fibras GFP+ (del alelo reportero RCE) observadas en los glomérulos de los mutantes, de modo que podemos concluir que, al igual que lo que se ha observado recientemente para el selector terminal *Lmx1b* en las neuronas serotoninérgicas (Donovan et al., 2019) o *Dlx1/2* en las interneuronas GABAérgicas (Pla et al., 2018), *Pbx1* también controla el desarrollo de algunas características morfológicas de las neuronas DA del BO. Destacamos que, hasta el momento, no se conocen los genes efectores que controlan la adquisición de la morfología de este tipo neuronal. Sin embargo, se sabe que *Pbx1a* orquesta el desarrollo axonal de las neuronas DA del mesencéfalo mediante la regulación del receptor de netrina DDC (Sgadò et al., 2012), por esta razón, podría ser interesante determinar si este receptor está implicado, de igual modo, en el correcto desarrollo morfológico de las neuronas DA del BO y si su expresión es regulada también por PBX1 en este caso.

La alteración en la morfología de las dendritas, incluyendo el cambio en los patrones de ramificación como los que observamos en nuestros mutantes de *Pbx1*, se ha relacionado con numerosos trastornos del neurodesarrollo (Garey, 2010; Supekar et al., 2013) y enfermedades neurodegenerativas (Cochran, Hall, & Roberson, 2014; Kweon, Kim, & Lee, 2017). Por esta razón, entender los factores que influyen en la correcta adquisición de la morfología neuronal, así como entender los efectos funcionales a los que dan lugar es crucial a la hora de avanzar en el conocimiento de nuestro cerebro. Consecuentemente, creemos que sería interesante realizar estudios electrofisiológicos de las neuronas que carecen de *Pbx1* para estudiar cómo se ve comprometida su funcionalidad.

### **PBX1 reprime destinos celulares no dopaminérgicos en el linaje dopaminérgico**

Conforme se progresa en el desarrollo embrionario, la potencialidad de las células que permite generar distintos tipos celulares se va limitando en el tiempo, este concepto fue plasmado en el popular "paisaje de Waddington" que representa una bola rodando colina abajo que va restringiendo su capacidad de pasar de un valle a otro. Los mecanismos por los cuales una célula restringe su potencialidad están relacionados con cambios en la estructura de cromatina, aunque se conoce poco sobre cuál es el efecto de los FT en mediar estas restricciones de plasticidad. Estudios recientes (de nuevo en *C. elegans*) han mostrado un papel para los selectores terminales en la represión de genes efectores de otros tipos neuronales (Kerk, Kratsios, Hart, Mourao, & Hobert, 2017). Curiosamente, la pérdida de *unc-3*, selector terminal de las motoneuronas en *C. elegans*, cambia las dianas transcripcionales de LIN-39 produciendo defectos en locomoción asociados a una incorrecta especificación y a la expresión ectópica de genes (Feng et al., 2020). Asimismo se ha descrito que algunos selectores terminales disminuyen

la plasticidad requerida en las reprogramaciones llevadas a cabo mediante FT exógenos (Patel & Hobert, 2017).

Volviendo al modelo del paisaje de Waddington, hipotetizamos que la falta de un selector terminal para un tipo específico de neurona podría suponer no solo la pérdida de expresión de genes efectores sino también una mayor flexibilidad para adquirir fenotipos "molecularmente" cercanos, es decir "saltar" a un "valle cercano." En nuestro caso, decidimos estudiar alguno de los fenotipos alternativos a la dopamina, CB y CR, en los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*, puesto que los progenitores de estas subpoblaciones se localizan cerca de los progenitores DA y comparten la expresión de algunos FT. Nuestros resultados mostraron que mientras que las células del linaje DA en los mutantes *Pbx1* no presentan ninguna alteración en la expresión de CB, sí muestran un aumento de casi tres veces más de células del linaje DA positivas para CR. En definitiva, nuestros resultados indican que *Pbx1*, aparte de definir las propiedades estructurales y funcionales de las neuronas DA del BO, también restringe el fenotipo CR.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo responsable de la expresión ectópica de CR que observamos en nuestros mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*, decidimos estudiar la expresión de dos FT inductores de la identidad CR. Los mutantes tanto de *Zic1/2* como de *Sp8* presentan un fenotipo con una disminución de las neuronas CR positivas de modo que podrían actuar como selectores terminales de este destino celular, asimismo concomitante con la pérdida de CR muestran un aumento de neuronas TH positivas ectópicas (Benito et al., 2018; Tiveron et al., 2017). A pesar de la complementariedad de los fenotipos observados entre *Pbx1* y estos factores, no observamos que exista una desregulación de estos factores en los mutantes *Pbx1*.

En el caso de *Zic2* encontramos que tan solo el 50% co-expresan CR. Estos datos contrastan con los observados en otros trabajos en los que se utilizó un anticuerpo que reconocía todos los genes *Zic* y detectaron que alrededor de un 80% de células *Zic* co-expresan CR. Por esta razón, pensamos que nuestros análisis parten de la limitación de no detectar todos los FT de la familia *Zic*. Nuestros datos revelan que la expresión ectópica de CR en los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* no viene mediada por la desregulación de *Zic2*. Sin embargo, en base a las limitaciones expuestas anteriormente, no podemos asegurar que el fenotipo observado no se deba a la desregulación de *Zic1*. En efecto, no sería de extrañar que así fuera, ya que en estudios anteriores se reporta un aumento del número de neuronas CR positivas al sobreexpresar específicamente *Zic1*, mientras que el RNA de interferencia contra *Zic1* disminuye este tipo neuronal aumentando el número de neuronas dopaminérgicas (Tiveron et al., 2017). Consecuentemente, pensamos que en el futuro sería interesante realizar el estudio de la expresión de este FT en nuestros mutantes mediante un anticuerpo pan*Zic* o un anticuerpo específico para *Zic1*.

Por otro lado, el porcentaje de expresión de *Sp8* en la células CR+ de los controles (91%) coincide con lo previamente descrito por otros autores (97%) (Waclaw et al., 2006). Sorprendentemente observamos que en controles casi el 50% de las células del linaje DA (GFP positivas) expresan *Sp8*. A pesar de su implicación en el mantenimiento del fenotipo CR la expresión de *Sp8* no se ve alterada en los mutantes *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>*, en consecuencia, *Pbx1* no

reprime la expresión de *Sp8*. Basándonos en estos resultados, no parece probable que dicho FT esté implicado en la expresión ectópica de CR observada en los mutantes para *Pbx1*. Alternativamente, podría darse el caso de que *Pbx1* no reprima la expresión de *Sp8* pero que sí impida su unión a secuencias reguladoras del gen CR, para testar esta hipótesis sería necesario realizar experimentos de CHIP en células del linaje DA de controles y mutantes.

En consecuencia, queda abierta la posibilidad de que *Pbx1* actúe directamente como represor de CR. Previamente y en otros contextos, ya se había descrito que este FT podía ejercer un papel dual tanto de activador como de represor (Asahara, Dutta, Kao, Evans, & Montminy, 1999; Saleh, Rambaldi, Yang, & Featherstone, 2000). Además, es importante mencionar que precisamente en las neuronas DA del mesencéfalo, *Pbx1* controla la especificación de este tipo celular activando directamente *Pitx3* y reprime fenotipos alternativos mediante la inhibición, directa o indirecta, de genes como *Onecut2* (Villaescusa et al., 2016).

En definitiva, nuestros resultados muestran que los selectores terminales tienen un papel importante no solo en mediar activación de destinos neuronales específicos sino también en la represión de marcadores de otros tipos neuronales, aunque el mecanismo de dicha represión es aún desconocido.

### **Los mutantes de *Pbx1*<sup>Th</sup> muestran déficits en el comportamiento olfativo**

Los análisis realizados a los mutantes *Pbx1*<sup>Th</sup> confirmaron que no exhiben ninguna alteración motora *per se* que pueda repercutir en el resto de experimentos comportamentales. En primer lugar, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra funcionan con normalidad, dado que los animales no presentan diferencias en la ejecución de la prueba del poste y tardan el mismo tiempo en bajar. En segundo lugar, el test de campo abierto muestra que los ratones mutantes para *Pbx1* tienen una locomoción igual a la de los controles en todos los parámetros analizados. Por último, hemos comprobado que dichos animales no experimentan un grado de ansiedad superior al exponerse a nuevos objetos y, por tanto, la exposición a un bastoncillo no debería alterar la ejecución del resto de test olfativos.

El sentido del olfato permite a los animales reconocer y discriminar con gran sensibilidad y exactitud gran cantidad de moléculas presentes en el aire. Nuestros experimentos de umbral olfativo demuestran que los defectos de especificación de las neuronas DA de los animales mutantes para *Pbx1*<sup>Th</sup> tienen una repercusión funcional en el sentido de que estos animales presentan un umbral de percepción del olor alterado. Los ratones control detectan la concentración más baja de geraniol a la que son expuestos (1nM), sin embargo, los mutantes no parecen responder a esta concentración y exhiben una mayor variabilidad de respuestas entre ellos.

El ensayo de habituación/deshabituación es una tarea de discriminación olfativa utilizada durante décadas para evaluar la función olfativa de los animales. Los animales son expuestos

repetidamente a un mismo olor hasta que se introduce otro nuevo. En los ensayos realizados a animales control de nuestros experimentos, observamos que presentan una capacidad de habituación similar a la reportada anteriormente en este tipo de ensayos con ratones (Coronas-Samano, Ivanova, & Verhagen, 2016; Tillerson et al., 2006; Wesson et al., 2011; Zhang et al., 2019). Al detectar el primer olor (la menta) los ratones aumentan su exploración mientras que en las siguientes exposiciones se habitúan a este olor disminuyendo el tiempo de exploración hasta los niveles basales iniciales observados con los bastoncillos de aceite. A este fenómeno se le denomina adaptación. Asimismo, también presentan una correcta deshabitación (o discriminación) cuando se les expone a un nuevo olor (Eugenol<sup>1</sup>), indicando que son capaces de discriminar los olores. A diferencia de los controles, los animales mutantes para *Pbx1* respondieron de manera anómala en este ensayo, puesto que, en primer lugar, no observamos respuesta en la exposición al primer olor y, en segundo lugar, tampoco parecieron detectar el cambio de la menta al eugenol.

El hecho de que los mutantes no sean capaces de detectar la menta tras el aceite es sorprendente, puesto que todos los animales mutantes analizados en el test de umbral eran capaces de detectar el geraniol mínimo a 11nM. Sin embargo, no es de extrañar que nuestros animales mutantes no aumenten su exploración al cambiar de la menta al eugenol, dado que se han descrito previamente que animales mutantes para DAT tienen déficits en la discriminación olfativa (Tillerson et al., 2006) y el bloqueo de los receptores D1 en el bulbo olfatorio hace que los ratones no sean capaces de discriminar moléculas similares que los controles si son capaces de distinguir (Yue, Cleland, Pavlis, & Linster, 2004). De hecho, también se ha visto que la alteración de la neurogénesis repercute en una alteración de la discriminación de olores (Gheusi et al., 2000). Así mismo, parece que es necesario un perfecto equilibrio de neuronas DA para la discriminación de olores puesto que otros autores han asociado un aumento de las neuronas TH del BO con una peor discriminación olfativa (Serguera, Triaca, Kelly-Barrett, Banchaabouchi, & Minichiello, 2008).

Con todo esto, podemos concluir que el déficit de neuronas DA en el BO provocado por la ausencia de PBX1 durante la diferenciación terminal, tiene un efecto funcional a nivel olfativo. Es difícil determinar cuáles son las funcionalidades olfativas que están específicamente afectadas en estos animales, ya que, en los ensayos de habituación/deshabitación al no detectar la menta tras el aceite no podemos determinar si son capaces de presentar habituación a lo largo de las 4 exposiciones al mismo olor. De la misma manera, tampoco hemos podido concluir si son capaces de discriminar los olores. Serían necesarios más estudios con otros paradigmas más sofisticados para poder esclarecer estos aspectos así como testar otros comportamientos asociados a la olfacción como, por ejemplo, la memoria espacial de olores que también se ha visto relacionada con alteraciones en las neuronas DA del BO (Zhang et al., 2019).

### Conservación evolutiva de los programas de diferenciación terminal neuronal

En *C. elegans* los FT CEH-20/PBX1, AST1/ETV1 y CEH-43/DLX2 ejercen de selectores terminales de las neuronas DA (Doitsidou et al., 2013; Flames y Hobert, 2009). Nuestra caracterización del papel de PBX1 como selector terminal, junto con los estudios previos que determinan el papel de ETV1 y DLX2 en la diferenciación terminal de las neuronas DA del BO (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010; Flames y Hobert, 2009) sugieren que el programa de regulación de la diferenciación terminal está conservado evolutivamente. Ciertamente, tal y como se ha comentado previamente *Pax6*, *Meis2* y *Coup-tf1* están implicados en la diferenciación terminal DA del ratón y estudios de nuestro laboratorio indican que los ortólogos para estos FT (*vab-3*, *unc-62* y *unc-55*) ejercen el mismo papel en *C. elegans* (Jimeno-Martín et al., 2020). Todos estos datos en conjunto indican que las neuronas DA del BO de mamíferos y las del nemátodo se encuentran profundamente conservados (concepto denominado en inglés *deep homology*). La homología profunda se refiere a la relación entre células y estructuras distantes entre especies que tienen un programa genético regulador común (Shubin, Tabin, & Carroll, 2009). Este fenómeno evolutivo también ha sido propuesto previamente en otros tipos neuronales y estructuras, por ejemplo con las neuronas serotoninérgicas del rafe del ratón y la HSN de *C. elegans* (Lloret-Fernández et al., 2018), el desarrollo del palio en ratones y cuerpos pedunculados también en nemátodos (Tomer, Denes, Tessmar-Raible, & Arendt, 2010) o de los circuitos sensoriales entre vertebrados y gasterópodos (Nomaksteinsky et al., 2013). La identificación y estudio de los programas de regulación génica conservados en diferentes grupos animales permite entender mejor el origen de las neuronas y del sistema nervioso en general, contribuyendo así a un mayor conocimiento del cerebro, de los mecanismos que subyacen en la aparición de nuevos tipos neuronales en evolución y de las enfermedades derivadas de su alteración.



# **CONCLUSIONES**

En esta tesis hemos llevado a cabo un estudio exhaustivo para determinar el papel de *Pbx1* en la diferenciación terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten formular las siguientes conclusiones:

1. La cepa *Pbx1<sup>Th-RCE</sup>* permite estudiar el papel de Pbx1 durante la diferenciación terminal dopaminérgica ya que elimina el FT de manera eficiente en neuroblastos en diferenciación del linaje dopaminérgico sin afectar a la neurogénesis embrionaria o adulta ni a los neuroblastos migradores.
2. La cepa *Pbx1<sup>Th</sup>* presenta recombinaciones inespecíficas durante la formación de los precursores germinales y en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario. Los animales que presentan el alelo deleciónado pueden ser detectados mediante fenotipado y genotipado de manera efectiva.
3. La eliminación de *Pbx1* en el linaje dopaminérgico, pero no de *Pbx2*, provoca una pérdida del marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa tanto en las neuronas generadas durante la etapa embrionaria como en las nacidas en la etapa adulta. Además, el fenotipo del mutante *Pbx1<sup>Th</sup>* no se ve incrementado en el doble mutante con *Pbx2*.
4. Las células dopaminérgicas que eliminan *Pbx1* no mueren y se mantienen en la zona periglomerular del bulbo olfatorio. En estas células se observa una expresión ectópica del marcador Calretinina, que sugiere que *Pbx1*, no sólo promueve el fenotipo dopaminérgico, sino que también reprime fenotipos de linajes cercanos no deseados.
5. PBX1 actúa posteriormente o en paralelo a otros FT implicados en el fenotipo dopaminérgico, DLX2, ETV1, COUP.TF1, PAX6, y MEIS2. Sin embargo, PBX1 es necesario para la estabilización de MEIS2, tal y como se ha descrito en otros sistemas.
6. PBX1 ejerce como selector terminal de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio, regulando la expresión de varios de sus genes efectores dopaminérgicos y, al menos en el caso de *Th*, su acción es directa.
7. PBX1 es necesario para la adquisición de una correcta morfología neuronal y su pérdida da lugar a unas neuronas más simples e inmaduras. Estos resultados expanden las funciones de un selector terminal.
8. La pérdida de neuronas dopaminérgicas provocada por la eliminación de *Pbx1* durante la diferenciación terminal provoca una alteración en la función olfativa.
9. El papel de los factores de transcripción PBX en la especificación dopaminérgica parece estar conservado evolutivamente desde los nemátodos hasta los ratones.



# **BIBLIOGRAFÍA**

- Adam, Y., & Mizrahi, A. (2011). Long-term imaging reveals dynamic changes in the neuronal composition of the glomerular layer. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(22), 7967–7973.
- 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*, *141*(1), 28–38.
- Alizadeh, R., Hassanzadeh, G., Soleimani, M., Joghataei, M., Siavashi, V., Khorgami, Z., & Hadjighassem, M. (2015). Gender and age related changes in number of dopaminergic neurons in adult human olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *69*(1), 1–6.
- 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.
- Alqadah, A., Hsieh, Y.-W., Vidal, B., Chang, C., Hobert, O., & Chuang, C.-F. (2015). Postmitotic diversification of olfactory neuron types is mediated by differential activities of the HMG-box transcription factor SOX-2. *The EMBO Journal*, *34*(20), 2574–2589.
- Alvarez-Buylla, A., Kohwi, M., Nguyen, T. M., & Merkle, F. T. (2008). The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *73*(1), 357–365.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., & Rubenstein, J. L. R. (1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. *Science*, *278*(5), 474–476.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., & Rubenstein, J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, *128*(3), 353–363.
- Angelo, K., Rancz, E. A., Pimentel, D., Hundahl, C., Hannibal, J., Fleischmann, A., ... Margrie, T. W. (2012). A biophysical signature of network affiliation and sensory processing in mitral cells. *Nature*, *488*(7411), 375–378.
- Antal, M., Eyre, M., Finklea, B., & Nusser, Z. (2006). External tufted cells in the main olfactory bulb form two distinct subpopulations. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(4), 1124–1136.
- 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. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(12), 8219–8225.
- Aspland, S. E., Bendall, H. H., & Murre, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*, *20*(40), 5708–5717.
- 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.
- Azevedo, F., Carvalho, L., Grinberg, L., Farfel, J., Ferretti-Rebustini, R., Leite, R., ... Herculano-Houzel, S. (2009). Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-Up Primate Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *513*(1), 532–541.
- Bacon, C., Schneider, M., Le Magueresse, C., Froehlich, H., Sticht, C., Gluch, C., ... Rappold, G. A. (2015). Brain-specific Foxp1 deletion impairs neuronal development and causes autistic-

- like behaviour. *Molecular Psychiatry*, 20(5), 632–639.
- 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.
- Baker, N. E., & Brown, N. L. (2018). All in the family: proneural bHLH genes and neuronal diversity. *Development*, 145(9), 159426-159429
- Banerjee, A., Marbach, F., Anselmi, F., Koh, M. S., Davis, M. B., Garcia da Silva, P., ... Albeanu, D. F. (2015). An Interglomerular Circuit Gates Glomerular Output and Implements Gain Control in the Mouse Olfactory Bulb. *Neuron*, 87(1), 193–207.
- Barnes, I. H. A., Ibarra-Soria, X., Fitzgerald, S., Gonzalez, J. M., Davidson, C., Hardy, M. P., ... Frankish, A. (2020). Expert curation of the human and mouse olfactory receptor gene repertoires identifies conserved coding regions split across two exons. *BMC Genomics*, 21(1), 196
- 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.
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., & LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(32), 10411–10418.
- Bendahmane, M., Ogg, M. C., Ennis, M., & Fletcher, M. L. (2016). Increased olfactory bulb acetylcholine bi-directionally modulates glomerular odor sensitivity. *Scientific Reports*, 6(1), 25808.
- Benito, N., Gaborieau, E., Sanz Diez, A., Kosar, S., Foucault, L., Raineteau, O., & De Saint Jan, D. (2018). A pool of postnatally generated interneurons persists in an immature stage in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 38(46), 9870–9882.
- Bissonette, G. B., & Roesch, M. R. (2016). Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes, Brain, and Behavior*, 15(1), 62–73.
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 194–202.
- Bonzano, S., Bovetti, S., Gendusa, C., Peretto, P., & De Marchis, S. (2016). Adult born olfactory bulb dopaminergic interneurons: Molecular determinants and experience-dependent plasticity. *Frontiers in Neuroscience*, 10(MAY), 1–8.
- Borisovska, M., Bensen, A. S. L., Chong, G., & Westbrook, G. L. (2013). Distinct modes of dopamine and GABA release in a dual transmitter neuron. *Journal of Neuroscience*, 33(5), 1790–1796.
- 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*, 140(24), 4850–4859.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta 3rd, M. R., & Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(48), 15245–15257.
- Brill, J., Shao, Z., Puche, A. C., Wachowiak, M., & Shipley, M. T. (2016). Serotonin increases

- synaptic activity in olfactory bulb glomeruli. *Journal of Neurophysiology*, 115(3), 1208–1219.
- Brill, M. S., Snapyan, M., Wohlfrom, H., Ninkovic, J., Jawerka, M., Mastick, G. S., ... Götz, 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.
- 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(4), 435–445.
- Briscoe, J., & Small, S. (2015). Morphogen rules : design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, 142 (1) 3996–4009.
- Brunert, D., Tsuno, Y., Rothermel, M., Shipley, M. T., & Wachowiak, M. (2016). Cell-Type-Specific Modulation of Sensory Responses in Olfactory Bulb Circuits by Serotonergic Projections from the Raphe Nuclei. *The Journal of Neuroscience*, 36(25), 6820–6835.
- Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3), 497–521.
- 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.
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., & Lledo, P.-M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 6(5), 507–518.
- Cavarretta, F., Burton, S. D., Igarashi, K. M., Shepherd, G. M., Hines, M. L., & Migliore, M. (2018). Parallel odor processing by mitral and middle tufted cells in the olfactory bulb. *Scientific Reports*, 8(1), 70-75.
- Cave, J. W., Akiba, Y., Banerjee, K., Bhosle, S., Berlin, R., & Baker, H. (2010). Differential regulation of dopaminergic gene expression by Er81. *Journal of Neuroscience*, 30(13), 4717–4724.
- Cave, J. W., & Baker, H. (2009). Dopamine systems in the forebrain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 651(1), 15–35.
- Chae, H., Kepple, D. R., Bast, W. G., Murthy, V. N., Koulakov, A. A., & Albeanu, D. F. (2019). Mosaic representations of odors in the input and output layers of the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 22(8), 1306–1317.
- Chand, A. N., Galliano, E., Chesters, R. A., & Grubb, M. S. (2015). A distinct subtype of dopaminergic interneuron displays inverted structural plasticity at the axon initial segment. *Journal of Neuroscience*, 35(4), 1573–1590.
- Chen, B., Schaevitz, L. R., & McConnell, S. K. (2005). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17184–17189.
- Chen, C. L., Broom, D. C., Liu, Y., De Nooij, J. C., Li, Z., Cen, C., ... Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron*, 49(3), 365–377.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), 942–946.

- Cochran, J. N., Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2014). The dendritic hypothesis for Alzheimer's disease pathophysiology. *Brain Research Bulletin*, *103* (1), 18–28.
- Coré, N., Erni, A., Hoffmann, H. M., Mellon, P. L., Saurin, A. J., Beclin, C., & Cremer, H. (2020). Stem cell regionalization during olfactory bulb neurogenesis depends on regulatory interactions between Vax1 and Pax6. *ELife*, *9*(1), e58215.
- Coronas-Samano, G., Ivanova, A. V., & Verhagen, J. V. (2016). The Habituation/Cross-Habituation Test Revisited: Guidance from Sniffing and Video Tracking. *Neural Plasticity*, *2016* (2016), 9131284.
- Cucarella, C. (2019). Actividad inesperada de Cre en tejido germinal y durante el desarrollo embrionario. *Animales de Laboratorio*, *83* (1), 33–38.
- Dardaei, L., Longobardi, E., & Blasi, F. (2014). Prep1 and Meis1 competition for Pbx1 binding regulates protein stability and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(10), 896–905.
- David, L. S., Schachner, M., & Saghatelian, A. (2013). The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R affects adult but not developmental neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, *33*(25), 10324–10339.
- Dellovade, T. L., & Pfaff, D. W. (1998). Olfactory bulb development is altered in small-eye ( Sey ) mice. *Europe PMC*. *402*(3), 402–418.
- Deneris, E. S., & Hobert, O. (2014). Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. *Nature Neuroscience*, *17*(7), 899–907.
- 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*, *27*(12), 1391–1405.
- Donovan, L. J., Spencer, W. C., Kitt, M. M., Eastman, B. A., Lobur, K. J., Jiao, K., ... Deneris, E. S. (2019). Lmx1b is required at multiple stages to build expansive serotonergic axon architectures. *ELife*, *8* (1), 48788.
- Eisenstat, D. D., Liu, J. K., Mione, M., Zhong, W., Yu, G., Anderson, S. A., ... Rubenstein, J. L. R. (1999). DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *Journal of Comparative Neurology*, *414*(2), 217–237.
- Escanilla, O., Yuhas, C., Marzan, D., & Linster, C. (2009). Dopaminergic modulation of olfactory bulb processing affects odor discrimination learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, *123*(4), 828–833.
- Feng, W., Li, Y., Dao, P., Aburas, J., Islam, P., Elbaz, B., ... Kratsios, P. (2020). A terminal selector prevents a Hox transcriptional switch to safeguard motor neuron identity throughout life. *ELife*, *9*(1), 1–38.
- 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.
- Ferretti, E., Li, B., Zewdu, R., Wells, V., Hebert, J. M., Karner, C., ... Selleri, L. (2011). A conserved Pbx-Wnt-p63-Irf6 regulatory module controls face morphogenesis by promoting epithelial apoptosis. *Developmental Cell*, *21*(4), 627–641.
- Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B., & Raineteau, O. (2015). Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development*, *142*(12), 2109–2120.

- Flames, N., & Hobert, O. (2009). Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature*, *458*(7240), 885–889.
- Flames, N., & Hobert, O. (2011). Transcriptional Control of the Terminal Fate of Monoaminergic Neurons. *Annual Review of Neuroscience*, *34*(1), 153–184.
- Fuentealba, L. C., Rompani, S. B., Parraguez, J. I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C. L., & Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, *161*(7), 1644–1655.
- Fujiwara, N., & Cave, J. W. (2016). Partial conservation between mice and humans in olfactory bulb interneuron transcription factor codes. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(JUL), 1–13.
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., ... Gotoh, Y. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 657–665.
- Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *65*(4), 573–596.
- Gaborieau, E., Hurtado-Chong, A., Fernández, M., Azim, K., & Raineteau, O. (2018). A dual role for the transcription factor Sp8 in postnatal neurogenesis. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10.
- Galliano, E., Franzoni, E., Breton, M., Chand, A. N., Byrne, D. J., Murthy, V. N., & Grubb, M. S. (2018). Embryonic and postnatal neurogenesis produce functionally distinct subclasses of dopaminergic neuron. *ELife*, *7*, 1–36.
- García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundation Symposium*, *0*(29), 161–182.
- García-Cuellar, M. P., Steger, J., Füller, E., Hetzner, K., & Slany, R. K. (2015). Pbx3 and Meis1 cooperate through multiple mechanisms to support Hox-induced murine leukemia. *Haematologica*, *100*(7), 905–913.
- Garey, L. (2010). When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *Journal of Anatomy*, *217*(4), 324–333.
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(4), 1823–1828.
- 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.
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(10), 777–788.
- Grace, A. A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(8), 524–532.
- Grebbin, B. M., Hau, A.-C., Groß, A., Anders-Maurer, M., Schramm, J., Koss, M., ... Schulte, D. (2016). Pbx1 is required for adult subventricular zone neurogenesis. *Development*, *143*(13), 2281–2291.
- Guo, J.-F., Zhang, L., Li, K., Mei, J.-P., Xue, J., Chen, J., ... Tang, B.-S. (2018). Coding mutations in NUS1 contribute to Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(45), 11567–11572.

- Guo, T., Liu, G., Du, H., Wen, Y., Wei, S., Li, Z., ... Yang, Z. (2019). Dlx1/2 are Central and Essential Components in the Transcriptional Code for Generating Olfactory Bulb Interneurons. *Cerebral Cortex*, 29(11), 4831–4849.
- 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.
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., & Cremer, H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 5(10), 939–945.
- 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.
- Hau, A.-C., Grebbin, B. M., Agoston, Z., Anders-Maurer, M., Müller, T., Groß, A., ... Schulte, D. (2017). MEIS homeodomain proteins facilitate PARP1/ARTD1-mediated eviction of histone H1. *The Journal of Cell Biology*, 216(9), 2715–2729.
- Heffner, C. S., Herbert Pratt, C., Babiuk, R. P., Sharma, Y., Rockwood, S. F., Donahue, L. R., ... Murray, S. A. (2012). Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nature Communications*, 3(1), 1218–1219.
- Hobert, O. (2008). Regulatory logic of neuronal diversity: Terminal selector genes and selector motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20067–20071.
- Hobert, O. (2016). Terminal Selectors of Neuronal Identity. *Current Topics in Developmental Biology*, 116 (1), 455-475.
- Hobert, O., & Kratsios, P. (2019). Neuronal identity control by terminal selectors in worms, flies, and chordates. *Current Opinion in Neurobiology*, 56(1), 97–105.
- Hoekstra, E. J., Mesman, S., de Munnik, W. A., & Smidt, M. P. (2013). LMX1B Is Part of a Transcriptional Complex with PSPC1 and PSF. *PLOS ONE*, 8(1), 53122.
- Hsia, A. Y., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (1999). Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology*, 82(2), 1082–1085.
- Huang, Z., Thiebaud, N., & Fadool, D. A. (2017). Differential serotonergic modulation across the main and accessory olfactory bulbs. *The Journal of Physiology*, 595(11), 3515–3533.
- Huisman, E., Uylings, H. B. M., & Hoogland, P. V. (2004). A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 19(6), 687–692.
- Ichinose, H., Ohye, T., Takahashf, E., Sel, N., Hori, T., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1994). Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nature Genetics*, 8(1), 236-242.
- Ilkiw, J. L., Kmita, L. C., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Rodrigues, L. S., Dorieux, F. W. C., ... Lima, M. M. S. (2019). Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1082–1095.
- Imamura, F., Nagao, H., Naritsuka, H., Murata, Y., Taniguchi, H., & Mori, K. (2006). A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 495(6), 754–768.

- Jacobs, F. M. J., van Erp, S., van der Linden, A. J. A., von Oerthel, L., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2009). Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development*, *136*(4), 531 – 540.
- Jimeno-Martín, A., Sousa, E., Daroqui, N., Brocal-Ruiz, R., Maicas, M., & Flames, N. (2020). Transcription factors from multiple families ensure enhancer selectivity and robust neuron terminal differentiation. *BioRxiv*, 2020.09.04.283036. Retrieved from <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.283036>
- Johnson, W. A., & Hirsh, J. (1990). Binding of a Drosophila POU-domain protein to a sequence element regulating gene expression in specific dopaminergic neurons. *Nature*, *343*(6257), 467–470.
- Jung, J.-G., Shih, I.-M., Park, J. T., Gerry, E., Kim, T. H., Ayhan, A., ... Wang, T.-L. (2016). Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. *Cancer Research*, *76*(21), 6351–6361.
- Keiflin, R., & Janak, P. H. (2015). Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron*, *88*(2), 247–263.
- Kelsch, W., Lin, C.-W., Mosley, C. P., & Lois, C. (2009). A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*, *29*(38), 11852–11858.
- 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.
- Kim, J., Yeon, J., Choi, S.-K., Huh, Y. H., Fang, Z., Park, S. J., ... Kim, K. (2015). The Evolutionarily Conserved LIM Homeodomain Protein LIM-4/LHX6 Specifies the Terminal Identity of a Cholinergic and Peptidergic *C. elegans* Sensory/Inter/Motor Neuron-Type. *PLoS Genetics*, *11*(8), 1005480–1005480.
- 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*, *30*(3), 1185 – 1196.
- 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. *Journal of Neuroscience*, *27*(26), 6878–6891.
- Kosaka, K., Aika, Y., Toida, K., Heizmann, C. W., Hunziker, W., Jacobowitz, D. M., ... Kosaka, T. (1995). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neuroscience Research*, *23*(1), 73–88.
- Kosaka, T., Deans, M. R., Paul, D. L., & Kosaka, K. (2005). Neuronal gap junctions in the mouse main olfactory bulb: Morphological analyses on transgenic mice. *Neuroscience*, *134*(3), 757–769.
- Kosaka, T. & Kosaka, K. (2012). Further characterization of the juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb by transcription factors, Sp8 and Tbx21. *Neuroscience Research*, *73*(1), 24–31.
- Kosaka, T. & Kosaka, K. (2016). Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anatomical Science International*, *91*(2), 115–127.
- Kosaka, T., Pignatelli, A., & Kosaka, K. (2019). Heterogeneity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in the main olfactory bulb of the mouse. *Neuroscience Research*, *157* (1),15-33.

- Koss, M., Bolze, A., Brendolan, A., Saggese, M., Capellini, T. D., Bojilova, E., ... Selleri, L. (2012). Congenital Asplenia in Mice and Humans with Mutations in a Pbx/Nkx2-5/p15 Module. *Developmental Cell*, 22(5), 913–926.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626.
- Kruzich, P. J., & Grandy, D. K. (2004). Dopamine D2 receptors mediate two-odor discrimination and reversal learning in C57BL/6 mice. *BMC Neuroscience*, 5(1), 12.
- Kweon, J. H., Kim, S., & Lee, S. B. (2017). The cellular basis of dendrite pathology in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*, 50(1), 5–11.
- Le, T. N., Zhou, Q.-P., Cobos, I., Zhang, S., Zagozewski, J., Japoni, S., ... Eisenstat, D. D. (2017). GABAergic Interneuron Differentiation in the Basal Forebrain Is Mediated through Direct Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase Isoforms by Dlx Homeobox Transcription Factors. *The Journal of Neuroscience*, 37(36), 8816–8829.
- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J.-C., & Lledo, P.-M. (2005). Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(29), 6816–6825.
- Li, J., Wang, C., Zhang, Z., Wen, Y., An, L., Liang, Q., ... Yang, Z. (2018). Transcription factors Sp8 and Sp9 coordinately regulate olfactory bulb interneuron development. *Cerebral Cortex*, 28(9), 3278–3294.
- Li, W. L., Chu, M. W., Wu, A., Suzuki, Y., Imayoshi, I., & Komiyama, T. (2018). Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *ELife*, 7(1), 1–26.
- Li, Y., Sun, Z., Zhu, Z., Zhang, J., Sun, X., & Xu, H. (2014). PBX3 is overexpressed in gastric cancer and regulates cell proliferation. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(5), 4363–4368.
- Lindeberg, J., Usoskin, D., Bengtsson, H., Gustafsson, A., Kylberg, A., Söderström, S., & Ebendal, T. (2004). Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis*, 40(2), 67–73.
- Lindtner, S., Catta-Preta, R., Tian, H., Su-Feher, L., Price, J. D., Dickel, D. E., ... Rubenstein, J. L. R. (2019). Genomic Resolution of DLX-Orchestrated Transcriptional Circuits Driving Development of Forebrain GABAergic Neurons. *Cell Reports*, 28(8), 2048–2063.
- 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), 1190–1198.
- Liu, S., Plachez, C., Shao, Z., Puche, A., & Shipley, M. T. (2013). Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(7), 2916–2926.
- Liu, W.-L., & Shipley, M. T. (1994). Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *Journal of Comparative Neurology*, 346(4), 541–558.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Livneh, Y., & Mizrahi, A. (2012). Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nature Neuroscience*, 15(1), 26–28.
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 179–193.
- Lloret-Fernández, C., Maicas, M., Mora-Martínez, C., Artacho, A., Jimeno-Martín, Á., Chirivella, L., ... Flames, N. (2018). A transcription factor collective defines the HSN serotonergic neuron regulatory landscape. *ELife*, 7(1), 1–36.
- Lodato, S., Molyneaux, B. J., Zuccaro, E., Goff, L. A., Chen, H. H., Yuan, W., ... Arlotta, P. (2014). Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1046–1054.
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-Distance Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(1), 1145–1148.
- Longobardi, E., Penkov, D., Mateos, D., De Florian, G., Torres, M., & Blasi, F. (2014). Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental Dynamics*, 243(1), 59–75.
- Luo, G. R., Chen, Y., Li, X. P., Liu, T. X., & Le, W. D. (2008). Nr4a2 is essential for the differentiation of dopaminergic neurons during zebrafish embryogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(2), 202–210.
- Luo, L., Ambrozkiwicz, M. C., Benseler, F., Zoghbi, H. Y., Kawabe, H., Craig, A. M., ... Hutchison, M. A. (2020). Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines : Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors NeuroResource Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines : Prevalence of Germline Recombination and influencing factors. *Neuron*, 106 (1), 37-65.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96(5), 713–723.
- Marin, C., Vilas, D., Langdon, C., Alobid, I., López-Chacón, M., Haehner, A., ... Mullol, J. (2018). Olfactory Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(8), 42.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., & Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), 1834.
- Marks, C. A., Cheng, K., Cummings, D. M., & Belluscio, L. (2006). Activity-dependent plasticity in the olfactory intrabulbar map. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(44), 11257–11266.
- Martie, C., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802–805.
- Mayer, C., Hafemeister, C., Bandler, R. C., Machold, R., Batista Brito, R., Jaglin, X., ... Satija, R. (2018). Developmental diversification of cortical inhibitory interneurons. *Nature*, 555(7697), 457–462.
- McCulley, D. J., Wienhold, M. D., Hines, E. A., Hacker, T. A., Rogers, A., Pewowaruk, R. J., ... Sun, X. (2018). PBX transcription factors drive pulmonary vascular adaptation to birth. *Journal of Clinical Investigation*, 128(2), 655–667.

- Merabet, S., & Mann, R. S. (2016). To Be Specific or Not: The Critical Relationship Between Hox And TALE Proteins. *Trends in Genetics*, 32(6), 334–347.
- 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.
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381–384.
- Mi, D., Li, Z., Lim, L., Li, M., Moissidis, M., Yang, Y., ... Marín, O. (2018). Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science*, 360(6384), 81–85.
- Milech, N., Kees, U. R., & Watt, P. M. (2001). Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 32(3), 275–280.
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 10(4), 444–452.
- 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.
- Monahan, K., Schieren, I., Cheung, J., Mumbey-Wafula, A., Monuki, E. S., & Lomvardas, S. (2017). Cooperative interactions enable singular olfactory receptor expression in mouse olfactory neurons. *ELife*, 6(1), 28620.
- 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), 6149–6157.
- Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17980–17985.
- Mori, K., Takahashi, Y. K., Igarashi, K. M., & Yamaguchi, M. (2006). Maps of Odorant Molecular Features in the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiological Reviews*, 86(2), 409–433.
- Mukherjee, K., & Bürglin, T. R. (2007). Comprehensive Analysis of Animal TALE Homeobox Genes: New Conserved Motifs and Cases of Accelerated Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 65(2), 137–153.
- Mundiñano, I.-C., Caballero, M.-C., Ordóñez, C., Hernandez, M., DiCauda, C., Marcilla, I., ... Luquin, M.-R. (2011). Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, 122(1), 61.
- Muotri, A. R., & Gage, F. H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, 441(7097), 1087–1093.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Neural circuits*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Negoias, S., Croy, I., Gerber, J., Puschmann, S., Petrowski, K., Joraschky, P., & Hummel, T. (2010). Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*, 169(1), 415–421.
- 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.

- Nomaksteinsky, M., Kassabov, S., Chettouh, Z., Stoeklé, H.-C., Bonnaud, L., Fortin, G., ... Brunet, J.-F. (2013). Ancient origin of somatic and visceral neurons. *BMC Biology*, *11*(1), 53.
- Nowakowski, RS; Lewin, SB; Miller, M. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*, *18*(1), 311–318.
- Padmanabhan, K., & Urban, N. N. (2010). Intrinsic biophysical diversity decorrelates neuronal firing while increasing information content. *Nature Neuroscience*, *13*(10), 1276–1282.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M. T., Erdelyi, F., Szabo, G., & Puche, A. C. (2007). Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, *501*(6), 825–836.
- Patel, T., & Hobert, O. (2017). Coordinated control of terminal differentiation and restriction of cellular plasticity. *ELife*, *6*(1), 1–26.
- Penkov, D., San Martin, D., Fernandez-Diaz, L. C., Rosselló, C. A., Torroja, C., Sanchez-Cabo, F., ... Torres, M. (2013). Resource Analysis of the DNA-Binding Profile and Function of TALE Homeoproteins Reveals Their Specialization and Specific Interactions with Hox Genes / Proteins. *Cell Reports*, *3*(4), 1321–1333.
- Perez-Villalba, A., Sirerol-Piquer, M. S., Belenguer, G., Soriano-Cantón, R., Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., ... Fariñas, I. (2018). Synaptic regulator  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic fibers is essentially required for the maintenance of subependymal neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, *38*(4), 814–825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-17.2017>
- Pifl, C., Reither, H., Del Rey, N. L.-G., Cavada, C., Obeso, J. A., & Blesa, J. (2017). Early Paradoxical Increase of Dopamine: A Neurochemical Study of Olfactory Bulb in Asymptomatic and Symptomatic MPTP Treated Monkeys. *Frontiers in Neuroanatomy*, *11*(1), 46-54.
- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2008). Cholinergic Modulation of Dopaminergic Neurons in the Mouse Olfactory Bulb. *Chemical Senses*, *33*(4), 331–338.
- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2017). Dopaminergic Neurons in the Main Olfactory Bulb: An Overview from an Electrophysiological Perspective. *Frontiers in Neuroanatomy*, *11*(1), 7.
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971). The Neuron Types of the Glomerular Layer of the Olfactory Bulb. *Journal of Cell Science*, *9*(2), 305–345.
- Pla, R., Stanco, A., Howard, M. A., Rubin, A. N., Vogt, D., Mortimer, N., ... Rubenstein, J. L. R. (2018). Dlx1 and Dlx2 Promote Interneuron GABA Synthesis, Synaptogenesis, and Dendritogenesis. *Cerebral Cortex*, *28*(11), 3797–3815. 1
- Platel, J. C., Angelova, A., Bugeon, S., Wallace, J., Ganay, T., Chudotvorova, I., ... Cremer, H. (2019). Neuronal integration in the adult mouse olfactory bulb is a non-selective addition process. *ELife*, *8*(1), 1–21.
- Poirazi, P., & Mel, B. W. (2001). Impact of Active Dendrites and Structural Plasticity on the Memory Capacity of Neural Tissue. *Neuron*, *29*(3), 779–796.
- Polese, D., Martinelli, E., Marco, S., Natale, C., & Gutierrez-Galvez, A. (2014). Understanding odor information segregation in the olfactory bulb by means of mitral and tufted cells. *PLoS ONE*, *9*(10), 109716.
- Pöpperl, H., Rikhof, H., Cheng, 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.

- Price, J. L., & Powell, T. P. S. (1970a). The Mitral and Short Axon Cells of the Olfactory Bulb. *Journal of Cell Science*, 7(3), 631-651.
- Price, J. L., & Powell, T. P. S. (1970b). The Morphology of the Granule Cells of the Olfactory Bulb. *Journal of Cell Science*, 7(1), 91-123.
- Qiu, M., Bulfone, A., Martinez, S., Meneses, J. J., Shimamura, K., Pedersen, R. A., & Rubenstein, J. L. R. (1995). Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes and Development*, 9(20), 2523–2538.
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Histologie du Systeme Nerveux de L'Homme et des Vertebres*. Maloine: Paris
- Remesal, L., Roger-Baynat, I., Chirivella, L., Maicas, M., Brocal-Ruiz, R., Pérez-Villalba, A., ... Flames, N. (2020). PBX1 acts as terminal selector for olfactory bulb dopaminergic neurons. *Development*, 147(8), 186841.
- 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.
- Rubenstein, J. L. R., & Rakic, P. (2013). Introduction to Comprehensive Developmental Neuroscience. San Francisco: USA.
- Saghatelyan, A., de Chevigny, A., Schachner, M., & Lledo, P.-M. (2004). Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(4), 347–356.
- Saino-Saito, S., Sasaki, H., Volpe, B. T., Kobayashi, K., Berlin, R., & Baker, H. (2004). Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal and adult mice. *Journal of Comparative Neurology*, 479(4), 389–398.
- Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., ... Imayoshi, I. (2014). Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *The Journal of Neuroscience*, 34(17), 5788–5799.
- Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X. J., & Featherstone, M. S. (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*, 20(22), 8623–8633.
- Sansom, S. N., Griffiths, D. S., Faedo, A., Kleinjan, D.-J., Ruan, Y., Smith, J., ... Livesey, F. J. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genetics*, 5(6), 1000511.
- Sasajima, H., Miyazono, S., Noguchi, T., & Kashiwayanagi, M. (2015). Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. *NeuroToxicology*, 51(1), 106–115.
- Schweyer, K., Rüschoff-Steiner, C., Arias-Carrión, O., Oertel, W. H., Rösler, T. W., & Höglinger, G. U. (2019). Neuronal precursor cells with dopaminergic commitment in the rostral migratory stream of the mouse. *Scientific Reports*, 9(1), 13359.
- Selleri, L., DiMartino, J., van Deursen, J., Brendolan, A., Sanyal, M., Boon, E., ... Cleary, M. L. (2004). The TALE Homeodomain Protein Pbx2 Is Not Essential for Development and Long-Term Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5324–5331.

- Selleri, L., Depew, M. J., Jacobs, Y., Chanda, S. K., Tsang, K. Y., Cheah, K. S. E., ... Cleary, M. L. (2001). Requirement for *Pbx1* in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *3557*(1), 3543–3557.
- Selleri, L., Zappavigna, V., & Ferretti, E. (2019). 'Building a perfect body': Control of vertebrate organogenesis by PBX-dependent regulatory networks. *Genes and Development*, *33*(5–6), 258–275.
- Serguera, C., Triaca, V., Kelly-Barrett, J., Banchaabouchi, M., & Minichiello, L. (2008). Increased dopamine after mating impairs olfaction and prevents odor interference with pregnancy. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 949–956.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., & Sakano, H. (2003). Ensures the One Receptor – One Olfactory Neuron Rule in Mouse. *302*(1), 2088–2095.
- Serrano-Saiz, E., Leyva-Díaz, E., De La Cruz, E., & Hobert, O. (2018). BRN3-type POU Homeobox Genes Maintain the Identity of Mature Postmitotic Neurons in Nematodes and Mice. *Current Biology*, *28*(17), 2813-2823.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.045>
- 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.
- Sheikh, S. N., Martin, S. B., & Martin, D. L. (1999). Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochemistry International*, *35*(1), 73–80.
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*, *457*(7231), 818–823.
- Simon, H. H., Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgadò, P., & Alberí, L. (2003). Midbrain Dopaminergic Neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *991*(1), 36–47.
- Song, A. J., & Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in Genetics*, *34*(5), 333–340.
- 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(1), 167–174.
- Stoykova, A., & Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *Journal of Neuroscience*, *14*(3), 1395–1412.
- Supekar, K., Uddin, L. Q., Khouzam, A., Phillips, J., Gaillard, W. D., Kenworthy, L. E., ... Menon, V. (2013). Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Reports*, *5*(3), 738–747.
- Takahashi, H., Yoshihara, S., & Tsuboi, A. (2018). The Functional Role of Olfactory Bulb Granule Cell Subtypes Derived From Embryonic and Postnatal Neurogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(1), 1–11.
- Thor, S., & Thomas, J. B. (1997). The *Drosophila* *islet* Gene Governs Axon Pathfinding and Neurotransmitter Identity. *Neuron*, *18*(3), 397–409.
- Tillerson, J., Caudle, W., Parent, J., Gong, C., Schallert, T., & Miller, G. (2006). Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behavioural Brain Research*, *172*(1), 97–105.

- Tiveron, M.-C., Beclin, C., Murgan, S., Wild, S., Angelova, A., Marc, J., ... Cremer, H. (2017). Zic-Proteins Are Repressors of Dopaminergic Forebrain Fate in Mice and *C. elegans*. *The Journal of Neuroscience*, *37*(44), 10611–10623.
- Tomer, R., Denes, A. S., Tessmar-Raible, K., & Arendt, D. (2010). Profiling by Image Registration Reveals Common Origin of Annelid Mushroom Bodies and Vertebrate Pallium. *Cell*, *142*(5), 800–809.
- 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.
- Van Hove, H., Antunes, A. R. P., De Vlaminc, K., Scheyltjens, I., Van Ginderachter, J. A., & Movahedi, K. (2020). Identifying the variables that drive tamoxifen-independent CreERT2 recombination: Implications for microglial fate mapping and gene deletions. *European Journal of Immunology*, *50*(3), 459–463.
- Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nuñez, J. M., Vosshall, L. B., & Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, *79*(6), 981–991.
- Vergaño-Vera, E., Díaz-Guerra, E., Rodríguez-Traver, E., Méndez-Gómez, H. R., Solís, Ó., Pignatelli, J., ... Vicario-Abejón, C. (2015). Nurr1 blocks the mitogenic effect of FGF-2 and EGF, inducing olfactory bulb neural stem cells to adopt dopaminergic and dopaminergic-GABAergic neuronal phenotypes. *Developmental Neurobiology*, *75*(8), 823–841.
- 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*, *35*(18), 1963–1978.
- Vinograd, A., Livneh, Y., & Mizrahi, A. (2017). History-Dependent Odor Processing in the Mouse Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *37*(49), 12018–12030.
- Wachowiak, M., & Shipley, M. (2006). Wachowiak, M. & Shipley, M. T. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*(1), 411–423.
- 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.
- 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), 127–131.
- Wang, M., Fones, L., & Cave, J. W. (2018). Conserved Upstream Regulatory Regions in Mammalian Tyrosine Hydroxylase. *Molecular Neurobiology*, *55*(9), 7340–7351.
- Wei, C. J., Linster, C., & Cleland, T. A. (2006). Dopamine D<sub>2</sub> receptor activation modulates perceived odor intensity. *Behavioral Neuroscience*, *120*(1), 393–400.
- Weihe, E., Depboylu, C., Schütz, B., Schäfer, M. K. H., & Eiden, L. E. (2006). Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *26*(4–6), 659–678.
- Wesson, D. W., Borkowski, A. H., Landreth, G. E., Nixon, R. A., Levy, E., & Wilson, D. A. (2011). Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an

- Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(44), 15962–15971.
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2007). Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(37), 9951–9961.
- 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*, 128(19), 3759–3771.
- Winkeler, C., Kladney, R., Maggi, L., & Weber, J. (2012). Cathepsin K-Cre Causes Unexpected Germline Deletion of Genes in Mice. *PloS One*, 7(1), 42005.
- Yamaguchi, M., & Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9697–9702.
- Yarmolinsky, Michael; Hoess, R. (2015). The Legacy of Nat Sternberg: The Genesis of Cre-lox Technology. *Annual Review of Virology*, 2, 25–40.
- 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(31), 8286–8296.
- Yue, E. L., Cleland, T. A., Pavlis, M., & Linster, C. (2004). Opposing effects of D1 and D2 receptor activation on odor discrimination learning. *Behavioral Neuroscience*, 118(1), 184–190.
- Zapiec, B., & Mombaerts, P. (2020). The Zonal Organization of Odorant Receptor Gene Choice in the Main Olfactory Epithelium of the Mouse. *Cell Reports*, 30(12), 4220–4234
- Zeng, H., & Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 530–546.
- Zhang, W., Sun, C., Shao, Y., Zhou, Z., Hou, Y., & Li, A. (2019). Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Scientific Reports*, 9(1), 254.
- Zhou, X., Liu, F., Tian, M., Xu, Z., Liang, Q., Wang, C., ... Yang, Z. (2015). Transcription factors COUP-TFI and COUP-TFII are required for the production of granule cells in the mouse olfactory bulb. *Development (Cambridge)*, 142(9), 1593–1605.
- Zou, D.-J., Chesler, A., & Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature Reviews Neuroscience*, 10(8), 611–618.

# **ANEXOS**

## RESEARCH ARTICLE

# PBX1 acts as terminal selector for olfactory bulb dopaminergic neurons

Laura Remesal<sup>1,\*</sup>, Isabel Roger-Baynat<sup>1,‡</sup>, Laura Chirivella<sup>1</sup>, Miren Maicas<sup>1</sup>, Rebeca Brocal-Ruiz<sup>1</sup>, Ana Pérez-Villalba<sup>2</sup>, Carme Cucarella<sup>3</sup>, Marta Casado<sup>3</sup> and Nuria Flames<sup>1,§</sup>

## ABSTRACT

Neuronal specification is a protracted process that begins with the commitment of progenitor cells and culminates with the generation of mature neurons. Many transcription factors are continuously expressed during this process but it is presently unclear how these factors modify their targets as cells transition through different stages of specification. In olfactory bulb adult neurogenesis, the transcription factor PBX1 controls neurogenesis in progenitor cells and the survival of migrating neuroblasts. Here, we show that, at later differentiation stages, PBX1 also acts as a terminal selector for the dopaminergic neuron fate. PBX1 is also required for the morphological maturation of dopaminergic neurons and to repress alternative interneuron fates, findings that expand the known repertoire of terminal-selector actions. Finally, we reveal that the temporal diversification of PBX1 functions in neuronal specification is achieved, at least in part, through the dynamic regulation of alternative splicing. In *Caenorhabditis elegans*, PBX/CEH-20 also acts as a dopaminergic neuron terminal selector, which suggests an ancient role for PBX factors in the regulation of terminal differentiation of dopaminergic neurons.

**KEY WORDS:** Neuron differentiation, Alternative splicing, Terminal selector, Dopaminergic neuron, Olfactory bulb, Adult neurogenesis

## INTRODUCTION

Mature neurons are specialized cells that express unique transcriptomes for specific functions. The acquisition of neuron type-specific transcriptomes is a protracted process beginning with the commitment of progenitors, followed by the migration of neuroblasts and culminating in the terminal differentiation of the neuron (Rubenstein and Rakic, 2013). Transcription factors (TFs) are the main orchestrators of neuron-type specification and different TFs fulfill specific functions at each step in this process.

Although most attention has been given to TFs with temporally or spatially restricted expression, many TFs are continuously

expressed in the nervous system throughout the various stages of differentiation, from progenitors to mature neurons (Delile et al., 2019; Mayer et al., 2018; Mi et al., 2018; Nowakowski et al., 2017). In only a few cases have the specific roles of these TFs in progenitors and postmitotic neurons been determined, such as the diverse functions of *Nkx2.1* in the subpallium (Magno et al., 2011; Nóbrega-Pereira et al., 2008; Sussel et al., 1999), or the specific roles of *Fezf2*, *Brn1/2* and *Cux1/2* at particular differentiation stages in the pallium (Cubelos et al., 2008; Guo et al., 2013; Iulianella et al., 2008; Lodato et al., 2014; McEvelly et al., 2002; Sugitani et al., 2002). However, only early roles have generally been studied for these TFs, whereas later functions in postmitotic neurons have not yet been analyzed. In addition, how a TF that is continuously expressed from progenitors to mature neurons temporally modifies its activity throughout differentiation is an important unresolved issue.

In contrast to our limited understanding in mammals, neuronal terminal differentiation programs have been extensively characterized in *Caenorhabditis elegans*. In this simple model organism, specific TFs, termed terminal selectors, directly regulate the coordinated expression of the genes that allow for neuron-type-specific functions, such as neurotransmitter biosynthesis enzymes, ion channels and neurotransmitter receptors (Hobert, 2011). An increasing number of examples show that the terminal selector model also applies to mammals (Deneris and Hobert, 2014; Hobert and Kratsios, 2019). However, the extent to which specific regulatory programs are conserved throughout evolution has yet to be determined.

In *C. elegans*, CEH-20, a PBX TF, acts as a terminal selector of dopaminergic (DA) neurons (Doitsidou et al., 2013). CEH-20 works in a TF collective, together with the E26 transformation-specific TF AST-1 and the DLX homeodomain TF CEH-43 (Doitsidou et al., 2013). Remarkably, mouse orthologs for AST-1 and CEH-43, ETV1 (also called ER81) and DLX2, respectively, are required in the differentiation of olfactory bulb (OB) DA neurons, which constitute the most ancestral DA population of the mammalian brain (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010; Flames and Hobert, 2009; Qiu et al., 1995). These data suggest that the DA neuron terminal differentiation program could be conserved from worms to mammals. However, the role of PBX TFs as OB DA terminal selectors has not been previously studied.

OB DA neurons are GABAergic interneurons located in the periglomerular layer (PGL) (Kosaka and Kosaka, 2016). These neurons are generated throughout the life of the animal from adult neural stem cell progenitors located in the subependymal zone (SEZ) (Bonzano et al., 2016). PBX1 is expressed in SEZ progenitors and early deletion of *Pbx1* and *Pbx2* leads to adult neurogenesis defects and cell death of migrating neuroblasts (Grebbin et al., 2016). These phenotypes allowed the assignment of specific early functions to PBX TFs in adult neurogenesis but precluded the study of their role in DA neuron terminal differentiation.

<sup>1</sup>Developmental Neurobiology Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC, 46010 Valencia, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Estructura de Investigación Interdisciplinar en Biotecnología y Biomedicina (ERI BIOTECMED), and Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Spain. <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Metabolic Experimental Pathology Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC, 46010 Valencia, Spain.

\*Present address: School of Medicine, University of California San Francisco, United States.

‡These authors contributed equally to this work

§Author for correspondence (nflames@ibv.csic.es)

© A.P.-V., 0000-0002-5330-2374; N.F., 0000-0003-0961-0609

Here, we specifically remove *Pbx1* from terminally differentiating DA neurons and show that PBX1 is required for the correct expression of many OB DA effector genes, supporting its role as a DA terminal selector. In addition, we find PBX1 is also necessary for inducing OB DA neuron morphological maturation and for repressing alternative interneuron fates, expanding the functional repertoire of terminal-selector actions. Notably, we find that temporal PBX1 diversification of labor throughout adult neurogenesis is achieved, at least in part, by dynamic regulation of alternative splicing.

## RESULTS

### PBX1 but not PBX2 is required for olfactory bulb dopaminergic neuron terminal differentiation

Three TFs act as terminal selectors for *C. elegans* DA neuron differentiation: the ETS TF AST-1, the homeodomain TF CEH-43 and the PBX TF CEH-20 (Doitsidou et al., 2013). In mice, ETV1 (an ortholog of AST-1) and DLX2 (an ortholog of CEH-43) are required for DA specification in the OB (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010; Flames and Hobert, 2009; Qiu et al., 1995), raising the possibility that the DA terminal differentiation program might be conserved from worms to mammals. Hence, we addressed whether PBX TFs are also required for correct DA terminal differentiation in the OB.

Expression of terminal selectors often continues throughout the life of the animal to maintain cell fate (Deneris and Hobert, 2014). Thus, we first analyzed the expression of the four PBX TF members in adult OB DA neurons. PBX4 is not expressed in the brain and PBX3 is expressed in OB but not in DA neurons (Grebbin et al., 2016; Fig. S1). PBX1 is expressed in OB DA neurons (Grebbin et al., 2016; Fig. S1) and similarly, we found that PBX2 expression colocalizes with tyrosine hydroxylase (TH), a marker for DA neurons in the OB (Fig. S1). Therefore, PBX1 and PBX2 are good candidates for being involved in OB DA neuron terminal differentiation; thus, we next analyzed mouse mutant models for these TFs.

To avoid known neurogenesis defects upon *Pbx1* removal from adult neuronal progenitors (Grebbin et al., 2016), we used a conditional *Pbx1* allele (*Pbx1<sup>F1/F1</sup>*) combined with the tyrosine hydroxylase (Th) CRE recombinase knock-in line (*Pbx1<sup>F1/F1</sup>/Th:CRE*, referred to as *Pbx1<sup>Th</sup>* for simplicity). Transcription of *Th* begins during the final stages of neuroblast migration, once immature DA neurons have reached the external granular layer (Saino-Saito et al., 2004; Fig. S2). Thus, *Pbx1<sup>Th</sup>* mutant animals preserve PBX1 expression in progenitors and migrating neuroblasts but not in terminally differentiating DA neurons (Figs S3 and S4). We confirmed that *Pbx1<sup>Th</sup>* animals show normal proliferation and migration by quantifying the number of proliferating cells (Ki67 positive) in the SEZ and the number of migrating neuroblasts [doublecortin (DCX) positive] in the rostral migratory stream (RMS) (Fig. S3). In contrast to PBX1, PBX2 is not expressed in SEZ progenitors or in migrating neuroblasts (Fig. S1) and therefore, we used *Pbx2* conventional knockout mice (*Pbx2<sup>-/-</sup>*) to assess its role in OB DA terminal differentiation.

TH immunohistochemical analysis shows similar numbers of DA cells in the OB of *Pbx2<sup>-/-</sup>* mutants and control animals; however, there is a dramatic decrease of TH expression in adult *Pbx1<sup>Th</sup>* mice, suggesting a role for this TF in DA terminal differentiation (Fig. 1A-C,E; Table S1). In other cellular contexts, *Pbx2* acts redundantly with *Pbx1* (Capellini et al., 2008; Ferretti et al., 2011; Grebbin et al., 2016; Koss et al., 2012). Thus, to unravel possible compensatory effects, we analyzed the OB DA population of *Pbx1<sup>Th</sup>*, *Pbx2<sup>-/-</sup>* double-mutant mice. We found that the *Pbx1<sup>Th</sup>* phenotype is not significantly increased in the *Pbx1<sup>Th</sup>*, *Pbx2<sup>-/-</sup>* double mutant

(Fig. 1D,E; Table S1), indicating that *Pbx1* plays a major role in OB DA neuron terminal differentiation that cannot be offset by the presence of *Pbx2*. Therefore, we specifically focused the rest of our analyses on *Pbx1<sup>Th</sup>* single mutant characterization.

### PBX1 function is dispensable for survival of olfactory bulb dopaminergic neurons

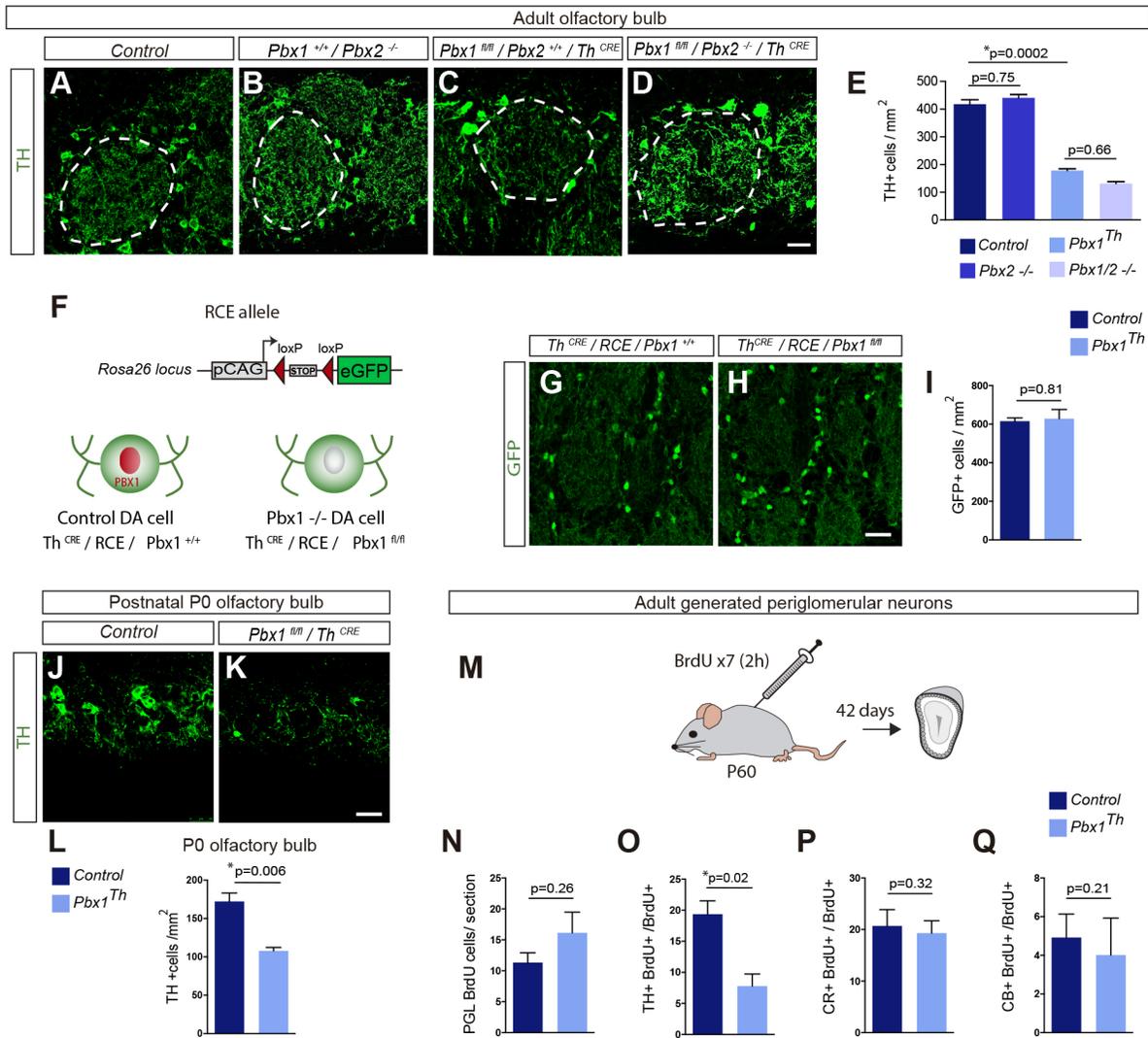
The observed loss of TH expression in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutant mice might reflect either DA terminal differentiation problems or survival defects. Early *Pbx1* removal from migrating neuroblasts leads to cell death (Grebbin et al., 2016). Thus, we next attempted to directly assess DA neuron survival in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals. To this purpose, we performed DA lineage-tracing analysis introducing the fluorescent reporter R26R CAG-boosted EGFP LoxP allele (*RCE:loxP*) into *Pbx1<sup>Th</sup>* and control mice (Fig. 1F). Quantification of GFP-expressing cells showed no difference between *Pbx1<sup>Th</sup>* and control animals (Fig. 1G-I; Table S1). Moreover, immunostaining against the apoptotic marker cleaved caspase 3 showed no differences between control and mutant animals (Fig. S4). These results demonstrate that, in contrast to the earlier role of PBX1 in the survival of adult-generated migrating neuroblasts (Grebbin et al., 2016), PBX1 is not required for OB DA neuron survival at later stages of differentiation. The divergent phenotypes generated upon *Pbx1* removal at distinct differentiation steps uncover stage-specific functions for PBX1.

### PBX1 controls embryonic and adult-generated olfactory bulb dopaminergic-neuron differentiation

OB DA neurons are classified into two subpopulations with different morphologies and electrophysiological properties (Galliano et al., 2018; Kiyokage et al., 2010; Kohwi et al., 2007; Kosaka and Kosaka, 2016; Vergaño-Vera et al., 2006). Generation of both DA neuron subtypes is temporally segregated: embryonically generated DA neurons are larger in size, have more complex morphologies and contain axon initial segment, whereas postnatal adult neurogenesis generates smaller DA neurons that lack an axon initial segment (Galliano et al., 2018).

To investigate the role of PBX1 in embryonically generated DA neurons, newborn *Pbx1<sup>Th</sup>* animals were analyzed. At postnatal day 0 (P0), *Pbx1<sup>Th</sup>* mutant mice already showed a significant decrease in the number of TH-positive cells in the OB compared with control animals (Fig. 1J-L; Table S1), indicating that PBX1 is required for terminal differentiation of embryonically generated DA neurons.

Embryonic DA-specification defects could explain per se adult *Pbx1<sup>Th</sup>* mutant decreases in the number of TH-positive cells (Fig. 1E). Thus, to unequivocally assess whether PBX1 has a role in the specification of adult-generated DA neurons, 2-month-old control and *Pbx1<sup>Th</sup>* animals were injected with bromodeoxyuridine (BrdU), a thymidine analog, to label adult proliferating progenitors. Animals were sacrificed 42 days after injections to allow for migration and differentiation of the adult-generated cohort of cells (Fig. 1M). The total number of BrdU-positive cells was unaffected in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals (Fig. 1N; Table S1), although there was a significant decrease in the number of double-labeled TH- and BrdU-positive cells compared with control animals (Fig. 1O; Table S1). This indicates a role for PBX1 in the terminal specification of adult-generated DA neurons and confirms cell survival is not affected in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals. As expected, the deletion of *Pbx1* exclusively from the DA lineage (*Pbx1<sup>Th</sup>*) did not affect the other two types of adult-generated periglomerular interneurons labeled with calretinin (CR) and calbindin (CB) (Fig. 1P,Q; Table S1). Nevertheless, we found that PBX1 is expressed in 16% of CR and 42% of CB interneurons (Fig. S4). PBX1 expression in non-DA lineages is unaffected in



**Fig. 1. PBX1 is required for olfactory bulb dopaminergic neuron terminal differentiation but not cell survival.** (A–D) Tyrosine hydroxylase (TH) expression in control (A), *Pbx2* mutants (B), *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants (C), and double *Pbx1*<sup>Th</sup> and *Pbx2* mutants (D). (E) Quantification of the different genotypes. *n*=3 animals for each condition, Tukey's multiple comparison test. (F) Diagram of the RCE allele. Cells expressing CRE recombinase become permanently labeled with GFP. (G,H) GFP-positive cells in control animals (G) and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutant animals (H). (I) Quantification of GFP-positive cells in controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. *n*=3 animals for each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (J,K) Tyrosine hydroxylase expression at postnatal day 0 in controls (J) and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants (K). (L) Quantification of TH-positive cells in controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants in P0 OB. *n*=3 animals each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (M) Experimental design for labeling adult-generated OB neurons. (N) Quantification of total number of BrdU cells/section. *n*=3 animals for each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (O–Q) Percentage of BrdU cells expressing TH, CR and CB in controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. *n*=3 animals, two-tailed unpaired Student's *t*-test. Scale bars: 25  $\mu$ m. See Table S1 for primary data for quantification, Fig. S1 for PBX2 expression analysis in SEZ, RMS and OB, and Fig. S2–S4 for *Th*<sup>CRE</sup> expression analysis and *Pbx1* deletion analysis in *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants.

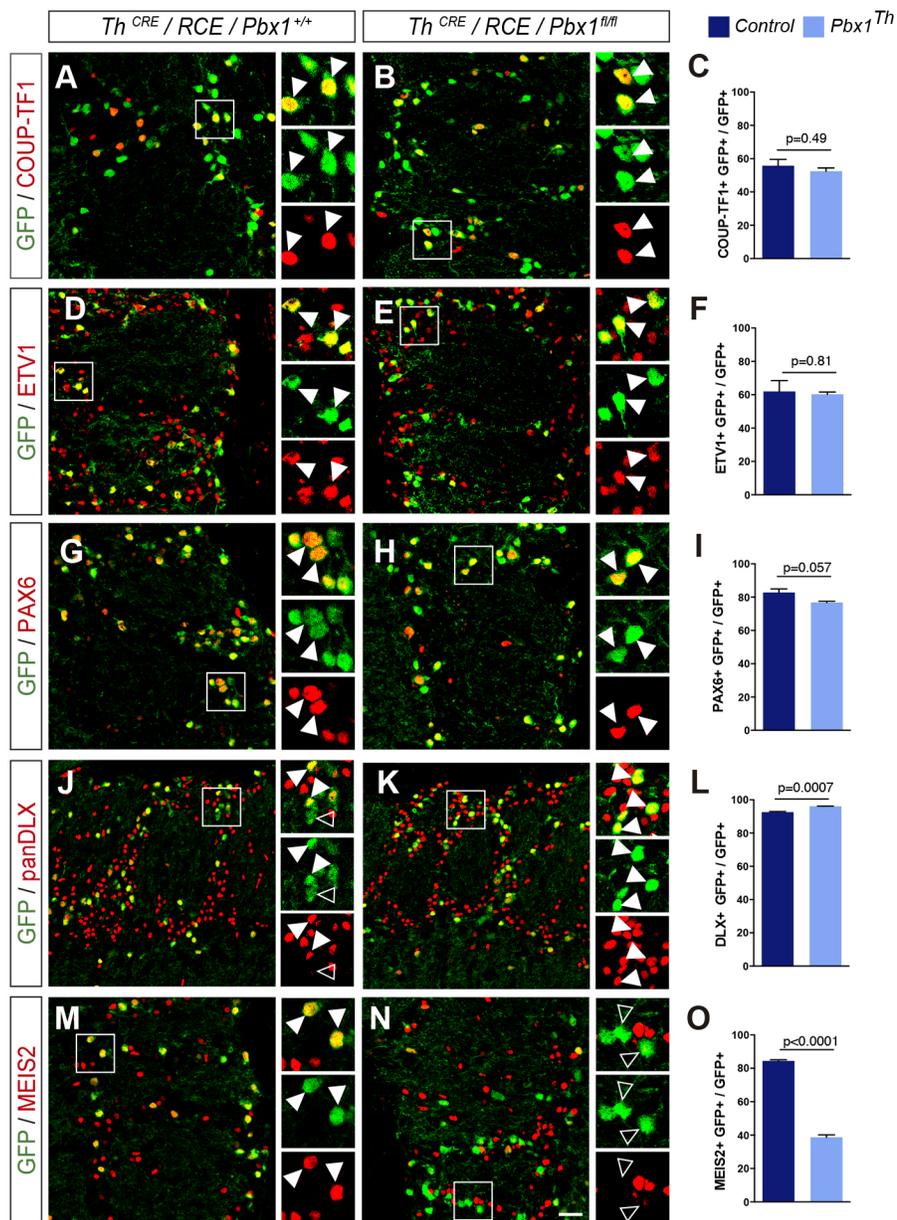
*Pbx1*<sup>Th</sup> animals, thus the role of PBX1 on CR and CB differentiation remains to be explored. Altogether, our results demonstrate that PBX1 is necessary for terminal differentiation of both embryo- and adult-generated OB DA neurons.

#### PBX1 acts downstream of or in parallel to other transcription factors required for dopaminergic neuron specification

Several TFs are known to be required for correct OB DA neuron specification, including previously mentioned orthologs of *C. elegans* DA terminal selectors DLX2 (Brill et al., 2008; Qiu et al., 1995) and ETV1 (Cave et al., 2010; Flames and Hobert, 2009), and also PAX6 paired homeodomain (Brill et al., 2008; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007), NR2F1 (also known as COUP-TF1) nuclear hormone receptor (Bovetti et al., 2013; Zhou et al., 2015) and MEIS2 TALE homeodomain (Agoston et al., 2014). In common with PBX1, all of

these TFs are expressed throughout the DA differentiation process from progenitors and migrating neuroblasts to postmitotic DA neurons. As we saw in *Pbx1*<sup>Th</sup> mutant mice, loss-of-function experiments for these TFs lead to lower numbers of TH-expressing cells (Agoston et al., 2014; Bovetti et al., 2013; Brill et al., 2008; Flames and Hobert, 2009). Considering these phenotypic similarities, we next analyzed whether PBX1 acts upstream of any of these TFs.

Double-immunostaining analysis of TF expression in the DA lineage showed that COUP-TF1, ETV1 and PAX6 expression remained unaffected in *Pbx1*<sup>Th</sup> animals, suggesting that PBX1 acts downstream of or in parallel to these TFs (Fig. 2A–I; Table S1). *Pbx1*<sup>Th</sup> mutant mice showed a small increase in the number of DA lineage cells co-expressing DLX TFs (Fig. 2J–L; Table S1), demonstrating PBX1 is not required for DLX expression. The potential biological relevance of the increase of DLX-expressing



**Fig. 2. PBX1 acts downstream or in parallel to other TFs required for DA specification.**

(A,B) COUP-TF1 expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. (C) Quantification of double COUP-TF1/GFP-positive cells. *n*=3 animals for each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (D,E) ETV1 expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. (F) Quantification of double ETV1-GFP-positive cells. *n*=3 animals for each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (G,H) PAX6 expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. (I) Quantification of double PAX6-GFP-positive cells. *n*=3 animals for each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (J,K) panDLX expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. (L) Quantification of double DLX-GFP-positive cells. *n*=3 animals each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (M,N) MEIS2 expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. (O) Quantification of double MEIS2-GFP-positive cells. *n*=3 animals each condition, two-tailed unpaired Student's *t*-test. Scale bar: 25 μm. See Table S1 for primary data for quantification and Fig. S5 for *Meis2* mRNA expression analysis by qPCR. *Meis2* transcription is unaffected in *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants. White arrowheads indicate colocalization; black arrowheads indicate lack of colocalization.

cells is so far unclear. Finally, immunohistochemical analysis revealed a decrease in the number of MEIS2-positive cells in the DA lineage of *Pbx1*<sup>Th</sup> animals, indicating that PBX1 is required for correct MEIS2 protein expression (Fig. 2M-O; Table S1). When co-expressed in the same cell, PBX and MEIS TFs function as protein complexes (Longobardi et al., 2014). PBX1 has not been reported to transcriptionally activate *Meis2*; however, in other cellular contexts, *Pbx1* loss leads to MEIS2 protein instability and degradation (Dardaei et al., 2014; Garcia-Cuellar et al., 2015). We found that *Meis2* mRNA levels in the OB of *Pbx1*<sup>Th</sup> animals were similar to those in controls (Fig. S5), suggesting that, analogous to what has been reported, PBX1 is not upstream of *Meis2* transcription but is required for MEIS2 protein stability.

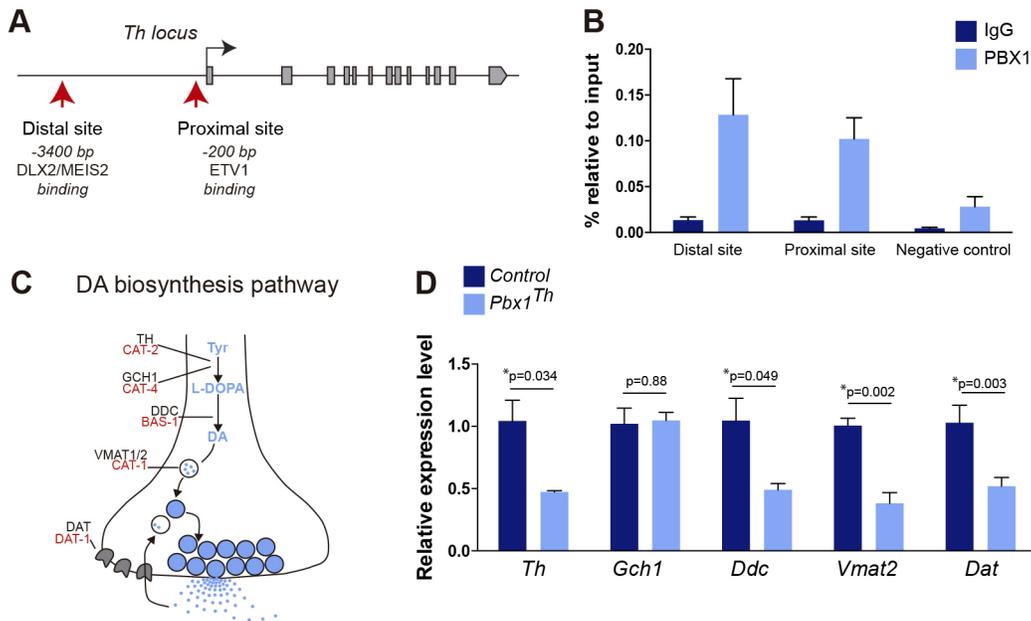
### PBX1 operates as olfactory bulb dopaminergic terminal selector

In different tissues and organisms, PBX and MEIS factors physically interact to co-regulate many target genes (Penkov et al., 2013). In mouse OB, PBX1 binds ~3.5 kb upstream of the

*Th* transcriptional start site, a region also bound by MEIS2 and which overlaps with a predicted DLX consensus site (Fig. 3A) (Agoston et al., 2014; Grebbin et al., 2016).

In *C. elegans*, CEH-20/PBX1, together with AST-1/ETV1 and CEH-43/DLX, directly bind and activate *cat-2/Th* expression (Doitsidou et al., 2013). Therefore, we investigated whether, in addition to binding near the MEIS2 and DLX sites, PBX1 also binds near the *in vivo* reported ETV1-binding site in the *Th* promoter region (Fig. 3A) (Cave et al., 2010; Flames and Hobert, 2009). Our ChIP qPCR analysis showed this to be the case (Fig. 3B) and suggested that PBX1, MEIS2, DLX and ETV1 could constitute a TF collective of DA terminal selectors similar to that described in *C. elegans* for CEH-20/PBX, AST-1/ETV1 and CEH-43/DLX (Doitsidou et al., 2013). Moreover, PBX1 binding to both proximal and distal sites suggests it might be necessary for the correct physical interactions of the *Th* enhancer and promoter.

Acting as terminal selectors, TFs work broadly to activate the expression of multiple genes that are necessary for neuron subtype-specific functions (Hobert, 2008). DA neurons are characterized by



**Fig. 3. PBX1 is a terminal selector for OB DA neuron fate.** (A) Schematic representation of the tyrosine hydroxylase locus with binding sites for MEIS2, ETV1 and DLX. (B) ChIP qPCR from OB tissue shows PBX1 binding to both *Th* proximal and distal sites. PBX1-binding specificity was tested with the *untr17*-negative binding region. (C) Schematic representation of the conserved dopamine biosynthesis pathway. Mouse names are in black and *C. elegans* orthologs are in red. DA, dopamine; DAT/DAT-1, dopamine transporter; DDC/BAS-1, aromatic-L-amino-acid decarboxylase; GCH1/CAT-4, GTP cyclohydrolase; TH/CAT-2, tyrosine hydroxylase; Tyr, tyrosine; VMAT1/2/CAT-1, vesicular monoamine transporter. (D) mRNA expression levels of dopamine pathway genes in controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants measured by qRT-PCR.  $n=4$  animals (controls) *Pbx1<sup>Th</sup>*  $n=3$  animals (*Pbx1<sup>Th</sup>*), two-tailed unpaired Student's *t*-test. See Table S1 for the primary data for quantifications.

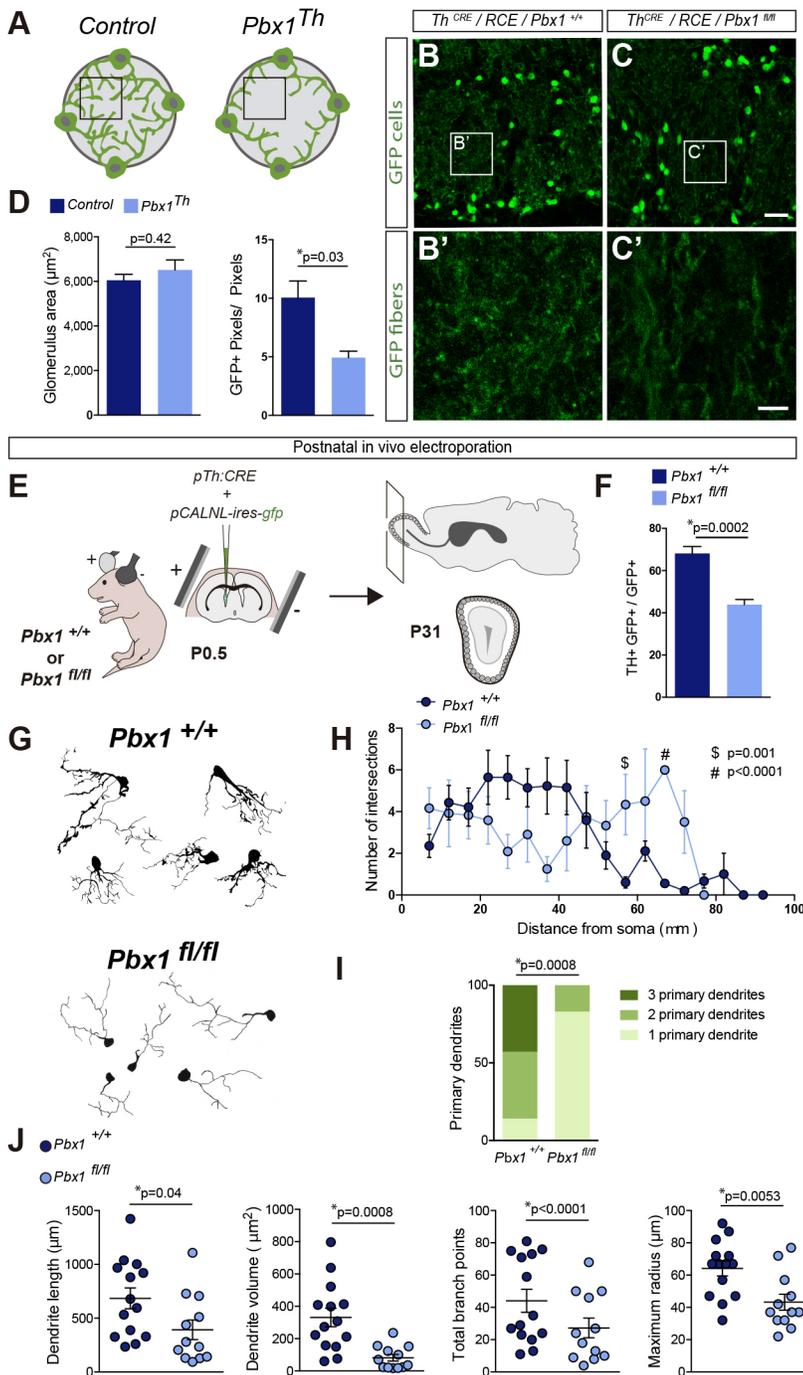
the expression of a battery of enzymes and transporters called the dopamine pathway genes, which allow for the synthesis and use of dopamine as neurotransmitter (Fig. 3C). In *C. elegans*, CEH-20/PBX acts as a DA terminal selector and is required for the correct expression of all dopamine pathway genes. Therefore, we next assessed the expression levels of dopamine pathway genes in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals. The genes, *Ddc*, *Gch1*, *Vmat2* and *Dat*, are expressed at low levels in the OB compared with hypothalamic or midbrain DA populations, and are not detectable by immunohistochemistry or *in situ* hybridization staining (Weihe et al., 2006). These genes are uniquely expressed by DA neurons in the OB; thus, we quantified mRNA levels by qRT-PCR. As expected, *Pbx1<sup>Th</sup>* animals showed a significant decrease in *Th* mRNA level compared with control animals. In addition, *Ddc*, *Vmat2* and *Dat*, but not *Gch1*, were also significantly downregulated in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants (Fig. 3D; Table S1). Altogether, our data support a late role for PBX1 as a terminal selector for OB DA neuron fate; however, it remains to be determined whether PBX1, similar to its direct binding to *Th* regulatory regions, also directly binds to the regulatory regions of other dopamine pathway genes.

### PBX1 directs morphological maturation of olfactory bulb dopaminergic neurons

For both *C. elegans* and mammals, it is well established that terminal selectors have a direct role on the transcriptional activation of neuron type-specific effector genes (Hobert, 2011). However, it is unclear whether they also play a role in the regulation of other cell maturation features, such as cellular morphology and axon projections. A few examples seem to indicate that this might be the case (Donovan et al., 2019; Lodato et al., 2014; Luria et al., 2008; Shirasaki et al., 2006); therefore, we next investigated the morphological maturation of OB DA neurons upon late deletion of *Pbx1*.

In the OB, DA somas surround the glomeruli that are invaded by DA dendritic projections (Fig. 4A; Kosaka and Kosaka, 2016). From our GFP lineage-tracing analysis, we noticed a general decrease in GFP labeling inside the glomeruli of *Pbx1<sup>Th</sup>* animals (Fig. 4B,C). Indeed, quantification of the area occupied by DA fibers revealed a significant decrease in GFP-positive pixels in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals compared with controls (Fig. 4D; Table S1). As the number of GFP-positive cells surrounding the glomeruli (Fig. 4I; Table S1) and glomerulus area (Fig. 4D, Table S1) were not affected in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants, this difference is probably due to morphological defects of *Pbx1<sup>Th</sup>* DA neurons.

To directly study the cellular morphology of individual cells, we performed postnatal *in vivo* electroporations. SEZ progenitors of newborn control (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) and *Pbx1<sup>F1/F1</sup>* animals were co-electroporated with a plasmid expressing CRE recombinase under the *Th* promoter and a CRE-inducible GFP expression plasmid (Fig. 4E). Animals were sacrificed 31 days after electroporation to allow for the migration and maturation of electroporated cells. In control animals, 68% of GFP-expressing cells co-express TH, whereas in *Pbx1<sup>F1/F1</sup>* animals, only 44% of GFP cells are TH positive (Fig. 4F; Table S1). Therefore, these data confirm a late and cell-autonomous role for PBX1 in the induction of OB DA neuron differentiation. Morphological reconstruction of individual electroporated cells shows striking differences between control and *Pbx1<sup>F1/F1</sup>* animals (Fig. 4G). *Pbx1<sup>F1/F1</sup>*-electroporated cells seem morphologically simpler and more immature than controls. They display a different branching distribution (Fig. 4H), significantly fewer primary dendrites (Fig. 4I), lower total dendrite length, lower dendrite volume, fewer branching points and a lower maximum cell radius (Fig. 4J; Table S1). Altogether, our data show that, in addition to its role in dopamine pathway gene activation, PBX1 is also required for the



**Fig. 4. PBX1 controls morphological maturation of olfactory bulb dopaminergic neurons.** (A) Schematic representation of DA neurons surrounding OB glomerulus in controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. (B-C') DA lineage tracing from the RCE allele. Scale bars: 25  $\mu\text{m}$  (B,C); 5  $\mu\text{m}$  (B',C'). (D) Quantification of glomerulus area and GFP fibers inside glomeruli of controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants.  $n=3$  animals for each genotype, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (E) Experimental design for postnatal *in vivo* electroporations. *Pbx1<sup>+/+</sup>* and *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* animals are electroporated with a plasmid for expression of CRE recombinase under the control of the *Th* promoter and a floxed *gfp*-inducible plasmid. Mice are analyzed 31 days post-electroporation. (F) Induced deletion of *Pbx1* by *in vivo* electroporation leads to a decreased number of electroporated cells co-expressing TH.  $n=5$  (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) and  $n=12$  (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*) electroporated animals, two-tailed unpaired Student's *t*-test. (G) Morphological reconstruction of electroporated cells in *Pbx1<sup>+/+</sup>* and *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* animals. (H) Morphological Sholl analysis shows different branching distributions between *Pbx1<sup>+/+</sup>* and *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* electroporated cells.  $n=14$  cells from three animals (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) and  $n=12$  cells from three animals (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*), multiple two-tailed unpaired Student's *t*-test with Holm-Sidak adjusted *P*-value. (I) Frequency distribution of primary dendrites in *Pbx1<sup>+/+</sup>* and *Pbx1<sup>fl/fl</sup>* electroporated cells.  $n=14$  cells from three animals (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) and  $n=12$  cells from three animals (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*),  $\chi^2$  test. (J) Morphological quantification of dendrite length, dendrite volume, branching points and maximum radius in *Pbx1<sup>+/+</sup>*- and *Pbx1<sup>fl/fl</sup>*-electroporated cells.  $n=14$  cells from three animals (*Pbx1<sup>+/+</sup>*) and  $n=12$  cells from three animals (*Pbx1<sup>fl/fl</sup>*), two-tailed unpaired Student's *t*-test, length, volume, radius,  $\chi^2$  branching points. See Table S1 for the primary data for quantifications.

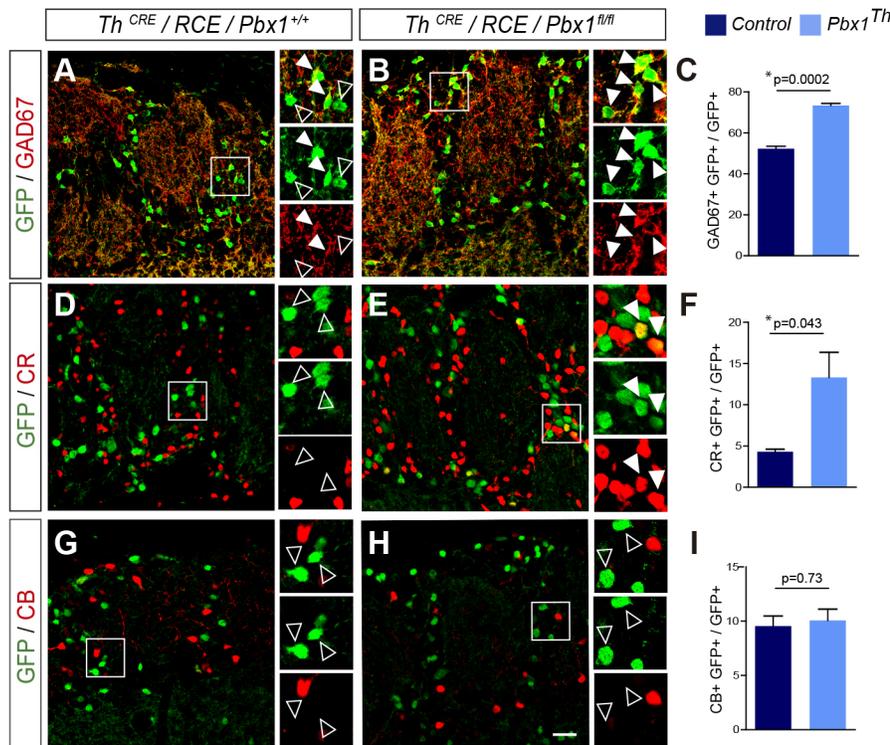
morphological maturation of OB DA neurons, expanding the number of known roles for terminal selectors.

### PBX1 is postmitotically required to repress alternative interneuron cell fates

OB DA interneurons use both dopamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as neurotransmitters (Borisovska et al., 2013). Therefore, we next assessed whether PBX1 is also required for the expression of effector genes related to GABA metabolism. GABA is synthesized from glutamate by glutamate decarboxylase enzymes GAD1 (also called GAD67) or GAD2 (also called GAD65). GAD67 is the enzyme predominantly expressed by OB DA neurons

(Kiyokage et al., 2010). Unexpectedly, *Pbx1<sup>Th</sup>* animals showed an increase in the number of DA lineage cells expressing GAD67 compared with controls (Fig. 5A-C; Table S1). This result suggests that PBX1 acts, at least to some extent, as a repressor of the GABAergic neuron fate.

In OB adult neurogenesis, different SEZ progenitors give rise to non-overlapping GABAergic interneuron populations (classified by TH, CR or CB expression) (Merkle et al., 2007). Expression analysis of non-DA interneuron markers in DA lineage cells of control and *Pbx1<sup>Th</sup>* animals showed a small but highly significant de-repression of CR in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutant cells, whereas CB expression is not affected (Fig. 5D-I; Table S1). Thus, our results indicate that,



**Fig. 5. PBX1 is required to repress alternative interneuron fates.** (A,B) GAD67 expression in DA lineage cells of controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. (C) Quantification of double GAD67- and GFP-positive cells.  $n=3$  animals for each condition, unpaired two-tailed Student's *t*-test. (D,E) CR expression in the DA lineage cells of controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. (F) Quantification of double CR- and GFP-positive cells.  $n=3$  animals for each condition, unpaired two-tailed Student's *t*-test. (G,H) CB expression in the DA lineage cells of controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. (I) Quantification of double CB- and GFP-positive cells.  $n=3$  animals for each condition, unpaired two-tailed Student's *t*-test. Scale bar: 25  $\mu$ m. See Table S1 for the primary data for quantifications. White arrowheads indicate colocalization; open arrowheads indicate lack of colocalization.

postmitotically, PBX1 is not only required for the correct expression of DA effector genes but also for repression of alternative cell fates. Interestingly, *C. elegans* terminal selectors are known to decrease cellular plasticity towards induced reprogramming by exogenous TFs (Patel and Hobert, 2017), which in more physiological conditions could be related to a role in restricting molecularly close and undesired cell fates.

#### ***Pbx1<sup>Th</sup>* mutants show olfactory behavior deficits**

Neuron-type differentiation defects are often translated into the inadequate execution of behaviors mediated by the corresponding neurons (Bacon et al., 2015; Chen et al., 2006; Erbel-Sieler et al., 2004; Liu et al., 2010). Although the specific functions of OB DA neurons are not well understood, they have been proposed to modulate odor detection, odor discrimination and gain control (Pignatelli and Belluzzi, 2017). Indeed, the activity of DA cells is directly proportional to odor concentration, and optogenetic silencing of these cells reduces mitral and tufted cell response to odors *in vivo* (Banerjee et al., 2015).

To analyze possible olfactory behavior impairments in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals, we performed an odor threshold paradigm using increasing concentrations of a synthetic non-emotionally significant odor [geraniol ( $C_{10}H_{18}O$ )] (Fig. S6). Control animals can detect this odor at the lowest tested concentration (1 nM), whereas *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants do not significantly react to this concentration (Fig. 6A; Fig. S6, Table S1). Odor behavioral defects of *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants are not specific to geraniol as mutant animals also failed to detect carvone, an additional neutral odor, even at higher concentrations (13 nM) (Fig. 6B; Table S1). These results demonstrate the existence of odor detection defects in *Pbx1<sup>Th</sup>* animals.

In addition to expression in the OB, PBX1 is also expressed in midbrain DA neurons. Loss of *Pbx1* in this DA population is offset by the upregulation of *Pbx3* (Villaescusa et al., 2016); thus, midbrain DA neurons are unaffected in *Pbx1<sup>Th</sup>*, whereas double *Pbx1<sup>Th</sup>/Pbx3* mutants show midbrain DA neurodegeneration (Villaescusa et al.,

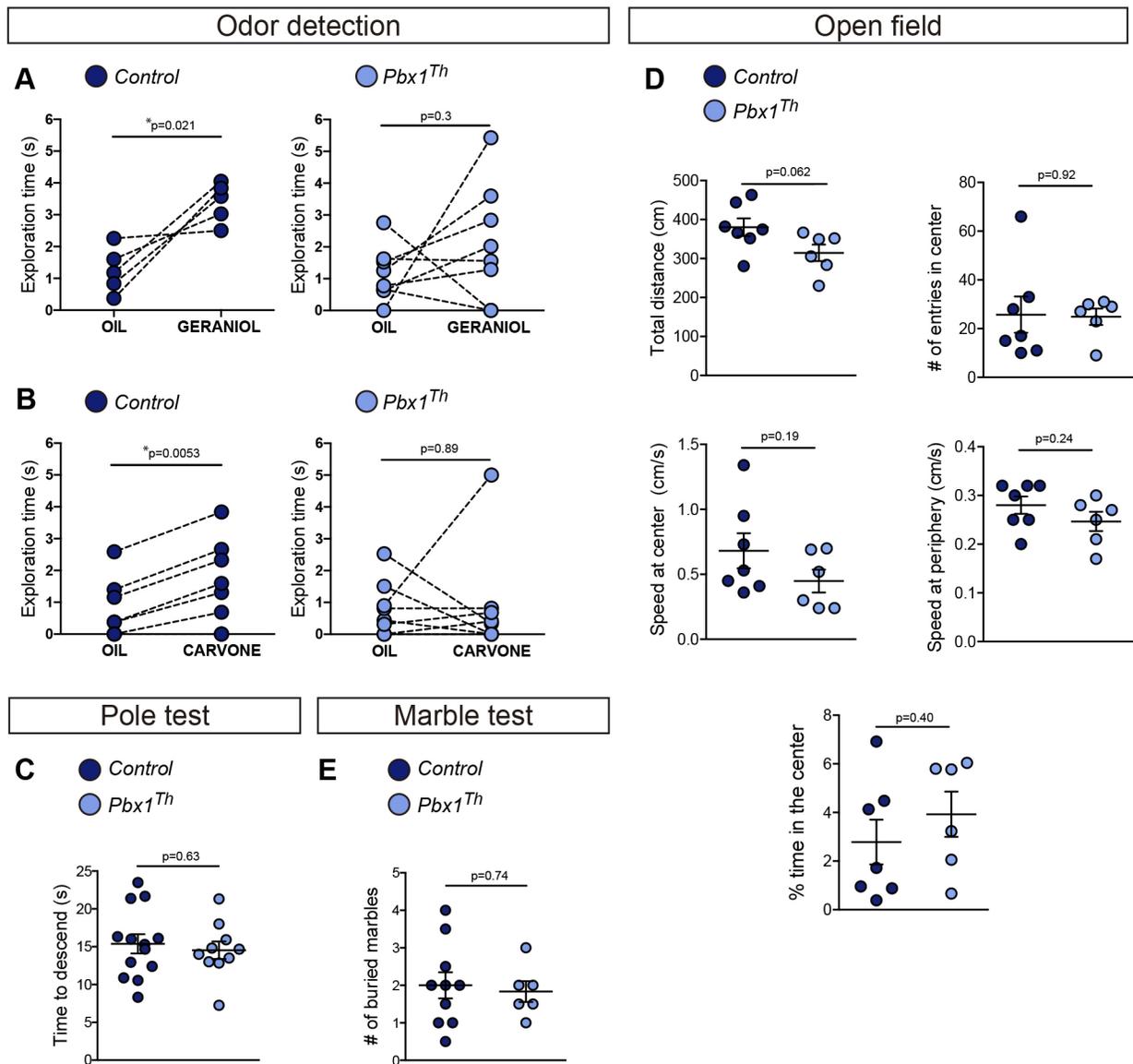
2016). Nevertheless, we analyzed locomotion activity in *Pbx1<sup>Th</sup>* single mutants to discard the possibility that the observed odor impairments were due to underlying motor defects. Importantly, performance on the pole test (T-down), a paradigm used to evaluate midbrain DA neuron dysfunction, such as nigrostriatal projection deficits, was similar in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants and controls (Fig. 6C; Table S1).

Additional behavioral tests were performed to assess locomotion and anxiety in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. Motor behavior measured in the open field test by total distance travelled and mean speed showed no differences between experimental groups (Fig. 6D; Table S1). Anxious behavior was analyzed by comparing time and number of entries in the center with the periphery of the open field. Statistical analyses of these variables in *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants presented no differences compared with controls (Fig. 6D; Table S1). Finally, in order to evaluate a possible anxious interaction with novel objects, we used the marble-burying test, which is a measure of stereotypical behavior associated with anxiety and obsessive-compulsive disorder. We did not observe differences in the number of buried marbles between animal groups (Fig. 6E; Table S1). Thus, this test, along with the open-field results, suggests *Pbx1<sup>Th</sup>* exhibit normal anxiety levels.

In summary, we find that *Pbx1<sup>Th</sup>* defects in OB DA specification leads to odor impairments, whereas motor function or anxiety levels are unaffected.

#### ***Pbx1* splicing is dynamically regulated throughout olfactory bulb adult neurogenesis**

Our results, together with previous reports, assign diverse functions to PBX1 throughout the SEZ adult neurogenic process. In progenitors, PBX1 controls neurogenic versus oligogenic commitment (Grebbin et al., 2016). Later, it is required for the survival of migrating neuroblasts (Grebbin et al., 2016) and, here, we show that during terminal differentiation, it acts as a terminal selector that induces DA neuron fate, morphological maturation and postmitotically restricting alternative cell fates. Therefore, we wondered how the plethora of PBX1 functions is temporally regulated as the cell ages.

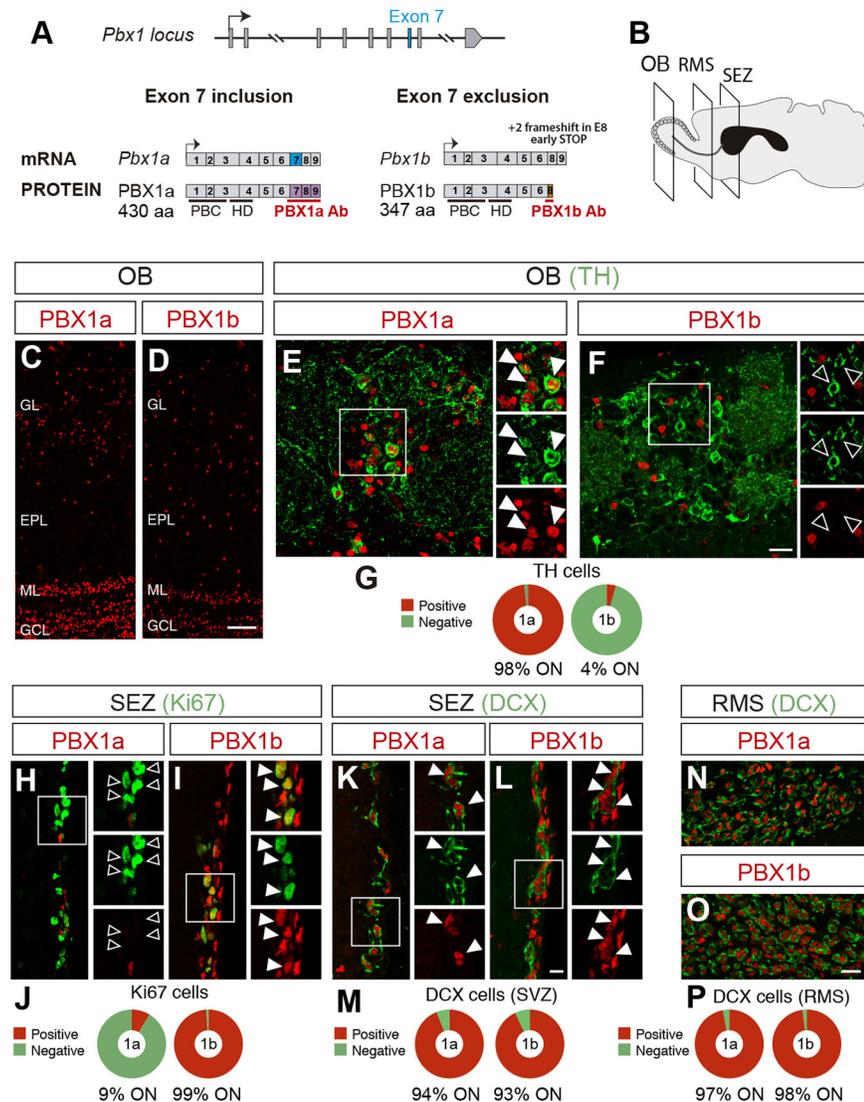


**Fig. 6. *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants show olfactory behavioral deficits.** (A, B) Quantification of the exploration time for two neutral odors, geraniol and carvone, in controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants, paired two-tailed *t*-test. (C) Pole-test results. Quantification of the time required to descend from a vertical pole in controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants, unpaired two-tailed *t*-test. (D) Analysis of the motor behavior displayed in an open field by controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants, unpaired two-tailed *t*-test. (E) Quantification of the number of buried marbles by controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants, unpaired two-tailed *t*-test. See Table S1 for the primary data for quantifications and Fig. S6 for geraniol threshold determination in controls and *Pbx1<sup>Th</sup>* mutants. Data points represent individual values for each animal; data points linked by a dashed line represent the same animal tested under two different conditions.

Specific PBX1 functions could be modulated by unique cellular contexts (e.g. the presence of different cofactors at each stage). However, like *Pbx1*, other TFs involved in OB DA neuron differentiation, such as *Dlx2*, *Pax6*, *Etv1*, *Meis2* and *Coup-tf1*, are also expressed at earlier stages of differentiation (Agoston et al., 2014; Brill et al., 2008; de Chevigny et al., 2012; Flames and Hobert, 2009; Zhou et al., 2015). Recently, alternative splicing has been demonstrated to be very prevalent in the nervous system where it provides increased functional diversity to proteins with important neuronal functions (Furlanis and Scheiffele, 2018; Vuong et al., 2016). Therefore, we aimed to explore whether alternative splicing could be involved in controlling the functional switching of PBX1.

The *Pbx1* gene can generate three different coding isoforms that differ in their C-terminal domain (Fig. 7A). *Pbx1a*, the longest isoform (coding for PBX1a, 430 amino acids), includes all coding

exons. The *Pbx1b* isoform skips exon 7, leading to a shift in the open reading frame and coding for a shorter protein with a different C-terminal domain (PBX1b, 347 amino acids). Finally, *Pbx1c* skips exons 6 and 7, and gives rise to a truncated version of PBX1a (PBX1c, 339 amino acids) (Fig. 7A). Using specific antibodies against PBX1a and PBX1b isoforms we found that both isoforms are expressed in the adult OB (Fig. 7A-D). PBX1c isoform expression was not analyzed due to a lack of specific antibodies. Interestingly, double immunostaining with TH reveals that all DA cells express PBX1a whereas PBX1b expression is absent (Fig. 7E-G). Next, we analyzed PBX1 isoform expression at earlier stages of differentiation. As opposed to mature DA neurons, almost all SEZ cycling progenitors (labeled by Ki67 expression) express PBX1b but lack PBX1a isoform expression (Fig. 7H-J). Finally, immature migrating neuroblasts in the SEZ and RMS labeled with DCX,



**Fig. 7. *Pbx1* exon 7 skipping is tightly regulated throughout the OB DA neurogenic process.**

(A) Schematic representation of the *Pbx1* locus and the isoforms generated by alternative splicing of exon 7 (in blue). The black bars indicate the location of the DNA-binding domains and the red bars represent the domain recognized by the isoform-specific antibodies. Purple and orange boxes in the protein coding regions represent amino acid differences between the two isoforms. Ab, antibody; HD, homeodomain DNA binding domain, PBC, PBC DNA-binding domain.

(B) Brain representation of the coronal levels analyzed in the micrographs. OB, olfactory bulb; RMS, rostral migratory stream; SEZ, subependymal zone.

(C,D) Analysis of PBX1a and PBX1b expression in the adult OB with isoform-specific antibodies. Scale bar: 75  $\mu$ m. EPL, external plexiform layer; GCL, granular cell layer; GL, glomerular cell layer; ML, mitral cell layer. (E,F) Double immunostaining of TH with PBX1a and PBX1b antibodies. Scale bar: 25  $\mu$ m.

(G) Quantification of PBX1a and PBX1b expression in OB DA cells. (H,I) Analysis of PBX1a and PBX1b expression in SEZ proliferating progenitors labeled with Ki67 antibody. (J) Quantification of PBX1a and PBX1b expression in SEZ proliferating cells.

(K,L) Analysis of PBX1a and PBX1b expression in SEZ migrating neuroblasts labeled with DCX antibody. Scale bar: 10  $\mu$ m. (M) Quantification of double immunostaining of DCX with PBX1a and PBX1b isoforms in SEZ. (N,O) Analysis of PBX1a and PBX1b expression in RMS migrating neuroblasts labeled with DCX antibody. Scale bar: 20  $\mu$ m. (P) Quantification of double immunostaining of DCX with PBX1a and PBX1b isoforms in RMS. White arrowheads indicate colocalization; open arrowheads indicate lack of colocalization.

co-express both PBX1b and PBX1a isoforms (Fig. 7K-P). In conclusion, our analysis reveals a temporal gradient of exon 7 inclusion throughout the adult DA neurogenic process: progenitors skip exon 7 but it is partially included in migrating neuroblasts and is always present in mature DA neurons.

### The long PBX1 isoform specifically rescues dopaminergic terminal differentiation defects of *Pbx1*<sup>Fl/Fl</sup> mutant mice

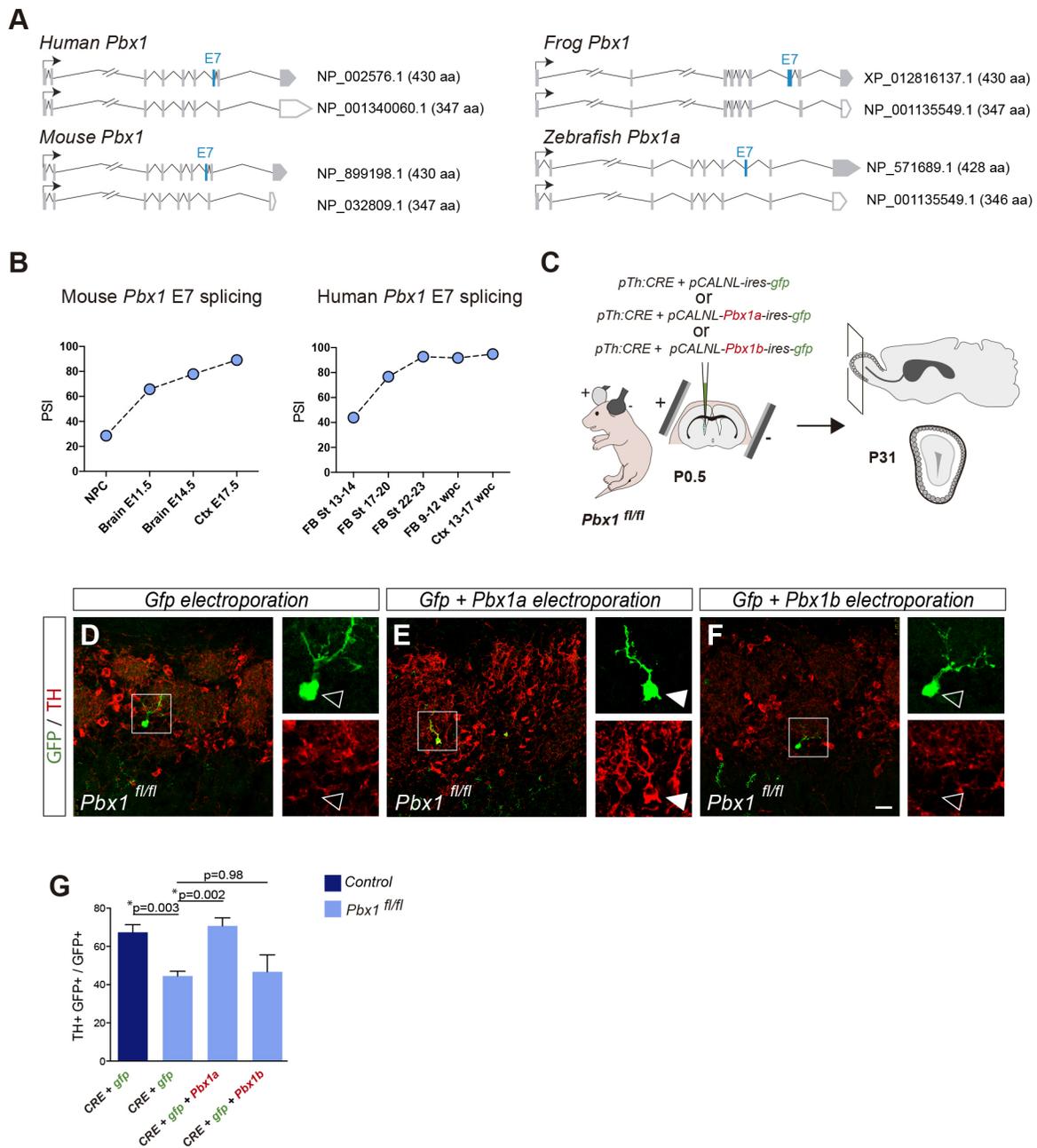
PBX TFs are evolutionarily ancient and present in different animal groups including bilateria and cnidaria. Sequences homologous to mouse exon 7 are present in all *Pbx1* vertebrate genes but they are absent in invertebrates. Importantly, exon 7 is alternatively spliced in fish, frogs, mice and humans, suggesting that this splicing event bears important functions (Fig. 8A). Analysis from available expression data for *Pbx1* exon 7 inclusion throughout mouse and human brain development (Tapial et al., 2017) shows that exon 7 is mostly excluded from mouse neuronal progenitors and at the earliest stages of human forebrain development, and it is progressively included during brain development, being the predominant isoform at the end of cortical neurogenesis (Fig. 8B). Additionally, it has been reported that, *in vitro*, mouse embryonic stem cells mostly skip exon 7, and forced expression of the long-isoform *Pbx1a* induces aberrant transcription of neuronal genes (Linares et al., 2015).

In light of the phylogenetic conservation of exon 7 alternative splicing, its increased inclusion during brain development in mice and humans, and its tight temporal control in adult SEZ neurogenesis, we explored whether PBX1a and PBX1b isoforms are functionally different *in vivo*. To this end we performed electroporations of CRE recombinase under the control of the *Th* regulatory region on *Pbx1*<sup>Fl/Fl</sup> and expressed GFP alone, or GFP plus each *Pbx1* isoform (Fig. 8C). As we previously described, late deletion of *Pbx1* by CRE electroporation leads to defects in TH expression (Fig. 8D,G; Table S1). Importantly, these TH-expressing defects could be rescued by co-electroporation of an inducible *Pbx1a*-expressing construct but not through *Pbx1b* expression (Fig. 8E-G; Table S1), which suggests that the 97 amino acid C-terminal domain of PBX1a confers specific functions to PBX1 for the induction of dopaminergic neuron fate.

## DISCUSSION

### PBX1 acts as terminal selector for olfactory bulb dopaminergic neuron fate

Here, we show that *Pbx1* is expressed throughout the OB DA neurogenic process from progenitors to differentiating neurons, and its expression is maintained throughout the life of the OB DA cells. In



**Fig. 8. The long *Pbx1* isoform specifically rescues DA terminal differentiation defects of *Pbx1*<sup>Th</sup> mutants.** (A) Representation of *Pbx1* exon 7 alternative splicing isoforms that are present in human, mouse, frog and zebrafish. (B) Percent spliced-in (PSI) values for *Pbx1* exon 7 throughout mouse and human neurodevelopmental progression. Data source: VastDB (Tapial et al., 2017). Ctx, cortex; E, embryonic day; FB, Forebrain; NPC, neuronal precursor; St, Carnegie stage; wpc, weeks post-coitum. (C) Schematic representation of the experimental design. *Pbx1*<sup>fl/fl</sup> mutant animals are electroporated with a plasmid for CRE recombinase expression under the *Th* promoter and a *Gfp*, *Gfp+Pbx1a* or *Gfp+Pbx1b* inducible plasmid. Mice are analyzed 31 days post-electroporation. (D-F) Representative pictures of electroporated GFP cells and TH expression under the different experimental conditions. Scale bar: 20  $\mu$ m. (G) Quantification of TH expression in the electroporated cells. Tukey's multiple comparison test. See Table S1 for the primary data for quantifications.

addition to its known early roles in neurogenesis and neuroblast survival (Grebbin et al., 2016), late depletion of *Pbx1* in maturing DA neurons allowed us to unravel its role in DA terminal differentiation. PBX1 is required for the expression of a broad range of OB DA effector genes, and we determined that, at least for *Th*, this regulation is direct. Moreover, PBX1 is not required for the transcription of other TFs known to be necessary for OB DA specification, although it seems to stabilize MEIS2 protein, as determined in other systems (Dardaei et al., 2014; Garcia-Cuellar et al., 2015). Altogether, our data

suggest that PBX1 acts as a terminal selector for OB DA neuron fate. Interestingly, PBX1 is also required for midbrain DA neuron specification (Villaescusa et al., 2016). However, the regulatory program controlling midbrain DA neuron specification is not shared with the OB, as a different set of TFs control midbrain DA neuron specification (Flames and Hobert, 2011) and in this brain region PBX1 acts as an upstream regulator of *Pitx3*, a TF that acts as midbrain DA terminal selector. Thus, PBX1 seems to act at different levels in OB and midbrain DA neuron specification.

### Neuron morphology and alternative fate repression are also part of the terminal selector regulatory program

Previous studies in *C. elegans* have established that terminal selectors directly bind and activate expression of neuron type specific effector genes (Hobert, 2011). However, it is unclear whether these TFs play additional roles in neuron-type specification programs. Here, we show that PBX1 is terminally required for correct morphological maturation of OB DA cells, expanding the known functions of terminal selectors. Currently, effector genes controlling OB DA neuron morphology are unknown. Interestingly, PBX1a is required for correct axon pathfinding in midbrain DA neurons through regulation of the netrin receptor DCC (Sgadò et al., 2012). It would be interesting to determine whether DCC signaling is also involved in correct OB DA morphology and whether DCC expression in the OB is regulated by PBX1.

In addition to this unforeseen role of PBX1 as a morphological determinant, we also find that postmitotic removal of PBX1 leads to de-repression of effector genes from other cell lineages, implying that terminal selectors are also actively involved in restraining alternative cell fates. Of note, other TFs required in OB terminal differentiation programs show similar dual roles as activators and repressors of specific cell fates. For example, expression of a dominant-negative form of *Meis2* leads to a decrease in TH expression accompanied by induction of CR expression (Agoston et al., 2014). This phenotype, which is very similar to the *Pbx<sup>Th</sup>* phenotype, also supports the function of MEIS2/PBX1 as a complex. Complementarily, deletion of *Sp8* or *Zic1/2*, TFs that are expressed in the CR lineage, leads to defects in CR expression and ectopic TH induction (Gaborieau et al., 2018; Tiveron et al., 2017). Repression of alternative fates might be an important function of some terminal selectors. In line with this hypothesis, a recent report shows that *unc-3*, a terminal selector for *C. elegans* motoneuron specification, also acts as a repressor of alternative neuronal fates (Feng et al., 2020).

In *C. elegans*, terminal selectors restrain neuronal plasticity to induced reprogramming, at least in part, through epigenetic mechanisms (Patel and Hobert, 2017). Future experiments should determine whether DA cells lacking *Pbx1* have defects in chromatin compaction, and whether those defects are responsible for ectopic CR expression.

### Neuron-subtype terminal differentiation programs are phylogenetically conserved

In *C. elegans*, CEH-20/PBX1, AST-1/ETV1 and CEH-43/DLX2 are terminal selectors of DA neuron fate (Doitsidou et al., 2013; Flames and Hobert, 2009). Our characterization of PBX1 as a DA terminal selector, along with previous reports on ETV1 and DLX2 roles in OB DA terminal differentiation (Brill et al., 2008; Cave et al., 2010; Flames and Hobert, 2009), suggest that these two neuronal populations in *C. elegans* and mammals share the same terminal regulatory program. As previously mentioned, mouse *Pax6*, *Meis2* and *Coup-fl1* TFs are also involved in OB DA terminal differentiation. Our own unpublished results in *C. elegans* indicate that nematode orthologs for these TFs (*vab-3*, *unc-62* and *unc-55*, respectively) are also necessary for correct DA specification in the worm (A. Jimeno and N.F., unpublished). Altogether, these data indicate that nematode DA neurons and mammalian OB DA neurons share deep homology. Deep homology refers to the relationship between cells or structures in distant species that share their genetic regulatory programs. This concept has been previously proposed for other neuronal types in distant animals (Denes et al., 2007; Lloret-Fernández et al., 2018; Nomaksteinsky et al., 2013;

Tomer et al., 2010). Indeed, the identification of homologous gene regulatory networks is an emerging strategy used to assign homologous neuronal types in distant species (Arendt, 2008; Arendt et al., 2019, 2016).

### Temporal diversification of transcription factor functions through splicing regulation

TFs are usually broadly expressed, and it is well established that they fulfill different functions depending on their specific cellular contexts. Interactions with other differentially expressed TFs, as well as available chromatin landscapes, are thought to determine context-specific targets of a given TF (Reiter et al., 2017). However, TFs display different functions not only in distinct cell types but also throughout the differentiation of the same cell. In this context, cells have to rapidly transition from one regulatory state to another. These transitions imply the rapid rewiring of the transcriptional regulatory landscape of the cell (Rhee et al., 2016). How the same TFs dynamically switch their functional targets in a quick and efficient manner is currently poorly understood. Here, we show that regulation of TF alternative splicing could be an important mechanism controlling temporal modulation of TF functions.

Indeed, alternative splicing is more prevalent in TFs than in the rest of the genome, and defects in TF isoform expression may underlie multiple neurodevelopmental disorders (Porter et al., 2018). Despite evidence supporting the biological relevance of TF alternative splicing in nervous system development, very little is known about the functional differences between splicing variants of the same TF (Bohrer et al., 2015; Huynh et al., 2011; Gabut et al., 2011; Pfurr et al., 2017; Raj et al., 2011; Rhee et al., 2016). Here, we provide an additional example of the diverse functionality of TF isoforms. More importantly, this is, to our knowledge, the first reported example of dynamic regulation of TF actions throughout neuronal development by alternative splicing.

How diverse actions of PBX1 isoforms are modulated remains to be determined. PBX1a and PBX1b isoforms share the homeodomain and PBC DNA-binding domains, suggesting their different actions are likely mediated through differential protein-protein interactions. Indeed, cell lines with different percentages of *Pbx1* exon 7 inclusion show broadly similar PBX1 DNA-binding profiling (Linares et al., 2015), and in SEZ and *in vitro* adult neural stem cells, PBX1 is already bound to *Th* even though the gene is still not expressed (Grebbin et al., 2016).

In summary, our results suggest that temporal control of TF alternative splicing could be used to diversify TF targets at various stages of neuron specification. It will be important in the future to investigate whether this is a widespread mechanism used to regulate the rapid rewiring of transcriptional regulatory programs that is required in the cell-state transitions taking place in the development of many tissues and organs.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The generation and genotyping of *Pbx1<sup>Flox/Flox</sup>* conditional and *Pbx2* knockout mutant mice has been described previously (Koss et al., 2012; Selleri et al., 2004). Both strains were kindly provided by Dr Licia Selleri (University of California San Francisco, CA, USA). Th-IRES-Cre [B6.129X1-Th<sup>tm1(cre)</sup>/Te<sup>Kieq</sup>] and RCE [Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1.1(CAG-EGFP)</sup>Fsh/Mmjax] mice were obtained from the European Mutant Mice Association (EM ID: 00254) and the Jackson Laboratory (stock number 32037-JAX), respectively. Both strains were genotyped as described previously (Lindeberg et al., 2004; Sousa et al., 2009). *Pbx1<sup>FUFI</sup>* or *Pbx1<sup>+/-</sup>;Th<sup>CRE</sup>* animals were used as controls as no significant differences were found between these two genotypes. Housing and experiments were carried out following protocols approved by the ethics

committee of the Consejo Superior Investigaciones Científicas (Madrid, Spain) and in accordance with Spanish and European regulations.

For BrdU labeling, 8-week old male mice received seven intraperitoneal injections of 50 mg/kg body weight BrdU, one every 2 h, and were sacrificed 42 days after the last injection.

### Histological analysis

Adult male mice were deeply anesthetized (5.5 µl/g of Dolethal) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Postnatal day (P) 0 pups were anesthetized by hypothermia before transcardial perfusion. Brains were dissected and postfixed by immersion in the same fixative overnight (o/n), washed in PBS for 2 h, cryoprotected o/n in 30% sucrose in PBS (w/v), mounted in OCT Compound (Anamed) and serially sectioned (10 µm) using a Leica CM1900 cryostat. For morphology analysis, we obtained 50 µm floating sections with a sliding microtome (Leica SM2010R). Frozen sections were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer [0.1 M PBS containing 1% bovine serum albumin (v/v) and 0.2% Triton X-100 (v/v)]. For BrdU immunodetection, sections were first treated with 2 N HCl for 20 min at 37°C and neutralized in 0.1 M borate buffer (pH 8.5) for 10 min. For antigen retrieval, sections were boiled in 10 mM sodium citrate (pH 6), for 5 min and allowed to cool down slowly. Blocked sections were incubated o/n at 4°C with primary antibodies diluted in blocking buffer. Antibodies used were as follows: rabbit anti-TH (1:1000; Pel-Freez, P40101-0); mouse anti-TH (1:500; Millipore, MAB318); sheep anti-TH (1:1000; Pel-Freez, P60101-0); mouse anti-PBX1a (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-101851); mouse anti-PBX1b (1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-101852); mouse anti-PBX2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-890); rat anti-BrdU (1:400; Abcam, ab6326); rabbit anti-CR (1:2000; Millipore, MAB1568); rabbit anti-CB (1:2000; Swant, CB38); mouse anti-CR (1:3000; Millipore, MAB5054); chicken anti-GFP (1:1000; Aves Labs, GFP-1020); mouse anti-GAD67 (1:500; Millipore, MAB5406); mouse anti-MEIS2 (1:1000; Sigma-Aldrich, AV34684); mouse anti-COUP-TF1 (1:500; Persus Proteomics, H8132); rabbit anti-ER81 (1:1000, kindly provided by T. Jessel, Columbia University, NY, USA); and rabbit anti-PAX6 (1:1000; Developmental Studies Hybridoma Bank, AB-528427). After several PBS washes, the sections were incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 555- or Alexa Fluor 647-conjugated appropriate secondary antibodies (A21202, A21206, A31572, A31571, A21447, A21071, 1:600, Thermo Fisher Scientific) (1:600, Thermo Fisher Scientific). Samples were counterstained with 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI, 0.4 mg/ml, Sigma-Aldrich), dehydrated in an ascending series of ethanols and mounted with Entellan (Millipore).

For quantification of BrdU-labeled cells, samples were analyzed using a Zeiss ImagerM2 microscope. All BrdU-positive cells of the entire glomerular cell layer were counted in 16 sections along the entire rostro-caudal extent of the olfactory bulb. No fewer than 100 BrdU-positive cells per animal were scored. For quantifications of TH-positive cells (P0 and adult animals), GFP-positive cells and colocalization in immunofluorescence, samples were analyzed with a TCS-SP8 Leica Microsystems confocal microscope. For OB quantification, dorsal, ventral, medial and lateral regions of the glomerular cell layer were randomly sampled with a predetermined area (184×184 µm corresponding to the field at 63× magnification) and all immunopositive cells in these selected areas were counted. In all cases, cells were sampled from six sections along the rostro-caudal axis of the olfactory bulb. A minimum of 400 GFP-positive cells per animal were scored. To analyze the *in vivo* electroporations, all GFP-positive cells of the glomerular cell layer were counted in every fourth section. A minimum of 100 GFP-positive cells per animal were analyzed. For expression analysis of PBX1a and PBX1b in the SEZ, five sections covering the extent of the SEZ per animal were analyzed. For the analysis of the amount of Ki67-positive cells and DCX-positive cells per area, a minimum of three sections were analysed, corresponding to at least 300 Ki67-positive cells and 400 DCX-positive cells.

### Behavioral tests

Male animals between 8 and 12 weeks old were used. Olfactory threshold detection method was run as described previously (Perez-Villalba et al.,

2018). Briefly, mice were placed in a 22.5 cm<sup>2</sup> open Plexiglas box with chip bedding. After 3 min of exploration, a cotton stick soaked in non-odorant mineral oil was introduced into the box through a 1 cm diameter hole. The stick was presented for 1 min and thereafter substituted by a series of five consecutive fresh cotton sticks also soaked in non-odorant mineral oil to produce habituation to the novel stimulus. Mice were then exposed for 1 min to successive cotton sticks with 3:1 increasing concentrations of geraniol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O; Ventós) diluted in mineral oil: 1 nM, 3 nM, 11 nM, 36 nM, 111 nM and 341 nM. A different set of animals was exposed to carvone (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O, Sigma-Aldrich) at 13 nM, after stick habituation. Carvone vapor pressure is slightly higher than geraniol (0.115 mmHg and 0.03 mmHg, respectively at 25°C); thus, at the same concentration, more volatile carvone is available. Nevertheless, to ensure values above detection threshold, we used 13 nM carvone instead of the 1 nM used for geraniol. Olfactory exploration and subsequent behavioral experiments were recorded and tracked with Smart Video Tracking Software (Panlab). After each test, behavioral instruments were thoroughly wiped clean with 70% alcohol.

In the open-field test, general locomotor activity was examined in a 40 cm<sup>2</sup> gray squared box (Panlab). Mice were carefully introduced into the open field and recorded for 20 min. Periphery/center areas were automatically established by the Smart video tracking software (Panlab, Harvard Apparatus). Variables, such as mean speed (cm/s), total distance traveled (cm), time in areas and number of entries, were analyzed.

In the marble-burying test, mice were placed for 10 min in a clean home cage with four small crystal marbles randomly distributed. The number of totally buried marbles (1 point) or half-buried marbles (0.5 points) was measured.

For pole-test analysis, each mouse was placed head upwards on top of a wooden pole (1 cm diameter and 45 cm long). When placed on the pole, the mouse self-oriented downwards and descended the pole. The time between the placement on pole and the moment when the four paws touched the floor (T-down) was measured, with a time limit of 90 s. All experimental subjects were tested for three trials and the time average was considered for representation.

### In vivo electroporations

The SEZ electroporation procedure was based on published methods (Boutin et al., 2008; Fernández et al., 2011). Briefly, P0 male and female mice were anesthetized by hypothermia, fixed on a custom-made support plate placed in a stereotaxic rig and injected at the midpoint of a virtual line connecting the eye with the cranial landmark Lambda with hand-pulled glass pipettes. Plasmid solution (0.8 µl) was injected in combination with 1% Fast Green (Sigma-Aldrich). The accuracy of the injection could be monitored by the filling of the injected ventricle by the dark solution. Only successfully injected mice were subjected to five electrical pulses (135 V, 50 ms pulse and 950 ms intervals) using the ECM 830 BTX electroporator (Harvard Apparatus) and tweezer-style reusable electrodes. Electroporated animals were reanimated for several minutes on a 37°C heating plate before being returned to the mother.

Plasmids used in this study were prepared by using an EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) and resuspended in sterile PBS at a final concentration of 4–6 µg/µl. pTh:CRE plasmid (pNF365) was built with a CRE sequence from the pCAG-Cre backbone (Addgene, 26647) replacing the luciferase sequence in the TH5kb\_pGL3 plasmid (Flames and Hobert, 2009). pCALNL-IRES-EGFP (pNF320), was built by replacing the DsRed sequence of pCALNL-DsRed plasmid (Addgene, 13769) with an 'IRES-EGFP' cassette from pCAGIG (Addgene, 11159). *Pbx1a* and *Pbx1b* were then cloned into pCALNL-IRES-EGFP to generate pNF419 and pNF420, respectively.

### Morphology measurements

For fiber analysis, GFP levels were measured after anti-GFP immunostaining. The inner contour of 26 glomeruli per animal (at 63× magnification) was delimited and the area was analyzed using ImageJ. After background analysis, the threshold for minimal GFP-positive pixel value was set to 20. Results are expressed as percentage of GFP-positive pixels with respect to the total number of pixels in the area.

To analyze the morphology of electroporated neurons, randomly selected GFP-positive neurons in the OB glomerular layer of *Pbx1<sup>+/+</sup>* and *Pbx1<sup>Flox/Flox</sup>* were photographed at 63× magnification using a TCS-SP8 Leica confocal

microscope, and maximum projections from image z stacks (every 0.75  $\mu\text{m}$ ) were generated. GFP cells were confirmed PBX1a and TH positive in *Pbx1<sup>F/+</sup>* electroporated animals, and PBX1a negative and TH negative in *Pbx1<sup>Flx/Flx</sup>* electroporated animals. In both genotypes, for each neuron, different morphometric parameters were measured using the NeuronStudio software package.

### ChIP PCR

For the ChIP assay, the olfactory bulbs of three C57Bl/6 adult male animals (8-12 weeks old) were dissected for each experiment. The tissue was dissociated in papain solution at 37°C for 50 min followed by Dounce homogenization. Cells were fixed in 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min. Fixed cells were washed with PBS and lysed in lysis buffer [NaCl 0.1 M, Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 5 mM and 0.5% SDS] (1 ml/10<sup>7</sup> cells) at 4°C for 10 min. After centrifugation, the pellet was resuspended in two parts of lysis buffer and one part of triton buffer [NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M (pH 8), EDTA 5 mM and 0.5% Triton X-100]. Cell lysates were sonicated using a Bioruptor (Diagenode) for five cycles (30 s ON/30 s OFF). The PBX1 antibody (2  $\mu\text{g}$ , Cell Signaling Technology, 4342) was incubated with 30  $\mu\text{l}$  of Dynabeads Protein G (Invitrogen) o/n at 4°C. The antibody was then added to the chromatin solution, which was diluted 2:1 in dilution buffer [1.1% Triton X-100, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl 16.7 mM (pH 8) and NaCl 167 mM] and incubated o/n at 4°C. Immune complexes were washed twice with low salt buffer [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8) and 150 mM NaCl] twice with high salt buffer [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8) and 500 mM NaCl] once with LiCl immune complex buffer [LiCl 0.25 M (Sigma-Aldrich), 1% NP40 (Sigma-Aldrich), 1% deoxycholic acid, 1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl (pH 8)] and twice with TE buffer [1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl (pH 8)]. Finally, DNA was eluted in 20  $\mu\text{l}$  10% SDS, 20  $\mu\text{l}$  1 M NaHCO<sub>3</sub> and 160  $\mu\text{l}$  of double distilled H<sub>2</sub>O per sample. Crosslinks were reversed at 65°C o/n, proteins were digested using proteinase K, and DNA was purified using the QIAQUICK PCR Purification Kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR was performed with Fast SYBR Green (Applied Biosystems) in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The percentage of input is represented, showing the amount of DNA pulled down using the antibody of interest in the ChIP reaction, relative to the amount of starting material (input sample). The following formula was used ( $2^{-(\text{sample Ct} - \text{INPUT Ct}) \times 100} / 3000$ ) (3000 corrects the dilution factor). Normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2027) was used as a negative control for the nonspecific binding. Untr17 genomic regions were used as control sequences for negative PBX1 binding. The primers used for this assay were as follows: *Th distal site*, fwd gataaggcagcagcttcac, and rev cctcttcagcagcgtgttt; *Th proximal site*, fwd gtctctgtcccagaacacc and rev: aggcacctcctctgaatc; Untr17 fwd caccacctgtgacacata and rev ttacccttcattcgtctgt.

### RNA isolation and qRT-PCR analysis

Eight-12-week-old male animals were used for RNA isolation and the qRT-PCR analysis. Total RNA from a single olfactory bulb was extracted using Trizol (Invitrogen) and 1  $\mu\text{g}$  of RNA was reverse transcribed into cDNA using random primers and the SuperScript III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). cDNA products were amplified using the Applied Biosystems QuantStudio5 Real-Time PCR System. All PCR reactions were performed using 10  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gene Expression Master Mix 2 $\times$  (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gene Expression Assay 20 $\times$ , 4  $\mu\text{l}$  of cDNA (5 ng/ $\mu\text{l}$ ) and water to reach a final volume of 20  $\mu\text{l}$ /reaction. Specific TaqMan probes for mouse *Th* (Mm00447557 m1), *Slc6a3* (Mm00438388 m1), *Slc18a2* (Mm00553058 m1), *Gch1* (Mm01322973 m1), *Ddc* (Mm01192100 m1), *Meis2* (Mm00487748 m1) and *Gapdh* (Mm99999915 g1 as an endogenous control) were purchased from Applied Biosystems. Each sample was run in triplicate as a singleplex reaction system. In all experiments, samples containing no template were included as negative controls. The mRNA expression levels of the genes analyzed were represented as relative quantities (RQs) using the comparative threshold cycle method ( $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) (Livak and Schmittgen, 2001). The threshold cycle values of each gene were normalized with respect to the housekeeping gene *Gapdh*.

### Statistical analysis and graphical representation

All experiments were conducted blind to the genotype or experimental condition. All values are represented as the mean $\pm$ s.e.m. For each experiment, the number of independent animals or cells is indicated as *n*. Applied statistical tests are indicated in the corresponding figure legends. Results were considered to be statistically significant when \**P*<0.05.

### Acknowledgements

We thank Dr Licia Selleri for providing *Pbx1<sup>F/Flx</sup>* and *Pbx2* mutant animals and *Pbx1* plasmids; Dr Oscar Marín and Dr Beatriz Rico labs for scientific discussion; Dr Pietro Fazzari for help with morphological reconstruction; Elia García for technical help; and Dr Oscar Marín, Dr Helena Mira and Dr Isabel Fariñas for comments on the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

### Author contributions

Conceptualization: N.F.; Methodology: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., R.B.-R., A.P.-V., C.C., M.C., N.F.; Formal analysis: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., R.B.-R., A.P.-V.; Investigation: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., R.B.-R., A.P.-V.; Data curation: N.F.; Writing - original draft: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., R.B.-R., C.C., N.F.; Writing - review & editing: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., R.B.-R., A.P.-V., C.C., M.C., N.F.; Visualization: L.R., I.R.-B., L.C., M.M., N.F.; Supervision: N.F.; Project administration: N.F.; Funding acquisition: N.F.

### Funding

This work was supported by PhD fellowships from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU16/02008 to I.R.-B.) and the Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2012-053847 to L.R. and BES-2015-072799 to R.B.-R.); by European Research Council grant (ERC-STG-2011-281920); by Ministerio de Economía y Competitividad grants (SAF2017-84790-R and SAF2016-75004R) and by the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2018/055).

### Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.186841.supplemental>

### Peer review history

The peer review history is available online at <https://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.186841.reviewer-comments.pdf>

### References

- Agoston, Z., Heine, P., Brill, M. S., Grebbin, B. M., Hau, A.-C., Kallenborn-Gerhardt, W., Schramm, J., Götz, M. and Schulte, D. (2014). Meis2 is a Pax6 co-factor in neurogenesis and dopaminergic periglomerular fate specification in the adult olfactory bulb. *Development* **141**, 28-38. doi:10.1242/dev.097295
- Arendt, D. (2008). The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 868-882. doi:10.1038/nrg2416
- Arendt, D., Musser, J. M., Baker, C. V. H., Bergman, A., Cepko, C., Erwin, D. H., Pavlicev, M., Schlosser, G., Widder, S., Laubichler, M. D. et al. (2016). The origin and evolution of cell types. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 744-757. doi:10.1038/nrg.2016.127
- Arendt, D., Bertucci, P. Y., Achim, K. and Musser, J. M. (2019). Evolution of neuronal types and families. *Curr. Opin. Neurobiol.* **56**, 144-152. doi:10.1016/j.conb.2019.01.022
- Bacon, C., Schneider, M., Le Magueresse, C., Froehlich, H., Sticht, C., Gluch, C., Monyer, H. and Rappold, G. A. (2015). Brain-specific Foxp1 deletion impairs neuronal development and causes autistic-like behaviour. *Mol. Psychiatry* **20**, 632-639. doi:10.1038/mp.2014.116
- Banerjee, A., Marbach, F., Anselmi, F., Koh, M. S., Davis, M. B., Garcia da Silva, P., Delevich, K., Oyibo, H. K., Gupta, P., Li, B. et al. (2015). An interglomerular circuit gates glomerular output and implements gain control in the mouse olfactory bulb. *Neuron* **87**, 193-207. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.019
- Bohrer, C., Pfurr, S., Mammadzada, K., Schildge, S., Plappert, L., Hils, M., Pous, L., Rauch, K. S., Dumit, V. I., Pfeifer, D. et al. (2015). The balance of Id3 and E47 determines neural stem/precursor cell differentiation into astrocytes. *EMBO J.* **34**, 2804-2819. doi:10.15252/embj.201591118
- Bonzano, S., Bovetti, S., Gendusa, C., Peretto, P. and De Marchis, S. (2016). Adult born olfactory bulb dopaminergic interneurons: molecular determinants and experience-dependent plasticity. *Front. Neurosci.* **10**, 7967. doi:10.3389/fnins.2016.00189
- Borisovska, M., Bensen, A. L., Chong, G. and Westbrook, G. L. (2013). Distinct modes of dopamine and GABA release in a dual transmitter neuron. *J. Neurosci.* **33**, 1790-1796. doi:10.1523/JNEUROSCI.4342-12.2013

- Boutin, C., Diestel, S., Desoeuvre, A., Tiveron, M.-C. and Cremer, H. (2008). Efficient in vivo electroporation of the postnatal rodent forebrain. *PLoS ONE* **3**, e1883. doi:10.1371/journal.pone.0001883
- Bovetti, S., Bonzano, S., Garzotto, D., Giannelli, S. G., Iannielli, A., Armentano, M., Studer, M. and De Marchis, S. (2013). COUP-TFI controls activity-dependent tyrosine hydroxylase expression in adult dopaminergic olfactory bulb interneurons. *Development* **140**, 4850-4859. doi:10.1242/dev.089961
- Brill, M. S., Snappyan, M., Wohlfrom, H., Ninkovic, J., Jawerka, M., Mastick, G. S., Ashery-Padan, R., Saghatelian, A., Berninger, B. and Götz, M. (2008). A Dlx2- and Pax6-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* **28**, 6439-6452. doi:10.1523/JNEUROSCI.0700-08.2008
- Capellini, T. D., Zewdu, R., Di Giacomo, G., Asciutti, S., Kugler, J. E., Di Gregorio, A. and Selleri, L. (2008). Pbx1/Pbx2 govern axial skeletal development by controlling Polycomb and Hox in mesoderm and Pax1/Pax9 in sclerotome. *Dev. Biol.* **321**, 500-514. doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.005
- Cave, J. W., Akiba, Y., Banerjee, K., Bhosle, S., Berlin, R. and Baker, H. (2010). Differential regulation of dopaminergic gene expression by Er81. *J. Neurosci.* **30**, 4717-4724. doi:10.1523/JNEUROSCI.0419-10.2010
- Chen, C.-L., Broom, D. C., Liu, Y., De Nooij, J. C., Li, Z., Cen, C., Samad, O. A., Jessell, T. M., Woolf, C. J. and Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* **49**, 365-377. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.036
- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Kim, S., Moreno-Ortiz, C., Redondo, J. M., Walsh, C. A. and Nieto, M. (2008). Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb. Cortex* **18**, 1758-1770. doi:10.1093/cercor/bhm199
- Dardaei, L., Longobardi, E. and Blasi, F. (2014). Prep1 and Meis1 competition for Pbx1 binding regulates protein stability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E896-E905. doi:10.1073/pnas.1321200111
- de Chevigny, A., Core, N., Follert, P., Wild, S., Bosio, A., Yoshikawa, K., Cremer, H. and Beclin, C. (2012). Dynamic expression of the pro-dopaminergic transcription factors Pax6 and Dlx2 during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Front. Cell Neurosci.* **6**, 6. doi:10.3389/fncel.2012.00006
- Delile, J., Rayon, T., Melchionda, M., Edwards, A., Briscoe, J. and Sagner, A. (2019). Single cell transcriptomics reveals spatial and temporal dynamics of gene expression in the developing mouse spinal cord. *Development* **146**, dev173807. doi:10.1242/dev.173807
- Deneris, E. S. and Hobert, O. (2014). Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. *Nat. Neurosci.* **17**, 899-907. doi:10.1038/nn.3731
- Denes, A. S., Jékely, G., Steinmetz, P. R. H., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D. E. K., Balavoine, G. and Arendt, D. (2007). Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* **129**, 277-288. doi:10.1016/j.cell.2007.02.040
- Doitsidou, M., Flames, N., Topalidou, I., Abe, N., Felton, T., Remesal, L., Popovitchenko, T., Mann, R., Chalfie, M. and Hobert, O. (2013). A combinatorial regulatory signature controls terminal differentiation of the dopaminergic nervous system in *C. elegans*. *Genes Dev.* **27**, 1391-1405. doi:10.1101/gad.217224.113
- Donovan, L. J., Spencer, W. C., Kitt, M. M., Eastman, B. A., Lobur, K. J., Jiao, K., Silver, J. and Deneris, E. S. (2019). Lmx1b is required at multiple stages to build expansive serotonergic axon architectures. *eLife* **8**, e48788. doi:10.7554/eLife.48788
- Erbel-Sieler, C., Dudley, C., Zhou, Y., Wu, X., Estill, S. J., Han, T., Diaz-Arrostia, R., Brunskill, E. W., Potter, S. S. and McKnight, S. L. (2004). Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13648-13653. doi:10.1073/pnas.0405310101
- Feng, W., Li, Y., Dao, P., Aburas, J., Islam, P., Elbaz, B., Kolarzyk, A., Brown, A. E. X. and Kratsios, P. (2020). A terminal selector prevents a Hox transcriptional switch to safeguard motor neuron identity throughout life. *eLife* **9**, e50065. doi:10.7554/eLife.50065
- Fernández, M. E., Croce, S., Boutin, C., Cremer, H. and Raineteau, O. (2011). Targeted electroporation of defined lateral ventricular walls: a novel and rapid method to study fate specification during postnatal forebrain neurogenesis. *Neural Dev.* **6**, 13. doi:10.1186/1749-8104-6-13
- Ferretti, E., Li, B., Zewdu, R., Wells, V., Hebert, J. M., Karner, C., Anderson, M. J., Williams, T., Dixon, J., Dixon, M. J. et al. (2011). A conserved Pbx-Wnt-p63-Irf6 regulatory module controls face morphogenesis by promoting epithelial apoptosis. *Dev. Cell* **21**, 627-641. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.005
- Flames, N. and Hobert, O. (2009). Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* **458**, 885-889. doi:10.1038/nature07929
- Flames, N. and Hobert, O. (2011). Transcriptional control of the terminal fate of monoaminergic neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 153-184. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113824
- Furlanis, E. and Scheiffele, P. (2018). Regulation of neuronal differentiation, function, and plasticity by alternative splicing. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 451-469. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062826
- Gaborieau, E., Hurtado-Chong, A., Fernández, M., Azim, K. and Raineteau, O. (2018). A dual role for the transcription factor Sp8 in postnatal neurogenesis. *Sci. Rep.* **8**, 14560. doi:10.1038/s41598-018-32134-6
- Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O'Hanlon, D., Sung, H.-K., Alvarez, M., Talukder, S., Pan, Q., Mazzoni, E. O. et al. (2011). An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* **147**, 132-146. doi:10.1016/j.cell.2011.08.023
- Galliano, E., Franzoni, E., Breton, M., Chand, A. N., Byrne, D. J., Murthy, V. N. and Grubb, M. S. (2018). Embryonic and postnatal neurogenesis produce functionally distinct subclasses of dopaminergic neuron. *eLife* **7**, e32373. doi:10.7554/eLife.32373
- García-Cuellar, M.-P., Steger, J., Füller, E., Hetzner, K. and Slany, R. K. (2015). Pbx3 and Meis1 cooperate through multiple mechanisms to support Hox-induced murine leukemia. *Haematologica* **100**, 905-913. doi:10.3324/haematol.2015.124032
- Grebbin, B. M., Hau, A.-C., Groß, A., Anders-Maurer, M., Schramm, J., Koss, M., Wille, C., Mittelbronn, M., Selleri, L. and Schulte, D. (2016). PBX1 is required for adult subventricular zone neurogenesis. *Development* **143**, 2281-2291. doi:10.1242/dev.128033
- Guo, C., Eckler, M. J., McKenna, W. L., McKinsey, G. L., Rubenstein, J. L. R. and Chen, B. (2013). Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neuron* **80**, 1167-1174. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.037
- Hack, M. A., Saghatelian, A., De Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.-M. and Götz, M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **8**, 865-872. doi:10.1038/nn1479
- Hobert, O. (2008). Regulatory logic of neuronal diversity: terminal selector genes and selector motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20067-20071. doi:10.1073/pnas.0806070105
- Hobert, O. (2011). Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 681-696. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154226
- Hobert, O. and Kratsios, P. (2019). Neuronal identity control by terminal selectors in worms, flies, and chordates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **56**, 97-105. doi:10.1016/j.conb.2018.12.006
- Huynh, M. A., Ikeuchi, Y., Netherton, S., de la Torre-Ubieta, L., Kanadia, R., Stegmüller, J., Cepko, C., Bonni, S. and Bonni, A. (2011). An isoform-specific SnoN1-FOXO1 repressor complex controls neuronal morphogenesis and positioning in the mammalian brain. *Neuron* **69**, 930-944. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.008
- Iulianella, A., Sharma, M., Durnin, M., Vanden Heuvel, G. B. and Trainor, P. A. (2008). Cux2 (Cutl2) integrates neural progenitor development with cell-cycle progression during spinal cord neurogenesis. *Development* **135**, 729-741. doi:10.1242/dev.013276
- Kiyokage, E., Pan, Y.-Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., Obata, K., Okano, H., Toida, K., Puche, A. C. et al. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J. Neurosci.* **30**, 1185-1196. doi:10.1523/JNEUROSCI.3497-09.2010
- Kohwi, M., Petryniak, M. A., Long, J. E., Ekker, M., Obata, K., Yanagawa, Y., Rubenstein, J. L. R. and Alvarez-Buylla, A. (2007). A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J. Neurosci.* **27**, 6878-6891. doi:10.1523/JNEUROSCI.0254-07.2007
- Kosaka, T. and Kosaka, K. (2016). Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anat. Sci. Int.* **91**, 115-127. doi:10.1007/s12565-015-0309-7
- Koss, M., Bolze, A., Brendolan, A., Saggese, M., Capellini, T. D., Bojilova, E., Boisson, B., Prall, O. W. J., Elliott, D. A., Solloway, M. et al. (2012). Congenital asplenia in mice and humans with mutations in a Pbx/Nkx2-5/p15 module. *Dev. Cell* **22**, 913-926. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.009
- Linares, A. J., Lin, C.-H., Damianov, A., Adams, K. L., Novitsch, B. G. and Black, D. L. (2015). The splicing regulator PTBP1 controls the activity of the transcription factor Pbx1 during neuronal differentiation. *eLife* **4**, e09268. doi:10.7554/eLife.09268
- Lindeberg, J., Usoskin, D., Bengtsson, H., Gustafsson, A., Kylberg, A., Söderström, S. and Ebendal, T. (2004). Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis* **40**, 67-73. doi:10.1002/gene.20065
- Liu, C., Maejima, T., Wyler, S. C., Casadesus, G., Herlitze, S. and Deneris, E. S. (2010). Me-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat. Neurosci.* **13**, 1190-1198. doi:10.1038/nn.2623
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* **25**, 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lloret-Fernández, C., Maicas, M., Mora-Martínez, C., Artacho, A., Jimeno-Martín, Á., Chirivella, L., Weinberg, P. and Flames, N. (2018). A transcription factor collective defines the HSN serotonergic neuron regulatory landscape. *eLife* **7**, e32785. doi:10.7554/eLife.32785
- Loadot, S., Molyneaux, B. J., Zuccaro, E., Goff, L. A., Chen, H.-H., Yuan, W., Meleski, A., Takahashi, E., Mahony, S., Rinn, J. L. et al. (2014). Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. *Nat. Neurosci.* **17**, 1046-1054. doi:10.1038/nn.3757

- Longobardi, E., Penkov, D., Mateos, D., De Florian, G., Torres, M. and Blasi, F. (2014). Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Dev. Dyn.* **243**, 59-75. doi:10.1002/dvdy.24016
- Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, T. M., Laufer, E. and Kania, A. (2008). Specification of motor axon trajectory by Ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron* **60**, 1039-1053. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.011
- Magno, L., Kretz, O., Bert, B., Ersözülü, S., Vogt, J., Fink, H., Kimura, S., Vogt, A., Monyer, H., Nitsch, R. et al. (2011). The integrity of cholinergic basal forebrain neurons depends on expression of Nkx2-1. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 1767-1782. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07890.x
- Mayer, C., Hafemeister, C., Bandler, R. C., Machold, R., Batista Brito, R., Jaglin, X., Allaway, K., Butler, A., Fishell, G. and Satija, R. (2018). Developmental diversification of cortical inhibitory interneurons. *Nature* **555**, 457-462. doi:10.1038/nature25999
- McEvilly, R. J., Ortiz de Diaz, M., Schonemann, M. D., Hooshmand, F. and Rosenfeld, M. G. (2002). Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science* **295**, 1528-1532. doi:10.1126/science.1067132
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z. and Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* **317**, 381-384. doi:10.1126/science.1144914
- Mi, D., Li, Z., Lim, L., Li, M., Moissidis, M., Yang, Y., Gao, T., Hu, T. X., Pratt, T., Price, D. J. et al. (2018). Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science* **360**, 81-85. doi:10.1126/science.aar6821
- Nóbrega-Pereira, S., Kessar, N., Du, T., Kimura, S., Anderson, S. A. and Marín, O. (2008). Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* **59**, 733-745. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.024
- Nomaksteinsky, M., Kassabov, S., Chettouh, Z., Stoeklé, H.-C., Bonnaud, L., Fortin, G., Kandel, E. R. and Brunet, J.-F. (2013). Ancient origin of somatic and visceral neurons. *BMC Biol.* **11**, 53. doi:10.1186/1741-7007-11-53
- Nowakowski, T. J., Bhaduri, A., Pollen, A. A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Haussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S. J., Velmeshev, D. et al. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. *Science* **358**, 1318-1323. doi:10.1126/science.aap8809
- Patel, T. and Hobert, O. (2017). Coordinated control of terminal differentiation and restriction of cellular plasticity. *eLife* **6**, e24100. doi:10.7554/eLife.24100.001
- Penkov, D., San Martín, D. M., Fernandez-Díaz, L. C., Rosselló, C. A., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F., Warnatz, H. J., Sultan, M., Yaspo, M. L., Gabrieli, A. et al. (2013). Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell Rep.* **3**, 1321-1333. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.029
- Perez-Villaalba, A., Sirerol-Piquer, M. S., Belenguer, G., Soriano-Cantón, R., Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Alarcón-Arís, D., Soria, F. N., Dehay, B., Bezard, E. et al. (2018). Synaptic regulator  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic fibers is essentially required for the maintenance of subependymal neural stem cells. *J. Neurosci.* **38**, 814-825. doi:10.1523/JNEUROSCI.2276-17.2017
- Pfurr, S., Chu, Y.-H., Bohrer, C., Greulich, F., Beattie, R., Mammadzada, K., Hils, M., Arnold, S. J., Taylor, V., Schachtrup, K. et al. (2017). The E2A splice variant E47 regulates the differentiation of projection neurons via p57(KIP2) during cortical development. *Development* **144**, 3917-3931. doi:10.1242/dev.145698
- Pignatelli, A. and Belluzzi, O. (2017). Dopaminergic neurons in the main olfactory bulb: an overview from an electrophysiological perspective. *Front. Neuroanat.* **11**, 7. doi:10.3389/fnana.2017.00007
- Porter, R. S., Jaamour, F. and Iwase, S. (2018). Neuron-specific alternative splicing of transcriptional machineries: implications for neurodevelopmental disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* **87**, 35-45. doi:10.1016/j.mcn.2017.10.006
- Qiu, M., Bulfone, A., Martinez, S., Meneses, J. J., Shimamura, K., Pedersen, R. A. and Rubenstein, J. L. R. (1995). Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev.* **9**, 2523-2538. doi:10.1101/gad.9.20.2523
- Raj, B., O'Hanlon, D., Vessey, J. P., Pan, Q., Ray, D., Buckley, N. J., Miller, F. D. and Blencowe, B. J. (2011). Cross-regulation between an alternative splicing activator and a transcription repressor controls neurogenesis. *Mol. Cell* **43**, 843-850. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.014
- Reiter, F., Wienerroither, S. and Stark, A. (2017). Combinatorial function of transcription factors and cofactors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**, 73-81. doi:10.1016/j.gde.2016.12.007
- Rhee, H. S., Closser, M., Guo, Y., Bashkirova, E. V., Tan, G. C., Gifford, D. K. and Wichterle, H. (2016). Expression of terminal effector genes in mammalian neurons is maintained by a dynamic relay of transient enhancers. *Neuron* **92**, 1252-1265. doi:10.1016/j.neuron.2016.11.037
- Rubenstein, J. L. R. and Rakic, P. (2013). Patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS. In *Comprehensive Developmental Neuroscience* (ed. J. L. R. Rubenstein and P. Rakic), Chapter 1, pp. 3-24. Elsevier. doi:10.1016/c2011-0-07685-8
- Saino-Saito, S., Sasaki, H., Volpe, B. T., Kobayashi, K., Berlin, R. and Baker, H. (2004). Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal and adult mice. *J. Comp. Neurol.* **479**, 389-398. doi:10.1002/cne.20320
- Selleri, L., DiMartino, J., van Deursen, J., Brendolan, A., Sanyal, M., Boon, E., Capellini, T., Smith, K. S., Rhee, J., Popperl, H. et al. (2004). The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5324-5331. doi:10.1128/mcb.24.12.5324-5331.2004
- Sgadò, P., Ferretti, E., Grbec, D., Bozzi, Y. and Simon, H. H. (2012). The atypical homeoprotein Pbx1a participates in the axonal pathfinding of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neural Dev.* **7**, 24. doi:10.1186/1749-8104-7-24
- Shirasaki, R., Lewcock, J. W., Lettieri, K. and Pfaff, S. L. (2006). FGF as a target-derived chemoattractant for developing motor axons genetically programmed by the LIM code. *Neuron* **50**, 841-853. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.030
- Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Lefler, J., Karayannis, T. and Fishell, G. (2009). Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb. Cortex* **19**, i1-i10. doi:10.1093/cercor/bhp038
- Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K. I., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M. and Noda, T. (2002). Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev.* **16**, 1760-1765. doi:10.1101/gad.978002
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. and Rubenstein, J. L. R. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370.
- Tapial, J., Ha, K. C. H., Sterne-Weiler, T., Gohr, A., Braunschweig, U., Hermoso-Pulido, A., Quesnel-Vallières, M., Permanyer, J., Sodaei, R., Marquez, Y. et al. (2017). An atlas of alternative splicing profiles and functional associations reveals new regulatory programs and genes that simultaneously express multiple major isoforms. *Genome Res.* **27**, 1759-1768. doi:10.1101/gr.220962.117
- Tiveron, M.-C., Beclin, C., Murgan, S., Wild, S., Angelova, A., Marc, J., Coré, N., de Chevigny, A., Herrera, E., Bosio, A. et al. (2017). Zic-proteins are repressors of dopaminergic forebrain fate in mice and *C. Elegans*. *J. Neurosci.* **37**, 10611-10623. doi:10.1523/JNEUROSCI.3888-16.2017
- Tomer, R., Denes, A. S., Tessmar-Raible, K. and Arendt, D. (2010). Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallidum. *Cell* **142**, 800-809. doi:10.1016/j.cell.2010.07.043
- Vergaño-Vera, E., Yusta-Boyo, M. J., de Castro, F., Bernad, A., de Pablo, F. and Vicario-Abejón, C. (2006). Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development* **133**, 4367-4379. doi:10.1242/dev.02601
- Villaescusa, J. C., Li, B., Toledo, E. M., Rivetti di Val Cervo, P., Yang, S., Stott, S. R. W., Kaiser, K., Islam, S., Gyllborg, D., Laguna-Goya, R. et al. (2016). A PBX1 transcriptional network controls dopaminergic neuron development and is impaired in Parkinson's disease. *EMBO J.* **35**, 1963-1978. doi:10.15252/embj.201593725
- Vuong, C. K., Black, D. L. and Zheng, S. (2016). The neurogenetics of alternative splicing. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 265-281. doi:10.1038/nrn.2016.27
- Weihe, E., Depboylu, C., Schütz, B., Schäfer, M. K.-H. and Eiden, L. E. (2006). Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 657-676. doi:10.1007/s10571-006-9053-9
- Zhou, X., Liu, F., Tian, M., Xu, Z., Liang, Q., Wang, C., Li, J., Liu, Z., Tang, K., He, M. et al. (2015). Transcription factors COUP-TFI and COUP-TFII are required for the production of granule cells in the mouse olfactory bulb. *Development* **142**, 1593-1605. doi:10.1242/dev.115279