

MECANISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS POBLACIONES NEURONALES DEL MESENCÉFALO Y CEREBELO

JESÚS EDUARDO MARTÍNEZ LÓPEZ

- 2014 -

Director: Eduardo de Puelles



A QUIEN CORRESPONDA:

El Profesor Juan Lerma Gómez, Director del Instituto de Neurociencias de Alicante, Centro Mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “*Mecanismos genéticos implicados en la diferenciación de las poblaciones neuronales del mesencéfalo y cerebelo*” ha sido realizada por D. Jesús Eduardo Martínez López, bajo la inmediata dirección y supervisión del Dr. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre, y da su conformidad para que sea presentada ante la comisión de doctorado.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firma el presente certificado en San Juan de Alicante, a 22 de Octubre de 2014.


Fdo.: Juan Lerma
Director



D. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre, Profesor Contratado Doctor por el Departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “MECANISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS POBLACIONES NEURONALES DEL MESENCÉFALO Y CEREBELO”, realizada por D. Jesús Eduardo Martínez López, bajo la inmediata dirección y supervisión en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández-CSIC, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en San Juan a 22 de Octubre de 2014.

Fdo: Eduardo de Puelles Martínez de la Torre

Agradecimientos



En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Edu, la oportunidad que me dio al permitirme hacer todo este trabajo a su lado, al lado de una grandísima persona, que ha estado siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, y que me ha tratado siempre de una forma increíble, y también quiero darle las gracias por ser una de esas personas con las que «ha creado escuela».

Siguiendo con la gente del laboratorio, tenemos a Diego, un tío increíble dispuesto siempre a hablar, ayudar y a darte cualquier consejo que necesites; a Salva, «el patriarca», fuente de sabiduría pero, sobre todo, alguien que me ha hecho ver que se puede llegar a ser un magnífico científico manteniendo la humildad de siempre; y, terminando con los jefazos, en el número uno tenemos a Constantino Sotelo, una eminencia y un referente como científico en el mundo de la neurociencia, al que he tenido la suerte de tener cerca.

Gracias al cuerpazo técnico, del que formé parte y de cuyas componentes es imposible olvidarse: Carol, Olga, Paqui, Alicia, Moni y Aurelia; a Ana, Raquel y Arancha, por haberme hecho, gracias a las sobremesas, un experto en el desarrollo embrionario humano —a mí un embarazo ya no me pilla de sorpresa; a Marusa, capaz de solucionar cualquier problema de papeleos mientras comenta los goles de la jornada; a Valentina «la cucho» y a María, que me han precedido en esta aventura y han sido de gran ayuda, y a Elena, una persona que admiro, ya que te puede dar grandes consejos en el trabajo y tomarse luego unos calimochos contigo.

A los electrofisiólogos, «los chispas» encabezados por Emilio, Edu «Junior», gran amigo mucho antes de esto y con el que ha sido un placer poder trabajar a su lado, y Alejandro «el Chispi», una persona peculiar pero, eso sí, fuerte, guapo y listo como el que más, y cuyos sóleos podrían dar para otra tesis. Por sus innumerables escapadas al 102 para relajarnos haciendo un corrillo y hablando de cualquier tema científico-social-guas-futbolístico.

A todos con los que aparte de laboratorio también compartía alguna que otra cerveza: Almudena, Abraham «el Jona» y Pablo. A todos los que, en un momento u otro, siempre estuvieron aquí, en Murcia o en Londres, para ayudarme con cualquier cosa que necesitara: Jon, Carlos, Diego, Iván, Tere y M^ª Paz.

Y como no, el rinconcico del lab donde me he criado, el *Puelles'Corner*. A todas las chicas que han pasado por allí, Ari y Nora, «mi Bro», que ya estaban allí cuando llegué y con las que he compartido bancada y aquellos maravillosos días de Wii-lab-meeting. A M^a Pili, nuestra última incorporación, a la que espero que le vaya genial ahora por Valencia, y que sabe que nos tiene para lo que necesite.

Y por último, terminando con el laboratorio, al gran compañero de fatigas, Juan Antonio «el *fucking* master», «el retroflejo», por compartir mesa de estudio donde el roce hizo el cariño, por trabajar codo con codo, por las mañanas de confesiones en cultivos, por despertarme con el dulce canto de un delfín en cada congreso, por ayudarme siempre en los malos momentos, cada vez que no salía un experimento, cada vez que le robaban un partido al Madrid o cada vez que me subía el bajón, pero también por compartir alegrías, experimentos que han terminado siendo un éxito, publicaciones y ahora sí, aunque ha costado, la décima del Madrid. En general, por todos esos momentos en los que has sido el más cercano y el que mejor me has podido entender... esto no está *pagao* ... this is not paid!!!

Fuera del lab también quiero agradeceréselo a todos los grupos de amigos que tengo. A los de Villena: Ana, Blanca, Alma, Gisela, Bea, Virtu, Alba, Fran, Juan Antonio, Jesús, Pascual, Jose Enrique y Arturo, por todos estos años a mi lado y sus innumerables anécdotas.

A los de Alicante, por un lado los «Fuckers»: Pedro, David, Pazcu, Abel, Borja, Javi Mazón, Javi Quinto, Isa, Gema, Nuria, Marieta y Vero. Y por otro lado a los «Genios»: Marina, Noema, Oana, Nuria Escudero, Ana López, Elena, Marta Frías, Laurita, Marisol, Marta Ruíz, Nuria Pina, Giulia, Teresa, Ana Echanove, Irina y Leona, y dentro del mismo a los «m-Achos»: Edu, Víctor, Sanchis, Antonio, Luca, David, Charly, Joaquín, Héctor, Juanjo y Carlos. Por haber sido aquí mi familia, por haberme ayudado, por haberme aguantado, por todas esas cervecicas, por todas esas cenas, por los... y la..., por todos esos días de café-torero, por todas esas fiestas, por todas esas noches en... ¡¡¡que Stereo ni que Stereo señor agente!!! Por haber sido y seguir siendo una parte fundamental en mi vida, por ser todo un recuerdo de esta época y porque estemos donde estemos cada uno, no os olvidaré nunca.

A mis vecinos de arriba, por su gran simpatía, por esas charlas por el patio, por todo el aguante que han tenido conmigo y por todos los gritos que han tenido que soportar, ya fueran por alguna crisis con la tesis o por los goles del Madrid en liga, copa y champions.

A mi gatete Kyra, por toda su compañía y cariño durante este tiempo, y a mi perrete Dogo, por hacer que me olvidara de todo en los paseícos por el monte.

Y finalmente, a mi familia: a mi madre, mi padre y mi hermano, a mi abuela, a mis tías y primos/as. A todos los que dejé por el camino y a todos los que, por suerte, os unisteis para formar parte de nosotros. Por saber que siempre os tengo a mi lado, por todo vuestro apoyo, por todo vuestro cariño, por todo lo que a lo largo de mi vida habéis hecho por mí, porque sin vosotros no soy nada, por todo eso y por mucho más que me resulta imposible expresar con palabras. ¡¡¡GRACIAS!!!



A toda mi familia



I Introducción	1
Capítulo 1. Embriogénesis temprana del sistema nervioso	3
1. Inducción, regionalización y neurulación de la placa neural	3
2. Vesiculación y segmentación: el modelo Prosomérico	5
3. Organizadores secundarios: control molecular de la regionalización	7
4. Gradiente de <i>Shh</i> en el desarrollo neuronal	8
4.1. Papel en la regionalización dorso-ventral	8
4.2. Vía de señalización de <i>Shh</i>	9
Capítulo 2. El mesencéfalo	13
1. Mesencéfalo dorsal	14
2. Mesencéfalo ventral	14
2.1. Poblaciones dopaminérgicas	14
2.2. Complejo oculomotor	15
2.3. Núcleo rojo	16
2.4. Núcleo mesencefálico intersticial	17
2.5. Sustancia gris periacueductal y formación reticular mesencefálica	17
Capítulo 3. El cerebelo	19
1. Morfología macroscópica y microscópica	19
2. Origen y migración de las células del cerebelo. Papel de <i>Shh</i>	21
II. Objetivos	23

III. Materiales y Métodos	27
1. Modelos animales	29
1.1. Mutante condicional de <i>Shh</i>	29
1.2. Mutante knockout de <i>Pou4f1</i>	29
2. Genotipado de cepas	30
2.1. Extracción de ADN	30
2.2. Cebadores	30
2.3. PCR	31
3. Obtención y procesamiento de embriones	31
3.1. Fijación de embriones	31
3.2. Inclusión y sección de embriones	32
3.2.1. Microtomo de parafina	32
3.2.2. Vibratomo	32
4. Técnicas histológicas	33
4.1. Hibridación <i>in situ</i>	33
4.1.1. Síntesis de sonda	33
4.1.2. Hibridación <i>in situ</i> en cortes de parafina	34
4.2. Inmunohistoquímica en cortes de parafina	36
4.3. Inmunohistoquímica en cortes de vibratomo	37
4.4. Tinción X-gal	37
5. Estudio de la proliferación celular con BrdU	37

6. Estudio de expresión génica por PCR cuantitativa (PCRq)	38
6.1. Extracción de ARN	38
6.2. Retrotranscripción de ARN a ADN complementario (ADNc)	38
6.3. PCR cuantitativa	39
6.3.1. Condiciones para cebadores comerciales (TaqMan ©)	39
6.3.2. Condiciones para cebadores diseñados	39

IV. Resultados

1. Análisis del patrón de expresión de nuevos candidatos en la placa basal del mesencéfalo	43
1.1. Descripción del patrón de expresión de los nuevos candidatos durante el desarrollo embrionario	43
1.2. Caracterización de las poblaciones neuronales descritas por los nuevos candidatos	49
2. Integración de los nuevos candidatos analizados en la vía de señalización de <i>Shh</i>	51
2.1. Alteración del dominio basolateral	51
2.2. Alteración del dominio basal medial	54
3. Integración de los nuevos candidatos analizados en la vía de señalización de <i>Pou4f1</i>	55
3.1. Alteración en el desarrollo del núcleo rojo	55
3.2. Defectos en la maduración del núcleo rojo	59
3.3. Alteración del tracto rubroespinal	62

4. Desarrollo de la glía de Bergmann en ausencia de <i>Shh</i>	65
4.1. Reducción de la expresión de <i>Gdf10</i> en el mutante condicional <i>En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}</i>	65

V. Discusión

71

1. Distribución del patrón de expresión de los nuevos candidatos en la placa basal del mesencéfalo durante el desarrollo	73
2. Integración de los nuevos candidatos en la vía de señalización de <i>Shh</i>	77
3. Integración de los nuevos candidatos en la vía de señalización de <i>Pou4f1</i>	79
4. Desarrollo de la glía de Bergmann en ausencia de <i>Shh</i>	83

VI. Conclusiones

87

VII. Bibliografía

91

VIII. Anexo

105

ABREVIATURAS

AD: Alar dorsal

ADNc: Acido desoxirribonucleico complementario

AL: Alar lateral

AP: Antero-posterior

ANR: Borde anterior neural

ATV: Área tegmental ventral

AVL: Alar ventrolateral

BCI: Núcleo del brazo conjuntivo del colículo inferior

BI: Basal intermedia

BL: Basolateral

BM: Basal medial

CG: Células granulares

CGE: Capa granular externa

CGI: Capa granular interna

CI: Colículo inferior

CP: Células de Purkinje

CS: Colículo superior

DV: Dorso-ventral

GB: Glía de Bergmann

gcl: Capa granular

LR: Labio rómbico

ml: Capa molecular

NDm: Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

NR: Núcleo rojo

IsO: Istmo

OM: Complejo oculomotor

pcl: Capa de Purkinje

PCRq: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SNC: Sustancia negra pars compacta

SNR: Sustancia negra pars reticulata

TG: Sustancia gris tectal

TRS: Tracto rubroespinal

wm: Materia blanca

ZLI: Zona limitans intratalámica

ZV: Zona ventricular



I. INTRODUCCIÓN

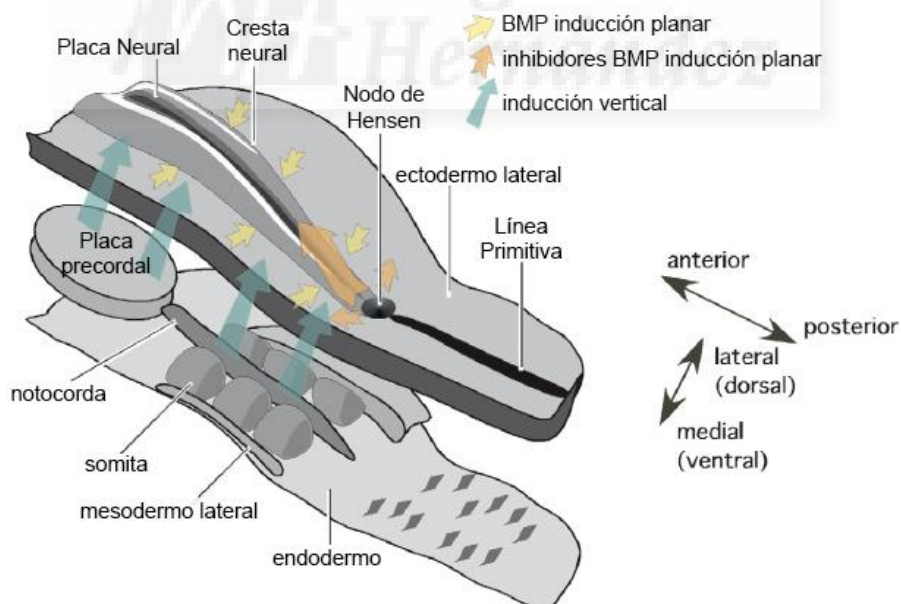




Capítulo 1. Embriogénesis temprana del sistema nervioso

1. Inducción, regionalización y neurulación de la placa neural

En las etapas tempranas del desarrollo embrionario ocurren una serie de movimientos celulares conocidos como gastrulación en los que las células del epiblasto migran hacia el interior dando lugar a las tres capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Simultáneamente a este proceso ocurre la inducción neural, en la que señales procedentes del mesodermo hacen que las células del ectodermo se diferencien para dar lugar a la placa neural, estableciendo desde este momento el territorio que dará lugar al sistema nervioso. Estas señales iniciales proceden de una determinada región conocida como “organizador” descrita inicialmente en embriones de *Xenopus* (Spemann & Mangold 1924). En aves y mamíferos coincide con el nodo de Hensen, la región más distal de la línea primitiva, y cuya capacidad de inducir la formación de la placa neural, se demostró en trasplantes interespecíficos, indicando que dicho proceso está altamente conservado (Oppenheimer, 1936; Kintner & Dodd 1991; Hatta & Takahashi 1996).



Esquema 1. Señales inductoras en la placa neural.

Durante la gastrulación, las diferentes señales procedentes del mesodermo axial (flechas verdes), nodo de Hensen (flechas naranjas) y del ectodermo (flechas amarillas) regulan la polaridad dorso-ventral y los primeros pasos de una regionalización antero-posterior en el futuro neuroepitelio, induciendo así la diferenciación de la placa neural (Adaptado de Vieira et al., 2010).

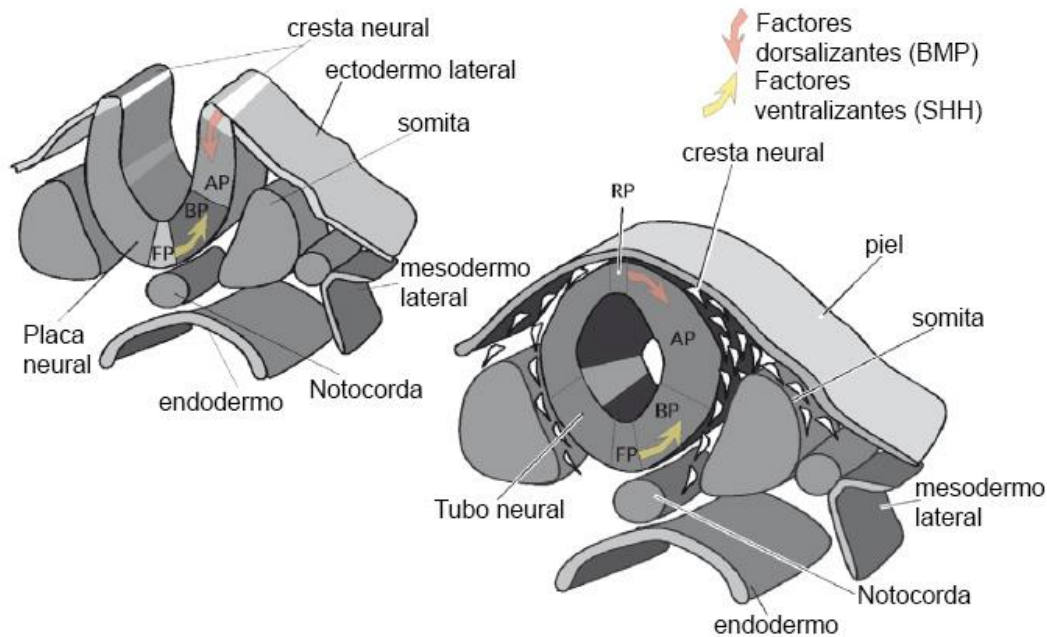
A partir de este momento, son los organizadores secundarios los que emiten una serie de señales que reciben las células ectodérmicas y hacen que se diferencie tanto el eje antero-posterior (AP) como en el eje dorso-ventral (DV), dependiendo de la intensidad de la señal, así como de la capacidad de las células de responder a ellas. Las moléculas implicadas en este proceso han sido desveladas gracias al estudio del patrón de expresión de diversos genes, lo que ha permitido conocer la localización, inicio y desarrollo que lleva a estos procesos de especificación regional (Vieira et al., 2010; Bauman 2014; Teiomuri & Kolomeisky 2014).

En la regionalización AP hay una serie de factores de transcripción que son clave: entre los que generan un efecto caudalizante se encuentran el ácido retinoico y los genes de la familia *Fgf* y *Wnt* (Cox & Hemmati-Brivanlou 1995; Simeone et al., 1995; Varlet et al., 1997), mientras que entre aquellos que generan un efecto rostralizante podemos destacar la proteína NODAL, y los genes *Otx2* y *Lim1*, entre otros (Matsuo et al., 1995; Shawlot et al., 1999; Martínez-Barbera et al., 2000).

Con respecto a la regionalización DV, toda la zona ventral está bajo la influencia del morfogen *Sonic Hedgehog* (*Shh*) que codifica para la proteína SHH y es secretada por el mesodermo axial (notocorda y placa precordal) (Echelard et al., 1993; Chiang et al., 1996; Shimamura & Rubenstein 1997).

La zona dorsal está influenciada por señales de algunos miembros de la familia *TGF- β* , como *BMP4*, *BMP7* o *DSL1*, o de la familia *Wnt* como *Wnt1* o *Wnt3a* (Balsler et al., 1993; Dickinson et al., 1995; Liem et al., 1995). El resultado de la difusión de estas señales, así como de su interacción, genera la especificación de cuatro zonas básicas longitudinales que corresponden con la placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo (Puelles et al., 2012).

Por último, el proceso que culminará con la formación del tubo neural, conocido como neurulación, consta de una serie de pasos entre los que se incluyen la remodelación de la placa neural, donde hay un engrosamiento de la placa y los pliegues neurales; plegamiento de la placa neural, donde se forman los pliegues neurales en los extremos laterales de la placa y comienzan a elevarse; y, por último, el cierre del tubo neural, en el que los pliegues neurales entran en contacto el uno con el otro y acaban fusionándose en la línea media dorsal (Colas & Schoenwolf 2001).



Esquema 2. Formación del tubo neural.

Durante el proceso de neurulación, la cresta neural comienza a elevarse y culmina su fusión en la línea media, formando así el tubo neural. A partir de este momento, la influencia de diversas moléculas señalizadoras acaba subdividiendo el tubo neural en diferentes dominios desde la zona ventral a la zona dorsal (Adaptado de Vieira 2010). Abreviaturas: AP, placa alar; BP, placa basal; FP, placa del suelo; RP, placa del techo.

2. Vesiculación y segmentación: el modelo prosomérico

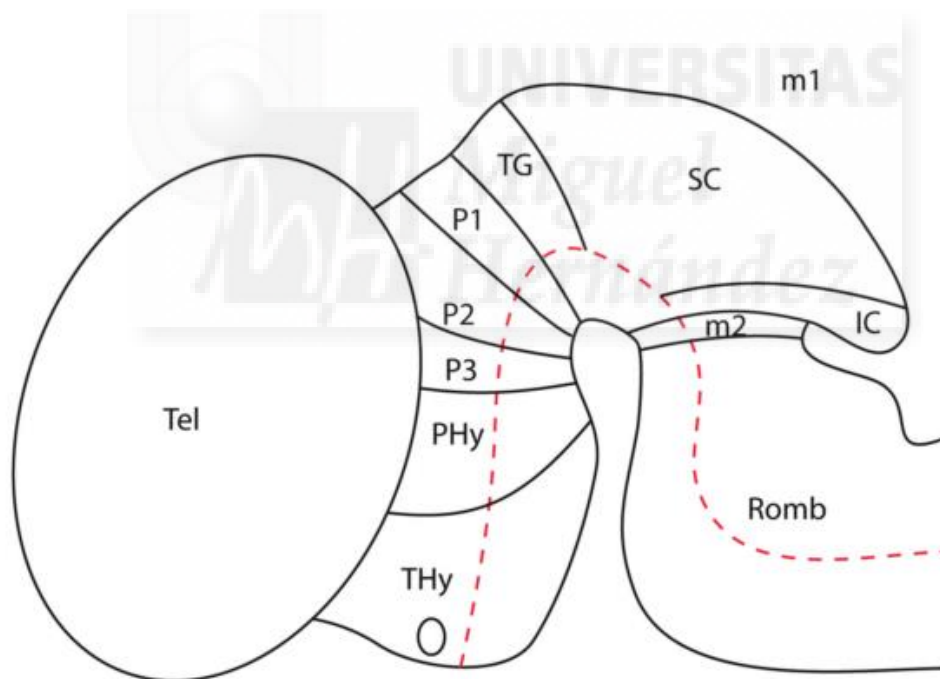
Una vez cerrado por completo el tubo neural, ocurren una serie de acontecimientos a lo largo del eje AP, en los que el tubo se segmenta en tres vesículas principales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo, que siguen con el proceso de segmentación, dando lugar a los segmentos neurales o neurómeros (Puelles & Rubenstein, 1993, 2003).

Este hecho, ya observado junto con la idea de neurómeros a lo largo del tubo neural, quedó plasmado en el modelo prosomérico (Bulfone et al., 1993; Puelles & Rubenstein 1993, 2003; Rubenstein et al., 1994; Rubenstein & Puelles 1994; Shimamura et al., 1995, 1997; Puelles 1995), siendo este un modelo dinámico que se actualiza conforme a los nuevos conocimientos.

Según avanza el desarrollo embrionario, el prosencéfalo dará lugar al diencéfalo, subdividido en pretecho (p1), tálamo (p2) y pretálamo (p3), y al prosencéfalo secundario, del que provienen las vesículas telencefálicas y el hipotálamo (regiones peduncular y terminal; Morales-Delgado 2011).

El mesencéfalo se subdivide en dos (Hidalgo-Sanchez et al., 2005; Allen Developing Mouse Brain Atlas, 2009; Puelles et al., 2012): una región rostral y más grande (m1), que incluye la sustancia gris tectal y el colículo superior e inferior en la zona dorsal, entre otras poblaciones ventrales, y una región caudal (m2) bastante más pequeña (la región preístmica), entre el colículo inferior y el istmo (Puelles et al., 2012).

Por último, el rombencéfalo se subdivide en el istmo, siete rombómeros (r1-r7) y cuatro cripto-rombómeros (r8-r11) (Marin & Puelles 1995; Cambroner & Puelles 2000; Puelles & Rubenstein, 2003; Marin et al., 2008).



Esquema 3. Segmentación del tubo neural.

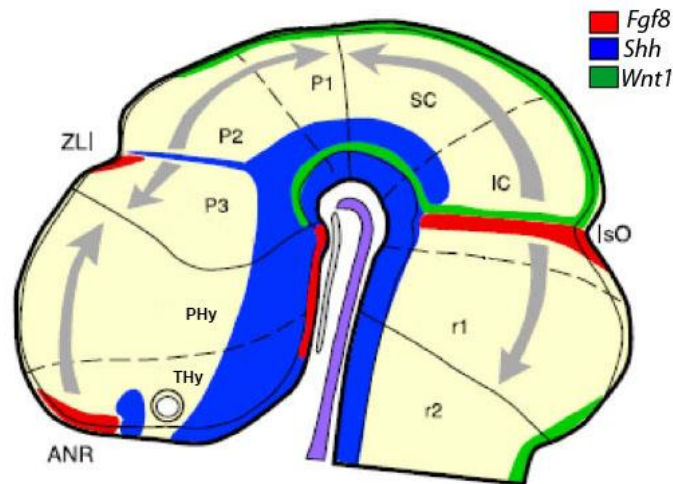
La segmentación de las tres vesículas primarias genera la división del tubo neural en una serie de neurómeros. Estos neurómeros, definidos por unos patrones de expresión únicos, darán lugar a diferentes regiones del cerebro y sus correspondientes poblaciones neuronales (Adaptado de Moreno-Bravo et al., 2012). Abreviaturas: IC, colículo inferior; m1, mesómero 1; m2, mesómero 2; P1, pretecho; P2, tálamo; P3, pretálamo; PHy, hipotálamo peduncular; SC, colículo superior; Tel, telencéfalo; THy, hipotálamo terminal, Romb, rombencéfalo.

3. Organizadores secundarios: control molecular de la regionalización

Tras la primera fase del complejo proceso de neurulación que acaba generando el tubo neural, prosiguen una serie de acontecimientos que suponen un refinamiento de la regionalización del neuroectodermo. Las primeras evidencias sugirieron la existencia de unas regiones del tubo neural capaces de emitir unas señales que posteriormente se demostró que eran unas proteínas que difunden llamadas morfógenos, las cuales generaban dicho refinamiento (Ruiz i Alba 1998). A estas regiones se les denominó organizadores secundarios y se definen como unos dominios con un papel clave en regular la especificación y el desarrollo de los tejidos colindantes (Martinez 2001; Echevarría et al., 2003; Aroca & Puelles 2005).

Dentro de estos organizadores secundarios encontramos, de rostral a caudal: el borde anterior de la placa neural (ANR), donde la expresión de *Fgf8* y *Shh* controla a otra serie de genes necesarios para la regionalización telencefálica (Martinez 2001; Echevarria et al., 2003; Vieira et al., 2010); la zona limitans intratalámica (ZLI), comprendida entre p2 y p3, expresa *Shh*, el cual tiene un papel principal y al que se le suma el efecto de otros factores que flanquean su zona de expresión, como *Wnt1* caudalmente y *Fgf8* rostralmente, contribuyendo a la compleja regionalización molecular talámica (Martinez 2001; Echevarria et al., 2003; Vieira et al., 2010); por último, el organizador ístmico (IsO) localizado en la transición mesencéfalo-rombencéfalo, delimitado de forma temprana por la interacción entre *Otx2* y *Gbx2*, expresa *Fgf8* como director de orquesta que controla la regionalización del mesencéfalo, rombencéfalo anterior y cerebelo así como otras regiones adyacentes (Martinez 2001; Echevarria et al., 2003; Vieira et al., 2010).

Los gradientes moleculares generados desde estos organizadores secundarios dotan al tejido diana de la información posicional necesaria para disparar los diferentes programas de especificación y diferenciación neuronal que darán lugar a los núcleos y poblaciones del sistema nervioso central.



Esquema 4. Organizadores secundarios.

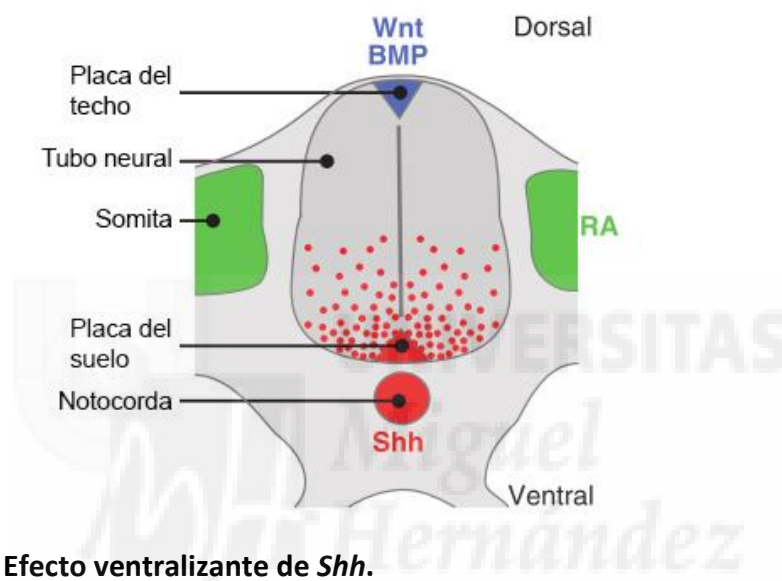
La importancia de los organizadores secundarios reside en la expresión de diferentes morfógenos que influyen en el tejido colindante. De rostral a caudal tenemos el borde anterior neural (ANR), la zona limitans intratálamica (ZLI) y el istmo (IsO), que junto con la placa del suelo y la placa del techo producen gradientes de moléculas como *Fgf8* (rojo), *Shh* (azul) y *Wnt1* (verde) que genera los patrones AP y DV dentro de las tres vesículas primarias (Adaptado de Echevarria et al., 2003). Abreviaturas: ANR, borde anterior neural; IC, colículo inferior; IsO, istmo; P1, pretecho; P2, tálamo; P3, pretálamo; PHy, hipotálamo peduncular; SC, colículo superior; THy, hipotálamo terminal; r1, rombómero 1; r2, rombómero 2.

4. Gradiente de *Shh* en el desarrollo neuronal

4.1 Papel en la regionalización dorso-ventral

A lo largo del eje DV encontramos una serie de dominios que, de dorsal a ventral, son la placa del techo, placa alar, placa basal y placa del suelo. Estos dominios se establecen desde el estadio de placa neural y se encuentran a lo largo del eje AP (Shimamura et al., 1995). Esta organización DV se debe al efecto de dos regiones enfrentadas que secretan moléculas señalizadoras en forma de gradiente: la placa del techo (*Wnt* y BMPs) y la placa del suelo (*Shh*). Estos gradientes se traducen en programas de diferenciación que generan la especificación del eje DV (Balser et al., 1993; Dickinson et al., 1995; Lee & Jessell 1999; Patten & Placzek 2000; Chizhikov & Millen 2005; Placzek & Briscoe, 2005; Ingham & Placzek, 2006; Szabó et al., 2009). *Shh*, secretado por la notocorda y la placa del suelo, establece un gradiente de actividad que proporciona la información espacial necesaria para la ventralización de dicha

región. Este proceso, al igual que el de otros morfógenos, se basa en tres etapas: producción y secreción en el tejido diana, conversión del gradiente extracelular en una señal intracelular y regulación de la expresión génica que determina el destino neuronal. Diferentes estudios demuestran que el efecto *Shh* depende de su concentración y que una expresión ectópica induce una nueva placa del suelo y, alrededor de ella, la especificación de motoneuronas mientras que si se bloquea su efecto desaparecen las estructuras ventrales del tubo neural (Roelink et al., 1995; Martín et al., 1995; Ericson et al., 1996).



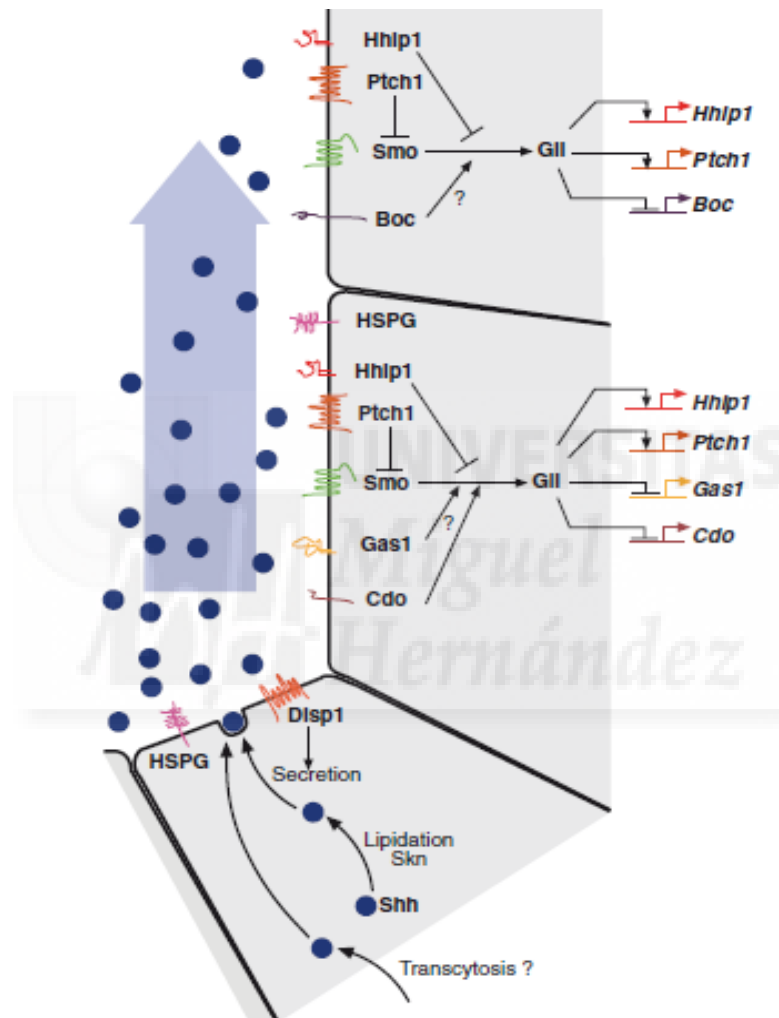
Esquema 5. Efecto ventralizante de *Shh*.

En la placa del suelo *Shh* es producido y secretado en forma de gradiente. La diferente concentración de este morfógeno a lo largo del eje DV inducirá o inhibirá a diferentes moléculas que continúan con la diferenciación de esta región basal (Adaptado de Dessaud et al., 2008).

4.2. Vía de señalización de *Shh*

La vía de señalización de *Shh* regula la expresión de diferentes factores de transcripción, incluidos miembros de la familia homeobox y bHLH (Chamberlain et al., 2008; Dessaud et al., 2008). La proteína SHH sufre unas modificaciones post-traduccionales, escisiones autocatalíticas y modificaciones lipídicas que dan lugar a su forma activa (Lee et al., 1994; Bumcrot et al., 1995; Porter et al., 1995), la cual requiere de la proteína transmembrana *Disp1* para su correcta secreción (Caspary et al., 2002; Kawakami et al., 2002; Ma et al., 2002) y de proteínas extracelulares y de membrana para su difusión (Dessaud et al., 2008).

Una vez liberada al medio, SHH se une a una serie de proteínas de membrana que influyen en la respuesta de los progenitores neuronales. Algunas de ellas, como *Cdo*, *Boc* y *Gas1*, potencian su señal sensibilizando a las células frente una baja concentración de SHH (Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; Zhang et al., 2006; Allen et al., 2007; Martinelli & Fan 2007), mientras que otras como *Ptch1*, inhiben la señal mediante endocitosis y degradación de SHH (Incardona et al., 2002).

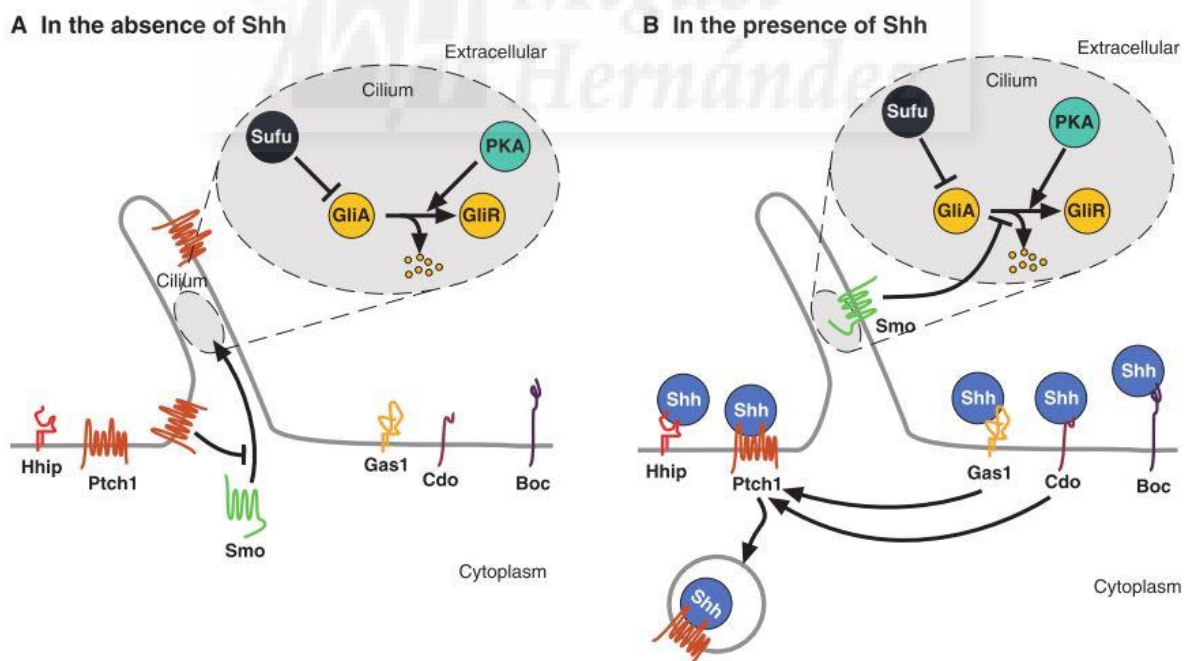


Esquema 6. Regulación en la difusión de SHH.

Diferentes proteínas de la superficie celular interaccionan con SHH, disminuyendo su difusión a lo largo del eje DV y generando un gradiente de acción. Algunas, como *Hhip1* y *Ptch1*, inhiben la señal de SHH, mientras que otras, como *Gas1*, *Cdo* y *Boc*, la estimulan (Adaptado de Dessaud et al., 2008).

El proceso de endocitosis para inhibir la actividad de SHH, supone una disminución de *Ptch1* a lo largo del cilio primario, lo que genera un acúmulo de *Smo* en esta región, siendo este cambio de *Ptch1* por *Smo* esencial en la transducción de señal, sin estar claro si se debe a dicho intercambio o a la cantidad de *Smo* presente en el cilio primario (Rohatgi et al., 2007).

A pesar de que la cascada de señalización no está totalmente esclarecida, algunos componentes han sido ya descritos como las kinesinas *Kif7* y *Kif27*, por su interacción con *Smo* (Ingham & McMahon 2001; Katoh & Katoh, 2004a, 2004b; Huangfu & Anderson, 2006). En cualquier caso, la cascada de *Shh* culmina con la regulación de los genes *Gli*: *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*, factores de transcripción con un dominio Zinc-Finger (Matisse & Joyner 1999). Además de la concentración de *Shh* que llega al tejido diana, la duración de la señal también afecta al patrón DV (Jeong & McMahon 2005; Stamatakis et al., 2005; Dessaud et al., 2007), ya que a medida que pasa el tiempo, las células se sensibilizan y es necesaria una mayor concentración de SHH para generar la misma respuesta. Como consecuencia, diferentes concentraciones de SHH son capaces de generar diferentes respuestas en distintos periodos de tiempo.



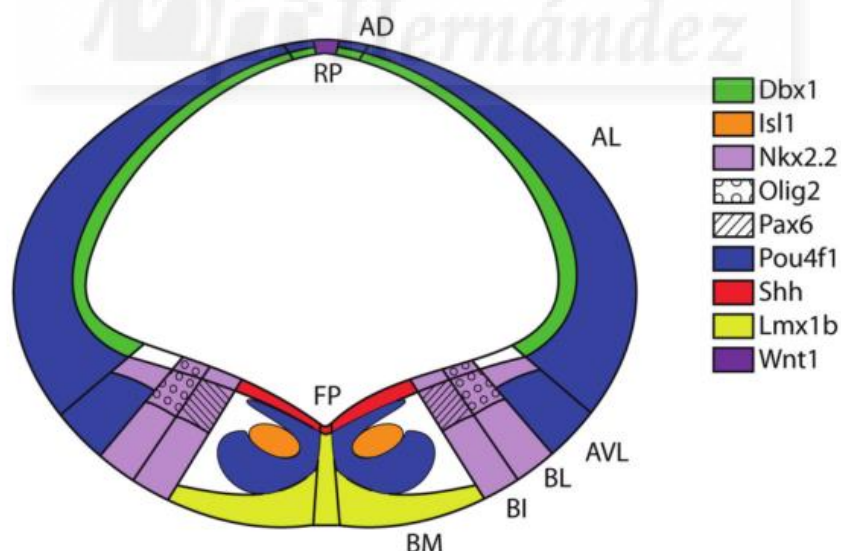
Esquema 7. Transducción de la señal de SHH.

En ausencia de SHH, PTCH1 se localiza en los cilios reprimiendo la actividad de SMO (A). En presencia de SHH, PTCH1 abandona el cilio y se genera un acúmulo de SMO en esta zona que induce la regulación de los factores de transcripción *Gli* (B) (Dessaud et al., 2008)



Capítulo 2. El mesencéfalo

El mesencéfalo es una de las tres vesículas primarias localizadas entre el prosencéfalo caudal (pretecho o p1) y el rombencéfalo rostral (istmo). Está subdividido a lo largo del eje AP en dos mesómeros (m1 y m2): la región más rostral (m1) incluye la sustancia gris tectal (TG), los colículos superior (CS) e inferior (CI) en la zona dorsal y el núcleo rojo, el complejo oculomotor o las neuronas dopaminérgicas, entre otras poblaciones ventrales, y la zona más caudal (m2) corresponde con la región preístmica y es significativamente más pequeña que la anterior (Puelles et al., 2012). Además de esta división AP existe otra DV, donde la región más dorsal se denomina *tectum* e incluye la placa del techo y la placa alar, subdividida en alar dorsal (AD), alar lateral (AL) y alar ventrolateral (AVL). La región más basal se denomina *tegmentum* y corresponde con la placa basal, subdividida en basolateral (BL), basal intermedia (BI) y basal medial (BM) y la placa del suelo (Puelles et al., 2012). Todas estas subdivisiones han sido posibles gracias al estudio de diferentes patrones de expresión de genes (Esquema de Moreno-Bravo et al., 2012).



Esquema 8. Organización DV del mesencéfalo.

En una sección transversal al mesencéfalo podemos ver las diferentes divisiones a lo largo del eje DV. Los patrones de expresión de diferentes genes nos permiten diferenciar las subdivisiones que presenta esta estructura tanto en su región alar como en su región basal (Adaptado de Moreno-Bravo et al., 2012). Abreviaturas: AD, alar dorsal; AL, alar lateral; AVL, alar ventrolateral; BI, basal intermedia; BL, basolateral; BM, basal media; FP, placa del suelo; RP, placa del techo.

1. Mesencéfalo dorsal

La región más dorsal se conoce como *tectum* y está implicada en procesos auditivos y visuales (Moreno-Bravo et al., 2012). Rostralmente encontramos al CS, una estructura retino-recipiente pluri-laminada que se encuentra dividida en tres estratos: profundo, intermedio y superficial. Estos reciben proyecciones de la retina (Dräger & Hubel 1975; Moreno-Bravo et al., 2012). En la región más caudal podemos encontrar el CI, dividido en núcleo central, córtex dorsal y córtex externo. Este último recibe señales de todos los centro auditivos del rombencéfalo (Franklin & Paxinos, 2008; Puelles et al., 2012). Además de estas estructuras principales, existen otras como el TG, similar al CS pero de menor tamaño, y la región preístmica, que contiene una población dopaminérgica retrorubral (Puelles et al., 2012).

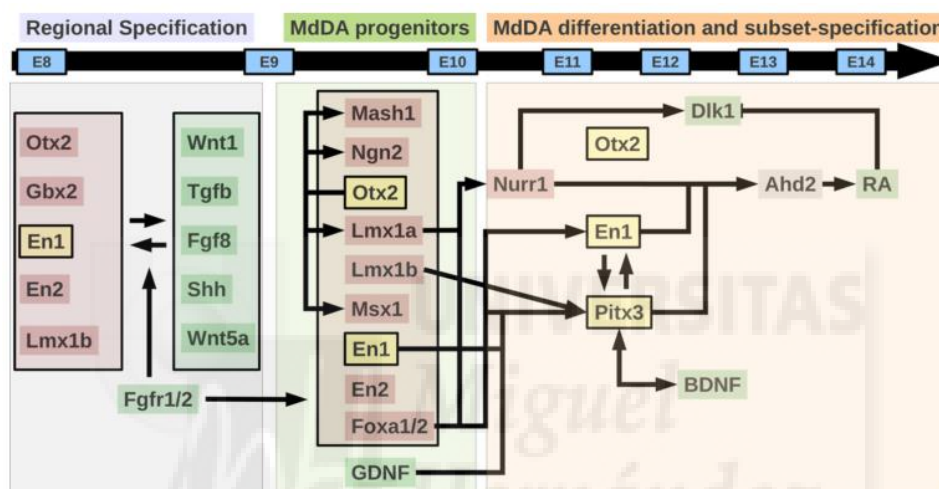
2. Mesencéfalo ventral

La región más basal se conoce como *tegmentum* y está implicada en movimientos visuales y coordinación motora (Moreno-Bravo et al., 2012). En su mayor parte está compuesto por la formación reticular, pero hay una serie de poblaciones neuronales bien definidas:

2.1. Poblaciones dopaminérgicas

Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDm) son las más estudiadas debido a su implicación en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o la esquizofrenia (Simeone 2005; Prakash & Wurst 2006). Dentro de estas poblaciones encontramos el área tegmental ventral (ATV) y la sustancia negra pars compacta (SNC). El ATV se encuentra en la región medial del manto y proyecta al núcleo accumbens y al sistema límbico mesocortical (Tzschentke & Schmidt 2000). Ventrolateral a ATV encontramos la SNC, que conecta con el estriado mediante la proyección nigro-estriatal (Golden 1972). Diversos estudios han demostrado que *Shh* y *Fgf8* antes de E10.5 son suficientes para instruir el destino de los progenitores ventrales y definir múltiples progenitores de NDm tempranos que, posteriormente, expresarán diferentes factores de transcripción como *Lmx1a* y *Lmx1b* (Andersson et al., 2006; Blaess et al., 2006; Smidt & Burbach, 2007; Deng et al., 2011). Las NDm del área medial requieren

de *Lmx1a*, que induce *Msx1*, inhibiendo este a *Nkx6.1* e induciendo a *Ngn2* que, a su vez, induce a *Sox2* y termina en la expresión de *Nurr1*, un factor necesario para que los progenitores alcancen el estadio post-mitótico, ya que regula la expresión de varios genes implicados en la generación y producción de dopamina como la tirosina hidroxilasa (Smidt & Burbach, 2007). *Lmx1b* parece estar implicado en la activación de *Pitx3*, importante para la SNC pero no para el ATV. Además de los factores implicados en su inducción y desarrollo, hay otros, como *En1* o *FoxA2*, que están implicados en su supervivencia (Kittappa et al., 2007; Sonnier et al., 2007; Alvarez-Fischer et al., 2011; Alves dos Santos & Smidt, 2011).



Esquema 9. Desarrollo de las poblaciones dopaminérgicas del mesencéfalo.

El esquema muestra las diferentes moléculas implicada en el desarrollo de las poblaciones dopaminérgicas. En una primera fase, varios factores de transcripción establecen su destino neuronal. Durante su expansión, *Otx2* controla su proliferación regulando la expresión de *Lmx1a*, *Msx1*, *Ngn2* y *Mash1*. En el momento de su diferenciación empiezan a expresar *Nurr1* junto con *Pitx3* y *En1* que activará su fenotipo, mientras que otros factores definirán los distintos subtipos. (Adaptado de Veenvliet & Smidt 2014).

2.2. Complejo oculomotor

El complejo oculomotor (OM) o III par craneal es un grupo de motoneuronas que se desarrolla de forma temprana en el desarrollo embrionario. En su especificación están implicados *Fgf8* y *Shh*, del que es claramente dependiente, ya que su ausencia genera la pérdida casi total de este núcleo, permaneciendo pues alguna neurona positiva para *Isl1*, marcador característico de las motoneuronas de dicho núcleo (Tanabe et al., 1995; Litingtung & Chiang, 2000). En cooperación con *Shh*, *Nkx6.1* también interviene en la formación de este núcleo, ya que los precursores

neuronales que lo formarán provienen de un dominio positivo para este factor de transcripción (Perez-Balaguer et al., 2009).

2.3. Núcleo rojo

El núcleo rojo (NR) juega un papel importante en la locomoción integrando señales de la corteza motora y del cerebelo a través de sus conexiones con interneuronas y motoneuronas de la médula espinal (Massion 1967; Liang et al., 2012). Su desarrollo presenta dos orígenes, estando compuesto por dos subpoblaciones: una parvocelular y una magnocelular. La región parvocelular, en el diencefalo, está formada en su mayoría por neuronas pequeñas y positivas para *vGlut2* y *Gad67*. La región magnocelular, en el mesencefalo (m1), está compuesta principalmente por neuronas grandes y positivas exclusivamente para *vGlut2* (Liang et al., 2012; Moreno-Bravo et al., 2012).

Esta última subpoblación está relacionada con el dominio basal positivo para *Shh* cuyos sus precursores neuronales dejarán de expresar *Nkx6.1* tan pronto como abandonen la zona de proliferación ventricular, y comenzarán a expresar *Pou4f1*, marcador característico de este núcleo (Puelles et al., 2003, 2004; Prakash et al., 2009). A su vez, el NR proyecta a lo largo de la médula espinal, a través del tracto rubroespinal (TRS), el cual cruza la línea media en la región caudal del mesencefalo y desciende por la región dorsolateral. Su función es excitatoria, ya que el 97% de sus fibras son *vGlut2* positivas (Du Beau et al., 2012; Liang et al., 2012; Watson & Harrison 2012).

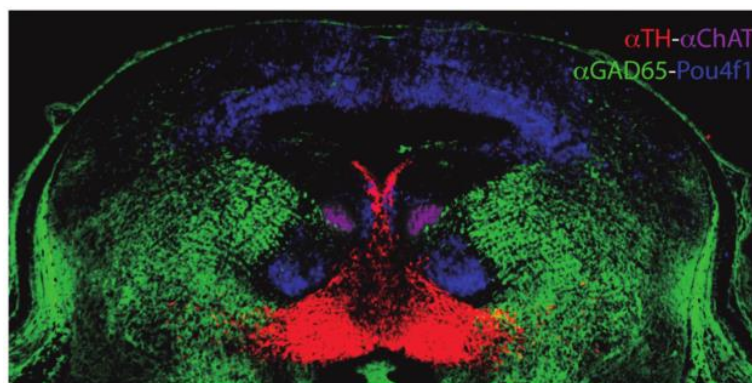
Por último, se ha demostrado la influencia de *Shh* en el desarrollo de este núcleo, cuya ausencia no genera la pérdida del NR pero sí conlleva una desorganización del mismo con presencia de algunas células ectópicas *Pou4f1* positivas cruzando la línea media y colonizando la región ausente del OM y SNC, lo que lleva a la idea del papel de *FoxA2* en el mantenimiento de este núcleo (Perez-Balaguer et al., 2009). Los precursores neuronales del NR derivan de los mismos que los del OM pero a diferentes tiempos, siendo la expresión de *Lmx1b* la que induce el destino de estos precursores, inhibiendo la especificación del núcleo rojo y favoreciendo la del OM, ya que la falta de *Lmx1b* genera una superproducción de células *Pou4f1* positivas (Deng et al., 2011).

2.4. Núcleo mesencefálico intersticial.

Este núcleo, recientemente descrito, corresponde con un dominio longitudinal a lo largo del diencefalo y mesencéfalo positivo para *Nkx6.1* y *Nkx6.2*, formando una columna integrada de rostral a caudal en la formación reticular (Moreno-Bravo et al., 2010). La zona medial positiva para *Nkx6.2* corresponde con el núcleo pre-Edinger-Westphal, mientras que la parte lateral corresponde con una población de núcleos pre-motores involucrados en los movimientos sacádicos de los ojos (Puelles, 2007; Franklin & Paxinos 2008; Moreno-Bravo et al., 2010). La población *Nkx6.2* positiva no sólo se mantiene en ausencia de *Shh*, sino que incrementa, pudiendo estar bajo la influencia de *FoxA2* (Perez-Balaguer et al., 2009).

2.5 Sustancia gris periacueductal y formación reticular mesencefálica

Estas dos poblaciones están menos caracterizadas en lo que a su diferenciación genética corresponde. La sustancia gris periacueductal (PAG) es un denso grupo de neuronas que rodea la zona ventricular, cuya zona dorsal está implicada en acciones lucha/huida y su zona ventral implicada en la toma de decisiones pasivas. Además, sus proyecciones descendentes tienen un papel en la modulación del dolor (Puelles 2007; Moreno-Bravo et al., 2012). La formación reticular (FR) es un grupo difuso de neuronas en la zona del manto, sin áreas o centros funcionales descritos por el momento, posiblemente por la falta de marcadores moleculares que las diferencien para su desarrollo (Moreno-Bravo et al., 2012).



Esquema 10. Poblaciones neuronales del mesencéfalo.

El uso de marcadores específicos nos permite identificar las diferentes poblaciones neuronales presentes en la región basal del mesencéfalo como el núcleo rojo (azul), el complejo oculomotor (lila) y las neuronas dopaminérgicas (rojo) entre otras (Adaptado de Moreno-Bravo et al., 2012).



Capítulo 3. El cerebelo

El cerebelo juega un papel importante en la percepción sensorial y en la coordinación de la ejecución motora. Esta estructura, caudal al mesencéfalo, proviene de la región dorsal de r1 e istmo a partir del día embrionario 9 (E9) que, tras una larga serie de procesos, culmina con su desarrollo postnatal en el día 21 (P21) (Sotelo 2004; Sillitoe & Joyner 2007; Martinez et al., 2013). La primera molécula señalizadora en actuar durante el desarrollo del cerebelo es *Fgf8*, secretada por el istmo, seguida inmediatamente por *Wnt1*, que carece de efecto inductivo, pero es necesaria para el mantenimiento de la expresión de *Fgf8*. La zona de expresión de estos dos genes queda inicialmente delimitada por la acción antagonista de *Otx2* y *Gbx2* (Li & Joyner 2001; Sotelo 2004; Hidalgo-Sanchez et al., 2005; Sillitoe & Joyner 2007; Martinez et al., 2013).

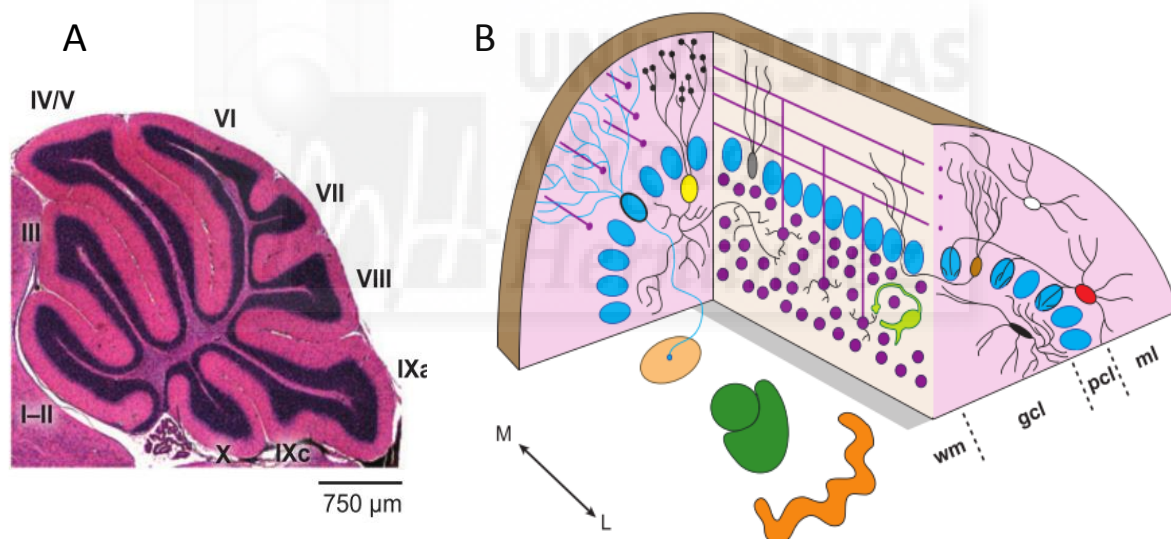
1. Morfología macroscópica y microscópica

El cerebelo está compuesto por una región medial, la vermis, y por los hemisferios cerebelosos, que se encuentran a ambos lados de esta. A lo largo de su eje AP la corteza cerebelar está dividida en 10 lóbulos primarios (I-X) que se subdividen a su vez en lóbulos secundarios (Larsell 1970).

A nivel histológico, podemos ver una región de materia blanca en la que se encuentran varios grupos de neuronas bien diferenciadas: los núcleos profundos (Sotelo 2004; Sillitoe & Joyner 2007; Puellas et al., 2012). Estos núcleos, que proyectan hacia el tálamo y la médula espinal, se distribuyen en tres grupos principales: medial (fastigial), interpuesto y lateral (dentado), que a su vez, pueden ser subdivididos en dominios citoarquitectónicos y moleculares (Puelles et al., 2012). Superficialmente aparecen tres capas celulares bien organizadas: la capa granular es la más profunda y de mayor extensión, y está formada por células granulares (CG), el soma de las células de Golgi y células unipolares (Mugnaini et al., 1997; Sotelo 2004; Sillitoe & Joyner 2007); la capa de Purkinje, en la zona intermedia, es una monocapa formada por el soma de las células de Purkinje (CP), por el soma de las células de la glía de Bergmann (GB) y por el soma de las células candelabro (Laine & Axelrad 1994; Voogd & Glickstein

1998); por último, la capa más externa, la capa molecular, está compuesta por el árbol dendrítico de las CP rodeado por fibras de la BG, los axones de las CG, células estrelladas, células en cesta e interneuronas (Voogd & Glickstein 1998).

Todas estas estructuras integran información del resto del cerebro y médula espinal a través de dos sistemas aferentes: las fibras musgosas, que desde diferentes localizaciones llegan hasta la capa granular, y las fibras trepadoras, procedentes de varios núcleos de la oliva inferior, que contactan con el árbol dendrítico de las CP en la capa molecular (Sotelo 2004; Sillitoe & Joyner 2007). Además de estas aferencias, una tercera clase de proyecciones adrenérgicas, colinérgicas y serotoninérgicas llegan hasta el cerebelo procedentes de distintos núcleos del sistema nervioso (Strahlendorf & Hubbard 1983; Jaarsma et al., 1997; Abbott & Sotelo 2000).



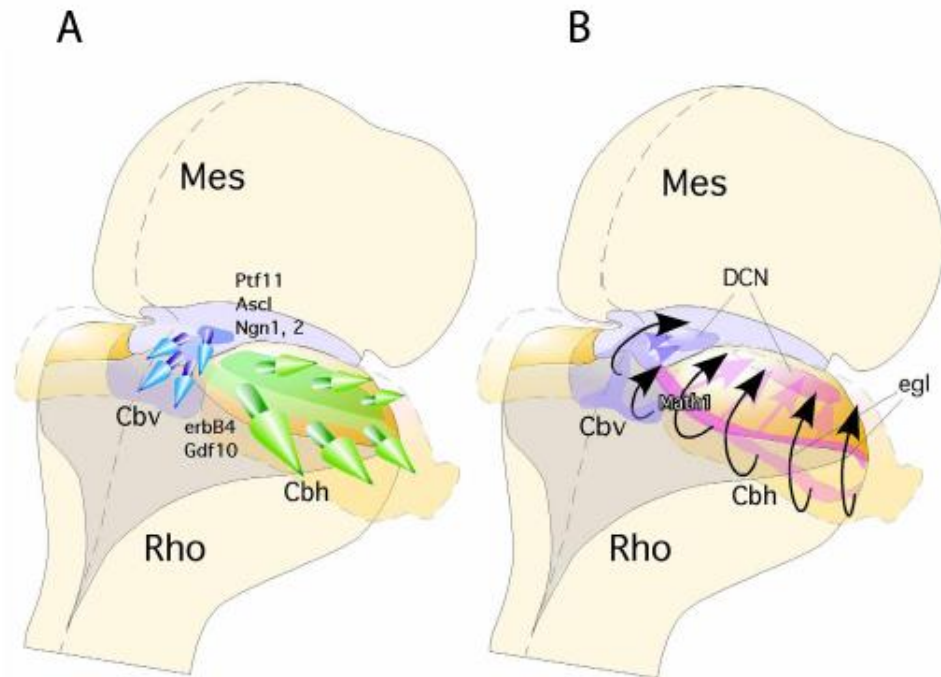
Esquema 11. Morfología macroscópica y microscópica del cerebelo.

(A) El cerebelo adulto de ratón presenta una serie de lóbulos a lo largo del eje AP que se vuelve más o menos compleja según la especie. (B) A su vez, las células que lo forman están bien organizadas a lo largo de la capa molecular (ml), la capa de Purkinje (pcl), la capa granular (gcl) y los núcleos profundos (medial, interpuesto y lateral) localizados en la materia blanca (wm) (Adaptado de Sillitoe & Joyner 2007).

2. Origen y migración de las células del cerebelo. El papel de *Shh*

Dentro del cerebelo existen dos zonas germinales, el labio rúbico (LR) y la zona ventricular (ZV), en las cuales se generan las diferentes neuronas que formarán parte del cerebelo. Las neuronas glutamatérgicas, las CG, se generan en el LR y realizan una migración tangencial para formar la capa granular externa (CGE). Proliferan en respuesta a la proteína SHH producida por las CP con un pico proliferativo alrededor de P8. A partir de P0, algunas de ellas salen del ciclo celular y migran de forma radial al interior a través de las fibras de la GB, para formar la capa granular interna (CGI) terminando de formar por completo la capa granular a P20 (Sillitoe & Joyner 2007; Huang et al., 2009, 2010).

Con respecto a las neuronas GABAérgicas, se producen en la ZV a diferentes tiempos: primero a E10-E12 se generan las neuronas de los núcleos profundos; a E11-E13, las CP, donde la reelina secretada por la CGE será la señal para que se organicen en monocapa y, por último, a partir de E14, el resto de neuronas GABAérgicas (Huang et al., 2009, 2010). Además de estos tipos neuronales, los astrocitos, incluidos la GB y oligodendrocitos, también se generan en la ZV, aunque hay evidencias de un posible origen de GB procedente del LR (Buffo & Rosi 2013). Durante todo este proceso, *Shh* tiene un papel importante en el desarrollo del cerebelo. Alrededor de E17, las CP expresan *Shh*, que actúa como señal de proliferación para las CG (Lewis et al. 2004; Corrales et al., 2004, 2006). Diferentes estudios de sobreexpresión e inhibición han demostrado su papel como factor mitogénico justo después del nacimiento de estas células (Wechsler-Reya & Scott 1999; Corrales et al., 2004, 2006). La GB, que expresa *Gli1* y *Ptch* también aparece alterada cuando se elimina *Gli2*, demostrando la relación de *Shh* en el desarrollo de la misma (Dahmane & Ruiz i Alba 1999).



Esquema 12. Migración celular desde de las zonas germinales del cerebelo.

(A) Las células GABAérgicas se producen en la zona ventricular y llegan a su localización final mediante migración radial. (B) Por otro lado, las células glutamatérgicas, generadas en el labio rómico, sufren una primera migración tangencial, que da lugar a la capa granular externa y una segunda migración radial que les permite alcanzar su lugar correspondiente en la capa granular. (Adaptado de Martínez et al., 2013). Abreviaturas: Cbh, hemisferios cerebelares; Cbv, vermis cerebelar; DCN, núcleos cerebelares profundos; egl, capa granular externa; Mes, mesencéfalo; Rho, rombencéfalo.

II. OBJETIVOS





OBJETIVOS

En el presente trabajo intentamos indagar en los procesos de diferenciación que ocurren en la placa basal del mesencéfalo y el cerebelo para así entender mejor la cascada genética que interviene en dicho proceso. Mediante el estudio de patrones de expresión y el uso de cepas transgénicas, pretendemos integrar a nuevos genes candidatos en la vía de señalización de uno de los morfogenes más importantes que actúan en estas regiones, *Shh*, y de otros factores de transcripción que influyen en la diferenciación de algunas de sus poblaciones como *Pou4f1*.

1. Estudio de los patrones de expresión de nuevos genes y factores de transcripción candidatos a formar parte de la cascada genética de la placa basal del mesencéfalo

- 1.1. Estudio de su expresión a lo largo del desarrollo
- 1.2. Descripción de nuevos marcadores para poblaciones basales del mesencéfalo

2. Caracterización fenotípica de los nuevos marcadores en ausencia de *Shh*

- 2.1. Integración en la cascada genética
- 2.2. Alteración de los dominios basales

3. Nuevos factores de transcripción relacionados con la vía de señalización de *Pou4f1*

- 3.1. Integración en la cascada genética
- 3.2. Papel en el desarrollo del núcleo rojo y el tracto rubroespinal

4. Desarrollo del cerebelo en ausencia de *Shh*

- 4.1. Relación de *Shh* y *Gdf10*. Implicación en el desarrollo de la glía de Bergmann



III. MATERIALES Y MÉTODOS





MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos animales

1.1. Mutante condicional de *Shh*

Los mutantes condicionales de *Shh* fueron generados a partir de dos líneas transgénicas. Una de las cepas, *Shh^{flox/flox}*, generada en el laboratorio del Dr. Andrew McMahon (Massachusetts, EEUU), presenta en homocigosis una inserción de la secuencia loxP flanqueando al exón 2. Por otro lado, la cepa *En1^{cre/+}*, generada por el laboratorio del Dr. Wolfgang Wurst (Munich, Alemania), presenta en heterocigosis la expresión de una endonucleasa cre que se expresa en el dominio de *Engrailed 1 (En1)*, incluyendo por completo todo el mesencéfalo y el rombómero 1. Esta endonucleasa cre es capaz de reconocer las secuencias loxP dentro del ADN y escindir la secuencia contenida entre ellas. Por lo tanto, en este modelo perderemos el exón 2 de *Shh* generando una proteína no funcional en la zona de expresión de *En1*.

A la hora de generar los animales parentales, cruzamos machos heterocigotos de *En1^{cre/+}* con hembras homocigotas de *Shh^{flox/flox}*, obteniendo una descendencia del 50% de ratones dobles heterocigotos *En1^{cre/+};Shh^{flox/+}*. Los machos dobles heterocigotos, *En1^{cre/+};Shh^{flox/+}*, se cruzan con hembras homocigotas *Shh^{flox/flox}*, y así obtenemos una camada con un 25% de mutantes condicionales *En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}*.

1.2. Mutantes knockout de *Pou4f1*

La cepa transgénica de *Pou4f1^{TauLacZ/+}* fue generada en el laboratorio del Dr. Eric Turner (San Diego, USA). Estos ratones tienen el reportero TauLacZ insertado en uno de los alelos de *Pou4f1*, lo que genera la interrupción del mismo. Cruzando parentales heterocigotos obtenemos una descendencia con un 25% de ratones KO *Pou4f1^{TauLacZ/TauLacZ}*. Esta línea presenta la ventaja de que gracias a la proteína Tau, la enzima codificada por el gen *lac z*, la β -galactosidasa, está distribuida a lo largo de toda la proyección neuronal.

2. Genotipado de cepas

2.1. Extracción de ADN

A la hora de seleccionar los embriones con los alelos de interés dentro de una camada, se realizó la extracción de ADN con una pequeña muestra de tejido fresco, generalmente un pequeño trozo de cola. La muestra se digiere con 100µL de NaOH 50mM a 98 °C durante una hora. Una vez digerido el tejido, se neutraliza con 100µL de Tris 1mM. Para realizar la PCR, se utilizan 2µL de dicha muestra, 1µL del mix de cebadores a 10µM, 9,5µL de agua libre de ARNasa (Sigma W4502) y 12,5µL de 1,1x ReddyMix Master Mix (Thermo AB-0608LD/B).

2.2. Cebadores

Para cada una de las cepas se utilizó un mix de cebadores concretos.

En1^{cre/+}; *Shh*^{flox/flox}

En1.11D → 5' GTGCCTTCGCTGAGGCTTC 3'

CreB → 5' ACCCTGATCCTGGCAATTCGGC 3'

ShhF → 5' ATGCTGGCTCGCCTGGCTGTGGAA 3'

ShhR → 5' GAAGAGATCAGGGCAAGCTCTGGC 3'

En el caso de *En1* se obtiene un tamaño de banda de 700pb para el alelo mutante y no se amplifica banda en el caso del alelo silvestre. En el caso de *Shh*, se obtiene un tamaño de banda de 449pb para el alelo silvestre y otra banda de 483pb para el alelo mutante.

Pou4f1^{TauLacZ/TauLacZ}

5' Pou4f1 WT → 5' ACAAGCCGGAGCTCTTCAACGG 3'

3' Lox- PCR A → 5' CAGGATACCGGACAGTCTAAATGA 3'

5' TauLacZ → 5' TTTGCTATCGGGTCCAGTCC 3'

3' TauLacZ → 5' GATGCGACAGCACCTTAGTG 3'

En este caso, se obtiene una banda de 330pb para el alelo silvestre y otra de 210pb para el alelo mutante.

2.3. PCR

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron comunes para todas las líneas transgénicas.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización Inicial	95 °C	15 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	39
Hibridación	55 °C	2 seg	
	Hasta 64 °C	0,1 °/seg	
Extensión	72 °C	90 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1

3. Obtención y procesamiento de embriones

Los embriones se obtenían cruzando generalmente 1 macho con 2 hembras y observando la presencia de tapón vaginal a la mañana siguiente, contando como E0.5 en el caso de que fuera positivo. Las hembras fueron sacrificadas mediante luxación cervical, acorde a la directiva del Parlamento Europeo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

3.1. Fijación de embriones

Los embriones se aislaron del útero en el estadio de interés con la ayuda de una lupa estereoscópica y se fijaron en PBS 1x (NaCl 13mM, Sigma S3014; KCl 0,3mM, Sigma P9541; Na₂HPO₄ 1mM, Sigma S3264 y KH₂PO₄ 0,2mM, Sigma P9791) con paraformaldehído (PFA, Panreac 141451.1211) al 4% durante una noche a 4 °C. Una vez fijados, los embriones se lavaron con PBS 1x y fueron deshidratados de forma gradual con etanoles al 25%, 50%, 75% y 100% y almacenados en este último etanol a -20 °C hasta su posterior uso.

3.2. Inclusión y sección de embriones

3.2.1. Microtomo de parafina

Esta técnica consiste en incluir los embriones en parafina (Gemcut emerald paraffin, Spiele no. 24364-1) para realizar secciones en el microtomo. Para ello, los embriones han de ser previamente lavados un par de veces con butanol 100% (Panreac 14.682.1211) un tiempo variable según el estadio, sin sobrepasar nunca las 2 horas. El butanol, miscible en parafina, sustituirá al etanol 100% en el que estaban almacenados.

Posteriormente, los embriones se pasan a parafina líquida a 56 °C y se realizan al menos, 6 cambios de 30 minutos, que nos permiten eliminar por completo el butanol y que se produzca una buena inclusión del tejido. Después de los sucesivos cambios, los embriones se orientan dentro de un molde según el plano a estudiar y se dejan a temperatura ambiente para que la parafina solidifique. Así pues, los embriones quedan dentro de un bloque de parafina sólida que nos permite hacer secciones con el microtomo.

Las secciones de 7µm se montan en portas (Superfrost plus, Thermo Scientific, J1800AMNZ) de forma seriada con una dilución de etanol al 17,5% a unos 40 °C para que el tejido se extendiera de forma correcta. Una vez el tejido queda perfectamente estirado, el etanol es eliminado y los portas se dejan secar una noche a 37 °C y se almacenan a temperatura ambiente para su posterior estudio.

3.2.2. Vibratomo

Esta técnica consiste en incluir los embriones en agarosa al 4% (low melting point, Pronadisa 8064). Para ello rehidratamos los embriones de forma gradual pasando del etanol 100% en el que estaban almacenados a etanol 75%, 50%, 25% y PBS 1x. Posteriormente, los embriones se pasan a un molde con agarosa líquida y se orientan según el plano de corte deseado. La agarosa acaba solidificando a temperatura ambiente generando un bloque consistente. Este bloque se corta en secciones de entre 50-150µm mediante el uso del vibratomo.

4. Técnicas histológicas

4.1. Hibridación *in situ*

4.1.1. Síntesis de sonda

A la hora de sintetizar una sonda de ARN, debemos linealizar el vector que contiene el fragmento de ADN que nos servirá como molde y que está flanqueado por promotores específicos para una polimerasa de ARN que nos permitirá sintetizar la sonda en un sentido u otro.

La digestión se hace con una enzima de restricción específica que elegimos conociendo la secuencia de ADN que contiene el plásmido. Para ello, utilizamos 5µg del vector circular, 2µl de enzima, 3µl del buffer y añadimos agua libre de ARNasa hasta completar un volumen final de 30µl. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a 37 °C y se purifica con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen 28104).

Una vez limpio el vector lineal, se usa como molde para generar una sonda complementaria al ARNm presente en el tejido. Para ello, sintetizamos la sonda complementaria usando 1µg del vector lineal, 2µl de buffer (Roche 11465384001), 2µl de inhibidor de ARNasa (Thermo EO0382), 2µl de polimerasa (Roche), 2µl del mix de nucleótidos marcados (ATP 10mM, Roche 1140965, CTP 10mM, Fermentas HR0451, GTP 10mM, Fermentas R0461, UTP 6.5mM, Roche 1140949 y UTP-digoxigenina 3.5mM, Roche 11209256910) y completamos hasta 20µl con agua libre de ARNasa. La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a 37 °C y, una vez transcurrido este tiempo, se añaden 2µl de ADNasa (Roche 04716728001) y se deja 30 minutos más en las mismas condiciones para eliminar el vector lineal.

La sonda sintetizada se purificada añadiendo 5µl de LiCl 8M (Sigma R6625) y 300µl de etanol 100%, y se deja toda la noche a -20 °C para que la sonda precipite. A la mañana siguiente, se centrifuga a 4 °C durante 15 minutos a 14.000 xg y se elimina el sobrenadante. Se hace un lavado con etanol 70% y se centrifuga a 4 °C otros 15 minutos a 14.000 xg. Por último, se retira el sobrenadante y se deja secar a 37 °C unos 10 minutos. La sonda precipitada y limpia se resuspende en 20µl de agua libre de ARNasa y 5µl de formamida desionizada (Amresco 0606).

Relación de las distintas sondas utilizadas, con la enzima de corte, polimerasa utilizada y tamaño del fragmento:

Gen	Enzima	Polimerasa	Tamaño	Referencia
<i>Barhlh1</i>	KpnI	T3	989pb	imaGenes IRAPv968G10116D
<i>Cplx1</i>	BglII	T7	1417pb	imaGenes IRAPv968A0151D
<i>Dync1i1</i>	BstXI	T3	1229pb	imaGenes IRAPv968F11111D
<i>Gdf10</i>	EcoRI	T3	2613pb	imaGenes IRAPv968G04118D
<i>Klhdc8a</i>	BstXI	T7	981pb	imaGenes IRAPv968E0227D
<i>Mfap3l</i>	PmlI	T7	653pb	imaGenes IRAPv968E04150D
<i>Nhlh1</i>	BstEII	T7	676pb	imaGenes IRAPv968D02101D
<i>Nkx2.2</i>	NotI	T7	2100pb	John L.R. Rubenstein, Nina Ireland Lab of Developmental Neurobiology (San Francisco, USA)
<i>Npas1</i>	NdeI	T3	838pb	imaGenes IRCKp5014E128Q
<i>Six3</i>	XbaI	T7	1200pb	Peter Grus, Dept. of Molecular Cell Biology (Max-Planck-Institute of biophysical Chemistry, Alemania)
<i>Tln2</i>	BamHI	T3	1280pb	imaGenes IRAPv968A08135D

4.1.2. Hibridación *in situ* en cortes de parafina

Esta técnica nos permite detectar la expresión del ARNm. Para ello, las secciones de tejido han de desparafinarse por lo que se incuban a 65 °C durante 25 minutos para fundir la parafina, y se hacen dos pases de xilol (Panreac 141769.2711) de 25 minutos cada uno para acabar de eliminarla por completo. Después, el tejido se rehidrata en alcoholes decrecientes empezando por 2 pases de etanol 100%, 2 de etanol 96%, 1 de etanol 70% y 1 de agua, durando 10 minutos cada pase. Las secciones se lavan con PBS 1x, se fijan con PFA 4% durante 10 minutos y se lavan 10 minutos con PBS 1x y con PBS-T (PBS 1x con 0,1% tween 20, Sigma P7949). Para facilitar la penetración de la sonda se incuban 3 minutos con una disolución de proteinasa K (10mg/ml) de 1µl/ml en PBS-T, que nos permite abrir poros en el tejido. Las secciones se post-fijan de nuevo 10 minutos reusando el PFA del paso anterior y se termina con 3 lavados de PBS-T.

El tejido se prepara para la hibridación con 1 hora de pre-hibridación en el buffer compuesto por 50% formamida desionizada, SALT 1X (NaCl 0,2M, Sigma S3014, tris-HCl 9mM Sigma T3253, Tris-Base 1mM, Sigma T6066, Na₂HPO₄·2H₂O 5mM,

Scharlau SO0334, Na₂HPO₄ 5mM, Sigma S3264 y EDTA 5mM, Sigma E5134) Denharts 2X (Bio Basic Canada D0062), Dextran sulfato 0,2mM (Amresco 0198), 0,1% ARNt (Sigma R6625) y agua autoclavada. La sonda que se utilizará se desnaturaliza a 80 °C durante 5 minutos y se deja en hielo otros 5 minutos. La sonda desnaturalizada se resuspende en el buffer de hibridación a unos 100-300ng totales. A cada porta se le añaden 200µl de la mezcla y se cubren antes de la hibridación que tendrá lugar durante toda la noche en un horno a 65 °C.

A la mañana siguiente, eliminamos el exceso de sonda con 3 lavados de 30 minutos a 65 °C con una solución de lavado compuesta por 50% de SSC 1x pH 7 (NaCl 0,15M, Sigma S3014 y Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 15mM, Sigma C8532), 25% de formamida (Sigma F7503), 25% agua autoclavada y 0,1% tween 20. Una vez eliminado el exceso de sonda las secciones se bloquean con MABT 1x (NaCl 40mM, Sigma S3014; ácido maleico 20mM, Acros Organics 125230010 y NaOH 40mM, VWR 28245.298; a un pH de 7,4) con un 10% de suero de oveja (Sigma S2263), un 20% de Blocking Reagent (Roche 10057177103) y 0,1% de tween 20 durante 1 hora. Parte de esa solución de bloqueo se usa para diluir el anticuerpo (1:3.500) contra digoxigenina el cual está conjugado con fosfatasa alcalina (Roche 11093274910) y se incuba a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se realizan 8 lavados de 30 minutos con MABT 1x para eliminar el exceso de anticuerpo y 2 lavados de 10 minutos con NTMT (NaCl 0.1 M, Sigma S3014, Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, Sigma T3253 y MgCl₂·6H₂O 0.05 M, VWR 1.05833 y tween-20 0.1 %). En esta última solución también se diluye una mezcla de 0,45µl/ml de 4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT, 75mg/ml, Roche 70227721) y 3,5µl/ml de 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate, (BCIP, 50mg/ml, Roche 11585002001) y se incuba durante toda la noche.

Estos sustratos para la fosfatasa alcalina sufren una serie de reacciones oxidación/reducción, pasando de una forma soluble amarilla a un precipitado insoluble y de color azulado, que permiten localizar las zonas en las que ha tenido lugar la hibridación de la sonda. El posible precipitado inespecífico se elimina con 3 lavados de PBS 1x y las muestras se deshidratan de nuevo y se montan con Eukitt para su conservación.

4.2. Inmunohistoquímica en cortes de parafina

Esta técnica nos permite detectar la expresión de proteínas. Para ello, las secciones de tejido se desparafinan y rehidratan como en la técnica de hibridación *in situ*. Una vez hidratadas, se hacen 3 lavados con PBT (PB ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,08M, Panreac 141678.1214 y NaCl 0,15M, Panreac 121659.1211 con 0,075% Triton-X100, Sigma X100) de 10 minutos y se hierven en un microondas 4 veces a 750W de potencia durante 3 minutos con citrato sódico pH 6 0,01M para facilitar la exposición del epítipo de interés. Después del hervido, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos y se inactiva la peroxidasa endógena incubando con H_2O_2 (Normapur 23619.297) al 1,5% en PBT durante 30 minutos. Una vez inactivada, se lava de nuevo con PBT y se bloquea durante 1 hora en PBT con 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma A2153) y 10% de lisina 1M (Sigma L5626). Por último, las secciones se incuban con el anticuerpo deseado en PBT con 0,1% BSA y 0,01% azida (Sigma S2002) durante toda la noche. A la mañana siguiente, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con biotina a 1:200 en PBT. El exceso de secundario se elimina con otros 3 lavados de PBT durante 10 minutos y se incuba 1 hora con el complejo ABC (Vectastain PK-4000) a 1:500 en PBT. Este complejo está formado por peroxidasa bitoinilada y por avidina, una glicoproteína que se unirá a la biotina de la peroxidasa y a la del anticuerpo secundario. El último paso, consiste en añadir una solución de Tris pH7 0,01M con 1% de 3-3' Diaminobenzidine tetrahydroc (DAB, Acros Organics W0572M) y 0,003% de H_2O_2 que nos permitirá la detección mediante un precipitado marrón.

Relación de los diferentes anticuerpos utilizados y su concentración final:

Anticuerpo	Dilución	Ac. Secundario	Referencia
α CALBINDINA	1:2000	α Rabbit	Swant, CB-38
α ChAT	1:100	α Goat	Chemicon, AB144P
$\alpha\beta$ GALACTOSIDASA	1:500	α Chicken	Abcam, ab9361
α ISLT1	1:10	α Mouse	Hybridoma bank, 39.4D5
α NESTINA	1:200	α Mouse	Chemicon, MAB353
α PAX6	1:500	α Rabbit	Covance, PRB-278P
α POU4F1	1:10	α Mouse	Santa Cruz, SC-8429
α TH	1:1000	α Rabbit	Inst.J.Boy, 208020234
α VIMENTINA	1:10	α Mouse	Hybridoma bank, H5

4.3. Inmunohistoquímica en cortes de vibratomo

Esta técnica puede hacerse con los cortes flotantes o montados sobre portas y se desarrolla de igual manera que la anterior pero con ciertas diferencias: en este caso, los cortes se lavan el doble de veces y con PBT-1% (1% Triton-X100 en PB). La peroxidasa endógena se inactiva con H₂O₂ al 3% y se bloquea durante 2h.

4.4. Tinción X-gal

Esta técnica se utiliza con la cepa de ratones *Pou4f1^{TauLacZ/+}*, en la que mediante una reacción enzimática, obtenemos un color azul en los somas y proyecciones de las células *Pou4f1* positivas que estarán expresando β-galactosidasa. La reacción enzimática se llevaba a cabo a 37 °C, con un tiempo que varía dependiendo del estadio embrionario. La solución de tinción está formada por 1mg/ml de X-gal a 25mg/ml (Stratagene 200384-5), ferricianuro de potasio 20mM (Prolabo 26 810.298), ferrocianuro de potasio 20mM (Prolabo, 26 816.298), cloruro de magnesio 2mM (Prolabo 28 109.298), EGTA 5mM (Sigma E3889), 0,01% de desoxicolato sódico (Sigma, D6750) y 0,02% de NP-40 (Sigma I3021).

5. Estudio de la proliferación celular con BrdU

Para estudiar la proliferación celular se utilizó la técnica de marcaje del ADN con 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU), un análogo de la timidina. Este compuesto será incorporado al ADN que se esté sintetizando por las células que, en el momento de la administración, se encuentren en una fase activa de proliferación. Para incorporarlo en los embriones, se inyectó a la hembra gestante, por vía intraperitoneal una disolución de BrdU (5mg/ml) a una cantidad final de 50μg de BrdU por gramo de peso; de esta forma, la disolución llega hasta los embriones en desarrollo a través del torrente sanguíneo. Las inyecciones en el estadio deseado se repiten 5 veces cada 2 horas y se deja avanzar el desarrollo embrionario hasta E15.5, momento en el que se sacrifica a las hembras y se extraen los embriones. Estos se fijaron en PFA al 4% y se deshidrataron hasta etanol 100%. Los embriones fueron incluidos en parafina y cortados con el micrótopo para realizar un marcaje con inmunohistoquímica.

6. Estudio de expresión génica por PCR cuantitativa (PCRq)

Esta técnica nos permite determinar la cantidad relativa de ARN de una muestra con respecto a un control.

6.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó tejido fresco. Las muestras de tejido se homogenizaron con 1ml de Trizol (Ambion 15596) y se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para una completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A la muestra homogeneizada se añaden 200µl de cloroformo (Scharlau CL02031000), se agita con fuerza y se dejan 3 minutos en reposo a 4 °C antes de centrifugar a 12.000 xg y 4 °C durante 15 minutos. Tras centrifugar, la fase acuosa se pasa a un nuevo eppendorf y se añaden 500µl de Isopropanol (Panreac 141090) frío y 1µl de glicógeno a 20mg/ml (Roche 10899232103), para favorecer la precipitación del ARN, y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar durante 10 minutos a 12.000 xg y 4 °C. A continuación, se elimina el sobrenadante por completo y se añade 1ml de etanol frío al 75% y se agita la muestra antes de centrifugarla a 7.500 xg y 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina y el ARN precipitado se deja secar unos 10 minutos a 37 °C. El precipitado se resuspende en agua libre de ARNasa, variando el volumen en base al tamaño del precipitado, y se incuba durante 5 minutos a 56 °C para favorecer la completa disolución. La muestra de ARN se almacena a -20 °C.

6.2. Retrotranscripción de ARN a ADNcomplementario (ADNc)

Para llevar a cabo la PCRq, necesitamos retro-transcribir el ARN extraído del tejido a ADNc. Esta reacción se lleva a cabo mediante el kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems 4368814), en el que se usan 10µl de ARN (a unos 400ng finales), 2µl de Buffer, 2µL de cebadores, 2µl de NTP, 2µl de inhibidor de ARNasa, 1µl de enzima y completamos con agua libre de ARNasa hasta 20µl finales. La reacción se produce a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 2 horas y 85 °C durante 5 minutos. Tras la reacción no es necesario purificar las muestras.

6.3. PCR cuantitativa

Para amplificar las muestras de ADNc se ajustan todas por igual a 100ng/ μ l, pudiendo usarse tanto cebadores comerciales como diseñados frente a una región específica, lo que supone que en cada caso tanto los reactivos como las condiciones de los ciclos de amplificación serán específicos para cada reacción.

6.3.1. Condiciones para cebadores comerciales (TaqMan ©)

En este caso se utilizan 2 μ l de ADNc junto con 10 μ l de TaqMan gene expression Master Mix (TaqMan 4369016), 1 μ l de sonda TaqMan y completamos hasta 20 μ l finales con agua libre de ARNasa.

Los ciclos de PCRq son los siguientes:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización e hibridación	50 °C	2 minutos	1
	95 °C	10 minutos	
Amplificación	95 °C	15 segundos	40
	60 °C	1 minuto	

6.3.2. Condiciones para cebadores diseñados

En este caso se utilizan 2 μ l de ADNc, 4 μ l de PyroTaq EvaGreen (Cmb 87_H2400S), 1 μ l de cada cebador (10pmol/ μ l) y se completa hasta 20 μ l finales con agua libre de ARNasa.

Los ciclos de PCRq son los siguientes:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	45
Hibridación	65 °C	20 segundos	
Elongación	72 °C	20 segundos	



IV. RESULTADOS





1. Análisis del patrón de expresión de nuevos candidatos en la placa basal del mesencéfalo

Como hemos descrito anteriormente, el mesencéfalo al igual que el resto del tubo neural, presenta una clara subdivisión DV. Los grandes territorios están claramente definidos, pero las subdivisiones interiores todavía no han sido plenamente caracterizadas. Es por ello que nos hemos planteado encontrar marcadores moleculares que nos permitan detallar estas regiones, concentrándonos en los territorios ventrales. En un segundo paso nos proponemos analizar el posible papel de estos genes en las cascadas génicas necesarias para especificar las diferentes poblaciones neuronales.

1.1. Descripción del patrón de expresión de los nuevos candidatos durante el desarrollo embrionario

Para seguir indagando en la complejidad de la organización ventral del mesencéfalo, elegimos una serie de genes candidatos. Estos fueron seleccionados usando bases de datos de expresión génica (Allen Brain Atlas: <http://mouse.brain-map.org/> y Eurexpress: <http://www.eurexpress.org/ee/>), considerando únicamente importante su patrón de expresión en lugar de su posible función.

Los genes candidatos se dividieron entre genes que codifican proteínas con funciones diversas, (*Dync1i1*, *Klhdc8a*, *Mfap3l* y *Tln2*) y genes que codifican factores de transcripción (*Barhl1*, *Cplx1*, *Nhlh1*, *Npas1*, y *Six3*). Estos últimos presentaban un mayor interés dada su capacidad de unión al ADN y, por la tanto, su posible integración en cascadas génicas de diferenciación neuronal.

Para los estudios de expresión a lo largo del desarrollo embrionario se eligieron dos estadios: E12.5, en el que los precursores neuronales continúan dividiéndose en la zona ventricular pero muchos de ellos, sobre todo en la placa basal, ya han comenzado su diferenciación y se encuentran migrando hacia su destino final; y E15.5, donde las poblaciones basales ya ocupan básicamente su posición final y se encuentran bien diferenciadas, al menos en el mesencéfalo.

A E12.5, los cuatro genes candidatos que no codifican factores de transcripción, *Dync1i1*, *Klhdc8a*, *Mfap3l* y *Tln2*, presentan un dominio de expresión discreto en el dominio BM (Figura 1 A-D). *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2* comienzan a mostrar una tenue expresión en la zona del manto mientras que *Klhdc8a* aparece más cercano a la capa ventricular y su expresión es mucho más evidente.

Posteriormente, a E15.5, *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2* presentan una pequeña expresión en una población bien definida en la zona del manto (Figura 1 E, G, H). Desafortunadamente la expresión *Klhdc8a* desaparece en este estadio (Figura 1 F). La localización en el manto de esta población positiva para los diferentes genes nos permite plantear la hipótesis de que correspondería al complejo oculomotor del mesencéfalo. En el siguiente apartado aportaremos datos para corroborar dicho postulado.



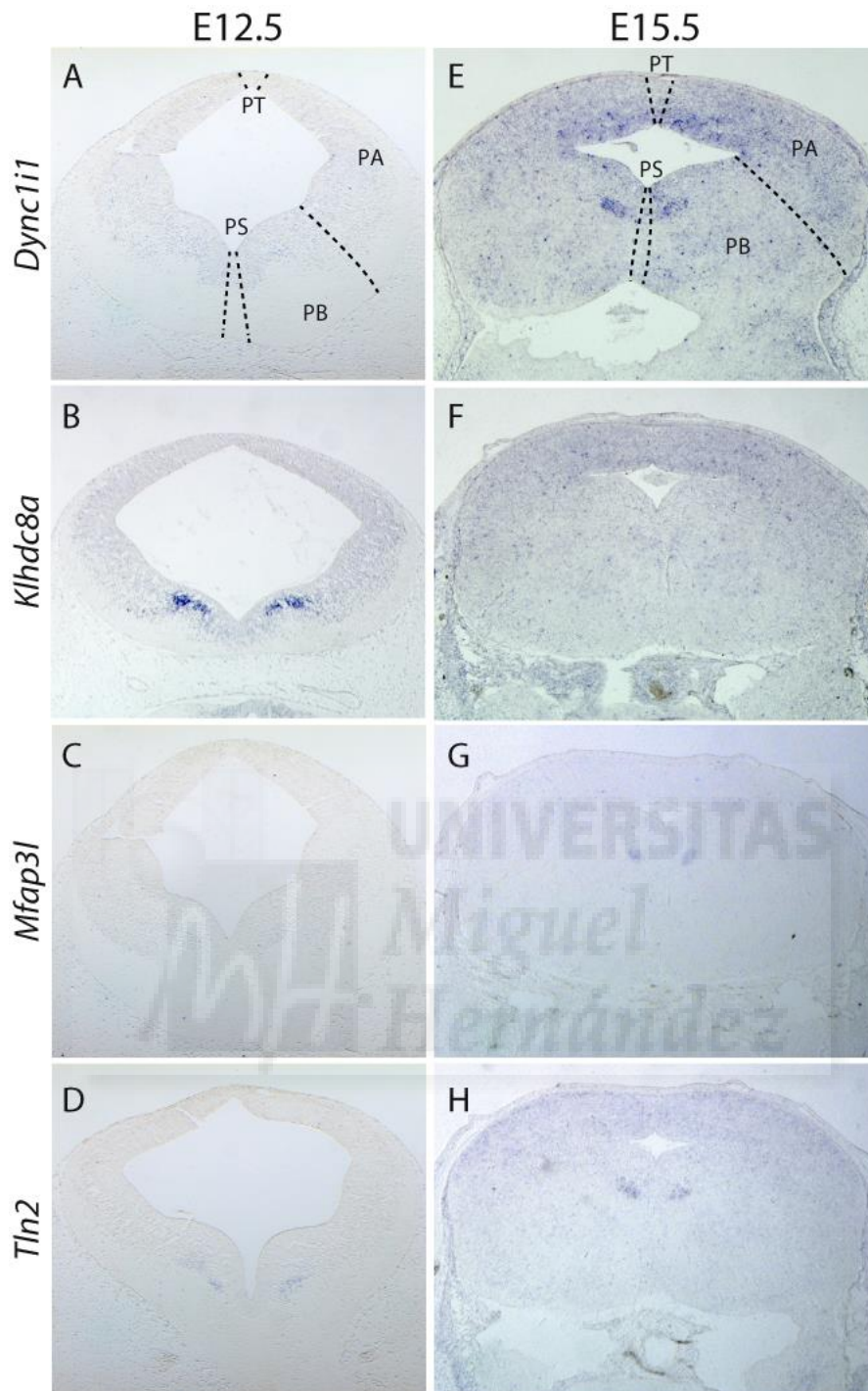


Figura 1. Expresión de los genes candidatos durante el desarrollo.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E12.5 procesados mediante hibridación *in situ* (A-D). *Dync1i1* (A), *Mfap3l* (C) y *Tln2* (D) presentan un tenue patrón de expresión en la zona basal del manto mientras que *Klhdc8a* (B) muestra una fuerte expresión periventricular. Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por hibridación *in situ* (E-H). La expresión de *Dync1i1* (E), *Mfap3l* (G) y *Tln2* (H) se ha intensificado y parece coincidir en los tres casos, delimitando una población discreta y bien definida de la región basal del mesencéfalo. *Klhdc8a* (F) deja de expresarse por completo. Abreviaturas: PA, placa alar; PB, placa basal, PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

Los factores de transcripción mostraron, sin embargo, diferente complejidad en su expresión por lo que se decidió diferenciarlos en dos grupos: uno que presenta expresión en dos poblaciones bien definidas donde, incluimos *Cplx1* y *Npas1*, y otro cuyo patrón de expresión es más complejo, como *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3*.

Dentro del primer grupo a E12.5, *Cplx1* se restringe a un dominio concreto en la zona del manto del territorio BM (Figura 2 A) mientras que *Npas1* no se expresa aún a este estadio (Figura 2 B). Sin embargo, a E15.5 dos poblaciones bien definidas en la zona del manto expresan ambos factores de transcripción (Figura 2 C y D). Estas se encuentran en el dominio BM, una más superficial y la otra más cercana a la capa ventricular, siendo esta última población aparentemente la misma que fue identificada por los genes *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2*.

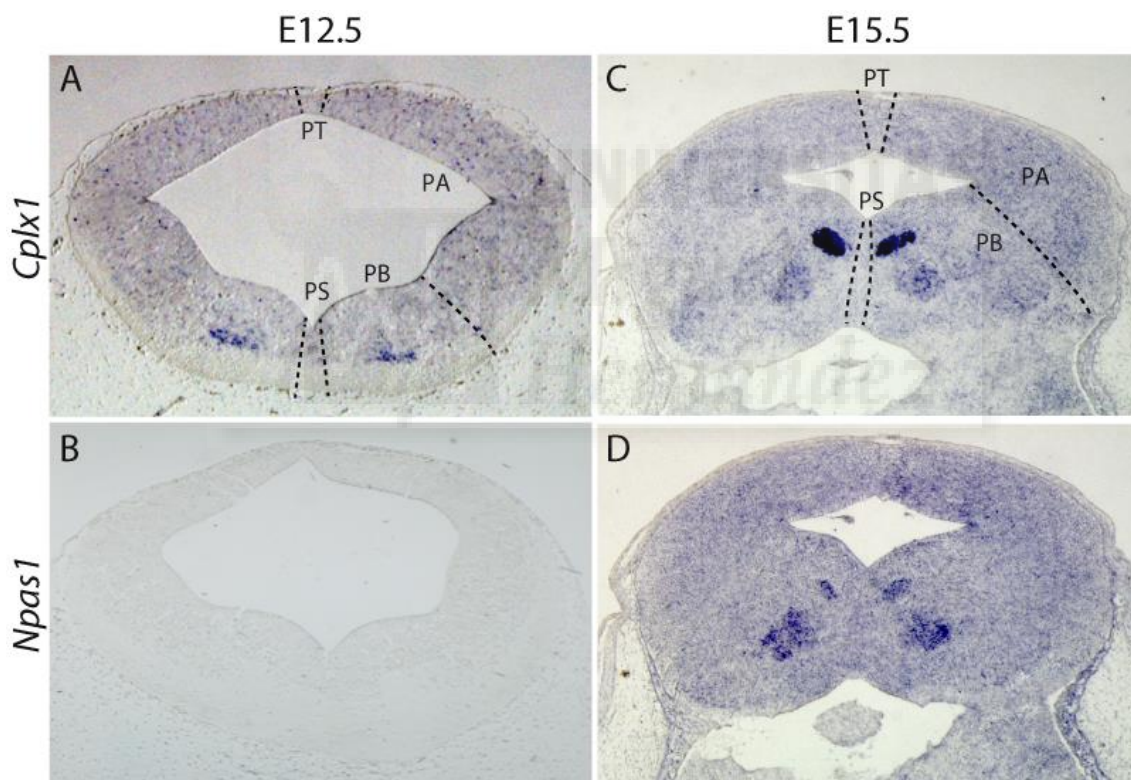


Figura 2. Expresión de *Cplx1* y *Npas1* durante el desarrollo.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E12.5 procesados por hibridación *in situ* (A y B). *Cplx1* (A) muestra expresión en la zona del manto basal. *Npas1* (B) sin embargo no se expresa en este estadio (B). Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por hibridación *in situ* (C y D). *Cplx1* (C) y *Npas1* (D) muestran un patrón de expresión similar. Los dos definen dos poblaciones discretas en la zona ventral. Abreviaturas: PA, placa alar; PB, placa basal, PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

Por otro lado están *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3* que, ya a E12.5, se expresan en diferentes regiones discretas a lo largo del eje DV del mesencéfalo. *Barhl1* se expresa en una población específica en la zona ventral del dominio BL (Figura 3 A). *Nhlh1* se distribuye en todos los dominios de la región alar, y en la región basal cubre la placa del suelo y los dominios BI y BM, dejando únicamente la zona BL sin marcaje (Figura 3 B). Por último, *Six3* se expresa en la zona de transición alar-basal, incluyendo los dominios AVL y BL (Figura 3 C). Con el fin de precisar la localización de los patrones analizados, tomamos como referencia *Nkx2.2*, que se expresa en el dominio BL, y la distribución de la proteína PAX6, que se restringe a la porción ventral de la zona BL (Figura 3 D).

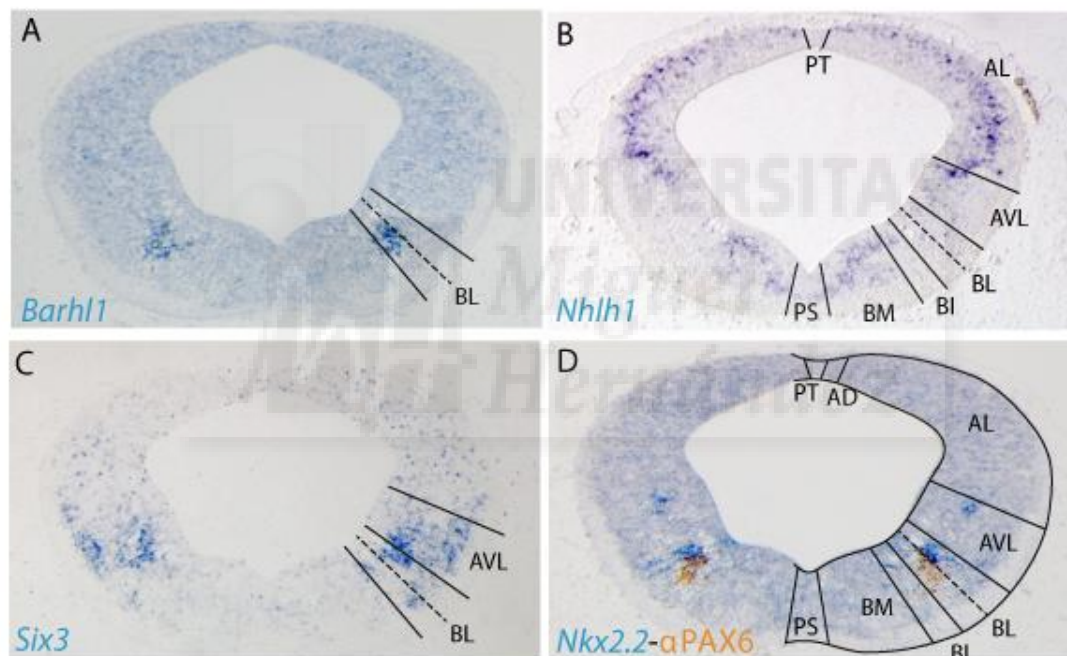


Figura 3. Expresión de *Barhl1*, *Nhlh1*, *Six3* y *Nkx2.2*-PAX6 a E12.5.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E12.5 procesados por hibridación *in situ* (A-C) e hibridación *in situ* más inmunohistoquímica (D). Este grupo de factores de transcripción muestra una expresión diversa en este estadio. *Barhl1* se expresa de forma discreta en la región glutamatérgica de la compleja banda BL (A). *Nhlh1* está presente a lo largo de todo eje DV, a excepción de la banda BL (B). *Six3* presenta expresión en la transición alar-basal, incluyendo la banda AVL y la banda BL (C). Para la precisa localización de estos factores de transcripción tomamos como referencia *Nkx2.2*, que marca por completo la banda BL, y PAX6, que se restringe a su zona glutamatérgica más ventral (D). Abreviaturas: AD, alar dorsal; AL, alar lateral; AVL, alar ventrolateral; BI, basal intermedio; BL, basolateral; BM, basal medial; PA, placa alar; PB, placa basal, PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

Una vez avanzamos en el desarrollo hasta E15.5, *Barhl1* presenta expresión en la región del colículo superior y en una población bien definida en la región más ventral del dominio alar, colindante con la zona basal, mientras que en la zona basal define una pequeña población en la región BM (Figura 4 A). *Nhlh1*, desafortunadamente, no mantiene su expresión en este estadio (Figura 4 B). Por último, *Six3* se encuentra disperso en la zona del manto de la placa basal, ocupando el área de la formación reticular (Figura 4 C). En este estadio, al igual que en E12.5, volvemos a tomar la expresión de *Nkx2.2* y PAX6 como referencia (Figura 4 D).

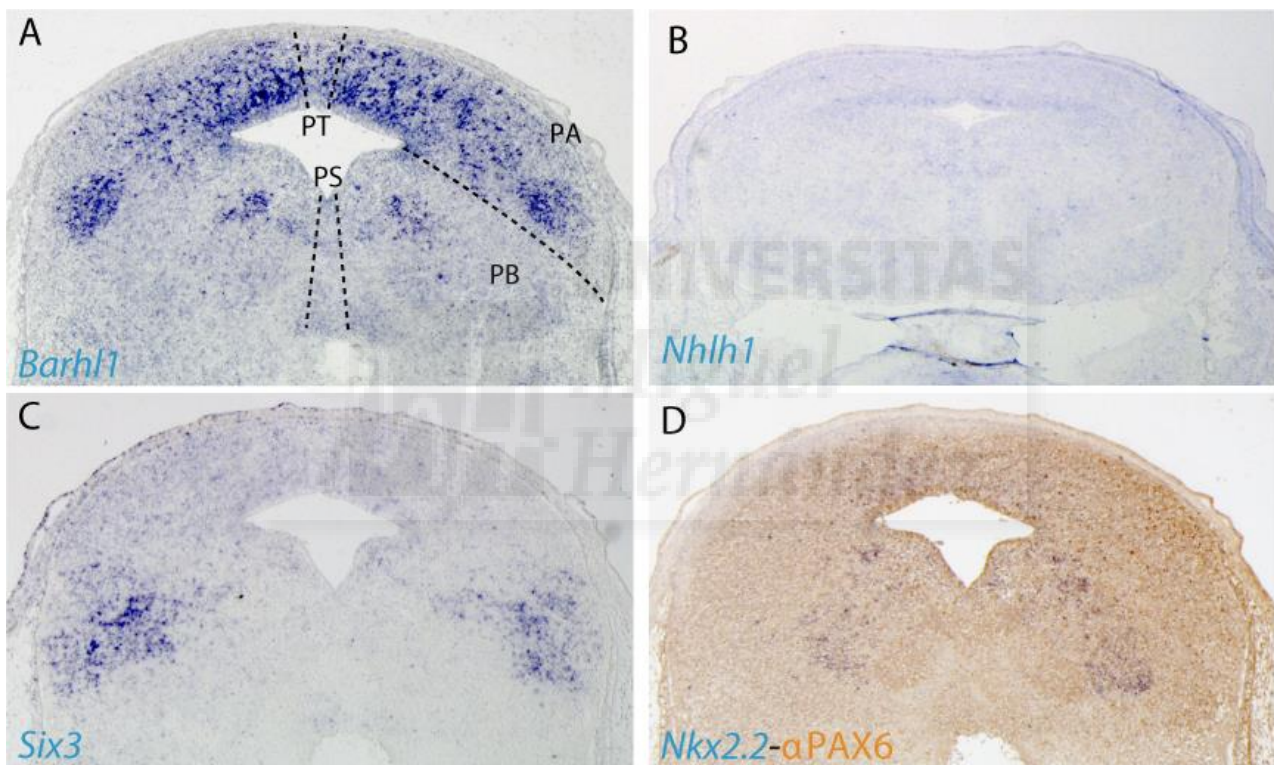


Figura 4. Expresión de *Barhl1*, *Nhlh1*, *Six3* y *Nkx2.2*-PAX6 a E15.5.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por hibridación *in situ* (A-C) e hibridación *in situ* más inmunohistoquímica (D). En este estadio *Barhl1* da lugar a una pequeña población en el manto de la placa basal mientras que expande su expresión a lo largo de la placa alar (A). *Nhlh1*, por otro lado, pierde por completo su expresión (B), mientras que *Six3* se dispersa a lo largo de la formación reticular del manto (C). *Nkx2.2* nos vuelve a servir como herramienta para localizar los patrones de expresión, mientras que el nivel de proteína PAX6 se reduce drásticamente en este estadio en el mesencéfalo (D). Abreviaturas: PA, placa alar; PB, placa basal, PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

1.2 Caracterización de las poblaciones neuronales descritas por los nuevos candidatos

La placa basal del mesencéfalo está compuesta por una serie de poblaciones bien definidas, las cuales presentan una serie de marcadores característicos para cada una de ellas. Con el fin de esclarecer e identificar a qué poblaciones corresponden aquellas definidas por los nuevos candidatos analizados a partir de E15.5, utilizamos diversos marcadores específicos como POU4F1, que identifica el núcleo rojo y el colículo superior; ISL1, que nos muestra la localización del complejo oculomotor, y TH, que nos señala la posición de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta y el área tegmental ventral (ver esquema con las poblaciones características en Figura 5 H).

En el caso de los genes *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2*, comprobamos que nuestro postulado de que su expresión se restringe al complejo oculomotor era cierto, tal y como nos lo indica la localización de la proteína ISL1 (Figura 5 A-C).

Con respecto a los factores de transcripción que definían dos poblaciones basales discretas, *Npas1* y *Cplx1*, comprobamos que la población más cercana a la capa ventricular coincide con la del complejo oculomotor gracias a la localización de ISL1 (comparar Figura 5 A con Figura 5 D y E), mientras que el marcaje con POU4F1 nos permitió identificar la población más superficial en la capa del manto como el núcleo rojo (Figura 5 D y E). En el segundo grupo de factores de transcripción, vemos la localización de *Six3* en la formación reticular mesencefálica, así como su posible contribución a la sustancia negra pars reticulata, confirmando la identificación de este último núcleo por la presencia superficial de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, identificadas por la proteína TH (Figura 5 F). Por último, *Barhl1* se encuentra en dos poblaciones bien definidas de la región alar mesencefálica, que son: el colículo superior, coincidente con la presencia de POU4F1, y el núcleo del brazo conjuntivo del colículo inferior (BCI) (comparar Figura 5 D con Figura 5 G), mientras que su dominio de expresión en la placa basal no coincide con ningún marcador característico (Figura 5 G), situándose adyacente al complejo oculomotor.

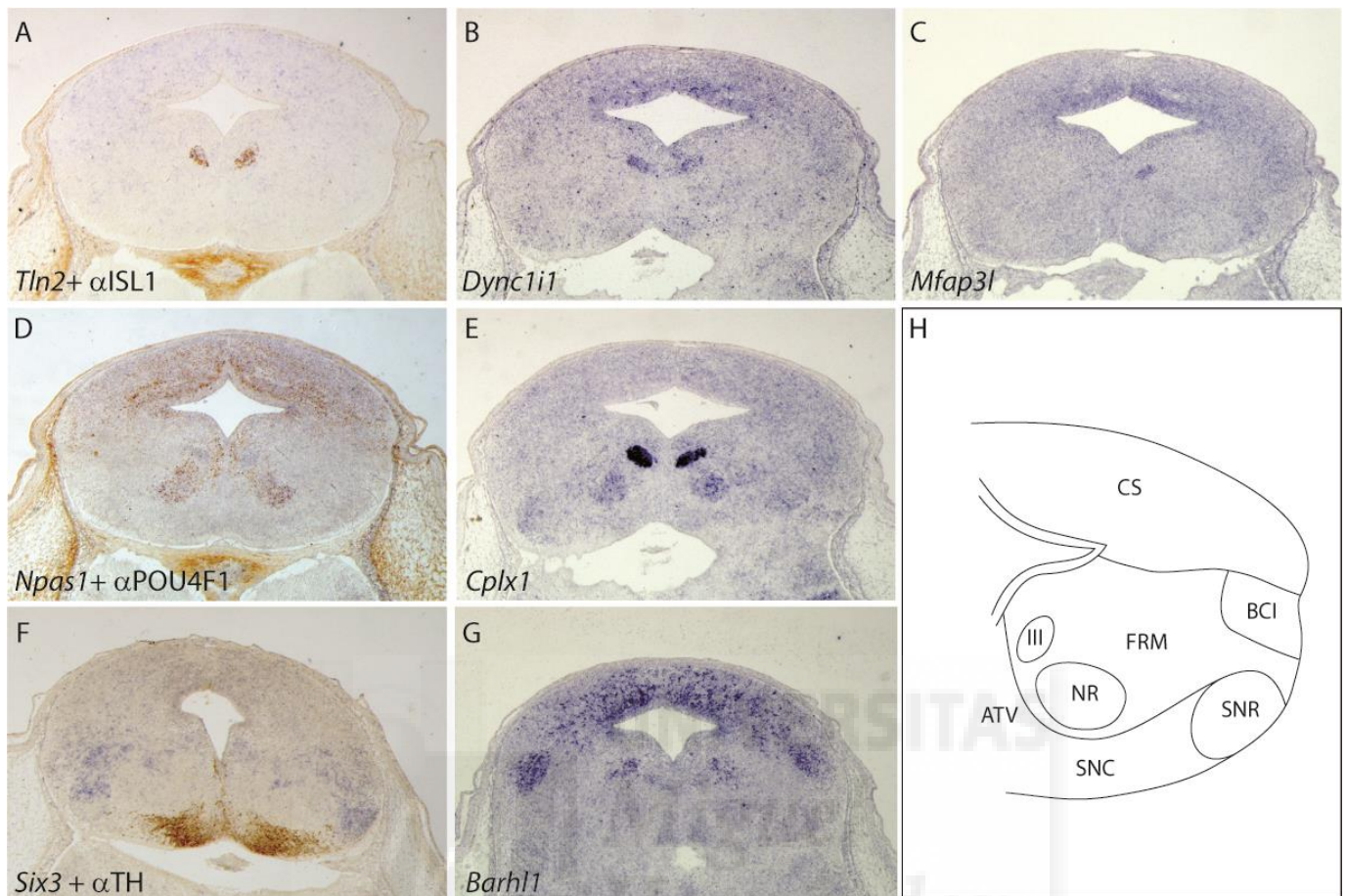


Figura 5. Caracterización de las poblaciones descritas por los nuevos genes y factores de transcripción candidatos a E15.5.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por hibridación *in situ* (A-G) e hibridación *in situ* más inmunohistoquímica (A, D y F). La expresión de los genes *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2* (A-C) define una población en la placa basal. Tras tomar como referencia la presencia de ISL1, marcador típico del complejo oculomotor, comprobamos que se trataba de esta población (A). *Npas1* y *Cplx1* definen dos poblaciones claras (D y E). La más pequeña y dorsal es idéntica a los genes anteriores (A-C) y corresponde por lo tanto con ISL1. Vemos cómo la población más grande y ventral coincide con POU4F1, corroborando que se trata del núcleo rojo (D). La disposición de la población dopaminérgica, junto con la expresión de *Six3*, nos muestra la expresión de este a lo largo de la formación reticular y su posible contribución a la sustancia negra pars reticulata (F). Por último, *Barhl1* únicamente coincide en la región alar con POU4F1 (D y G) mientras que su población basal no coincide con ningún marcador característico. El esquema muestra la localización de las diferentes poblaciones en un corte coronal del mesencéfalo a E15.5 (H). Abreviaturas: ATV, área tegmental ventral; BCI, brazo conjuntivo del colículo inferior; CS, colículo superior; FRM, formación reticular mesencefálica; NR, núcleo rojo; SNC, sustancia negra pars compacta; SNR, sustancia negra pars reticulata; III, complejo oculomotor.

2. Integración de los nuevos candidatos analizados en la vía de señalización de *Shh*

Shh, secretado por la placa basal y del suelo, es la molécula responsable de la regionalización de la zona ventral del tubo neural y, por lo tanto, de las poblaciones basales mesencefálicas. Nuestra intención es comprobar si nuestros nuevos candidatos seleccionados se encuentran integrados en esta importante vía de señalización. Para ello, utilizamos la cepa de ratones $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$, en la que se pierde esta vía de señalización de forma específica en el mesencéfalo. Esta pérdida de función nos permitirá comprobar si la expresión de estos genes es dependiente o no de *Shh*.

2.1. Alteración del dominio basolateral

Shh influye en la regionalización de todos los dominios de la placa basal y su ausencia genera una pérdida de especificación de estos territorios. Como se describió previamente, en este mutante condicional no se genera una completa ausencia de la placa basal (Perez-Balaguer et al., 2009). Por lo tanto, en este modelo nos queda un territorio basal que no ha sufrido una transformación en territorio alar pero que carece de la señalización de *Shh*. Este hecho nos permite comprobar el efecto de esta carencia sobre nuestros nuevos candidatos. Los dominios BL y BI se encuentran fuertemente afectados.

A E12.5, la expresión de *Nkx2.2* en el dominio BL y la presencia de PAX6 en la región más ventral del mismo están completamente ausentes, quedando únicamente la expresión de *Nkx2.2* en el dominio AVL (Figura 6 A y B). Esta fuerte afectación de la zona BL quedó confirmada por la pérdida de expresión de *Barhl1* en este mismo territorio (Figura 6 C y D).

A E15.5, *Barhlh1* mantiene su expresión en el colículo superior y en el núcleo del brazo conjuntivo del colículo inferior, mientras que el dominio ventral sigue sin ser detectado (Figura 6 E y F). Por otro lado, *Nhlh1*, que a E12.5 se expresa en todos los territorios del eje DV salvo en el BL, nos muestra, sin embargo, una expresión continua a lo largo de todo el eje DV (Figura 6 G y H); al igual que en el control, su expresión desaparece a E15.5.

Por último, *Six3* es el menos afectado a E12.5, ya que mantiene un patrón de expresión similar al presente en el control (Figura 6 I y J). A E15.5, se observa cierta desorganización de las neuronas *Six3* positivas, pero se mantiene un patrón de expresión similar al control (Figura 6 K y L).

Estos datos nos indican que el dominio BL, a pesar de ser el más alejado de la fuente de *Shh*, presenta una grave alteración mostrando así una gran sensibilidad a dicho morfogen, ya que en esta región se perturba la expresión de los marcadores estudiados y, con mucha probabilidad, se encuentra gravemente desorganizada o incluso ausente en este mutante condicional.



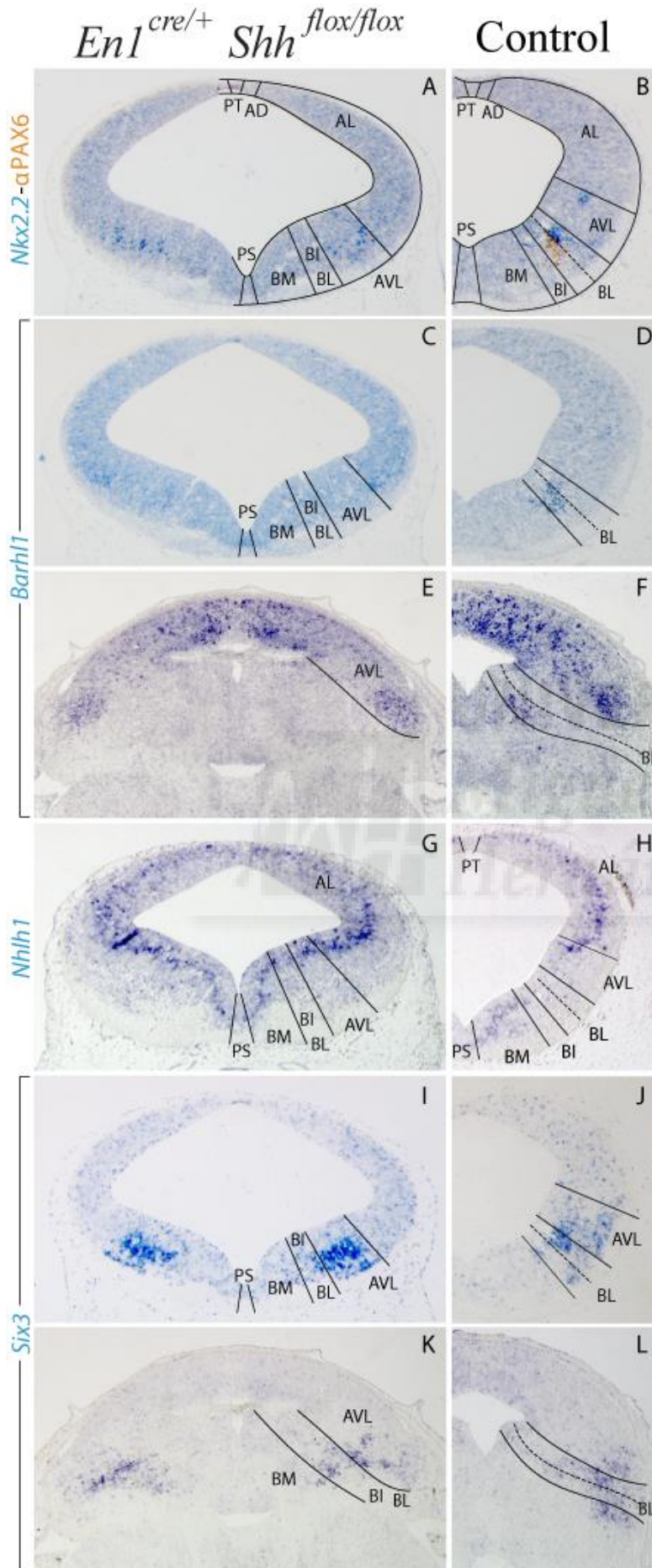


Figura 6. Alteración del dominio BL en ausencia de *Shh*.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones procesados por hibridación *in situ* más inmunohistoquímica (A y B) e hibridación *in situ* únicamente (C-L). La ausencia de *Shh* genera un fallo de ventralización en la placa basal, produciéndose a E12.5 la pérdida de PAX6 y *Nkx2.2* en el dominio BL, quedando únicamente *Nkx2.2* en el dominio AVL (A y B). La expresión de *Barhl1*, que a E12.5 coincide con PAX6 en la región ventral del dominio BL, también está ausente (C y D). A E15.5, *Barhl1* presenta su expresión normal en la región alar, mientras que la población que define en la zona del manto vuelve a estar ausente (E y F). *Nhlh1* presenta una expresión continua a lo largo del eje DV, incluyendo el dominio BL en ausencia de *Shh*, dominio que no presenta expresión en el control a E12.5 (G y H). *Six3* muestra una expresión similar en el mutante condicional y en el control, tanto a E12.5 (I y J) como a E15.5 (K y L). Abreviaturas: AD, alar dorsal; AL, alar lateral; AVL, alar ventrolateral; BI, basal intermedio; BL, basolateral; BM, basal medial; PS, placa del suelo; PT, placa del techo.

2.2 .Alteración del dominio basal medial

Ya se describió que en el dominio BM de este mutante condicional, se producía una pérdida total del complejo oculomotor mientras que el núcleo rojo se mantenía con cierto grado de desorganización (Perez-Balaguer et al., 2009).

La ausencia de las neuronas que conforman el complejo oculomotor provoca que no se detecte la expresión de los genes *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2*, que eran exclusivos de esta población. Por otro lado, los factores de transcripción *Cplx1* y *Npas1*, que se expresaban en el complejo oculomotor y en el núcleo rojo, muestran expresión a E15.5 exclusivamente en esta segunda población (Figura 7 A-D).

En este dominio nos encontramos poblaciones altamente sensibles a *Shh* (como el complejo oculomotor), mientras que otras parecen ser independientes en su especificación a esta vía de señalización, aunque no para su mantenimiento.

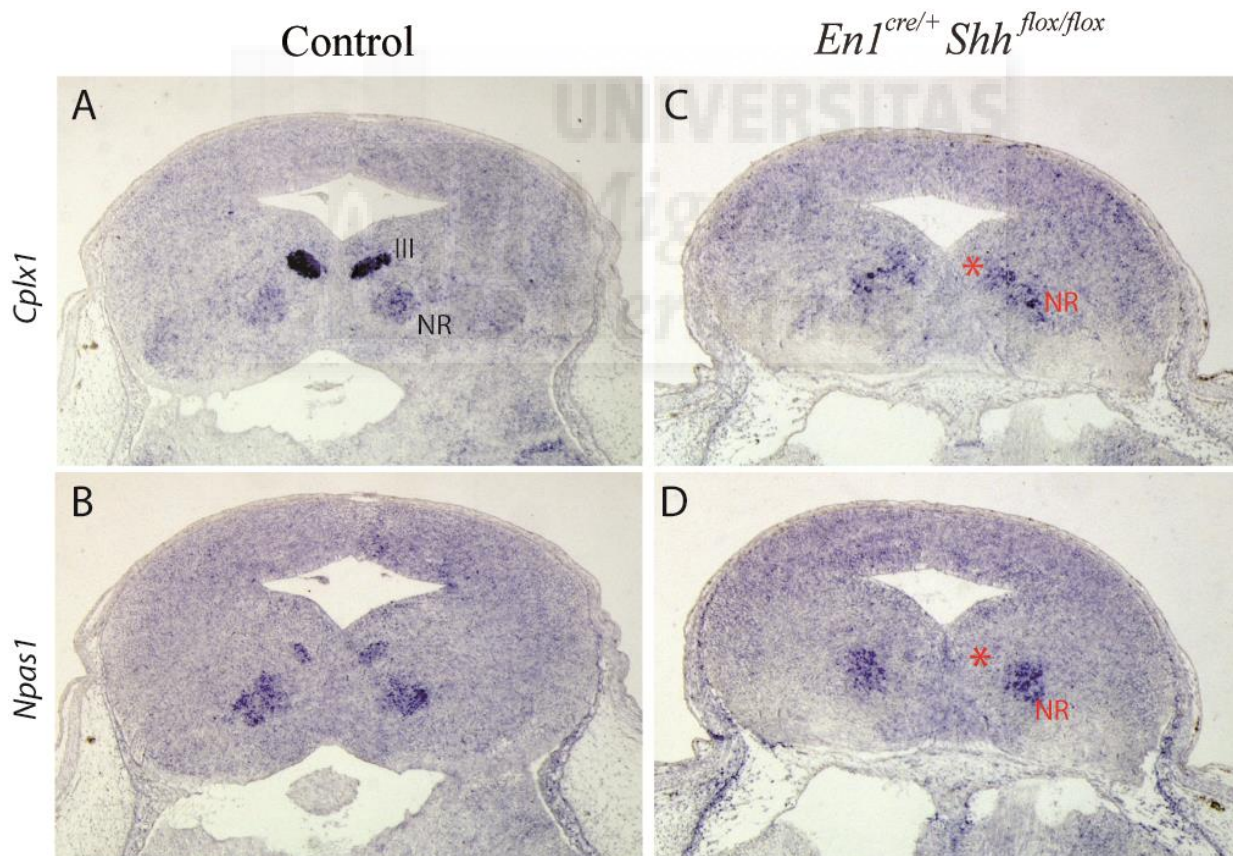


Figura 7. Alteración del dominio BM en ausencia de *Shh*.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por hibridación *in situ* (A-D). *Cplx1* (A) y *Npas1* (B) están presentes en el complejo oculomotor (III) y en el núcleo rojo (NR). En el mutante condicional, *Cplx1* (C) y *Npas1* (D) se pierden por completo en el complejo oculomotor (*) mientras que se mantienen en el núcleo rojo, aunque se aprecia una clara desorganización de este grupo de neuronas.

3. Integración de los nuevos candidatos analizados en la vía de señalización de *Pou4f1*

Pou4f1 es un factor de transcripción importante en la diferenciación y maduración del núcleo rojo. El hecho de que varios factores de transcripción analizados en apartados anteriores, mostraran un marcaje específico en núcleo rojo, nos llevó a comprobar su posible implicación en este programa de diferenciación neuronal. Para ello, estudiamos el desarrollo del núcleo rojo en ausencia de *Pou4f1* así como la expresión de los factores de transcripción *Cplx1* y *Npas1*, con el fin de comprobar su posible relación en esta vía de señalización neuronal.

3.1. Alteración en el desarrollo de núcleo rojo

En la región basal del mesencéfalo, *Pou4f1* es un marcador del núcleo rojo. Usando la línea transgénica *Pou4f1^{TauLacZ/+}*, en la que el ratón heterocigoto puede ser utilizado como control, ya que no presenta diferencia alguna con el fenotipo silvestre, pudimos comprobar a través del anticuerpo contra β -galactosidasa su especificidad en dicha población. Con el fin de establecer el periodo embrionario en el que realizar el estudio, decidimos comprobar la ventana de tiempo en la que se generan las neuronas del núcleo rojo. Para ello suministramos pulsos largos de BrdU a ratonas gestantes para realizar un mapa de destino de los neuroblastos en el estadio E15.5. En los embriones tratados a E9.5 no se detecta ninguna célula positiva en la región del núcleo rojo (Figura 8 A). En los estadios E10.5 y E11.5 es cuando se genera la totalidad del núcleo rojo (Figura 8 B y C), ya que a partir de E12.5 no se detecta ninguna neurona positiva en el territorio (Figura 8 D). Por lo tanto, a E12.5 ya se han generado los precursores neuronales del núcleo rojo.

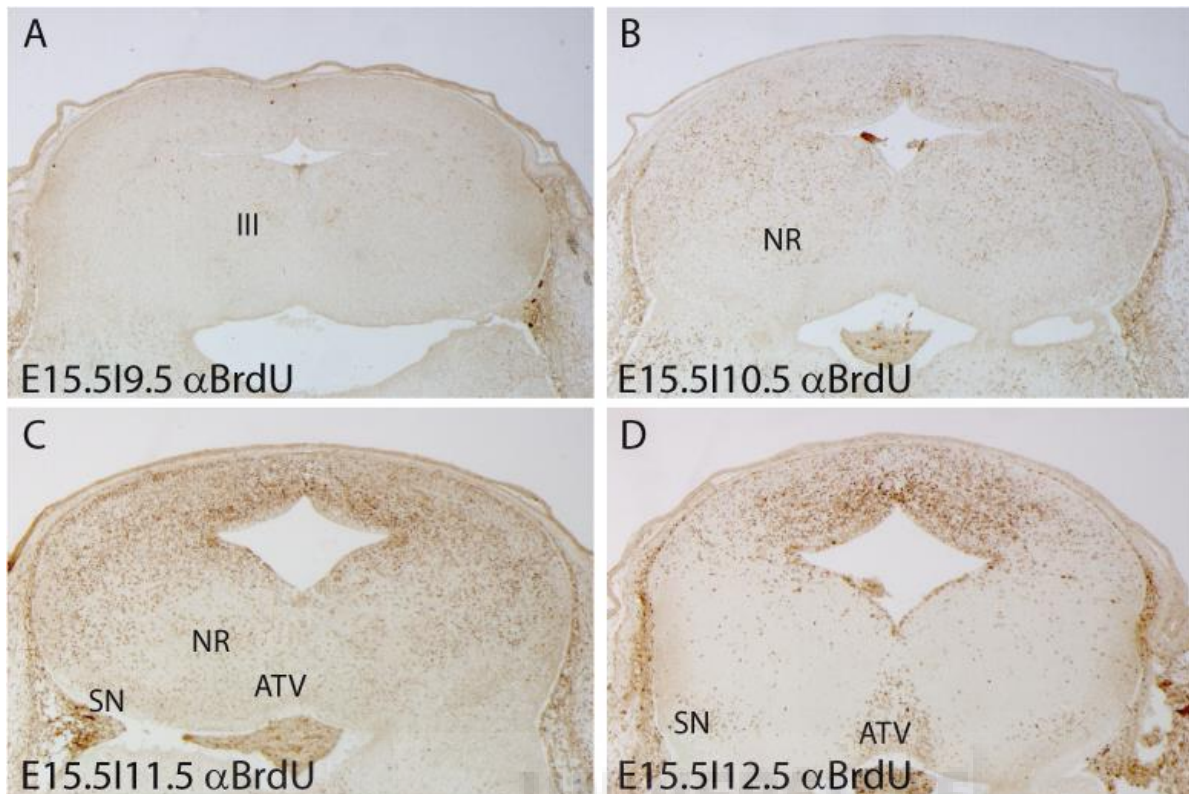


Figura 8. Mapa de destino de los neuroblastos a E15.5.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E15.5 procesados por inmunohistoquímica (A-D). Mediante inyecciones de BrdU a diferentes estadios, identificamos en qué momento del desarrollo se genera cada población basal del mesencéfalo. A E9.5 se generan las células que dan lugar al complejo oculomotor (A). A E10.5 vemos cómo aparecen las primeras células del núcleo rojo (B), que extienden su desarrollo hasta E11.5, donde coincide con el inicio de la sustancia negra y el área tegmental ventral (C). Estas dos últimas poblaciones terminan de desarrollarse a E12.5 (D). Abreviaturas: ATV, área tegmental ventral; NR, núcleo rojo; SN, sustancia negra; III complejo oculomotor.

En el control heterocigoto, a E12.5, se puede identificar el núcleo en la región ventral del manto (Figura 9 A) así como alguna célula que se encuentra migrando de forma radial desde la zona ventricular hasta su posición final (flecha en Figura 9 A). A este estadio también puede detectarse alguna fibra pionera del tracto rubroespinal (punta flecha en Figura 9 A). A E13.5, todas las neuronas del núcleo rojo pueden detectarse en su posición final formando un núcleo compacto (Figura 9 B) y se aprecia un denso grupo de axones en la línea media (punta flecha en Figura 9 B). Un día después, a E14.5, estos axones positivos cruzan la línea media generando la decusación tegmental ventral (Figura 9 C). Medial a la zona del complejo oculomotor, observamos una pequeña población positiva para β Gal que corresponde con el núcleo Edinger-Westphal (Figura 9 C). A E15.5, tanto el núcleo rojo como la primera porción del tracto rubroespinal están completamente desarrollados (Figura 9 D).

En el ratón mutante, a E12.5 la mayoría de células positivas se encuentran cercanas a la región ventricular (Figura 9 E), sin embargo, pueden detectarse los primeros axones para el tracto rubroespinal (punta flecha en Figura 9 E). A E13.5, el número de neuronas positivas en la región del manto se incrementa aunque se sigue observando algunas neuronas migrando desde la región ventricular (flecha en Figura 9 F). El tracto rubroespinal, al igual que en el control, se localiza en la línea media (punta flecha en Figura 9 F). A E14.5, la decusación tegmental ventral se observa de manera clara (punta flecha en Figura 9 G) mientras que el núcleo rojo sigue sin mostrar una apariencia compacta y el núcleo de Edinger-Westphal muestra un aspecto más denso (Figura 9 G). Por último, a E15.5, el núcleo rojo sigue mostrando una distribución neuronal más amplia si se compara con el control (Figura 9 H), sin embargo, la primera porción del tracto rubroespinal se genera de forma correcta sin observarse alteración aparente (punta flecha en Figura 9 H). Por lo tanto, las neuronas del núcleo rojo se especifican en ausencia de *Pou4f1* pero son incapaces de generar un núcleo organizado, aunque este hecho no provoca ninguna afectación en la primera porción del tracto rubroespinal.

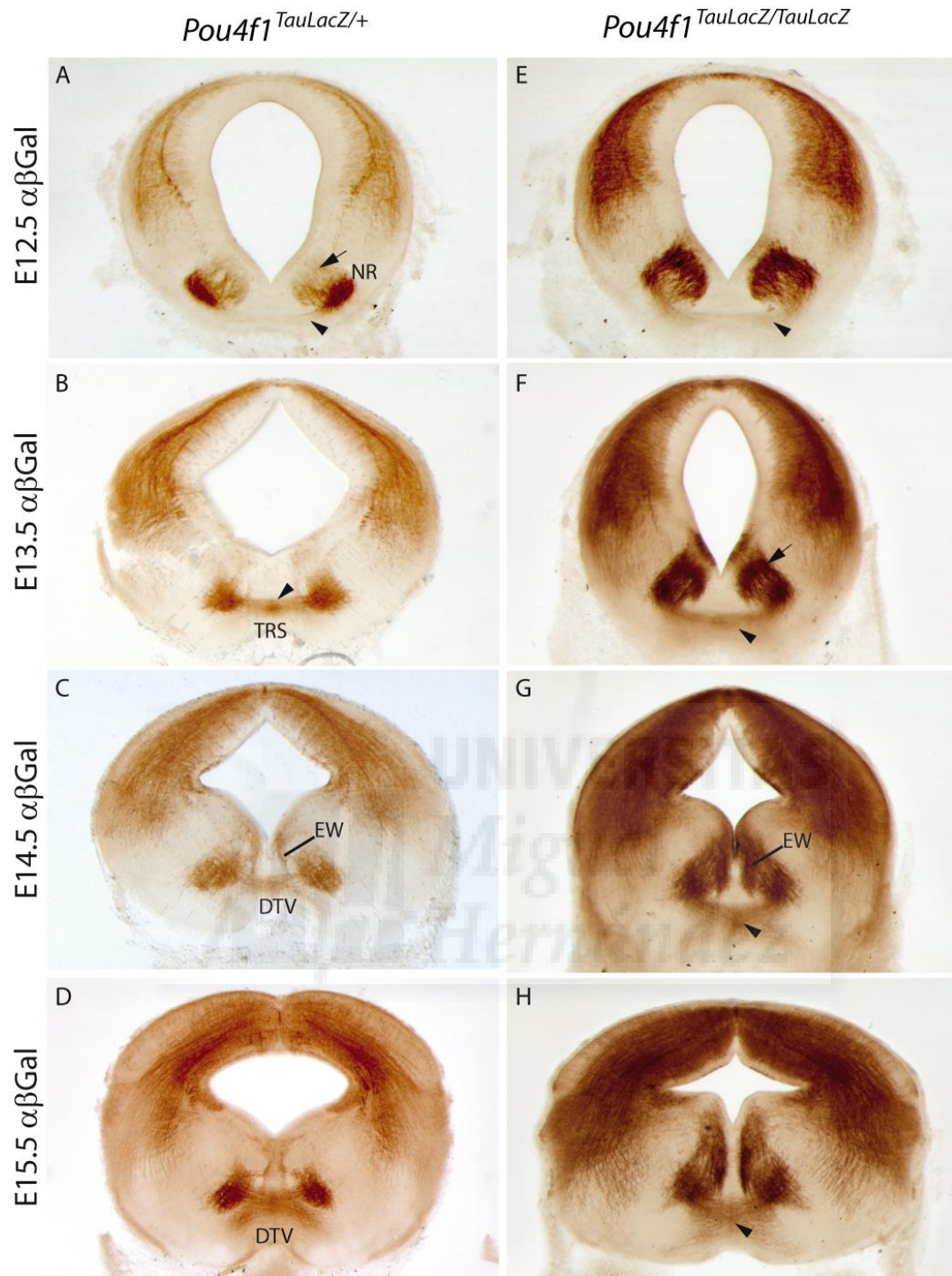


Figura 9. Desarrollo del núcleo rojo y su proyección a lo largo del desarrollo en ausencia de *Pou4f1*.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones procesados por inmunohistoquímica (A-H). Se ha estudiado el desarrollo del núcleo rojo y su proyección, desde E12.5 hasta E15.5, en controles heterocigotos (A-D) y mutantes (E-H). En ausencia de *Pou4f1*, el núcleo rojo se desarrolla de forma más lenta y las neuronas muestran una cierta desorganización espacial. La punta de flecha señala al tracto rubroespinal mientras que la flecha señala a las células migrando. Abreviaturas: DTV, decusación tegmental ventral; EW, núcleo de Edinger-Westphal; NR, núcleo rojo, TRS, tracto rubroespinal.

3.2. Defectos en la maduración del núcleo rojo.

Con el fin de analizar el desarrollo final del núcleo rojo y comprobar si *Cplx1* y *Npas1* se encuentran integrados en la cascada genética de *Pou4f1*, estudiamos su expresión en embriones nulos para *Pou4f1* (*Pou4f1^{TauLacZ/TauLacZ}*), analizando de forma independiente la región parvocelular y la región magnocelular, en el estadio final del desarrollo a E18.5. Utilizamos ChAT y TH para identificar el complejo oculomotor y las poblaciones dopaminérgicas, respectivamente.

La porción parvocelular del núcleo rojo, en la región diencefálica, es fácilmente identificable por la ausencia del complejo oculomotor (Figura 10 A). Las hibridaciones *in situ* para *Cplx1* y *Npas1* revelaron patrones de expresión diferentes. En el control heterocigoto, *Cplx1* se expresa de forma débil mientras que *Npas1* ya muestra una fuerte expresión (Figura 10 B y C). La sustancia negra pars reticulata, también resultó positiva en este nivel para *Npas1* (Figura 10 C) e identificamos su posición gracias a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (Figura 10 D). En el mutante, la región parvocelular del núcleo rojo aparece dispersa y más cercana a la línea media (Figura 10 E), los factores de transcripción, *Cplx1* y *Npas1* no se detectan en la región del núcleo rojo mientras que la sustancia negra pars reticulata se mantiene positiva para *Npas1* (Figura 10 F y G), localizando de nuevo dicha población por la expresión de TH en la sustancia negra pars compacta (Figura 10 H).

La región magnocelular del núcleo rojo se localiza en la placa basal del mesencéfalo y coincide con la expresión de ChAT, positivo para las motoneuronas del complejo oculomotor (Figura 11 A). En el control heterocigoto, la expresión de *Cplx1* en el núcleo rojo, es mucho más intensa que en la región parvocelular y el complejo oculomotor resulta también positivo (Figura 11 B). *Npas1*, también se expresa en ambas poblaciones (Figura 11 C). En el ratón mutante, se observa que las células del núcleo rojo son incapaces de agruparse formando una población compacta y aparecen mucho más dispersas que en el control, mientras que el complejo oculomotor no muestra alteración ninguna (Figura 11 D). *Cplx1* y *Npas1* se pierden por completo en esta región del núcleo rojo, sin embargo, la expresión en el complejo oculomotor se observa normal (Figura 11 E y F). Esta pérdida nos sugiere una posible alteración en los últimos pasos del desarrollo del núcleo rojo.

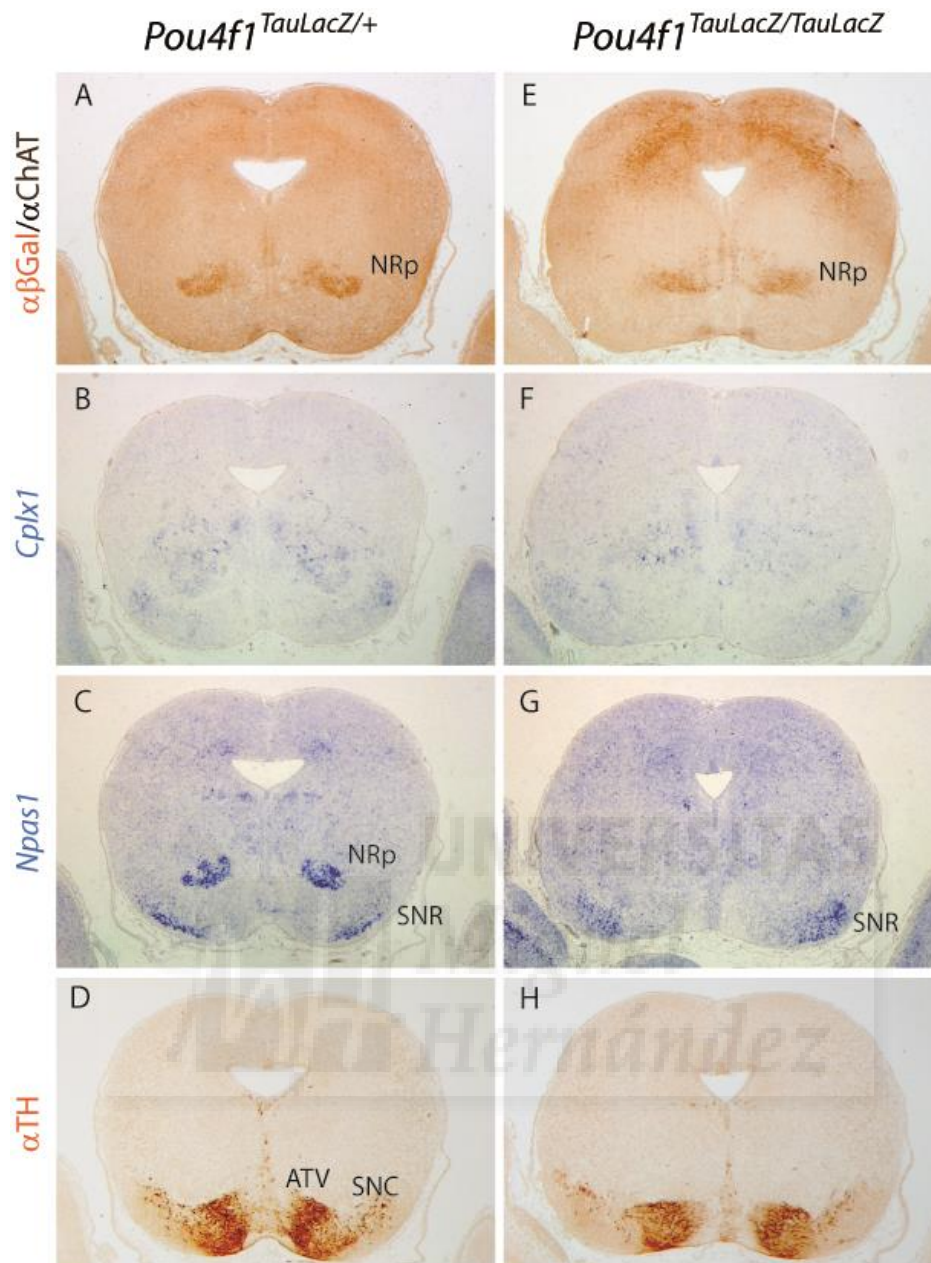


Figura 10. Desorganización del núcleo rojo parvocelular en ausencia de *Pou4f1*.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E18.5 procesados por inmunohistoquímica (A, D, E y H) y por hibridación *in situ* (B, C, F y G). Las células del núcleo rojo del ratón *Pou4f1*^{TauLacZ/TauLacZ} en la región diencefálica muestran una cierta desorganización frente al control heterocigoto *Pou4f1*^{TauLacZ/+} (A y E). La expresión de *Cplx1* es prácticamente nula en esta región en ambos ratones (B y F). *Npas1* muestra una clara expresión en la región parvocelular del núcleo rojo en el control *Pou4f1*^{TauLacZ/+}, así como en la sustancia negra pars reticulata (C). En el mutante *Pou4f1*^{TauLacZ/TauLacZ} está completamente ausente en el núcleo rojo, mientras que se mantiene en la sustancia negra pars reticulata (G). La expresión de TH en ambos ratones permanece invariable (D y H) y nos sirve de referencia para localizar la sustancia negra pars reticulata que marca la expresión de *Npas1*. Abreviaturas: ATV, área tegmental ventral; NRp, núcleo rojo parvocelular; SNC, sustancia negra pars compacta; SNR, sustancia negra pars reticulata; III, complejo oculomotor.

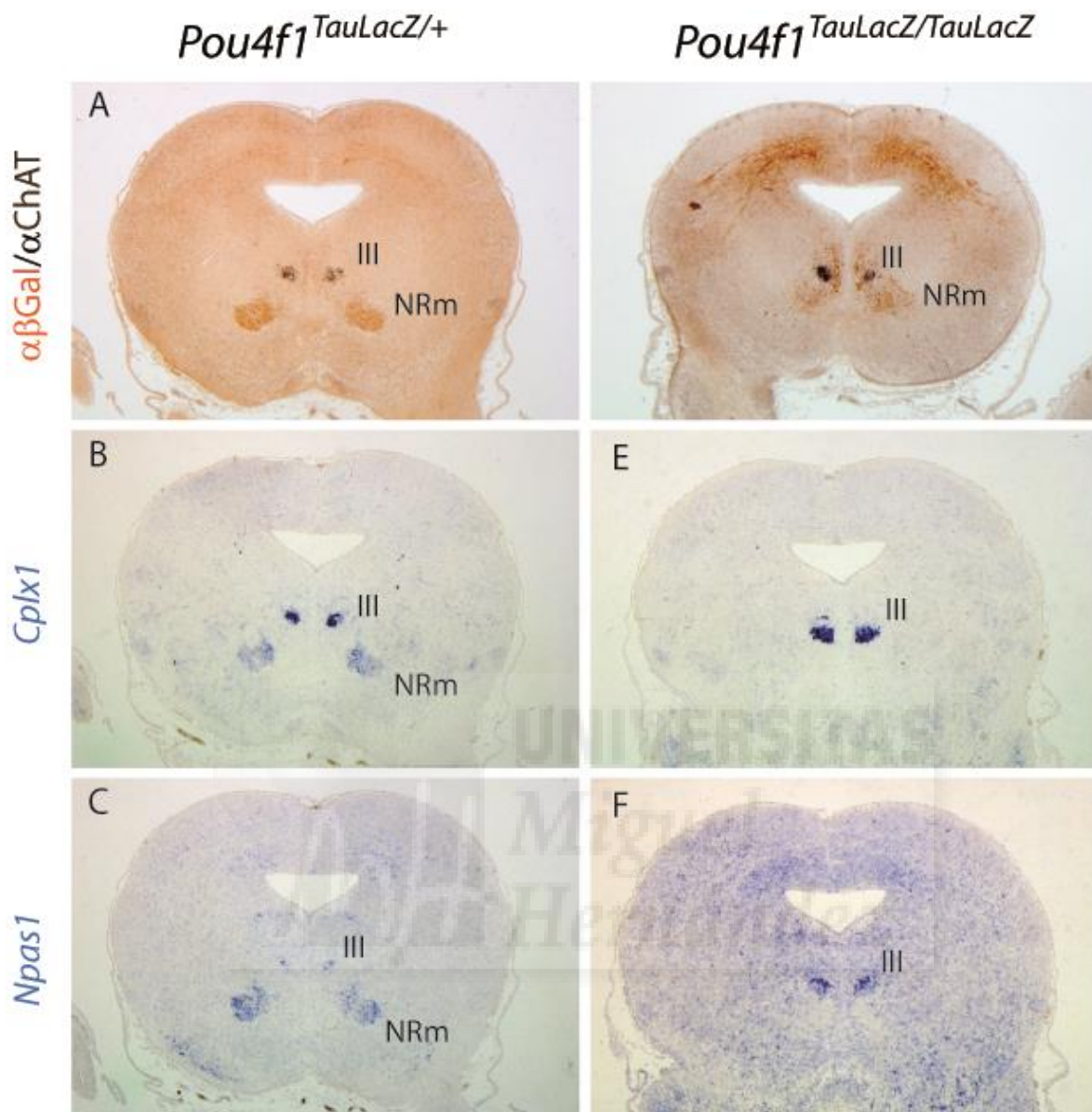


Figura 11. Desorganización del núcleo rojo magnocelular en ausencia de *Pou4f1*.

Cortes transversales de mesencéfalo de embriones a E18.5 procesados por inmunohistoquímica (A y D) y por hibridación *in situ* (B, C, E y F). La región magnocelular del núcleo rojo en el mutante *Pou4f1*^{TauLacZ/TauLacZ} presenta una desorganización mucho más acentuada que en el control heterocigoto, mientras que el complejo oculomotor permanece inalterado en ambos casos (A y D). *Cplx1* identifica claramente el complejo oculomotor y el núcleo rojo en el ratón *Pou4f1*^{TauLacZ/+} (B) mientras que en el ratón *Pou4f1*^{TauLacZ/TauLacZ} está completamente ausente en el núcleo rojo sin presentar cambios en el complejo oculomotor (E). *Npas1*, que identifica las mismas poblaciones que *Cplx1* en el control heterocigoto (C), sufre el mismo destino y desaparece por completo en el mutante sin apreciarse cambios en el complejo oculomotor (F). Abreviaturas: NRm, núcleo rojo magnocelular; III, complejo oculomotor.

3.3. Alteración del tracto rubroespinal

En la cepa *Pou4f1^{TauLacZ/TauLacZ}* se han descrito fallos de sinaptogénesis en inervación periférica del nervio trigémino (Eng et al., 2001). Esto nos hizo plantearnos el objetivo de comprobar la proyección rubroespinal a nivel medular en el ratón nulo para *Pou4f1*.

Ya hemos descrito antes en el apartado anterior que la primera porción del tracto rubroespinal se genera con normalidad en el control heterocigoto y el mutante. Tras decusar, el tracto desciende hacia la médula espinal por la región dorsolateral. En el control, a E15.5 el tracto es difícil de detectar a nivel cervical en la médula espinal (flecha en Figura 12 A). Un día después, a E16.5, el tracto se puede identificar de forma clara (flecha en Figura 12 B). Finalmente, a E18.5, se observa el tracto rubroespinal con un marcaje denso (flecha en Figura 12 C). En el mutante, a E15.5, el área esperada por la que desciende el tracto muestra un marcaje claro (seguramente por las dos copias para LacZ, flecha en Figura 12 D). A E16.5, la distribución de las fibras positivas para LacZ abarcan un espacio más amplio que en el control (flechas en Figura 12 E). Finalmente, a E18.5, se observa el tracto con una distribución irregular y un área de terminación axonal anómala (flecha en Figura 12 D). En resumen, la maduración alterada del núcleo rojo se traduce en una distribución anómala de la porción descendente del tracto rubroespinal.

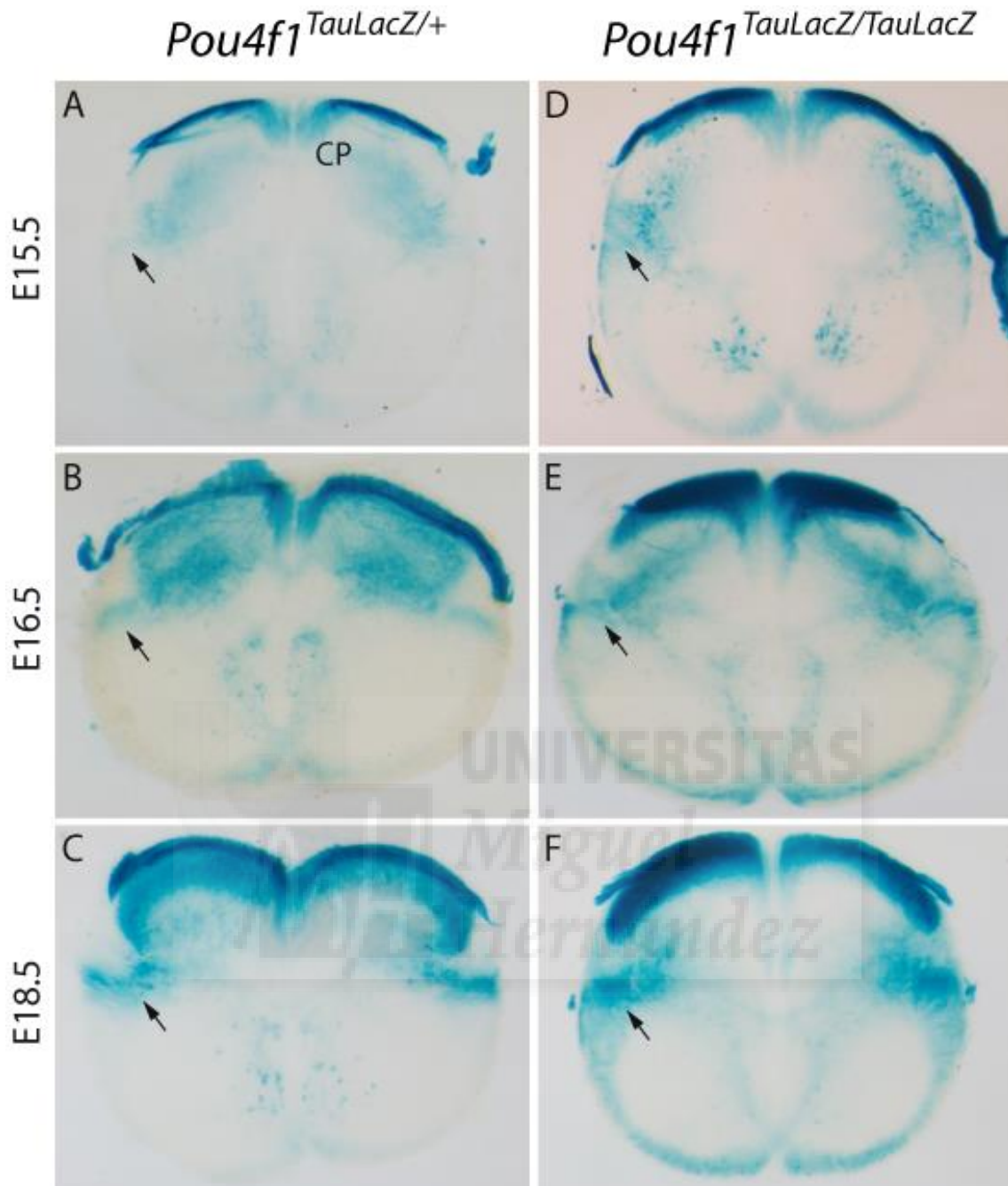


Figura 12. Proyección del tracto rubroespinal en la médula. Alteración en el crecimiento axonal por la falta de *Pou4f1*.

Cortes transversales de médula espinal a nivel cervical de embriones procesados por la tinción de X-gal (A-F). En el control, el tracto rubroespinal es prácticamente inapreciable a E15.5 (A), mientras que a E16.5 ya comienza a distinguirse (B) y a E18.5 muestra un aspecto mucho más denso y compacto (C). En el mutante, a E15.5 ya se observa un marcaje más fuerte (D). Tanto a E16.5 (E) como a E18.5 (F), el tracto muestra un aspecto claramente desorganizado, con una distribución irregular. Las flechas indican la posición del tracto rubroespinal. Abreviaturas: CP, cordones posteriores.



4. Desarrollo de la glía de Bergmann en ausencia de *Shh*

El desarrollo del cerebelo en ausencia de *Shh* genera una serie de malformaciones como la desorganización de las células de Purkinje o el deficiente desarrollo en las células de los granos y la glía de Bergmann (Dahmane & Ruiz i Altaba 1999). *Gdf10* en el cerebelo se expresa en la capa de Purkinje, pero su localización se restringe únicamente a las células de la glía de Bergmann (Koirala & Corfas 2010). Diferentes estudios han sugerido una regulación de *Gdf10* por parte de *Shh* (Gold et al., 2003; Rong et al., 2004; Wechler-Reya & Scott 1999). Con el fin de indagar en la relación entre *Shh* y *Gdf10*, en el siguiente apartado analizamos la expresión de *Gdf10* y de otros marcadores de glía en el mutante condicional $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$.

4.1. Reducción de la expresión de *Gdf10* en el mutante condicional $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$

Las células de Purkinje son las únicas neuronas en el cerebelo que expresan *Shh*, y por lo tanto, son una fuente de este morfogen (Wechsler-Reyna & Scott 1999). En el mutante condicional $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$, *Shh* se pierde por completo en el cerebelo y en una pequeña porción del plexo coroideo (Figura 13 A y B).

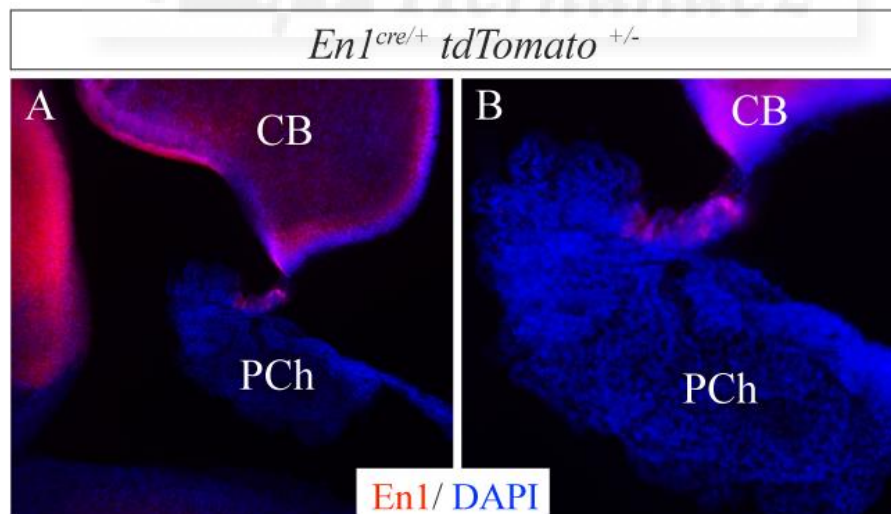
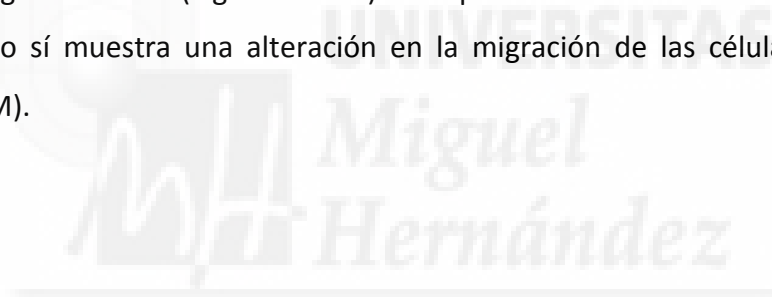


Figura 13. Inactivación de *Shh* en el dominio de expresión de *En1*.

Cortes sagitales de cerebros de embriones a E18.5 del ratón condicional $En1^{cre/+}$ cruzado con la línea reportera $tdTomato^{+/-}$. Esto nos permite identificar el dominio de expresión de *En1* por la presencia de la proteína fluorescente Tomato. Este dominio incluye por completo el cerebelo (A) y una pequeña porción del plexo coroideo adyacente al cerebelo (B). Este marcaje nos indica la región donde se va a inactivar *Shh* en el mutante condicional. Abreviaturas: CB, cerebelo; PCh, plexo coroideo.

Shh se expresa en las células de Purkinje a partir de E17.5 (Corrales et al., 2004; Dahmane & Ruiz i Altaba 1999; Lewis et al., 2004). Justo un día después, a E18.5, es cuando empiezan a observarse las diferencias en la expresión de *Gdf10* entre el control y el mutante condicional (Figura 14). En el mutante condicional, la expresión de *Gdf10* está claramente reducida, siendo mucho más evidente en la región medial (Figura 14 A, C, E, G, I, y L) que en la región lateral (Figura 14 B, D, F, H, K y M). A pesar de ello, una ligera expresión se mantiene en el mutante condicional con un patrón similar al control en ambas regiones (flechas en Figura 14 C, D, H, L y M).

Con el fin de dilucidar si la disminución de *Gdf10* tiene alguna influencia sobre las células de la glía o las células de Purkinje, se estudió la expresión de marcadores típicos de estas poblaciones como NESTINA y VIMENTINA para las células de la glía y de CALBINDINA para las células de Purkinje. Sorprendentemente, la expresión de NESTINA y VIMENTINA no presentó cambios importantes, aunque sí alguna ligera alteración en el perfil de algunas células (Figura 14 A-H). La expresión de CALBINDINA tampoco se ve afectada pero sí muestra una alteración en la migración de las células de Purkinje (Figura 14 I-M).



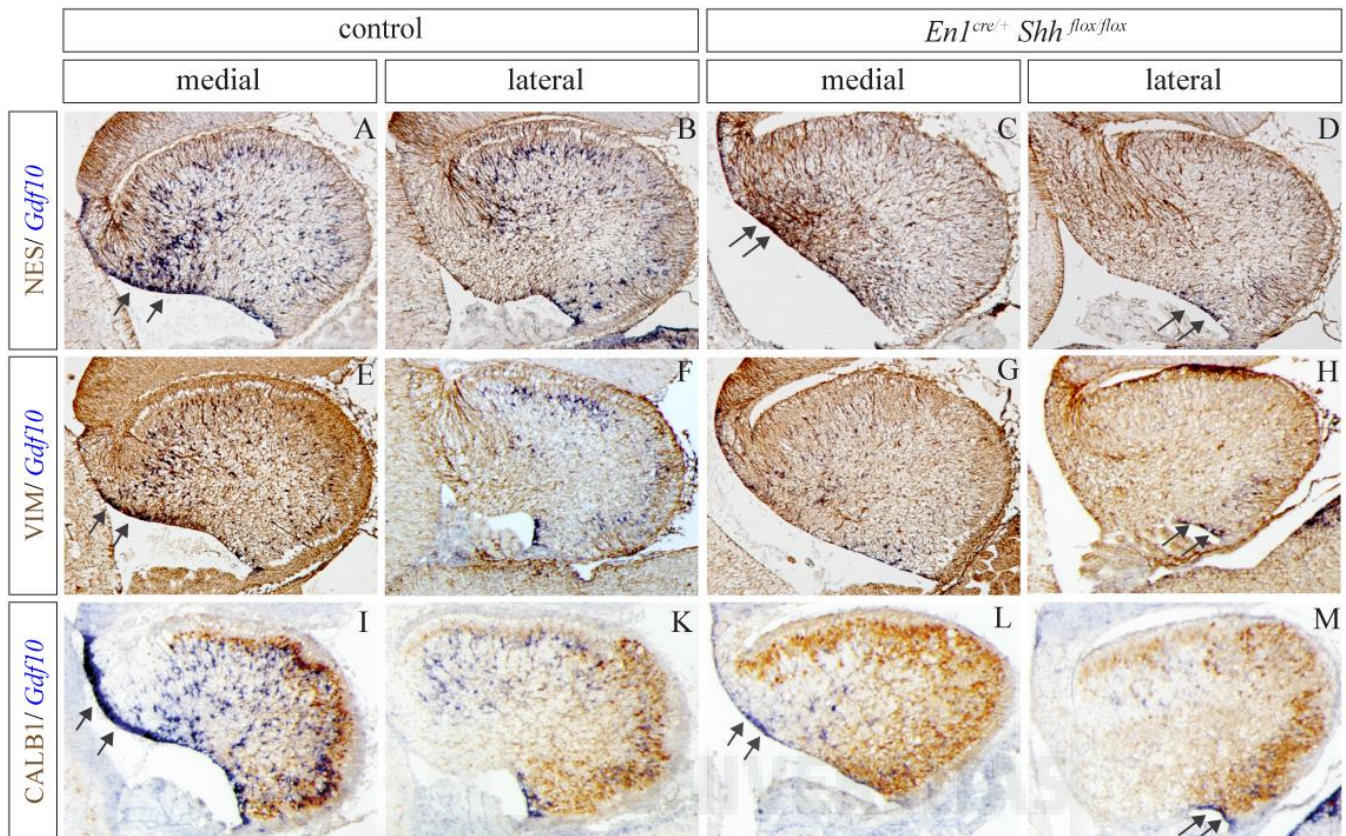


Figura 14. Disminución en la expresión de *Gdf10* en el mutante condicional *En1^{cre/+}; Shh^{flox/flox}*.

Cortes sagitales de cerebelos de embriones a E18.5 del ratón control y condicional *En1^{cre/+}; Shh^{flox/flox}* procesados por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (A-M). La expresión de *Gdf10* es mucho más fuerte en la zona ventricular de la línea media (A, E e I) que en la región lateral (B, F y K). En el mutante condicional la expresión de *Gdf10* está claramente reducida, pero no se pierde por completo (C, D, G, H, L y M). La expresión se mantiene en la zona ventricular adyacente al labio rómbico (flechas en D, H, M), así como en una pequeña área de la línea media en la zona ventricular (flechas en C y L). Esta zona es la misma que muestra una alta expresión en el control (flechas en A, E e I). Por el contrario, los marcadores característicos de la glía, NESTINA y VIMENTINA no presentan cambio alguno (A-H). La distribución de CALBINDINA en las células de Purkinje no muestra alteración (I-M), aunque pone de manifiesto una migración alterada de esta población en el mutante condicional (L y M).

Para comprobar de forma más precisa los datos obtenidos con las técnicas de hibridaciones *in situ* e inmunohistoquímica, realizamos un estudio de PCR cuantitativa para *Gdf10*, *Nestina* y *Vimentina* en cerebelos de E18.5. Para ello, cada cerebelo se diseccionó en 5 partes, siendo las regiones más laterales X1 y X5, las regiones intermedias X2 y X4, y la región medial X3 (Figura 15 A).

El análisis global (X1-X5) de la expresión de ARNm confirmó una disminución significativa en la expresión de *Gdf10* en los mutantes condicionales en comparación con los controles, mientras que los niveles de ARNm de *Nestina* y *Vimentina* no presentaron cambios (Figura 15 B). Para concretar con más detalle analizamos de forma individual cada región del cerebelo (X1, X2, X3, X4 y X5) y los resultados obtenidos coincidieron con las hibridaciones *in situ* e inmunohistoquímica, donde la expresión de *Gdf10* es mayor en la zona medial con respecto a las otras regiones. Esto se mantiene también en los mutantes condicionales, donde, a pesar de la falta de SHH, la expresión de *Gdf10* está significativamente reducida pero aún presente, mostrando el mismo patrón que en el control en la región medial y lateral (Figura 15 C).

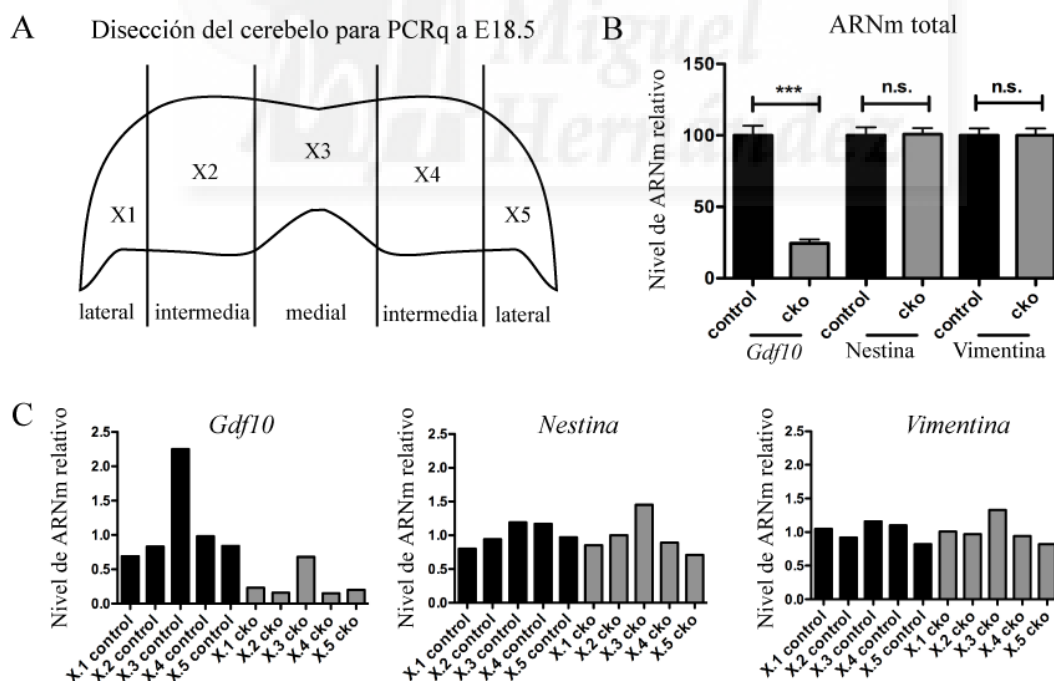


Figura 15. Cuantificación de la expresión de *Gdf10*, *Nestina* y *Vimentina* en el mutante condicional $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$.

Cuantificación de los diferentes marcadores por PCR cuantitativa a E18.5. Para la cuantificación, cada cerebelo fue diseccionado en cinco partes (A). Un análisis global del total de ARNm reveló una fuerte disminución de la expresión de *Gdf10* en el mutante condicional, mientras que los niveles de *Nestina* y *Vimentina* permanecen

equivalentes (B). De forma individual, de lateral a medial, volvemos a ver una clara disminución de *Gdf10* en el mutante condicional aunque se mantiene la tendencia de una mayor expresión en la línea media respecto a la zona lateral (C).

Por otro lado, los niveles de ARNm de *Nestina* y *Vimentina* siguen sin variación ninguna a nivel latero-medial (X1-X5), tanto en el control como en el mutante condicional (C).

Por último, decidimos estudiar si estas alteraciones de *Gdf10* se observan también en estadios postnatales. A P7, se observó un gradiente rostro-caudal (hablando en términos fenotípicos), siendo más severo en la zona rostral y relativamente más leve en la zona caudal. En la zona rostral, los defectos en foliación acompañan a una expresión alterada de CALBINDINA, NEUN y GFAP y una reducción de *Gdf10* (Figura 16 A-H). En la región caudal se observan unos defectos en la foliación más suaves, al igual que ocurre en la expresión de los marcadores anteriormente mencionados. Además, la expresión de *Gdf10* en esta zona caudal no está tan afectada como en la zona rostral del cerebelo. A pesar de ello, incluso en la zona menos afectada, ni las células de Purkinje ni la glía de Bergmann son capaces de organizarse en su monocapa correspondiente (Figura 16 A, B, E, y F) y la falta de SHH producido por las células de Purkinje afecta a su vez a la proliferación de los granos (Figura 16 C y D), previamente descrita. Este posible fenotipo rostro-caudal puede deberse a la secreción de SHH en el plexo coroideo del rombencéfalo que reparte dicha proteína transventricularmente a través del líquido cefalorraquídeo (Huang et al., 2009, 2010).

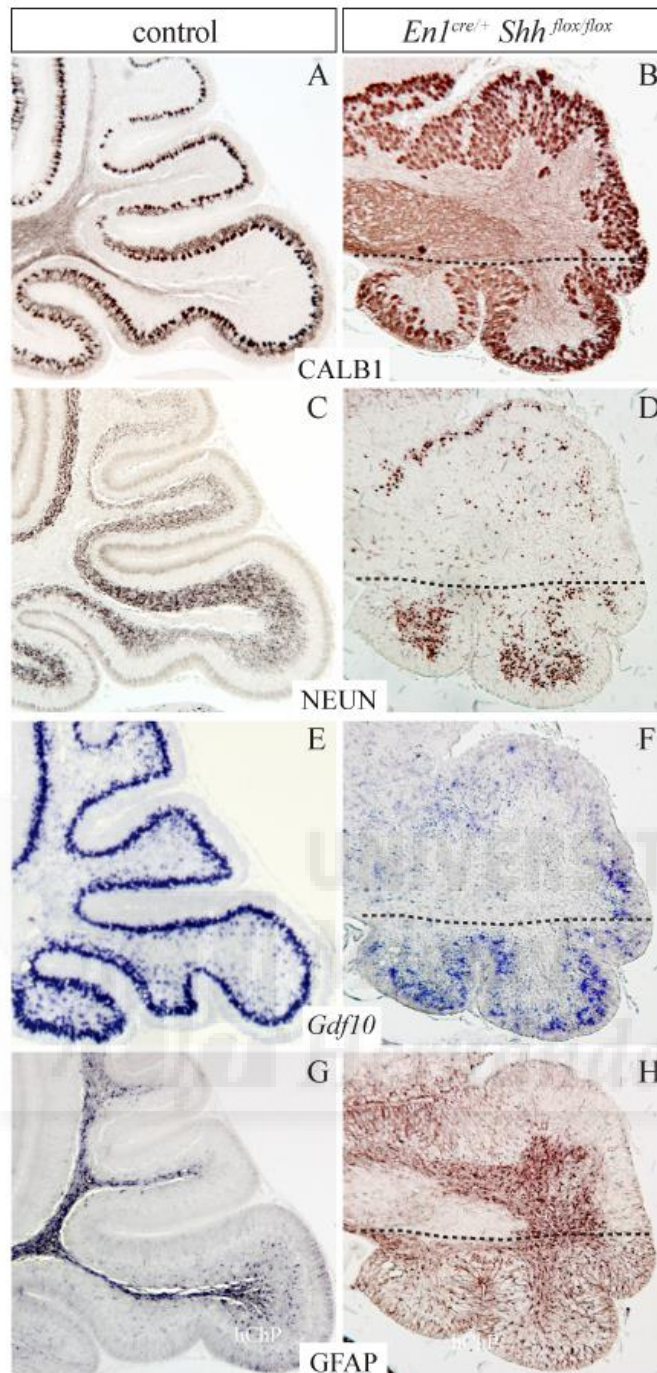


Figura 16. Fenotipo rostro-caudal del cerebelo en el mutante condicional *En1^{cre/+}; Shh^{flox/flox}*.

Cortes sagitales de cerebelos de ratones postnatales a P7 del ratón control y condicional *En1^{cre/+}; Shh^{flox/flox}* procesados por inmunohistoquímica (A-D, G y H) e hibridación *in situ* (E y F). La distribución de CALBINDINA muestra una desorganización de las células de Purkinje frente al control (A y B). La falta de SHH genera una alteración clara en la proliferación y migración de las células de los granos, como nos muestra el marcaje con NEUN (C y D). La expresión de *Gdf10* está disminuida en la glía de Bergmann del mutante condicional (E y F), así como la distribución de GFAP (G y H). La línea de puntos marca la clara diferencia fenotípica rostro-caudal en el mutante condicional (B, D, F y H) por el posible efecto de la proteína SHH liberada en el ventrículo por el plexo coroideo.

V. DISCUSIÓN





1. Distribución del patrón de expresión de los nuevos candidatos en la placa basal del mesencéfalo durante el desarrollo

El tubo neural presenta un claro patrón DV que se ha ido subdividiendo gracias al estudio de diferentes patrones de expresión que han permitido una mejor caracterización de los dominios alar y basal (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Puelles et al., 2012). En el presente trabajo nos propusimos estudiar en diferentes estadios del desarrollo embrionario de los patrones de expresión de una serie de nuevos candidatos, incluyendo genes que codifican proteínas con funciones diversas y factores de transcripción, que nos permitieran contribuir a seguir indagando en la complejidad del eje DV, concretamente en la región basal. Esta región presenta cuatro subdominios, la placa del suelo y las zonas BM, BI y BL.

Tras realizar las hibridaciones *in situ* pertinentes para los genes que codifican para proteínas diversas, *Dync1i1*, *Klhdc8a*, *Mfap3l* y *Tln2*, vemos que a E12.5 es poca la información que obtenemos de *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2*, pues presentan un tenue patrón de expresión en la región del manto, lo que nos sugiere que es a partir de este estadio cuando dichos genes comienzan a iniciar su actividad. Sin embargo, *Klhdc8a* es el único que a E12.5 presenta una fuerte expresión en la región peri-ventricular. Cuando avanzamos en el desarrollo hasta E15.5 ocurre totalmente lo contrario: *Klhdc8a* pierde por completo su expresión y son *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2* los que muestran por igual una clara expresión en una población bien definida del manto. Al caracterizar esta población vemos como estos tres genes coinciden con la localización de ISL1, un marcador típico del complejo oculomotor. *Dync1i1* codifica una proteína que forma parte de un complejo de proteínas citoplasmáticas implicadas en el transporte axonal a lo largo de los microtúbulos (Banks et al., 2011); *Mfap3l* expresa una proteína transmembrana con un dominio intracelular SH3, homólogo a PIK3 y por lo tanto implicado en esta vía de transducción de señal (Kang et al., 2008), y *Tln2* codifica una proteína citoplasmática que media en la afinidad de las integrinas por su ligando, estando implicada en la unión de las integrinas a la actina citoplasmática así como a la matriz extracelular (Debrand et al., 2008).

Por lo tanto, podemos definir tres nuevos marcadores para esta población y conociendo la función de estas proteínas, pensamos que podrían intervenir en el mantenimiento y correcto funcionamiento del complejo oculomotor una vez diferenciada justificando su expresión tardía expresión a E15.5.

Con respecto a *Klhdc8a*, codifica una proteína con dominio Kelch que interviene en diversas funciones, siendo una de ellas la migración celular (Gupta & Beggs 2014), por lo que su expresión temprana y posterior desaparición puede deberse a que intervienen en dicho proceso, a E12.5, en el que los progenitores neuronales están proliferando y comienzan a migrar a sus posiciones finales.

Por otro lado, los factores de transcripción mostraron una complejidad diversa por lo que fueron separados en dos grupos. Uno de ellos incluye a *Cplx1* y *Npas1*, dos factores de transcripción que a E15.5 marcan por igual dos poblaciones bien definidas en el manto, las cuales, tras caracterizar, observamos que localizan con dos marcadores típicos de poblaciones basales mesencefálicas: por un lado, ISL1, que corresponde con el complejo oculomotor y, a su vez, con los tres genes que codifican para proteínas diversas que vimos con anterioridad; y por otro lado con POU4F1, que corresponde con el núcleo rojo, con lo que volvemos a mostrar dos nuevos marcadores comunes para definir estas poblaciones basales. Sin embargo, a E12.5, es únicamente *Cplx1* el que presenta una discreta expresión en la zona del manto de la región BM. *Cplx1* codifica para la isoforma 1 de las complexinas, unas proteínas reguladoras, pequeñas y solubles que se unen de forma reversible al complejo SNARE, jugando un papel importante en regular la liberación de los neurotransmisores (Glynn et al., 2005; Kielar et al., 2012; Gispert, et al., 2014). *Npas1* codifica un factor de transcripción con acción represora (Teh et al., 2006) y se ha sugerido que está implicado en el cambio de un ambiente proliferativo a uno diferenciativo por la regulación a la baja que induce en la expresión de la eritropoyetina (Ohsawa et al., 2005). El conocimiento de los procesos en los que intervienen estos factores de transcripción nos hace suponer que su papel a E15.5 es actuar en la maduración de dichas poblaciones y generar una correcta sinaptogénesis de estas con sus dianas. Con respecto a la función de *Cplx1* a E12.5, puede deberse a que, debido a la naturaleza de

este factor de transcripción, intervenga en algún proceso temprano de exocitosis/endocitosis.

El segundo grupo de factores de transcripción está formado por *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3*, cuya expresión a E12.5 y E15.5 es mucho más diversa que en el grupo anterior. *Barhl1* se expresa a lo largo de discretos dominios del sistema nervioso. En el mesencéfalo a E12.5 podemos ver marcaje en una pequeña región de la zona BL. Esta zona colindante con la región alar es la que presenta una mayor complejidad ya que, a su vez, se subdivide en una zona más alar GABAérgica y una zona más ventral glutamatérgica (Kala et al., 2009), y es en esta última subregión donde *Barhl1* co-expresa con PAX6 definiendo la región glutamatérgica de la zona BL. En el cerebelo, *Barhl1* se expresa en las células de los granos que se encuentran migrando y que posteriormente darán lugar a la capa granular externa, momento en el que vuelven a co-expresar con PAX6, implicado en la correcta migración de estas neuronas (Engelkamp et al., 1999). Esto nos podría hacer pensar que ambos tienen una relación directa pero, a pesar de ello, se ha sugerido que son independientes (Landsberg et al., 2005), por lo que *Barhl1*, implicado en generar este subtipo específico de progenitores neuronales en el cerebelo, debe estar actuando por otras vías como, por ejemplo, regulando la expresión de NT-3, controlando así la migración y supervivencia de dichos progenitores (Bulfone et al., 2000; Li et al., 2004; Lopes et al., 2006). El hecho de que en el mesencéfalo a E12.5 se dé una situación similar donde co-expresa con PAX6, sugiere que también debe estar implicado en la migración y supervivencia de la subpoblación glutamatérgica que se está generando de forma temprana en esta región BL.

A E15.5 la expresión de *Barhl1* se expande en la zona alar, incluyendo el colículo superior y una población que, si atendemos a su localización, corresponde con el núcleo del brazo conjuntivo del colículo inferior. En este caso, *Barhl1* vuelve a tener el mismo papel en el mantenimiento y supervivencia, aunque no en la diferenciación, de una gran población neuronal del colículo superior (Li & Xiang 2006). Con respecto a su expresión a E15.5 en la zona basal, vemos que es mucho más discreta que en la región alar, reduciéndose a una pequeña población adyacente al complejo oculomotor. *Nhlh1* presenta una expresión completamente diferente a *Barhl1*. A E12.5 se expresa en toda

la región alar y en la mayoría de la región basal, a excepción de la zona BL, y a E15.5 pierde por completo su expresión. *Nhlh1* se restringe a las jóvenes neuronas postmitóticas que acaban de abandonar la capa ventricular, lo que sugiere que está implicado en prevenir la vuelta al ciclo celular. Además también interviene en procesos de migración (Li et al., 1999), tal y como ha sido descrito durante la formación los núcleos pontino y reticulotegmental (Schmid et al., 2007). El hecho de que la expresión en el mesencéfalo a lo largo del eje DV sea tan extensa durante el desarrollo a E12.5 y que acabe desapareciendo a E15.5 puede deberse a que, por sus funciones descritas, esté implicado en generar un ambiente propicio para la correcta diferenciación y migración de los precursores neuronales.

Por último, *Six3* a E12.5 se expresa en la zona de transición alar-basal, abarcando la zona AVL y BL. Este factor de transcripción es uno de los marcadores del linaje GABAérgico que se expresa tras la activación de *Gata2* (Virolainen et al., 2012), lo que nos indica que su presencia en estas dos regiones, siendo ambas nichos GABAérgicos (Kala et al., 2009), evidencia un importante papel en el desarrollo de este tipo neuronal. A E15.5 su expresión continúa, aunque reside únicamente en la formación reticular de la zona basal, ocupando gran parte del manto. En este estadio es posible que siga regulando parte del desarrollo de alguna de las poblaciones GABAérgicas que se encuentran en la zona basal, como el núcleo pararrubral o la sustancia negra pars reticulata (Moreno-Bravo et al., 2012).

2. Integración de los nuevos candidatos en la vía de señalización de *Shh*

Shh es uno de los morfógenos más importantes secretados por la placa del suelo y la placa basal que influye en la ventralización del mesencéfalo. Todos los nuevos candidatos analizados fueron seleccionados por presentar expresión en la región ventral. Con el fin de desvelar si alguno de nuestros candidatos están regulados, de forma directa o indirecta por *Shh*, hicimos uso de la cepa transgénica *En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}*, en la que la placa basal mesencefálica está fuertemente afectada (Perez-Balaguer et al., 2009).

Uno de los aspectos más evidentes en la pérdida de identidad de la placa basal en ausencia de *Shh* es la alteración de los dominios BI y BL, que se hace patente en la modificación de los patrones de expresión de *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3* entre el mutante condicional y el control. La población glutamatérgica de la zona más ventral de la región BL que definía *Barhl1* a E12.5 está totalmente ausente. Hay que recordar que esta población co-expresaba con PAX6, que también desaparece por completo. A E15.5, la expresión de *Barhl1* en la zona alar permanece intacta, cosa que era de esperar, pues la pérdida de *Shh* no debería afectar a este dominio. Sin embargo, la pequeña población que se observa en el control en la zona basal no aparece en el mutante. Es posible que esta población se genere a partir de aquella que ya aparecía positiva para *Barhl1* a E12.5, por lo que su ausencia parece evidente. En el caso de *Nhlh1* ocurre lo contrario. Este factor de transcripción en el control aparece positivo a lo largo del eje DV, a excepción de la zona BL. En el mutante condicional la expresión muestra un continuo a lo largo del eje DV, incluyendo el dominio BL, lo que indica de nuevo una clara pérdida de identidad en esta región. Con respecto al dominio de expresión de *Six3*, el mutante condicional muestra a E12.5 un patrón de expresión similar al control, aunque parece algo más compacto. Esto puede deberse a que la expresión es la misma pero, debido al menor desarrollo de la zona ventral, las células positivas quedan confinadas en un espacio menor. A E15.5 puede parecer que hay cierta desorganización en las neuronas *Six3* positivas, aunque seguramente vuelva a deberse a la localización de las mismas en una región completamente desorganizada.

El hecho de que *Six3* sea el que menos afectado aparece de los tres, podría deberse al papel que ejerce este sobre el desarrollo de las poblaciones GABAérgicas del mesencéfalo, las cuales se generan a partir de progenitores neuronales que no son positivos para *Shh* (Joksimovic et al., 2009). Por lo tanto, las diferencias que vemos entre la expresión en el control frente al mutante condicional muestran una clara alteración y pérdida de identidad de los dominios basales. Los dominios BI y BL son las más dorsales en el dominio basal y se podría pensar que la pérdida de *Shh* les debería afectar en menor medida, ya que este se secreta desde la placa del suelo y la placa basal en forma de gradiente. Gracias a *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3*, que por su expresión definen bastante bien estas regiones, vemos que no es así y que, al igual que el resto, sufren una grave alteración. Tras ver la expresión en el mutante condicional llegamos a la conclusión de que ambos dominios, BI y BL, quedan mal especificadas por la falta de *Shh*, combinándose ambas en un único dominio alterado.

Dejando a un lado el desarrollo de los diferentes dominios DV y centrándonos en el desarrollo de las poblaciones de la región BM, se pensaba que todas ellas deberían ser dependientes de *Shh*, aunque se ha visto que no es así y se postula algún mecanismo independiente que intervenga también en la especificación de estas poblaciones (Perez-Balaguer et al., 2009). Los nuevos candidatos analizados en este trabajo, y que caracterizan poblaciones del dominio BM, pueden ser usados como marcadores alternativos a los ya conocidos. Decidimos estudiar qué ocurre con estos marcadores en ausencia de *Shh* a E15.5. De aquellos que únicamente muestran expresión en el complejo oculomotor (*Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2*) vemos como se produce una pérdida completa de todos ellos. En el caso de *Cplx1* y *Npas1*, que definían tanto el complejo oculomotor como el núcleo rojo, vuelve a producirse una pérdida completa en la región del complejo oculomotor, mientras que se mantienen en la zona del núcleo rojo, pero con una aparente desorganización. Esto concuerda con lo ya descrito anteriormente en ausencia de *Shh*, donde se produce una completa pérdida por apoptosis del complejo oculomotor, el cual necesita a *Shh* para su diferenciación y mantenimiento, mientras que el núcleo rojo se mantiene aunque de una forma desorganizada, indicando que *Shh* no es necesario para su diferenciación pero sí para su maduración (Perez-Balaguer et al., 2009).

3. Integración de los nuevos candidatos en la vía de señalización de *Pou4f1*

En la placa basal del mesencéfalo, *Pou4f1* se expresa durante el desarrollo y la fase adulta en el núcleo rojo y marca la identidad de esta población. La ausencia de este factor de transcripción supone una especificación y posterior pérdida de estas neuronas, y por lo tanto, una grave alteración en el desarrollo de este núcleo (Fedtsova and Turner, 1995; McEvilly et al., 1996; Xiang et al., 1996; Agarwala and Ragsdale 2002). Hemos visto cómo dos de nuestros genes candidatos, *Cplx1* y *Npas1* mostraban expresión en dos poblaciones basales del mesencéfalo, siendo una de ellas el núcleo rojo. Por ello nos resultó interesante ver qué ocurría durante el desarrollo de este núcleo y como se podría ver afectada la expresión de estos factores de transcripción en esta población en ausencia de *Pou4f1*, mediante el uso de la cepa transgénica *Pou4f1^{TauLacZ/+}* en la que, gracias a su característica, podemos estudiar tanto el núcleo rojo como su proyección mediante el tracto rubroespinal hacia la médula espinal.

El núcleo rojo está formado por dos subpoblaciones con diferente origen, la parte parvocelular, localizada en el diencéfalo, y la parte magnocelular, localizada en el mesencéfalo, donde coincide con el complejo oculomotor (Massion 1967, Liang et al., 2012). En el desarrollo del núcleo rojo en el ratón mutante, las neuronas que lo forman no desaparecen pero presentan una clara desorganización frente al control heterocigoto, y a simple vista parece mucho más acentuada en la región magnocelular que en la parvocelular. A E18.5, la expresión de *Cplx1*, en la región parvocelular es escasa y difusa tanto en el ratón heterocigoto como mutante, sin embargo, en la región magnocelular, como ya habíamos descrito, se mantiene en el núcleo rojo y en el complejo oculomotor en el ratón heterocigoto, aunque se pierde por completo en el núcleo rojo del ratón mutante mientras que permanece intacta en el complejo oculomotor.

Por un lado, vemos los diferentes requerimientos de *Cplx1* en la región parvocelular y magnocelular. Esto puede deberse a la función que tiene la proteína codificada por este factor de transcripción, ya que se unen de forma reversible al complejo SNARE y juegan un papel importante en regular la liberación de los neurotransmisores (Glynn et al., 2005; Kielar et al., 2012; Gispert, et al., 2014). El hecho de que la expresión sea tan escasa y difusa en la zona parvocelular y tan fuerte y clara en la región magnocelular puede deberse a la diferente naturaleza sináptica de ambas regiones. La fuerte expresión en la región magnocelular puede deberse a que esta parte del núcleo es la que proyecta a través del tracto rubroespinal para hacer sinapsis con sus diferentes dianas. La pérdida de expresión en el ratón mutante puede estar relacionada con la alteración en el crecimiento e innervación de los axones que se ha observado en ciertos axones sensitivos en ausencia de *Pou4f1* (Eng et al., 2001), lo que estaría indicando una alteración en la proyección e innervación del tracto rubroespinal.

Por otro lado, a E18.5, *Npas1* en la región parvocelular ya muestra una expresión bien definida en este núcleo y en la sustancia negra pars reticulata, mientras que en el mutante se pierde en el núcleo rojo, permaneciendo intacta en la sustancia negra pars reticulata. En la región magnocelular ocurre algo similar: en el ratón heterocigoto *Npas1*, al igual que *Cplx1*, define el complejo oculomotor y el núcleo rojo, mientras que vuelve a perderse por completo en el núcleo rojo del mutante y continúa intacta en el complejo oculomotor. En este caso, *Npas1* se expresa por completo en ambas regiones del núcleo rojo, por lo que puede estar interviniendo en su correcta maduración, debido al posible papel propuesto que tendría en el cambio de un ambiente proliferativo a uno diferenciativo (Ohsawa et al., 2005). Si nos centramos únicamente en la región parvocelular, *Npas1* está presente en el núcleo rojo y en la sustancia negra pars reticulata, cuya característica en común es que ambas están formadas por neuronas GABAérgicas (Liang et al., 2012). Ya se ha descrito que *Npas1* se expresa principalmente en neuronas inhibitorias en otras regiones del sistema nervioso como el hipocampo, el giro dentado o ciertas capas de la corteza cerebral (Erbel-Sieler et al., 2004) y que está implicado en el correcto desarrollo de interneuronas (Zhao et al., 2008).

En general, vemos como la falta de *Pou4f1* conlleva una clara alteración en el desarrollo del núcleo rojo, en especial en la zona magnocelular, y que se hace patente además, con la pérdida de la expresión de *Cplx1* y *Npas1*, los cuales, por sus funciones descritas, pueden estar interviniendo en la correcta maduración del núcleo y en su adecuada proyección e innervación a través del tracto rubroespinal.

Para precisar un poco más en este último aspecto, decidimos ver qué ocurría con dicha proyección en el ratón mutante. El tracto rubroespinal cruza la línea media en la zona caudal del mesencéfalo y desciende hacia la médula por la región dorsolateral. El núcleo rojo comienza a formarse entre E10.5 y E11.5, por lo que a partir de aquí es cuando debe comenzar a iniciar su proyección hacia la médula espinal. Vemos cómo, de E12.5 en adelante, la proyección del tracto rubroespinal se va haciendo cada vez más fuerte y entre E13.5-E14.5 comienza a verse el cruce del tracto a través de la línea media en la decusación tegmental ventral. Ni en el momento del inicio de la proyección ni en el momento del cruce se observan diferencias aparentes en el tracto entre el ratón heterocigoto y el mutante, a pesar de que en este último hay una clara desorganización del núcleo, que se va acentuando a lo largo del desarrollo. Si seguimos la proyección del tracto hacia la médula espinal, su presencia se hace patente desde E15.5-E16.5 en adelante. Este tracto está implicado en el control rudimentario de los movimientos tempranos que posteriormente se van refinando por el control cortical (Williams et al., 2014), por lo tanto antes de nacer ya debe estar bien establecido y haber innervado sus dianas correspondientes. A E18.5 podemos ver en la médula una clara alteración de este tracto en el ratón mutante, lo que podría indicar, junto con la pérdida de expresión de *Cplx1*, un fallo en la correcta innervación y/o sinapsis, lo que estaría relacionado, en parte, con la alteración de movimientos que ocurren a P0 (Xiang et al., 1996).



4. Desarrollo de la glía de Bergmann en ausencia de *Shh*

La proteína SHH que secretan las células de Purkinje induce la diferenciación de la glía de Bergmann (Dahmane & Ruiz i Altaba 1999), aunque el mecanismo exacto aún no está totalmente claro. Para investigar la posible regulación de *Gdf10* por *Shh*, utilizamos la cepa de ratón *En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}*, en la que se analizó la expresión del ARNm de *Gdf10* en este mutante condicional, demostrando que la pérdida de *Shh* conlleva una fuerte reducción en la expresión de *Gdf10* en todo el cerebelo, patente tras cuantificar mediante PCRq a E18.5. Sin embargo, gracias a las hibridaciones *in situ* vimos que la pequeña expresión de *Gdf10*, que persiste en el mutante condicional, se localiza en la zona ventricular. Esta expresión en la región más caudal de la zona ventricular puede ser atribuida a la secreción de SHH por el plexo coroideo del rombencéfalo al líquido cefalorraquídeo del cuarto ventrículo, que comienza a partir de E12.5 y es esencial para el desarrollo temprano del cerebelo y, en particular, para la proliferación de la glía radial y la expansión de interneuronas GABAérgicas (Huang, et al., 2009, 2010).

En nuestro mutante condicional, la inactivación de *Shh* se produce en el dominio de expresión de *En1*, incluyendo el mesencéfalo, el cerebelo y únicamente una pequeña parte del plexo coroideo del rombencéfalo. Por lo tanto, SHH se sigue produciendo y secretando del plexo coroideo al cuarto ventrículo, lo que podría compensar parcialmente su pérdida en la región cerebelar, en especial en la zona caudal, que está expuesta a cantidades de SHH más elevadas. Es posible que la proteína SHH presente en el cuarto ventrículo mantenga activa la transcripción de *Gdf10* en células localizadas en la zona ventricular adyacente al labio rómbico, lo que haría que persistiera su expresión tal y como observamos en el mutante. Esta diferencia dentro del mismo mutante apoya nuestra hipótesis de una regulación de *Gdf10* dependiente de *Shh* en el cerebelo.

Por otro lado, también se caracterizó la expresión de *Nestina* y *Vimentina* en este mutante condicional. En general, las técnicas de inmunohistoquímica y PCRq mostraron unos niveles completamente normales en ausencia de *Shh*; sin embargo puede apreciarse una morfología de la glía, así como una migración algo

desorganizada. Este fenotipo morfológico de la glía radial puede ser secundario al mal desarrollo de la capa granular y molecular. La caracterización de la migración de las células de Purkinje a E18.5 presenta cierta alteración. Sin embargo, se ha mostrado en otros mutantes condicionales de *Shh* a E18.5 que no hay un fenotipo obvio en este tipo celular, mientras que a P5 se observa una reducción en la células de Purkinje, así como una alteración en esta capa (Lewis et al., 2004). En nuestro mutante condicional a P7 no parece que el número de células de Purkinje esté alterado, pero podemos apreciar una grave desorganización en su distribución. Por otro lado, la caracterización de la glía de Bergmann en diferentes mutantes de *Shh* mostró una apariencia normal a E18.5, mientras que a P5 aparecía desorganizada, lo que se sugirió como un efecto secundario a la desorganización de las células de Purkinje y el mal desarrollo de las fibras paralelas células de los granos, demostrado por la presencia de fibras de glía GFAP positivas rodeando las neuronas de Purkinje Calbindina-D28 positivas a P5 y P13 (Lewis et al., 2004). Nuestros datos a P7 confirman el fenotipo previamente descrito, pero ponen de manifiesto un claro gradiente rostro-caudal que puede ser atribuido a la secreción de SHH por el plexo coroideo tal y como mencionamos previamente.

Con este trabajo mostramos por primera vez que, a pesar de que la expresión de *Nestina* y *Vimentina* en las células de la glía de Bergmann permanece sin cambios en el mutante condicional, a E18.5 la expresión de *Gdf10* en el cerebelo está altamente afectada por la ausencia de *Shh*. Esta rápida reducción de *Gdf10* es más sorprendente si se tiene en cuenta que *Shh* inicia su expresión en las células de Purkinje justo un día antes, a E17.5 (Corrales et al., 2004; Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Lewis et al., 2004). Esto sugiere una regulación directa por *Shh* más que un efecto secundario por la alteración en el desarrollo de las células de Purkinje en estadios postnatales. Además, tanto *Gli1* como *Gli2* están ambos expresados en la glía de Bergmann. Estos genes son dos importantes dianas en la vía de señalización de *Shh* y se ha observado que el mutante condicional para *Gli2* presenta cierta desorganización en las fibras de la glía de Bergmann (Corrales et al., 2004). Esto vuelve a apoyar nuestra hipótesis de que la señal de *Shh* podría tener un efecto directo en la diferenciación de la glía de Bergmann.

En resumen, hemos sido capaces de ver como la expresión de *Gdf10* en las dos zonas germinales del cerebelo, la zona ventricular y el labio rómbico, destacan un posible papel de *Gdf10* en la diferenciación de los precursores neuronales. Además pudimos observar una temprana regulación a la baja de este gen específico de la glía de Bergmann en el mutante condicional de *Shh*, lo que sugiere un efecto directo de este sobre el desarrollo de la glía más que un efecto secundario por el alterado desarrollo de las células de Purkinje a estadios postnatales.





VI. CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

1. Los genes *Dync1i1*, *Mfap3l* y *Tln2* son específicos del complejo oculomotor y pueden ser usados como marcadores de dicha población.
2. Los factores de transcripción *Cplx1* y *Npas1* se expresan tanto en el complejo oculomotor como en el núcleo rojo. Por lo tanto, pueden ser usados como marcadores de estas poblaciones.
3. Los factores de transcripción *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3* presentan un patrón de expresión complejo. Son herramientas útiles para una descripción detallada de la región basolateral mesencefálica.
4. En ausencia de *Shh*, el complejo oculomotor desaparece y, por lo tanto los nuevos marcadores identificados de esta población, *Dync1i1*, *Mfap3l*, *Tln2*, *Cplx1* y *Npas1*, no son detectados. Sin embargo, *Cplx1* y *Npas1* mantienen su expresión en el núcleo rojo, por lo que no dependen de la actividad de *Shh*.
5. La especificación de la zona basolateral mesencefálica es altamente dependiente de *Shh*. Todos los nuevos marcadores identificados, *Barhl1*, *Nhlh1* y *Six3*, aparecen alterados.
6. La ausencia de *Pou4f1* provoca la pérdida de expresión de los factores de transcripción *Cplx1* y *Npas1* en el núcleo rojo. Por lo tanto, en estas neuronas su expresión tiene que estar regulada directa o indirectamente por *Pou4f1*.
7. El tracto rubroespinal se inicia a partir de E12.5 y comienza a ser visible en la región cervical de la médula espinal a partir de E16.5.
8. En ausencia de *Pou4f1* el tracto rubroespinal muestra una clara desorganización en la médula espinal a nivel cervical.
9. En el cerebelo, la expresión de *Gdf10* aparece en las dos áreas germinales, la zona ventricular y el labio rómbico. Muestra un claro gradiente, siendo más intenso en la zona medial frente a la zona lateral.

10. La expresión de *Gdf10* en la glía de Bergmann está regulada por *Shh*, ya que en ausencia del mismo hay una gran reducción de su expresión.

11. En ausencia de *Shh*, las células de Purkinje y la glía radial aparecen desorganizadas, aunque sus marcadores, CALBINDINA, NESTINA y VIMENTINA no reducen significativamente su expresión.

12. El fenotipo cerebeloso en la ausencia de *Shh* presenta un claro gradiente rostrocaudal, estando la región rostral mucho más afectada que la caudal.



VII. BIBLIOGRAFÍA





- Abbott, L., & Sotelo, C. (2000). Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *J Comp Neurol.* 16,316-29.
- Agarwala, S., & Ragsdale, C.W. (2002). A role for midbrain arcs in nucleogenesis. *Development*, 129, 5779–5788.
- Allen, B.L., Tenzen, T., McMahon, A.P. (2007). The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev.* 21, 1244-1257.
- Alvarez-Fischer, D., Fuchs, J., Castagner, F., Stettler, O., Massiani-Beaudoin, O., Moya, K.L., Bouillot, C., Oertel, W., Lombès, A., Faigle, W., Joshi, R., Hartmann, A. & Prochiantz, A. (2011). Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat. Neurosci.* 14, 1260-1266.
- Alves dos Santos, M.T.M. & Smidt M.P. (2011). En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Dev.* 6, 23.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S. Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., Ericson, J. (2006) Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell.* 124, 393-405.
- Aroca, P., & Puellas, L. (2005). Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain. *Brain Res Brain Res Rev.* 49, 179-90.
- Banks, G. T., Haas, M. A., Line, S., Shepherd, H. L., Alqatari, M., Stewart, S., Fisher, E. M. C. (2011). Behavioral and other phenotypes in a cytoplasmic Dynein light intermediate chain 1 mutant mouse. *J Neurosci.* 31, 5483–5494.
- Basler, K., Edlund, T., Jessell, T.M., Yamada, T. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member. *Cell.* 21, 687-702.
- Baumann, K. (2014). Development: Morphogen gradients revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 75.
- Blaess, S., Corrales, J.D., Joyner, A.L. (2006) Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development.* 133, 1799-1809.
- Buffo, A., & Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol*, 109, 42–63.

- Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R., & Rubenstein, J. L. (1993). Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci.* 13, 3155–72.
- Bulfone, A., Menguzzato, E., Broccoli, V., Marchitello, A., Gattuso, C., Mariani, M., Banfi, S. (2000). Barhl1, a gene belonging to a new subfamily of mammalian homeobox genes, is expressed in migrating neurons of the CNS. *Hum Mol Genet.* 9, 1443–52.
- Bumcrot, D.A., Takada, R., McMahon, A.P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol. Cell Biol.* 15, 2294-2303.
- Cambroner, F., & Puelles, L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol.* 427, 522–45.
- Caspary, T., Garcia-Garcia, M.J., Huangfu, D., Eggenschwiler, J.T., Wyler, M.R., Rakeman, A.S., Alcorn, H.L., Anderson, K.V. (2002). Mouse Dispatched homolog1 is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Curr. Biol.* 12, 1628-1632.
- Chamberlain, C.E., Jeong, J., Guo, C., Allen, B.L., McMahon, A.P. (2008). Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development.* 135, 1097-1106.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, I. H., Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 3,407-13.
- Chizhikov, V. V., & Millen, K. J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Developmental Biology.* 277, 287–95.
- Colas, J., & Schoenwolf, G. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn.* 145, 117–145.
- Corrales, J. D., Rocco, G. L., Blaess, S., Guo, Q., Joyner, A. L. (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development.* 131, 5581–90.
- Corrales, J. D., Blaess, S., Mahoney, E. M., Joyner, A. L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development.* 133, 1811–21.
- Cox, W. G., & Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development.* 121, 4349–58.

Dahmane, N., & Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development*. 126, 3089–100.

Debrand, E., El Jai, Y., Spence, L., Bate, N., Praekelt, U., Pritchard, C. A., Critchley, D. R. (2009). Talin 2 is a large and complex gene encoding multiple transcripts and protein isoforms. *FEBS J*. 276, 1610–28.

Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J.H., Brunet, J.F., Ericson, J. & Perlmann T. (2011). Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development*. 138, 3399-3408.

Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*. 135, 2489–503.

Dickinson, M. E., Selleck, M.A., McMahon, A. P., Bronner-Fraser, M. (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development*. 121, 2099–106.

Dräger, U.C. & Hubel, D.H. (1975). Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature*. 253, 203-204

Dräger, U.C. & Hubel, D.H. (1975). Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. *J. Neurophysiol*. 38, 690-713.

Du Beau, A., Shakya Shrestha, S., Bannatyne, B. A, Jalicy, S. M., Linnen, S., Maxwell, D. J. (2012). Neurotransmitter phenotypes of descending systems in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*. 227, 67–79

Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J., McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 31,1417-30.

Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., Martínez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 43,179-91.

Eng, S. R., Gratwick, K., Rhee, J. M., Fedtsova, N., Gan, L., & Turner, E. E. (2001). Defects in sensory axon growth precede neuronal death in Brn3a-deficient mice. *J Neurosci*. 21, 541–9.

Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, a, & van Heyningen, V. (1999). Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development*. 126, 3585–96.

Erbel-Sieler, C., Dudley, C., Zhou, Y., Wu, X., Estill, S. J., Han, T., McKnight, S. L. (2004). Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 13648–53.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell.* 87, 661-673.

Franklin, K.B.J. & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* 3rd Edition. Eds Elsevier Academic Press. San Diego.

Gispert, S., Kurz, A., Brehm, N., Rau, K., Walter, M., Riess, O., & Auburger, G. (2014). Complexin-1 and Foxp1 Expression Changes Are Novel Brain Effects of Alpha-Synuclein Pathology. *Mol Neurobiol.*

Glynn, D., Drew, C. J., Reim, K., Brose, N., Morton, a J. (2005). Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. *Hum Mol Genet.* 14, 2369–85.

Gold, D.A., Baek, S.H., Schork, N.J., Rose, D.W., Larsen, D.D., Sachs, B.D., Rosenfeld, M.G., Hamilton, B.A. 2003. ROR[alpha] coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron.* 40,1119–1131

Golden, G.S. (1972). Embryologic demonstration of a nigro-striatal projection in the mouse. *Brain Res.* 15,278-82

Gupta, V. A, & Beggs, A. H. (2014). Kelch proteins: emerging roles in skeletal muscle development and diseases. *Skelet Muscle.* 4, 11.

Hatta, K. & Takahashi, Y. (1996). Secondary axis induction by heterospecific organizers in zebrafish. *Dev. Dyn.* 205, 183-195.

Hidalgo-Sánchez, M., Martínez-de-la-Torre, M., Alvarado-Mallart, R.-M., Puellas, L. (2005). A distinct preisthmic histogenetic domain is defined by overlap of Otx2 and Pax2 gene expression in the avian caudal midbrain. *J Comp Neurol.* 483, 17–29.

Hidalgo-Sánchez, M., & Millet, S. (2005). Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: The Otx2/Gbx2 boundary. *Brain Res Brain Res Rev.* 49, 134-49.

Huang, X., Ketova, T., Fleming, J. T., Wang, H., Dey, S. K., Litingtung, Y., Chiang, C. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. *Development.* 136, 2535–43.

- Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J. T., Grover, V. K., Cooper, M. K., ... Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 8422–7.
- Huangfu, D. & Anderson, K.V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development.* 133, 3-14.
- Incardona, J.P., Gruenberg, J., Roelink, H. (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr. Biol.* 12, 983-995.
- Ingham, P.W. & McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.
- Ingham, P.W., & Placzek, M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet.* 7, 841-50.
- Jaarsma, D., Ruigrok, T.J., Caffé, R., Cozzari, C., Levey, A.I., Mugnaini, E., Voogd, J. (1997). Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. *Prog Brain Res.* 114, 67-96.
- Joksimovic, M., Anderegg, A., Roy, A., Campochiaro, L., Yun, B., Kittappa, R., Awatramani, R. (2009). Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 19185–90.
- Kala, K., Haugas, M., Lilleväli, K., Guimera, J., Wurst, W., Salminen, M., Partanen, J. (2009). *Gata2* is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons. *Development.* 136, 253–62.
- Kang, B., Hao, C., Wang, H., Zhang, J. (2008). Evaluation of hepatic-metastasis risk of colorectal cancer upon the protein signature of PI3K/AKT pathway. *J Proteome Res.* 7, 3507–3515.
- Katoh, Y. & Katoh, M. (2004a). KIF27 is one of orthologs for *Drosophila* Costal-2. *Int. J. Oncol.* 25, 1875-1880.
- Katoh, Y. & Katoh, M. (2004b). Characterization of KIF7 gene in silico. *Int. J. Oncol.* 25, 1881-1886.
- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.J., Zhang, W., Hu, Y., Chuang, P.T. (2002). Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development.* 129, 5753-5765.

Kielar, C., Sawiak, S. J., Navarro Negredo, P., Tse, D. H. Y., Morton, a J. (2012). Tensor-based morphometry and stereology reveal brain pathology in the complexin1 knockout mouse. *PLoS One*. 7, 326-36.

Kintner, C.R. & Dodd, J. (1991). Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Development*. 113, 1495-1505.

Kittappa, R., Chang, W.W., Awatramani, R.B. & McKay, R.D.G. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol*. 5, e325.

Koirala., S, & Corfas., G. 2010. Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PLoS ONE*. 5, 91-98.

Laine, J., & Axelrad, H. (1994). The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol*. 339, 159–73

Landsberg, R. L., Awatramani, R. B., Hunter, N. L., Farago, A. F., DiPietrantonio, H. J., Rodriguez, C. I., Dymecki, S. M. (2005). Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron*. 48, 933–47.

Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., Beachy, P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*. 266, 1528-1537.

Lee, K.J., & Jessell, T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*. 22, 261-294.

Lewis, P.M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., McMahon, A.P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol*. 270, 393–410.

Li, C.M., Yan, R.T., Wang, S.Z. (1999). Misexpression of a bHLH gene, *cNSCL1*, results in abnormal brain development. *Dev Dyn*. 215, 238–47.

Li, J.Y. & Joyner, A.L. (2001). *Otx2* and *Gbx2* are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development*. 128, 4979-4991.

Li, S., Qiu, F., Xu, A., Price, S. M., & Xiang, M. (2004). *Barhl1* regulates migration and survival of cerebellar granule cells by controlling expression of the neurotrophin-3 gene. *J Neurosci*. 24, 3104–14.

Li, S., & Xiang, M. (2006). *Barhl1* is required for maintenance of a large population of neurons in the zonal layer of the superior colliculus. *Dev Dyn*. 235, 2260–2265.

- Liang, H., Paxinos, G., Watson, C. (2012). Spinal projections from the presumptive midbrain locomotor region in the mouse. *Brain Struct Funct.* 217, 211–219
- Liang, H., Paxinos, G., Watson, C. (2012). The red nucleus and the rubrospinal projection in the mouse. *Brain Struct Funct.* 217, 221–232
- Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Roelik, H., Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMO-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell.* 22, 969-79
- Litingtung, Y. & Chiang, C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat. Neurosci.* 3, 979-985.
- Lopes, C., Delezoide, A.-L., Delabar, J.-M., Rachidi, M. (2006). BARHL1 homeogene, the human ortholog of the mouse Barhl1 involved in cerebellum development, shows regional and cellular specificities in restricted domains of developing human central nervous system. *Biochim and Biophys Res Commun.* 339, 296–304.
- Ma, Y., Erkner, A., Gong, R., Yao, S., Taipale, J., Basler, K., Beachy, P.A. (2002). Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell.* 111, 63-75.
- Marin, F., & Puellas, L. (1995). Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci.* 1, 1714-38
- Marín, F., Aroca, P., Puellas, L. (2008). Hox gene colinear expression in the avian medulla oblongata is correlated with pseudorhombomeric domains. *Dev Biol.* 323, 230–47.
- Marti, E., Bumcrot, D.A., Takada, R., McMahon, A.P. (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature.* 375, 322-325.
- Martínez, S. (2001). The isthmic organizer and brain regionalization. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 367-371
- Martinez, S., Andreu, A., Mecklenburg, N., Echevarria, D. (2013). Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat.* 26, 7-18
- Martinez-Barbera, J. P., Signore, M., Boyle, P.P., Puellas, E., Acampora, D., Gogoi, R., Simeone, A. (2001). Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development.* 128, 4789–800.
- Martinelli, D. C., & Fan, C.M. (2007). The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle.* 6, 2650–5.

- Matise, M.P. & Joyner, A.L. (1999). Gli genes in development and cancer. *Oncogene*. 18, 7852-7859.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., Aizawa, S. (1995). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev*. 9, 2646–2658.
- Massion, J. (1967). The mammalian red nucleus. *Physiol Rev*. 47, 383-436.
- McEvelly, R.J., Erkman, L., Luo, Lin., Sawchenko, P.E., Ryan, A.F., Rosenfeld, M.G. (1996). Requirement for *Brn-3.0* in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature*. 12, 574-7
- Mugnaini, E., Diño, MR., Jaarsma, D. (1997). The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Prog Brain Res*. 114, 131-50
- Morales-Delgado, N., Merchan, P., Bardet, S. M., Ferrán, J. L., Puellas, L., Díaz, C. (2011). Topography of Somatostatin Gene Expression Relative to Molecular Progenitor Domains during Ontogeny of the Mouse Hypothalamus. *Front Neuroanat*. 28, 5-10
- Moreno-Bravo, J. A., Perez-Balaguer, A., Martinez, S., & Puellas, E. (2010). Dynamic expression patterns of *Nkx6.1* and *Nkx6.2* in the developing mes-diencephalic basal plate. *Dev Dyn*. 239, 2094–101
- Moreno-Bravo, J.A., Martinez-Lopez, J.E., Puellas, E. (2012). Mesencephalic neuronal populations: new insights on the ventral differentiation programs. *Histol Histopathol*. 27, 1529-38.
- Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., Ono, Y. (2007). *Hes1* determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing *Ngn* genes in the developing mesencephalon. *Development*. 134, 2783–93.
- Nieuwenhuys, R. (2011). The structural, functional, and molecular organization of the brainstem. *Front Neuroanat*. 24, 5-33.
- Oppenheimer, J. M. (1936) Structures development in amphibians by implantation of living fish organizer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 34, 461-463
- Ohsawa, S., Hamada, S., Kakinuma, Y., Yagi, T., Miura, M. (2005). Novel function of neuronal PAS domain protein 1 in erythropoietin expression in neuronal cells. *J Neurosci Res*. 79, 451–8.
- Patten, I., & Placzek, M. (2000). The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol. Life Sci*. 57, 1695-1708.

Perez-Balaguer, A., Puellas, E., Wurst, W., Martinez, S. (2009). Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mech Dev.* 126, 301–13.

Placzek, M., & Briscoe, J. (2005). The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 230-240.

Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., Beachy, P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature.* 374, 363-366.

Prakash, N. & Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 187-206.

Prakash, N., Puellas, E., Freude, K., Trümbach, D., Omodei, D., Di Salvio, M., Sussel, L., Ericson, J., Sander, M., Simeone, A. & Wurst, W. (2009). Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development.* 136, 2545-2555.

Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S. & Simeone, A. (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat. Neurosci.* 6, 453-460.

Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S., Wurst S. & Simeone, A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development.* 131, 2037-2048.

Puelles, E. (2007). Genetic control of basal midbrain development. *J Neurosci Res.* 85, 3530-4

Puelles, E., Martínez-de-la-Torre, M., Watson, C., Puellas, L. (2012) Midbrain. In: Watson C, Paxinos G, Puellas L. *The mouse nervous system.* (eds) Elsevier Academic Press, San Diego

Puelles, L. (1995). A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav Evol.* 46, 319-37.

Puelles, L., & Rubenstein, J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16,472-9

Puelles, L., & Rubenstein, J. L. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26, 469–76.

Puelles, L., & Rubenstein, J. L. (1994). Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain. *Curr Top Dev Biol.* 29, 1-63

Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*. 317, 372-376.

Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. 8, 445-55

Rong, Y., Wang, T., Morgan, J.I. 2004. Identification of candidate Purkinje cell- specific markers by gene expression profiling in wild-type and *pcd(3J)* mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 132,128–145.

Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K., Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*. 28, 578-80

Ruiz i Altaba, A. (1998). Deconstructing the organizer. *Nature*. 19, 748-9.

Schmid, T., Krüger, M., Braun, T. (2007). NSCL-1 and -2 control the formation of precerebellar nuclei by orchestrating the migration of neuronal precursor cells. *J Neurochem*. 102, 2061–72.

Shawlot, W., Wakamiya, M., Kwan, K. M., Kania, a, Jessell, T. M., Behringer, R. R. (1999). *Lim1* is required in both primitive streak-derived tissues and visceral endoderm for head formation in the mouse. *Development*. 126, 4925–32.

Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J. L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development*. 121, 3923–33.

Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J.L. (1997) Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev Neurosci*. 19,88-96

Shimamura, K., & Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*. 124, 2709–18.

Sillitoe, R. V, & Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23, 549-77.

Simeone, A., Avantaggiato, V., Cristina, M., Mavilio, F., Arrac, C., Cotellid, F., Acampora, D. (1995). Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostra1 central nervous system. *Mech Dev*. 51, 83–98.

Simeone, A. Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. *Trend Neurosci*. 28, 62-65.

Smidt, M.P. & Burach, J.P.H. (2007). How to make a meso-diencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 21-32.

Sonnier, L., Le Pen, G., Hartmann, A., Bizot, J., Trovero, F., Krebs, M. & Prochiantz, A. (2007). Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for *Engrailed1*. *J. Neurosci.* 27, 1063-1071.

Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol.* 72, 295-339.

Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species. *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik.* 100, 599-638

Strahlendorf, J.C., & Hubbard, G.D. (1983). Serotonergic interactions with rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res. Bull.* 11, 265–69

Szabó, N.E., Zhao, T., Cankaya, M., Theil, T., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G. (2009). Role of neuroepithelial Sonic hedgehog in hypothalamic patterning. *J Neurosci.* 27, 6989-7002.

Szabó NE, Zhao T, Zhou X, Alvarez-Bolado G. (2009). The role of Sonic hedgehog of neural origin in thalamic differentiation in the mouse. *J Neurosci.* 25, 2453-66.

Tanabe, Y., Roelink, H. & Jessell, T.M. (1995). Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Curr. Biol.* 5, 651-658

Teh, C. H. L., Lam, K. K. Y., Loh, C. C., Loo, J. M., Yan, T., & Lim, T. M. (2006). Neuronal PAS domain protein 1 is a transcriptional repressor and requires arylhydrocarbon nuclear translocator for its nuclear localization. *J Biol Chem.* 281, 34617–29.

Teimouri, H., & Kolomeisky, A. B. (2014). Development of morphogen gradient: The role of dimension and discreteness. *J Chem Phys.* 140(8), 085102.

Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.S., Krauss, R.S., McMahon, A.P. (2006). The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell.* 10, 647–56.

Turner, E.E., Fedtsova, N., & Rosenfeld, M.G. (1996). POU-domain factor expression in the trigeminal ganglion and implications for herpes virus regulation. *Neuroreport.* 25, 2829–2832.

Tzschentke, T.M., & Schmidt, W.J. (2000). Differential effects of discrete subarea-specific lesions of the rat medial prefrontal cortex on amphetamine- and cocaine-induced behavioural sensitization. *Cereb Cortex.* 10, 488-98

Varlet, I., Collignon, J., Robertson, E. J. (1997). Nodal Expression in the Primitive Endoderm Is Required for Specification of the Anterior Axis During Mouse Gastrulation. *Development*. 124, 1033–44.

Veenvliet, J. V., & Smidt, M. P. (2014). Molecular mechanisms of dopaminergic subset specification: fundamental aspects and clinical perspectives. *Cell Mol Life Sci*. DOI 10.1007/s00018-014-1681-5

Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., Martínez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol*. 54, 7–20.

Virolainen, S.-M., Achim, K., Peltopuro, P., Salminen, M., Partanen, J. (2012). Transcriptional regulatory mechanisms underlying the GABAergic neuron fate in different diencephalic prosomeres. *Development*. 139, 3795–805.

Voogd, J., & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*. 21, 370–5.

Watson, C., & Harrison, M. (2012). The location of the major ascending and descending spinal cord tracts in all spinal cord segments in the mouse: actual and extrapolated. *Anat Rec*. 295, 1692–7.

Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. 22, 103–14.

Williams, P. T. J. A., Kim, S., Martin, J. H. (2014). Postnatal Maturation of the Red Nucleus Motor Map Depends on Rubrospinal Connections with Forelimb Motor Pools. *J Neurosci*. 34, 4432–4441.

Xiang, M., Gan, L., Zhou, L., Klein, W. H., & Nathans, J. (1996). Targeted deletion of the mouse POU domain gene *Brn-3a* causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 11950–5.

Yao, S., Lum, L., Beachy, P. (2006). The *ihog* cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell*. 125, 343–57.

Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M., McMahon, A.P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for *Shh* and *Ihh* signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell*. 27, 781-92

Zhao, Y., Flandin, P., Long, J. E., Cuesta, M. Dela, Westphal, H., & Rubenstein, J. L. R. (2008). Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of *Lhx6* mutants. *J Comp Neurol*. 510, 79–99.

VIII. ANEXO





Growth and Differentiation Factor 10 (*Gdf10*) is Involved in Bergmann Glial Cell Development Under *Shh* Regulation

Nora Mecklenburg,^{1,2} Jesus E. Martinez-Lopez,¹ Juan Antonio Moreno-Bravo,¹ Ariadna Perez-Balaguer,¹ Eduardo Puelles,¹ and Salvador Martinez^{1,3}

Growth differentiation factor 10 (*Gdf10*), also known as *Bmp3b*, is a member of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily. *Gdf10* is expressed in Bergmann glial cells, which was investigated by single-cell transcriptional profiling (Koirala and Corfas, (2010) PLoS ONE 5: e9198). Here we provide a detailed characterization of *Gdf10* expression from E14, the stage at which *Gdf10* is expressed for the first time in the cerebellum, until P28. We detected *Gdf10* expression in both germinal zones: in the ventricular zone (VZ) of the 4th ventricle as well as in the rhombic lip (RL). The VZ has been postulated to give rise to GABAergic neurons and glial cells, whereas the RL gives rise to glutamatergic neurons. Thus, it was very surprising to discover a gene that is expressed exclusively in glial cells and is not restricted to an expression in the VZ, but is also present in the RL. At postnatal stages *Gdf10* was distributed equally in Bergmann glial cells of the cerebellum. Furthermore, we found *Gdf10* to be regulated by *Sonic hedgehog* (*Shh*), which is secreted by Purkinje cells of the cerebellum. In the conditional *Shh* mutants, glial cells showed a reduced expression of *Gdf10*, whereas the expression of *Nestin* and *Vimentin* was unchanged. Thus, we show for the first time, that *Gdf10*, expressed in Bergmann glial cells, is affected by the loss of *Shh* as early as E18.5, suggesting a regulation of glial development by *Shh*.

GLIA 2014;00:000–000

Key words: *Gdf10*, *Bmp3b*, Bergmann glia, cerebellum, *Nestin*, *Shh*

Introduction

Bergmann glial cells are considered as a subclass within the group of astrocytes in the cerebellar cortex. They are unipolar astrocytes located around the soma of Purkinje cells with Bergmann fibers extending through the molecular layer terminating at the pial surface. Historically, Bergmann glial cells are also called “epithelial cells with Bergmann fibers” and “Golgi epithelial cells” (Yamada and Watanabe, 2002). The whole dendritic arbors of Purkinje cells are covered with Bergmann glial fibers, which are not only in close contact with Purkinje cells, but also known to associate with migrating granule cells from which the concept of glia-guided neuronal migration has been proposed (Rakic, 1971; Yamada and Watanabe, 2002).

The development of Bergmann glia is divided into four stages. First is the stage of radial glia, classically identified by a periventricular soma and a radial fiber connecting with the pial surface, until E14 in mice. At this developmental stage glial precursors take the phenotype of radial glia expressing glutamate-aspartate transporter (GLAST) and tenascin-C (Yamada and Watanabe, 2002). This stage of development coincides with the birth date of Purkinje cells, which are produced between E11–13 in mice (Miale and Sidman, 1961). During Purkinje cell migration at E14 and E15 radial-glia fibers are apposed and in contact with CALBINDIN-positive migratory Purkinje cells (Yuasa et al., 1996, 1991). Whether or not Bergmann glial fibers thereby guide Purkinje cell migration has not been clarified yet.

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22710

Published online Month 00, 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received Feb 21, 2014, Accepted for publication June 6, 2014.

Address correspondence to Dr. S. Martinez, Instituto de Neurociencias de Alicante (UMH-CSIC), Universidad Miguel Hernandez, Consejo Superior de Investigaciones científicas., Avda. Ramon y Cajal S/N, E03550 Alicante, Spain. E-mail: smartinez@umh.es

From the ¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernandez, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (UMH-CSIC), E-03550, Alicante, Spain; ²Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, D-13125, Berlin, Germany; ³Instituto Murciano de Investigación Biomédica IMIB-Arrixaca, E30120, Murcia, Spain.

N.M. and J.E.M.-L. contributed equally to this work.

The second stage of Bergmann glia development is referred to as migration and takes place between E14 and P7. At E15, one day after active Purkinje cell migration from the ventricular zone (VZ), GLAST, and tenascin expression increases in the mantle zone and Bergmann glial cells are evenly experiencing somatic migration towards subpial fibers (by a process of somatic translocation) and situate beneath Purkinje cells, indicating a strong correlation between Bergmann glia and Purkinje cell migration. During the first postnatal week Bergmann glial cells form a compact epithelium-like lining in the Purkinje cell layer (Yamada and Watanabe, 2002). Cell transformation, as the third phase of development, is characterized by cytoarchitectonic changes up to the third week. From P21 onwards Bergmann glial cells enter the stage of protoplasmic astrocytes, which completely enwrap the spines and spiny branches of Purkinje cells by thin lamellate processes (Yamada and Watanabe, 2002). There is growing evidence that a subgroup of Bergmann glial cells may originate from rhombic lip (RL) precursors and migrate tangentially until their final destination (Buffo and Rossi, 2013; Jensen et al., 2004).

Growth differentiation factor 10 (Gdf10), also known as *Bmp3b*, is a member of the transforming growth factor beta (TGF- β)-superfamily. In mice *Gdf10* is expressed in the Purkinje cell layer of the cerebellum (Gold et al. 2003; Koirala and Corfas, 2010; Zhao et al., 1999). On the basis of a publication by Zhao and colleagues, *Gdf10* is expressed in the Purkinje cell layer, but *Gdf10*-expressing cells are not Purkinje cells, granule cells, or Bergmann glial cells. However, Gold et al. (2003), and Koirala and Corfas (2010) demonstrated that *Gdf10* is expressed in Bergmann glial cells. Nevertheless our knowledge about the precise temporo-spatial expression pattern and potential signaling pathways involved in the regulation of *Gdf10* expression is very limited.

Phylogenetic analysis revealed that *Gdf10* and *Bmp3* genes are paralogs. *Gdf10* and *Bmp3* homologs are well conserved, especially within the C-terminal TGF- β -like domain (Katoh and Katoh, 2006). The Human BMP3b gene is located on chromosome 10, which correlates with its location in the mice genome, where it is located in the proximal region of chromosome 14. That is accepted to be syntenic to the human chromosome 10 (Cunningham et al., 1995; Hino et al., 1996).

Studies performed during the past decade raise the possibility of a *Shh* dependent regulation of *Gdf10*. Gold and colleagues for example demonstrated that mutations in the orphan nuclear receptor ROR α , via *sonic hedgehog (Shh)*; negatively regulate the expression of *Gdf10* (Gold et al., 2003). Additionally, Rong and colleagues showed that in 4-month-old Purkinje cell degeneration mice (*pcd3J*), *Gdf10* is reduced to 15% of the wild type signal (Rong et al., 2004). This

reduction of *Gdf10* may be secondary to the degeneration of SHH producing Purkinje cells (Wechsler-Reya and Scott, 1999) suggesting a regulation of *Gdf10* expression by Shh.

This study focuses on a detailed characterization of *Gdf10* expression in the developing cerebellum from E14 until adulthood. We highlight a *Gdf10* specific pattern with high expression levels in the vermal and posterior lateral cerebellum, where *Gdf10* is expressed in both germinal zones: the VZ of the 4th ventricle as well as the RL. Additionally, we demonstrate that *Gdf10* is highly downregulated in *Shh* conditional mutants, whereas the expression levels of other glial markers such as *Nestin* and *Vimentin* are unchanged. The analysis of Shh mutants proposes a direct role for *Shh* in the regulation of Bergmann glial specific genes, which in turn suggests that malformations of Bergmann fibers in conditional *Shh* mutants (Lewis et al., 2004) are not a secondary effect due to the altered Purkinje neurons.

Materials and Methods

Mouse Strains

The analysis of the expression of *Gdf10* mRNA was performed in wild-type ICR mice. Embryos were collected from embryonic stages (E) 14-E16.5 and at postnatal days (P) 0, 7, 15, 22, and in adults (>P28). Embryo heads were fixed over night in 4% PFA, processed to 20% sucrose, embedded in frozen section medium, and sectioned at 12 μ m. Brains from postnatal mice were dissected after perfusion and fixed over night in 4% PFA. They were processed like the embryos and sectioned in 16 μ m sections.

The *Shh* conditional mutant contains the *Shhtm2AMC* allele in homozygosis (loxP sequences flanking *Shh* exon2). It was generated in the laboratory of Andrew McMahon as previously reported (Lewis et al., 2004). The *En1* promoter drives cre endonuclease expression; the transgenic line was generated in the laboratory of Wolfgang Wurst and was previously reported (Kimmel et al., 2000). The conditional mutant embryos were generated crossing double heterozygous males (*En1^{cre/+}*; *Shh^{flax/+}*) with homozygous *Shh* conditional females. Embryos were fixed in 4% PFA overnight and completely dehydrated for storage at -20°C or wax embedded (Gemcut emerald paraffin) and sectioned in 7 μ m parallel series.

For the characterization of *Engrailed1 (En1)* expression the R26R-CAG-tdTomato reporter line was crossed into an *En1-cre* line. The R26R-CAG-tdTomato line was obtained from Jackson Laboratories (strain 007905). This reporter line has a loxP-flanked STOP cassette that prevents transcription of the CAG promoter. When this line is crossed with a cre line, the STOP cassette is excised and a red fluorescent protein variant (*tdTomato*) is transcribed.

We crossed heterozygous males (*En1^{cre/+}*) with homozygous females (*tdTomato^{-/-}*). Double heterozygous embryos (*En1^{cre/+}*; *tdTomato^{+/-}*) were used for further analysis.

In Situ Hybridization

For *in situ* hybridization we synthesized antisense digoxigenin-labeled riboprobes for *Gdf10*. The cDNA was obtained from Source

Bioscience (IRAVp968G04118D). The RNA-probe was detected with an alkaline-phosphatase-coupled antibody against digoxigenin (Roche). BM Purple (Roche) or NBT/BCIP (Roche) were used as a chromogenic substrate for the alkaline phosphatase. For fluorescent *in situ* hybridizations we synthesized antisense biotin-labeled riboprobes for *Gdf10*. The RNA-probe was detected with a streptavidin-Cy3 coupled antibody recognizing the biotin (Diamandis and Christopoulos, 1991). After hybridization, the embryos were rinsed with PBT (phosphate-buffered saline solution; 0.1M, pH 7.4, containing 0.1% Tween-20) and processed for immunostaining.

Immunohistochemistry

Sections were immunostained with the following antibodies: anti-CALBINDIN D-28k (1:3000, Swant), anti-VIMENTIN (1:20, Acris Antibodies), anti-GDF10 (1:25, SIGMA Prestige Antibodies), anti-GFAP (1:500, Abcam), anti-NESTIN (1:200, Hybridoma Bank), anti-PAX6 (1:5, Abcam), anti-NeuN (1:500, Chemicon).

After immunostainings sections were either embedded with Eukitt or with Mowiol-NPG (for fluorescent staining). In all cases selected sections were photographed with digital cameras (Leica DC500, DC250). Contrast and brightness of the photomicrographs were adjusted in Adobe PhotoShop, Macintosh or PC version, CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA).

Quantitative RT-PCR (qPCR)

For quantitative RT-PCR (qPCR) E18.5 embryos were collected from crossings of double heterozygous males (*En1^{cre/+}; Shh^{lox/+}*) with homozygous *Shh* conditional females. The cerebellum of conditional mutants ($n = 3$); (*En1^{cre/+}; Shh^{lox/lox}*) and controls ($n = 3$); (*Shh^{lox/+}*) was dissected and named as illustrated in Fig. 5A.

Total RNA was isolated using TRizol® Reagent (Ambion). Generation of cDNA from RNA was done using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (life technologies).

Transcripts were determined using commercial Assay-on-Demand primer/probe sets (life technologies). We used TaqMan® Gene Expression Master Mix (life technologies) and the following TaqMan® primers; *Gdf10* (Mm01220860_m1), *Nestin* (Mm00450205_m1), *Vimentin* (Mm01333430_m1). Each template was run in triplicates, and relative expression levels were calculated by normalization to the internal control *Gapdh* (Mm99999915_g1).

Individual cDNA samples were named X.1-X.5 depending on the cerebellar region they correspond to as illustrated in Fig. 5A. For total mRNA expression analysis, 10 µl of each individual sample (X.1-X.5) was pooled for each cerebellum and named “total mRNA”. The PCR reaction was performed in a 96 well plate using the StepOnePlus Real Time PCR System (life technologies).

Results

Gdf10 is Expressed in the Ventricular Zone of the 4th Ventricle As Well As in the Rhombic Lip

In this study we analyzed the expression of *Gdf10* mRNA during cerebellar development from E14 until adulthood (Figs. 1–3). Between E13 and 14 the two dorsal alar plates of

rhombomere 1 continue through the isthmic roof plate to the midbrain/hindbrain boundary (MHB) junction, forming the cerebellar plate (Louvi et al., 2003; Martinez and Alvarado-Mallart, 1989). *Gdf10* at this stage was expressed at the cerebellar midline and in the cerebellar RL (Fig. 1A, B). By E14.5, *Gdf10* expression decreased in the mantle layer of cerebellar roof plate (Fig. 1C,D) whereas its expression was maintained in the underlying neuroepithelium. Moreover, *in situ* hybridizations (ISH) on coronal sections revealed a distinct expression pattern in two domains of the cerebellar primordium. Anteriorly, *Gdf10* was expressed in the VZ of dorsal midline (isthmic origin), the adjacent epithelium to the RL and in the RL (rhombomere1 origin; Fig. 1E, F). In the posterior cerebellum, *Gdf10* was detected along the entire RL and contiguous ventricular epithelium (Fig. 1G). This precise location was also observed on sagittal sections at this stage of development. Medial cerebellar sections show *Gdf10* expression along the VZ of entire midline of the cerebellum, whereas in the lateral cerebellum *Gdf10* was detected in the VZ adjacent to the RL (posterior VZ) and the RL itself (Fig. 1H, I). In all of the sections we observed *Gdf10*-positive cells migrating out of the two germinative compartments, the VZ and the RL, to invade anterior and superficial regions of the mantle layer (arrows in Fig. 1E, F, I). ISH expression pattern was confirmed by immunohistochemistry with a GDF10 antibody (Fig. 1K).

The vermis formation between the cerebellar hemispheres is completed by E15.5, when CALBINDIN positive Purkinje cells secondarily colonize the midline region (Louvi et al., 2003). At the same time *Gdf10* expression further increased (Fig. 2A–D), which was accompanied by a strong migration of *Gdf10*-positive cells from the VZ towards the pial surface (Fig. 2F, G) as well as by an expansion of *Gdf10* expression from the RL to a forming layer underlining the developing external granule cell layer (EGL), (Fig. 2E). Cells originating from the midline VZ appeared to migrate mainly following radial axes towards vermis mantle layer, whereas *Gdf10*-positive cells from the medial and lateral RL and VZ adjacent to the RL appeared to expand tangentially covering the hemispheric mantle layers, underneath the EGL.

To corroborate the localization of *Gdf10* in the RL we performed immunohistochemistry (IHC) with anti-CALBINDIN (Fig. 2H–J), a marker for Purkinje cells originating from the VZ (Carletti and Rossi 2008; Rong et al., 2004) and with anti-PAX6 (Fig. 2K–M), a marker for granule neurons originating from the RL (Engelkamp et al., 1999). There was no overlapping expression between *Gdf10* and CALBINDIN (Fig. 2H–I). Nevertheless we were able to show that the *Gdf10* expression domain, which appeared to localize in the RL (Fig. 2G), clearly overlaps with the Pax6 positive domain, e.g., the cerebellar RL (Fig. 2K–H).

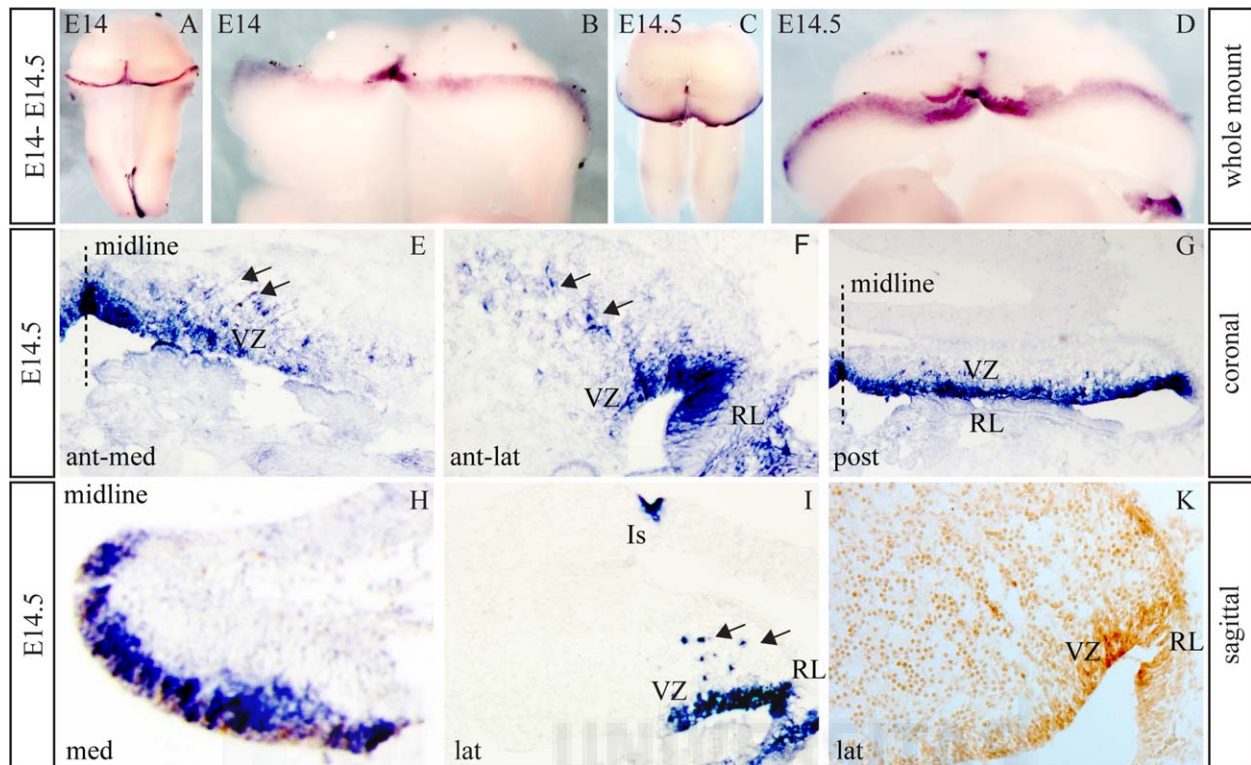


FIGURE 1: Expression of *Gdf10* mRNA at E14/E14.5. At E14 *Gdf10* labeled the cerebellar midline and the cerebellar rhombic lip (A, B). By E14.5 *Gdf10* expression decreased in the midline of the cerebellar roof plate (C, D), but was maintained in the underlying alar neuroepithelium. *In situ* hybridizations (ISH) on coronal sections revealed a distinct expression pattern between the anterior and posterior cerebellar primordium. Anteriorly, *Gdf10* was expressed in the VZ along the cerebellar midline, the VZ adjacent to the rhombic lip and in the rhombic lip itself (E, F). Posteriorly, *Gdf10* was detected along the entire ventricular epithelium and rhombic lip (G). Differences in anterior–posterior patterning were also observed on sagittal sections. Medial cerebellar sections showed *Gdf10* expression along the entire midline of the cerebellum, whereas in the lateral cerebellum *Gdf10* was mainly expressed in the VZ adjacent to the rhombic lip and the rhombic lip itself (H, I). ISH results were confirmed by immunohistochemistry with a GDF10 antibody (K). (Is: isthmus; RL: rhombic lip; VZ: ventricular zone). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

The distinct expression pattern between medial and lateral cerebellum as described at E14.5 was still observed at E15.5 and E16.5 (Fig. 2E–G). *Gdf10* expressing cells were distributed in a multicellular layer underlying the EGL, in which more cells accumulated in the medial and rostral cerebellum (Fig. 2E–J, N, P). We confirmed the expression pattern observed with ISH by IHC with a GDF10 antibody (Fig. 2O).

At early postnatal stages *Gdf10* was detected in a broad band inside and below the Purkinje cell layer, although scattered positive cells were also located in the prospective internal granular layer (Fig. 3A–C). This band narrowed down until P28, when *Gdf10*-positive cells were exclusively present in a thin band within the Purkinje cell layer (Fig. 3D–F). To demonstrate the nature of the *Gdf10*-positive cells, we showed that *Gdf10* highly colocalized with GFAP and VIMENTIN (Fig. 3G, H). No coexpression was detected with the Purkinje cell marker CALBINDIN (Fig. 3I). Therefore, the *Gdf10*-positive cells were clearly identified as Bergmann glia.

Gdf10 is Highly Reduced in *En1^{cre/+}; Shh^{fllox/fllox}* Mice

Recent publications have shown that *Gdf10* is reduced to 15% of the wild-type signal in Purkinje cell degeneration mice (Rong et al., 2004). The Purkinje neuron is the only cell type in the cerebellum, which produces high amounts of SHH protein (Wechsler-Reya and Scott, 1999). To investigate whether the high reduction of *Gdf10* in these mice is due to a loss of *Shh*, *Gdf10* expression was analyzed in *En1^{cre/+}; Shh^{fllox/fllox}* mice (Kimmel et al., 2000; Lewis et al., 2001; Perez-Balaguer et al., 2009). In these mice *Shh* expression is lost in the *En1* positive cerebellum including the RL and a small portion of the choroid plexus as illustrated here in an E18.5 *En1^{cre/+}; tdTomato^{+/-}* embryo (Fig. 6I, J).

Shh is expressed in Purkinje cells from E17.5 onwards (Corrales et al., 2004; Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Lewis et al., 2004). At E18.5, we observed major alterations in the expression of *Gdf10* between controls and conditional mutant embryos (Fig. 4). *Gdf10* expression in the medial

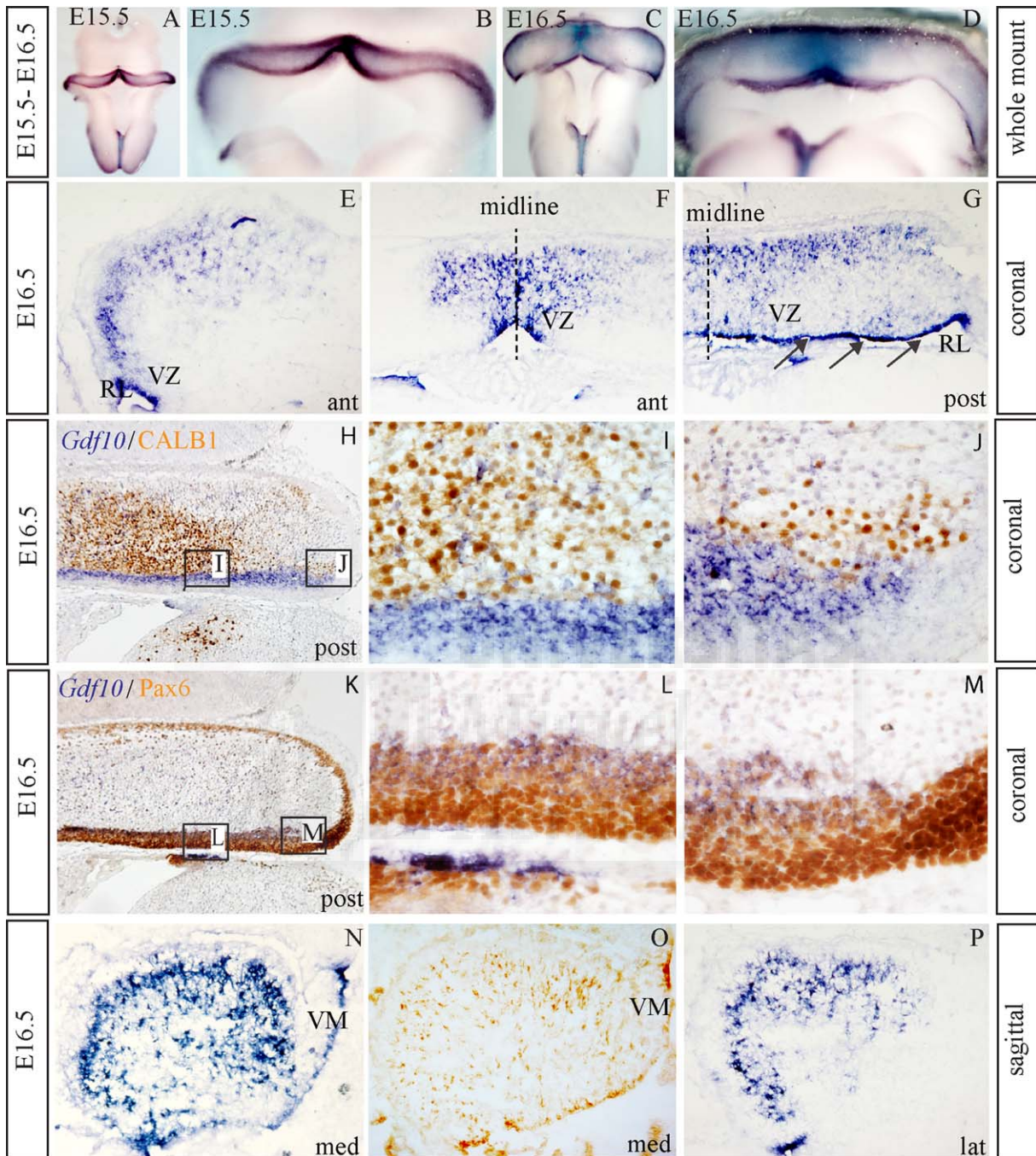


FIGURE 2: Expression of *Gdf10* mRNA between E15.5 and E16.5. Between E15.5 and E16.5 *Gdf10* expression further increased (A–D), accompanied by an expansion of *Gdf10* expression from the RL underlining the developing external granule cell layer (EGL), (E) and a strong radial migration of *Gdf10*-positive cells from the VZ towards the pial surface (F, G). Cells originating from the VZ appeared to migrate radially, whereas *Gdf10*-positive cells underlining the EGL appeared to expand tangentially from the RL and the VZ adjacent to the RL. IHC with CALBINDIN (brown) labeling Purkinje cells originating from the VZ (H–J) and with PAX6 (brown) labeling granule neurons originating from the rhombic lip (K–M) confirmed these results. The distinct expression pattern between anterior and posterior as well as medial and lateral cerebellum as described at E14.5 was still observed at E16.5 (E–G; N and P). Results obtained with ISH were confirmed by IHC with a GDF10 antibody (O). (ant: anterior; med: medial; post: posterior; RL: rhombic lip; VM: velum medullare; VZ: ventricular zone).

cerebellum was strongly reduced (Fig. 4C, G, L). Major alterations were observed in the mantle layer, where we detected only scattered *Gdf10*-positive glial cells (Fig. 4C,G,L). Never-

theless the VZ of the prospective velum medullare maintained a stronger expression of *Gdf10* (arrows in Fig. 4C, L) similar to the expression observed in controls (arrows in Fig. 4A, E).

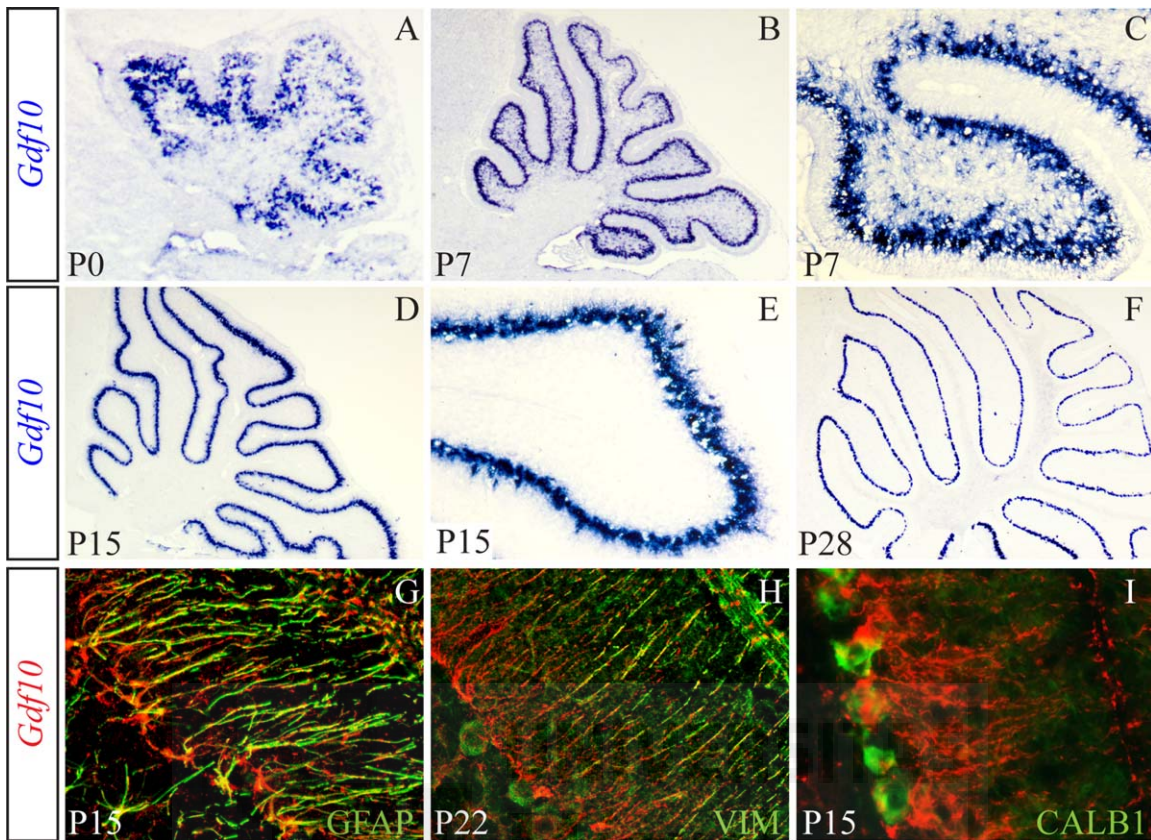


FIGURE 3: Expression of *Gdf10* at postnatal stages. At early postnatal stages *Gdf10* was located in a broad band inside and below the Purkinje cell layer (A–C). This band narrowed down until P28, when *Gdf10*-positive cells were present in a thin band within the Purkinje cell layer exclusively (D–F). Fluorescent ISH with *Gdf10* demonstrated colocalization with GFAP and VIMENTIN (G, H) whereas it did not show coexpression with the Purkinje cell marker CALBINDIN (I).

Additionally, *Gdf10* expression was also maintained in the VZ adjacent to the RL, as observed in lateral sections of the cerebellum (arrows in Fig. 4D, H, M), whereas, similar to the medial cerebellum, *Gdf10* expression was highly reduced in the mantle layer. Therefore, *Gdf10* expression was highly downregulated in *Sbb* conditional mutants, but maintained at slightly lower levels in the VZ adjacent to RL and the presumptive velum medullare (Fig. 4C,D,G,H,L,M).

We further investigated whether the down regulation of *Gdf10* has an influence on the expression of glial markers NESTIN and VIMENTIN, on CALBINDIN expressed in Purkinje cells and on glial and Purkinje cell migration. Surprisingly, we found that the expression of the most prominent glial markers NESTIN and VIMENTIN was unchanged. Glial cell migration took still place, but showed cellular profiles and radial glia fibers with slightly disrupted distribution at this stage of development (Fig. 4A–H). Also the expression of CALBINDIN was unaffected but the migration of Purkinje cells appeared altered (Fig. 4I–M).

To proof the data obtained by ISH and IHC we performed quantitative RT-PCR (qPCR) of E18.5 cerebella for *Gdf10*, *Nestin* and *Vimentin* (Fig. 5). Therefore, each cerebellum

was dissected into five parts as illustrated in Fig. 5A. Lateral parts were named X1 and X5, intermediate parts were named X2 and X4 and medial/ vermal cerebellum was named X3.

The analysis of pooled total mRNA revealed a highly significant down regulation of *Gdf10* expression levels in *Sbb* conditional mutants as compared to control embryos, whereas *Nestin* and *Vimentin* total mRNA levels were unchanged (Fig. 5B).

As described above, *Gdf10* expression differed between medial and lateral cerebellum at prenatal stages with a high expression along the midline and in the lateral cerebellum and a relatively low expression in intermediate zones. Furthermore *Gdf10* expression was reduced in *Sbb* deficient mice, but there were certain areas, such as the VZ of the prospective velum medullare and the VZ adjacent to the RL where a stronger expression of *Gdf10* was maintained. Thus, in order to detect regional differences in expression of *Gdf10* in *Sbb* deficient mice, we decided to analyze each cerebellar section (X1–X5).

The mean expression fold of *Gdf10* reflected the results observed by ISH and IHC, showing a more than 2-fold

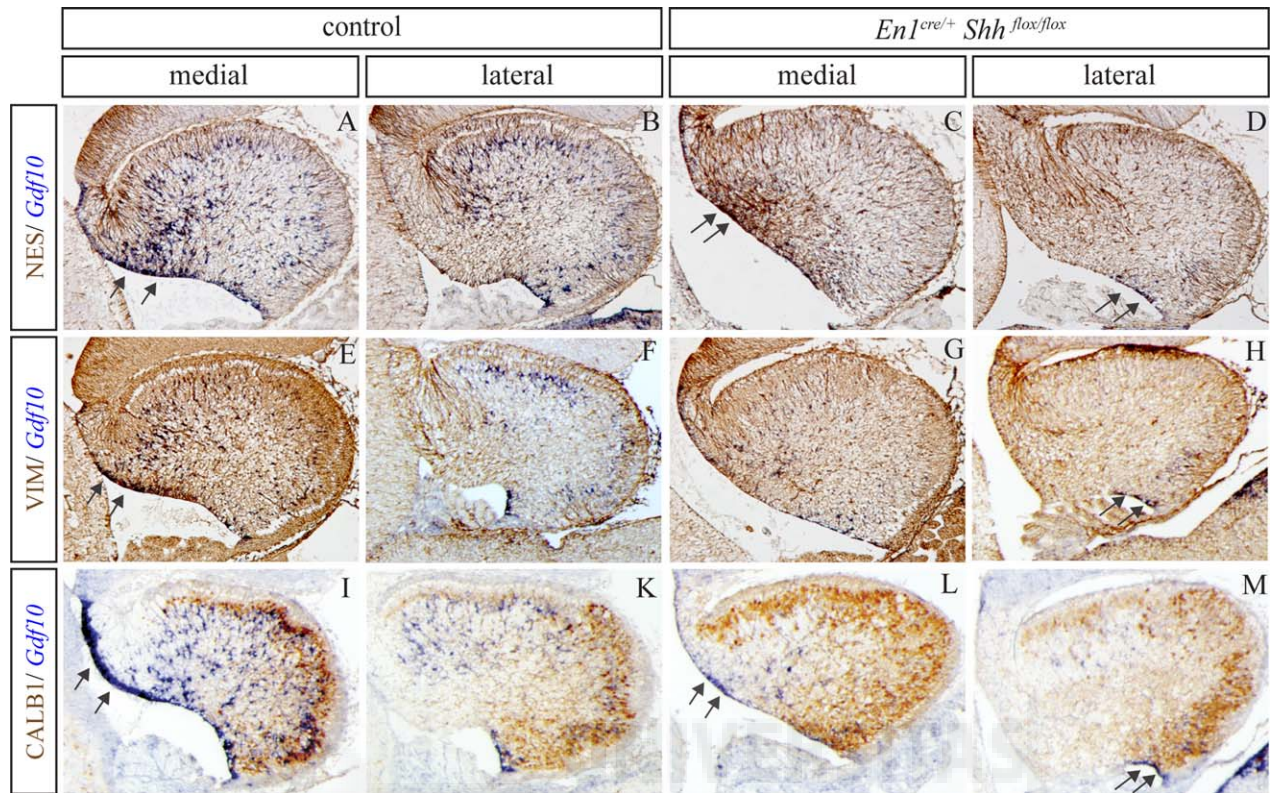


FIGURE 4: *Gdf10* expression is down regulated in *Shh* conditional mutants. *Gdf10* expression was analyzed in *En1^{cre/+}/Shh^{flox/flox}* mice. *Gdf10* expression was highly down regulated in conditional mutants but not completely lost (C, D, G, H, L, M). Expression was maintained in the ventricular zone adjacent to the rhombic lip, as observed in lateral sections of the cerebellum (arrows in D, H, M). Moreover, *Gdf10* expression was preserved in a particular area of the midline VZ (arrows in C, L). This area also showed especially high *Gdf10* expression under wild-type conditions (arrows in A, E, I). In contrast prominent glial markers NESTIN and VIMENTIN as well as glial cell migration were unchanged at this stage of development (A–H). The distribution of CALBINDIN positive cells, labeling Purkinje neurons, was not altered (I–M), but shows an altered migration of this population (L, M).

higher expression of *Gdf10* in the cerebellar vermis as compared to the cerebellar hemispheres (Fig. 5C). Even in the absence of *Shh* expression levels in the vermis were highly reduced but still more than twice as high as in the lateral hemispheres.

Normalizing *Gdf10* to 100% of the control signal, the reduction of *Gdf10* became even more apparent showing a significant reduction of *Gdf10* in each analyzed fraction (Fig. 5D). In contrast *Nestin* and *Vimentin* mRNA levels were relatively equal and unchanged between the different fractions X1–X5 (Fig. 5C,D). The only exception we observed was a decrease in *Nestin* expression levels in X4 and X5. However, the overall expression did not seem to be affected by the loss of *Shh* at this stage of development.

Finally, we investigated whether the *Gdf10* decreased expression in *Shh* conditional mutants at E18.5 can also be observed in the postnatal cerebellum. At P7, we observed a rostrocaudal gradient in terms of phenotypical changes, with a phenotype more severe in rostral cerebellum and relatively mild in caudal cerebellum as indicated by the dashed line (Fig. 6A–H). In the rostral cerebellum we observed strong

foliation defects accompanied by a misexpression of CALBINDIN, NEUN, and GFAP as previously described (Lewis et al., 2004) as well as a strong reduction of *Gdf10* expression. In the caudal cerebellum we observed milder foliation defects, which go along with milder defects in cerebellar layer formation and the expression of corresponding proteins (Fig. 6A–H). Also *Gdf10* expression in the caudal cerebellum was not as strongly affected as in rostral cerebellum. Nevertheless, even in the less affected caudal portion Purkinje cells as well as Bergmann glial cells were not able to organize a proper Purkinje cell layer (Fig. 6A,B, and E–H) and the lack of *Shh* produced by Purkinje neurons generated alterations in the formation of the granule cell layers as previously described (Lewis et al., 2004) (Fig. 6C,D).

A possible explanation for the observed rostrocaudal phenotypic differences could lie in the secretion of SHH from the hindbrain choroid plexus (hChP), which thereby delivers the protein transventricularly via the cerebrospinal fluid (CSF) to the VZ of the cerebellum (Huang et al., 2009, 2010).

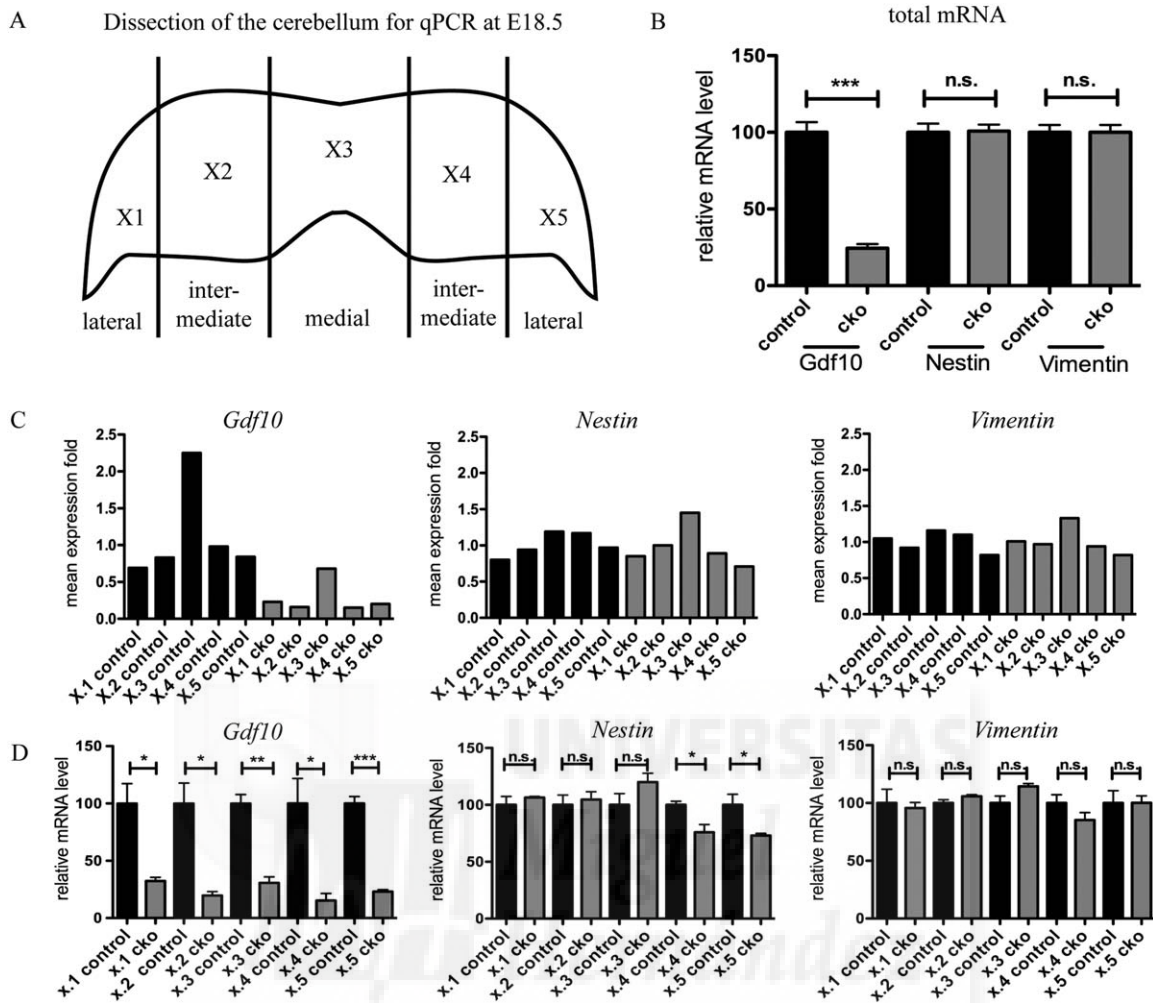


FIGURE 5: Quantitative RT-PCR of *Gdf10*, *Nestin*, and *Vimentin*. Quantitative PCR was performed on E18.5 cerebella for *Gdf10*, *Nestin* and *Vimentin*. Each cerebellum was dissected into five parts as illustrated in A. The analysis of pooled total mRNA expressions levels revealed a highly significant down regulation of *Gdf10* in *Shh* conditional mutants as compared to control animals, whereas *Nestin* and *Vimentin* mRNA levels were unchanged (B). The mean expression fold of *Gdf10* in each cerebellar section reflected the results observed by ISH and IHC, showing a more than 2-fold higher expression of *Gdf10* in the cerebellar vermis compared to the cerebellar hemispheres (C). Even in the absence of *Shh*, *Gdf10* expression levels in the vermis were highly reduced but still more than twice as high as in the lateral hemispheres. Normalizing *Gdf10* to 100% of the control signal, the reduction of *Gdf10* became even more apparent showing a significant reduction of *Gdf10* expression in each analyzed fraction (D). In contrast *Nestin* and *Vimentin* mRNA levels were relatively equal and unchanged between the different fractions X1–X5 (C, D). The only exception was a decrease in *Nestin* expression levels in X4 and X5. However, the overall expression does not seem to be affected by the loss of *Shh*, at least at this stage of development (B).

Discussion

This work demonstrated that *Gdf10* is strongly expressed in glial cells of the cerebellum. The expression pattern was characterized in detail by *in situ* hybridization and by cell fate analysis during embryonic and postnatal stages. The results demonstrated that *Gdf10* labels Bergmann glial cells from the moment they are generated, around E14 (Sudarov et al., 2011) suggesting a potential role of *Gdf10* in the transition from radial glia to Bergmann glia. In this section we would like to highlight and focus on the expression of *Gdf10* in the RL as well as the down regulation of *Gdf10* in conditional *Shh* mutants.

Gdf10 Expression in the Rhombic Lip

The concept of two germinal cerebellar territories of which each gives rise to specific cell types has been proposed for many years. The VZ thereby has been postulated to give rise to GABAergic neurons and glial cells, whereas the RL gives rise to glutamatergic neurons (Carletti and Rossi, 2008; Sotelo, 2004). As clearly compartmentalized as the origin of these cerebellar subtypes, is the expression of transcription factors, and proteins specific for each group of cells. Neuronal precursors originating from the VZ express *Ptf1a*, radial glial cells from the VZ express GLAST and *tenascin-C* and precursors originating from the RL express *Math1* (Buffo and Rossi,

2013; Carletti and Rossi, 2008; Sotelo, 2004; Yamada and Watanabe, 2002). Thus, it was very surprising to discover a gene that is expressed exclusively in glial cells and is not restricted to an

expression in the VZ, but is also present in the RL. From our studies we cannot conclude a specific role for *Gdf10* in the RL, but we would like to highlight some possibilities.

During the past decade, investigations started on the stem cell potential of astroglia during postnatal development (Guo et al., 2013; Sievers et al., 1994; Silbereis et al., 2009, 2010; Sottile et al., 2006). It was demonstrated that Bergmann glia indeed express stem cell markers such as Sox2 and Sox9 and that early postnatal GFAP-expressing cells produce only astrocytes and Bergmann glia in the adult cerebellum (Guo et al., 2013; Sottile et al., 2006). At postnatal stages astroglial cells in the external granule layer (EGL) were shown to generate a subset of granule cells indicating a role for glial cells as neuronal precursor cells (Silbereis et al., 2010). Additionally, GFAP⁺ cells located in the EGL were shown to transiently generate GABAergic interneurons in the postnatal cerebellum (Silbereis et al., 2009) again suggesting a multipotency of these astroglia. Whether or not this type of multipotent astroglia can be characterized by the expression of specific proteins, distinguishing them from other astroglia, was not shown yet. These results do not explore the origin of these progenitor cells, but they support the idea of the existence of multipotent glial progenitor cells, which, due to their presence in the EGL, might originate from the RL.

Another study by Alcaraz and colleagues prompted us to analyze the interrelations between glial progenitor cells and *Gdf10*. This study focused on the role of the 30-zinc finger transcription factor *Zfp423* in cerebellar development and discovered that the loss of this transcription factor causes major defects during cerebellar development. For example, they observed an abnormal differentiation and migration of Bergmann glia, which was accompanied by a reduction of *Gdf10* expression at the lateral edges of the cerebellum. In addition, they noticed that *Gdf10*-positive cell bodies do not infiltrate the cerebellar cortex at E15.5, but remain in the posterior portion of the VZ, adjacent to the RL. Furthermore they

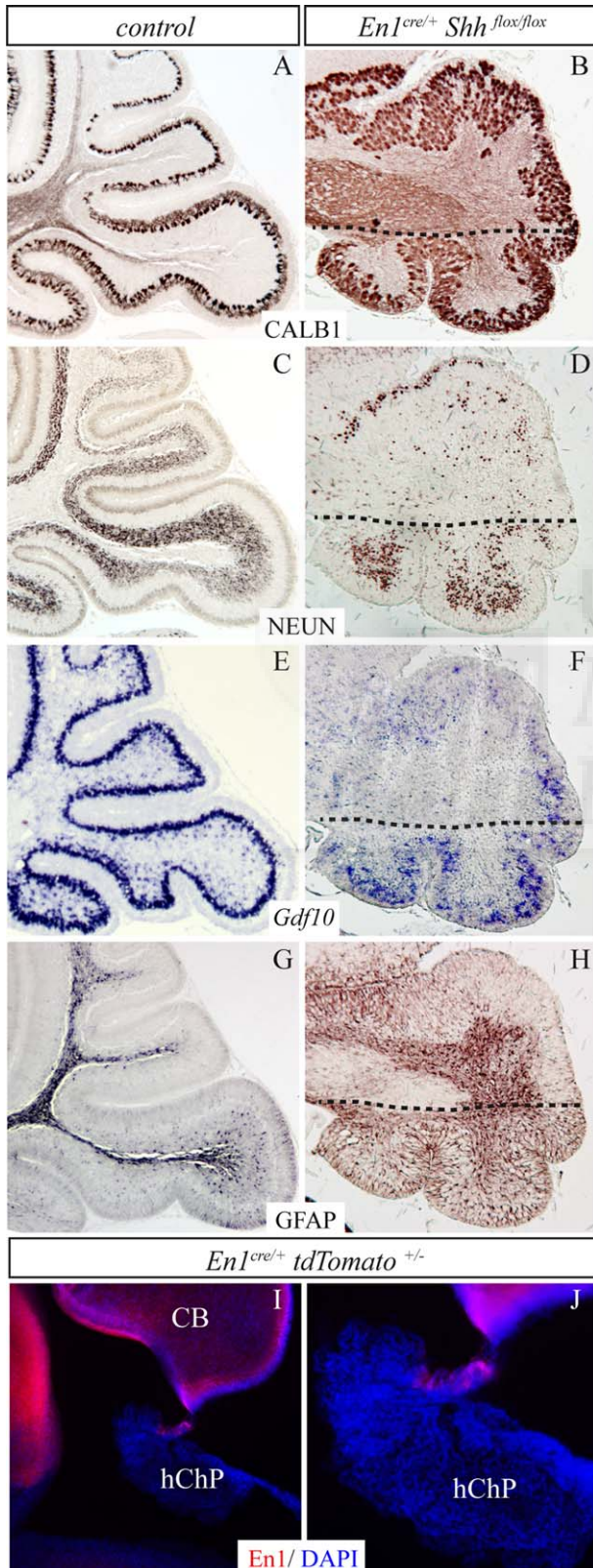


FIGURE 6: Postnatal alterations in *Shh* conditional mutants. Sagittal sections of a P7 cerebellum stained for CALBINDIN showed that Purkinje cells were highly disorganized as compared to controls (A, B). Phenotypical differences between highly affected rostral cerebellum and less affected caudal cerebellum are indicated by the dashed line in B, D, F, H. The lack of SHH production by Purkinje cells generated a clear alteration in the proliferation and migration of granule cells, labeled with NeuN (C, D). *Gdf10* expression was clearly down regulated in Bergmann glial cells. Even in less affected caudal cerebellum remaining *Gdf10*-positive cells were not able to localize properly within the Purkinje cell layer (E, F). Also the distribution of GFAP-positive cells was highly affected (G, H) The inactivation of *Shh* in the *En1* driven conditional mutant takes place in the whole cerebellum including the rhombic lip and a small portion of the choroid plexus as illustrated here in an E18.5 *En1*^{cre/+} *tdTomato*^{+/-} embryo (I, J).

observed reduced levels of proliferation in both germinal zones, but particularly in the midline EGL. This reduction correlates with a temporal shift in cell fate of *Math1*-positive precursors in the RL, from progenitors of hindbrain nuclei and some of the most anterior cerebellar granule cells at E10.5–E12.5 to predominantly granule cells at E13.5–E16.5 (Alcaraz et al., 2006). The observed regional defects in the posterior portion of the VZ, adjacent to the RL, together with shift in cell fate of *Math1*-positive precursors originating from the RL, support our hypothesis that *Gdf10* might be involved in the generation of glial precursors in the RL. Nevertheless, these studies only point to one possible role of *Gdf10* in cerebellar development. Additional fate mapping studies are necessary to address this question in detail.

Gdf10* is Regulated by *Shh

Purkinje cells constantly secrete SHH and thereby induce Bergmann glia differentiation (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). The exact mechanism behind this differentiation still needs to be elucidated. To investigate a possible regulation of *Gdf10* by *Shh*, *En1*^{cre/+}; *Shh*^{lox/lox} mice we analyzed the expression of *Gdf10* mRNA in these conditional mutants. We were able to show that the loss of *Shh* leads to an overall strong reduction of *Gdf10* expression in the cerebellum, which we also quantified by qPCR at E18.5.

However, the results obtained by *in situ* hybridization revealed a persistent, although reduced, *Gdf10* expression in the posterior VZ despite the loss of *Shh*. This retained *Gdf10* expression in the caudalmost VZ might be attributed to SHH secreted from the hindbrain choroid plexus (hChP) into the cerebro-spinal-fluid (CSF). Huang and colleagues demonstrated that the hChP produces SHH from E12.5, and secretes the protein into the CSF of the 4th ventricle (Huang et al., 2009, 2010). The authors claim that transventricular delivery of SHH is essential to early cerebellar VZ development in particular for radial glial cell proliferation and the expansion of GABAergic interneurons (Huang et al., 2010).

The inactivation of *Shh* in the *En1* driven conditional mutants only affects a small portion of the hChP (Fig. 6I,J). Thus, in our mutants SHH is still produced and secreted into the CSF and could therefore partially compensate for the loss of SHH in those areas of the cerebellum that are exposed to high levels of secreted SHH such as the nearby caudal cerebellum. Therefore it is possible that SHH from the CSF keeps *Gdf10* transcription activated in cells located in the VZ adjacent to the RL. This would subsequently lead to a persistent *Gdf10* expression in these areas as observed in our mutants. Thus, the fact, that the down regulation of *Gdf10* expression in these areas is not as strong as in areas that are not exposed to high SHH levels supports our concept of a *Shh*-dependent regulation of *Gdf10* in the cerebellum.

We also characterized *Nestin* and *Vimentin* expression in these mice. In general, immunohistochemistry and qPCR analyses with *Nestin* and *Vimentin* demonstrated that mRNA expression levels were not affected by the loss of *Shh* and the subsequent down regulation of *Gdf10*, but glial cell morphology and glial cell migration was slightly disrupted. This morphological phenotype of radial glial cells may be secondary to the lacking of normal development of granular and molecular layers. The characterization of the Purkinje neuron migration at E18.5 displayed certain alterations. However, it was shown in other *Shh* conditional mutants that there is no obvious Purkinje cell phenotype at E18.5. In contrary to P5 mutant mice, which show a reduced number of Purkinje cells, as well as a malformed Purkinje cell layer (Lewis et al., 2004). In our conditional mutant at P7, the number of Purkinje neurons does not seem to be affected, but their distribution is heavily altered. Lewis and colleagues also characterized Bergmann glial cells in different *Shh* mutants and found that Bergmann glial cells at E18.5 show a normal appearance whereas at P5 they are dislocated. The authors suggest, that this is a secondary effect due to disorganization of the Purkinje neurons and possibly a lack of granule cell's parallel fibers, evidenced by the presence of GFAP-expressing glial fibers that surround CALBINDIN-D28-expressing Purkinje neurons at P5 and P13 (Lewis et al., 2004). Our data at P7 confirmed previously described phenotypes, but displayed a clear rostrocaudal phenotypical gradient, which could be attributed to the secretion of SHH from the hChP as mentioned before.

However, here we could show for the first time, that even though *Nestin* and *Vimentin* expression in Bergmann glia are unchanged in *Shh* conditional mutants at E18.5, *Gdf10*, specifically expressed in this cerebellar cell type, is highly affected by the loss of *Shh* as early as E18.5. This fast reduction of *Gdf10* expression is even more striking taking into account, that *Shh* only starts to be expressed in Purkinje cells one day earlier, at E17.5 (Corrales et al., 2004; Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Lewis et al., 2004). This suggests a direct regulation of glial development by *Shh* rather than a secondary influence on glial cell development due to a disrupted Purkinje cell development at postnatal stages. Furthermore *Gli1* and *Gli2*, two of the most prominent down stream targets of the *Shh* signaling machinery, are both expressed in Bergmann glial cells and although Bergmann glia form in *Gli2* conditional knock-out mutants, their fibers are disorganized (Corrales et al., 2004). This additionally supports our hypothesis that *Shh* signaling could have a direct effect on Bergmann glia differentiation.

In summary, our studies illustrate a detailed characterization of *Gdf10* expression throughout development. We were able draw attention to the expression of *Gdf10* in both germinal compartments of the cerebellum, the RL as well as the VZ, highlighting a possible role for *Gdf10* in the differentiation of neural precursors. Furthermore we could show that

there is an early down regulation of this Bergmann glia specific gene in conditional *Shh* mutants, which suggests a proximate regulation of glial development by *Shh* rather than a secondary influence on glial cell development due disrupted Purkinje cell development at postnatal stages.

Acknowledgment

Grant sponsor: Ministerio de Economía y Competitividad, FEDER Fonds; Grant numbers: BFU2010–16548; BFU2011–27326; Grant sponsor: Consolider; Grant number: CSD2007-00023; Grant sponsor: European commission EUCOMMTOOLS; Grant number: 261492; Grant sponsor: Predoctoral Program of the “Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Ampliación de Estudios”.

The authors thank Annette Hammes-Lewin for critical reading of the manuscript.

References

Alcaraz WA, Gold DA, Raponi E, Gent PM, Concepcion D, Hamilton BA. 2006. Zfp423 controls proliferation and differentiation of neural precursors in cerebellar vermis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19424–19429.

Buffo A, Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* 109:42–63.

Carletti B, Rossi F. 2008. Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist* 14: 91–100.

Corrales JD, Rocco GL, Blaess S, Guo Q, Joyner AL. 2004. Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* 131:5581–5590.

Cunningham NS, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Reddi AH, Lee SJ. 1995. Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors* 12:99–109.

Dahmane N, Ruiz i Altaba A. 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089–3100.

Diamandis EP, Christopoulos TK. 1991. The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 37:625–636.

Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. 1999. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126:3585–3596.

Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, Rosenfeld MG, Hamilton BA. 2003. ROR[alpha] coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* 40:1119–1131.

Guo Z, Wang X, Xiao J, Wang Y, Lu H, Teng J, Wang W. 2013. Early postnatal GFAP-expressing cells produce multilineage progeny in cerebrum and astrocytes in cerebellum of adult mice. *Brain Res* 1532:14–20.

Hino J, Takao M, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H, Kangawa K. 1996. cDNA cloning and genomic structure of human bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b). *Biochem Biophys Res Commun* 223:304–310.

Huang X, Ketova T, Fleming JT, Wang H, Dey SK, Litingtung Y, Chiang C. 2009. Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. *Development* 136:2535–2543.

Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, Litingtung Y, Chiang C. 2010. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8422–8427.

Jensen P, Smeyne R, Goldowitz D. 2004. Analysis of cerebellar development in math1 null embryos and chimeras. *J Neurosci* 24:2202–2211.

Mecklenburg et al.: *Gdf10* in Bergmann Glia Regulated by *Shh*

Katoh Y, Katoh M. 2006. Comparative integromics on BMP/GDF family. *Int J Mol Med* 17:951–955.

Kimmel RA, Turnbull DH, Blanquet V, Wurst W, Loomis CA, Joyner AL. 2000. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* 14:1377–1389.

Koirala S, Corfas G. 2010. Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PLoS ONE* 5:e9198.

Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. 2001. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105:599–612.

Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP. 2004. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270:393–410.

Louvi A, Alexandre P, Métin C, Wurst W, Wassef M. 2003. The isthmic neuroepithelium is essential for cerebellar midline fusion. *Development* 130:5319–5330.

Martinez S, Alvarado-Mallart RM. 1989. Rostral cerebellum originates from the caudal portion of the so-called ‘mesencephalic’ vesicle: A study using chick/quail chimeras. *Eur J Neurosci* 1:549–560.

Miale IL, Sidman RL. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4:277–296.

Perez-Balaguer A, Puelles E, Wurst W, Martinez S. 2009. Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mech Dev* 126:301–313.

Rakic P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141:283–312.

Rong Y, Wang T, Morgan JI. 2004. Identification of candidate Purkinje cell-specific markers by gene expression profiling in wild-type and *pcd3J* mice. *Brain Res Mol Brain Res* 132:128–145.

Sievers J, Pehlemann FW, Gude S, Hartmann D, Berry M. 1994. The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP- positive cells in the external granular layer. *J Neurocytol* 23:97–115.

Silbereis J, Cheng E, Ganat YM, Ment LR, Vaccarino FM. 2009. Precursors with glial fibrillary acidic protein promoter activity transiently generate GABA interneurons in the postnatal cerebellum. *Stem Cells* 27:1152–1163.

Silbereis J, Heintz T, Taylor MM, Ganat Y, Ment LR, Bordey A, Vaccarino F. 2010. Astroglial cells in the external granular layer are precursors of cerebellar granule neurons in neonates. *Mol Cell Neurosci* 44:362–373.

Sotelo C. 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 72:295–339.

Sottile V, Li M, Scotting PJ. 2006. Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res* 1099:8–17.

Sudarov A, Turnbull RK, Kim EJ, Lebel-Potter M, Guillemot F, Joyner AL. 2011. *Ascl1* genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly. *J Neurosci* 31:11055–11069.

Wechsler-Reya RJ, Scott MP. 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22:103–114.

Yamada K, Watanabe M. 2002. Cyto differentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 77:94–108.

Yuasa S, Kawamura K, Kuwano R, Ono K. 1996. Neuron-glia interrelations during migration of Purkinje cells in the mouse embryonic cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 14:429–438.

Yuasa S, Kawamura K, Ono K, Yamakuni T, Takahashi Y. 1991. Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat Embryol* 184:195–212.

Zhao R, Lawler AM, Lee S-J. 1999. Characterization of GDF-10 expression patterns and null mice. *Dev Biol* 212:68–79.

Role of *Shh* in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1

J. A. Moreno-Bravo · A. Perez-Balaguer ·
J. E. Martinez-Lopez · P. Aroca · L. Puelles ·
S. Martinez · E. Puelles

Received: 16 January 2013 / Accepted: 25 February 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Hindbrain rhombomeres in general are differentially specified molecularly by unique combinations of *Hox* genes with other developmental genes. Rhombomere 1 displays special features, including absence of *Hox* gene expression. It lies within the hindbrain range of the *Engrailed* genes (*En1*, *En2*), controlled by the isthmic organizer via diffusion of FGF8. It is limited rostrally by the isthmus territory, and caudally by rhombomere 2. It is double the normal size of any other rhombomere. Its dorsal part generates the cerebellar hemispheres and its ventral part gives rise to several populations, such as some raphe nuclei, the interpeduncular nucleus, the rhabdoid nucleus, anterior, dorsal, ventral and posterodorsal tegmental nuclei, the cholinergic pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei, rostral parts of the hindbrain reticular formation, the locus coeruleus, and part of the lateral lemniscal and paralemniscal nuclei, among other formations. Some of these populations migrate tangentially before reaching their final positions. The morphogen Sonic Hedgehog (*Shh*) is normally released from the local floor plate and underlying notochord. In the present report we

explore, first, whether *Shh* is required in the specification of these r1 populations, and, second, its possible role in the guidance of tangentially migrating neurons that approach the midline. Our results indicate that when *Shh* function is altered selectively in a conditional mutant mouse strain, most populations normally generated in the medial basal plate of r1 are completely absent. Moreover, the relocation of some neurons that normally originate in the alar plate and migrate tangentially into the medial basal plate is variously altered. In contrast, neurons that migrate radially (or first tangentially and then radially) into the lateral basal plate were not significantly affected.

Keywords Tangential migration · Radial migration · Lateral lemniscus nuclei · Pedunculopontine nucleus · Interpeduncular nucleus · Tegmental nuclei · Isthmus · Hindbrain

Abbreviations

ATg	Anterior tegmental nucleus
CA	Caudal apical interpeduncular subnucleus
Cb	Cerebellum
cDR	Caudal dorsal raphe nucleus
Ch	Choroid tela
CLi	Caudal linear nucleus
DLL	Dorsal nucleus of the lateral lemniscus
DR	Dorsal raphe
DTg	Dorsal tegmental nucleus
gV	Trigeminal ganglion
III	Oculomotor nucleus
IF	Interfascicular nucleus
Inc	Nucleus incertus
ILL	Intermediate nucleus of the lateral lemniscus
IOC	Inferior olive complex
IP	Interpeduncular nucleus

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00429-013-0534-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. A. Moreno-Bravo · A. Perez-Balaguer ·
J. E. Martinez-Lopez · S. Martinez · E. Puelles (✉)
Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC, Campus de San Juan,
Av. Ramón y Cajal S/N, Sant Joan d'Alacant,
03550 Alicante, Spain
e-mail: epuelles@umh.es

P. Aroca · L. Puelles
Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología,
Facultad de Medicina, Universidad de Murcia,
Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

IPC	Caudal part of the interpeduncular nucleus
IPL	Intermediate paralemniscal nucleus
IPR	Rostral part of the interpeduncular nucleus
Is	Isthmus
isDR	Isthmic dorsal raphe nucleus
IV	Trochlear nucleus
IV ventr	Fourth ventricle
LC	Locus coeruleus
LDTg	Laterodorsal tegmental nucleus
m (1–2)	Mesomere (1–2)
Mes	Mesencephalon
MesV	Mesencephalic trigeminal nucleus
MnR	Median raphe nucleus
p (1–3)	Prosomere (1–3)
PAG	Periaqueductal gray
PB	Parabrachial nucleus
PDTg	Posterodorsal tegmental nucleus
PPnR	Prepontine raphe nucleus
PPTg	Pedunculopontine tegmental nucleus
Pro	Prodromal nucleus
r (1–11)	Rhombomeres (1–11)
r1SuLR	Rhombomere 1 suprallemniscal raphe complex
RA	Rostral apical interpeduncular subnucleus
Rbd	Rhabdoid nucleus
Ret	Reticular formation
Rf	Raphe formation
Rhomb	Rhombencephalon
RN	Red nucleus
SNC	Substantia nigra compacta
sc	Spinal cord
Sph	Sphenoid nucleus
SVe	Sensitive vestibular complex
Svp	Principal sensitive trigeminal nucleus
v	Ventricle
V	Trigeminal nucleus
VI	Abducens nucleus
VII	Facial nucleus
VLL	Ventral nucleus of the lateral lemniscus
Vm	Trigeminal motor nucleus
VTg	Ventral tegmental nucleus

Introduction

The developing hindbrain is subdivided along the antero-posterior axis into segmental neuromeres widely known as rhombomeres (Fig. 1; Vaage 1969; Lumsden 1990; Puelles 2001; Aroca and Puelles 2005). A common structural characteristic of these segments is the presence of superposed longitudinal domains or zones, which represent a result of dorsoventral patterning. From dorsal to ventral the primary longitudinal zones are the roof, alar, basal and

floor plates (Shimamura et al. 1995; Puelles 2001, 2013 in press). The roof plate of all rhombomeres is highly specialized and constitutes the choroidal tela of the fourth ventricle that is complemented by the cerebellar and isthmus non-choroidal median roof domains. Rostral hindbrain levels the alar plate develops sensory nuclei (e.g., vestibular, trigeminal) and other analyzer formations, such as the cerebellum itself, or parabrachial, lemniscal, paralemniscal and isthmus nuclei. The basal plate usually develops motoneurons (though not so at r1 level), serotonergic raphe populations (Alonso et al. 2012) and various neurons of the medial reticular formation. The floor plate consists of a neuron-poor astroglial palisade known as the hindbrain raphe (raphe nuclei lie at both sides of this landmark). A complex neuronal formation that comes to occupy the ventromedian floor area in r1 is the interpeduncular nucleus (Lorente-Cánovas et al. 2012). Similarly as occurs in the spinal cord, the alar and basal plates of the hindbrain result minutely patterned along the DV dimension, producing each a number of molecularly distinct microzones. These represent homogeneous progenitor domains where characteristic neuronal types are produced (Lorente-Cánovas et al. 2012; Puelles 2013 in press).

The hindbrain neuromeres can be grouped in four regions (Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet] 2009). The isthmus, r1 and r2 are located in the prepontine area, r3 and r4 form the pons proper (defined by the basilar

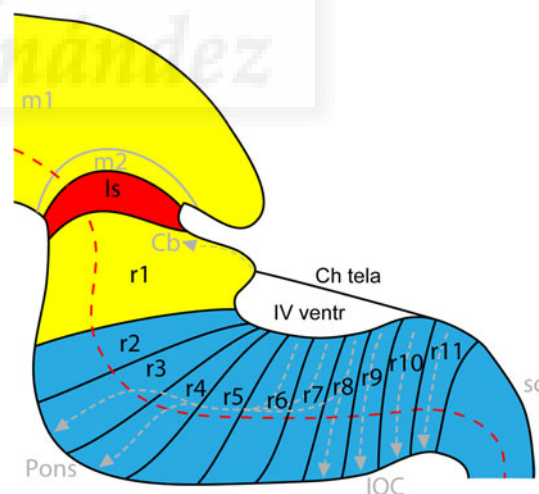


Fig. 1 Isthmus and r1 as rostral hindbrain domains. Schematic position of r1 relative to general brainstem organization, according to the updated prosomeric model. We emphasize the hindbrain and instances of tangential migration occurring in this region. The red color represents the isthmus, the blue color indicates the expression pattern of *Hoxa2* in rhombomeres 2–11 and beyond, the yellow color shows the *En1* expression pattern across midbrain and rhombomere 1, including the isthmus), illustrating where *Shh* was deleted in the conditional mutant mouse. The red dashed line indicates the alar-basal boundary. The gray dashed arrows indicate the principal tangential migrations taking place in the hindbrain

pontine nuclei and the reticulotegmental nucleus), r5 and r6 represent a pontomedullary transition area and r7 to r11 (Cambronero and Puelles 2000; Marín et al. 2008; Puelles 2013 in press) constitute the medullary region of the hindbrain (Fig. 1). In general, the specific anteroposterior identities of the different rhombomeres are established by unique combinations of transcription factors of the *Hox* gene family, associated to other markers (Marín et al. 2008; Alexander et al. 2009). However, the prepontine hindbrain lacks expression of *Hox* family genes; pattern differences emerging across isthmus, r1 and r2 seem to depend rather on gradiental *Fgf8* signals from the isthmus organizer, with a possible contribution of *Irx* family and/or other genes (Echevarria et al. 2005; Aroca and Puelles 2005).

Modern understanding of the prepontine hindbrain in rhombomeric terms has superseded two previously widely accepted anatomic conceptions. First, the concept of the ‘pontine’ region extending up into the r2 and r1 domains (possibly originated because the middle cerebellar peduncle courses through them), and, second, the idea that the ‘caudal midbrain’ contacts the ‘pons’ (see detailed discussion in Alonso et al. 2012, and Puelles 2013 in press).

Our present interest is centered on r1, which is a peculiar and poorly understood rhombomere that requires more detailed developmental analysis. Note we distinguish the rostrally placed isthmus territory as different from r1 proper (it can be conceived as a r0 rhombomere Vieira et al. 2010), though other authors lump isthmus and our r1 together under an ampler ‘r1’ concept. Rhombomere 1 does not express any *Hox* gene, is double in length than other rhombomeres (triple, if you add the isthmus), and does not develop motoneurons. The caudal boundary of r1 coincides with the rostral limit of *Hoxa2* expression in r2 (blue domain in Fig. 1). The Is/r1 boundary is established early on by the caudal limit of *Fgf8* expression at the isthmus (Aroca and Puelles 2005; Aroca et al. 2006). The r1 alar domain gives rise to the extensive cerebellar hemispheres (the vermis being isthmus) and to parts of the vestibular and trigeminal sensory columns (Marín and Puelles 1995; Pasqualetti et al. 2007). Recently, it has been reported that the r1 alar plate also generates diverse neuronal populations that migrate tangentially into the basal plate: the major derivatives of these migrations are the locus coeruleus (Aroca et al. 2006) and the interpeduncular nucleus (Lorente-Cánovas et al. 2012), though others contribute to the lateral lemniscus complex. Remarkably, various neural derivatives of r1 are distributed into rostral and caudal moieties of the neuromere (e.g., body versus flocculonodular lobe of the cerebellum, or the conventional rostral and caudal parts of the interpeduncular nucleus; see also Alonso et al. 2012 as regards raphe nuclei). This relates to the double size of r1 relative to other rhombomeres, and led Vaage (1973) to propose a subdivision into two late

appearing neuromeres, called by him r1a and r1b. One distinct molecular piece of evidence that bespeaks of this r1 subdivision is the expression of *Otx2* in the basal plate, which appears only at the caudal part of r1 (Lorente-Cánovas et al. 2012). It is plausible that the isthmus organizer (red domain in Fig. 1) is causally related to the special anteroposterior patterning characteristics within r1; the genes *Engrailed 1* and *2* induced by the isthmus morphogen *Fgf8* are selectively expressed across isthmus and r1 (Vieira et al. 2010; Alonso et al. 2012).

In the present report, we explore patterning or other roles of the floor plate-derived *Shh* morphogen on the histogenetic pattern of r1. *Shh* is a well-known organizer of ventral specification of the neural tube (Placzek and Briscoe 2005). Along the whole hindbrain, SHH is secreted by the notochord and the floor plate (Echelard et al. 1993), and is reputedly responsible for inducing ventral neuronal cell types in a concentration- and time-dependent manner. Basal neuroepithelial microzones neighboring the floor plate express selectively *Nkx2.9*, *Nkx2.2* and *Nkx6.1* downstream of *Shh* signaling (Briscoe et al. 1999, 2000; Pabst et al. 2000). The *Nkx2.2*-positive domain adjacent to the floor plate characteristically originates the serotonergic raphe populations (Briscoe et al. 1999; Pattyn et al. 2003; Alonso et al. 2012). In the spinal cord, gradiental effects of SHH diffused at larger distances from the floor plate are held to trigger the differentiation program of all neuronal subtypes of the basal plate (Dessaud et al. 2010; Ribes et al. 2010), though less encompassing effects are known more rostrally in the midbrain (Perez-Balaguer et al. 2009) and were found here as well. A detailed analysis of SHH effects at r1 level, where no motoneurons are produced, has not been performed yet (note that trochlear motoneurons are produced at the isthmus, and trigeminal motoneurons are born at r2 and r3). Another postulated developmental role of floor plate signals is to attract both growing axons and tangentially migrating neurons towards the midline (Kennedy et al. 1994; Bloch-Gallego et al. 1999; Alcántara et al. 2000). Many axons approach or cross the floor plate before turning into ascending or descending longitudinal courses (Farmer et al. 2008; Domanitskaya et al. 2010). In addition, migrating neurons are known to originate in the r1 alar plate and translocate tangentially towards the local raphe neighborhood (e.g., some interpeduncular nucleus neurons; Lorente-Cánovas et al. 2012). Similar movements are well-known at the medullary hindbrain region (Bloch-Gallego et al. 2005; Hidalgo-Sánchez et al. 2012).

We therefore analyzed whether *Shh* function is required in the specification of the diverse ventral structures of r1 and also its possible participation in the tangential migration of interpeduncular neurons. We generated a conditional inactivation of *Shh* within r1 driven by the expression of *Engrailed1* (*En1*, yellow domain in Fig. 1a).

We found that loss of function of *Shh* in r1 produced a strong alteration in the neuronal populations generated at the corresponding paramedian and medial basal plate areas. The cell populations generated in the alar plate which normally migrate into the basal plate were present, and generally displayed normal movements oriented towards the raphe and pre-terminal periventricular or tegmental positioning, but the terminal part of the migratory course into the median IP complex was disturbed; indeed, normal median compaction and rostrocaudal distribution into rostral and caudal IP subdivisions was not achieved in the altered animals. In contrast, other alar neurons that normally distribute within the r1 lateral basal plate via secondary radial migration were not affected by the lack of *Shh* function.

There is a group of malformations of the rostral hindbrain in humans known as molar-tooth-sign syndromes (Barkovich 2012), whose symptoms include an enlarged fourth ventricle, hypoplasia of the vermis, an abnormally deep interpeduncular fossa and enlarged cerebellar peduncles (giving this area the aspect of a molar tooth in axial radiographic images). It is hoped that deeper knowledge of the complex developmental processes occurring at the prepontine hindbrain, and particularly within r1, may eventually help our understanding of the causes and progression of this group of syndromes.

Materials and methods

Animals

The day when the vaginal plug was detected was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). The conditional *Shh* mutant mouse was previously reported by Lewis et al. (2001). These mice contain in homozygosis the *Shh*^{tm2AMC} allele (where exon 2 is flanked by LoxP sequences). The *En1*^{cre/+} transgenic line used by us was previously described by Kimmel et al. (2000). The conditional mutant embryos were generated, as previously described in Perez-Balaguer et al. (2009), by crossing double heterozygous mouse males (*En1*^{cre/+}; *Shh*^{flox/+}) with homozygous *Shh* conditional females (*Shh*^{flox/flox}). The R26R-CAG-tdTomato line was obtained from Jackson Laboratories (strain 007905). This reporter line has a loxP-flanked STOP cassette that prevents transcription of the CAG promoter. When this line is crossed with a Cre line, the STOP cassette is excised and a red fluorescent protein variant (tdTomato) is transcribed.

For immunohistochemistry and in situ hybridization, embryos were fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS (PFA 4 %) overnight and completely dehydrated for storage at -20°C . All mouse experiments were performed according

to protocols approved by the Universidad Miguel Hernandez CEIE committee.

Immunohistochemistry

The embryos were wax embedded (Gemcut emerald paraffin, Spieles no. 24364-1), sectioned in parallel series (7 μm thick). The sections were dewaxed and rehydrated. Then, the tissue was incubated with hydrogen peroxide (H_2O_2) at 3 % for 30 min to inactivate the endogenous peroxidase activity. Afterwards, the sections were rinsed three times in phosphate buffer solution with triton at 0.075 % (PBS-T) and then were boiled in sodium citrate (0.01 M), only if the epitope retrieval was needed. Then the tissue was blocked 1 h with PBS-T, Albumin bovine serum (BSA, #A2153-50G Sigma) at 0.1 % and Lysine 1 M at 10 %, next it was incubated overnight at room temperature in PBST, BSA (0.1 %) and sodium azide (0.01 %) with the different antibodies: αPOU4F1 , Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. N° sc8429, 1:20; αISLET1 , Hybridoma Bank Cat. N° 39.4D5, 1:13; $\alpha\text{NKX2.2}$, Hybridoma Bank Cat. N° 74.5A5, 1:7; $\alpha\text{NKX6.1}$, Hybridoma Bank Cat. N° F55A10, 1:20; $\alpha\text{-HT}$, Diasorin Cat. 20080; $\alpha\text{-TH}$, Institute Jacques Boy Cat. N° 268020234, 1:1,000; $\alpha\text{-PAX7}$, Developmental Hybridoma Bank Cat. N° PAX7, 1:100; $\alpha\text{-GAD67}$, Millipore Cat. N° MAB5406, 1:300; $\alpha\text{-RFP}$, MBL Cat. N° PM005, 1:200. The day after, the tissue was rinsed 3 times in PBS-T and incubated 1 h with the appropriate biotinylated secondary antibodies at 1:300. Afterwards, the sections were washed three times in PBS-T, incubated with Avidin–Biotin Complex at 1:300 for 1 h and finally washed in PBS-T (ABC kit; Vector Laboratories CA-94010). For the colorimetric detection (brown), the tissue incubated with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories SK-4100) and 0.003 % H_2O_2 . After this, for double staining, the tissue was dehydrated and rehydrated and incubated with the corresponding biotinylated secondary antibodies and ABC. In this case, for the colorimetric detection (black), the samples were incubated with DAB, H_2O_2 and 0.025 % of ammonium nickel sulfate hexahydrate (Fluka 09885).

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as previously described (Vieira and Martínez 2006). Embryos were wax embedded and sectioned as explained above. The sections were dewaxed and rehydrated. Then, the tissue was post fixed in PFA 4 %. Next, it was rinsed 3 times in PBS, and pre-hybridized with hybridization buffer [Deionized Formamide (Ambion 50 %), Salt sodium citrate (SSC 5 \times , pH 7.4), Heparin (Sigma-Aldrich 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Tween 20 (Sigma-Aldrich, 0.1 %)].

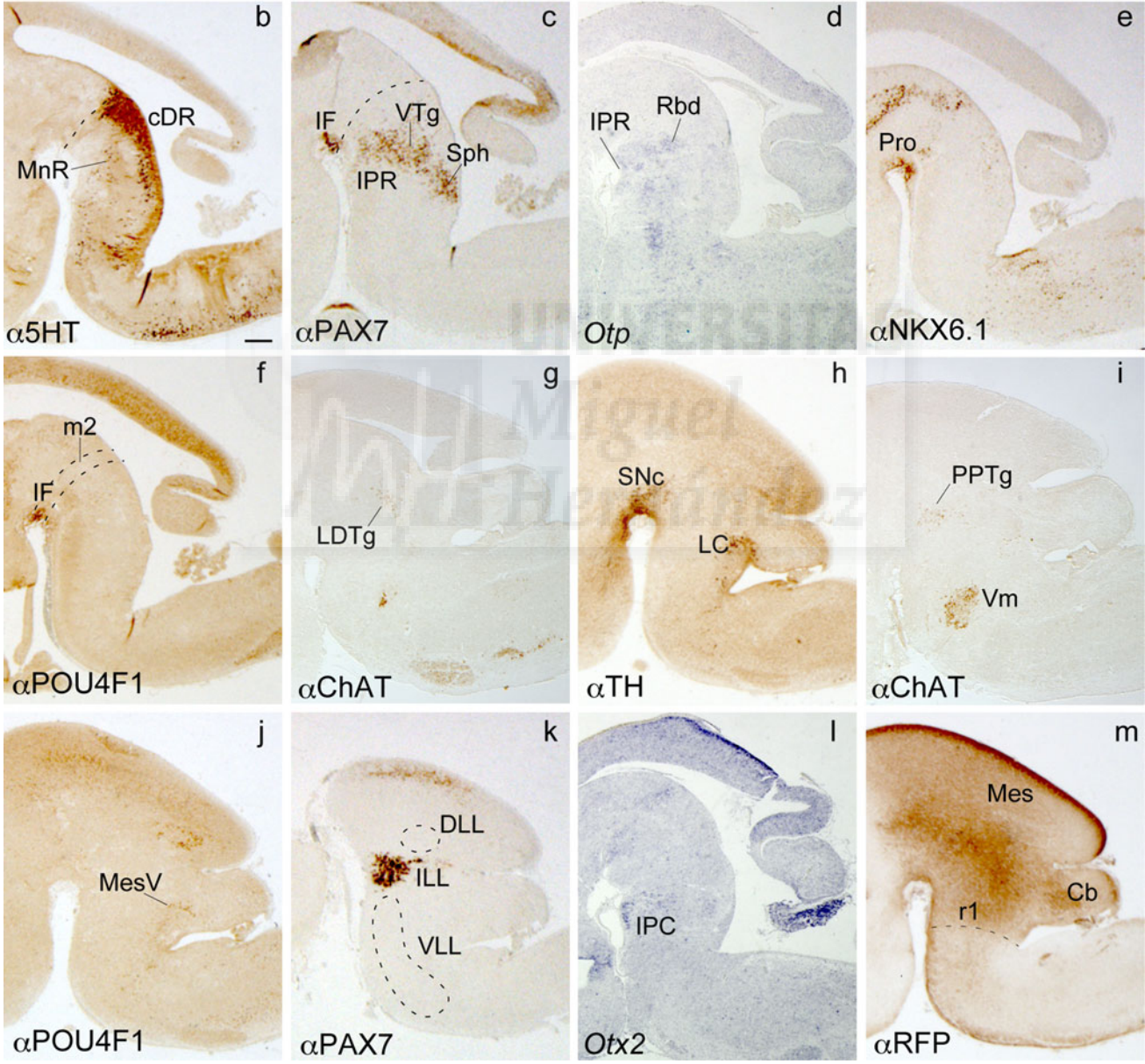
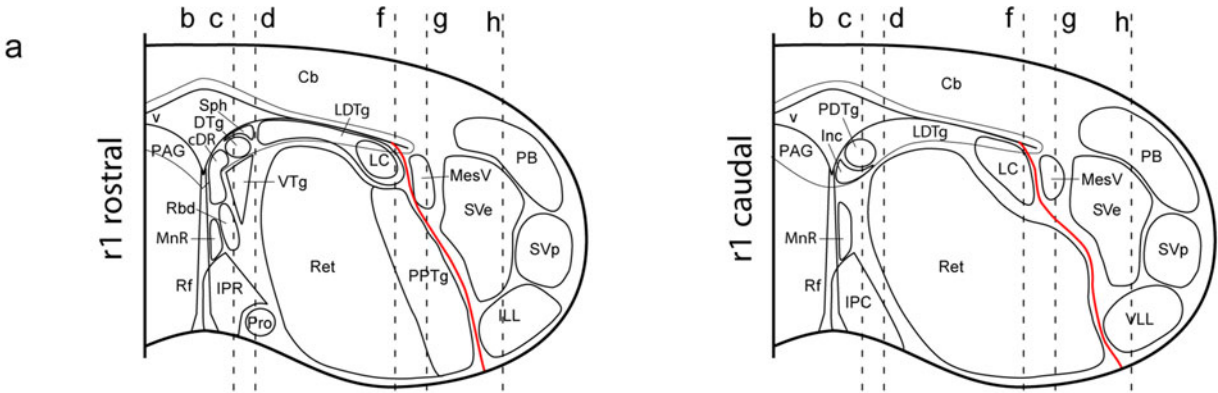
The RNA probes were prepared from constructions kindly provided by Dr. O. Reiner (*Netrin-1*) and Dr. A. Simeone (*Otp*, *Otx2*). These Digoxigenin-labeled RNA probes (DIG-11-UTP, Roche Diagnostics 11209256910) were denaturalized at 80 °C. The tissue was incubated in hybridization buffer with the probes overnight at 62 °C. The samples were washed (SSC 1×, Formamide 50 % and Tween 0.1 %, water 50 %) 3 times at 62 °C. Afterwards, the tissue was blocked in Sheep Serum 10 %, (Sigma-Aldrich, #S3772) and 20 % of blocking reagent (Roche; #11096176001) in MABT 1× (NaCl (150 mM), maleic acid (100 mM, Sigma-Aldrich), NaOH (Sigma-Aldrich) to obtain pH 7.5, and Tween 20 0.1 %) and incubated overnight with an alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin antibody (Roche Diagnostics, #11093274910). Next day, the samples were extensive washing with MABT 1× to remove the traces of non-specific bound antibodies. Before the colorimetric reaction, the samples were incubated in NTMT [NaCl (0.1 M), Tris-HCl (0.2 M, pH 9.5), MgCl₂ (0.05 M) and Tween 20 (0.1 %)]. The NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim) was used as a chromogenic substrate to detect the probes. The alkaline phosphatase reacts with this substrate producing a solid precipitate.

Results

Rhombomere 1 populations

As a preliminary step before analyzing the phenotype of r1 in the absence of *Shh* we will describe and illustrate with appropriate markers normal neuronal populations of this neuromere. The reference atlases and related ontology of the Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet] (2009), developed by L. P., guided this analysis (www.developingmouse.brain-maps.org), apart other sources. The principal structural elements are presented in two schemata of hypothetical transversal sections through the rostral and caudal parts of r1 (Fig. 2a); we represented their mutual mature spatial relationships, regardless of their embryonic origins. Next to the floor plate, in the paramedian sector of the basal plate, we find elements of the hindbrain raphe formation, namely the caudal or r1 part of the dorsal raphe nucleus (cDR) and the median raphe nucleus (MnR), both of them characterized by a serotonergic subpopulation of neurons (Fig. 2a, b). Lateral to the raphe nuclei, the medial part of the basal plate contains rostrally within the periaqueductal stratum the round dorsal tegmental nucleus, which subdivides into core and shell portions, and an associated periventricular cap, the sphenoid nucleus (DTg, Sph; Paxinos and Butcher 1985). The intermediate stratum underlying the DTg is largely occupied by the less compact anterior

and ventral tegmental nuclei, and also shows the thin rhabdoid nucleus (ATg, VTg, Rbd; Paxinos and Butcher 1985); the latter is continuous ventrally with the rostral apical interpeduncular subnucleus, which sits upon the rostral main part of the interpeduncular complex (RA, IPR); both RA and IPR extend into midline areas. The Sph, VTg, ATg, Rbd, RA, and IPR are positive for *Pax7*, though other cell populations may be intermixed, as occurs with *Otp*-positive neurons (Fig. 2a, c, d; see Paxinos and Butcher 1985 for known chemoarchitectonic peculiarities). The *Gad67*-positive DTg is largely devoid of *Pax7* neurons. Caudally to the DTg, the posterodorsal tegmental and incertus nuclei appear in its place, accompanied superficially by the caudal interpeduncular nucleus (PDTg, Inc, IPC; Fig. 2a, right side). As a rostralmost component of the IP complex we corroborated the existence in the mouse of a prodromal nucleus (Pro), that is selectively positive for *Nkx6.1*, and presumptively derives from the isthmus, as recently described in the chick (Fig. 2a, e; Lorente-Cánovas et al. 2012). Just in front of Pro appears the small dopaminergic interfascicular nucleus (IF), selectively positive for *Pou4f1*, which apparently derives from the mesomere 2 (Fig. 2a, f; Hidalgo-Sánchez et al. 2005; Puelles et al. 2012). Laterally to these medial basal nuclei, we find lateral basal elements, which include at periaqueductal level the cholinergic laterodorsal tegmental nucleus (LDTg; Fig. 2a, g), which also partly spills over into the underlying intermediate mantle stratum; the noradrenergic, tyrosine hydroxylase-positive neurons of the locus coeruleus are embedded within the LDTg locus and share a dual periaqueductal and intermediate configuration; the LC is best developed caudally (LC; Fig. 2a, h). The laterobasal intermediate stratum is otherwise occupied by dispersed neurons of the r1 reticular formation (Ret) as well as by intermixed cholinergic neurons of the pedunculopontine tegmental nucleus, selectively present at the rostral part of r1 (PPTg; Fig. 2a, i). At the caudal subregion, the medial basal reticular formation and the IPC contain selectively a population of *Otx2*-positive neurons (Fig. 2a, l; Lorente-Cánovas et al. 2012). The so-called mesencephalic trigeminal nucleus lies adjacent to the LC; it extends back from the original population lying truly in the midbrain (MesV, it is still unclear whether these cells migrate actively out from the midbrain or arise locally secondarily; they do not extend into r2); the MesV is selectively positive for *Pou4f1*, and we ascribe it to the alar plate (Fig. 2a, j). Superficial to the MesV, also within the alar plate, we observe rostrally and caudally the parabrachial nuclear complex (PB), held to be also possibly partly isthmic. Next to PB there appear the r1 parts of the superior vestibular nucleus (SVe) and the principal sensitive trigeminal nucleus (SVp). Ventral to the latter there is the ascending course of the lateral lemniscus with its interstitial. At r1



◀ **Fig. 2** Schematic map of the main neural populations in r1. **a** Schematic representation of ideal transversal sections through rostral and caudal parts of r1, side by side, to highlight some differences. The *dotted lines* indicate the level of representative sagittal sections below. The *red line* represents the alar-basal boundary. **b–k** Selected serial sagittal sections of the same E18.5 mouse brain showing a battery of markers for different cell populations: immunohistochemistry using antibodies against α -5HT (5-hydroxytryptamine, serotonergic neurons) in **b**; α -PAX7 in **c** and **k**; α NKX6.1 in **e**; α -POU4F1 in **f** and **j**; α -ChAT in **g** and **i**; α -TH (tyrosine hydroxylase) in **h**; α -RFP (red fluorescent protein, component of tdTomato lineage marker) in **m**. In situ hybridization for *Otp* in **d** and *Otx2* in **l**. Scale bar 200 μ m

levels, apart from the ventral lemniscal nucleus (VLL, largely migrated out from r4; Di Bonito et al. 2013), there is another lemniscal population that we identify for comparative reasons (see Puelles et al. 2007) as the intermediate lateral lemniscal nucleus (ILL). This last population is strongly positive for *Pax7* (Fig. 2a, k).

Shh loss-of-function phenotype

In order to inactivate *Shh* selectively in r1 we crossed the *En1*^{cre/+} mouse strain (*En1*^{cre/+}; *Shh*^{fllox/+}) with homozygous *Shh* loxP females (*Shh*^{fllox/nlox}). In the hindbrain ventricular zone, *En1* is expressed only in the isthmus and r1. To determine the area where *Shh* is efficiently inactivated, we crossed the *En1*^{cre/+} mouse strain with a tdTomato reporter line. The presence of the fluorescent protein was detected with a specific antibody (α RFP). The fluorescent signal appeared widely distributed throughout the mesencephalon, isthmus and r1 (Fig. 2m).

Raphe formation and motor nuclei

We started our analysis with the populations known to be generated in the paramedian and medial basal plate. The deletion of *Shh* function at the r1 and isthmus produced a complete loss of serotonergic neurons of the DR and MnR nuclei. At E12.5 the primordial mantle cell aggregates that normally generate the isthmus and midbrain parts of DR, as well as the caudal DR and MnR nuclei in r1 (Fig. 3a; see Alonso et al. 2012) were undetectable in the conditional mutant (Fig. 3b). At E15.5 these two populations are well developed in the wild-type mouse (Fig. 3c). At this stage, in the conditional mutant, we only detected a small cluster of serotonergic neurons in r2, which correspond to the recently identified prepontine raphe nucleus (PPnR; Alonso et al. 2012); these cells were already visible at E12.5 (arrow in Fig. 3b, d). The location of these neurons in r2 was confirmed in frontal sections at E15.5 (Fig. 3e, f). The expression of the transcription factor *Nkx2.2* is closely related with the specification of the serotonergic fate. At E12.5, the expression of this gene is completely absent in the conditional mutant at r1 levels (Fig. 3g, h).

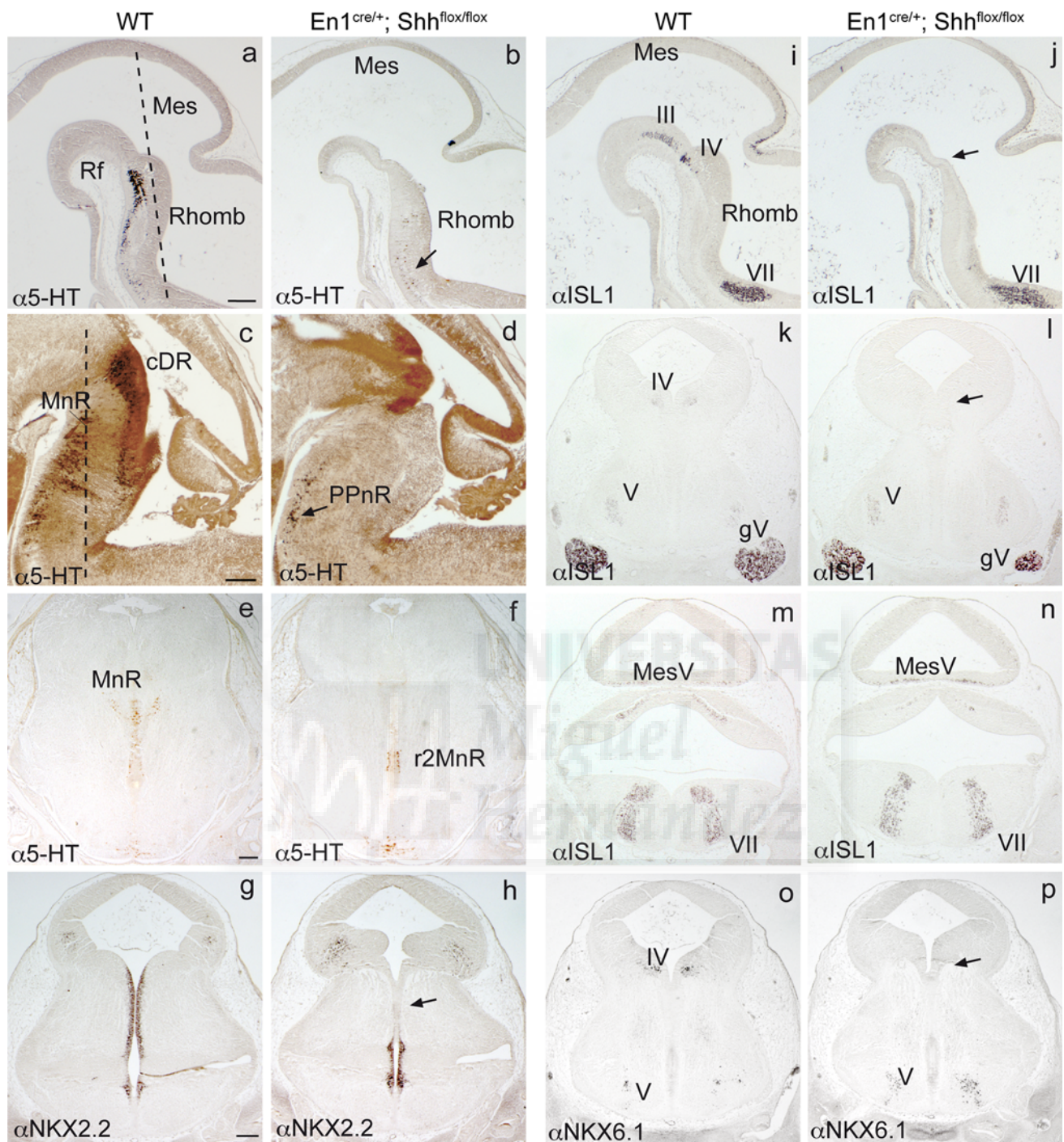
The transcription factor *Nkx6.1* is involved in the specification of motor neurons and other basal neurons, and is strongly expressed in oculomotor nuclei (Fig. 3o). In the conditional mutant, its expression was lost in the area of the III and IV cranial nuclei (arrow in Fig. 3p). These motor populations of the midbrain and isthmus were absent at E12.5 (Fig. 3i–l). Note that the trigeminal motor nucleus (V, located in r2 and r3), the abducens motor nucleus (VI, r5) and the facial motor nucleus (VII, r5 and r6) are clearly located outside the area of inactivation (Fig. 3i–n) and therefore were not affected. We did not determine whether specific components of the r1 medial reticular formation were likewise lacking in these animals, though it seemed decreased in size.

In general, the sensory vestibular and trigeminal nuclei present in r1 were normal. The proprioceptive sensory neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus (MesV; isthmus and r1 parts) also appeared unaltered (Fig. 3m, n).

Interpeduncular nucleus

Next we analyzed neuronal populations reported (in chick embryos) to be generated in the r1 alar plate, which migrate ventralwards into the medial basal plate, forming a sizeable part of the interpeduncular nucleus complex, apart other medial tegmental nuclei, such as Rbd, ATg, VTg, and Sph, along their migration pathway (Lorente-Cánovas et al. 2012). This migratory stream, exclusively present in r1 mantle (absent at isthmus proper and rest of rhombomeres), was characterized as expressing *Pax7*, a transcription factor whose signal in the whole hindbrain is otherwise restricted to the alar ventricular zone (Ju et al. 2004). In the absence of *Shh* function, we still detected at late postnatal stages normal *Pax7* expression in the sphenoid nucleus (Sph), a population that surrounds periventricularly the DTg (Fig. 2a; note the Sph was misinterpreted by Lorente-Cánovas et al. 2012 as DTg), as well as in the VTg and neighboring ATg (Fig. 4a, b). In contrast, the Rbd nucleus and the rostral apical (RA) portion of the IP nucleus seemed disorganized when compared to the wild-type, and the caudal apical (CA) portion of the IP was wholly absent (Fig. 4c–f); these two parts correspond to the mentioned partition of r1, in this case of the IP complex, into rostral and caudal components. Moreover, the two main rostral and caudal subnuclei of the IP-IPR and -IPC were also strongly affected. The IPC was not formed at all, and the IPR appeared smaller than normal and did not reach the expected final median location (Fig. 4c–f). Similarly, the prodromal IP subnucleus (Pro), a *Pax7*-negative and *Nkx6.1*-positive isthmus derivative (Puelles 2001; Lorente-Cánovas et al. 2012), was completely lost (not shown).

Several integrated migratory events are needed for the generation of the complex IP formation (Lorente-Cánovas



et al. 2012). A medial basal ventricular domain expressing *Nkx6.1* gives rise by radial migration to the Pro subnucleus, mainly at the isthmus. Separately, a ventral alar ventricular domain positive for *Pax7* gives rise by tangential migration into the basal plate along the whole r1 to the Sph, ATg, VTg, and Rbd nuclei, as well as to the main apical and principal components of the IP (RA, CA, IPR, IPC); a final paramedian radial migration towards the pial surface, plus subsequent invasion of the raphe midline, occur

additionally in this case. Intermingled with these alar *Pax7* positive migrating neurons, there is a parallel *Otp*-positive tangential migration towards the interpeduncular complex that originates in the lateral basal plate (Lorente-Cánovas et al. 2012). It colonizes partially different subnuclei of the IPR. Finally, in the caudal r1, there is a basal *Otx2* positive radial migration that contributes to the IPC (Lorente-Cánovas et al. 2012). In order to analyze these processes in our material we sectioned our wild-type and conditional

Fig. 3 Raphe nuclei and motor populations are lost in the conditional mutant mouse. **a, b, i, j** Selected serial sagittal sections through a wild-type (**a, i**) and mutant (**b, j**) E12.5 mouse brain immunoreacted with antibodies against α -5HT (**a, b**) and α -Islet 1 (**i, j**). **c, d** Sagittal sections of a wild-type (**c**) and mutant (**d**) E15.5 mouse brain immunoreacted with antibodies against α -5HT. **e–h** and **k–p** Selected serial horizontal sections through the hindbrain in wild-type (**e**) and mutant (**f**) E15.5 and wild-type (**g, k, m, o**) and mutant (**h, l, n, p**) E12.5 mouse brains immunoreacted with antibodies against α -5HT (**e, f**), α -NKX2.2 (**g, h**), α -ISLET1 (**k, m, l, n**) and α -NKX6.1 (**o, p**). The *dotted lines* in **a** and **c** indicate the section plane represented in (**e, f**) and (**g, h**), respectively. The raphe formation (Rf) is shown in a wild-type embryo at E12.5 (**a, e**) and E15.5 (**c**); the r1 Rf is clearly differentiated in two elements, the caudal dorsal raphe (cDR) and median raphe (MnR) nuclei. In the conditional mutant mouse, the Rf is practically absent, with the exception of the serotonergic neurons of the prepontine raphe nucleus in r2 (PPnR, *arrows* in **b, d**). This phenotype is due to the lack of expression of *Nkx2.2* (compare the wt with the mutant, *arrow* in **h**). The motor populations present in midbrain and isthmus (**i, k**) are completely lost in the mutant mouse (*arrows* in **j, l**). As expected, other motor populations, such as the trigeminal and the facial motor nuclei, that are located in regions where *Shh* was not affected, are present (**n**). The mesencephalic trigeminal nucleus has an alar origin and is not affected by the absence of *Shh* (**m**). The lack of the oculomotor and trochlear cranial nuclei is due to the absence of expression of *Nkx6.1* in this region (**o, p**). The *scale bar* is 200 μ m

mutant samples in a plane transversal to r1 (see schema in Fig. 5a). In the conditional mutant, the *Nkx6.1* positive ventricular domain was not identified at E13.5 (Fig. 5a, d); as a consequence, the radial and medial migratory stream of *Nkx6.1*-positive neurons (arrow in Fig. 5b) was not detected at E14.5 (Fig. 5e). As expected, the Pro nucleus was absent at E18.5 (Fig. 5c, f). Surprisingly, the medial basal *Otx2*-positive migration located in the caudal part of rhombomere 1 was not lost, though it appears severely reduced (Online resource ESM1a–d). The alar *Pax7*-positive ventricular domain was clearly present in the conditional mutant at E13.5, although its boundary seemed slightly displaced towards the floor plate, possibly due to a shorter basal domain (Fig. 5g, j). The lateromedial periventricular migratory stream of *Pax7*-positive neurons invading the basal plate and the paramedian radial migratory stream that continues it towards the superficial IP locus were clearly detected at E14.5, though occupying the paramedian space left vacant by the absent raphe nuclei (Fig. 5h, k). At E18.5, a *Pax7*-positive IP primordium was identified only rostrally, but it was disorganized and did not invade the median floor plate territory (Fig. 5i, l), as found previously at postnatal stages. The *Otp*-positive tangential migration originated in the lateral basal plate was also detected in the conditional mutant, but these cells likewise are not able to reach properly the IPR (Online resource ESM1e–h).

The persistence in the conditional mutant of the tangential alar-basal migration approaching the r1 floor plate suggests the existence of SHH-independent signaling

molecules that are responsible for this phenomenon. Indeed, we detected the presence at the r1 floor plate neuroepithelium of *Netrin1* mRNA, which codes for a secreted diffusible protein that generates a potent attractive effect upon many axons (and potentially cells as well) towards the floor plate (Kennedy et al. 1994; Bloch-Gallego et al. 1999; Alcántara et al. 2000). Our data indicate that floor plate *Netrin1* expression occurs even in the absence of *Shh* function (Fig. 5i, l).

Intermediate lateral lemniscus nucleus and locus coeruleus

Finally, we analyzed TH- or *Pax7*-expressing populations likewise originated in the alar plate that normally migrate selectively into the lateral part of the basal plate; these populations include the noradrenergic locus coeruleus (LC) at periventricular levels and an intermediate part of the lateral lemniscal and paralemniscal populations, superficially (ILL, IPL; Fig. 6a, c). These nuclei seemed largely unaffected by the absence of *Shh* function. The *Pax7*-positive neurons that originate the ILL share their origin with the IP and medial tegmental populations described above. Jointly with them, they first migrate tangentially out of the *Pax7*-positive ventral alar plate progenitor domain into the periventricular stratum of the lateral basal plate, as seen at E12.5 (not shown). By E13.5 the ILL/IPL cells start to migrate radially within the lateral basal plate, instead of approaching the midline (Fig. 5g, j). At E14.5 they have reached the pial surface (Fig. 6a, b). Nevertheless, these ILL and IPL cell populations seemed more dispersed at E18.5 in conditional mutant mice than in wild-type specimens, suggesting some final disorganization, possibly due to background abnormality of the basal plate under experimental conditions (Fig. 6c, d).

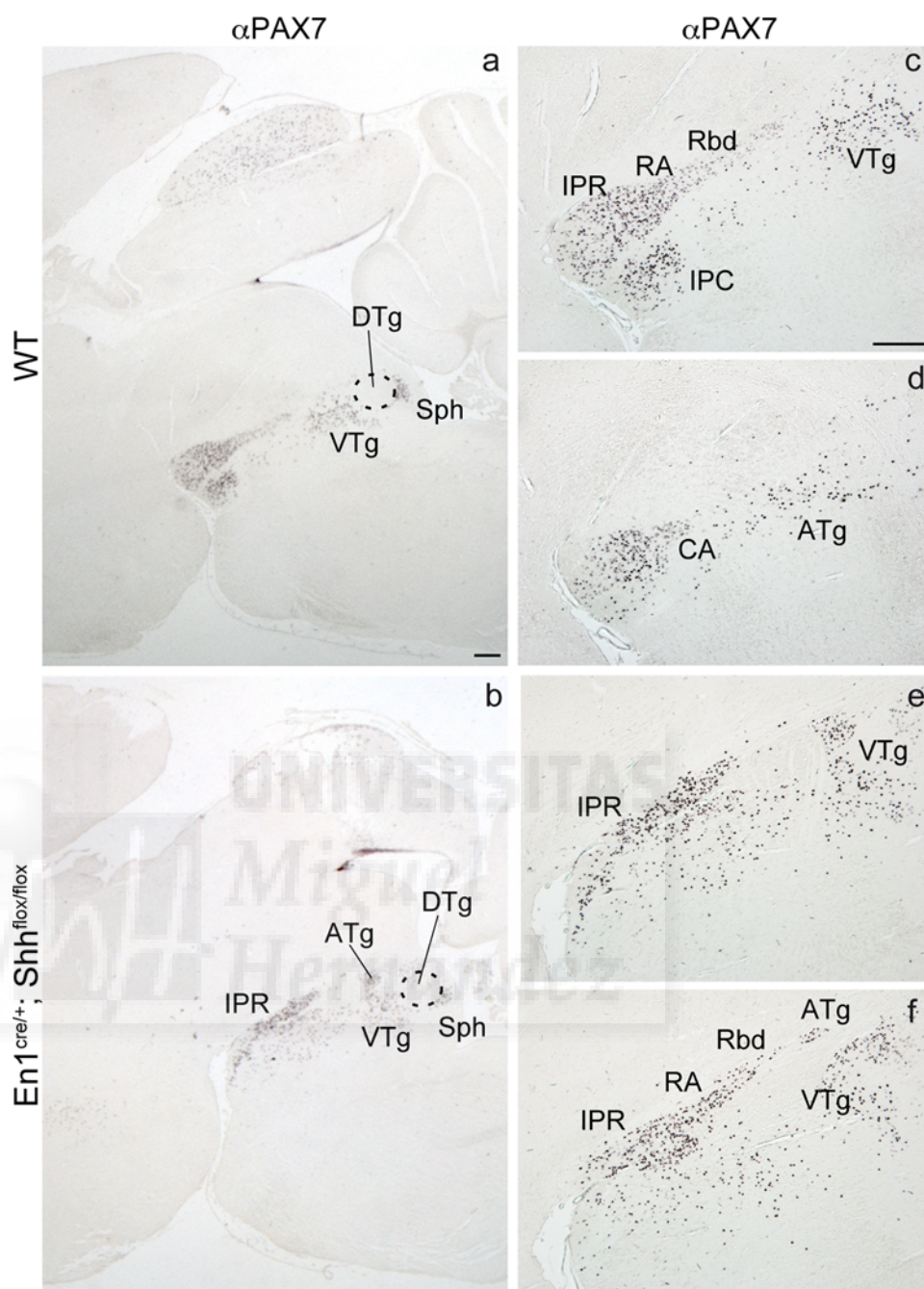
The neurons that constitute the LC are strongly immunoreactive for tyrosine hydroxylase and were clearly visible at the periventricular stratum of the lateral basal plate at E14.5 (Fig. 6e, f). The LC seemed unaltered in the conditional mutant at E18.5; it occupied a position close to the ventricle, as in the wild-type (Fig. 6g, h). TH immunoreaction also showed that the substantia nigra (SN) is severely diminished in the midbrain, though a remnant persists, as has been already described previously (Fig. 6g, h; Perez-Balaguer et al. 2009).

Discussion

Generalities

The nuclear derivatives of r1 traditionally have suffered severe anatomic misinterpretation (see discussion in

Fig. 4 The interpeduncular nucleus (IP) is altered postnatally in the r1-conditional *Shh* mutant. **a–f** Selected serial sagittal sections immunoreacted against *Pax7* at P7. **a, c, d** At this stage the different *Pax7*-positive IP subnuclei and other *Pax7*-immunoreactive populations are normally well differentiated: Sph, VTg, Rbd, periventricularly, and parts of the IP (RA, IPR, IPC, and CA). **b, e, f** In the *Shh* conditional mutant, the IP is clearly disorganized and displays a stronger phenotype caudally. The tegmental nuclei seem unaltered. Scale bar 200 μ m



Alonso et al. 2012). This is due to two sorts of error. First, the classic conception of the pons and cerebellum, as defined anatomically in adults by the rostral border of the middle cerebellar peduncle, and as rostral components of the metencephalic hindbrain limiting with the midbrain, represented a widely held erred viewpoint that has led to widespread ascription of isthmic, r1 and r2 pre-ponsine hindbrain derivatives to either the ‘caudal midbrain’ or ‘the pons’. Application of experimental fate-mapping techniques such as quail-chick neural tube transplants (Marín and Puelles 1995; Alvarado-Mallart 2000; Aroca et al. 2006) and transgenic derivative-tracing

tools in the mouse (Zervas et al. 2004; Jensen et al. 2008) has underpinned the correct ascription to the rostral hindbrain of many pre-ponsine neuronal populations, including the major rostral raphe nuclei (isDR, r1DR, MnR, r1SuLR), the ‘tegmental complex’ formed by DTg, VTg, ATg, Rbd, PDTg, LDTg, PPTg, and the whole IP complex, jointly with a substantial reduction in the modern concept of the extent of the midbrain (reviews in Aroca and Puelles 2005; Nieuwenhuys 2011; Puelles et al. 2007, 2012; see also reference atlases of the Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet] (2009), developed by L. P.).

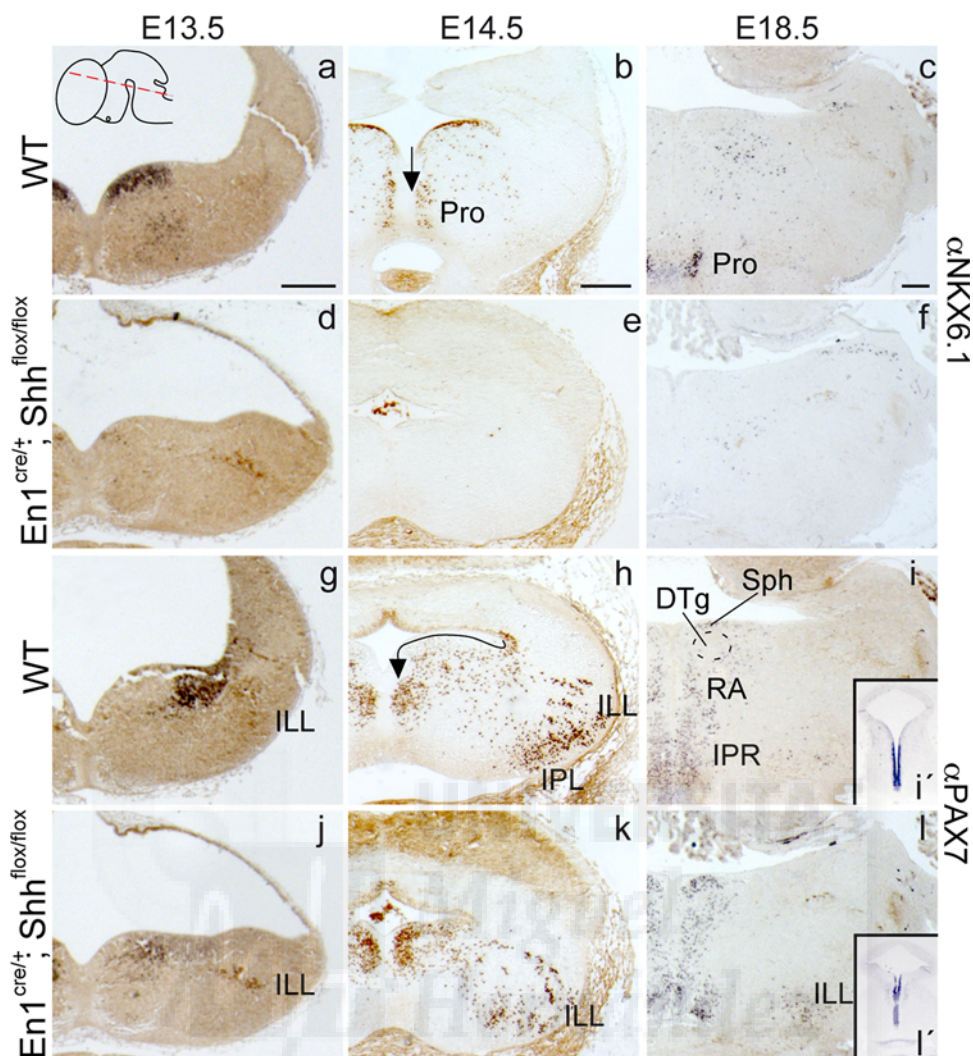


Fig. 5 Altered final histogenesis of the interpeduncular nucleus in the *Shh* conditional mutant mouse. **a–l** Selected serial transversal sections through r1 (section plane indicated in **a**), immunoreacted against NKX6.1 (**a–f**) and *Pax7* (**g–l**) at wild-type (**a, d**) and mutant (**g, j**) E13.5, wild-type (**b, h**) and mutant (**e, k**) E14.5 and wild-type (**c, i**) and mutant (**f, l**) E18.5. The inserts **i** and **l** are frontal sections of wild-type and mutant E12.5 embryos, respectively, in situ hybridized for *Netrin1*. The Pro nucleus is normally generated by the radial migration of *Nkx6.1*-positive neurons from a medial positive ventricular domain (a–c). In the absence of *Shh*, a *Nkx6.1*-positive ventricular zone domain is not detected (**d**), the migrating neurons (arrow in **b**) are absent (**e**) and the Pro nucleus is not generated (**f**).

Pax7-positive cells of the IP have their origin in an alar *Pax7*-positive ventricular domain (**g**). These neurons reach their final destination by tangential and radial migration (arrow in **h**), giving rise to the Sph nucleus, nearby ATg/VTg nuclei, the Rbd nucleus, and the main components of the IP (IPR, IPC, RA/CA (**i**)). In the conditional mutant mouse the alar *Pax7*-positive domain is maintained (**j**). There are positive neurons migrating tangentially medialwards (**k**), and they finally generate various nuclei with variable levels of disorganization (**l**). The maintenance of this migratory stream is probably due to the presence of attractive cues (*Netrin1*, wild-type **i**) in the mutant floor plate (**l**). Scale bar 200 μ m

Second, the cited wrong interpretation of the prepontine hindbrain as a part of either the midbrain or the pons has been compounded with further confusion due to disregarding the fact that the deep cephalic flexure causes the length axis of the hindbrain to be bent upwards precisely along this prepontine region, both in embryos and adults. Disregard for this morphogenetic peculiarity has caused coronal sections through this region, which are topologically horizontal to the true developmental axis, to be misinterpreted as normal cross-sections, that is, as

topologically transversal sections (see Puelles et al. 2012; Alonso et al. 2012). The resulting misleading anatomical topographic terminology thus requires adjustments, or at least some mental annotation (e.g., the nucleus *subcoeruleus* lies in r2, caudal to the nucleus coeruleus in r1, and the ‘dorsal raphe nucleus’ is clearly a rostral ventral structure within the median tegmentum of the isthmus and r1, since it sits across the *Shh*-positive floor plate domain; Alonso et al. 2012; Puelles 2013). Future atlases probably will cause these sources of confusion to disappear (see e.g., the

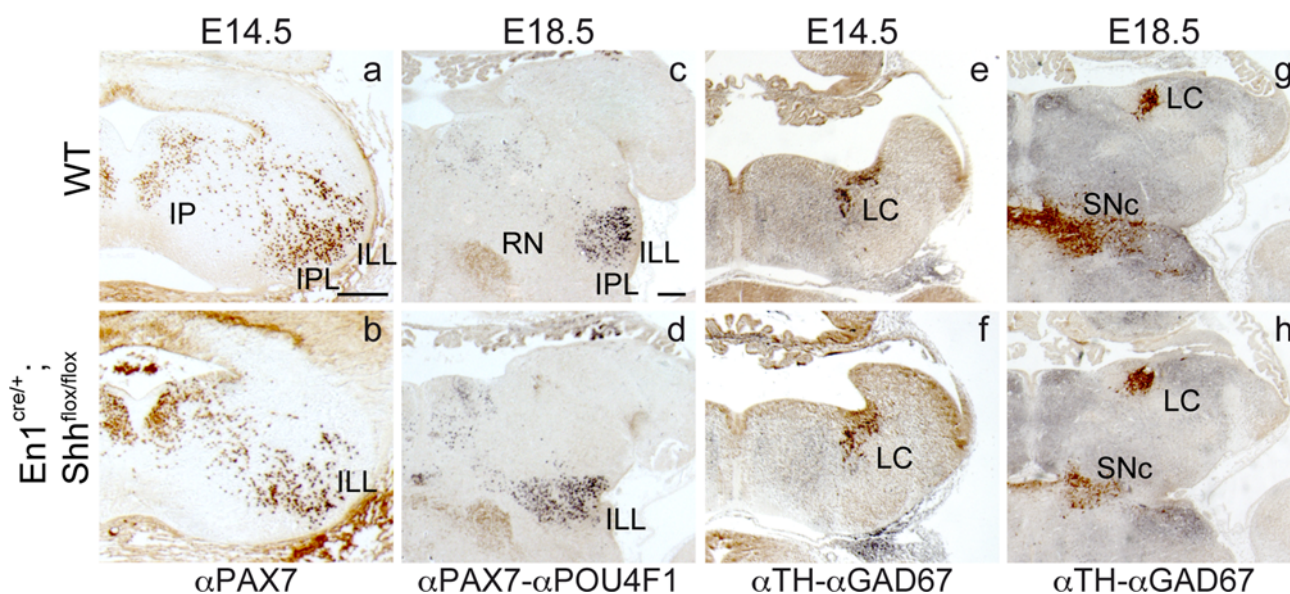


Fig. 6 Intermediate lateral lemniscus (ILL) and Locus coeruleus (LC) nuclei are present in the absence of *Shh*. **a–h** Transversal sections to r1 at wild-type (**a, e**) and mutant (**b, f**) E14.5 and wild-type (**c, g**) and mutant (**d, h**) E18.5 immunoreacted against PAX7 (**a, b**), double immunoreacted against *Pax7* (brown) and POU4F1 (black **c, d**) and double reacted against TH (brown) and GAD67 (black **e–h**). Some *Pax7*-positive neurons migrate radially towards the pial surface,

to form de ILL (**a, c**). In the absence of *Shh* the ILL is identified at its normal postmigratory position, but displays some disorganization (**b, d**). The TH-positive population of the LC originates in an intermediate alar ventricular domain and migrates (as previously described) to the periventricular lateral basal plate (**e, g**). In the mutant mouse this alar domain is maintained (**f**) and the LC is generated with no obvious alteration (**h**). Scale bar 200 μm

reference atlases at www.developingmouse.brain-maps.org). We have analyzed our results within this updated scenario, summarized for the r1 territory in our schemata of true transversal sections through rostral and caudal parts of r1 (Fig. 2a).

Conditional *Shh* loss-of-function phenotype at isthmus and r1

Early conditional deletion of *Shh* function within the expression domain of *En1* in the rostral hindbrain produced severe alterations in some of the neuronal populations formed at the distinct isthmus and r1. As a general observation, the basal plate territory seems reduced in size relative to wild-type configuration, and the alar-basal border, as identified by the alar-restricted ventricular expression of *Pax7* (Ju et al. 2004), appears somewhat displaced ventralwards. Nevertheless, there persists a sizeable remnant that must be identified according to our criteria as a basal plate. We recently obtained a similar result within the midbrain, where the basal structure persisting in absence of *Shh* signals was found to require *Foxa2* function (Perez-Balaguer et al. 2009).

The isthmic and r1 serotonergic raphe populations that derive from the thin *Nkx2.2*-positive domain lying adjacent to the midline floor (forming isDR, CLi, r1DR, MnR, and r1SuLR raphe subpopulations; Alonso et al. 2012) were wholly absent, while the r2 analog (e.g., PPNr) were

present. This result was expected, since patterning of this progenitor domain is known to depend directly from median *Shh* signaling (Briscoe et al. 1999; Pattyn et al. 2003). Due to the normal absence of motoneurons in r1, there was no related phenotype, though certainly the neighboring isthmic IV nucleus and midbrain III nucleus were absent (no change of the trigeminal motor nucleus in r2). Other derivatives of the medial band of the basal plate that expresses *Nkx6.1* (Qiu et al. 1998; Puelles 2001) were likewise wholly absent. This includes at the isthmus the prodromal (rostralmost) subnucleus of the IP complex and apparently also a number of other medial reticular cell groups in r1 that do not have a specific name yet. A number of *Pax7*-expressing neurons of alar origin that migrate tangentially and have various final destinations in the medial basal plate were produced and initiated migration normally, but seemed more or less affected in their final position and subnuclear arrangement, particularly at the IP complex, whose midline aggregation failed to occur, and whose caudal components were missing. The mature nuclei that normally form medially at periaqueductal or deep tegmental levels (Sph, VTg, ATg; Lorente-Cánovas et al. 2012), along the trail of the initial lateromedial deep migration, were distinguishable in the mutant, but seemed relatively displaced towards the midline, probably due to the absence of the local raphe nuclei and the reduction of the basal plate volume. The Rbd and apical IP subnuclei (RA, CA) normally form along the trail of the secondary

paramedian radial migration that brings a substantial number of alar-originated *Pax7*-positive cells from transient medial periventricular positions into the superficial IP complex (Lorente-Cánovas et al. 2012). The rostral IP subnuclei Rbd, RA and IPR, derivatives of the rostral part of r1, were present in the mutant, whereas the caudal analogs CA and IPC were wholly absent. The observed IP populations seemed diminished in number and somewhat disorganized. These components largely remained bilateral and did not fuse at the midline, suggesting a failure of the final steps of their migration. Such a failure might also explain the lack of the caudal *Pax7*-expressing IP components, if these normally invade the caudal IP through the rostral IP. The caudal IP receives also a separate contingent of *Otx2*-positive neurons, produced selectively within the basal plate of caudal r1 (Lorente-Cánovas et al. 2012). This population is somewhat affected, but is nevertheless still observable in our conditional mutant. The maintenance of this population may be a SHH-independent effect of *Foxa2* (Perez-Balaguer et al. 2009).

In contrast, *Pax7*-expressing populations of alar origin that migrate radially within the lateral basal plate, contributing to the intermediate lemniscal and paralemniscal nuclei, formed normally. They only showed a slightly more dispersed aspect than in the wild-type. Sensory and MesV nuclei formed wholly within the alar plate did not display any recognizable alteration.

The effects observed in the development of r1 deprived of *Shh* function can be divided in two main categories: defects in neuronal specification and defects in final nucleo-genetic neuronal migration close to the raphe. It was initially reported that the absence of *Shh* produces a complete lack of floor and basal plate structures (Chiang et al. 1996; Fogel et al. 2008), but recently it was shown that there are basal plate formations that are independent of *Shh* function (Perez-Balaguer et al. 2009; Mavromatakis et al. 2011). The populations originated in the basal plate and localized next to the floor plate are nevertheless highly sensitive to the presence of *Shh*, apparently due to an initial patterning defect. In the conditional mutant they are not specified at all. The differentiation of the serotonergic neurons of the raphe formation is directed by the transcription factor *Nkx2.2* downstream of *Shh* signaling (Cheng et al. 2003; Pattyn et al. 2003). The expression of this gene is lost within r1 in our conditional mutant. Therefore, the serotonergic neurons are not specified and the raphe formation of r1 is missing, in sharp contrast to what happens in the unaffected r2. The somatic motoneurons of the trochlear cranial nucleus located in the isthmus are dependent on the transcription factor *Nkx6.1* (Sander et al. 2000). This gene is likewise not induced in our conditional mutant within the isthmus and r1 territories. Accordingly, the trochlear nucleus is not detected. The

prodromal IP subnucleus is normally generated in the *Nkx6.1*-positive isthmus basal plate, and migrates radially into the superficial mantle layer next to the floor plate in the chicken (Lorente-Cánovas et al. 2012). This nucleus is positive for *Nkx6.1* also in the mouse (present results), and is likewise completely lost in our conditional mutant.

On the other hand, neuronal populations generated in the lateral basal plate, or in the alar plate, that migrate tangentially into the medial basal plate are specified correctly and initiate normally their migration, fulfilling part of their normal fates along that course, but displayed an altered final state of nuclear aggregation close to the midline. A ventral (liminal) patch of ventricular zone located at the rim of the *Pax7*-positive alar plate of r1 gives rise to a periventricular lateromedial migratory stream of postmitotic neurons, part of whose cells then continue moving radially adjacent to the floor plate, finally reaching the superficial location where the IP forms (Lorente-Cánovas et al. 2012). In the lateral basal plate, a patch of *Otp*-positive ventricle gives rise to a parallel or intermingled tangential migration targeting different subnuclei of the IPR (Lorente-Cánovas et al. 2012; present results). The *Pax7*-positive migrating neurons give rise to the discrete Sph, VTg, ATg, Rbd, and IP nuclei that are variously located along their course within the basal plate (Sph caps periventricularly the DTg; VTg partly lies periventricularly, but also invades the underlying deep intermediate tegmental stratum; Rbd and ATg form at the beginning of the paramedian radial migration course into the IP complex, just behind the decussation of the superior cerebellar peduncle). In our conditional mutant, abnormalities appeared particularly at the end of the final radial course occurring next to the floor plate. Fewer neurons seem able to finish this movement; very few finally aggregate at the midline, and none advance subpially into the caudal part of the IP complex. As a result, the whole *Pax7*-immunoreactive population of the caudal portion of the IP is absent, and the organization of the rostral part is severely disrupted, due to the lack of median aggregation, the decrease and abnormal subnuclear aggregation of its majoritary *Pax7* and *Otp*-positive populations, and the absence of *Nkx6.1*-positive Pro neurons.

We speculate that the maintenance of the tangential/radial migration stream of *Pax7* and *Otp* cells may be due to the continuing floor plate expression of *Netrin1*, which codes for a well-known signaling molecule with attractive or repulsive functions (Alcántara et al. 2000). It has been shown that the expression of *Netrin1* is dependent on the transcription factor *Foxa2* (Rastegar et al. 2002). We previously showed that this ventralizing transcription factor is not lost at the floor plate in our conditional mutant (Perez-Balaguer et al. 2009). The failure of terminally migrated *Pax7*-positive neurons to aggregate properly into a median

arrangement, and to spread into the caudal part of the IP complex (forming IPR, IPC, RA, CA), suggests a dependency of this terminal behavior upon signals directly or indirectly related to *Shh*. It remains unclear why this effect should become apparent mainly subpially, next to the floor plate. The particular behavior of caudal r1 in some aspects may perhaps be attributed to its position at the caudal end of the range of signaling of the isthmus organizer.

Analogous neuronal populations generated in the alar plate, that first migrate into the lateral basal plate, and then move radially at this locus to form lemniscal and paramlemniscal populations (ILL, IPL), are largely unaffected by the lack of *Shh* function. The slightly different aspect of these elements in the conditional mutant may be due to their adaptation to the reduced, probably partly abnormal basal plate produced in the absence of *Shh*. The nuclei of the lateral lemniscus are divided in the chick (Aroca and Puelles 2005; Puelles et al. 2007) and in the mouse (Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet] (2009) in three components (dorsal, intermediate and ventral), though the literature often lumps them into dorsal and ventral components. Only the intermediate cells express *Pax7* and derive from r1 (we believe the true DLL is isthmus and the VLL derives from more caudal rhombomeres; Di Bonito et al. 2013). The signals that may attract or repel these neurons away from their initial deep periventricular position into the course of the superficial lateral lemniscus tract are wholly unknown. It is interesting, though, that other cell populations in this area show a similar radial displacement, sometimes stabilizing somewhere along the radial migration course (e.g., the cholinergic cells of the PPTg nucleus, or the noradrenergic cells of the A7 cell group).

The noradrenergic neurons of the LC also are originated in the alar plate, though not at its ventral rim, origin of the migrating *Pax7* cells (Aroca et al. 2006); they migrate tangentially into the periventricular stratum of the lateral basal plate (Aroca et al. 2006), where they invade the locus of the more dispersed cholinergic LDTg formation, a periventricular or central gray neighborhood also occupied by the nucleus of Barrington, medial to the alar r1mesV; it has been suggested that *Netrin1* signals are involved in this migratory process (Shi et al. 2008). As would be expected, due to the availability of such signals in our conditional mutant, the LC population seems completely unaffected as respects its neurogenesis, migration and postmigratory position by the lack of *Shh* function. It has been indicated that the specification of this population, occurring in an alar area roughly intercalated between the progenitors of the vestibular and trigeminal sensory nuclei (Aroca et al. 2006), is dependent on *Bmp* signals coming from the roof plate (Vogel-Höpker and Rohrer 2002; Tilleman et al. 2010). Therefore, it was expected that the LC population is wholly independent of *Shh* function.

Summarizing these findings, we found that SHH morphogen function only seems strictly required for the normal dimensioning of the basal plate (positioning of the alar-basal boundary) and the patterning of basal plate elements generated at paramedian and medial parts of the basal plate, probably due to direct effects upon the induction of the *Nkx2.9*, *Nkx2.2* and *Nkx6.1* transcription factors and resulting downstream effects in the production of specific cell types that as a consequence remain wholly absent (motoneurons at the isthmus and midbrain, serotonin neurons of the isthmus and r1 raphe and *Nkx6.1*-positive neurons of the Pro nucleus and the medial basal plate in general). Intrinsically generated elements of the lateral basal plate may be saved by the parallel ventralizing effect of *Foxa2* (Perez-Balaguer et al. 2009), possibly compounded by other local determinants, such as *Otp*, normally expressed selectively in the lateral part of the basal plate, jointly with *Lhx* family members (Simeone et al. 1994; Aroca et al. 2006). Separately, *Shh* function is needed as well for final median and rostrocaudal positioning of interpeduncular *Pax7*-positive cell populations at the end of their long tangential plus radial migration course started at the rim of the alar plate. *Pax7* populations formed along the course of this migration, or diverging early on into the superficial region where the lateral lemniscus courses through r1, are largely unaffected by lack of *Shh* function. This analysis, jointly with that of Perez-Balaguer et al. (2009), suggests that mechanisms of patterning, neurogenesis and histogenesis of the brainstem basal plate still require additional studies to be fully understood. Such efforts may throw light on the molar-tooth-sign group of human mid-hindbrain malformations (including the Joubert syndrome; Parisi and Dobyns 2003; Barkovich 2012), which have been associated recently to alterations in *Shh* signaling (Doherty 2009; Juric-Sekhar et al. 2012).

Acknowledgments Work supported by “Ministerio de Economía y Competitividad” BFU2010-16548 (FEDER Funds) to E. Puelles, Consolider Grant (CSD2007-00023) and European commission (EUCOMMTOOLS, contract 261492) to S.M., and “Ministerio de Economía y Competitividad” grant BFU2008-01456 and Fundación SENECA contract 04548/GERM/06 (no. 10891) to L. Puelles. J.A. Moreno-Bravo was supported by the Predoctoral Program of the “Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Ampliación de Estudios”, co-financed by the European Social Fund.

References

- Alcántara S, Ruiz M, de Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127:1359–1372
- Alexander T, Nolte C, Krumlauf R (2009) Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:431–456

- Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet] (2009) Allen Institute for Brain Science, Seattle (WA). <http://developingmouse.brain-map.org>
- Alonso A, Merchán P, Sandoval JE, Sánchez-Arrones L, García-Cazorla A, Artuch R, Ferrán JL, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L (2012) Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. *Brain Struct Funct*. doi:10.1007/s00429-012-0456-8
- Alvarado-Mallart RM (2000) The chick/quail transplantation model to study central nervous system development. *Prog Brain Res* 127:67–98
- Aroca P, Puelles L (2005) Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain. *Brain Res Brain Res Rev* 49:179–190
- Aroca P, Lorente-Cánovas B, Mateos FR, Puelles L (2006) Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496:802–818
- Barkovich AJ (2012) Developmental disorders of the midbrain and hindbrain. *Front Neuroanat* 6:7
- Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C (1999) Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 19:4407–4420
- Bloch-Gallego E, Causeret F, Ezan F, Backer S, Hidalgo-Sánchez M (2005) Development of precerebellar nuclei: instructive factors and intracellular mediators in neuronal migration, survival and axon pathfinding. *Brain Res Brain Res Rev* 49:253–266
- Briscoe J, Sussell L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J (1999) Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398:622–627
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435–445
- Cambronero F, Puelles L (2000) Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol* 427:522–545
- Cheng L, Chen C, Luo P, Tan M, Qiu M, Johnson R, Ma Q (2003) *Lmx1b*, *Pet-1*, and *Nkx2.2* coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J Neurosci* 23:9961–9967
- Chiang C, Litington Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407–413
- Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitsch BG, Briscoe J, Sasai N (2010) Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol* 8:e1000382
- Di Bonito M, Narita Y, Avallone B, Sequino L, Mancuso M, Andolfi G, Franzè AM, Puelles L, Rijli FM, Studer M (2013) Assembly of distinct auditory sub-circuits by a Hox genetic network in the mouse brainstem. *PLoS Gen* 9:e1003249
- Doherty D (2009) Joubert syndrome: insights into brain development, cilium biology, and complex disease. *Semin Pediatr Neurol* 16:143–154
- Domanitskaya E, Wacker A, Mauti O, Baeriswyl T, Esteve P, Bovolenta P, Stoeckli ET (2010) Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *J Neurosci* 30:11167–11176
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417–1430
- Echevarria D, Belo JA, Martinez S (2005) Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 49:150–157
- Farmer WT, Altick AL, Nural HF, Dugan JP, Kidd T, Charron F, Mastick GS (2008) Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and slit/robo signals. *Development* 135:3643–3653
- Fogel JL, Chiang C, Huang X, Agarwala S (2008) Ventral specification and perturbed boundary formation in the mouse midbrain in the absence of Hedgehog signaling. *Dev Dyn* 237:1359–1372
- Hidalgo-Sánchez M, Martínez-de-la-Torre M, Alvarado-Mallart R, Puelles L (2005) A distinct preisthmus histogenetic domain is defined by overlap of *Otx2* and *Pax2* gene expression in the avian caudal midbrain. *J Comp Neurol* 483:17–29
- Hidalgo-Sánchez M, Backer S, Puelles L, Bloch-Gallego E (2012) Origin and plasticity of the subdivisions of the inferior olivary complex. *Dev Biol* 371:215–226
- Jensen P, Anna F, Farago AF, Awatramani RB, Scott MM, Deneris ES, Dymecki SM (2008) Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nat Neurosci* 11:417–419
- Ju MJ, Aroca P, Luo J, Puelles L, Redies C (2004) Molecular profiling indicates avian branchiomotor nuclei invade the hindbrain alar plate. *Neuroscience* 128:785–796
- Juric-Sekhar G, Adkins J, Doherty D, Hevner RF (2012) Joubert syndrome: brain and spinal cord malformations in genotyped cases and implications for neurodevelopmental functions of primary cilia. *Acta Neuropathol* 123:695–709
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425–435
- Kimmel RA, Turnbull DH, Blanquet V, Wurst W, Loomis CA, Joyner AL (2000) Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* 14:1377–1389
- Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP (2001) Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105:599–612
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferrán JL, Puelles L, Aroca P (2012) Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol* 361:12–26
- Lumsden A (1990) The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci* 13:329–335
- Marín F, Puelles L (1995) Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7:1714–1738
- Marín F, Aroca P, Puelles L (2008) Hox gene colinear expression in the avian medulla oblongata is correlated with pseudorhombomeric domains. *Dev Biol* 323:230–247
- Mavromatakis YE, Lin W, Metzakopian E, Ferri ALM, Yan CH, Sasaki H, Whisett J, Ang S (2011) *Foxa1* and *Foxa2* positively and negatively regulate *Shh* signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mech Dev* 128:90–103
- Nieuwenhuys R (2011) The structural, functional, and molecular organization of the brainstem. *Front Neuroanat* 5:33
- Pabst O, Herbrand H, Takuma N, Arnold HH (2000) *NKX2* gene expression in neuroectoderm but not in mesodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 210:47–50
- Parisi MA, Dobyns WB (2003) Human malformations of the midbrain and hindbrain: review and proposed classification scheme. *Mol Genet Metab* 80:36–53
- Pasqualetti M, Díaz C, Renaud JS, Rijli FM, Glover JC (2007) Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific *Hoxa2* enhancer elements in the mouse embryo. *J Neurosci* 27:9670–9681
- Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Samad OA, Krumlauf R, Rijli FM, Brunet J, Ericson J (2003) Coordinated temporal and spatial

- control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev* 17:729–737
- Paxinos G, Butcher LL (1985) Organizational principles of the brain as revealed by choline acetyltransferase and acetylcholinesterase distribution and projections. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system, vol I, Forebrain and midbrain* Academic Press, Sydney, pp 487–521
- Perez-Balaguer A, Puelles E, Wurst W, Martinez S (2009) Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mech Dev* 126:301–313
- Placzek M, Briscoe J (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6:230–240
- Puelles L (2001) Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull* 55:695–710
- Puelles L (2013) Plan of the developing vertebrate nervous system: relating embryology to the adult nervous system (Prosomere model, overview of brain organization). Chapter in: Rakic P and Rubenstein JLR (eds) *Comprehensive developmental neuroscience*, Elsevier, London (in press)
- Puelles L, Martínez-de-la-Torre M, Paxinos G, Martínez S (2007) The chick brain in stereotaxic coordinates. An atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies. Elsevier Academic Press, San Diego
- Puelles E, Martínez-de-la-Torre M, Watson C, Puelles L (2012) Midbrain. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) *The mouse nervous system*, 1st edn. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 337–359
- Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubenstein JL (1998) Control of antero-posterior and dorsoventral domains of *Nkx6.1* gene expression relative to other *Nkx* genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* 72:77–88
- Rastegar S, Albert S, Le Roux I, Fischer N, Blader P, Müller F, Strähle U (2002) A floor plate enhancer of the zebrafish *netrin1* gene requires Cyclops (Nodal) signalling and the winged helix transcription factor FoxA2. *Dev Biol* 252:1–14
- Ribes V, Balaskas N, Sasai N, Cruz C, Dessaud E, Cayuso J, Tozer S, Yang LL, Novitsch B, Marti E et al (2010) Distinct sonic hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev* 24:1186–1200
- Sander M, Sussel L, Conners J, Scheel D, Kalamaras J, Cruz dela F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M (2000) Homeobox gene *Nkx6.1* lies downstream of *Nkx2.2* in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533–5540
- Shi M, Guo C, Dai JX, Ding YQ (2008) DCC is required for the tangential migration of noradrenergic neurons in locus coeruleus of mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 39:529–538
- Shimamura K, Hartigan DJ, Martínez S, Puelles L, Rubenstein JL (1995) Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121:3923–3933
- Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, Casanova J, Graziani F, Acampora D, Avantsciato V (1994) Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and Drosophila. *Neuron* 13:83–101
- Tilleman H, Hakim V, Novikov O, Liser K, Nashelsky L, Di Salvo M, Krauthammer M, Scheffner O, Maor I, Mayseless O et al (2010) *Bmp5/7* in concert with the mid-hindbrain organizer control development of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Mol Cell Neurosci* 45:1–11
- Vaage S (1969) The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 41:3–87
- Vaage S (1973) The histogenesis of the isthmus nuclei in chick embryos (*Gallus domesticus*). I. A morphological study. *Z Anat Entwicklungsgesch* 142:283–314
- Vieira C, Martínez S (2006) Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience* 143:129–140
- Vieira C, Pombero A, García-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, Martínez S (2010) Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* 54:7–20
- Vogel-Höpker A, Rohrer H (2002) The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurons depends on bone morphogenetic proteins (BMPs). *Development* 129:983–991
- Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner AL (2004) Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43:345–357

Review

Mesencephalic neuronal populations. New insights on the ventral differentiation programs

Juan A. Moreno-Bravo*, Jesus E. Martinez-Lopez* and Eduardo Puelles

Institute of Neuroscience of Alicante, CSIC and University of Miguel Hernandez, Sant Joan d'Alacant, Spain

*Equal contribution

Summary. The midbrain is a complex structure where different functions are located. This formation is mainly involved in the visual and auditory information process (tectum) and visual movements and motor coordination (tegmentum). Here we display a complete description of midbrain anatomy based on the prosomeric model and of the developmental events that take place to generate this structure. We also summarize the new data about the differentiation and specification of the basal populations of the midbrain. The neural tube suffers the influence of several secondary organizers. These signaling centers confer exact positional information to the neuroblasts. In the midbrain these centers are the Isthmic organizer for the antero-posterior axis and the floor and roof plates for the dorso-ventral axis. This segment of the brain contains, in the dorsal part, structures such as the collicula (superior and inferior), tectal grey and the preisthmic segment, and in the basal plate, neuronal populations such as the oculomotor complex, the dopaminergic substantia nigra and the ventral tegmental area, the reticular formation and the periaqueductal grey. Knowledge of the genetic cascades involved in the differentiation programs of the diverse populations will be extremely important to understand not only how the midbrain develops, but how degenerative pathologies, such as Parkinson's disease, occurs. These cascades are triggered by signaling molecules such as Shh, Fgf8 or Wnt1 and are integrated by receptor complexes and transcription factors. These are directly responsible for the induction or repression of the differentiation programs that will produce a specific neuronal phenotype.

Key words: Midbrain, Mesomere, Tectal grey, Superior colliculus, Inferior colliculus, Preisthmic region, Mesomere 1, Mesomere 2, Oculomotor complex, Substantia nigra, Ventral tegmental area, Red nucleus, Reticular formation, Periaqueductal grey, Genetic mechanism

Introduction.

The neural tube is segmented during embryonic development. The rostral part is initially divided, along the antero-posterior axis (AP), into three main vesicles: the forebrain, midbrain, and hindbrain (Puelles and Rubenstein, 2003). This segmentation progresses further and results in the generation of the neuromeres. The most rostral vesicle, the forebrain, is subdivided into the diencephalon (prosomeres 1-3) and the secondary prosencephalon that gives rise to the telencephalic vesicles and hypothalamus (peduncular and terminal portions, Morales-Delgado et al., 2011). The hindbrain is the most caudal vesicle, and is subdivided into isthmus, 7 rhombomeres (r1-r7) and 4 pseudorhombomeres (r8-r11) (Marin and Puelles, 1995; Cambroner and Puelles, 2000; Puelles and Rubenstein, 2003). The midbrain is located between these two vesicles, and it is subdivided into two neuromeres (Hidalgo-Sanchez et al., 2005; Allen Developing Mouse Brain Atlas, 2009; Puelles et al., 2012). The rostral segment is larger and is named mesomere 1 (m1). It includes the tectal gray and the two colliculi among other populations. The mesomere 2 (m2) is a rather small segment localized between the inferior colliculus and the isthmus. It corresponds to the preisthmic region (Puelles et al., 2012). In addition to these transversal segments, in the neural tube four longitudinal domains along the dorso-ventral axis are present (DV). These domains are, from ventral to dorsal, the floor, basal, alar and roof plates (Puelles and

Rubenstein, 2003).

The DV patterning is due to two confronted structures that are sources of signaling molecules. On the one hand, the axial mesoderm (notochord and prechordal plate) and the floor plate express Sonic hedgehog (Shh), which is the most important morphogen with inducing capability of the ventral structures in the neural tube. (Patten and Placzek, 2000; Placzek and Briscoe, 2005; Ingham and Placzek, 2006) On the other hand, the roof plate expresses the Bone morphogenetic factor family, BMPs, among other molecules, which are involved in the specification of the dorsal regions (Lee and Jessell, 1999; Chizhikov and Millen, 2005).

The AP patterning is the result of the activity of the secondary organizers. These are groups of cells located in key regions of the neuroepithelium that emit signals with the capability of both inducing and patterning the surrounding tissue. So far, three of these structures have been identified; the anterior neural ridge (ANR) located at the rostral tip of the neural plate, the zona limitans intrathalamica (zli) at the thalamus-prethalamus boundary, and the isthmus (IsO) situated at the boundary between midbrain and hindbrain (Vieira et al., 2010; Martinez et al., 2012). The signals emitted by these organizers have been identified. One of these is Fibroblast growth factor 8 (Fgf8; Crossley and Martin, 1995), which is the main signaling molecule present in the ANR and the IsO. The zli combines the expression of Shh with the expression of Fgf8 at the dorsal tip.

Therefore, the specification of the mesencephalic territory is highly dependent on isthmus activity. The IsO is capable of inducing, when grafted in a more rostral region, the differentiation of an ectopic midbrain and cerebellum in the surrounding areas of the host (Martinez et al., 1991). This induction is due to the release of the Fgf8 protein from the IsO, generating a concentration gradient (Crossley et al., 1996). If this protein is placed directly in the diencephalon it has the capability to reproduce the effect of the isthmus transplant experiments (Martinez et al., 1999). The specification of the midbrain is heavily affected when the levels of Fgf8 are altered. The reduction of Fgf8 activity in the isthmus produces the absence of the anterior part of the midbrain by an apoptotic process. The Fgf8 deficient posterior midbrain suffers a change in its fate and is specified as anterior midbrain (Basson et al., 2008). Then Fgf8 in a low concentration is necessary and sufficient to specify the anterior midbrain, saving it from apoptosis, and a higher dose of this protein is needed for the specification of the posterior midbrain.

In order to localize the expression of Fgf8 in the isthmus the confrontation of two transcription factors is needed. Otx2 is expressed in the midbrain and Gbx2 in the hindbrain. These factors are not needed to induce but to restrain the expression of Fgf8 (Martinez-Barbera et al., 2001). The expression of Otx2 confers to the mesencephalic neuronal progenitors the capability of processing the positional signals received from the different organizers and of triggering the adequate

differentiation program.

Antero-posterior and dorso-ventral organization of the midbrain

The midbrain is divided in two neuromeres along the AP axis: The m1, containing the tectal gray, the superior colliculus and the inferior colliculus, and the m2, comprising the preisthmus region. Complementary to this AP patterning, the confrontation of Shh from the floor plate with the BMPs and Wnts families from the roof plate generates the subdivision of the midbrain in the DV axis.

The midbrain-hindbrain boundary was determined by fate map experiments (Echevarria et al., 2003). This limit coincides with the caudal limit of Wnt1 and Otx2 expression domains and with the rostral limit of Fgf8 and Gbx2 expression in the isthmus (Fig. 1A,B; Echevarria et al., 2003). The rostral boundary of the midbrain with the diencephalon coincides with the caudal limit of the alar pretectal domain, which expresses Pax6, and the rostral limit of the alar midbrain that expresses Meis2 (Fig. 1A,B; Ferrán et al., 2009; Agoston et al., 2012).

Along the AP axis, the m1 contains a homogeneous basal plate (midbrain tegmentum), which includes the substantia nigra, the oculomotor complex and the red nucleus, among other populations. The m1 alar plate contains three main regions: the tectal gray (TG; Fig. 1A,B), the superior colliculus (SC; Fig. 1A,B) and the inferior colliculus (IC; Fig. 1A,B).

The TG is a retinorecipient-layered formation and is selectively marked molecularly by the restricted strong expression of Ntng2 (Fig. 1A,B). The SC is also a retinorecipient structure and is involved in the integration of visual inputs. The TG and the SC receive the visual information following a precise retinotopic map (Puelles et al., 2012). During embryonic development different genes are expressed in gradients along the different axes of the SC. Among them, EphAs and ephrin-As are important players in these signaling mechanisms that produce the SC topographic map (Triplett and Feldheim, 2012). Other genes such as Meis2, Ntng2, Sox14, Pax3 or Tal2 are also expressed in gradients in the SC (Fig. 1A,B). All these gradients confer positional information to the navigating retinal axons allowing them to reach their final target. The IC is a massive globular formation, composed by a core (principal nucleus) and a shell, forming an important relay within the ascending auditory system. The expression of Ntng2 and Sox14 identifies the location of the IC, both being positive in the SC and negative in the IC (Fig. 1A,B; Puelles et al., 2012).

The m2 is a thin preisthmus transverse territory, whose basal plate is between the oculomotor nucleus (m1) and the trochlear nucleus (isthmus). This basal domain contains the retrorubral dopaminergic cell population (A8) and the dopaminergic interfascicular nucleus. The caudal limit of the basal m2 coincides with

Mesencephalic populations

the caudal end of the interfascicular nucleus and the rostral end of the trochlear nucleus (isthmus, Puelles et al., 2012). The alar plate of m2 contains, among less known structures, the cuneiform and the sagulum nuclei (Puelles et al., 2012), and it is identified by the expression of *Tal2* (Fig. 1A,B).

The mesencephalon has a clear DV organization, the dorsal midbrain, known generically as tectum, and the ventral midbrain, known as tegmentum (Puelles, 2007). Early on, roof (RP) and floor plate (FP) act as DV organizers conferring to the alar and basal plate their respective characteristics, and both of them are subdivided into smaller domains based on various gene expressions (Puelles et al., 2012). Each region shows three subdivisions, in the alar plate we can describe alar dorsal (AD), alar lateral (AL) and alar ventrolateral

(AVL), and in the basal plate the basal lateral (BL), basal intermediate (BI) and basal medial (BM) (Fig. 1C; Puelles et al., 2012; Allen developing mouse brain atlas). From dorsal to ventral, the different regions can be revealed by the detection of specific molecules. The roof plate expresses signaling molecules such as BMPs or Wnts (Chizhikov and Millen, 2005), Wnt1 (Fig. 1C) among them. The whole alar plate is identified by the expression of *Pou4f1*. It is restricted to the mantle zone (Fig. 1C). AD and AL regions are detected by the ventricular expression of *Dbx1* (Fig. 1C). The mantle layer of the AVL is positive medially for *Nkx2.2* and laterally for *Pou4f1* (Fig. 1C). With respect to the basal plate, BL express *Olig2*, BI express *Pax6* and both share the expression of *Nkx2.2* (Fig. 1C). BM expresses in the ventricular layer *Shh* while in the mantle layer *Isl1*

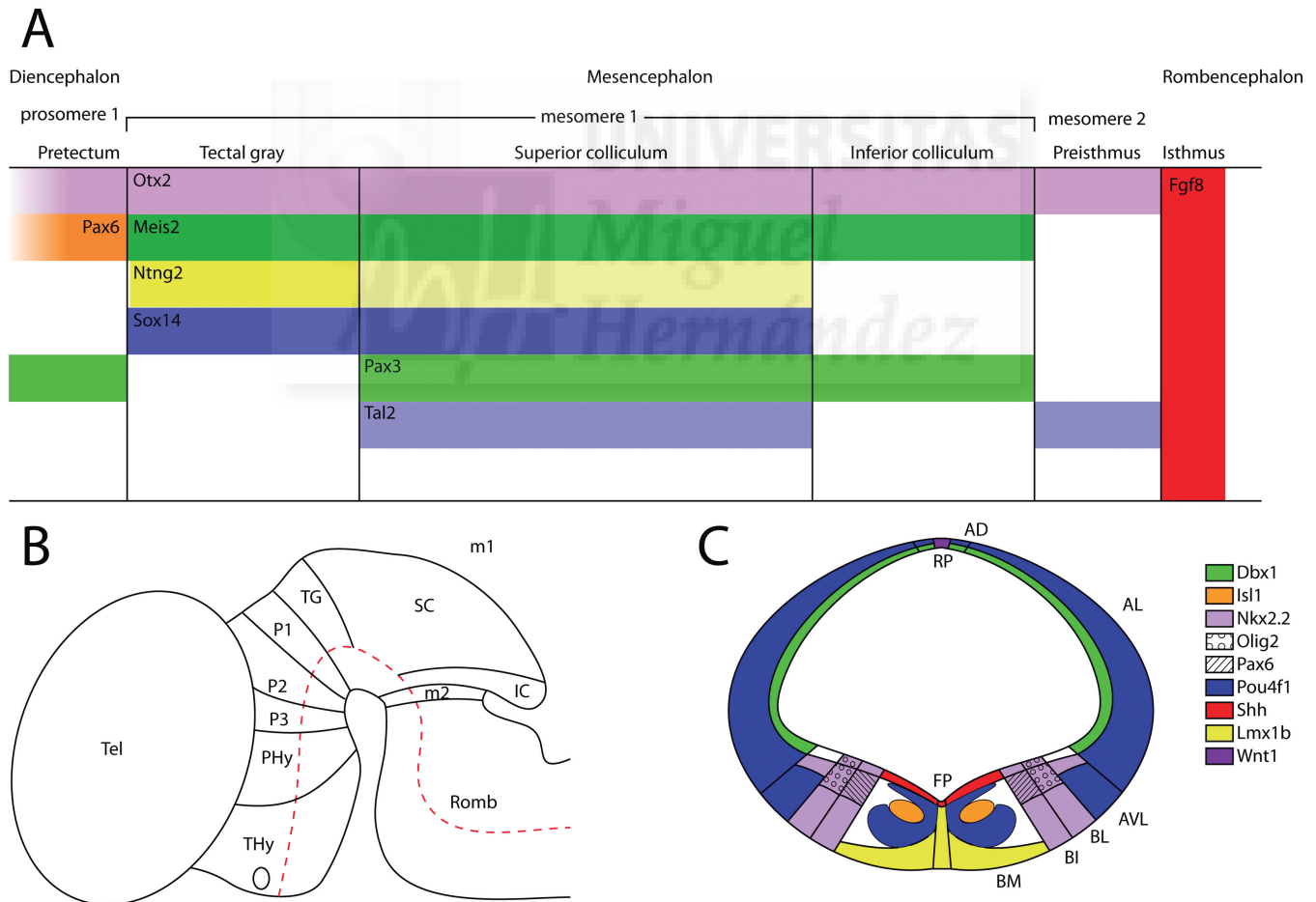


Fig. 1. Schematic representation of the antero-posterior and dorso-ventral organization of the midbrain. **A.** Diagram of the mesencephalic alar plate and surrounding territories displaying the expression pattern of several genes. The combination of these patterns helps us to identify the limits between the different domains. **B.** Schema of the neuromeres that compound the developing brain with special emphasis in the domains of the midbrain. The dashed red line identifies the antero-posterior axis of the neural tube and the alar-ventral limit. **C.** Schema of a transversal section through the midbrain. The different domains are represented and identified by the combination of expression patterns. AD, alar dorsal; AL, alar lateral; AVL, alar ventrolateral; BI, basal intermediate; BL, basal lateral; BM, basal medial; FP, floor plate; IC, inferior colliculus; m1, mesomere 1; m2, mesomere 2; p1, prosomere 1; p2, prosomere 2; p3, prosomere 3; PHy, peduncular hypothalamus; SC, superior colliculus; Romb, rhombencephalon; RP, roof plate; Tel, telencephalon; THy, terminal hypothalamus; TG, tectal grey.

identifies the oculomotor nucleus and Pou4f1 the magnocellular red nucleus (Fig. 1C). Finally, the floor plate and the BM share the expression of Shh in the ventricular layer. Lmx1b is specific of the floor mantle layer and participates in the determination of the dopaminergic populations. These dopaminergic neurons originated in the floor plate gives rise to the ventral tegmental area by radial migration and to the substantia nigra, located in the BL region, by tangential migration (Puelles et al., 2012).

Morphological structures of the midbrain.

Historically, there has been confusion in the delimitation of the mesencephalic territory. The extreme bend of the neural tube in the cephalic flexure produces in mammals a wedge-shape midbrain with a thin basal domain and a broader alar plate. In cross-section, past authors have attributed diencephalic and rombencephalic territories to the mesencephalon. Recent fate map and genetic expression patterns have confirmed the populations that belong to the midbrain (Puelles et al., 2012).

In order to describe the mesencephalic neural

populations, we will follow the AP and the DV axis. Thus, we begin rostrally in m1, in the RP, a thin astroglial palisade in which there is a poor-cell mantle layer, where we can find the beds of tectal gray, tectal and intercollicular commissures. Lateral to the RP, it is located the AD. This domain shows a periventricular stratum that contains part of the periaqueductal gray (PAG). The PAG is a dense group of packed neurons, mainly glutamatergic, surrounding the aqueduct of the midbrain. The central and intermediate strata of the AD are occupied by the tectal paracomisural nuclei and the rostral territory contains a separated tectal gray paracommissural nucleus (Puelles et al., 2012). The next domain is AL, ventral to the AD. Its periventricular stratum is also part of the PAG. This domain presents several populations along the rostrocaudal axis of m1. From rostral to caudal, the tectal gray, the superior colliculus (SC; Fig. 2A,D) and the inferior colliculus (IC). The SC is a pluri-laminated retinorecipient structure divided in deep (white and gray layers), intermediate (white and gray layers) and superficial stratum, which receives the massive projections from the collateral retina. This last stratum is divided in the optical, superficial gray and zonal layer (Dräger and

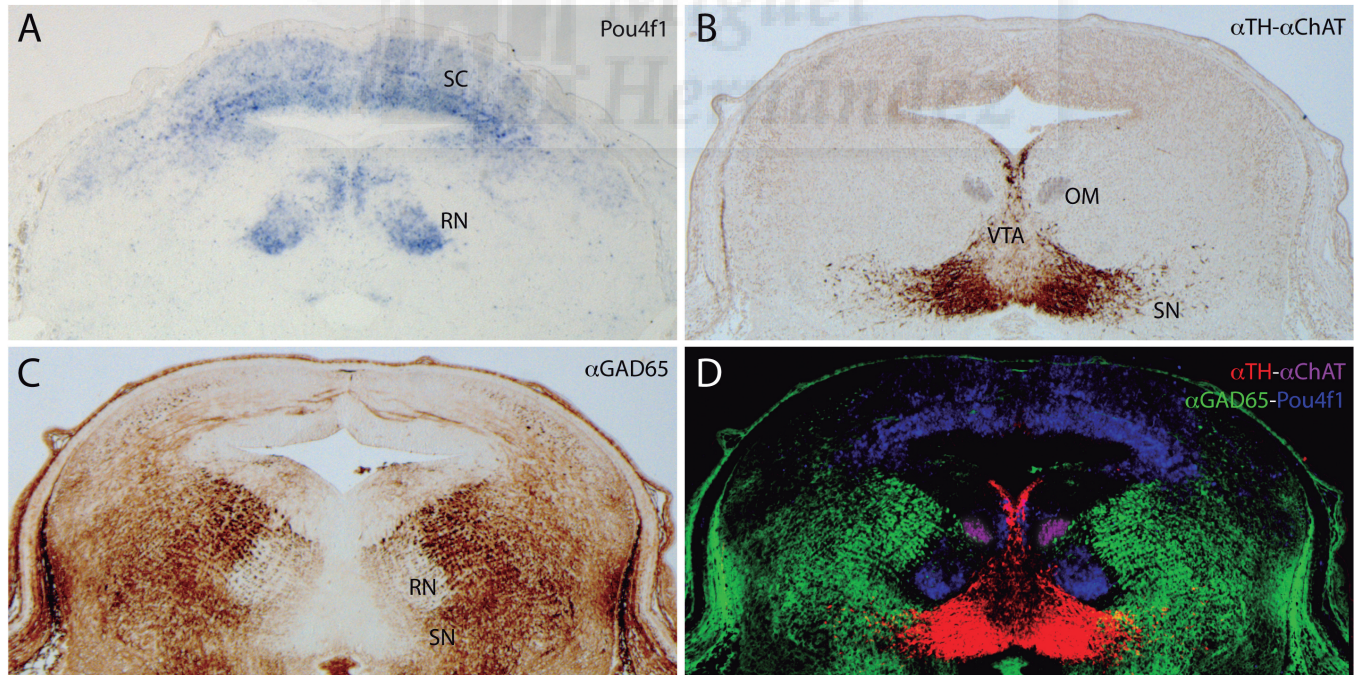


Fig. 2. Identification of the morphological structures of the midbrain. **A-D**, transversal section of the midbrain (mesomere 1) of an E15.5 mouse brain. **A.** *In situ* hybridization with a specific RNA probe against Pou4f1 displaying the localization of the red nucleus in the basal medial domain of the mesencephalon and the superior colliculus in the alar domain. **B.** Double immunohistochemistry with specific antibodies for TH (Institute Jacques Boy Cat. N° 268020234) and ChAT (Chemicon Cat. N° AB144P), identifying the dopaminergic substantia nigra and ventral tegmental area and the motoneurons of the oculomotor complex respectively. **C.** Immunohistochemistry with a specific antibody against Gad67 (Millipore Cat. N° MAB5406) showing the gabaergic populations of the midbrain. **D.** Color-coded overlays of hybridization and immunohistochemistry for TH (red), ChAT (purple), Gad65 (green) and Pou4f1 (blue). The result displayed in the photomicrograph is the result of the superposition of adjacent sections (**B**, **C**) and a non-adjacent section (**A**). This overlay allows us to display in the same image the combination of markers that identify the different mesencephalic populations. Abbreviations: OM, oculomotor nucleus; RN, red nucleus; SN, substantia nigra. SC, superior colliculus; VTA, ventral tegmental area.

Mesencephalic populations

Hubel, 1975a,b). The IC is constituted by a periventricular central nucleus (CIC) that contains densely packed neurons that are more strongly acetylcholinesterase positive than the cortical regions (Franklin and Paxinos, 2008). It receives inputs from all auditory centers in the hindbrain: the cochlear nuclei, the superior olivary complex and the nuclei of the lateral lemniscus, and it projects to the ventral division of the medial geniculate nucleus. Dorsomedially to CIC, the dorsal cortex is located (DCIC) which receives similar inputs from the hindbrain auditory centers and from the nucleus sagulum, and projects to the dorsal division of medial geniculate nucleus. Dorsocentrally to CIC, we can localize the external cortex (ECIC), defined by four layers, two layers contain neurons rich in Acetylcholinesterase and GABA, and the other two link up with the non-stratified rostral part of IC and receive auditory and somatosensory inputs from the hindbrain and spinal cord nuclei. The ECIC also projects to the dorsal division of the medial geniculate and to the magnocellular nucleus (Puelles et al., 2012). Finally, the last subdivision in the dorsal domain, the AVL, contains the liminar alar structures (from *limen alaris*, rim of the alar plate), composed in its periventricular zone by the liminar part of the PAG and in its intermediate stratum by the subtectal portion of the midbrain reticular formation. The superficial stratum is traversed longitudinally by the brachium of SC and IC.

Continuing with the basal plate, the most dorsal parts, BL and BI, are composed in their periventricular stratum by the PAG, possibly containing specialized cells in vocalization, and in their mantle layer by the reticular formation, the largest component of the midbrain tegmentum with non-specific nuclei characterized so far (Puelles et al., 2012). The best-known domain of the basal plate, the BM, contains well-defined neuronal populations. Lateral to the median floor plate and at the border of PAG is the oculomotor nucleus (OM; Fig. 2B,D), a population of motoneurons which innervates several eye muscles and, together with Edinger-Westphal nucleus (EW), preganglionic efferent neurons which project to the ciliary parasymphathetic ganglion in the orbit, compromising the most rostral group of motoneurons in the neural tube (Puelles, 2007). Some studies reporting descendent projections from EW to the spinal cord, referred to a pre-EW population, distinct from the proper EW by not being cholinergic and expressing early Nkx6.1 and Nkx6.2 (Puelles et al., 2012). It is also hypothesized that this population correspond to the mesencephalic interstitial nucleus (Moreno-Bravo et al., 2010). Ventral to the OM, in the outer intermediate stratum, is a glutamatergic reticular formation, the red nucleus (RN; Fig. 2A,D) whose magnocellular part, specifically of the midbrain, integrates inputs from the motor cortex and the spinocerebellum and it is part of the rubrospinal tract that controls movement of distal parts of the limbs (Puelles, 2007). Lateral and dorsal to the RN, there is a large reticular area of GABAergic cells, the parabrachial

area (Paxinos and Watson, 1998; Paxinos, 2009) that expresses Gad67 and parvalbumin (Fig. 2C,D). Projections from somatosensory and motor cortex to this area and to the rostral part of RN are suggested as the basis of an inhibitory pathway to modulate the rubrospinal control over flexor movements of the limbs (Puelles et al., 2012). Lateroventrally in this stratum there is the substantia nigra (SN; Fig. 2B,D), divided into superficial (pars reticularis, SNr) and deep portions (pars compacta, SNc) (Puelles, 2007) and its main input is inhibitory from the striatum, receiving also projections from a range of other structures (Fallon and Loughlin, 1995; Puelles et al., 2012). Neurons of SNr are GABAergic and project to the superior colliculus, thalamus and some midbrain and hindbrain nuclei involved in motor control (Fig. 2C,D; Faull and Mehler, 1978; Puelles et al., 2012). Neurons of SNc project to the striatum, via the nigrostriatal tract, which is affected in Parkinson's disease (Lang and Lozano, 1998a,b) and express tyrosine hydroxylase (TH) early in development (Marin et al., 2005) like the group of neurons located near the midline known as the ventral tegmental area (VTA; Fig. 2B,D). These neurons, derived from developing cells of the floor plate, project to the nucleus accumbens and the limbic cerebral cortex modulating cognitive process (Prakash and Wurst, 2006) and its deregulation is related to the development of addiction (Kelley and Berridge, 2002) and depression (Dailly et al., 2004). Finally, the last domain in the m1 is the floor plate, crossed by two distinct bundles of fibers, the dorsal tegmental decussation (tectobulbar and tectospinal tracts) and the dorsal tegmental decussation (rubrospinal tract). In its intermediate stratum there is the rostral linear nucleus located along the midline and medial to the parabrachial pigmented nuclei, which together with the paranigral and parainterfascicular nuclei form the different subnuclei recognized in the VTA (Puelles et al., 2012).

Continuing in the caudal part of the midbrain, the m2 is a thin transverse ring domain known as preisthmus (Hidalgo-Sanchez et al., 2005) and owing to its different molecular profile it has been recently recognized as a distinct domain (Puelles et al., 2012 and Allen developing mouse brain atlas). Like a complete neuromeric ring of the neural tube, it has roof, alar, basal and floor components (Puelles et al., 2012). The RF, in front of the decussation of the trochlear nerve, is very thin and unremarkable (Puelles et al., 2012). The AD, at both sides of the roof plate, contains the nucleus sagulum (Sag), which is linked to a variety of auditory areas in the hindbrain, midbrain and forebrain. The AL, caudal to the IC, contains the stratified cuneiform gray (CnG) that it is adjacent to the isthmo-mesencephalic border and its periventricular stratum belongs to the PAG. In the AVL, ventral to the cuneiform gray there is the subcuneiform nucleus, which projects to the contralateral spinal cord (Puelles et al., 2012).

The more dorsal domain of the basal plate, the BL and BI, contribute with their periventricular stratum to

the PAG and with their intermediate stratum to the mesencephalic reticular formation in the mantle layer (Puelles et al., 2012) with a large derivate of GABAergic neurons due to the expression of the transcription factor Helt (Nakatani et al., 2007; Guimera et al., 2006). The BM of m2 contributes to the same populations described in the BM of m1. It is specifically located the dopaminergic retrorubral area in the intermediate stratum of this domain. The periventricular PAG also shows the rostral tip of the dorsal raphe nucleus, composed mainly by neurons that express serotonin and by others that express somatostatin (Puelles et al., 2012). The last basal domain of m2, the FP, has only one derivate, the interfascicular nucleus (Puelles et al., 2012), included in the caudal VTA (Phillipson, 1979a-c; Ferreira et al., 2008) and projects opportunistically to the habenula via the retroflex tract (Puelles et al., 2012).

Genetic specification of the basal midbrain

Substantia nigra and ventral tegmental area

The mesencephalic dopaminergic neurons (mDN) are the most studied population owing to their neurodegenerative alteration in several motor syndromes like Parkinson's disease or schizophrenia. The genetic cascade responsible for their differentiation has been amply elucidated (Simeone, 2005; Prakash and Wurst, 2006). There are three main groups of factors composed by extracellular, intracellular and other signaling factors that act on the specification of the mitotic precursors, post-mitotic precursors and on early dopaminergic specified cells.

During the mitotic progenitor stage, the Shh secreted by the floor plate organizer is necessary and sufficient to instruct the ventral cell fate and defines a multiple progenitor pool of early mDNs (Hynes et al., 1995; Abeliovich and Hammond, 2007; Joksimovic et al., 2009). Progenitor cells expressing Patched receptor complex transduce the Shh signal to the transmembrane protein Smoothed. Then, this complex induces the intracellular transcriptional activation form of Gli2 which upregulates Gli1, sufficient for the induction of floor plate markers as Foxa2 (Fuccillo et al., 2006; Blaess et al., 2006, Abeliovich and Hammond, 2007). Fate-map and birth-dating analysis has proven that progenitors in the ventral midline contribute to mDNs in response to Shh before E10.5 (Joksimovic et al., 2009; Blaess et al., 2011). The inhibition of the ventral organizer alters the function of the IsO through the interaction between Shh-Gli3-Fgf8 (Blaess et al., 2006). The two main organizer centers involved in the production of the positional information needed for the specification of the mDNs are closely interrelated (Ye et al., 1998).

The Otx genes, Otx1 and Otx2, participate in the control of the proper position of the IsO (Fgf8 and Wnt1

expression domains). They also instruct the mesencephalic precursors to generate the correct response to the positional information received (Puelles et al., 2003; Simeone, 2005; Simeone et al., 2011). One of Otx2 functions is to repress the expression of the transcription factor Nkx2.2 in the basal medial area in order to prevent the specification of serotonergic neurons instead of mDN (Puelles et al., 2004) and is intrinsically required to control the mDN neurogenesis through a graded AP effect (Omodei et al., 2008) possibly through the regulation of Wnt1 (Alves dos Santos and Smidt, 2011; Simeone et al., 2011).

The mesencephalic precursors with the correct positional information and capabilities trigger the dopaminergic differentiation program, expressing transcription factors such as Lmx1a and Lmx1b (Andersson et al., 2006; Smidt and Burbach, 2007; Deng et al., 2011). Lmx1a is selectively required for the specification of mDNs in the medial area, whereas Lmx1b is necessary for the mDN progenitors located laterally (Deng et al., 2011). Therefore, the Lmx1a/Lmx1b combination has proven essential to initiate the process of all mDNs generation. Lmx1a induces Msx1, which inhibits the expression of negative regulators such as Nkx6.1 and induces the expression of Ngn2, which in turn will induce the expression of Sox2. This is a required factor for the differentiation of the early progenitors into postmitotic mDN that will express Nurr1 (Simeone et al., 2011; Abeliovich and Hammond, 2007). Lmx1b is also suggested to be involved in the activation of Pitx3, which is required for the correct formation, specification and/or survival of mDN in the SN but not in VTA (Smidt et al., 2004; Smidt and Burbach, 2007).

The Nurr1 positive early neurons initiate their postmitotic development. Nurr1 is an important intrinsic factor for the generation of mature mDN (Saucedo-Cardenas et al., 1998). It regulates the expression of several genes involved in the generation and regulation of dopamine (Smidt and Burbach, 2007), such as tyrosine hydroxylase, a limiting enzyme involved in the synthesis of this neurotransmitter. The lack of Nurr1 function produces a complete absence of mDN (Abeliovich and Hammond, 2007).

There is a group of transcription factors involved not only in the determination of the mDN, but also in their late survival. Engrailed-1 (En1) is a crucial factor in early mesencephalic development (Alves dos Santos and Smidt, 2011). Adult mice heterozygous for En1 suffer a progressive loss of mDN (Sonnier et al., 2007). Recently it has been proven that En1 protects dopaminergic neurons against mitochondrial insults (Alvarez-Fischer et al., 2011). Another transcription factor involved in the survival of the mDN is Foxa2. Adult heterozygous mice for Foxa2 suffer a spontaneous and progressive loss of these cells (Kittappa et al., 2007). The activation of Otx2 in the VTA mDN modifies their cellular biology and confers them resistance to MPTP mediated degeneration

Mesencephalic populations

(Di Salvio et al., 2010).

Red nucleus

The RN is organized in two subpopulations, the parvocellular part located in the posterior diencephalon and the magnocellular part located in the mesencephalon.

The mesencephalic RN population appears to be related to the Shh-positive basal domain. Its ventricular region is also positive for Nkx6.1 and gives rise to the oculomotor nucleus as well (Agarwala and Ragsdale, 2002). The progenitors committed to form the RN switch off the expression of Nkx6.1 as soon as they leave the proliferating ventricular layer and switch on the expression of the transcription factor Pou4f1. It has been demonstrated that a Shh overexpression in the developing midbrain produces inactivation of this ventricular Nkx6.1 domain, resulting in a complete lack of RN (Puelles et al., 2003, 2004). Recently, it has been confirmed that the lack of Nkx6.1 generates an abnormal RN with a reduced number of Pou4f1 positive neurons (Prakash et al., 2009).

We demonstrated that this nucleus is maintained in the absence of Shh in the midbrain. Even so this population displayed some disorganization with some ectopic Pou4f1 positive neurons crossing the ventral midline and colonizing the putative location of the lost OM and SN neurons. The number of Pou4f1 positive cells did not increase in this conditional mutant mouse. We hypothesized that the maintenance of the red nucleus could be due to the role of a Foxa2 mechanism in a Shh-independent manner (Perez-Balaguer et al., 2009).

In addition, it has been demonstrated that Foxa2 and Foxa1 are necessary and sufficient to induce the development of this nucleus. The suppression of both genes is required to produce a complete absence of the red nucleus (Ferri et al., 2007). Recently, it has been described that Foxa1 and Foxa2 participate in the specification of the ventral midbrain progenitors interacting with the Shh genetic cascade (Mavromatakis et al., 2011).

OM and RN neurons are derived from the same progenitor domain but at different time points in development. Lmx1b is necessary for the early inhibition of the specification of the red nucleus differentiation program at the beginning of the midbrain basal plate development (Deng et al., 2011). In Lmx1b mutants, there is an increase of the Pou4f1 positive cells and a decrease in the expression of Phox2a (marker of OM neurons). The lack of Lmx1b function generates a change in the progenitors fate from OM to RN neurons, giving rise to an overproduction of Pou4f1 positive cells (Deng et al., 2011).

The proportion of RN and OM population seems to be related to isthmic signaling. Near the Fgf8 source the number of OM neurons are predominant over the RN. As we move rostrally the relation is inverted. An ectopic source of Fgf8 in the anterior midbrain alters this

proportion. It produces the differentiation of ectopic Islet1-positive cells (OM) in the new location in detriment of the Pou4f1-positive neurons (RN; Fedtsova and Turner, 2001).

Oculomotor nucleus

It is well known that the morphogen Shh is essential for the determination of the motor neurons in all the neural tube, and the lack of this gene produces the absence of ventral structures and, consequently, the absence of motoneurons (Litingtung and Chiang, 2000). On the one hand Shh is able, by itself, to induce this neural type in in vitro assays (Tanabe et al., 1995). On the other hand Fgf8 signaling is implicated in the specification of this nucleus (see above).

The OM is specified early on in embryonic development. Overexpression of Shh in 9.5 dpc embryos does not produce changes in this population, due to the fact that it is already specified at this time (Puelles et al., 2003, 2004).

In the Shh conditional mutant mouse, where the lack of this gene (from 8.5dpc onwards) is driven by the expression of Engrailed1, we could only detect some Nkx6.1 and Islet1 co-expressing positive cells belonging to the OM at E10.5, but at 12.5 they were completely absent. For the first time it was proved that Shh is not only necessary to generate the OM neurons, but also to maintain this population (Perez-Balaguer et al., 2009).

In cooperation with Shh, Nkx6.1 is involved in the differentiation of this nucleus. It is expressed in two ventricular domains in the midbrain, one ventral related to the Shh expression domain, and the other dorsal separated from the first by the Nkx2.2-positive band. The OM originates from this Nkx6.1-positive ventricular ventral domain. It was previously described that there is a complete lack of these somatic motor neurons in the loss of function mouse for this gene (Sander et al., 2000), although recently it was proved that there are some Islet1-positive neurons remaining. These neurons have an abnormal migration in the mesencephalic neural tube and project their axons in erroneous directions (Prakash et al., 2009).

There is also evidence, that Lmx1b is involved in the specification of this complex, through the activity of Phox2a. It controls the switch in time in the ventricular progenitors from the OM to the RN differentiation program (Deng et al., 2011).

Mesencephalic interstitial nucleus

Recently, a population positive for Nkx6.1 and Nkx6.2 with a longitudinal distribution along the basal midbrain and diencephalon was described. This population may correspond from rostral to caudal to a functional column integrated in the reticular formation (Moreno-Bravo et al., 2010). Due to its location, the medial part of this positive column for Nkx6.2 corresponds to the pre-Edinger-Westphal nucleus

(Puelles, 2007; Franklin and Paxinos, 2008).

The lateral part of this column would contribute to the rostral interstitial nucleus in the thalamic segment (prosomere 2, Puelles and Rubenstein, 2003), to the interstitial nucleus of Cajal in the pretectal segment (prosomere 1, Puelles and Rubenstein, 2003) and to the interstitial mesencephalic nucleus in the midbrain (Moreno-Bravo et al., 2010). All these populations would constitute a functional column of pre-motor nuclei involved in the saccadic movements of the eyes.

This Nkx6.2-positive population is not only maintained in the absence of Shh in the basal midbrain, but also increased. Therefore, the specification of these Nkx6.2 positive cells is independent of this morphogen. We hypothesized that *Foxa2* could be the candidate to induce this differentiation program (Perez-Balaguer et al 2009).

Periaqueductal gray and diffuse reticular formation

The mesencephalic populations with a less characterized genetic differentiation program are the periaqueductal gray (PAG) and the diffuse reticular formation (Puelles, 2007). The PAG is a dense group of neurons located around the mesencephalic ventricle. It is divided into longitudinal domains parallel to the AP axis corresponding to the DV territories described previously. Each domain has different functional roles; the dorsal area is involved in active defensive/coping strategies while the ventral area has been related with passive coping strategies (Puelles et al., 2012). The diffuse reticular formation is a dispersed group of neurons occupying the remaining mantle layer in the midbrain. In this region no specific areas have been described as specific nuclei or functional centers so far (Puelles et al., 2012).

Conclusions

The development of molecular biology techniques and the increasing number of available specific antibodies allows us to increase the morphological knowledge of the different regions of the developing brain. Simultaneously, the generation of different mouse models through genetic engineering permits us to elucidate the genetic cascades that control the differentiation program of the neuronal nuclei that populate the nervous system. In this review we have joined the explanation of developing embryonic events that give rise to the mesencephalon with the latest updates of the morphological structure of the midbrain, and with the known genetic cascades that control the development of the mesencephalic basal plate.

Acknowledgements. MICINN (BFU2010-16548, FEDER Fonds), MICINN Consolider Grant (CSD2007-00023) and European commission (EUCOMMTOOLS, contract 261492) supported this work. The CSIC-JAE-Predoc program co-financed by FSE supports JA Moreno-Bravo.

References

- Abeliovich A. and Hammond R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates *Dev. Biol.* 304, 447-454.
- Allen Developing Mouse Brain Atlas (2009). Allen Institute for Brain Science. Seattle. Available from: <http://developingmouse.brain-map.org>.
- Agarwala S. and Ragsdale C.E. (2002). A role for midbrain arcs in nucleogenesis. *Development* 129, 5779-5788.
- Agoston Z., Li N., Haslinger A., Wizenmann A. and Schulte D. (2012). Genetic and physical interaction of *Meis2*, *Pax3* and *Pax7* during dorsal midbrain development *BMC Dev. Biol.* 12, p10.
- Alvarez-Fischer D., Fuchs J., Castagner F., Stettler O., Massiani-Beaudoin O., Moya K.L., Bouillot C., Oertel W., Lombès A., Faigle W., Joshi R., Hartmann A. and Prochiantz A. (2011). Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat. Neurosci.* 14, 1260-1266.
- Alves dos Santos M.T.M. and Smidt M.P. (2011). *En1* and *Wnt* signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Dev.* 6, 23.
- Andersson E., Tryggvason U., Deng Q., Friling S., Alekseenko Z., Robert B., Perlmann T. and Ericson J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393-405.
- Basson M.A., Echevarria D., Ahn C.P., Sudarov A., Joyner A.L., Mason I.J., Martinez S. and Martin G.R. (2008). Specific regions within the embryonic midbrain and cerebellum require different levels of FGF signaling during development. *Development* 135, 889-898.
- Blaess S., Corrales J.D. and Joyner A.L. (2006). Sonic hedgehog regulates *Gli* activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development* 133, 1799-1809.
- Blaess S., Bodea G.O., Kabanova A., Chanet S., Mugniery E., Derouiche A., Stephen D. and Joyner A.L. (2011). Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev.* 6, 29.
- Cambroner F. and Puelles L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras *J. Comp. Neurol.* 427, 522-545.
- Chizhikov V.V. and Millen K.J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev. Biol.* 277, 287-295.
- Crossley P.H. and Martin G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121, 439-451.
- Crossley P.H., Martínez S. and Martin G.R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66-68.
- Dailly E., Chenu F., Renard C.E. and Bourin M. (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 18, 601-607.
- Deng Q., Andersson E., Hedlund E., Alekseenko Z., Coppola E., Panman L., Millonig J.H., Brunet J.F., Ericson J. and Perlmann T. (2011). Specific and integrated roles of *Lmx1a*, *Lmx1b* and *Phox2a* in ventral midbrain development. *Development* 138, 3399-3408.
- Di Salvio M., Di Giovannantonio L.G., Acampora D., Prospero R., Omodei D., Prakash N., Wurst W. and Simeone A. (2010). *Otx2* controls neuron subtype identity in ventral tegmental area and

Mesencephalic populations

- antagonizes vulnerability to MPTP. *Nat. Neurosci.* 13, 1481-1488.
- Drager U.C. and Hubel D.H. (1975a). Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature* 253, 203-204.
- Drager U.C. and Hubel D.H. (1975b). Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 38, 690-713.
- Echevarria D., Vieira C., Gimeno L. and Martinez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res. Rev.* 43, 179-191.
- Fallon J.H. and Loughlin S.E. (1995). Substantia nigra. In: *The rat nervous system*. Paxinos G (ed). Academic Press. San Diego. pp 215-237.
- Faull R.L. and Mehler W.R. (1978). The cells of origin of nigrothalamic, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience* 3, 989-1002.
- Fedtsova N. and Turner E.E. (2001). Signals from the ventral midline and isthmus regulate the development of Brn3.0-expressing neurons in the midbrain. *Mech. Dev.* 105, 129-144.
- Ferran J.L., de Oliveira E.D., Merchán P., Sandoval J.E., Sánchez-Arrones L., Martínez-De-La-Torre M. and Puelles L. (2009). Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J. Comp. Neurol.* 1, 405-451.
- Ferreira J.G.P., Del-Fava F., Hasue R.H. and Shammah-Lagnado S.J. (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153, 196-213.
- Ferri A.L.M., Lin W., Mavromatakis Y.E., Wang J.C., Sasaki H., Whisett J.A. and Ang S. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761-2769.
- Franklin K.B.J. and Paxinos G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3rd Edition. Elsevier Academic Press. San Diego.
- Fuccillo M., Joyner A.L. and Fishell G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 772-783.
- Guimera J., Weisenhorn D.V. and Wurst W. (2006). Megane/Heslike is required for normal GABAergic differentiation in the mouse superior colliculus. *Development* 133, 3847-3857.
- Hidalgo-Sánchez M., Martínez-de-la-Torre M., Alvarado-Mallart R. and Puelles L. (2005). A distinct preisthmocytic histogenetic domain is defined by overlap of Otx2 and Pax2 gene expression in the avian caudal midbrain. *J. Comp. Neurol.* 483, 17-29.
- Hynes M., Porter J.A., Chiang C., Chang D., Tessier-Lavigne M., Beachy P.A. and Rosenthal A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35-44.
- Ingham P.W. and Placzek M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat. Rev. Genet.* 7, 841-850.
- Joksimovic M., Anderregg A., Roy A., Campochiaro L., Yun B., Kittappa R., McKay R. and Awatramani R. (2009). Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19185-19190.
- Kelley A.E. and Berridge K.C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.* 22, 3306-3311.
- Kittappa R., Chang W.W., Awatramani R.B. and McKay R.D.G. (2007). The foxa2 gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* 5, e325.
- Lang A.E. and Lozano A.M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1044-1053.
- Lang A.E. and Lozano A.M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1130-1143.
- Lee K.J. and Jessell T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 261-294.
- Litingtung Y. and Chiang C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat. Neurosci.* 3, 979-985.
- Marín F. and Puelles L. (1995). Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1714-1738.
- Marín F., Herrero M., Vyas S. and Puelles L. (2005). Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in mid- and forebrain: neuromeric pattern and novel positive regions. *Dev. Dyn.* 234, 709-717.
- Martínez S., Wassef M. and Alvarado-Mallart R.M. (1991). Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 6, 971-981.
- Martínez S., Crossley P.H., Cobos I., Rubenstein J.L. and Martin G.R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmocytic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* 126, 1189-1200.
- Martínez S., Puelles E., Puelles L. and Echevarría D. (2012). Molecular regionalization of the developing neural tube. In: *The mouse nervous system*. First Edition. Watson C., Paxinos G. and Puelles L. (eds). Elsevier Academic Press. San Diego. pp 2-18.
- Martinez-Barbera J.P., Signore M., Boyl P.P., Puelles E., Acampora D., Gogoi R., Schubert F., Lumsden A. and Simeone A. (2001). Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development* 128, 4789-4800.
- Mavromatakis Y.E., Lin W., Metzakopian E., Ferri A.L.M., Yan C.H., Sasaki H., Whisett J. and Ang S. (2011). Foxa1 and Foxa2 positively and negatively regulate Shh signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mech. Dev.* 128, 90-103.
- Morales-Delgado N., Merchán P., Bardet S.M., Ferrán J.L., Puelles L. and Díaz C. (2011). Topography of somatostatin gene expression relative to molecular progenitor domains during ontogeny of the mouse hypothalamus. *Front. Neuroanat.* 5, 10.
- Moreno-Bravo J.A., Perez-Balaguer A., Martínez S. and Puelles E. (2010). Dynamic expression patterns of Nkx6.1 and Nkx6.2 in the developing mes-diencephalic basal plate. *Dev. Dyn.* 239, 2094-2101.
- Nakatani T., Minaki Y., Kumai M. and Ono Y. (2007). Helt determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing Ngn genes in the developing mesencephalon. *Development* 134, 2783-2793.
- Omodei D., Acampora D., Mancuso P., Prakash N., Di Giovannantonio L.G., Wurst W. and Simeone, A. (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135, 3459-3470.
- Patten I. and Placzek M. (2000). The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1695-1708.
- Paxinos G. and Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. Academic Press. San Diego.

- Paxinos G., Watson C., Carrive P., Kirkcaldie M. and Ashwell K. (2009). Chemoarchitectonic atlas of the rat brain. Second edition. Elsevier Academic Press. San Diego.
- Perez-Balaguer A., Puelles E., Wurst W. and Martinez S. (2009). Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mech. Dev.* 126, 301-313.
- Phillipson O.T. (1979a). The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 85-98.
- Phillipson O.T. (1979b). A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 99-115.
- Phillipson O.T. (1979c). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 117-143.
- Placzek M. and Briscoe J. (2005). The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 230-240.
- Prakash N. and Wurst W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 187-206.
- Prakash N., Puelles E., Freude K., Trümbach D., Omodei D., Di Salvio M., Sussel L., Ericson J., Sander M., Simeone A. and Wurst W. (2009). Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development* 136, 2545-2555.
- Puelles E. (2007). Genetic control of basal midbrain development. *J. Neurosci. Res.* 85, 3530-3534.
- Puelles L. and Rubenstein J.L.R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26, 469-476.
- Puelles E., Acampora D., Lacroix E., Signore M., Annino A., Tuorto F., Filosa S., Corte G., Wurst W., Ang S. and Simeone A. (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat. Neurosci.* 6, 453-460.
- Puelles E., Annino A., Tuorto F., Usiello A., Acampora D., Czerny T., Brodski C., Ang S., Wurst S. and Simeone A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131, 2037-2048.
- Puelles E., Martinez-de-la-Torre M., Watson C. Puelles L. (2012). Midbrain. In: *The mouse nervous system. First Edition.* Watson C., Paxinos G and Puelles L. (eds). Elsevier Academic Press. San Diego. pp 337-359.
- Sander M., Sussel L., Conners J., Scheel D., Kalamaras J., Cruz F., Schwitzgebel V., Hayes-Jordan A. and German M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127, 5533-5540.
- Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt M.P., Cox J.J., de Mayo F., Burbach J.P. and Conneely M.O. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4013-4018.
- Simeone A. (2005). Genetic control of dopaminergic neuron differentiation *Trends Neurosci.* 28, 62-65.
- Simeone A., Puelles E., Omodei D., Acampora D., Di Giovannantonio L.G., Di Salvio M., Mancuso P. and Tomasetti C. (2011). Otx genes in neurogenesis of mesencephalic dopaminergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 665-679.
- Smidt M.P. and Burbach J.P.H. (2007). How to make a meso-diencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 21-32.
- Sonnier L., Le Pen G., Hartmann A., Bizot J., Trovero F., Krebs M. and Prochiantz A. (2007). Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for *Engrailed1*. *J. Neurosci.* 27, 1063-1071.
- Tanabe Y., Roelink H. and Jessell T.M. (1995). Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Curr. Biol.* 5, 651-658.
- Triplett J.W. and Feldheim D.A. (2012). Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 7-15.
- Vieira C., Pombero A., Garcia-Lopez R., Gimeno L., Echevarria D. and Martinez S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 7-20.
- Ye W., Shimamura K., Rubenstein J.L., Hynes M.A. and Rosenthal A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-766.

Accepted August 16, 2012