

Esta tesis doctoral se basa en el trabajo previamente publicado:

Murillo B, Ruiz-Reig N, Herrera M, Fairen A, Herrera E (2015). Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain. *The Journal of Neuroscience* **35**: 11266-11280.



Dr. Miguel Valdeolmillos
Director of the Neuroscience PhD and Master Program

En San Juan de Alicante, 20 Junio 2016

Por la presente certifico que la publicación titulada:

Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain.

The Journal of neuroscience 2015; **35**: 11266-11280. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0779-15.2015.

Cuyos autores son: Murillo B, Ruiz-Reig N, Herrera M, Fairén A and Herrera E.

Cumple con todos los requisitos para optar a presentación de la Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Dr. Miguel Valdeolmillos



Director del Programa de Doctorado en Neurociencias

En San Juan de Alicante, 7 de Julio de 2016

Por la presente certifico que la publicación titulada:

Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain

The Journal of Neuroscience 2015; 35: 11266-11280. doi: 10.1523/JNEUROSC.0779-15.2015

Cuyos autores son: Murillo B, Ruiz-Reig N, Herrera M, Fairén A and Herrera E.

Cumple con todos los requisitos para optar a presentación de la Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones

Dr. Eloísa Herrera González de Molina




Directora de la Tesis doctoral

A QUIEN CORRESPONDA:

Prof. Salvador Martínez Pérez, Director del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral *“Papel del factor de transcripción Zic2 en la migración de diferentes poblaciones prosencefálicas durante el desarrollo del SNC”* ha sido realizada por D.^a Blanca Murillo Rodríguez (NIF 75129381L) bajo la dirección de la Dra. Eloísa Herrera González de Molina y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en San Juan de Alicante a 19 de mayo de 2016



Salvador Martínez
Director



A QUIEN CORRESPONDA:

Eloísa Herrera González de Molina, Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA :

Que D.^a Blanca Murillo Rodríguez ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral "Papel del factor de transcripción Zic2 en la migración de diferentes poblaciones prosencefálicas durante el desarrollo del SNC"

Que tras revisar los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo, dan su conformidad para que se presente la Tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en San Juan de Alicante, a 19 de mayo de 2016


Eloísa Herrera
Directora


Papel del factor de transcripción Zic2 en la migración de diferentes poblaciones prosencefálicas durante el desarrollo del SNC

Blanca Murillo Rodríguez

Directora de Tesis Dra. Eloísa Herrera González de Molina

2016





A MIS PADRES

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis que me diera la oportunidad para iniciar este apasionante camino. En estos años has sido un referente para mí, te has mantenido a mi lado apoyándome siempre en todas las circunstancias, gracias a ti he aprendido a disfrutar de la ciencia y a conocer mis propias capacidades y también mis límites.

Durante este tiempo en los momentos difíciles y también en las alegrías mamá me has acompañado desde allá donde estés, te perdimos muy pronto, pero no te olvido y te llevo en el corazón cada segundo de mi vida.

Mi padre, a quien tanto me parezco, me ha enseñado que el trabajo es el esfuerzo necesario para conseguir los objetivos de la vida, me ha aportado siempre su inteligente visión de las cosas y me ha ayudado en todo momento. Gracias papá por estar ahí.

Mis cuatro vértices, mis hermanos Gonzalo, Álvaro, Alejandro y Adela, porque juntos podemos... porque formamos parte de un todo, porque sin vosotros no sería nadie y me perdería en cualquier cosa. Porque os quiero muchísimo y habéis estado junto a mí siempre en los buenos y malos ratos, por eso, gracias.

A mi abuela y a mi tita, que han sabido rescatarme en los instantes complicados, que me aportan el cariño y la seguridad de un hogar, que han aguantado mis cambios de humor, mis alegrías y tristezas, que me han cuidado como a una flor, haciendo que brotara por momentos, y dándome agua en otros, que me ayudan a respirar, mil gracias.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a Augusto, Cristina, Aida, Maca, Cruz, Gerald y Diana porque entre todos me habéis animado a alcanzar mi meta, por los ratos de conversación, buenos momentos compartidos, experimentos exitosos (y frustrados), “*lab meetings*”, desayunos, navidades y recuerdos... siempre os llevaré conmigo.

A Javi, la luz de mi vida, el amor hecho hombre, quien me ha apoyado constantemente y ha soportado mis llantos y compartido mis alegrías. El hombre, el amigo, el compañero... a ti Javi quiero agradecerte todo lo que sin dudar has hecho por mí, tu eres un pedazo muy importante de este triunfo.

Qué decir de mis amigos de siempre, incansables compañeros de viaje: Carlos, Raquel, Migue, Nicky y otros tantos más a los que no nombro. Por las cervecitas y los ratos de charla, los partidos de fútbol y los momentos en los que me habéis demostrado que la amistad es uno de los valores más importantes de la vida.

A Diego por su agudeza mental y sus giros cómicos, por su Deportivo de la Coruña y las noches en el “*Momias*” y en el “*Embolic*”, por dejarme sin leche para desayunar, por ayudarme con el inglés y mi “*chapurreo*” en alemán, los ratos vividos junto a ti han sido mágicos.

Giovanni, gran compañero y amigo, compartimos buenas cenas y encantadores almuerzos, viajamos a París y nos perdimos por sus calles. Me ayudaste en el momento más difícil de mi estancia en Alicante. Te llevo dentro del alma.

A Reva, mi gran amigo de San Juan, cuantas quinielas, cuantos ratos en los que con una copa de vino “arreglábamos” el mundo entre los dos, tu cariño ha sido muy importante para mí. Agradezco los años en los que fuimos vecinos.

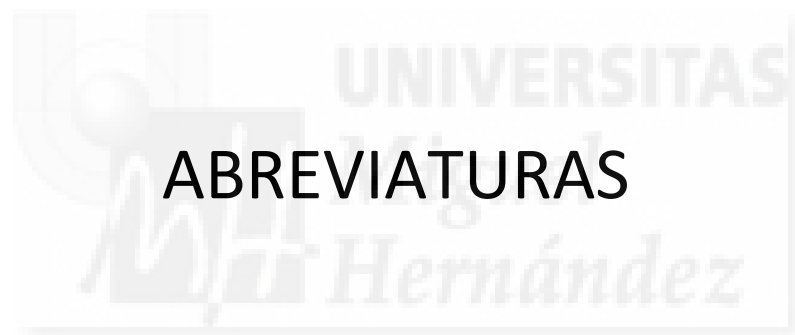
A “Los Cansinos”: Jessy, Alba, Bárbara, Elena, Migue... por tantas tardes de juerga, noches de confianzas, amistad y compañerismo, porque sin vosotros mi vida en Alicante hubiera sido más oscura, menos brillante, menos rica...

A mi gente de escalada, os quiero dar las gracias: Formi, Marta, Jaén, Vero, Maribel, Anabel, Arantxa, Helenita...por tantas noches mirando las estrellas, tantas vías escaladas, tantos ratos de guitarra, conciertos y risas. Me habéis hecho sentir plena y feliz, me habéis enseñado a disfrutar de la naturaleza más de lo que jamás pude soñar. Con vosotros me he bañado de luz, me he asomado a la luna y he comprendido que no hay instante más precioso que cuando el sol se oculta tras una colina.

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Inducción y regionalización del Sistema Nervioso.....	13
2. Migración neuronal.....	15
2.1. Migración radial en la corteza.....	16
2.2. Migración tangencial en la corteza	22
2.3. Migración radial y tangencial: ¿diferentes rutas pero mecanismos similares?.....	24
2.4. Mecanismos moleculares implicados en el Ciclo Migratorio.....	29
3. Migración de las células de Cajal-Retzius	33
3.1. Origen de las CCRs.....	33
3.2. Marcadores moleculares de las CCRs	36
3.3. Rutas de migración de las CCRs.....	37
3.4. Mecanismos moleculares implicados en la migración de las CCRs	40
3.5. Relina: cascada de señalización y funciones	44
3.5.1. Cascada de señalización de la Relina.....	45
3.5.2. Funciones de la Relina	48
3.5.3. Disminución de la cantidad de Relina e implicaciones en la laminación cortical	50
4. El factor de transcripción Zic2 y su papel en guía axonal y migración neuronal....	52
4.1. Zic2 en guía axonal	52
4.2. Zic2 en migración	60
OBJETIVOS	63
RESULTADOS.....	67
DISCUSIÓN	89
1. Zic2 en las neuronas telencefálicas	91
2. Zic2 en las neuronas diencefálicas.....	96
3. ¿Está Zic2 implicado en migración radial o tangencial?	98
4. Zic2 en holoprosencefalia y otras patologías del desarrollo	99
CONCLUSIONES.....	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	107

1. Animales.....	109
2. Inmunohistoquímica, inyecciones de BrdU e hibridación <i>in situ</i>	109
3. Preparación de las vesículas telencefálicas y cuantificación de la intensidad de fluorescencia.....	112
4. Cultivos y análisis de CCRs en los explantes de “hem” cortical.....	112
5. Experimentos de <i>time lapse</i> y rastreo celular	114
6. Análisis cuantitativos y estadísticos.....	114
REFERENCIAS	115
MATERIAL SUPLEMENTARIO	135





Akt1 o Akt: <i>Thymoma viral proto-oncogene 1</i>	DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol
ApoER2: <i>Apolipoprotein E receptor 2</i>	Dbx1: <i>Developing brain homeobox 1</i>
ARN: Ácido ribonucleico	Dcx: <i>Doublecortin</i>
BCIP: <i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt</i>	EAC: Estría amigdaloides caudal
BDNF: <i>Brain derived neurotrophic factor</i>	Ebf2: <i>Early B cell factor 2</i>
BrdU: Bromodesoxiuridina	Ebf3: <i>Early B cell factor 3</i>
CCRs: Células de Cajal-Retzius	Efna5: Efrina A5
Cdk5: <i>Cyclin-dependent kinase 5</i>	Efnb2: Efrina B2
Cdkn1a o P21: <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>	EGM: Eminencia ganglionar medial
Cdkn1b o p27Kip1: <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	EM: Estría migratoria
CGRs: Células ganglionares de la retina	EphA4: <i>Eph receptor A4</i>
CM: Ciclo migratorio	EphB1/B2/B3: <i>Eph receptor B1/B2/B3</i>
CRD-Ngr1: <i>Neuregulin 1 de unión a membrana</i>	FD: Fascículo dorsal
Crk: <i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i>	FDL: Fascículo dorsal lateral
CrkL: <i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like</i>	FGFs: <i>Fibroblast growth factors</i>
Cul5: <i>Cullin5</i>	FPS: Frontera palio-subpalio
Cxcl12: <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>	Fyn: <i>Fyn proto-oncogene</i>
Cxcr4: <i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>	GDNF: <i>Glial cell line derived neurotrophic factor</i>
Dab1: <i>Disabled 1</i>	GFP: <i>Green fluorescent protein</i>
	GGF: <i>Glial growth factor</i>
	GR: Glía radial
	HC: Hem cortical
	HPE: Holoprosencefalia
	Ig-Nrg1: <i>Neuregulin 1 soluble</i>

L1: <i>L1 cell adhesion molecule</i>	PCMTv: Parte ventral de la pared caudomedial telencefálica
Lhx5: <i>LIM homeobox protein 5</i>	PCZ: <i>Primitive cortical zone</i>
Limk1: <i>LIM-domain containing, protein kinase</i>	PFA: Paraformaldehido
Lis1: <i>Lissencephaly-1</i>	PI3K: <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
LN: Neurita más larga	Plxnd1: Plexina D1
MB: Membrana basal	PP: Preplaca
mGluR1: <i>Glutamate receptor, metabotropic 1</i>	Ptk2 o Fak: <i>Protein tyrosine kinase 2</i>
NBT: <i>Nitro-blue tetrazolium chloride</i>	Rapgef1 o C3G: <i>Rap guanine nucleotide exchange factor</i>
Ndel1: <i>Nuclear distribution gene E-like homolog 1</i>	Sema3A: <i>Semaforina 3A</i>
NGLd: Núcleo geniculado lateral dorsal	Sema3E: <i>Semaforina 3E</i>
NGLv: Núcleo geniculado lateral ventral	Sema3F: <i>Semaforina 3F</i>
Nr2f2 o Coup-TF2: <i>Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2</i>	Slit1: <i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>
Nrg1: <i>Neuregulin 1</i>	SN: Neurita más corta
NT4: <i>Neurotrophin 4</i>	SNC: Sistema Nervioso Central
nTOL: Núcleo del tracto olfatorio lateral	SOCS: <i>Suppressor of cytokine signaling</i>
1 ON: Neurita de primer orden	SP: Subplaca
2 ON: Neurita de segundo orden	Src: <i>Rous sarcoma oncogene</i>
Pak1: <i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>	ST: Septo
Pax6: <i>Paired box 6</i>	TBST: <i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
PBS: <i>Phosphate-buffered saline</i>	TC: Talamocorticales
PC: Placa cortical	Terf2ip o Rap1: <i>Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein</i>
	Trb1: <i>Tribbles homolog 1</i>

Trp73 o p73: *Transformation related protein 73*

VLDLR: *Very low-density lipoprotein receptor*

Wnt: *Wingless-type MMTV integration site family*

ZI: Zona intermedia

Zic: *Zinc finger protein of the cerebellum*

Zic1-3: *Zinc finger protein of the cerebellum 1-3*

ZLI: Zona limitante intratálámica

ZM: Zona marginal

ZSV: Zona subventricular

ZV: Zona ventricular





It has been previously reported that the transcription factor Zic2 is expressed in ipsilaterally projection neurons and by controlling the expression of axon guidance molecules such as the tyrosine kinase receptors EphB1 and EphA4, determines axon midline repulsion in these populations of differentiated neurons during the late phases of embryonic development (Escalante et al., 2013; Garcia-Frigola et al., 2008; Herrera et al., 2003). In this thesis we show that, at early embryonic stages, this transcription factor is also detected in three different prosencephalic populations of migrating cells: 1) The Cajal-Retzius Cells, 2) A subpopulation of cells originated in the dorsal telencephalon moving to the lateral olfactory tract nucleus (nLOT) and 3) A population of interneurons that go from the third ventricle wall to the ventral lateral geniculate nucleus (vLGN). We have first characterized these three types of Zic2 migrating cells and then, by assessing a set of different functional experiments *in vivo*, we demonstrate that Zic2 is essential to assure proper migration of these cells to their final locations in the brain. Finally, we reveal that as in differentiated neurons whose axons are repelled at the midline, this transcription factor regulates the expression of Eph receptors also in migrating neurons.

Se ha descrito previamente que el factor de transcripción Zic2 se expresa en determinadas poblaciones de neuronas diferenciadas que proyectan ipsilateralmente y mediante el control de la expresión de moléculas de guía axonal tales como los receptores de la familia de las tirosina quinasa EphB1 y EphA4, induce la repulsión de sus axones a la línea media del Sistema Nervioso durante las etapas tardías del desarrollo embrionario (Escalante et al., 2013; Garcia-Frigola et al., 2008; Herrera et al., 2003). En el presente trabajo de tesis revelamos que en etapas más tempranas del desarrollo embrionario, este factor de transcripción se detecta además en tres poblaciones de células prosencefálicas cuando éstas se encuentran migrando para alcanzar su localización final: 1) Las células de Cajal-Retzius, 2) Una subpoblación de células que se originan en el telencéfalo dorsal para alcanzar el núcleo del tracto olfatorio lateral (nTOL) y 3) Una población de células que se mueven desde la pared del tercer ventrículo hasta el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv). Mediante experimentos funcionales *in vivo* demostramos además que Zic2 es crucial para la correcta migración de estos tres tipos de poblaciones migratorias y que como ocurre en el caso de las neuronas diferenciadas cuyos axones son repelidos en la línea media, Zic2 regula la expresión de los receptores Eph también en las células migratorias en las que se expresa.



1. Inducción y regionalización del Sistema Nervioso

El desarrollo del Sistema Nervioso es un proceso muy complejo que en mamíferos se inicia en las primeras semanas de vida. El Sistema Nervioso Central (SNC) deriva de una lámina epitelial simple denominada placa neural que se genera a partir del ectodermo dorsal en un proceso conocido como inducción neural. En estadios tardíos de la gastrulación esta placa se cierra para formar el tubo neural que posteriormente se regionaliza en función de los ejes antero-posterior y dorso-ventral. La regionalización del tubo neural está controlada por la acción concertada de moléculas de señalización secretadas en forma de gradiente

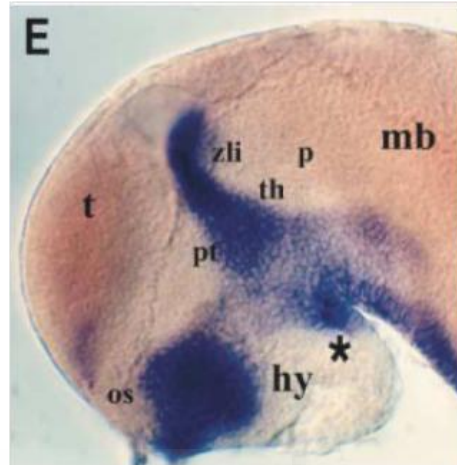


Figura 1: Cerebro anterior de pez cebra en desarrollo.

La expresión de Shh permite distinguir las distintas regiones cerebrales: región óptica, os; telencéfalo, t; pretálamo, pt; hipotálamo, hy; tálamo, th; zona limitante intratálamica, zli; pretectum, p; cerebro medio, mb; *Sonic hedgehog*, Shh (Wilson and Houart, 2004).

por grupos específicos de células conocidos como centros organizadores. Estas moléculas, denominadas morfógenos, regulan la expresión diferencial de diversos factores de transcripción en los tejidos adyacentes dotándolos de un fenotipo específico y confiriendo a las células información posicional a lo largo de los ejes embrionarios. De este modo en el tubo neural se diferencian distintos dominios de progenitores que posteriormente darán lugar a las estructuras que conforman el Sistema Nervioso adulto (Figura 1). De la zona inicial del tubo neural surge el cerebro anterior o prosencéfalo que en su parte más rostral está compuesto por el telencéfalo e hipotálamo mientras que en su región caudal se sitúa el diencéfalo. El telencéfalo a su vez se divide en palio: que dará lugar a la corteza cerebral e hipocampo y subpalio:

compuesto por los ganglios basales, la amígdala y el septo. Por su parte el diencefalo está formado por el pretálamo, tálamo, epitálamo y pretecto (Andoniadou and Martinez-Barbera, 2013; Beccari et al., 2013; Lim and Golden, 2007; Puellas and Rubenstein, 2003; Robertshaw and Kiecker, 2012; Scholpp and Lumsden, 2010; Wilson and Houart, 2004).



2. Migración neuronal

Junto a los mecanismos de regionalización y especificación celular, la migración neuronal es un proceso esencial para la formación del cerebro anterior. Durante el desarrollo del SNC, determinadas poblaciones neuronales poseen la capacidad de migrar desde sus lugares de origen en las zonas germinales hasta sus posiciones finales donde ejercerán su función. La migración de los diferentes tipos celulares permite, por tanto, la formación de distintas unidades funcionales que integrarán la heterogénea arquitectura del cerebro adulto (Cooper, 2013; Marin, 2013; Marin et al., 2010; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

Los procesos de migración neuronal durante el desarrollo se han descrito en detalle en la corteza (o córtex) cerebral, donde se llevan a cabo la integración y el procesamiento de elaboradas funciones cognitivas, sensoriales y motoras (Fietz and Huttner, 2011; Florio and Huttner, 2014; Franco and Muller, 2013; LaMonica et al., 2012; Reillo and Borrell, 2012). La corteza cerebral adulta se compone de una sofisticada red celular que incluye dos tipos principales de neuronas, por un lado las neuronas de proyección excitatorias, conocidas también como neuronas piramidales, que constituyen la mayoría de las neuronas corticales y por otro las interneuronas, generalmente inhibitorias, presentes en menor abundancia (Ayala et al., 2007; Chan et al., 2001; Marin et al., 2010; Molyneaux et al., 2007). Las neuronas piramidales e interneuronas se organizan en seis capas diferenciables por su densidad y morfología celular (I-VI), siendo la más externa la capa I y la más interna la capa VI. Dentro de cada capa, estas neuronas adquieren identidades específicas y forman tanto conexiones locales como de larga distancia. La intrincada arquitectura de la corteza cerebral es el

resultado final de un complejo proceso de desarrollo en el que la correcta migración de las neuronas piramidales y de las interneuronas es esencial para una adecuada laminación y conectividad. De hecho, alteraciones en la migración de estos dos tipos de neuronas corticales durante el desarrollo pueden provocar disfunciones y/o malformaciones asociadas a desordenes neurológicos (Hippenmeyer, 2014).

Durante el desarrollo cortical emerge también un tercer tipo de neuronas, las células de Cajal-Retzius (CCRs) que ejercen su función transitoriamente para después desaparecer mediante apoptosis en estadios postnatales (Gil et al., 2014; Kirischuk et al., 2014; Meyer, 2010). Las neuronas piramidales, las interneuronas y las CCRs viajan durante el desarrollo desde el lugar donde se generan hasta colocarse en sus respectivos destinos finales siguiendo diferentes rutas de migración. Mientras que las piramidales migran radialmente, las CCRs siguen un tipo de migración denominado tangencial y las interneuronas migran primero tangencialmente desde la eminencia ganglionar medial, la eminencia ganglionar caudal y el área preóptica para cambiar después a una migración radial (Bielle et al., 2005; Garcia-Moreno et al., 2007; Gil et al., 2014; Marin, 2013; Marin et al., 2006; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009; Meyer, 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Villar-Cervino et al., 2013; Yoshida et al., 2006).

2.1. Migración radial en la corteza

Las neuronas piramidales se generan en la llamada zona ventricular (ZV) que es la parte del telencéfalo en contacto con el ventrículo. En mamíferos aparece una zona proliferativa adicional durante la corticogénesis que se denomina zona subventricular

(ZSV), integrada por progenitores que han delaminado desde la ZV (Merot et al., 2009; Noctor et al., 2004). En la formación de esta zona proliferativa accesoria parece estar la base del aumento de espesor y laminación de la corteza cerebral durante la evolución (Cheung et al., 2007). A partir de progenitores neuronales localizados en estas zonas ventriculares se producen los diferentes tipos de neuronas piramidales que pueblan la corteza cerebral y que migran radialmente para formar las distintas capas corticales (Florio and Huttner, 2014; LaMonica et al., 2012; Merot et al., 2009; Tiberi et al., 2012). Con la primera ola de migración se forma la preplaca (PP) donde se localizarán además las CCRs. Con la siguiente ola de migración las neuronas postmitóticas, que se generan en las zonas ventriculares, formarán la placa cortical (PC) que divide la PP en dos capas: la zona marginal (ZM o capa I) que permanece cerca de la superficie pial y donde se localizan las CCRs, y otra zona más profunda denominada subplaca (SP). De esta manera se genera la capa VI de la PC, que queda intercalada entre estas dos nuevas láminas. El desarrollo de la PC continúa con sucesivas olas de neuronas que migran radialmente engrosando la PC en sentido vertical y produciendo las diferentes capas corticales (II-V) (Figura 2).

Estudios autoradiográficos llevados a cabo hace varias décadas propusieron que las distintas capas corticales (II-VI) debían generarse siguiendo un patrón de dentro hacia fuera o *"inside-out"* (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1972; Wilson and Houart, 2004). Estudios posteriores han confirmado definitivamente esta hipótesis demostrando que las neuronas más maduras residen en las capas más internas (V,VI), mientras que las neuronas generadas en estadios posteriores migran y sobrepasan las capas ya existentes para dar lugar a las capas más externas (IV, III, II) (Figura 2) (Ayala

et al., 2007; Gao and Godbout, 2013; Gupta et al., 2002; Hippenmeyer, 2014; Marin and Rubenstein, 2003; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009).

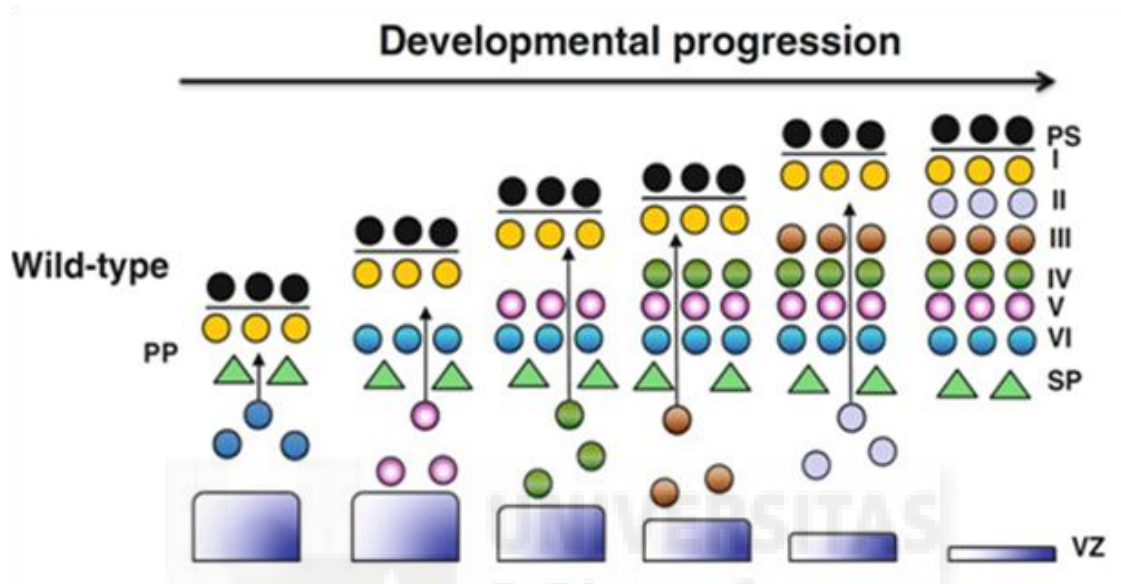


Figura 2: Migración radial en la corteza cerebral.

A estadios tempranos del desarrollo embrionario células progenitoras de la futura capa VI parten la preplaca para formar la subplaca y la zona marginal, también denominada capa I, generando así la capa VI de la corteza cerebral. Las neuronas que nacen posteriormente continúan migrando y sobrepasan a las neuronas más antiguas, resultando en una formación cortical de dentro hacia fuera “inside-out”, con las neuronas más maduras localizadas en las capas internas y las más recientes en las capas superiores. Zona ventricular, VZ; preplaca, PP; subplaca, SP; superficie pial, PS; capas I-VI, I-VI (Gao and Godbout, 2013).

Se han descrito hasta el momento dos modos de migración radial durante la formación de las capas corticales: la translocación somal y la locomoción guiada por glía radial (GR). En estadios muy tempranos de la corticogénesis el primordio cortical es relativamente delgado y ocupa una corta distancia vertical en sentido ápico-basal. Las neuronas recién generadas sufren translocación somal partiendo de la ZV y migrando hacia la superficie pial. Las células migrantes anclan su largo “leading process” (que como explicaremos más adelante es la neurita que sirve como brújula durante su movimiento) en la superficie pial produciéndose posteriormente una rápida

nucleoquinesis en la que el núcleo se transloca siguiendo la dirección del *“leading process”* y de esta manera se formará la PP (Hippenmeyer, 2014; Marin and Rubenstein, 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002). En cambio, las neuronas que se generan a estadios más tardíos se mueven mediante locomoción guiada por GR. Estas neuronas pasan por distintos estados de migración caracterizados por abruptos cambios morfológicos, de dirección del movimiento y de velocidad que dependen de su interacción con la GR (Hippenmeyer, 2014; Kriegstein and Noctor, 2004; Marin and Rubenstein, 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002) (Figura 3). Primero las células delaminan del neuroepitelio y se mueven radialmente hacia la ZSV (Itoh et al., 2013). A continuación, se produce una pausa de 24 horas y las células adquieren una morfología multipolar deteniéndose en la parte alta de la ZSV/parte baja de la zona intermedia (ZI), que es una capa situada entre la ZSV y la PC caracterizada principalmente por la presencia de estas células multipolares. Imágenes de video-microscopía muestran que estas células multipolares son altamente dinámicas generando y retrayendo sus procesos constantemente. En esta fase, las neuronas no parecen estar adheridas a la GR y son capaces de moverse tangencialmente (Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Después, algunas células se trasladan hasta la zona ZV para posteriormente engarzarse a la GR mientras que otras se enganchan directamente a la GR (Noctor et al., 2004). Tras adherirse a la GR todas las células adoptan una morfología bipolar. El *“leading process”* queda dirigido hacia la superficie pial y usando como soporte la GR avanzan en su migración (Merot et al., 2009; Nadarajah et al., 2001; Noctor et al., 2004; Rakic, 1972). Finalmente, cuando el *“leading process”* llega a la capa más superficial del córtex en desarrollo o ZM, los somas de la célula se

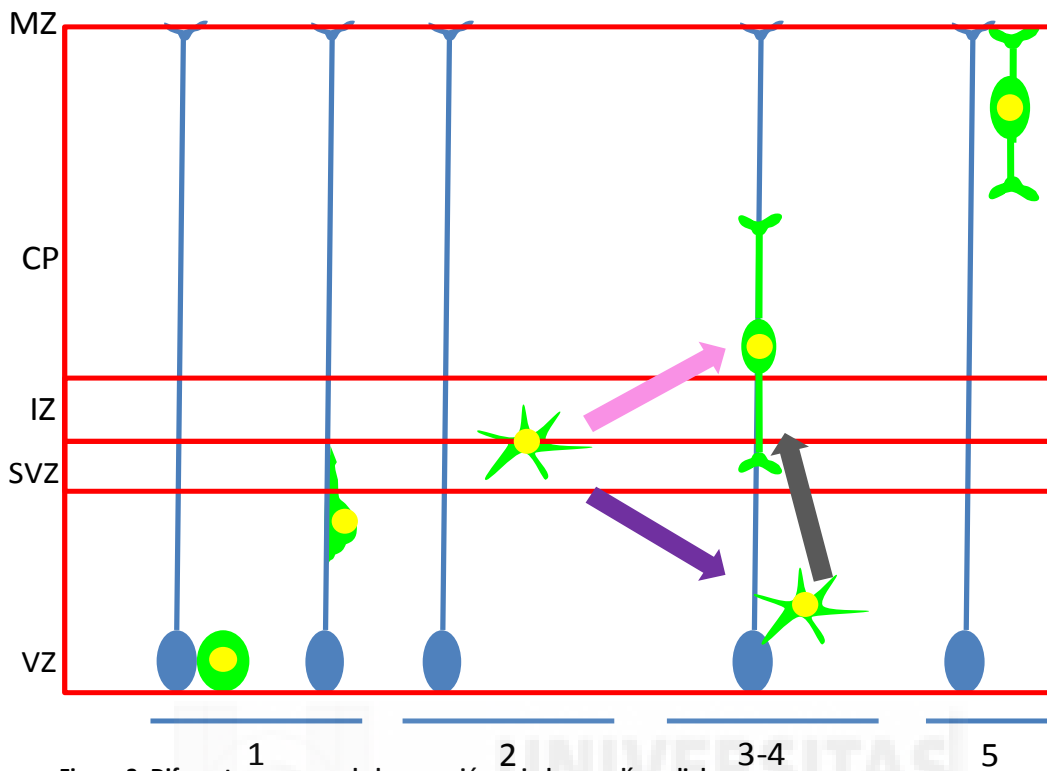


Figura 3: Diferentes pasos en la locomoción guiada por glía radial.

- 1) La neurona piramidal (verde) migra radialmente hasta la zona subventricular (SVZ) utilizando la glía radial (RG) (azul) como sustrato.
 - 2) En la SVZ/IZ la neurona se desancla de la RG y adopta una morfología multipolar.
 - 3-4) En este estadio, la neurona puede engancharse de nuevo a la RG (flecha rosa) y continuar su movimiento radial hacia la zona marginal (MZ), o bien descender hasta la zona ventricular (VZ) (flecha morada). Antes o después, todas las células se adhieren a la RG (flecha gris).
 - 5) Finalmente, la neurona se desancla de la RG y culmina su migración mediante translocación terminal.
- Zona ventricular, VZ; zona subventricular, SVZ; zona intermedia, IZ; placa cortical, CP; zona marginal, MZ; glía radial, RG. Adaptado de Kriegstein and Noctor, 2004.

desanclan de la GR y se mueven rápidamente hacia la superficie de la PC, mientras que los extremos de los *“leading processes”* siguen anclados a la ZM en un proceso denominado translocación terminal. Este mecanismo es morfológicamente similar a la translocación somal, completándose la migración justo debajo de la ZM, de manera que la célula finalmente ocupa su lugar de destino en la PC (Sekine et al., 2014).

En la locomoción, las interacciones entre la GR y las neuronas piramidales son fundamentales ya que se producen procesos adhesivos y de separación entre estos dos tipos celulares que permiten el movimiento saltatorio de la neurona migrante (Marin et al., 2010). Los mecanismos moleculares que controlan estos procesos están

siendo investigados con gran intensidad en estos últimos años. Así, por ejemplo, actualmente sabemos que varias moléculas de adhesión de membrana como las Neuregulinas (*Neuregulins*) y numerosas Integrinas (*Integrins*) median la interacción entre la GR y la neurona cortical en migración (Anton et al., 1997; Fishell and Hatten, 1991; Marin et al., 2010). La Neuregulina *Glial growth factor* (GGF) se expresa en las neuronas piramidales y es esencial para el mantenimiento y elongación de la GR ya que en su ausencia la GR está alterada (Anton et al., 1997). Las Integrinas son proteínas que forman heterodímeros y que se expresan ampliamente durante el desarrollo de la corteza. Tanto las subunidades $\alpha 3$, αV como la subunidad $\alpha 6$ dimerizan con la subunidad $\beta 1$ (Marin et al., 2010) y el bloqueo, por ejemplo, de la integrina $\alpha 3$ en cultivo da lugar a alteraciones citoesqueléticas. Además, en ausencia de estas moléculas la célula migrante se desancla de la GR produciéndose una corteza cerebral aberrante (Anton et al., 1999; Huang, 2009; Schmid et al., 2004).

Las “*gap-junctions*”, o uniones en hendidura, también juegan un papel importante en la interacción neurona-GR durante la migración (Cina et al., 2009; Elias et al., 2007). Sus componentes principales, unas proteínas de membrana llamadas Conexinas (Connexins), se expresan tanto en la GR como en la neurona en migración y proporcionan una dinámica de contactos adhesivos que interactúa con el citoesqueleto promoviendo la estabilización del “*leading process*” a lo largo de la GR y permitiendo además la translocación del núcleo (Elias et al., 2007).

2.2. Migración tangencial en la corteza

Al contrario que las neuronas piramidales, las interneuronas, que provienen de progenitores localizados en el subpallio (eminencias ganglionares y área preóptica), recorren una larga distancia siguiendo una complicada trayectoria hasta llegar a su posición final en las distintas capas de la corteza (Figura 4) (Marin, 2013). La fuente principal de interneuronas es la eminencia ganglionar medial (EGM) situada en el subpallio. El movimiento inicial de las interneuronas para salir de esta zona proliferativa parece estar mediado por señales

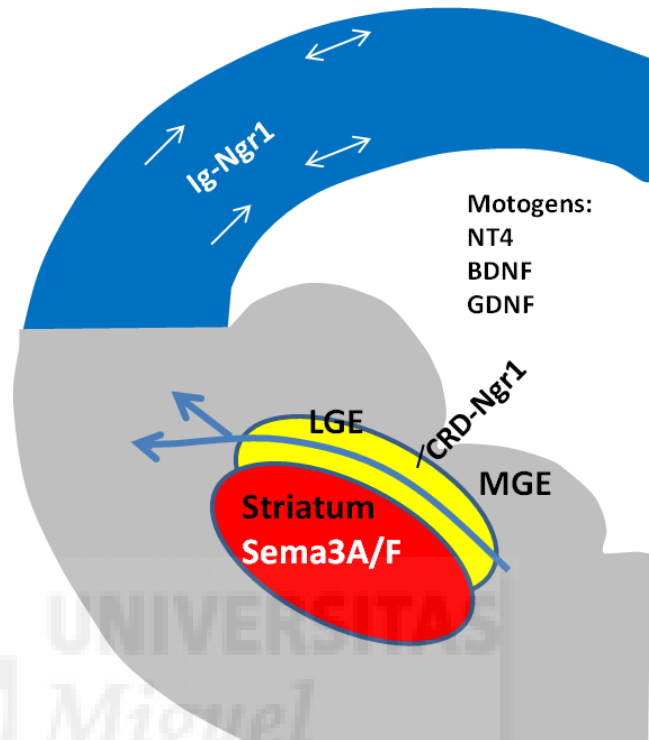


Figura 4: Migración tangencial de las interneuronas.

Las interneuronas originadas en la MGE atraviesan la eminencia lateral ganglionar (LGE) esquivando el estriado, que expresa las señales repulsivas Sema3A y Sema3F. En su proceso migratorio, las interneuronas también responden a factores motogénicos que estimulan el movimiento de las mismas. Además, existen señales quimioatrácticas como la Nrg1 en sus dos isoformas: CRD-Ngr1 de unión a membrana e Ig-Nrg1, que es una proteína difusible. Estas isoformas actúan como atrayentes a corta y larga distancia respectivamente para las interneuronas. Una vez en el córtex, las interneuronas se dispersan siguiendo rutas específicas. Eminencia lateral ganglionar, LGE; eminencia medial ganglionar, MGE; estriado, *striatum*; *Semaphorins 3A/F*, Sema3A/F; *Neuregulin 1* de membrana, CRD-Nrg1; *Neuregulin 1* soluble, Ig-Nrg1; factores motogénicos, motogénos; *Neurotrophin 4*, NT4; *Brain derived neurotrophic factor*, BDNF; *Glial cell line derived neurotrophic factor*, GDNF. Adaptado de Huang, 2009.

quimiorrepulsivas como las proteínas *Slit homolog 1 (Drosophila)* (Slit1) y efrina (*ephrin*) A5 (EfnA5) que se expresan en la zona ventricular de la EGM. Evidencias experimentales sugieren que estos dos factores repelen a las interneuronas

provocando así su salida de la zona proliferativa y por tanto el inicio de la migración (Marillat et al., 2002; Zhu et al., 1999; Zimmer et al., 2008).

Durante su migración hacia la corteza, las interneuronas tienen que atravesar la eminencia ganglionar lateral esquivando el estriado. Las neuronas de proyección situadas en el estriado expresan señales repulsivas tales como *Semaforina* (*Semaphorin*) 3A (Sema3A) y Semaforina 3F (Sema3F) que son sensadas por diferentes Neuropilinas (*Neuropilins*) expresadas en las interneuronas (Huang, 2009; Marin and Rubenstein, 2001; Marin et al., 2001).

En su camino hacia la corteza, las interneuronas derivadas de la EGM siguen además un gradiente permisivo probablemente creado por la difusión de señales quimioattractivas (Marin and Rubenstein, 2003). Una de estas señales quimioattractivas es *Neuregulin 1* (Nrg1). En el telencéfalo en desarrollo se expresan dos isoformas de Ngr1: CRD-Ngr1 que es una proteína de unión a membrana expresada en la ruta que han de seguir las interneuronas derivadas de la EGM hacia el córtex e Ig-Nrg1 que es una proteína difusible producida en el palio (Flames et al., 2004). Estas isoformas actúan como atrayentes a corta y larga distancia respectivamente. En su proceso migratorio, las interneuronas también responden a factores motogénicos que estimulan su movimiento promoviendo su migración tangencial como *Neurotrophin 4* (NT4), *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) y *Glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF) entre otros (Huang, 2009; Polleux et al., 2002; Pozas and Ibanez, 2005; Tan and Shi, 2013).

Una vez que las interneuronas llegan a la frontera palio-subpalio y finalizan la primera fase de su migración se dispersan en la corteza siguiendo trayectorias

específicas: la mayoría de ellas siguen una ruta superficial que cursa a través de la ZM o una ruta que discurre por la ZSV (Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 2001), mientras que una pequeña fracción de las mismas se dispersan a través de la SP.

En su fase migratoria final, las interneuronas cambian su modo de migración a un tipo de migración radial para encaminarse a su destino final en la PC (Marin, 2013).

Como hemos adelantado anteriormente, las CCRs también migran tangencialmente por la superficie telencefálica. Estas células se generan muy temprano durante el desarrollo embrionario, al comienzo de la neurogénesis (García-Moreno et al., 2007; Hevner et al., 2003; Takiguchi-Hayashi et al., 2004) y proceden de zonas específicas del pialo extracortical. Una vez diferenciadas, viajan desde diversas zonas del pialo hasta la PP/ZM de la corteza cerebral expandiéndose y dispersándose hasta cubrir toda la superficie cortical (Bielle et al., 2005; Gil et al., 2014; Kirischuk et al., 2014; Meyer, 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Villar-Cervino et al., 2013; Yoshida et al., 2006).

2.3. Migración radial y tangencial: ¿diferentes rutas pero mecanismos similares?

Durante años, debido a la diferencia en sus trayectorias y a la heterogeneidad de los diversos tipos de neuronas migratorias, se pensó que los mecanismos que controlan la migración radial y la migración tangencial estaban dirigidos por factores celulares y moleculares diferentes. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que tanto la migración radial como la migración tangencial, incluida la migración de las CCRs, comparten muchos mecanismos moleculares (Marin et al., 2006; Marin et al., 2010). Esta nueva perspectiva se basa en el descubrimiento de que las células migratorias

pueden cambiar su estilo de migración de radial a tangencial y viceversa durante su proceso migratorio. Por ejemplo, las células piramidales de tipología bipolar cambian a un estado multipolar típico de las interneuronas durante su migración radial en la corteza (Kriegstein and Noctor, 2004; Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Aunque las neuronas piramidales y las interneuronas migran en el cerebro anterior a través de caminos diferentes, parece que existe un modelo general que caracteriza el movimiento celular de cualquier neurona. Este proceso se denomina ciclo migratorio (CM) y consiste en la repetición de varios pasos interrelacionados pero independientes (Ayala et al., 2007; Hippenmeyer, 2014; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Marin et al., 2006; Pollard and Borisy, 2003; Ridley et al., 2003; Tsai and Gleeson, 2005).

La migración neuronal que ocurre mediante la repetición del CM estaría en última instancia coordinada por mecanismos de señalización externos provenientes de la matriz extracelular (Caviness, 1976; D'Arcangelo et al., 1995; Gao and Godbout, 2013; Hoffarth et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Rice and Curran, 2001) y por tanto más que migración radial vs tangencial, la migración celular depende de las distintas moléculas de guía que la neurona encuentra en su camino. Estos mecanismos de guía se transducen a través de receptores de membrana tales como Robos, Ephs, Neuropilinas (*Neuropilins*), Plexinas (*Plexins*), etc., expresados en la superficie celular que activan vías de señalización internas y producen una reorganización del citoesqueleto para generar un cambio en la morfología celular, lo que permite la formación de estructuras especializadas y transitorias necesarias para el movimiento. Así, el citoesqueleto y sus cambios de conformación, provocados por señales externas de la matriz extracelular, son el último determinante en el proceso de migración

neuronal, estando implicados tanto los filamentos de Actina (*Actin*) como los microtúbulos. Durante el CM ocurren tres procesos: 1) la formación del “*leading process*” o neurita inicial, 2) la translocación del soma y 3) la retracción del “*trailing process*” o neurita posterior (Figura 5).

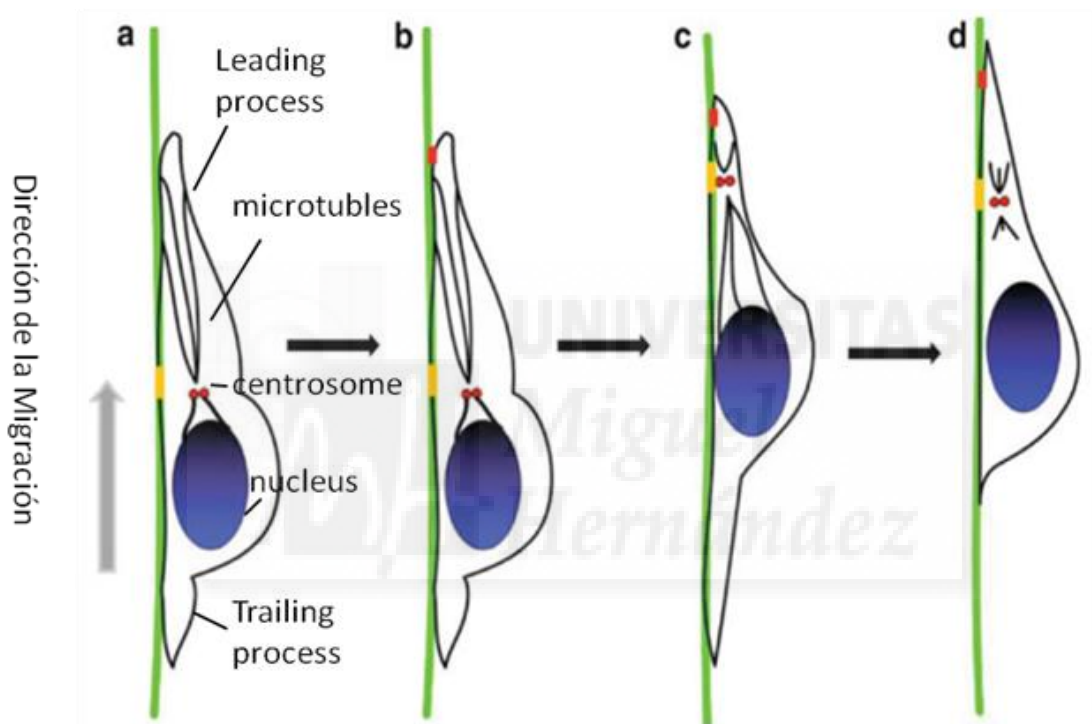


Figura 5: El Ciclo Migratorio.

- A) La célula comienza su movimiento en la dirección en la que se forma el “*leading process*”.
 - B) El “*leading process*” se adhiere al sustrato adyacente.
 - C) Se produce una remodelación de los microtúbulos y la nucleoquinesis.
 - D) Finalmente se retrae el “*trailing process*” que la célula arrastra tras la nucleoquinesis.
- Microtúbulos, *microtubule*; núcleo, *nucleus*; centrosoma, *centrosome* (Hippenmeyer, 2014).

Generación y estructura del “*leading process*”

Para que se inicie la migración, la neurona debe responder mediante receptores de membrana específicos Robos, Ephs, Neuropilinas, Plexinas, etc., a un factor quimiotáctico que genere una neurita principal que polarice la célula en la dirección

hacia la que va a migrar. Esta neurita principal se conoce como *“leading process”* y va a ser la *“brújula”* que guíe a la neurona en su proceso de migración, detectando señales repulsivas o atractivas en el medio. Actualmente, se considera que los *“leading processes”* de las células migratorias son estructuras similares a los conos de crecimiento de los axones, que navegan para llegar a contactar con neuronas diana con las que establecerán sinapsis a estadios posteriores del desarrollo (Rakic, 1990; Yee et al., 1999). Los *“leading processes”*, al igual que los conos de crecimiento axonales, pueden presentar dos tipos de estructuras, lamelipodios con forma de palma y sostenidos por un entramado de Actina y filopodios con forma de dedo o hilo constituidos por haces de Actina en lugar de por una malla (Marin et al., 2006). En la formación del *“leading process”* están implicadas numerosas proteínas y cascadas de señalización que tienen como objetivo la reestructuración del citoesqueleto: tanto el de los filamentos de Actina como los microtúbulos y por tanto la adaptación de la morfología celular al estado de migración de la célula (Ayala et al., 2007; Cooper, 2013; Marin et al., 2006; Marin et al., 2010).

La morfología del *“leading process”* varía en los diferentes tipos neuronales y durante las distintas fases de su migración. Por ejemplo, las neuronas piramidales recién generadas presentan un *“leading process”* simple (Rakic, 1972) cuando llegan a la ZV, pero pasan a adquirir una morfología multipolar al llegar a la ZSV/ZI (Cooper, 2013; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009; Tabata and Nakajima, 2003). Las neuronas que están migrando tangencialmente presentan un *“leading process”* muy ramificado (Bellion et al., 2005; Kappeler et al., 2006; Martini et al., 2009). Por ejemplo, las CCRs tienen un cuerpo fusiforme y un *“leading process”* muy dinámico y arborizado durante

su migración, según han mostrado experimentos de vídeo-microscopía (Villar-Cervino et al., 2013) (Figura 6). Estas neuronas, que migran tangencialmente para producir “*leading processes*” ramificados, responden a la actividad de moléculas atrayentes y repelentes orientándose a favor o en contra de la correspondiente molécula de guía (Martini et al., 2009; Ward et al., 2005) de un modo similar a la reorientación de los conos de crecimiento durante los procesos de guía axonal.

Translocación del soma

La translocación del núcleo y del resto de orgánulos celulares al

“*leading process*” consta de dos fases. En una primera etapa se produce una dilatación del “*leading process*” inmediatamente delante del núcleo formando una protuberancia que se denomina “*swelling*”. El centrosoma, que está generalmente situado delante del núcleo y que comprende el mayor centro organizador de microtúbulos, ocupa esa dilatación junto con otros orgánulos como el aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (Bellion et al., 2005; Konno et al., 2005; Schaar and McConnell,

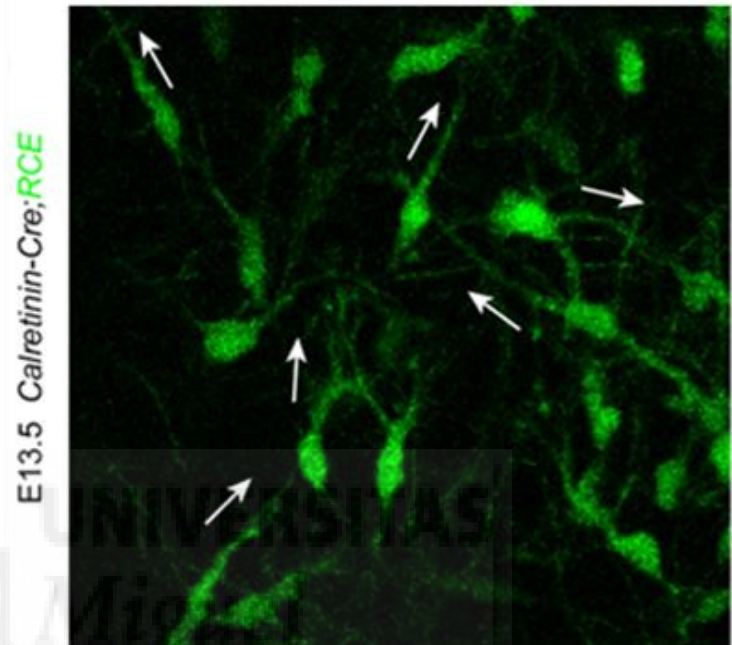


Figura 6: Morfología de las CCRs durante su migración para colonizar la superficie telencefálica.

Imagen de la superficie cortical de un embrión de ratón de estadio de gestación E13.5 en el que las células de Cajal-Retzius (CCR) se ven en verde porque están marcadas con GFP. Las CCRs se orientan en múltiples direcciones mostrando “*leading processes*” ramificados. Las flechas blancas señalan los “*leading processes*”. *Green fluorescent protein, GFP* (Villar-Cervino et al., 2013).

2005). Posteriormente, se produce la nucleoquinesis durante la cual el núcleo se adentra en el “*swelling*” siguiendo al centrosoma. En la nucleoquinesis, las fuerzas generadas en el “*leading process*” se transmiten al centrosoma que se desplaza hacia adelante. El centrosoma está constantemente unido al núcleo mediante una red de microtúbulos a modo de jaula y tira de él propulsándolo hacia adelante (Rivas and Hatten, 1995; Xie et al., 2003). La repetición de estos dos pasos produce el típico movimiento saltatorio de las neuronas en migración (Marin et al., 2010).

Retracción del “*trailing process*”

Una vez que se producen los dos primeros pasos, la célula simplemente arrastra el “*trailing process*” para completar su ciclo migratorio e iniciar el siguiente, consiguiendo así desplazarse y avanzar hacia su destino.

2.4. Mecanismos moleculares implicados en el Ciclo Migratorio

En cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en los distintos pasos del CM sabemos que *Lisencephaly-1* (Lis1) y *Doublecortin* (Dcx) son proteínas implicadas en la nucleoquinesis pero es posible que también regulen la arborización del “*leading process*” (Kappeler et al., 2006; Nasrallah et al., 2006). Mediante experimentos de video-microscopía se ha observado que el “*leading process*” de interneuronas de ratones deficientes en Dcx arboriza en mayor grado que en los ratones control, extendiendo y retrayendo distintas ramas. Sin embargo, estas ramificaciones son más pequeñas y menos estables, lo que sugiere que Dcx se requiere para la estabilización de los nuevos procesos generados (Kappeler et al., 2006). Por el contrario, en ratones heterocigotos para el gen Lis1 se observa el efecto opuesto, el “*leading process*” de

estas interneuronas arboriza con menos frecuencia y las ramas son más largas que en las células normales (Nasrallah et al., 2006). Estos resultados sugieren que Lis1 y Dcx tienen papeles complementarios en la dinámica del “*leading process*” durante la migración.

Por otro lado *Cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) modula la extensión del “*leading process*” a través de la fosforilación de *P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1* (Pak1) y *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (Cdkn1b o p27Kip1), dos importantes reguladores de los filamentos de Actina (Dhavan and Tsai, 2001; Kawauchi et al., 2006; Nikolic et al., 1998). Cuando Cdk5 fosforila a Pak1, ésta disminuye su actividad modulando de este modo la dinámica de la Actina (Nikolic et al., 1998). Cuando Cdk5 fosforila a p27Kip1, esta proteína se estabiliza en las neuronas, lo que es crítico para mantener el nivel apropiado de F-actina en el “*leading process*” (Kawauchi et al., 2006).

Las Dineínas (*Dyneins*), que son pequeñas moléculas motoras que se unen a los microtúbulos, parecen estar especialmente implicadas en la nucleoquinesis. Los microtúbulos son tubos largos y relativamente rígidos formados por dímeros de alfa y de beta Tubulina (*Tubulin*). Estos dímeros, generados en el centrosoma, se alinean para construir un protofilamento. Cada microtúbulo presenta 13 protofilamentos y cada protofilamento

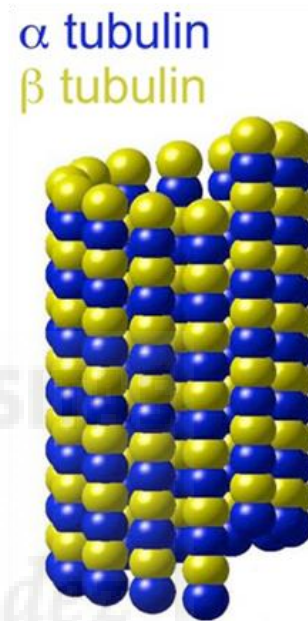


Figura 7: Estructura de un microtúbulo.

Los microtúbulos son tubos largos y rígidos formados por dímeros de alfa y beta Tubulina. Los dímeros se alinean para construir un protofilamento. Cada microtúbulo presenta 13 protofilamentos. α tubulina, α tubulin; β tubulina, β tubulin (Margolin et al., 2012).

tiene una polaridad estructural definida: la α -Tubulina siempre forma un extremo del protofilamento y la β -Tubulina el otro (Figura 7). Esta polaridad es la misma para todos los protofilamentos de un microtúbulo y por tanto el microtúbulo es también una estructura polarizada. Se denomina extremo (-) al extremo donde hay una α -Tubulina y extremo (+) donde está la β -Tubulina. Los microtúbulos son estructuras inestables y continuamente se polimerizan y despolimerizan. En el extremo (+) la polimerización es más rápida mientras que en el extremo (-) la polimerización es más lenta (Kapitein and Hoogenraad, 2015; Margolin et al., 2012). Las Dineínas se mueven siempre hacia el extremo (-) del microtúbulo y son esenciales para el transporte y la distribución de orgánulos y elementos del citoesqueleto (Roossien et al., 2015).

Cuando el centrosoma se adelanta al núcleo, éste queda envuelto por una red de microtúbulos formando una jaula que lo une con el centrosoma. Subsecuentemente, las Dineínas se localizan en la envuelta nuclear de la célula en migración y el extremo (-) de los microtúbulos se sitúa en el centrosoma. La continua actividad de esta proteína asegura que el centrosoma quede siempre asociado con el núcleo. El movimiento de la Dineína hacia el extremo (-) genera un tirón del núcleo hacia el centrosoma provocando la nucleoquinesis. Pero la Dineína no actúa de manera aislada, otras moléculas se asocian a ella para llevar a cabo el proceso de nucleoquinesis (Marin et al., 2010). La proteína *Nuclear distribution gene E-like homolog 1* (Ndel1) es necesaria para unir la proteína Lis1 y la Dineína al centrosoma, facilitando el anclaje del centrosoma a los microtúbulos (Guo et al., 2006; Li et al., 2005; Mesngon et al., 2006; Smith et al., 2000). La eliminación de la función de Lis1 rompe el acoplamiento entre el centrosoma y el núcleo incrementando la distancia

entre los dos orgánulos. Este efecto es similar a los que se producen después de la pérdida de función de Ndel1 o Dineína (Aumais et al., 2001; Dawe et al., 2001; Sasaki et al., 2000; Shu et al., 2004; Tsai and Gleeson, 2005). Por tanto, Lis1 y Ndel1 regulan la red de microtúbulos que acopla el centrosoma al núcleo y se sabe que las perturbaciones en este complejo contribuyen a los defectos de laminación observados en los pacientes con lisencefalia (Ayala et al., 2007; Higginbotham and Gleeson, 2007; Tsai and Gleeson, 2005). Existen ciertas evidencias de que Dcx también participa en la regulación de la nucleoquinesis. En neuronas mutantes para Dcx la nucleoquinesis es aberrante (Marin et al., 2010; Sapir et al., 2008), lo que sugiere que Dcx colabora con la Dineína para mediar el movimiento del núcleo al centrosoma (Marin et al., 2006).

En la nucleoquinesis es también importante destacar el papel de la Actomiosina cuyas contracciones propulsan al núcleo hacia delante (Bellion et al., 2005; Schaar and McConnell, 2005; Vallee et al., 2009).

3. Migración de las células de Cajal-Retzius

Las CCRs son una población celular originalmente descrita por Santiago Ramón y Cajal y Gustav Retzius a finales de siglo XIX (Cajal, 1891; Retzius, 1893) que tiene un origen extracortical. Estas células se generan en zonas específicas del telencéfalo desde donde migran tangencialmente a través de la ZM hasta cubrir toda la superficie telencefálica (Bielle et al., 2005; Garcia-Moreno et al., 2007; Gil et al., 2014; Marin, 2013; Marin et al., 2006; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009; Meyer, 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Villar-Cervino et al., 2013; Yoshida et al., 2006). La CCRs son las mayores productoras de la proteína Relina, que como veremos más adelante es indispensable para el correcto desarrollo de la corteza cerebral (D'Arcangelo et al., 1999; Ogawa et al., 1995).

3.1. Origen de las CCRs

En ratón, las CCRs se generan entre el día de gestación E10.5 y E11.5 (Garcia-Moreno et al., 2007; Hevner et al., 2003; Takiguchi-Hayashi et al., 2004) y finalizan su migración sobre E16.5 (Chiara et al., 2012). Su temprano nacimiento creó un intenso debate en cuanto a su origen. En un principio, se pensó que se generaban en la ZV del primordio neocortical, antes de la formación de la PC (Marin-Padilla, 1998; Valverde et al., 1995). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que se producen en diversas regiones neuroproliferativas del pialo extracortical desde donde migran tangencialmente largas distancias hasta cubrir por completo la corteza cerebral (Bielle et al., 2005; Garcia-Moreno et al., 2007; Gil et al., 2014; Marin, 2013; Marin et al.,

2006; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009; Meyer, 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Villar-Cervino et al., 2013; Yoshida et al., 2006).

La región neuroproliferativa que origina la mayoría de las CCRs es el “hem” cortical (HC). El HC es una estructura neuroepitelial transitoria situada en el telencéfalo dorsal y uno de los principales centros de organización durante la corticogénesis (Subramanian et al., 2009). El HC se caracteriza por la expresión de múltiples genes de la familia de los *Wingless-type MMTV integration site family* (Wnt) (Grove et al., 1998). El origen de las CCRs en el HC se sugirió por primera vez en un estudio que describe la expresión de la proteína *Transformation related protein 73* (Trp73 o p73) (Yang et al., 2000) en el telencéfalo de embriones humanos. En dicho estudio se observaba un gradiente medio-lateral de células p73 positivas con mayor densidad en la interfaz HC-córtex adyacente y una menor densidad en la corteza lateral, lo que llevó a pensar que las CCRs se producían en el HC y que desde allí migraban hacia el córtex a través de la ZM (Figura 8) (Gil et al., 2014; Meyer et al., 2002). Más recientemente, la utilización de una línea de ratones transgénicos reporteros (IG17) que marca las células Relina



Figura 8: Las CCRs migran desde el “hem” cortical hasta el neocórtex.

(A-D) Existe un gradiente medio-lateral de CCRs P73 positivas, con una mayor densidad en la interfaz entre el “hem” y el córtex adyacente y un número menor de células en la corteza lateral. De este hecho surgió la hipótesis de que las CCRs se producían en el “hem” cortical y desde allí migraban hacia el neocórtex a través de la zona marginal. CCRs, células de Cajal-Retzius; “Hem” cortical, CH; zona marginal, MZ; placa cortical, CP (Meyer et al., 2002).

positivas de la ZM, junto con experimentos de electroporación exouterina, han confirmado que las CCRs migran desde el HC tangencialmente hasta la corteza cerebral durante la corticogénesis (Gil et al., 2014; Takiguchi-Hayashi et al., 2004).

Experimentos de marcaje genético combinados con ablación celular de ciertas poblaciones han revelado además la existencia de dos nuevas fuentes adicionales de CCRs, el septo (ST) y la frontera palio-subpalio

(FPS), que también se conoce como palio ventral (Bielle et al., 2005) (Figura 9). Estas dos poblaciones se caracterizan por ser positivas para el factor de transcripción *Developing brain homeobox 1* (Dbx1) y difieren en el momento de su aparición, ya que las derivadas del ST se generan más temprano, y en la expresión de marcadores moleculares, ya que las células provenientes de la FPS expresan Calretinina (*Calretinin*) mientras que las del ST no. Además,

cada tipo de CCRs parece divergir en la zona del córtex que va a colonizar. Mientras que la ablación genética del HC desde estadios tempranos (E10.5) produce una pérdida masiva de CCRs en la corteza prenatal y una disminución de los niveles de Relina, que no es compensada por las otras fuentes de CCRs (Yoshida et al., 2006), la ablación de las CCRs procedentes del ST es rápidamente compensada por otras subpoblaciones de CCRs (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010).

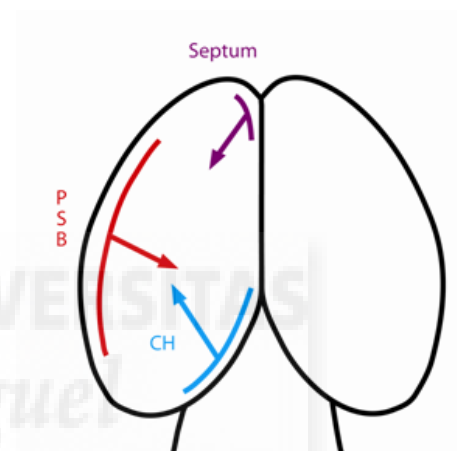


Figura 9: Diferentes orígenes de las CCRs.

Vista dorsal de la corteza cerebral. Existen tres orígenes diferentes de CCRs: el CH, la PSB y el septo. Células de Cajal-Retzius, CCRs; frontera palio subpalio, PSB; septo, *septum*; hem cortical, CH. Adaptado de Bielle et al., 2005.

Se ha propuesto que otras regiones del palio podrían ser también origen de CCRs, entre ellas la eminencia talámica (Abellan et al., 2010; Tissir et al., 2009), el “hem” amigdalario (Meyer, 2010), el plexo coroideo (Imayoshi et al., 2008) y la parte ventral de la pared caudomedial telencefálica (PCMTv) (Miquelajauregui et al., 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Incluso podrían existir otros puntos de origen de CCRs aún por descubrir (Gil et al., 2014; Meyer et al., 2002). Esta generación de CCRs en múltiples zonas se ha propuesto que serviría para asegurar el recubrimiento de las CCRs por toda la corteza cerebral en desarrollo en un periodo de tiempo relativamente corto (Soriano and Del Rio, 2005).

3.2. Marcadores moleculares de las CCRs

Genes tales como *Relina (Reelin)*, *Calretinina*, *Glutamate receptor metabotropic 1 (mGluR1)*, *p73*, *Tribbles homolog 1 (Trb1)* y *Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (Nr2f2 o Coup-TF2)* se establecieron inicialmente como marcadores generales de CCRs (Alcantara et al., 2006; del Rio et al., 1995; Hevner et al., 2003; Meyer et al., 2004; Meyer et al., 1999; Meyer et al., 2002; Ogawa et al., 1995; Soda et al., 2003; Tripodi et al., 2004). Posteriormente, con la descripción de los distintos tipos de CCRs, estos diferentes marcadores se han asociado a cada una de las distintas subpoblaciones. Actualmente se utilizan *p73* (Meyer et al., 2002), *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a o P21)* (Siegenthaler and Miller, 2008), *Zinc finger protein of the cerebellum 1-3 (Zic1-3)* (Inoue et al., 2008) y *Early B cell factor 2 (Ebf2)* (Chiara et al., 2012) para marcar CCRs provenientes del ST y HC y *Dbx1* para las originarias del ST

y de la FPS (Bielle et al., 2005), mientras que Er81 marca las células generadas en el ST y el plexo coroideo (Chiara et al., 2012; Imayoshi et al., 2008; Zimmer et al., 2010).

3.3. Rutas de migración de las CCRs

Como hemos visto previamente, las CCRs provenientes de distintos orígenes difieren en su momento de aparición, rutas de migración y expresión de marcadores moleculares, así como en la región del córtex que colonizan preferencialmente (Bielle et al., 2005; Garcia-Moreno et al., 2007; Griveau et al., 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006). La mayoría de las CCRs provienen del HC (Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006) y se generan en distintos dominios del mismo: rostral, medial y caudal. Las CCRs del HC migran a lo largo de vías paralelas en forma de abanico, siguiendo una ruta migratoria oblicua hacia la parte lateral de la corteza y manteniendo una clara relación entre su lugar de origen y su destino final (Garcia-Moreno et al., 2007). Siguiendo las mencionadas vías de migración las células derivadas del HC cubren la corteza con un gradiente caudomedial alto-rostralateral bajo (Garcia-Moreno et al., 2007; Takiguchi-Hayashi et al., 2004).

En relación a las CCRs generadas en el ST y en la FPS, no hay un acuerdo en cuanto a su ruta de migración ya que existen dos hipótesis. Algunos autores postulan que las células $Relina^+/Calretinina^-$ derivadas del ST y las células $Relina^+/Calretinina^+$ derivadas de la FPS siguen dos vías de migración distintas, una dorsal hasta regiones del neocórtex y otra ventral hacia la corteza piriforme (Figura 10) (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010). Sin embargo, el grupo de J.A. de Carlos ha propuesto que las

CCRs del ST y de la FPS sólo migran ventralmente hacia la corteza piriforme y sugiere que no pueden ascender dorsalmente hasta el neocórtex (Figura 10) (Ceci et al., 2012).

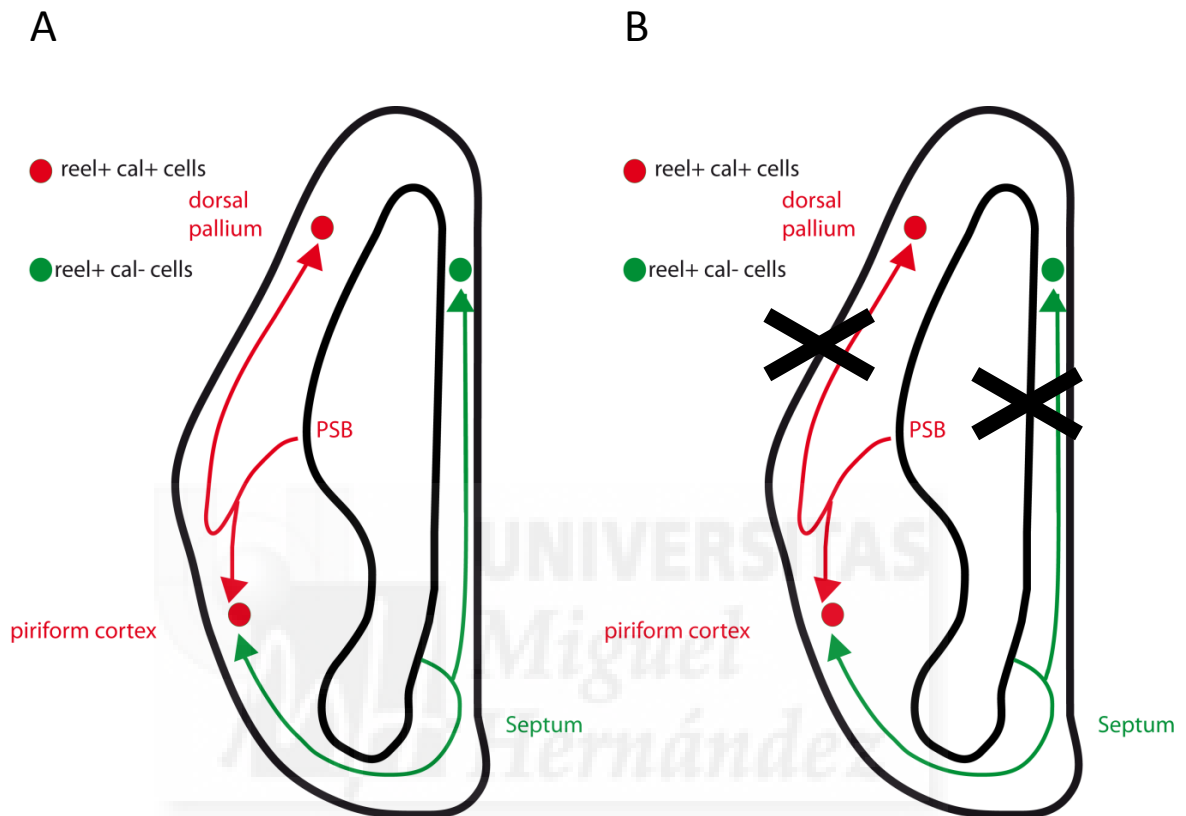


Figura 10: Doble modelo de generación y migración de las células Dbx1 positivas.

(A) Hipótesis 1: Los progenitores Dbx1 de la frontera palial-subpalial (PSB) producen células de Cajal-Retzius (CCRs) $Relina^+/Calretinina^+$ que migran ventralmente a la corteza piriforme y dorsalmente a la corteza dorsolateral (líneas rojas). Los progenitores Dbx1 del septum (líneas verdes) dan lugar a CCRs $Relina^+/Calretinina^-$ que migran ventrolateralmente hacia la corteza piriforme y dorsalmente al córtex medial.

(B) Hipótesis 2: Los movimientos migratorios dorsales hacia la corteza telencefálica no existirían. *Relina*, reel; *Calretinina*, cal; palio dorsal, *dorsal pallium*; corteza piriforme, *piriform cortex*; septo, *septum*; frontera palio-subpalio, PSB. Adaptado de Ceci et al., 2012.

Según la primera hipótesis, por la que las células del ST y las de la FPS migran dorsalmente hacia el neocórtex (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010), cada fuente de CCRs colonizaría una región específica del neocórtex (Figura 11) (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006).

Recientemente se ha conseguido diferenciar molecularmente entre los tres principales subgrupos de CCRs mediante la combinación de tres marcadores específicos: $Relina^+$, $p73^+$, $Dbx1^-$ para las provenientes del HC; $Relina^+$, $p73^+$, $Dbx1^+$ para las del ST y $Relina^+$, $p73^-$, $Dbx1^+$ para las de la FPS, lo que ha

permitido confirmar que unas regiones están más dominadas por un linaje de CCRs que por los otros (Griveau et al., 2010). De todos modos, aunque exista una predominancia de un tipo de CCRs en un área determinada de la corteza, la separación entre las CCRs de distinto origen en la ZM no es muy acusada. Las células procedentes de las diferentes fuentes se entremezclan en las regiones fronterizas y los diversos territorios del córtex simplemente difieren en la proporción de las distintas CCRs (Griveau et al., 2010) (Figura 11). Así, en territorios dorsomediales y dorsales de la parte anterior del neocórtex se encuentran preferentemente células derivadas del ST pero también, aunque en menor proporción, algunas células procedentes de la parte más rostral del HC y otras que tienen su origen en la FPS (Griveau et al., 2010). Los territorios caudales están dominados por CCRs originadas en el HC (García-Moreno et al., 2007; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006).

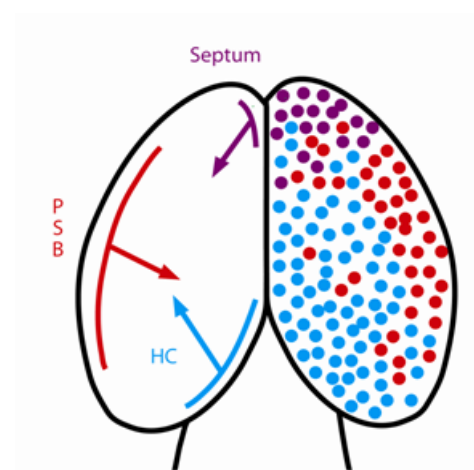


Figura 11: Diagrama de la distribución de las células de Cajal-Retzius (CCR) según sus orígenes.

Cada tipo de CCR coloniza preferentemente una región específica de la corteza cerebral pero la separación entre las células de distinto origen no es muy acusada sino que se entremezclan en las zonas fronterizas. "Hem" cortical, CH; frontera palio subpalio, PSB; septo, *septum*; células de Cajal-Retzius, CCRs. Adaptado de Bielle et al., 2005.

3.4. Mecanismos moleculares implicados en la migración de las CCRs

En los últimos años se han identificado algunos de los mecanismos moleculares implicados en la migración tangencial de las CCRs. Uno de los primeros trabajos sobre este tema demostró que las meninges, a través de la señalización mediada por la *Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12)* y su receptor *Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4)*, son suficientes y necesarias para provocar la migración tangencial de las CCRs derivadas del HC. Las meninges expresan Cxcl12 mientras que Cxcr4 es expresado por las CCRs (Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006).

La familia de moléculas de guía Semaforinas y sus receptores Plexinas y Neuropilinas se implicaron en un principio en la migración de las interneuronas gabaérgicas corticales (Lopez-Bendito et al., 2008; Marin and Rubenstein, 2003; Marin et al., 2001), pero trabajos más recientes han confirmado un papel para estas moléculas en la migración de las CCRs derivadas del HC (Bribian et al., 2014). Plexina D1 (Plxnd1) se expresa en las CCRs mientras que uno de sus ligandos, la Semaforina 3E (Sema3E), se expresa en la capa neocortical más superficial. Experimentos bioquímicos combinados con video-microscopía y cocultivos de confrontación de explantes de HC de ratones mutantes para Plxnd1 con células de las meninges, expuestos o no a Sema3E, han demostrado que la ausencia de señalización mediada por Sema3E/Plxnd1 incrementa las propiedades migratorias de las CCRs. De este modo, Sema3E parece ser un regulador negativo de la migración de las CCRs generadas en el HC. Además, esta modulación de la migración dependiente de Sema3E/Plxnd1 parece implicar efectos negativos en la señalización mediada por Cxcl12/Cxcr4, acompañados por un aumento

en la fosforilación de la Cofilina, que es una proteína de unión a Actina que despolimeriza los microfilamentos.

La señalización mediada por la familia de receptores de tirosina quinasas Ephs y sus ligandos las efrinas (ephrins), que son proteínas transmembrana que median repulsión por contacto célula-célula (Wilkinson, 2001), también es esencial para la

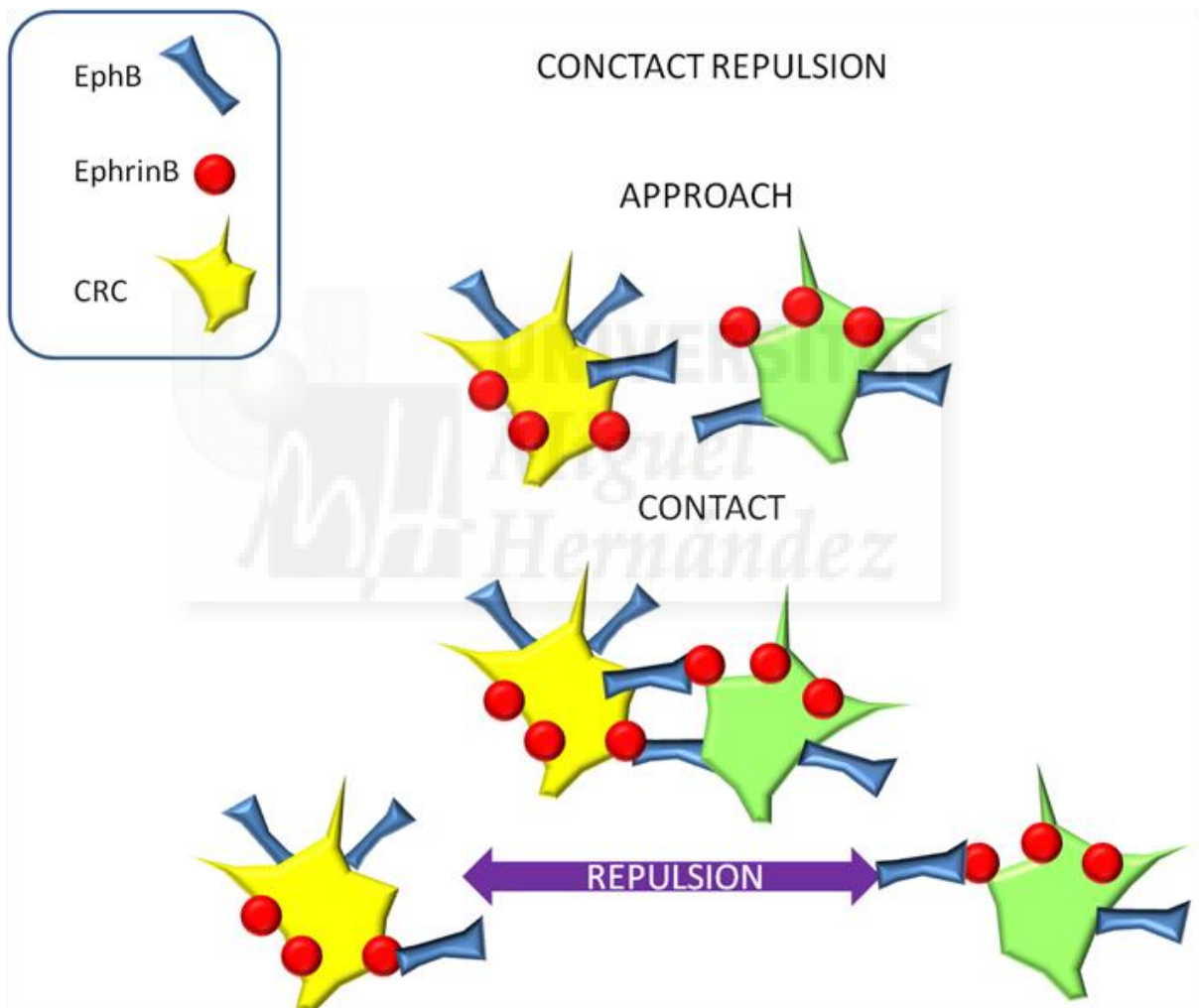


Figura 12: Esquema de la repulsión mediada por contacto de las CCRs.

Las CCRs presentan en su superficie *ephrins B* y sus receptores EphBs. Cuando se produce una aproximación entre dos CCRs se genera un contacto que provoca la unión entre las *ephrins B* y los EphBs, generándose una repulsión que produce el movimiento de ambas células en sentidos contrarios. Efrina, *ephrin*; receptor de *ephrin B*, EphB; célula de Cajal-Retzius, CRC; aproximación, *approach*; contacto, *contact*; repulsión, *repulsion*.

correcta migración de las CCRs. Recientemente se ha demostrado que la distribución y dispersión de las CCRs en la corteza cerebral se produce por la acción de una fuerte inhibición por contacto entre las CCRs. Esta inhibición por contacto, o respuesta repulsiva entre las CCRs, provocaría la dispersión aleatoria de las CCRs en la corteza cerebral, una hipótesis avalada por modelos matemáticos (Villar-Cervino et al., 2013) (Figura 12). Las CCRs procedentes del HC expresan múltiples miembros de la familia de las efrinas y sus receptores (cuyas características moleculares serán explicadas más adelante) y experimentos de confrontación de explantes de HC en cultivo, expuestos o no a efrinas, combinados con ratones mutantes para los receptores Ephs han demostrado que la señalización llevada a cabo por estas moléculas media, al menos en parte, la repulsión por contacto de las CCRs garantizando su correcta dispersión por toda la superficie telencefálica. Sin embargo, resultados presentados en el mismo artículo también muestran que la eliminación de uno sólo de los diferentes receptores EphB no afecta a la distribución de las CCRs. Es necesaria la delección de dos o incluso tres EphBs para que se produzca una reordenación anormal de las CCRs. Sólo los triples mutantes para *Eph receptor B1/B2/B3* (EphB1/B2/B3) muestran defectos evidentes en la dispersión de las CCRs en la superficie cortical.

Además de estas familias de moléculas de membrana que parecen estar implicadas de una manera u otra en la guía de las CCRs, se han identificado algunos factores de transcripción importantes para la correcta migración de las CCRs. Así por ejemplo, el factor de transcripción *LIM homeobox protein 5* (Lhx5), perteneciente a la familia de proteínas homeobox que contienen un dominio de unión a zinc rico en cisteínas (LIM), se expresa en regiones del telencéfalo positivas para Relina. La ablación

genética de *Lhx5* resulta en una disminución del número de CCRs en el telencéfalo dorsal acompañada de una marcada reducción de la expresión de *Relina* y *P73* en el HC, ST, PCMTv y el futuro córtex olfatorio. En los ratones mutantes para *Lhx5* las CCRs del HC caudal son incapaces de migrar tangencialmente hasta el córtex y las CCRs derivadas de la PCMTv también presentan una migración aberrante formando agrupaciones ectópicas (Miquelajauregui et al., 2010). A pesar de resultar evidente que *Lhx5* está implicado en la migración de las CCRs no está claro si juega un papel intrínseco o extrínseco en las CCRs y su mecanismo de acción no ha sido descrito con claridad.

Otro factor de transcripción implicado en la migración de las CCRs es *Ebf2*. La falta de función de *Ebf2* provoca una reducción transitoria de las CCRs en la corteza cerebral que parece ser debida a defectos migratorios desde el HC hasta el córtex. Esta disminución en las CCRs está acompañada de una sobreexpresión de *Early B cell factor 3* (*Ebf3*) tanto en el HC como en la FPS, sin que se produzca una disfunción de la laminación cortical. Mediante experimentos *in vitro* los autores demostraron que *Ebf2* y *Ebf3* actúan individual y/o conjuntamente para regular la migración de las células provenientes del HC (Chiara et al., 2012). Sin embargo, como en el caso de *Lhx5*, la función precisa de estos factores de transcripción en la migración y/o dispersión de las CCRs no está clara.

En resumen, las CCRs son células con diferentes lugares de origen, que pueden diferenciarse según la expresión de distintos marcadores moleculares y que dependiendo de donde vengan, colonizan preferencialmente zonas distintas de la corteza cerebral. Se han descrito algunas de las moléculas de guía y vías de

señalización implicadas en la migración de las CCRs pero la información existente sobre los factores de transcripción que dirigen sus trayectorias y las moléculas que estos regulan es escasa y difusa.

3.5. Relina: cascada de señalización y funciones

Las CCRs secretan una proteína de la matriz extracelular denominada Relina. La Relina, además de ser uno de los principales marcadores de las CCRs, juega un papel fundamental en el control de la migración radial de las neuronas que formarán la

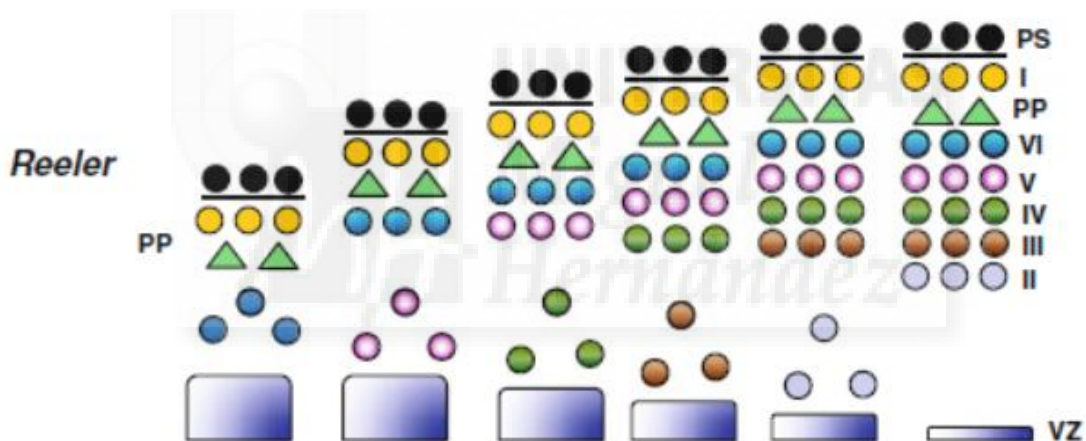


Figura 13: Formación de la corteza cerebral en un mutante "reeler".

En un ratón "reeler" las células de la capa VI no consiguen separar la PP en dos capas, lo que produce una acumulación de neuronas debajo de la placa. La incapacidad de las neuronas más jóvenes para superar a sus predecesoras resulta en una inversión de las capas en la placa cortical. Zona ventricular, VZ; preplaca, PP; subplaca, SP; superficie pial, PS; capas I-VI, I-VI (Gao and Godbout, 2013).

corteza y por tanto en la laminación cortical (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Cuando la Relina está mutada, como ocurre en el ratón mutante "reeler", descrito hace 60 años (Falconer, 1951), se produce una alteración de la migración radial. Estos animales, que a nivel celular presentan una laminación cortical aberrante, padecen ataxia, temblores y marcha tambaleante. En los mutantes "reeler" la PP no se

divide en ZM y SP, lo que provoca un acúmulo de neuronas debajo de la PP y una inversión en el orden de las capas corticales que se disponen de fuera hacia dentro en lugar de hacerlo de dentro hacia fuera (Caviness, 1982; D'Arcangelo et al., 1999; Gao and Godbout, 2013; Hoffarth et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Rice and Curran, 2001) (Figura 13). En humanos, mutaciones en la Relina provocan un defecto estructural en la corteza cerebral denominado lisencefalia que literalmente significa “cerebro liso” y que se caracteriza por la ausencia de las circunvoluciones o pliegues del cerebro (Folsom and Fatemi, 2013).

3.5.1. Cascada de señalización de la Relina

Cuando la Relina se une a sus receptores *Apolipoprotein E receptor 2* (ApoER2) y *Very low-density lipoprotein receptor* (VLDLR) que se expresan en las neuronas piramidales en migración, se dispara una compleja cascada de señalización (Figura 14) (D'Arcangelo et al., 1999; Forster et al., 2010; Gao and Godbout, 2013; Hiesberger et al., 1999; Rice and Curran, 2001; Sekine et al., 2014; Trommsdorff et al., 1999; Warner et al., 2003). En ese momento, a través de la familia de tirosina quinasas SFKs, la proteína adaptadora *Disabled 1* (Dab1) es fosforilada (Howell et al., 1997; Kojima et al., 2000; Kuo et al., 2005; Sheldon et al., 1997; Ware et al., 1997; Yoneshima et al., 1997) lo cual produce el reclutamiento de varias moléculas de señalización incluyendo las proteínas adaptadoras tales como *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog* (Crk) y *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like* (CrkL) (Park and Curran, 2008) (Figura 14). Los mutantes con deficiencia en la expresión de ApoER2, VLDLR y/o Dab1 presentan un orden invertido de las capas corticales similar al del mutante “*reeler*” (Forster, 2014).

Cuando Dab1 interacciona con Crk/CrkL se induce la fosforilación de *Rap guanine nucleotide exchange factor* (Rapgef1 o C3G). Gracias a esta interacción se activa la pequeña GTPasa *Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein* (Terf2ip o Rap1)

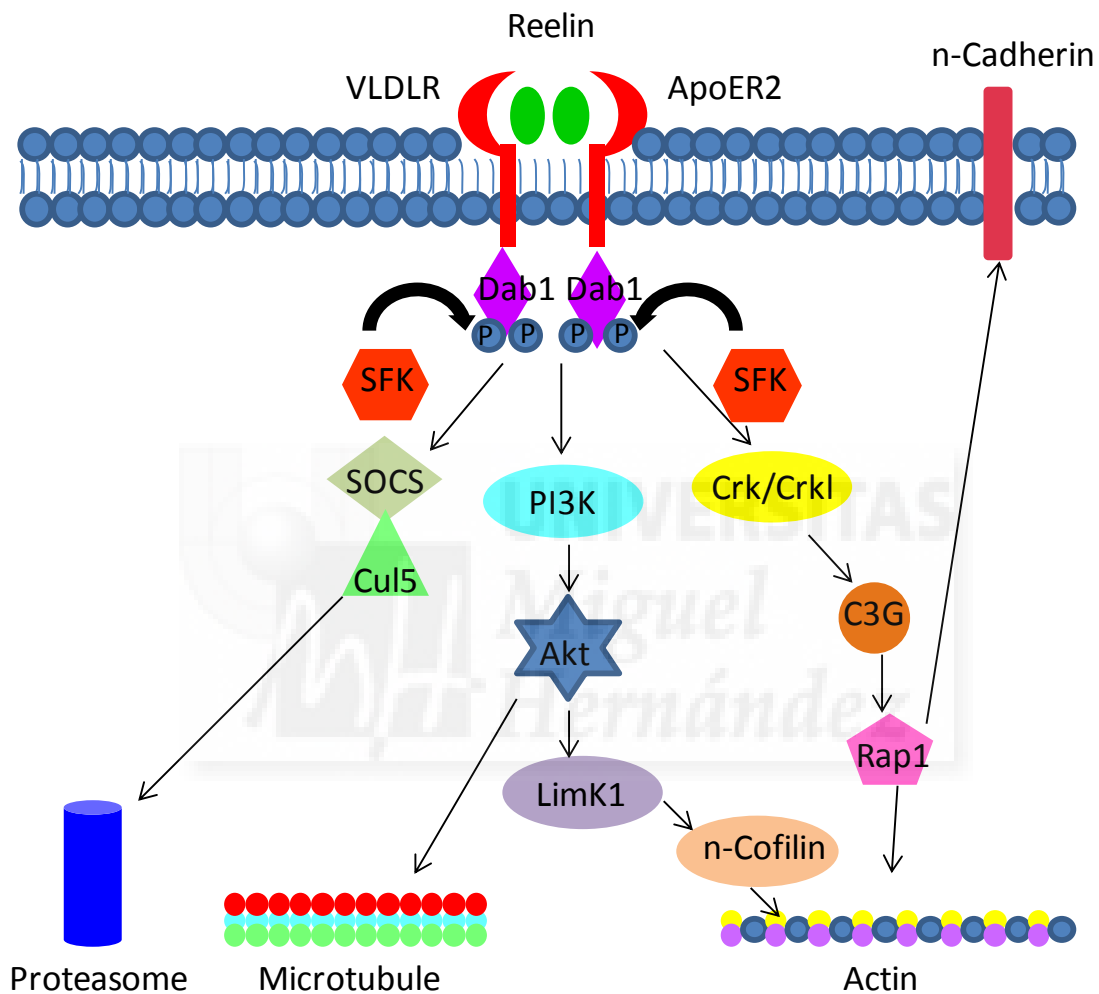


Figura 14: Cascada de señalización de la Relina.

Cuando la Relina se une a sus receptores ApoER2 y VLDLR, que se expresan en las neuronas piramidales, la proteína adaptadora Dab1 es fosforilada por la familia de tirosina quinasas SFKs, reclutando a su vez moléculas de señalización, incluidas la familia de proteínas adaptadoras Crk and CrkL. La activación de Crk/CrkL induce la fosforilación de C3G, la cual activa Rap1 que por un lado participa en la dinámica de la Actina y por otro regula la distribución de la molécula de adhesión celular *n-Cadherin*. Dab1 induce la cascada de señalización PI3K/Akt que modula la fosforilación de proteínas de unión a microtúbulos y además activa LimK1 que induce la fosforilación de la *n-Cofilin* provocando la estabilización de la polimerización de la Actina. A su vez la asociación entre SOCS y Cul1 produce la degradación de Dab1 en el proteosoma. *Apolipoprotein E receptor 2*, ApoER2; *Very low-density lipoprotein receptor*, VLDLR; *Disabled 1*, Dab1; *CT10 oncogene homolog*, Crk; *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like*, CrkL; *Rap guanine nucleotide exchange factor*, Rapgef1 o C3G; *GTPasa Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein*, Terf2ip o Rap1; *Phosphatidylinositol 3 kinase*, PI3K; *Thymoma viral proto-oncogene 1*, Akt1 o Akt; *LIM-domain containing, protein kinase*, Limk1; *Suppressor of cytokine signalin*, SOCS; *Cullin5*, Cul5; proteosoma, *proteasome*; microtúbulos, *microtubule*; Actina, *Actin*; n-Cofilina, *n-Cofilin*; Relina, *Reelin*; n-Caderina, *n-Cadherin*. Adaptado de Gao and Godbout, 2013.

que modula la dinámica de la Actina por un lado y que regula la distribución de la molécula de adhesión celular n-Caderina (*n-Cadherin*) por otro (Figura 14) (Gao and Godbout, 2013).

La Relina a través de Dab1 induce la cascada de señalización *Phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) / *Thymoma viral proto-oncogene 1* (Akt1 o Akt) que modula la fosforilación de proteínas de unión a microtúbulos y además activa la *LIM-domain containing, protein kinase* (Limk1) que induce la fosforilación de la n-Cofilina (*n-Cofilin*) produciendo la estabilización de la polimerización de la Actina (Figura 14) (Gao and Godbout, 2013).

La unión de la Relina a sus receptores fosforila Dab1 y las proteínas *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) se unen, a través de sus dominios SH2, a los residuos fosforilados de Dab1. Las proteínas SOCS son proteínas adaptadoras para un complejo E3 ubiquitín ligasa que contiene como elemento clave *Cullin5* (Cul5). Esta cascada de señalización induce la degradación de Dab1 en el proteosoma (Figura 14) lo que produce una señalización de parada (“*stop*”) en la migración neuronal (Sekine et al., 2014). La disminución de la expresión de Cul5 protege a Dab1 de la degradación y los mutantes de Cul5 muestran una localización superficial de las neuronas en la corteza cerebral (Sekine et al., 2014).

Todas estas múltiples y complicadas vías de señalización activadas por Dab1 desembocan en último lugar en una remodelación del citoesqueleto y en una redistribución de la n-Caderina (Gao and Godbout, 2013).

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las funciones que desempeña la Relina en la migración de las neuronas piramidales y si

bien son muchas las incertidumbres que aún quedan por resolver ciertos mecanismos y algunas de las funciones de la Relina durante la migración radial ya han sido descritos como veremos a continuación.

3.5.2. Funciones de la Relina

Estabilización del “leading process”

La Relina regula la actividad de la n-Cofilina la cual tiene una actividad despolimerizante de la F-actina (Forster et al., 2010; Gao and Godbout, 2013). La activación de la quinasa LimK1 por parte de la Relina induce la fosforilación de la n-Cofilina que se convierte en p-Cofilina, inhibiendo su habilidad para despolimerizar la F-actina, estabilizando de este modo el citoesqueleto y así el “leading process” (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). De hecho, en ratones condicionales con pérdida de función para la n-Cofilina en la corteza cerebral, las neuronas corticales están mal posicionadas (Bellenchi et al., 2007). La fosforilación de la n-Cofilina y por tanto la estabilización del “leading process” ocurre cuando éste se aproxima a la ZM y se produce su anclaje a la misma. Por tanto, gracias a la fosforilación de la n-Cofilina la Relina podría actuar a través de la estabilización del “leading process” como una señal de stop para las neuronas piramidales en migración (Chai et al., 2009).

Polarización de las neuronas en migración

Durante la migración radial la neuronas están polarizadas, de manera que tienen el “trailing process” orientado hacia la ZV y el “leading process” orientado hacia la ZM. Mutantes deficientes en los diferentes componentes de la cascada de señalización de

la Relina revelaron fallos en la polarización neuronal (Forster, 2014). A E13.5 los mutantes “*reeler*” muestran un defecto de polarización en una subpoblación de células de la PP que no consiguen polarizarse en el plano radial durante la partición de la PP (Schneider et al., 2011). Durante su locomoción las neuronas piramidales adquieren un estado multipolar en la ZSV/ZI para posteriormente cambiar a una morfología bipolar cuando se anclan a la GR. Cuando la Relina mediante la unión a sus receptores fosforila Dab1 esta molécula interacciona con Crk/CrkL induciendo la fosforilación de C3G lo que activa Rap1. Se ha observado que la regulación negativa de Rap1 a E14.5 altera la localización de las moléculas de membrana denominadas n-Caderinas, lo que afecta a la reorientación de las neuronas multipolares para alcanzar su morfología bipolar (Jossin and Cooper, 2011).

Regulación de la translocación somal

La translocación somal es el modo de migración que usan las neuronas tempranas (Hippenmeyer, 2014; Marin and Rubenstein, 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002). En este proceso está nuevamente implicada Rap1, que controla la función de las n-Caderinas en la regulación de la translocación somal. Cuando se altera la expresión de Rap1 se producen defectos en la translocación somal que son rescatados mediante la sobreexpresión de n-Caderina. Este déficit en la translocación somal es suficiente para causar defectos severos en la laminación cortical (Franco et al., 2011).

Regulación de la translocación terminal

La translocación terminal depende de la actividad de la proteína Dab1 que a su vez depende de la Relina. Experimentos de electroporación con plásmidos que codifican la

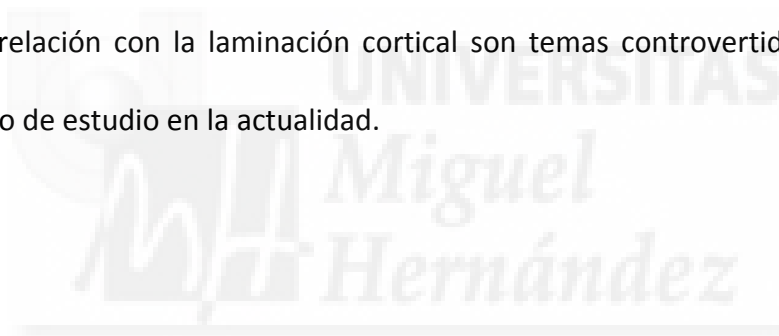
Cre-recombinasa en un ratón floxeado *Dab1* (Franco et al., 2011) han demostrado que la eliminación condicional de *Dab1* en progenitores corticales, no afecta a la locomoción mediada por GR pero sí a la translocación terminal. Aunque el “*leading process*” llega a la ZM sus somas son incapaces de moverse hacia la parte superior de la PC. Similarmente, la electroporación in útero de ARN de interferencia para *Dab1* reveló que en las neuronas con bajos niveles de *Dab1* el extremo final permanecía anclado a la ZM sugiriendo un fallo en la translocación terminal en las células carentes de *Dab1* (Sekine et al., 2011).

3.5.3. Disminución de la cantidad de Relina e implicaciones en la laminación cortical

Como hemos explicado anteriormente, en el mutante “*reeler*” (Falconer, 1951) se produce una alteración de la migración radial donde la PP no se divide en ZM y SP, provocando un acúmulo de neuronas debajo de la PP y una inversión en el orden de las capas corticales que se disponen de fuera hacia dentro en lugar de hacerlo de dentro hacia fuera (Caviness, 1982; D’Arcangelo et al., 1999; Gao and Godbout, 2013; Hoffarth et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Rice and Curran, 2001). Otros artículos corroboran que la pérdida de CCRs y/o la disminución de Relina producen la generación de una corteza aberrante (Alcantara et al., 2006; Hartmann et al., 1999; Ringstedt et al., 1998; Super et al., 2000). Sin embargo, trabajos más recientes en los que se realizó una ablación masiva de las CCRs (Yoshida et al., 2006), en los que se llevo a cabo el estudio de ratones mutantes para *Dbx1* en los progenitores del septum (Bielle et al., 2005) o el análisis del ratón deficiente para *P73* (Meyer et al., 2004; Meyer et al., 2002) mostraban en todos los casos una corteza cerebral

anatómicamente correcta. Este hecho podría explicarse por una escasa cantidad de Relina que sería suficiente para producir un córtex normal de modo que una mínima cantidad de Relina producida por la PP (Alcantara et al., 1998; Meyer et al., 2002) podría ser suficiente para generar una corteza cerebral normal. En los experimentos de ablación genética podría suceder que la eliminación de CCRs no fuera total, por lo que existirían CCRs que se mantendrían intactas, y estas pocas CCRs generarían la cantidad de Relina suficiente para producir una adecuada laminación cortical (Yoshida et al., 2006).

En resumen, tanto la pérdida de CCRs como la reducción en los niveles de Relina y su relación con la laminación cortical son temas controvertidos que siguen siendo objeto de estudio en la actualidad.



4. El factor de transcripción *Zic2* y su papel en guía axonal y migración neuronal

La familia de proteínas *Zinc finger protein of the cerebellum* (*Zic*) que en mamíferos incluye cinco miembros (*Zic1-5*) y que comparten cinco dominios conocidos como motivos en dedos de Zinc (CH₂H₂) repetidos en tándem, se identificó inicialmente en el cerebelo (Aruga et al., 1994). Posteriormente, estos factores de transcripción se han involucrado en una gran variedad de procesos del desarrollo incluyendo la guía axonal de determinados tipos neuronales (Aruga, 2004; Aruga et al., 2002a; Brown et al., 2001; Brown et al., 1998; Elms et al., 2003; Escalante et al., 2013; Herrera et al., 2003; Nagai et al., 2000; Nagai et al., 1997; Sanek and Grinblat, 2008).

4.1. *Zic2* en guía axonal

Uno de los miembros de esta familia, *Zic2*, determina la lateralidad axonal de las fibras ópticas durante el desarrollo del Sistema Visual (Herrera et al., 2003). Las células ganglionares de la retina (CGRs) son las neuronas encargadas de coleccionar la información visual y enviarla al cerebro, de manera que son el único tipo celular en la retina que proyecta sus axones a los principales centros visuales del cerebro, el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) en el tálamo y el colículo superior. Una vez que salen de la retina, los axones de las CGRs se dirigen al quiasma óptico donde algunos de ellos cruzan la línea media (axones contralaterales) mientras que otros evitarán la línea media delineando un giro de noventa grados para finalmente proyectar en el mismo hemisferio cerebral de donde proceden (axones ipsilaterales) (Figura 15). A lo largo de la evolución, el número de fibras visuales ipsilaterales correlaciona con el grado de visión binocular, de manera que especies con una buena visión binocular como los

primates cuentan con el mismo número de fibras visuales contralaterales que ipsilaterales mientras que en especies con pobre visión binocular, como el ratón, sólo el 3-5% de las fibras ópticas son ipsilaterales (Rice et al., 1995).

En la retina de ratón, las CGRs ipsilaterales se disponen en la zona ventrotemporal periférica de la retina mientras que las contralaterales tienen su cuerpo celular localizado en el resto de la retina (Figura 15).

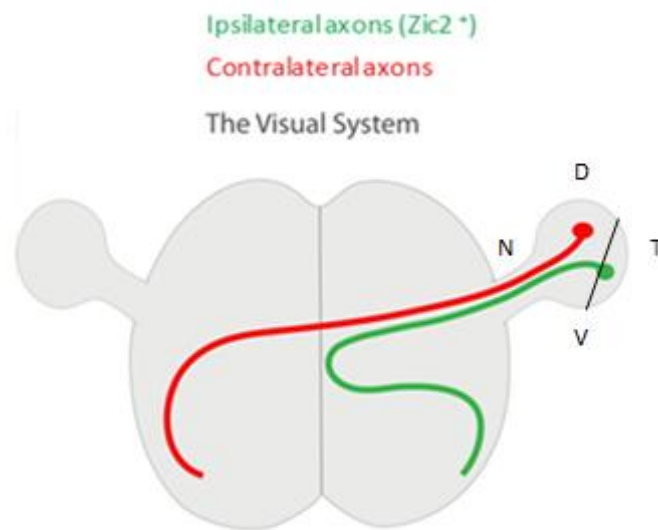


Figura 15: Comportamiento de los axones contralaterales (rojo) e ipsilaterales (verde) en el Sistema Visual.

Sistema visual, *The Visual System*; axones ipsilaterales, *ipsilateral axons*; axones contralaterales, *contralateral axons*; dorsal, D; ventral, V; nasal, N; temporal, T.

El factor de transcripción Zic2 se expresa en las CGRs ipsilaterales y el número de células Zic2 positivas en la retina en desarrollo correlaciona con el número de fibras ipsilaterales y por tanto con el grado de visión binocular en cada especie (Herrera et al., 2003). Por ejemplo el hurón, que tiene una visión binocular superior a la de los roedores, presenta un mayor número de células positivas para Zic2 en la retina en desarrollo que el ratón. La retina de pollo no contiene células Zic2 positivas, lo que coincide con la carencia de visión binocular de las aves no rapaces ya que sus ojos se localizan lateralmente y los campos de visión no se solapan. En *Xenopus*, los ojos están lateralmente localizados durante los estadios de renacuajo por lo que carecen de fibras ipsilaterales y no expresan Zic2 en su retina. Sin embargo, durante la metamorfosis, al

cambiar de estilo de vida y volverse depredadores necesitan una mayor agudeza visual y por tanto desarrollan una proyección ipsilateral que les permite solapar los campos de visión, lo cual coincide con el inicio de la expresión de Zic2 en la retina temporal. Estas observaciones sobre la expresión de Zic2 en la retina en diferentes

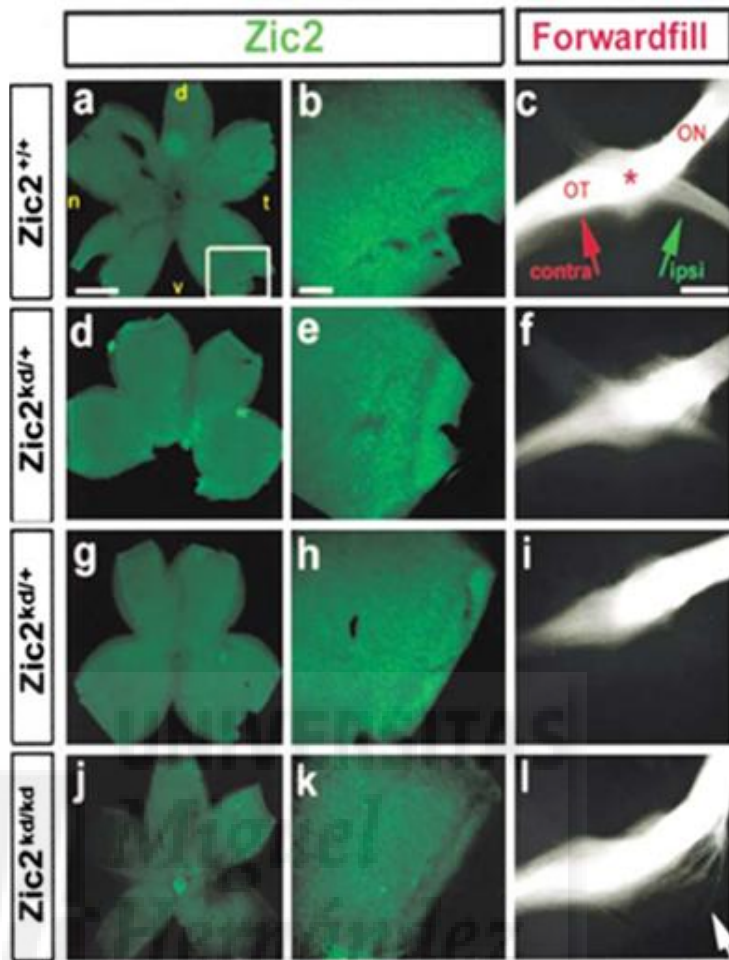


Figura 16: Análisis de la proyección ipsilateral en los heterocigotos y homocigotos para la mutación Zic2^{KD}. Trazado anterogrado de Dil en quiasmas de ratones *wildtypes*, heterocigotos y mutantes para Zic2. En los ratones control la proyección ipsilateral es normal (c) pero tanto en los mutantes como en los heterocigotos se observa una dramática reducción de fibras ipsilaterales (f, i, l). Tracto óptico, OT; nervio óptico, ON; ipsilateral, ipsi; contralateral, contra; trazado anterogrado, *fowardfill* (Herrera et al., 2003).

especies sugería un papel para este factor de transcripción en la determinación de la

lateralidad axonal, pero

fueron los experimentos funcionales los que demostraron su papel en guía axonal. El análisis de ratones mutantes para Zic2 reveló que Zic2 es necesario para la formación de la proyección ipsilateral (Figura 16) y experimentos en cultivo de ganancia de función indicaron que Zic2 es además suficiente para detectar las señales de repulsión proporcionadas por las células gliales del quiasma óptico (Herrera et al., 2003).

Un trabajo inmediatamente posterior demostró la implicación de las moléculas de guía EphB/efrinas B en el giro de los axones ipsilaterales visuales en la línea media (Williams et al., 2003). Los receptores Eph constituyen una gran familia de receptores

tirosina quinasa cuyos ligandos son unas proteínas de membrana denominadas efrinas. Los receptores Eph están subdivididos en dos clases denominadas EphA y EphB. En mamíferos existen nueve receptores EphA que se unen promiscuamente a cinco ligandos efrina A y cinco receptores EphB que se unen indistintamente a tres ligandos efrina B. Adicionalmente los receptores EphA4 y EphB2 pueden unirse a efrinas de diferentes clases (Lisabeth et al., 2013). Los receptores

Eph están conservados filogenéticamente y están formados por tres regiones: un ectodominio, una región transmembrana y un dominio intracelular. El ectodominio

contiene un dominio N terminal LBD, dominio de unión a efrinas; una región rica en cisteínas (*Cystein rich domain*) y dos dominios tipo *fibronectin type III domain*. La parte intracelular está constituida por una región yuxtamembrana (*juxtamembrane region*) con varios residuos tirosina (Y) conservados; un dominio tirosina quinasa (*Tirosin*

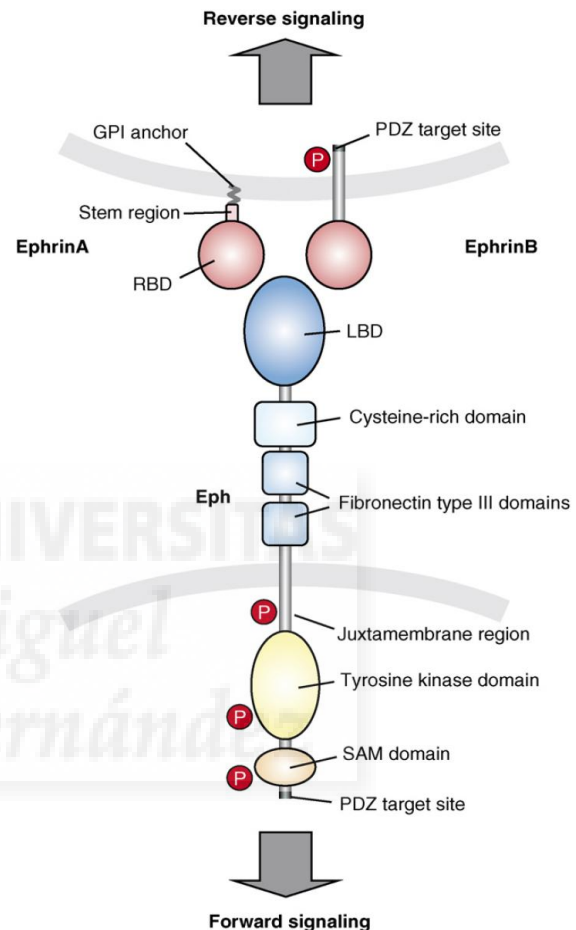


Figura 17: Estructura general de los Eph y efrinas.

Diagrama esquemático mostrando una *ephrin A* y una *ephrin B* (arriba) en contacto con una célula que expresa Eph (abajo). Efrina, *ephrin*; RBD, *Receptor binding domain*; SAM, *sterile α motive* (Egea and Klein, 2007).

kinase domain); un dominio con un motivo *sterile α* (*SAM domain*) y un dominio carboxiterminal PSD-95–Disc-large-ZO-1 (*PDZ target site*) (Egea and Klein, 2007; Klein, 2012; Lisabeth et al., 2013) (Figura 17). Las efrinas, por su parte, presentan un dominio de unión al receptor de Eph. Las efrinas A están unidas a la superficie celular por un glucosilfosfatidilinositol (GPI anchor) (Bartley et al., 1994; Egea and Klein, 2007; Lisabeth et al., 2013; Wykosky et al., 2005), mientras que las efrinas B contienen un segmento transmembrana y una corta región citoplasmática (Lisabeth et al., 2013). Los receptores Eph y las efrinas llevan a cabo múltiples actividades. Típicamente median comunicación intercelular dependiente de contacto que controla en última instancia el citoesqueleto de Actina (Klein 2012) mediando repulsión célula-célula, adhesión, movimiento, morfología, proliferación y supervivencia (Pasquale, 2005). A través de esas actividades el mecanismo de señalización Eph/efrinas juega un papel en la organización espacial de diferentes poblaciones celulares, guía axonal, formación de conexiones sinápticas entre neuronas y remodelado de los vasos sanguíneos (Lisabeth et al., 2013). Existen dos tipos de señalización mediada por Eph/efrinas: 1) La señalización directa (*forward*), que se produce por la unión del receptor a su ligando y que lleva consigo la activación de la actividad quinasa intrínseca del receptor y la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas efectoras para mediar la repulsión de la célula que expresa el receptor y 2) La señalización reversa (*reverse*) que se produce a través de las efrinas y que implica la fosforilación en residuos de tirosina de su dominio intracelular y el reclutamiento de proteínas que contienen un dominio PDZ (Egea and Klein, 2007; Klein, 2012) (Figura 17).

Aunque no de manera tan acusada como en los mutantes de *Zic2*, los ratones mutantes para *EphB1* presentan una proyección ipsilateral reducida y además el bloqueo de uno de los ligandos para este receptor, efrina B2 (*Efnb2*), que se expresa en la GR del quiasma óptico, impide el giro de los axones ipsilaterales (Williams et al., 2003). Además, estudios en los que *Zic2* se expresó ectópicamente en las células contralaterales de la retina mediante electroporación en útero, demostraron que *Zic2* induce la expresión de *EphB1* en CRGs (Garcia-Frigola et al., 2008). Sin embargo, la expresión ectópica de *Zic2* en ratones que carecen de *EphB1* aún produce una proyección ipsilateral que, aunque no es tan evidente como en ratones *wildtypes*, es significativa, lo que sugiere que *EphB1* no es la única molécula efectora de *Zic2* que interviene en la formación de la proyección ipsilateral (Garcia-Frigola et al., 2008).

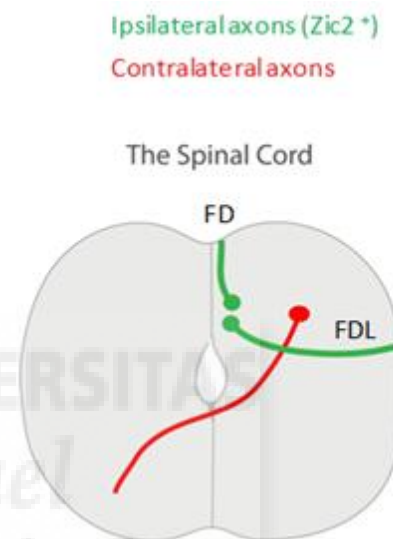


Figura 18: Comportamiento de los axones contralaterales (rojo) e ipsilaterales (verde) en la médula espinal.

Médula espinal, *the Spinal Cord*; axones ipsilaterales, *ipsilateral axons*; axones contralaterales, *contralateral axons*; fascículo dorsal, FD; fascículo dorsal lateral, FDL.

Más recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que *Zic2* no sólo controla la lateralidad de las fibras visuales sino que es un determinante general de la repulsión axonal a la línea media en el SNC (Escalante et al., 2013). Las neuronas de las astas dorsales de la médula espinal se generan en dos fases, una fase temprana donde nacen seis tipos de neuronas (dl1-dl3) que proyectan ipsilateral y contralateralmente, y unas células de generación tardía (neuronas dlL) formadas en una segunda ronda de

proliferación que comprende neuronas inhibitorias dIL_A y neuronas excitatorias dIL_B y que van a poblar la zona superficial de las astas dorsales. Todas las neuronas dIL_B extienden sus axones ipsilateralmente dentro del fascículo dorsal (FD) y/o del fascículo dorsal lateral (FDL) desde donde ascienden hacia el cerebro (Figura 18).

El uso de un ratón transgénico Tg(Zic2^{eGFP}) que expresa la proteína verde reportera GFP (*Green fluorescent protein*) bajo las secuencias reguladoras de Zic2, nos permitió observar

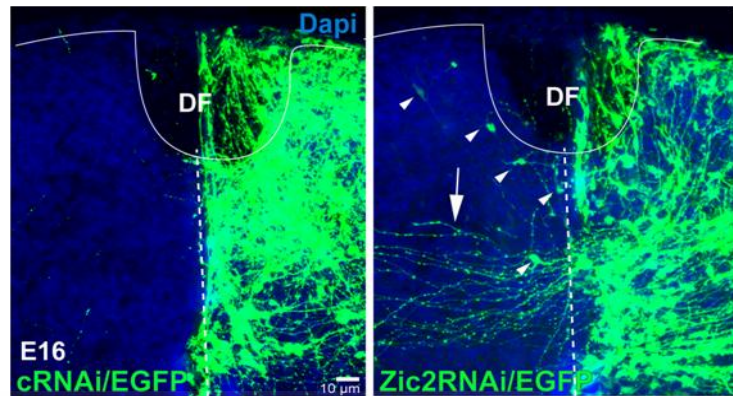


Figura 19: Zic2 es necesario para impedir el cruce aberrante de los axones espinales.

En el panel de la izquierda apenas observamos fibras contralaterales en la médula espinal de ratón. Sin embargo, cuando se electropora a E12 ARN de interferencia-GFP, con el fin de disminuir los niveles de Zic2, aumenta el número de fibras contralaterales a E16 (panel de la derecha). ARN de interferencia, cRNAi; *Green fluorescent protein*, GFP; fascículo dorsal, DF (Escalante et al., 2013).

que Zic2 se expresa en las neuronas glutamatérgicas dILB. Mediante estudios de pérdida de función utilizando ARNs de interferencia, que regulan negativamente la expresión de Zic2, demostramos que la expresión de Zic2 es esencial para que los axones de las neuronas de las astas dorsales de la médula espinal no crucen la línea media (Figura 19). Además, experimentos de ganancia de función desvelaron que Zic2 es suficiente para modificar la lateralidad axonal y hacer que axones espinales, que en un principio proyectaban al lado contralateral, cambien su proyección y eviten la línea media.

En la médula espinal, Zic2 no regula la expresión de EphB1 sino de otro miembro de la misma familia que también responde al ligando efrina B2, EphA4. La

expresión ectópica de Zic2 en la médula espinal induce la expresión del receptor EphA4 mientras que la regulación negativa de Zic2 disminuye su expresión en las neuronas espinales dorsales. Además, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina demostraron la unión específica de Zic2 al promotor de EphA4, indicando que Zic2 controla directamente la expresión de EphA4 en este tipo de neuronas.

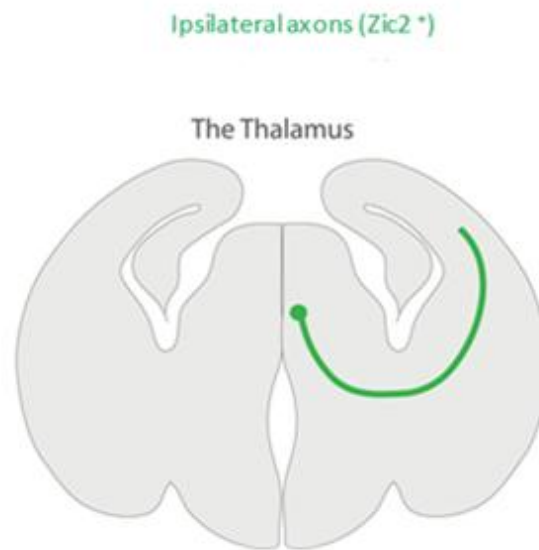


Figura 20: Comportamiento de los axones talamocorticales ipsilaterales en el tálamo.

Tálamo, *the Thalamus*; axones ipsilaterales, *ipsilateral axons*.

Gracias a mi participación en este trabajo (Escalante et al., 2013), pudimos demostrar además que Zic2 también determina la lateralidad de los axones talamocorticales (TC). Los axones TC forman otro de los tractos ipsilaterales más evidentes en el SNC llevando información de las distintas modalidades sensoriales desde los núcleos del tálamo dorsal hasta la corteza cerebral (Figura 20). Tanto por inmunohistoquímica como utilizando el ratón transgénico reportero Tg(Zic2^{eGFP}) observamos que Zic2 se expresa en las células TC recién diferenciadas. Además, mediante experimentos de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) vimos que las neuronas talámicas positivas para Zic2 se diferencian a E13.5. Con marcadores de axones TC: Calretinina y *L1 cell adhesion molecule* (L1) en los ratones Tg(Zic2^{eGFP}) observamos que los axones de las neuronas positivas para Zic2 son una fracción del

total de los axones TC, aquellos que circulan por las zonas mediales de la cápsula interna y que por tanto contactan con la línea media en algún momento de su trayectoria. Finalmente, ensayos funcionales desvelaron que niveles bajos de Zic2 en las células TC provocan un cruce aberrante de los axones TC en la línea media (Figura 21).

En definitiva, en este trabajo, demostramos el carácter general de Zic2 como determinante de la repulsión axonal en la línea media en el SNC. Todos los resultados concernientes al papel de Zic2 como determinante de la lateralidad axonal en la

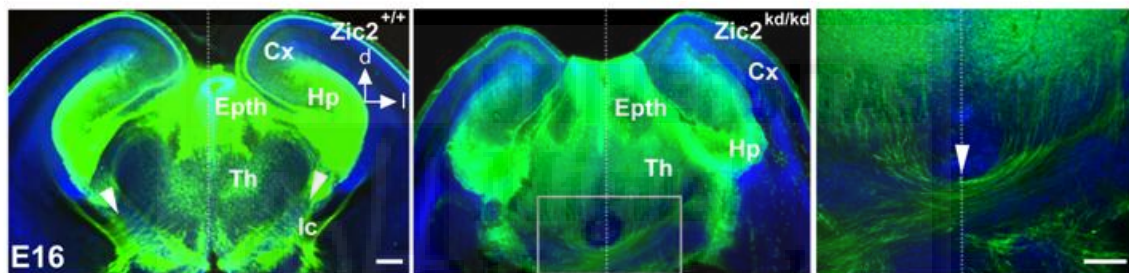


Figura 21: Zic2 previene el cruce de los axones talamocorticales en la línea media.

En los ratones control (panel de la izquierda) los axones talamocorticales Zic2 ascienden ipsilateralmente hasta la corteza cerebral. Sin embargo, en los mutantes de Zic2 los axones talamocorticales cruzan aberrantemente la línea media (panel medial y panel de la izquierda). Tálamo, Th; epitálamo, Epth; córtex cerebral, Cx; capsula interna, Ic; hipocampo, Hp; dorsal, d; lateral, l (Escalante et al., 2013).

médula espinal y en el tálamo, brevemente recogidos en esta sección, se explican en detalle en el artículo Escalante et al., 2013 adjuntado más adelante en el apartado Material Suplementario.

4.2. Zic2 en migración

Los ratones hipomórficos para Zic2, además de los fenotipos en guía axonal previamente referidos, presentan espina bífida y holoprosencefalia (HPE), que son anomalías causadas por el fallo del cierre del tubo neural y la falta de división del lóbulo frontal del embrión en desarrollo para formar los hemisferios cerebrales (las

mitades izquierda y derecha del cerebro) (Brown et al., 2001; Brown et al., 1998; Nagai et al., 2000). Estos fenotipos observados en los individuos con mutaciones en *Zic2* ocurren antes del comienzo de la axonogénesis y por tanto deben ser consecuencia de la función de este factor de transcripción en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, a pesar de las devastadoras consecuencias que provoca la disminución de los niveles de *Zic2* durante el desarrollo temprano del embrión, la función exacta de este factor en estos estadios no había sido estudiada en profundidad (Aruga, 2004).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral decidimos centrarnos en el papel de *Zic2* en estadios tempranos del desarrollo. Mediante experimentos de inmunohistoquímica y el análisis anatómico de los ratones reporteros para *Zic2* Tg(*Zic2*^{eGFP}) identificamos varias poblaciones celulares que expresan *Zic2* a estadios embrionarios tempranos y observamos que, en su mayoría, se trataban de células migrantes: 1) Las células de Cajal-Retzius, 2) Las células de la estría amigdaloides caudal, que son un corredor migratorio de células que van desde el polo caudal del telencéfalo dorsal hasta el núcleo del tracto olfatorio lateral (nTOL) y 3) Las células de una estría pretalámica de neuronas que migran desde la pared del tercer ventrículo hasta el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv). Estas observaciones, unidas al papel atribuido a *Zic2* como inductor de la repulsión de los conos de crecimiento en la línea media durante procesos de guía axonal mediado por la señalización Ephs/efrinas, nos llevaron a especular que *Zic2* podría jugar un papel relevante en la migración neuronal y más concretamente en neuronas migratorias en las que esté involucrada la señalización mediada por EphB/efrinas B. Los resultados obtenidos del análisis del

papel de Zic2 en estas poblaciones celulares están detallados en el artículo adjunto en la sección de Resultados (Murillo et al., 2015).





El objetivo principal de este trabajo de tesis fue investigar si el factor de transcripción Zic2, además de su función en guía axonal, interviene en procesos de migración neuronal durante el desarrollo embrionario.

Para ello nos centramos en:

1. Describir el papel de este factor de transcripción en tres poblaciones neuronales específicas en las que hemos observado su expresión:

1.1. Células de Cajal-Retzius.

1.2. Células de la estría amigdaloides caudal.

1.3. Células de la estría migratoria pretalámica.

2. Analizar la posibilidad de que los receptores Eph sean regulados por Zic2 durante la migración de estas poblaciones celulares a sus destinos finales.



Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain.

Murillo B, Ruiz-Reig N, Herrera M, Fairén A and Herrera E.

J Neurosci. 2015 Aug 12;35(32):11266-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0779-15.2015.

Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain

Blanca Murillo, Nuria Ruiz-Reig, Macarena Herrera, Alfonso Fairén, and  Eloísa Herrera

Instituto de Neurociencias de Alicante (Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Miguel Hernández), Campus San Juan, 03550 San Juan de Alicante, Spain

Human mutations in *ZIC2* have been identified in patients with holoprosencephaly and schizophrenia. Similarly, *Zic2* mutant mice exhibit holoprosencephaly in homozygosis and behavioral and morphological schizophrenic phenotypes associated with forebrain defects in heterozygosis. Despite the devastating effects of mutations in *Zic2*, the cellular and molecular mechanisms that provoke *Zic2*-deficiency phenotypes are yet unclear. Here, we report a novel role for this transcription factor in the migration of three different types of forebrain neurons: the Cajal–Retzius cells that populate the surface of the telencephalic vesicles, an amygdaloid group of cells originated in the caudal pole of the telencephalic pallium, and a cell population that travels from the prethalamic neuroepithelium to the ventral lateral geniculate nucleus. Our results also suggest that the receptor EphB1, previously identified as a *Zic2* target, may mediate, at least partially, *Zic2*-dependent migratory events. According to these results, we propose that deficiencies in cell motility and guidance contribute to most of the forebrain pathologies associated with *Zic2* mutations.

Key words: Cajal–Retzius cells; forebrain; LOT2 amygdaloid nucleus; neuronal migration; vLGN; *Zic2*

Significance Statement

Although the phenotype of *Zic2* mutant individuals was reported more than 10 years ago, until now, the main function of this transcription factor during early development has not been precisely defined. Here, we reveal a previously unknown role for *Zic2* in the migration of forebrain neurons such as Cajal–Retzius cells, interneurons moving to the ventral lateral geniculate nucleus, and neocortical cells going to the amygdala. We believe that the role of this transcription factor in certain populations of migratory cells contributes to defects in cortical layering and hypocellularity in the ventral LGN and amygdala and will contribute to our understanding of the devastating phenotypes associated with *Zic2* mutations in both humans and mice.

Introduction

The vertebrate forebrain is subdivided into the telencephalon, which includes the future cerebral cortex and amygdala, and the diencephalon, which contains the thalamus and the prethalamus. Mutations in *Zic2*, a gene that encodes a member of the ZIC family of C2H2-type zinc finger proteins, cause anomalies asso-

ciated with defects in forebrain development such as holoprosencephaly (Brown et al., 1998; Nagai et al., 2000; Brown et al., 2001). *Zic2* mutants also exhibit defects in cortical lamination (Inoue et al., 2008) and haploinsufficient *Zic2* mice and humans present schizophrenic symptoms (Hatayama et al., 2011). In advanced developmental stages, *Zic2* controls the axonal navigation of retinal ganglion cells and dorsal spinal cord neurons at the midline by regulating the expression of Eph receptors (Herrera et al., 2003; García-Frigola et al., 2008; Escalante et al., 2013). However, before axon-pathfinding processes, *Zic2* is expressed in other cell types such as Cajal–Retzius cells (CRCs) (Inoue et al., 2008), dorsal neural tube cells (Nagai et al., 1997; Escalante et al., 2013), or granule cell progenitors in the cerebellum (Aruga et al., 2002). Surprisingly, despite the devastating consequences of having low levels of *Zic2*, its precise role in early development is still poorly understood.

It has been proposed that the disorganization in cortical lamination observed in *Zic2* mutant individuals could be the consequence of defects in the biology of CRCs and/or meningeal cells (Inoue et al., 2008). However, the function of *Zic2* in CRCs has not been analyzed

Received Feb. 25, 2015; revised June 29, 2015; accepted July 2, 2015.

Author contributions: E.H. designed research; B.M., N.R.-R., and M.H. performed research; B.M., N.R.-R., M.H., and A.F. analyzed data; E.H. wrote the paper.

This work was supported by the Regional Government (Grant Prometeo 2012–005 to E.H.), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (Grant BFU2010-16563 to E.H. and Grant BFU2010-17305 to A.F.), and the European Research Council (Grant ERC2011-StG201001109 to E.H.). The Instituto de Neurociencias is a Severo Ochoa Excellence Center. B.M. and N.R.R. hold Formación de Personal Investigador (FPI) fellowships from the MINECO. We thank A. Barco for critical reading of the manuscript, C. Vegar for genotyping and maintenance of the mice, G. Exposito for assistance in time-lapse imaging, the RIKEN BioResource (Japan) for providing the *Zic2* mutant mice, and the Mutant Mouse Regional Resource Center Repository for providing the Tg(*Zic2*^{EGFP}) mice.

Correspondence should be addressed to Eloísa Herrera, Instituto de Neurociencias de Alicante (Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Miguel Hernández), Campus San Juan, Avd. Ramón y Cajal s/n, 03550 San Juan de Alicante, Spain. E-mail: e.herrera@umh.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0779-15.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/3511266-15\$15.00/0

thoroughly. CRCs are an early-born neuron population with different origins, including the cortical hem and the pallial septum (Meyer et al., 2002; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Bielle et al., 2005; García-Moreno et al., 2007), that localize in the cortical preplate and then in the marginal zone during the development of the cortical plate (Marín-Padilla, 1998; Meyer et al., 1999). CRCs migrate tangentially to disperse over the cortical surface and it has been recently suggested that this dispersion is facilitated by random cell–cell contact repulsions mediated by Eph/ephrin signaling (Villar-Cerviño et al., 2013). Once CRCs are homogeneously dispersed in the cortex, they stimulate radial migration of late-born cortical neurons via secretion of the extracellular protein reelin, which then influences cortical layering (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Frotscher, 1998; Rice and Curran, 2001; Shinozaki et al., 2002; Tissir and Goffinet, 2003; Gil-Sanz et al., 2013).

Here, we report a new function for Zic2 in the migration of CRCs. Zic2 mutant embryos present anomalous morphologies and locations of CRCs, resulting in their uneven distribution along the precocious cortical surface, together with misplacement into deep cortical layers. Given the function of Zic2 in the mobility of CRCs, we aimed to investigate its role in other migrating cell types and found that this transcription factor is also essential for the proper migration of at least two additional subpopulations of forebrain neurons: neuroepithelial cells in the caudal tier of the dorsal pallium moving to the amygdala via the caudal amygdaloid stream (CAS) and prethalamic subventricular neuroepithelial cells traveling to the ventral LGN (vLGN). Our results suggest that the expression of the tyrosine kinase receptor EphB1, previously identified as a Zic2 effector in axon guidance, also depends on this transcription factor during migratory processes. In summary, at least three types of forebrain-migrating cells exhibit aberrant cell migration in Zic2 mutant mice, displaying severe difficulties in reaching their final destinations, impairing forebrain morphology, and contributing to the undesirable Zic2-associated phenotypes.

Materials and Methods

Mouse lines. The Tg(Zic2^{eGFP})HT146Gsat/Mmcd line (identification number RP23-158G6) was generated by GENSAT (Gong et al., 2003) and obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (<http://www.mmrrc.org/strains/17260/017260.html>). The hypomorphic Zic2^{kd} mice line (Zic2^{tm1Jaru}) was obtained from the RIKEN repository. Transgenic mice Tg(Zic2^{eGFP}) were crossed with the heterozygous mice for Zic2 (Zic2^{kd/+}) and the resulting F1 progeny was crossed [(Zic2^{+/-}; Tg(Zic2^{eGFP})) × (Zic2^{+/-}; Tg(Zic2^{eGFP}))] to generate [Zic2^{+/+}; Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})] embryos into the same litter. These mouse lines allowed us to visualize, by eGFP fluorescence, both Zic2 cells in the control embryos and cells with no (or very low) levels of Zic2 in the Zic2 mutant embryos. All mouse lines were congenic on a C57BL/6J background and were kept in a timed pregnancy-breeding colony at the Instituto de Neurociencias. The animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and met European and Spanish regulations.

BrdU injections and immunohistochemistry and in situ hybridization. Immunostaining and *in situ* hybridization in mouse embryos were performed as described previously (Acloque et al., 2008). Antibodies used in this study: GFP (Aves Labs), Arx (Santa Cruz Biotechnology), Tuj1 (Covance Technology), RC2 (Developmental Studies Hybridoma Bank), Otx2 and Trb2 (Millipore), BrdU, Cofilin, and Tbr1 (Abcam), Reelin G-10 (gift from André Goffinet), Calretinin (Swant), Zic2 (home-made as described in Brown et al., 2003), COUP/TF2 (gift from Michèle Studer), and Caspase3 (Cell Signaling Technology). Probes for EphB1, ephrinB2, and ephrinB3 were described previously (Williams et al., 2003; Escalante et al., 2013).

For BrdU experiments, one single injection of BrdU (50 mg of BrdU/kg of body weight) was administrated intraperitoneally in embryonic day 10.5 (E10.5), E11.5, E12.5, or E13.5 pregnant females to label dividing cells in the embryos. Embryos were then analyzed at E14.5. Cryostat sections (20 μm) were pretreated with HCl and borate before performing BrdU and Zic2 staining. Slides were counterstained with DAPI. Fluorescence intensity (FI) obtained from immunostaining with Zic2, BrdU, or both was measured in thalamic cells using ImageJ. For quantification of BrdU cells in wild-type (WT) and mutant embryos, four/five anatomically comparable sections were analyzed per embryo. Two complementary squared areas were delineated along the migratory stream in each section as shown in Figure 8E. FI was measured in the area proximal to the ventricle (medial area) and in the area that includes the vLGN (lateral area). Corrected total area fluorescence was calculated from ImageJ measurements according to the following formula: integrated density (selected area × mean of background fluorescence).

Telencephalic vesicles preparation and quantification. E12.5 [Zic2^{+/+}; Tg(Zic2^{eGFP})] and Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})] embryos were dissected and telencephalic vesicles were transferred to Krebs' solution. The meninges were dissected out and the telencephalic vesicles were flattened by placing four cuts around the external area (see Fig. 2A). Flattened vesicles were then fixed with 4% PFA and incubated with anti-GFP antibodies. After incubation with secondary antibodies, vesicles were mounted and photographed. For quantification, flattened telencephalic vesicles were adapted into a rectangular ROI. The ROI was longitudinally divided in 11 columns of 1040 × 60 pixels each, with the first one being most proximal to the hem. Average FI was measured with ImageJ, obtaining a numeric value for each column that was then compared one by one between WT and mutants.

Culture and analysis of CRC in hem explants. [Zic2^{+/+}; Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})] embryos were dissected and telencephalic vesicles were included in 4% low-melting-point agarose to section them in slides of 250 μm as described previously (Anderson et al., 1997). Vibrosections were collected in Krebs' solution and the ones containing the hem were transferred to a Track-Etched (Nucleopore) membrane, incubated 1 h with MEM, and transferred to neurobasal media to be incubated for 30 min. The hem region was dissected, incubated in neurobasal for 15 more minutes and placed in Poly-L-Lysine Cell-ware 12 mm round Coverslips-BD BioCoat previously treated with 20 μg/ml laminin. Hem explants were then incubated with 0.4% neurobasal methylcellulose medium for 30–40 h. All incubations were performed at 37°C and 5% CO₂. The ImageJ plug-in MTrack was used to determine the longest neurite (LN) and the shorter neurite (SN) and to quantify the complexity of CRCs. Neurites were divided into two groups: (1) first-order neurites (1ONs), those growing directly from the cell soma, and (2) second-order neurites (2ONs), those arising from first-order neurites. Cell quantification was performed in four ROIs/explant and explants from six embryos/genotype.

CRCs were quantified by manually counting the total cells/explant. A circle was delineated to delimit the explant border. A second circle located concentrically 150 μm from the first one was drawn to divide the explant in two areas: the inner part closest to the explant and the outer part distal to the explant. The cells in the culture were counted manually and the percentage of cells located in each area was referred to the total number of cells in the explant. The amount of cells attached to the explant was calculated by delineating the area covered by cells still attached to the explant and measuring FI using ImageJ. FI was then normalized to the total area of the explant.

Time-lapse imaging and cell tracking. [Zic2^{+/+}; Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})] embryos were dissected to flatten telencephalic vesicles (see Fig. 2A) or to be included in 4% low-melting-point agarose to obtain 250 μm coronal slides. Flattened telencephalic vesicles or prethalamic slides were cultured in membrane wells with MEM for 45 min and incubated in neurobasal medium. eGFP cells were recorded with a Leica laser scanning spectral confocal microscope (TCS SP2) using resonant scanning with long working distance and water-immersion 20× objectives. The ImageJ plug-in MTrack was used to track cell trajectories as described previously (Villar-Cerviño et al., 2013).

Quantitative and statistical analysis. All quantifications were presented as the mean ± SEM. Minimal statistical significance was fixed at $p < 0.05$

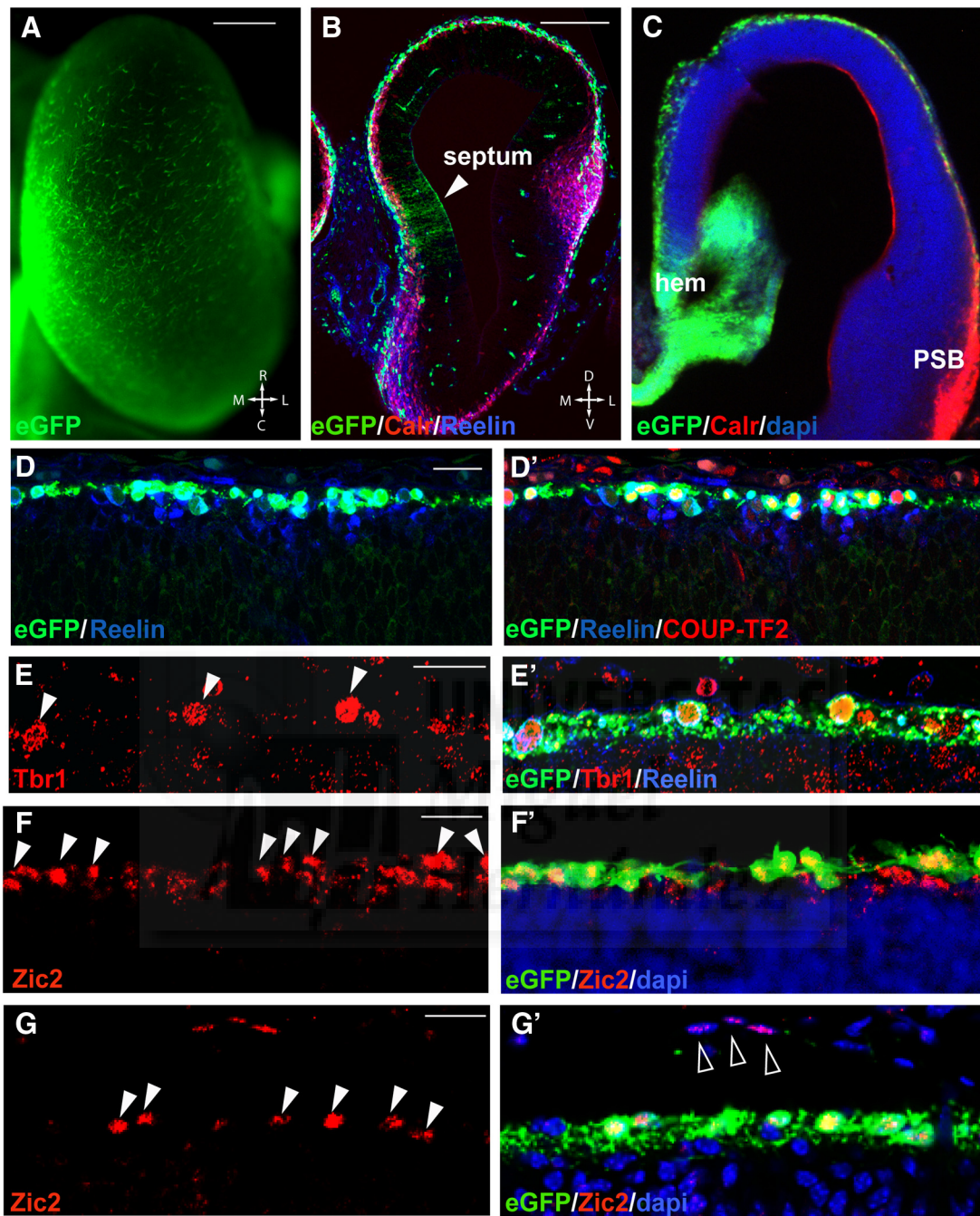


Figure 1. Zic2 is expressed in CRCs from hem and septum. **A**, Whole-mount telencephalic hemisphere of a E12.5 Tg(Zic2^{EGFP}) embryo. **B**, Calretinin and reelin immunostaining in coronal sections through the rostral telencephalon of E12.5 Tg(Zic2^{EGFP}) mouse embryos. Note eGFP expression in the septum region. **C**, Calretinin immunostaining in coronal sections through the telencephalon of E12.5 Tg(Zic2^{EGFP}) mouse embryos revealed that, whereas a large number of calretinin cells are found in the dorsolateral superficial cells, eGFP cells only localize in medial areas, close to the hem region. **D–D'**, Reelin and COUP-TF2 stainings in coronal sections through the telencephalon of E12.5 Tg(Zic2^{EGFP}) mouse embryos show that the majority of Zic2/eGFP cells express these CRC markers. **E, E'**, Tbr1 and reelin staining in coronal sections of E14.5 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos confirm that Zic2/eGFP cells still express this CRCs marker at later stages. Arrowheads point to Tbr1 positive cells that are also positive for reelin and eGFP. **F–G'**, Zic2 staining in coronal sections through the telencephalon of E12.5 and E15.5 Tg(Zic2^{EGFP}) mouse embryos demonstrate that eGFP expression reproduces the endogenous expression of Zic2 in the CRCs (white arrowheads). Note that, at E15.5, Zic2 but not eGFP is expressed in some DAPI-stained meningeal cells (empty arrowheads). R, Rostral; C, caudal; M, medial; L, lateral; PSB, palium subpalium boundary. Scale bars: **A–C**, 200 μ m; **D–G'**, 20 μ m.

for the results of the Student's *t* test and are represented in the figures as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

Results

Zic2 is required for the proper migration of CRCs

To investigate the function of Zic2 in CRCs, we took advantage of a previously described reporter mouse line that expresses eGFP under the regulatory sequences of Zic2 [Tg(Zic2^{eGFP})] (Gong et

al., 2003; Escalante et al., 2013). We observed eGFP cells in the surface of the telencephalic vesicles of E12.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos (Fig. 1A). These eGFP cells expressed CRC markers such as calretinin, reelin (del Río et al., 1995; Alcántara et al., 1998), COUP-TF2 (Tripodì et al., 2004), and Tbr1 (Hevner et al., 2001, 2003; Fig. 1B–E'). As expected, these eGFP cells were also positive for Zic2, confirming that Tg(Zic2^{eGFP}) mice reproduce the en-

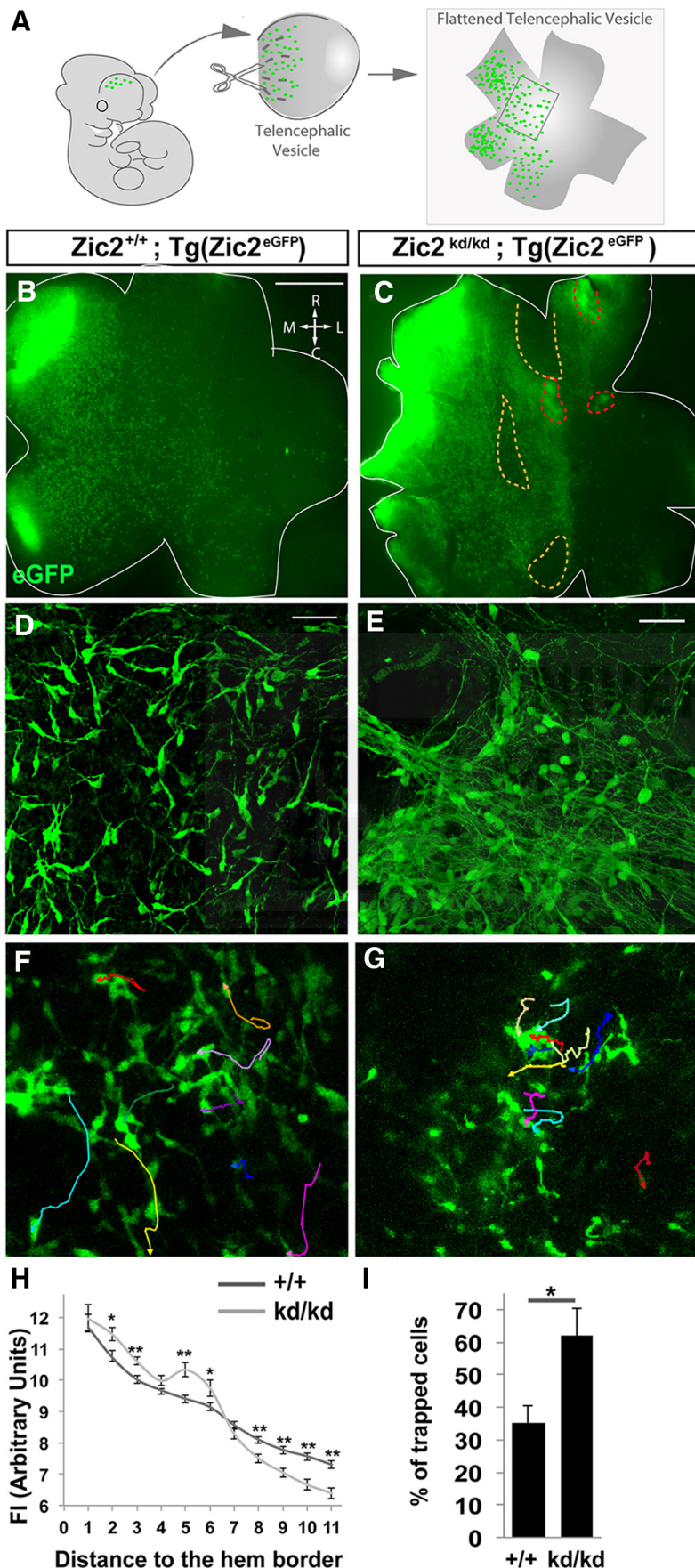


Figure 2. Zic2 mutants exhibit defects in the distribution of CRCs. **A**, Scheme summarizing the experimental procedure. Telencephalic vesicles were isolated, cut, and flattened on a dish. **B, C**, Images showing flattened telencephalic preparations from

dogenous expression of this transcription factor in the CRCs (Fig. 1*F–G'*) and demonstrating that Zic2 is expressed in these cells, as was proposed previously by *in situ* hybridization (Inoue et al., 2008). All the eGFP cells were reelin positive at E12.5, but eGFP was detected in only the $60.20 \pm 4.14\%$ of all the reelin-positive cells based on the observation that eGFP was detected in both the hem and the septum but not in the pallial/subpallial boundary. Zic2 was also expressed in a subpopulation of meningeal cells at E15.5 (Fig. 1*G*), as reported previously (Inoue et al., 2008), but eGFP was not detected in meningeal cells (Fig. 1*G*).

To further analyze the distribution of eGFP CRCs over the developing cortex in WT and Zic2 mutant mice, we dissected and flattened the telencephalic vesicles of control [**Zic2^{+/+}; Tg(Zic2^{eGFP})**] and hypomorphic Zic2 [**Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})**] mice (Nagai et al., 2000; Escalante et al., 2013; see Materials and Methods; Fig. 2*A–E*). The total number of eGFP cells, measured by FI, was similar in flattened vesicle preparations from the Zic2 mutants [average FI in the WT vesicles (FI_{WT}) = 26.94 ± 2.50 arbitrary units (a.u.); $n = 6$] or from the controls (FI_{MUT} = 26.17 ± 3.10 a.u.; $n = 7$; $p = 0.85$). However, although flattened vesicles from E12.5 control embryos showed a high density of eGFP cells at the hem/septum that spread gradually to lateral areas, eGFP cells in the Zic2 mutants were unevenly distributed over the cortical surface. In fact, an accu-

←

[**Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})**] and control E12.5 embryos. Note that, whereas in the control preparation, eGFP cells delineate a mediolateral gradient with homogeneously distributed CRCs, in the mutant vesicle, eGFP cells are unevenly distributed. Yellow-dashed areas in **C** are devoid of eGFP cells. Red-dashed areas delineate places where green cells had migrated into deeper layers. **D, E**, Images showing high magnification of cells from flattened telencephalic preparations. Zic2 mutant CRCs show longer processes compared with the control cells. Note that in, some areas, mutant CRCs were grouped or attached to neighbor cells at the expense of other areas devoid of cells. **F, G**, Time-lapse sequence of the surface of whole-mount telencephalic preparations from [**Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})**] and control E12.5 embryos. Cell trackings are indicated in different colors. **H**, Graph representing the distribution of eGFP CRCs measured by FI in flattened telencephalic vesicles of [**Zic2^{kd/kd}; Tg(Zic2^{eGFP})**] and control E12.5 embryos. Note the higher FI in the regions close to the hem in the Zic2 mutant embryos compared with the controls and a lower FI in the regions distal to the hem. **I**, Graph representing the percentage of trapped cells that form aggregates and therefore do not move or move for very short distances in the time-lapse videos. R, Rostral; C, caudal; M, medial; L, lateral. Scale bars: **B, C**, 500 μm ; **D–G**, 50 μm .

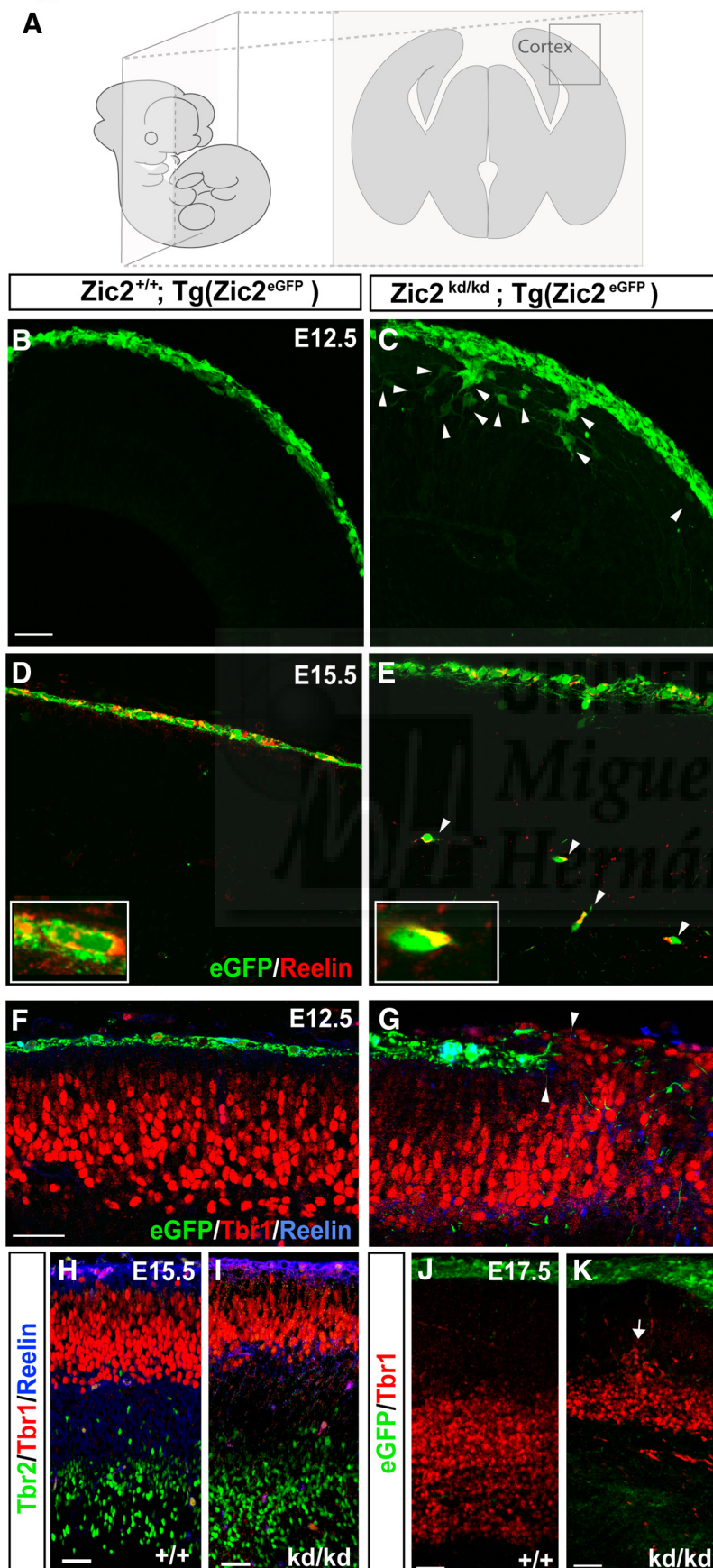


Figure 3. Zic2 mutants show cortical lamination defects. *A*, Schematic drawings representing the orientation and level of sectioning in the rest of the figure. *B, C*, Coronal sections of E12.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos showing that Zic2 CRCs are located in the

superficial layer of the telencephalic vesicle, whereas in the Zic2 mutant embryos, eGFP cells were not restricted to the most superficial cortical layer. White arrowheads point to mislocated eGFP cells. *D, E*, Coronal sections of E15.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos showing that Zic2 CRCs are located in the telencephalic superficial layer. In contrast, in the Zic2 mutant embryos, many eGFP cells expressing reelin reached deep cortical laminae. White arrowheads point to mislocated eGFP/reelin cells. *F–J*, Immunohistochemistry for Tbr1, Tbr2, and reelin in coronal sections of embryos at the indicated stages show that cortical layering, particularly the Tbr1 laminae, are affected from early stages of development (arrows) in the Zic2 mutant mice. Scale bars in *B–K* indicate 100 μ m.

mulum of eGFP cells was detected into the areas proximal to the hem/septum in the mutants compared with the control littermates, whereas fewer eGFP cells reached the lateral regions of the vesicles in the mutants (Fig. 2*B, C, H*). We also observed that in the Zic2-hypomorphic embryos eGFP cells show very long processes and often form circled paths or aggregates compared with control cells (Fig. 2*D, E*). This phenotype suggested defects in cell migration, so we decided to analyze the behavior of eGFP CRCs in the telencephalic vesicles of Zic2 mutant and WT E12.5 embryos by time-lapse imaging. Video-tracking analysis revealed that, in contrast to the behavior of eGFP in the controls, in the Zic2 mutants, many eGFP CRCs were trapped, forming aggregates (Fig. 2*F, G, I*). In addition, in the mutant preparations, many cells seemed to migrate to deeper layers. To confirm whether this was the case, we sectioned the cortex of E12.5 embryos and observed that, in fact, eGFP CRCs were occasionally spreading over deeper layers of the cortical primordium (Fig. 3*A–C*). At later stages (E15.5), reelin-expressing eGFP CRCs were found in deep cortical layers in the Zic2 mutant mice, whereas in the controls, CRCs were located exclusively below the pial surface (Fig. 3*D, E*). Using markers specific for different cell types in the developing cortex (Tbr1 to label layer 6 and Tbr2 to label intermediate progenitors in the subventricular zone), we confirmed that, as soon as E12.5 and coinciding with the CRCs mislocalization phenotype, cortical lamination was severely affected in the rostral telencephalon of mutant mice (Fig. 3*F–K*), showing a cobblestone-like appearance, as reported previously (Inoue et al., 2008).

To better visualize the morphology of individual CRCs and to facilitate cell movement analysis in a 2D surface, we dissected the hem regions of E12.5 Zic2 mutant ($n = 6$) and control embryos ($n =$

6) and cultured them for 36 h on wells preincubated with laminin to evaluate the number of CRCs migrating from the hem explant. A total of 348.80 ± 2.38 CRCs per explant were evenly dispersed through the well surface in control cultures and $19.47 \pm 2.02\%$ of them migrated $>150 \mu\text{m}$ away from the explant. In contrast, in the Zic2 mutants, despite the fact that the size of mutant and WT explants was similar, the number of CRCs moving away from the explant was consistently lower (107.67 ± 1.30) and only $10.25 \pm 1.17\%$ ($p < 0.002$) of them migrated $>150 \mu\text{m}$ away from the explant (Fig. 4A,B,K). In addition, many more cells were attached to the Zic2 mutant explants (IF_{MUT} : 239.93 ± 19.10) compared with the controls (IF_{WT} : 185.44 ± 14.87 a.u.; $p < 0.05$; Fig. 4A'–B',L), suggesting that Zic2^{kd/kd} CRCs migrate shorter distances or do not even leave the explant. Moreover, many mutant cells looked longer and exhibited excessive sprouting compared with control cells (Fig. 4C–J). Measurements of the LNs and SNs in individual cells confirmed that CRCs are significantly longer when Zic2 is downregulated (LN: WT = $33.15 \pm 0.75 \mu\text{m}$, mutant = $37.55 \pm 1.4 \mu\text{m}$, $p < 0.003$; SN: WT = $9.73 \pm 0.36 \mu\text{m}$, mutant = $12.75 \pm 0.65 \mu\text{m}$, $p < 0.001$). To quantify the sprouting phenotype, we counted the 1ONs and 2ONs. Most cells were bipolar in both the Zic2 mutant and control cultures (1ON: WT = 2.00 ± 0.08 neurites/cell, mutant = 1.89 ± 0.04 neurites/cell, $p = 0.302$). However, the number of 2ONs or lamellipodia/filopodia arising from 1ONs was significantly higher in the mutant compared with the control CRCs (2ON: WT = 2.56 ± 0.20 neurites/cell, mutant = 3.59 ± 0.17 neurites/cell, $p < 0.002$; Fig. 4C–J,M).

Together, both explant cultures and *in vivo* results suggested that Zic2 is required for proper morphology, migration, and dispersion of CRCs in the telencephalic vesicles during early embryonic development.

Zic2 is necessary for the migration of another population of telencephalic neurons, the caudal amygdaloid stream

While analyzing the CRCs, we observed another population of Zic2-expressing cells that appeared to delaminate from the neuroepithelium of the dorsal pallium at caudal levels and occupied a conspicuous curve-shaped stripe that resembles what has been described as the caudal amygdaloid stream (CAS). CAS cells migrate toward a cortical amygdaloid nucleus, the nucleus of the lateral olfactory tract (nLOT) (Remedios et al., 2007). The nLOT is connected to the olfactory bulb and piriform cortex and is composed of three layers (Santiago and Shammah-Lagnado, 2004). Layer 2 (nLOT2) differs from the other nLOT layers in its distinct embryonic origin in the most caudal part of the dorsal telencephalon (Fig. 5A). nLOT2 cells are generated between E11.5 and E12.5 (Remedios et al., 2007; Soma et al., 2009) and then migrate rostrally along the CAS to reach the amygdala (Remedios et al., 2007).

Similarly to CRCs, control Tg(Zic2^{eGFP}) mice reproduce Zic2 endogenous expression in CAS cells (Fig. 5B–B'). Sagittal sections from Tg(Zic2^{eGFP}) embryos showed that the Zic2/eGFP cells delaminating from the telencephalic neuroepithelium were positive for Tbr1, which also labels nLOT2 cells (Medina et al., 2004) (Fig. 5C), indicating that Zic2 cells were indeed migrating neurons navigating toward the amygdala. When hypomorphic [(Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{eGFP}))] mutant mice were analyzed, we noticed that the CAS cell population was less abundant, occupied a wider area, and did not form the curved-shaped stream typical in control mice (Fig. 5D,E). In addition, as was the case for CRCs, many CAS cells still expressed Tbr1 but presented anomalous

morphologies in the mutants compared with the controls (cf. Fig. 5D'–E', D''–E'').

These observations indicate that Zic2 is necessary for the proper migration of a second population of telencephalic neurons, the cells integrating the CAS that will populate the amygdaloid nLOT2 nucleus.

Zic2 also controls cell migration in a population of diencephalic interneurons that will end at the vLGN

We wondered whether Zic2 plays a role in the migration of non-telencephalic neural types during development. We knew that Zic2 is expressed in postmitotic thalamocortical neurons (Escalante et al., 2013), but we also noticed another population of Zic2-expressing cells in the diencephalon that formed a narrow stream running from the prethalamic neuroepithelium to the vLGN (Fig. 6A). This Zic2 expression was also recapitulated by the expression of eGFP in the Tg(Zic2^{eGFP}) mice (Fig. 6C,D,F–F'''). At E13.5, Zic2/eGFP cells in this stream coincided with a region positive for Arx, a transcription factor that marks the prethalamus and its boundary with the thalamus (Kitamura et al., 1997; Fig. 6B). One day earlier (E12.5), Zic2 was expressed rostral to the expression of Sonic Hedgehog (data not shown) in the zona limitans intrathalamica (ZLI), a signaling center compartment located between the thalamus and the prethalamus. Altogether, these data showed that Zic2-positive cells localize in the prethalamic area adjacent to the ZLI. To further characterize this Zic2 population in the prethalamus, we performed immunostaining for Tuj1 and RC2 in E15.5 coronal sections from Tg(Zic2^{eGFP}) embryos to distinguish neurons from radial glial cells (Fig. 6E,F). Zic2 cells were identified as neurons because they expressed Tuj1. We then used Otx2 staining to label a population of interneurons (INs) located between the thalamic and the prethalamic area (Golding et al., 2014) and observed that the Zic2 cells that form a narrow stripe in the prethalamus are indeed Otx2 positive and are therefore INs (Fig. 6G).

Although previous evidence has suggested that a subpopulation of vLGN INs originate in the prethalamic subventricular zone (Kitamura et al., 1997; Vue et al., 2009; Golding et al., 2014), their movement from the neuroepithelium has never been confirmed. To confirm the existence of such cell migration, we first determined, by BrdU uptake experiments, the birthdate of most Zic2 IN at E12.5 (Fig. 7A,B). Next, we performed time-lapse imaging experiments in coronal slides taken from E13.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos, when most Zic2 INs are already differentiated. Analysis and quantification of time-lapse videos ($n = 5$) in coronal slices demonstrated that Zic2/eGFP cells arising in the subventricular zone form a migratory stream (MS) of cells that moves along the prethalamus to the vLGN with an average speed ratio of $7.27 \pm 0.28 \mu\text{m}/\text{h}$ (Fig. 7C). Then, to investigate whether Zic2 plays a role in the migration of these prethalamic INs, we analyzed E13.5 embryos and found that the number of eGFP cells in the MS and in the vLGN of Zic2 mutants was significantly lower than in the control embryos (Fig. 8A,B). However, this phenotype was variable, ranging from just a narrower MS (6 embryos of 11 mutants) compared with the WT embryos ($n = 14$) to almost no cells in the MS (5 embryos of 11 mutants). In addition, we observed eGFP cells located ectopically in the prethalamus that appeared to be MS cells that escaped from the stereotyped pathway (Fig. 8A,B). A number of Zic2 mutant mice also presented cell accumulations in the subventricular area (7 of 11 mutants; Fig. 8C,D). BrdU uptake experiments showed a higher number of BrdU cells in the subventricular region of mutant embryos (FI : 7.57 ± 0.38 a.u.; $n = 5$) than in the controls

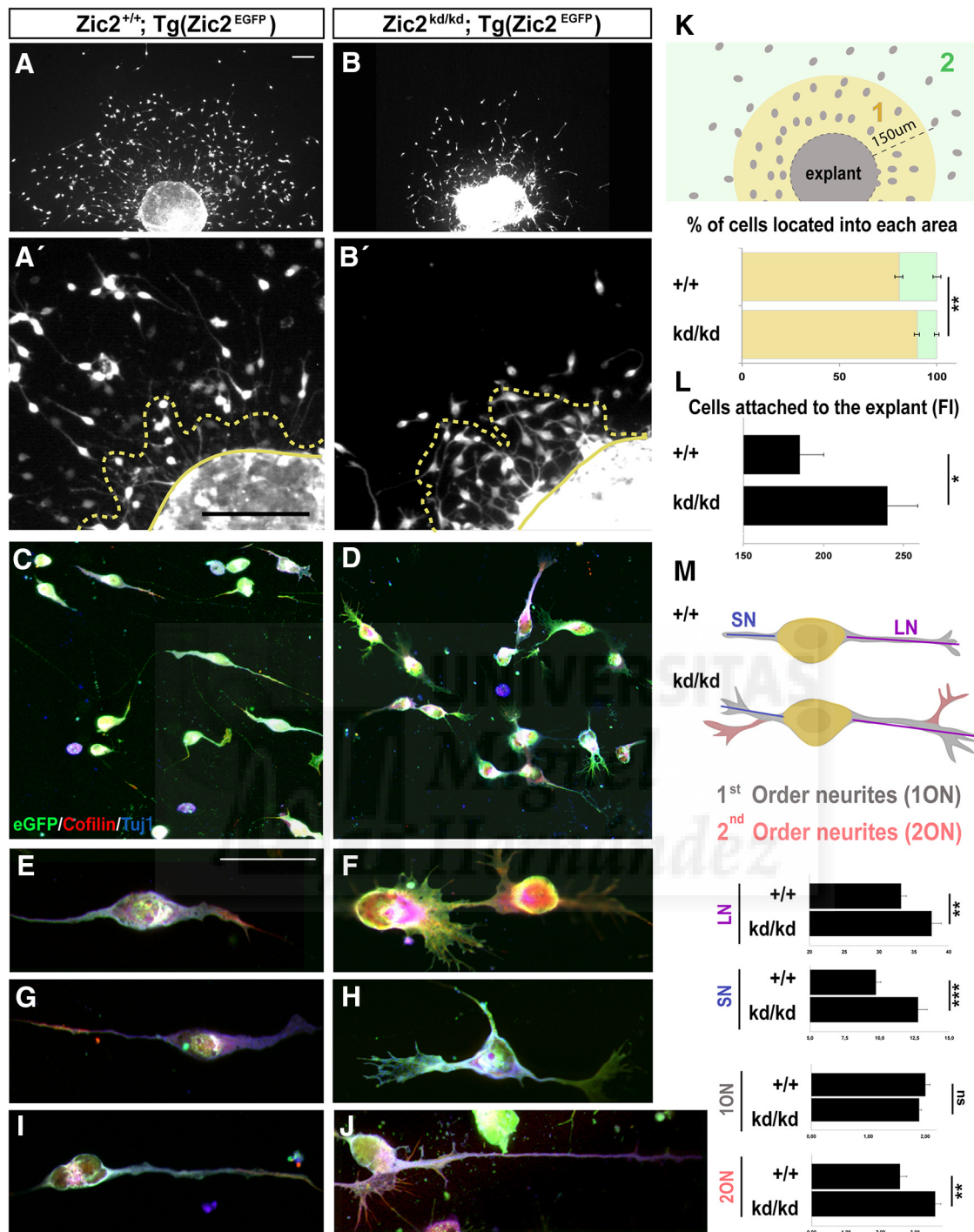


Figure 4. Zic2 is essential to maintaining proper morphology and migration of CRCs. **A, B**, Hem explants from E12.5 [*Zic2*^{+/+};Tg(*Zic2*^{EGFP})] or [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{EGFP})] embryos cultured on laminin showed a reduced number of cells migrating away from the explant. **A'–B'**, High magnification of representative hem explants from E12.5 embryos showing a higher number of eGFP CRCs attached to the explant in the [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{EGFP})] explant than in the controls. Yellow dashed lines include cells that have not completely detached from the explant. **C, D**, Immunostaining against cofilin and Tuj1 in migrating cells from the explants showing cytoskeleton differences between *Zic2* mutant and control cells. **E–J**, Three representative examples of WT and *Zic2* mutant CRCs. **K**, Drawing representing the analyzed areas in hem explant cultures. The graph shows the percentage of cells located within the 150 μm close to the explant (area 1, yellow) and the percentage of cells located in area 2 (green). Note that, in the *Zic2* mutant explants, most cells are located in area 1 and there are very few cells located in area 2. **L**, Graph quantifying eGFP CRCs not completely detached from the explant measured by FI (in a.u.). **M**, Schematic drawing representing a control (+/+) and a *Zic2* mutant (kd/kd) CRC to clarify the analysis approach. Light blue line represents the SN and the dark blue line the LN. Neurites growing directly from the cell body (yellow) were considered 1ONs (gray) and any other neurites were considered 2ONs (pink). Graphs show the quantification of 1ONs and 2ONs and the average length of the LNs and SNs in CRCs from E12.5 *Zic2* mutant and control cells from hem explants. ns, Nonsignificant. Scale bars in **A–J** indicate 50 μm .

(5.91 ± 0.43 a.u.; $n = 5$) and fewer BrdU cells in the vLGN area of mutants (3.71 ± 0.22 a.u.) than in the WT littermates (4.74 ± 0.41 a.u.) (Fig. 8*E, F, I*). However, analysis of cycling cells in the subventricular zone of E13.5 embryos, by counting phosphohis-

tone (pH3)-positive cells, did not reveal significant differences between WT and mutant embryos (WT: 0.34 ± 0.17 cells/ μm^2 , $n = 5$; mutant: 0.38 ± 0.12 cells/ μm^2 , $n = 3$; $p = 0.62$), indicating that proliferation is not grossly altered in the ventricular wall of

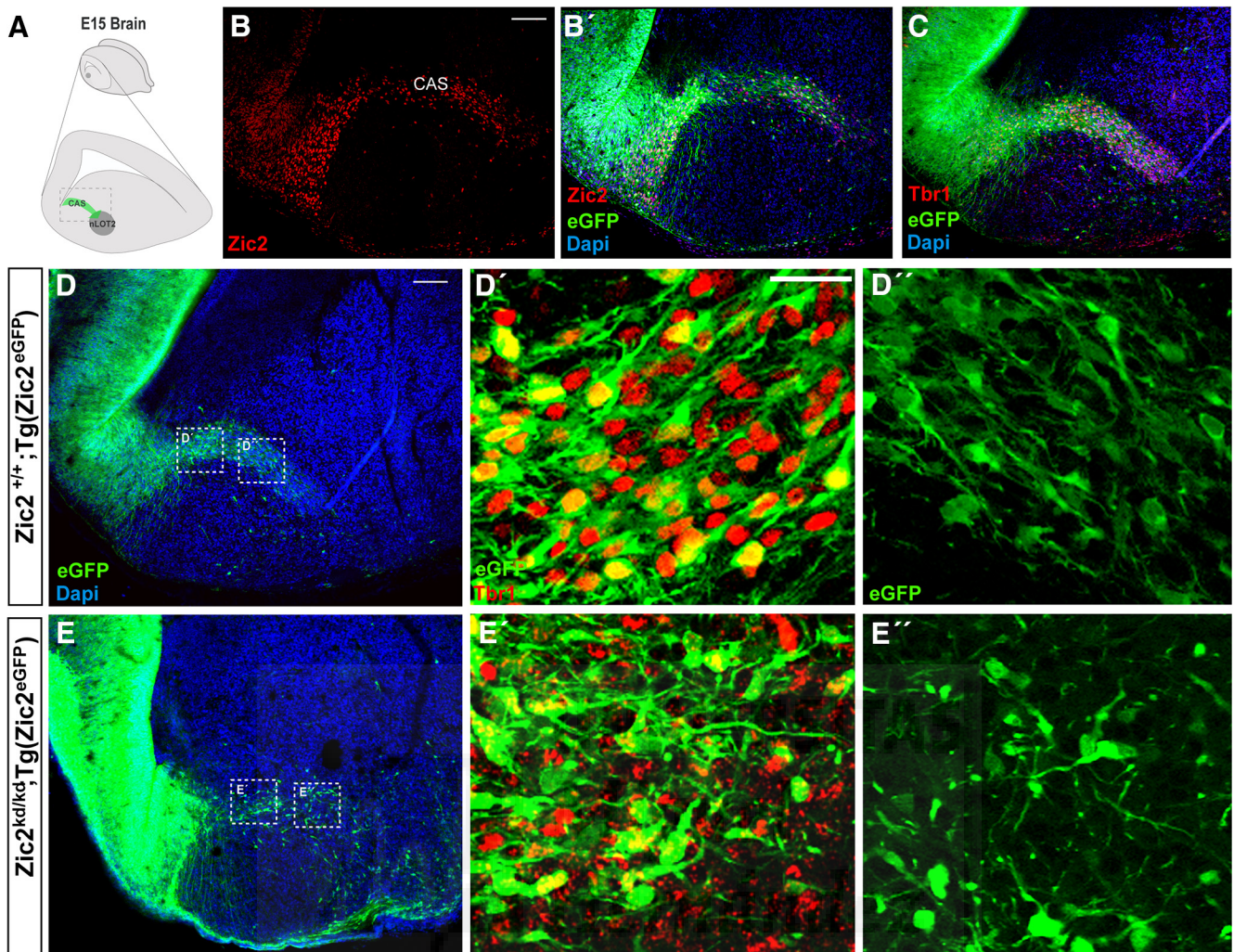


Figure 5. Zic2 is expressed in CAS cells migrating from the caudal telencephalon to the amygdaloid nucleus. **A**, Schematic drawing representing the area of CAS cells migrating from the lateral ventricle to nLOT2. **B, C**, Zic2 and Tbr1 staining in sagittal sections of E15.5 [*Zic2*^{+/+};Tg(*Zic2*^{eGFP})] embryos demonstrating that eGFP expression reproduces the endogenous expression of Zic2 in the area where Tbr1 CAS cells are migrating to nLOT2. **D, E**, Representative sagittal sections of *Zic2*^{+/+} [*Zic2*^{+/+};Tg(*Zic2*^{eGFP})] and [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{eGFP})] embryonic brains revealing a defect in the trajectories of eGFP positive cells in the *Zic2* mutant mice. **D'–E'**, Tbr1 immunostaining in sagittal sections of *Zic2*^{+/+} [*Zic2*^{+/+};Tg(*Zic2*^{eGFP})] and [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{eGFP})] embryonic brains. High-magnification images are shown in the squared areas in **D** and **E**. **D''–E''**, High magnification of the squared areas in **D** and **E** reveal aberrant morphologies of eGFP cells in the *Zic2* mutant mice. Scale bars: **B, C, E**, 100 μ m; **D–E''**, 50 μ m.

Zic2 mutant mice. In agreement with previous reports showing similar number of apoptotic cells in zebrafish or *Zic2* mutant mice compared with control animals (Inoue et al., 2008; Sanek and Grinblat, 2008), we did not find differences in the number of Caspase3-positive cells in the thalamus and the prethalamus of E12.5 *Zic2* mutants (9.67 ± 1.20 cells/embryo; $n = 3$) compared with their WT littermates (9.33 ± 2.33 cells/embryo; $n = 3$; $p = 0.91$; Fig. 8*G, H, J*). Therefore, the most likely explanation for both the accumulation of BrdU cells in the ventricular area and the ectopic cells located in the prethalamus would be a defect in the migration of eGFP cells to lateral areas. To assess whether this was in fact the case, we performed time-lapse videos in E13.5 embryos and tracked the trajectories of 121 eGFP cells in [*Zic2*^{kd/kd}; Tg(*Zic2*^{eGFP})] mutants ($n = 5$) and 104 eGFP cells in [*Zic2*^{+/+}; Tg(*Zic2*^{eGFP})] control mice ($n = 4$) (Fig. 9*A–C*). In the control embryos, most eGFP cells originated in the ventricle and migrated correctly, following a medial-to-lateral stereotyped pathway to the vLGN. Only $16.65 \pm 2.60\%$ of eGFP cells did not follow this stereotyped pathway in the WT embryos. In contrast, in the *Zic2* mutants, a significant number of eGFP cells ($70.96 \pm$

6.71% ; $p < 0.001$) showed any of three types of aberrant migration: (1) they escaped from the stereotyped path, (2) they moved in the opposite direction to the normal path, or (3) they did not follow a linear pathway (Fig. 9*D*). In addition, those eGFP cells abandoning the regular trajectory exhibited an altered morphology, with many protrusions and longer processes than in control embryos. The migratory speed of the eGFP cells was significantly higher in *Zic2* mutant embryos compared with the controls (average speed: WT, 7.27 ± 0.28 μ m/h; mutant, 8.69 ± 0.47 μ m/h, $p < 0.02$; maximum speed: WT, 24.47 ± 1.23 μ m/h; mutant, 30.44 ± 1.38 μ m/h, $p < 0.002$; Fig. 9*D*). These results indicate that Zic2 is required in a subpopulation of INs to migrate correctly from the prethalamic subventricular zone to the vLGN and also confirm a role for Zic2 in cell migration in these diencephalic migrating INs.

Expression of the guidance receptor EphB1 is disrupted in the migrating INs of *Zic2* mutants

The tyrosine kinase receptors EphB1 and EphA4, two different receptors for ephrinB2, are respectively controlled by Zic2 in two

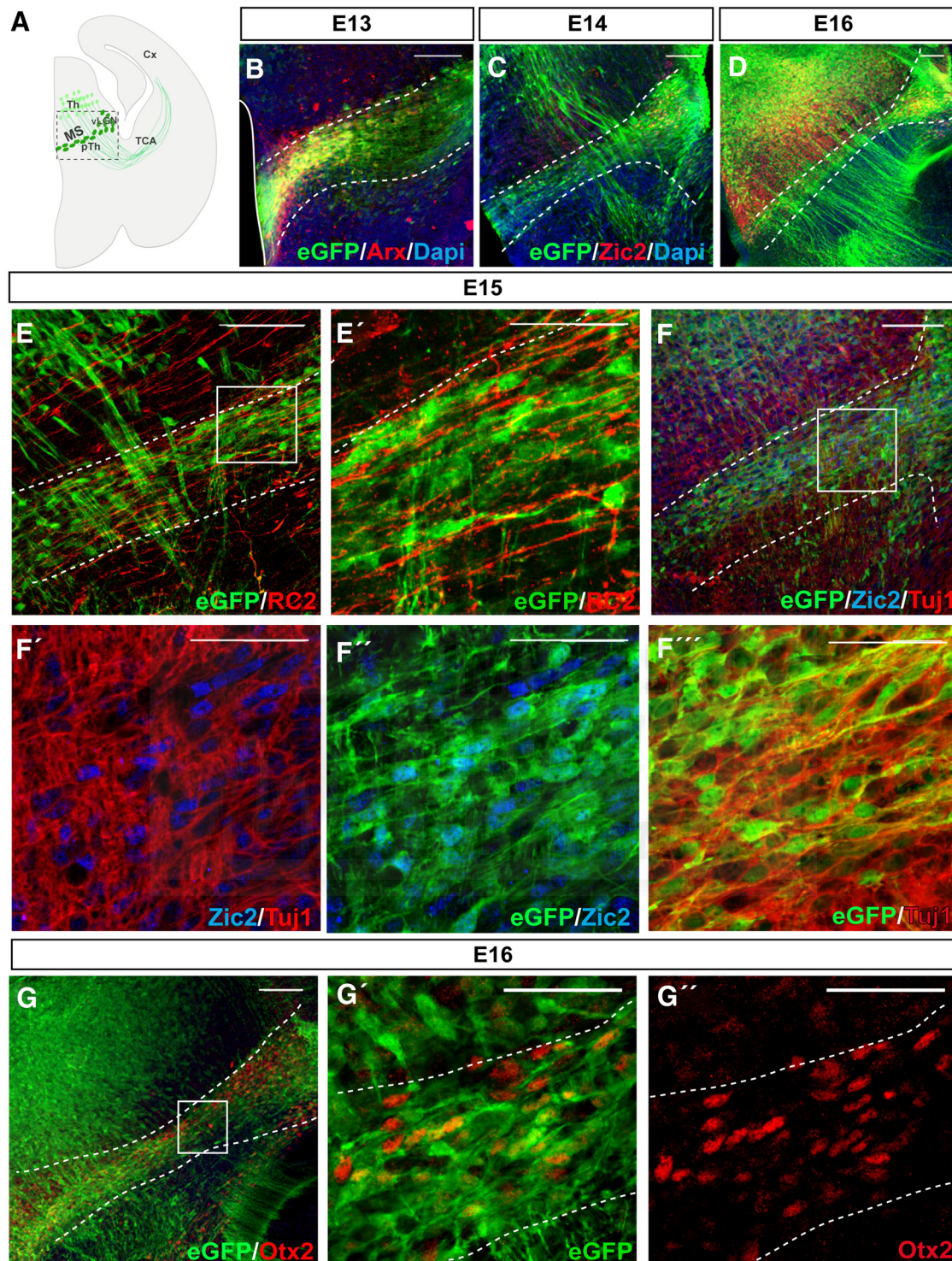


Figure 6. Zic2 is expressed in thalamus–prethalamus boundary INs. **A**, Scheme representing a coronal section from an E13.5 mouse brain. The squared area delimits the zone depicted in all the images of this figure. **B**, Arx immunostaining in coronal sections of E13.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos confirm the existence of a population of Zic2/eGFP cells in the thalamic–prethalamus boundary. White dashed lines delimit the thalamic prethalamus boundary (TpTB) Zic2-positive area. **C, D**, Zic2/eGFP cells in the thalamic–prethalamus boundary at E15.5 and E16.5. Note that Zic2 is also expressed in the thalamus and that thalamocortical axons are also positive for eGFP and visible from E14.5 in advance. **E, E'**, Immunostaining for Rc2 in coronal sections of E15.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos demonstrate that Zic2/eGFP cells are not glial cells. **F–F''**, Zic2 and Tuj1 immunostaining in coronal sections of E15.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos demonstrate that Zic2/eGFP cells in the TpTB are neurons. Note that eGFP cells present Zic2 staining in the nucleus. **F'–F'''**, Zic2 and Tuj1 immunostaining in coronal sections of E15.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos demonstrate that Zic2/eGFP cells are INs. Th, thalamus; pTh, prethalamus; Cx, cortex; TCA, thalamocortical axons. Scale bars: **B–G**, 100 μ m; **E'–G''**, 50 μ m.

different types of differentiated neurons, the retinal ganglion cells (Garcia-Frigola et al., 2008) and the dorsal horn neurons in the spinal cord (Escalante et al., 2013). To investigate whether any of these two receptors are implicated in the migration of Zic2 cells,

we first analyzed the diencephalic expression of EphA4 and EphB1 in the thalamic prethalamus boundary area. *In situ* hybridization in coronal sections showed that, whereas EphA4 is not expressed in the MS (data not shown), *EphB1* mRNA was de-

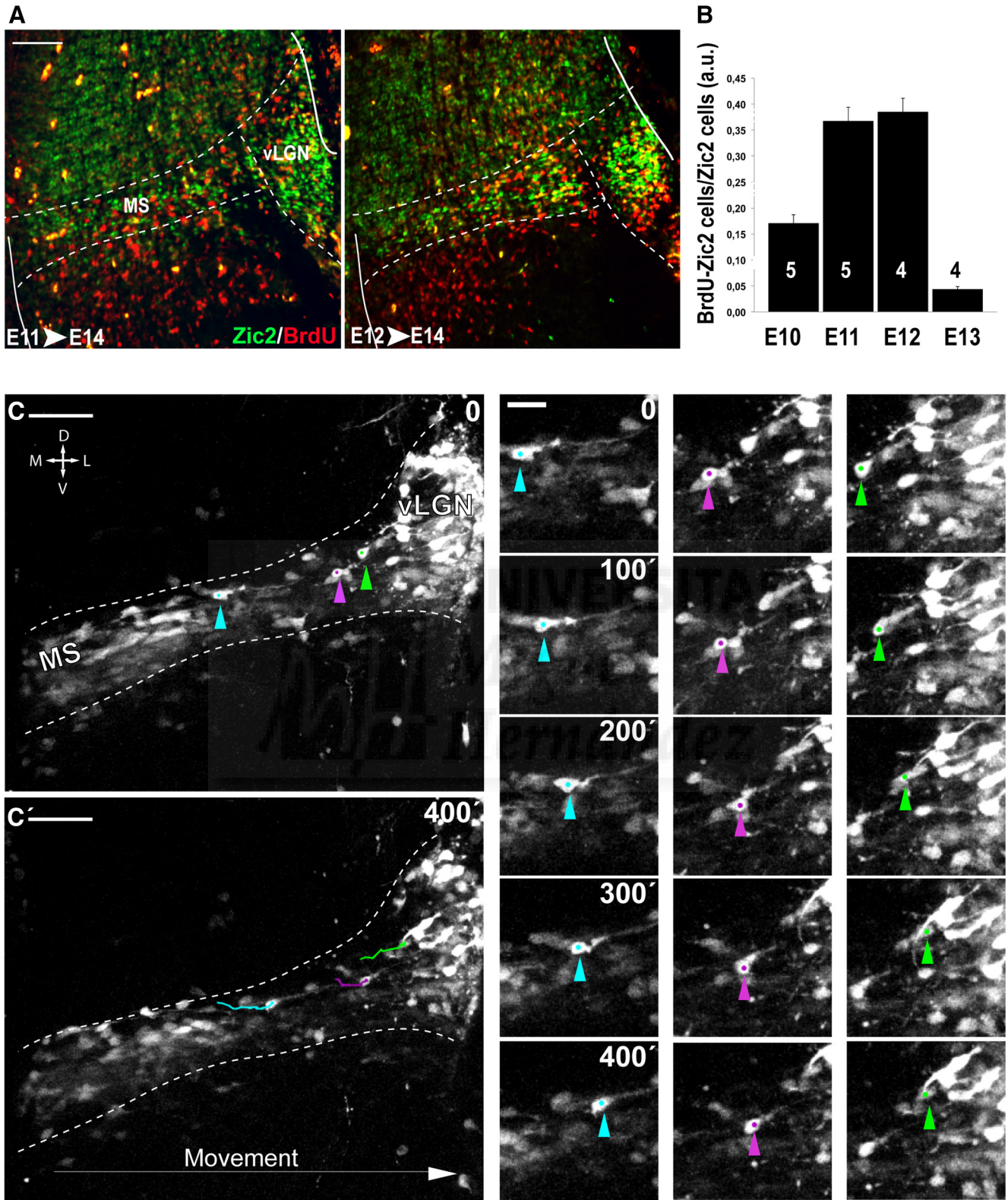


Figure 7. Zic2 thalamus–prethalamus INs are born between E11.5 and E13.5. **A**, Double staining for BrdU and Zic2 in coronal sections from E14.5 embryos with mothers that were injected with BrdU at E11.5 or E12.5. **B**, Quantification of the number of double-labeled Zic2/BrdU cells in E14.5 embryos from mothers injected with BrdU at E10.5, E11.5, E12.5, or E13.5. The majority of the Zic2 cells in the thalamic prethalamal boundary (TpTB) area were born between E11.5 and E12.5. Quantifications were performed in at least four sections per embryo. Numbers in the columns represent number of embryos analyzed. **C, C'**, Time-lapse sequence in the MS of E13.5 Tg(Zic2^{eGFP}) embryos. At the left, color arrowheads point out the starting (top) and the ending (bottom) points of the video. At the right, the three examples of migrating eGFP cells (turquoise, violet, and green arrowheads) over time demonstrate that these cells move from lateral to medial locations. D, Dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. Scale bars: **A, C–C'**, 100 μ m; small panels, 20 μ m.

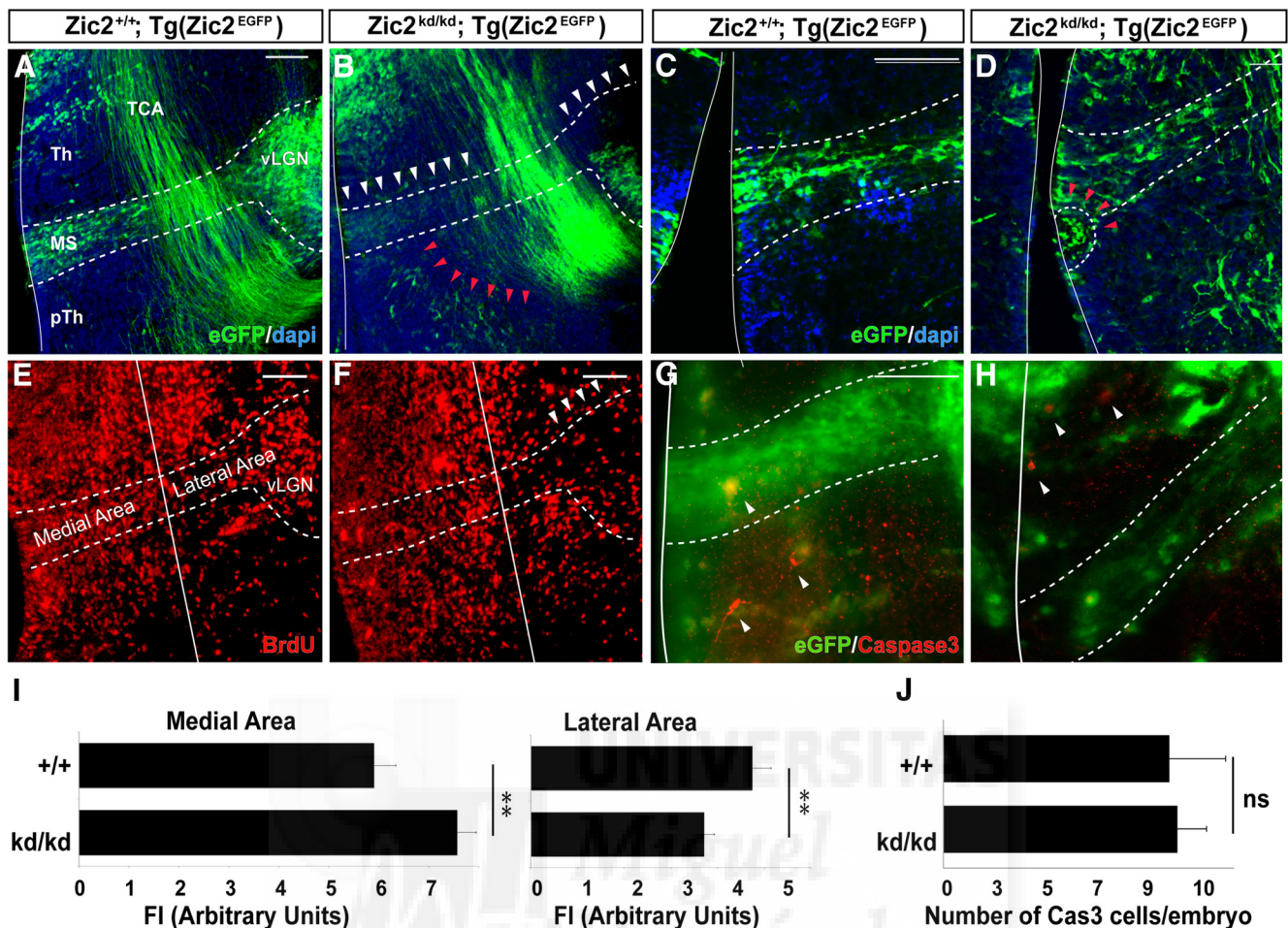


Figure 8. Zic2 mutant mice show lower number of eGFP thalamic prethalamic boundary (TpTB) IN in the vLGN. *A, B*, Coronal sections from E14.5 [Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{eGFP})] embryos through the medial diencephalon. Dashed lines delineate the MS from the third ventricle to the vLGN. White arrowheads highlight the reduction in the number of cells in the MS and vLGN of Zic2 mutant mice. Red arrowheads point to cells mislocated in the prethalamus of Zic2 mutant embryos. *C, D*, Close-up of the ventricular region of E14.5 [Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{eGFP})] embryos. Red arrowheads point to an area containing accumulation of cells in the ventricular wall of a Zic2 mutant embryo. *E, F*, Coronal sections from E14.5 control and Zic2 mutant embryos from mothers injected with BrdU at E12.5. A reduction in the number of BrdU-positive cells is observed in the vLGN area, but not in the ventricular areas of Zic2 mutant mice (arrowheads). White lines divide medial and lateral thalamic areas. *G, H*, Caspase3-positive cells (arrows) in coronal sections from E14.5 [Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{eGFP})] and [Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{eGFP})] embryos. *I, J*, Graphs representing the quantification of FI from BrdU-positive cells in the MS close to the ventricular zone (medial area) and close to the vLGN (lateral area) in Zic2 mutant and control embryos. *J*, Graph representing the number of Caspase3-positive cells in Zic2 mutant and control embryos at E14.5. Th, Thalamus; pTh, prethalamus; TCA, thalamocortical axons.

ected in E13.5 embryos in the area positive for Zic2 INs (Fig. 10*A, B'*). This *EphB1* mRNA expression was reduced in the Zic2^{kd/kd} mutant (Fig. 10*C, D*), suggesting that, as reported previously in the visual system, Zic2 may control the expression of EphB1 in migrating Zic2 INs. We then analyzed the expression of ephrinBs in this region by *in situ* hybridization in coronal sections of E13.5 WT embryos. EphrinB2 was expressed near the ventricular area of the thalamus and very mildly in the prethalamus. The expression of ephrinB3 in the thalamus was similar to ephrinB2, but ephrinB3 was also expressed at basal levels in the rest of the thalamus and strongly expressed in the prethalamic area. However, the boundary between thalamus and prethalamus was devoid of ephrinB2/B3 expression. Therefore, the expression of both ephrinB2 and ephrinB3 exhibited a complementary pattern to the expression of EphB1 all along the MS pathway (Fig. 10*E, F*).

Discussion

We show here that the transcription factor Zic2 plays a critical role in the migration of three different types of forebrain migrating cells, the CRCs, the pallial-derived neurons that will end in the nLOT2 nucleus of the amygdala, and a diencephalic group of

INs that will integrate into the vLGN of the thalamus. Low levels of Zic2 provoke similar defects in the morphology of all of these cell types, affecting migration to their final destinations. In addition, the expression of EphB1, which was implicated previously in the dispersion of CRCs (Villar-Cerviño et al., 2013), is altered in the prethalamus of Zic2 mutant mice, suggesting that Zic2 regulates EphB1 expression during cell migration, as it does during axonal navigation processes.

Zic2 in telencephalic neurons

Explant cultures obtained from the Zic2 mutants showed a lower number of migrating CRCs than the controls. However, we did not observe *in vivo* an obvious reduction in the number of CRCs in the telencephalic vesicles of Zic2 mutants. Therefore, the more parsimonious explanation for a lower number of migrating CRCs in the cultures was a defect in their movement and/or dispersion. In fact, cell accumulations around the explant were observed more abundantly in the Zic2 mutant than in the control explants. Because of defects in cell migration and/or dispersion, eGFP CRCs could not even leave the Zic2 mutant explant, so fewer cells were observed in the dish. This was consistent with the aberrant

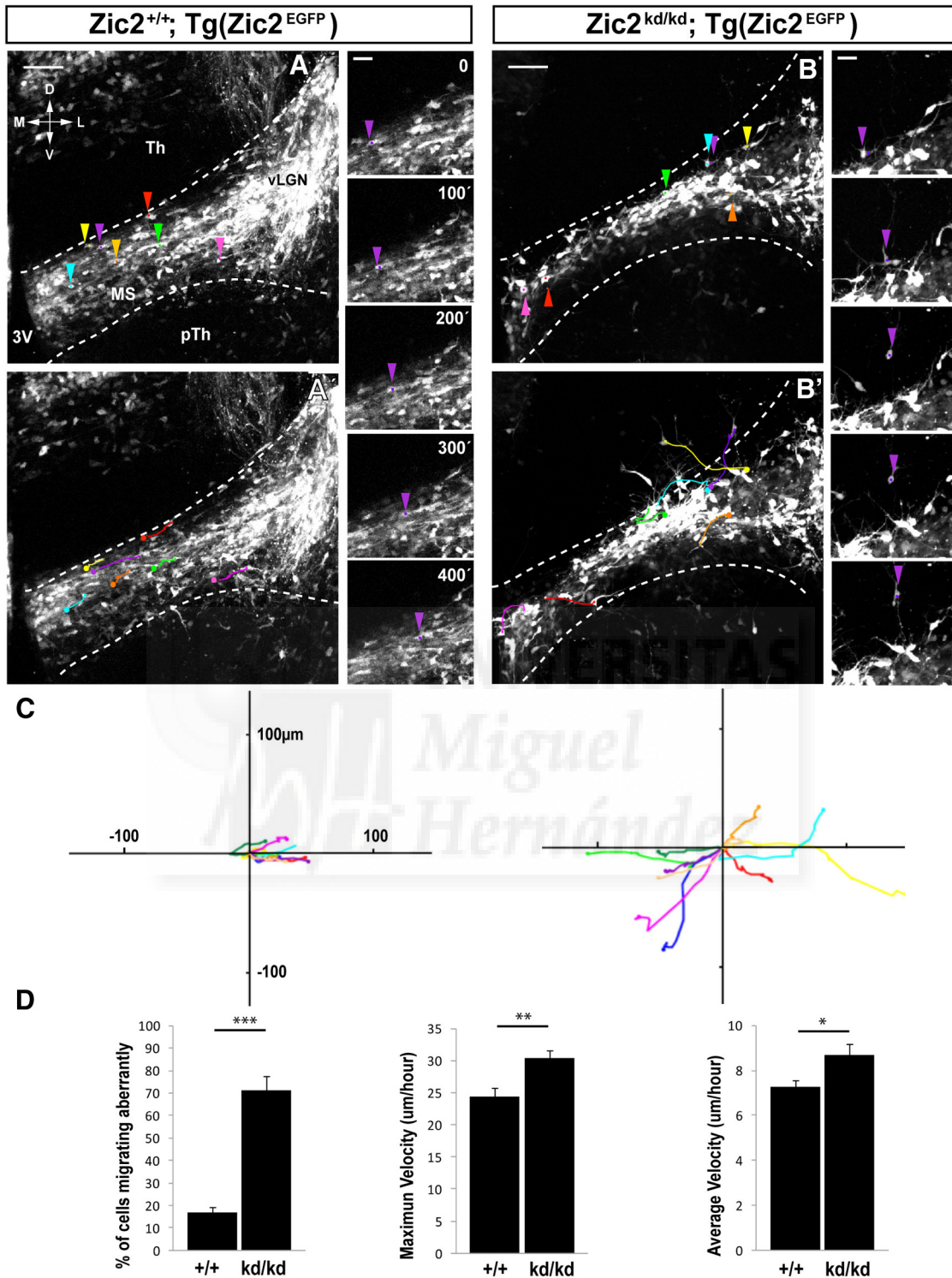


Figure 9. eGFP thalamic prethalamic boundary (TpTB) INs from *Zic2* mutant mice show defects in migration. *A–B'*, Time-lapse sequence of cells in the MS of [*Zic2*^{+/+};Tg(*Zic2*^{EGFP})] and [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{EGFP})] E13.5 embryos. Color arrowheads in *A* and *B* mark the starting point of individual eGFP cells and colored lines in *A'* and *B'* delineate individual cell trajectories. Note that, in the *Zic2* mutant mouse, many cells abandon their stereotyped mediolateral path to the vLGN. As an example, the trajectories of an eGFP-migrating cell in the control and the *Zic2* mutant are shown and highlighted with a purple arrowhead. *C*, Tracks of 10 cells taken from three different embryos evidence aberrant trajectories in *Zic2* mutant embryos (right) compared with the controls (left). Cell trajectories in the mutants delineate aberrant directions and cover longer distances. *D*, Quantification of the percentage of cells that migrate aberrantly and the maximum and average speed of [*Zic2*^{kd/kd};Tg(*Zic2*^{EGFP})] and control cells. D, Dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral; Th, thalamus; pTh, prethalamus; vLGN, ventral lateral geniculate nucleus; 3V, third ventricle. Scale bars: *A–B'*, 100 μ m; small panels, 20 μ m.

distribution and behavior of eGFP CRCs found in the whole-mount telencephalic vesicles *in vivo*, in which many CRCs are trapped, forming cell aggregates. Therefore, both the results *in vivo* in thelencephalic vesicles and those obtained with the ex-

plants *in vitro* are compatible with defects in the migration/dispersion of the CRCs in the mutant animals.

The cortical layering defects described previously in *Zic2* hypomorphic mice has been attributed to a function of *Zic* genes in

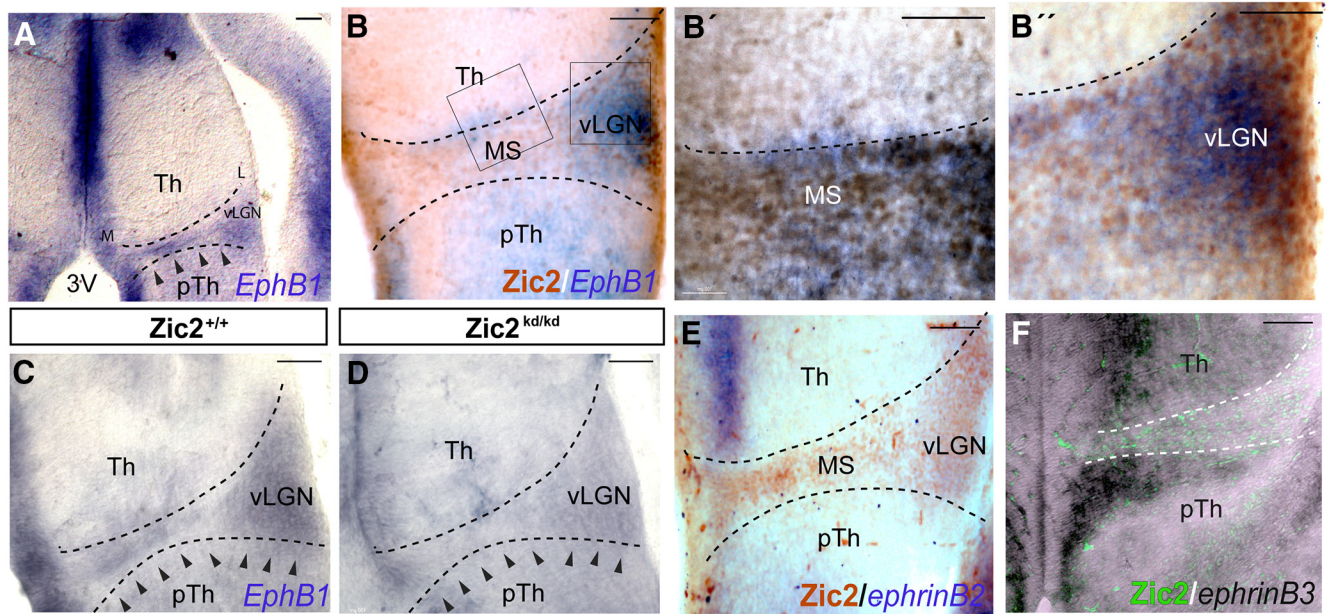


Figure 10. EphB1 is expressed in thalamic prethalamic boundary (TpTB) cells and its expression is disrupted in *Zic2* mutant mice. **A–B''**, *In situ* hybridization in coronal sections through the diencephalon of E13.5 embryos showing that EphB1 mRNA is expressed in the TpTB area coinciding with the location of *Zic2* cells. Arrowheads point to EphB1 expression. **B–B''**, Higher magnification of the squared areas in **B**. **C, D**, *In situ* hybridization in *Zic2* mutant and control littermates revealing a reduction in the expression of EphB1 in embryos expressing low levels of *Zic2*. Arrowheads delineate the expression of EphB1 in the control and its absence in the mutant section. **E**, *In situ* hybridization in coronal sections of E13.5 embryos showing that *ephrinB2* mRNA is expressed in thalamic areas proximal to the ventricular zone. *Zic2* staining reveals the *Zic2* MS. **F**, *In situ* hybridization in coronal sections of *Zic2* E13.5 embryos showing that *ephrinB3* mRNA is highly expressed in thalamic and prethalamic areas proximal to the ventricular zone and at basal levels in lateral areas. Note that the stream of *Zic2*/eGFP-migrating cells is devoid of *ephrinB3* expression. L, Lateral; M, medial; 3V, third ventricle; pTh, prethalamus; Th, thalamus. Scale bars: **A–F**, 100 μ m; **B'–B''**, 50 μ m.

CRCs and/or meningeal cells (Inoue et al., 2008). In both the time-lapse and the *in vitro* experiments (Figs. 2F, G, 4), we found striking migration differences between *Zic2* mutant CRCs and controls even though the meninges were dissected out in all the cases. Therefore, we favor the hypothesis that defects in the migration of CRCs in the *Zic2* mutant mice are caused by the lack of *Zic2* expression in the CRCs themselves rather than defects in signals coming from meningeal cells. However, because *Zic2* is also expressed in the meninges, we cannot disregard the idea that the cortical layering defect observed in the *Zic2* mutants is due to a putative role for this transcription factor in meningeal cells.

CRCs in the E12.5 *Zic2* mutants were not localized only in the preplate, but rather were dispersed toward deeper layers of the cortical primordium. This early defect in the migration of CRCs seems to provoke mislocalization of CRCs still expressing reelin into deeper areas at later stages (Fig. 3D, E). Therefore, in principle, we tend to believe that the cortical layering phenotype in the *Zic2* mutants is due to the migration defects of CRCs. However, the relationship between CRCs and cortical lamination has been challenged lately because massive reduction of CRCs in the hem-ablated mice (Yoshida et al., 2006), mice lacking *Dbx1*-expressing progenitors in the septum and PSB (Bielle et al., 2005), and *p73*-deficient mice (Meyer et al., 2002) seem to show anatomically correct neocortical layers. Therefore, given the role of *Zic2* in the migration of different cell populations, another hypothesis to explain cortical layering defects in the mutants is a putative role for *Zic2* in the migration of cortical progenitors at some point of their radial trajectories, an issue that will be investigated in the future.

Zic2 in diencephalic neurons

A proliferative niche in the prethalamic wall of the third ventricle has been proposed as the origin of *Otx2*-INs that populate the vLGN. It

has been reported previously that prethalamic INs are positive for *Otx2* (Golding et al., 2014), but it was never demonstrated that epithelial wall cells move adjacently to the ZLI along the prethalamic boundary to reach the vLGN. In the experiments presented here, we observe a decrease in the number of BrdU cells in the vLGN area of *Zic2* mutant mice and, although we cannot discard modest alterations in the number of proliferating cells in the ventricular area of *Zic2* mutant mice during early developmental stages, it is likely that the strong reduction in the number of BrdU cells in the vLGN rather results from defects in the migration of cells moving from medial to lateral prethalamic areas. Therefore, our results confirm the existence of this type of radial migration in the prethalamus and determine the speed ratio of these INs while migrating. In addition, we identify the first transcription factor involved in the migration of these prethalamic INs.

Although *Zic2* controls the expression of *EphA4* in dorsal spinal cord neurons to mediate axon midline avoidance (Escalante et al., 2013), in the developing retina, this transcription factor regulates the expression of another guidance receptor, *EphB1* (García-Frigola et al., 2008). Here, we show that migrating prethalamic INs express *EphB1* but not *EphA4* and that, in the absence of *Zic2*, the expression of *EphB1* in these cells is seriously compromised. Because the sum of *ephrinB2* and *ephrinB3* expression delineates a complementary pattern to *EphB1* expression in the thalamus/prethalamus boundary, it is likely that *EphB*/*ephrinB*-mediated repulsion is involved in channeling *Zic2* INs into the MS. In agreement with the idea that *EphB1* expression plays an important role in the migration of *Zic2* neurons, it seems that CAS cells also express *EphB1* (see <http://developingmouse.brain-map.org/experiment/siv?id=100053200&imageId=101048978&initImage=ish>).

Moreover, it has been reported recently that the repulsive interactions mediated by *EphB*/*ephrinB* signaling leads to random

dispersion of CRCs throughout the cortical surface (Villar-Cerviño et al., 2013), which also supports a role for Zic2 in controlling the contact cell repulsion mediated by EphB/ephrinB during the dispersion of CRCs on the telencephalic vesicles and supports the idea that Zic2 mutant CRCs fail to be repelled from each other during dispersion. Remarkably, EphB/ephrin signaling operating in the prethalamus and in CRCs may explain the apparently contradictory phenotype observed in the prethalamal Zic2 mutant IN and the defects observed in the hem explant cultures. Diencephalic GFP cells migrate into a narrow stream restricted by repulsive cues that create a repulsion-free corridor. In the mutant embryos, cells do not respond to the repulsive signals at both sides of the corridor and therefore they escape at higher speed than WT cells, which sense the repulsion and are braking all along the pathway. The consequence of decreased EphB/ephrinB signaling in CRCs is the formation of aggregates both *in vivo* and *in vitro* because these cells are unable to repel each other.

Role of Zic2 in cell migration: a putative explanation to holoprosencephaly and the other diencephalic phenotypes

In addition to the previously reported expression of Zic2 in several populations of cells at early embryonic stages (Nagai et al., 1997; Elms et al., 2003; Warr et al., 2008), we report here that this transcription factor is also expressed in CRCs, prethalamal INs, and amygdaloid CAS cells. A common feature of these three neural populations is the expression of Zic2 while navigating to their final destinations and we demonstrate here a function for this protein in cell migration. It has been suggested that mildly impaired ZIC2 functions result in psychiatric illnesses (Hatayama et al., 2011). In fact, Zic2 heterozygous mutant mice show behavioral phenotypes reminiscent of those of schizophrenia, a condition that has been related to defects in cortical cell migration during embryogenesis (Valiente and Marín, 2010). It is therefore possible that the schizophrenic features observed in Zic2 heterozygous individuals are the consequence of slight defects in the migration of CRCs and/or cortical progenitors.

A previous study showed a modest reduction in the number of BrdU-positive cells in the prethalamus of Zic2 zebrafish morphants (Sanek and Grinblat, 2008). However, further studies in different animal models, including the present work, showed evidence that alterations in cell proliferation or cell death do not fully explain the different phenotypes found in the Zic2 mutants (Elms et al., 2003; Sanek and Grinblat, 2008). Interestingly, a decreased number of neural crest cells exiting the dorsal neural tube has been reported in Zic2 mutant embryos (Elms et al., 2003), but it was not investigated whether this reduction in the number of neural crest cells in the mesenchyme is a consequence of defects in cell proliferation, cell migration, or both. Conversely, Zic2 mutant mice also exhibit important defects in cerebellar development (Aruga et al., 2002). The chemokine Cxcl12 is a strong chemoattractant to upper rhombic lip cells, preventing the migration of Cxcr4-expressing premature granule cells away from the external granule layer (Zou et al., 1998). Similarly, Cxcr4, expressed in CRCs, is essential for their migration through the surface of the telencephalic vesicles that express Cxcl12 in the meningeal cells (Borrell et al., 2006). Cxcr4 expression has been shown to be strongly reduced in Zic2 mutant mice (Inoue et al., 2008). All of these observations may be reinterpreted in light of the results presented here. Both the reduction in the number of neural crest cells in mesenchymal tissues and the defects in cerebellar development observed in the Zic2 mutants could be easily explained by defects in cell migration. Zic2 mRNA has been de-

tected in prechordal plate cells even earlier, at midgastrula stages (Warr et al., 2008), but an increase in apoptosis or alterations in proliferation have not been detected in Zic2-defective embryos at these stages (Elms et al., 2003; Merzdorf, 2007; Warr et al., 2008). We speculate that Zic2 mutant prechordal plate cells may suffer defects in migration during early gastrulation and that these migratory alterations may underlie the failure in telencephalic vesicle division that leads to holoprosencephaly.

References

- Acloque H, Wilkinson DG, Nieto MA (2008) In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* 87:169–185. [CrossRef Medline](#)
- Alcántara SA, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* 18:7779–7799. [Medline](#)
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474–476. [CrossRef Medline](#)
- Aruga J, Inoue T, Hoshino J, Mikoshiba K (2002) Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1. *J Neurosci* 22:218–225. [Medline](#)
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Nème N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002–1012. [CrossRef Medline](#)
- Borrell V, Marín O (2006) Meninges control tangential migration of hemiderived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9:1284–1293. [CrossRef Medline](#)
- Brown LY, Odent S, David V, Blayau M, Dubourg C, Apacik C, Delgado MA, Hall BD, Reynolds JF, Sommer A, Wiczorek D, Brown SA, Muenke M (2001) Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Hum Mol Genet* 10:791–796. [CrossRef Medline](#)
- Brown LY, Kottmann AH, Brown S (2003) Immunolocalization of zic2 expression in the developing forebrain. *Gene Expr Patterns* 3:361–367. [CrossRef Medline](#)
- Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RC, Muenke M (1998) Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of *Drosophila* odd-paired. *Nat Genet* 20:180–183. [Medline](#)
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JE, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374:719–723. [CrossRef Medline](#)
- del Río JA, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* 5:13–21. [Medline](#)
- Elms P, Siggers P, Napper D, Greenfield A, Arkell R (2003) Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. *Dev Biol* 264:391–406. [CrossRef Medline](#)
- Escalante A, Murillo B, Morenilla-Palao C, Klar A, Herrera E (2013) Zic2-dependent axon midline avoidance controls the formation of major ipsilateral tracts in the CNS. *Neuron* 80:1392–1406. [CrossRef Medline](#)
- Frotscher M (1998) Cajal—Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8:570–575. [Medline](#)
- García-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Mason C, Herrera E (2008) Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development* 135:1833–1841. [CrossRef Medline](#)
- García-Moreno F, López-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500:419–432. [CrossRef Medline](#)
- Gil-Sanz C, Franco SJ, Martínez-Garay I, Espinosa A, Harkins-Perry S, Müller U (2013) Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron* 79:461–477. [CrossRef Medline](#)
- Golding B, Pouchelon G, Bellone C, Murthy S, Di Nardo AA, Govindan S, Ogawa M, Shimogori T, Lüscher C, Dayer A, Jabaudon D (2014) Retinal input directs the recruitment of inhibitory interneurons into thalamic visual circuits. *Neuron* 81:1057–1069. [CrossRef Medline](#)
- Gong S, Zheng C, Dougherty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression

- atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917–925. [CrossRef Medline](#)
- Hatayama M, Ishiguro A, Iwayama Y, Takashima N, Sakoori K, Toyota T, Nozaki Y, Odaka YS, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J (2011) Zic2 hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and ZIC2 mutations identified in schizophrenia patients. *Sci Rep* 1:16. [Medline](#)
- Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA (2003) Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114:545–557. [CrossRef Medline](#)
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL (2001) Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353–366. [Medline](#)
- Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* 141:39–53. [Medline](#)
- Inoue T, Ogawa M, Mikoshiba K, Aruga J (2008) Zic deficiency in the cortical marginal zone and meninges results in cortical lamination defects resembling those in type II lissencephaly. *J Neurosci* 28:4712–4725. [CrossRef Medline](#)
- Kitamura K, Miura H, Yanazawa M, Miyashita T, Kato K (1997) Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. 67:83–96.
- Marín-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64–71. [Medline](#)
- Medina L, Legaz I, González G, De Castro F, Rubenstein JL, Puellas L (2004) Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustroramygdaloid complex. *J Comp Neurol* 474:504–523. [CrossRef Medline](#)
- Merzdorf CS (2007) Emerging roles for zic genes in early development. *Dev Dyn* 236:922–940. [CrossRef Medline](#)
- Meyer G, Goffinet AM, Fairén A (1999) Feature article: what is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cereb Cortex* 9:765–775. [CrossRef Medline](#)
- Meyer G, Perez-García CG, Gleeson JG (2002) Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12:1225–1236. [CrossRef Medline](#)
- Nagai T, Aruga J, Takada S, Günther T, Spörle R, Schughart K, Mikoshiba K (1997) The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182:299–313. [CrossRef Medline](#)
- Nagai T, Aruga J, Minowa O, Sugimoto T, Ohno Y, Noda T, Mikoshiba K (2000) Zic2 regulates the kinetics of neuroulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1618–1623. [CrossRef Medline](#)
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14:899–912. [CrossRef Medline](#)
- Remedios R, Huilgol D, Saha B, Hari P, Bhatnagar L, Kowalczyk T, Hevner RF, Suda Y, Aizawa S, Ohshima T, Stoykova A, Tole S (2007) A stream of cells migrating from the caudal telencephalon reveals a link between the amygdala and neocortex. *Nat Neurosci* 10:1141–1150. [CrossRef Medline](#)
- Rice DS, Curran T (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24:1005–1039. [CrossRef Medline](#)
- Sanek NA, Grinblat Y (2008) A novel role for zebrafish zic2a during forebrain development. *Dev Biol* 317:325–335. [CrossRef Medline](#)
- Santiago AC, Shammah-Lagnado SJ (2004) Efferent connections of the nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. *J Comp Neurol* 471:314–332. [CrossRef Medline](#)
- Shinozaki K, Miyagi T, Yoshida M, Miyata T, Ogawa M, Aizawa S, Suda Y (2002) Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in Emx1/2 double mutant cerebral cortex. *Development* 129:3479–3492. [Medline](#)
- Soma M, Aizawa H, Ito Y, Maekawa M, Osumi N, Nakahira E, Okamoto H, Tanaka K, Yuasa S (2009) Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol* 513:113–128. [CrossRef Medline](#)
- Takiguchi-Hayashi K, Sekiguchi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y (2004) Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24:2286–2295. [CrossRef Medline](#)
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4:496–505. [CrossRef Medline](#)
- Tripodi M, Filosa A, Armentano M, Studer M (2004) The COUP-TF nuclear receptors regulate cell migration in the mammalian basal forebrain. *Development* 131:6119–6129. [CrossRef Medline](#)
- Valiente M, Marín O (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 20:68–78. [Medline](#)
- Villar-Cerviño V, Molano-Mazón M, Catchpole T, Valdeolmillos M, Henkemeyer M, Martínez LM, Borrell V, Marín O (2013) Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77:457–471. [CrossRef Medline](#)
- Vue TY, Bluske K, Alishahi A, Yang LL, Koyano-Nakagawa N, Novitsch B, Nakagawa Y (2009) Sonic hedgehog signaling controls thalamic progenitor identity and nuclei specification in mice. *J Neurosci* 29:4484–4497. [CrossRef Medline](#)
- Warr N, Powles-Glover N, Chappell A, Robson J, Norris D, Arkell RM (2008) Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Hum Mol Genet* 17:2986–2996. [CrossRef Medline](#)
- Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M (2003) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39:919–935. [CrossRef Medline](#)
- Yoshida M, Assimacopoulos S, Jones KR, Grove EA (2006) Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* 133:537–545. [CrossRef Medline](#)
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor Cxcr4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393:595–599. [CrossRef Medline](#)



En esta tesis doctoral demostramos que el factor de transcripción Zic2 es esencial para la correcta migración de tres poblaciones celulares prosencefálicas diferentes: dos poblaciones telencefálicas, las CCRs generadas en zonas discretas del palio y las células de la EAC producidas en el polo caudal del telencéfalo dorsal y una tercera población de neuronas diencefálicas, que migran desde la pared del tercer ventrículo hasta el NGLv pretalámico, que denominamos estría migratoria pretalámica. Mediante experimentos de inmunohistoquímica comprobamos que Zic2 se expresa en estas poblaciones neuronales y combinando el análisis anatómico celular con experimentos de video-microscopía vimos que la morfología de las células de estas poblaciones neuronales positivas para Zic2 estaba alterada en los ratones mutantes para esta proteína y que además no migraban correctamente desde sus lugares de origen hasta sus destinos finales. Hemos observado también, que en las células de la estría migratoria pretalámica la expresión del receptor EphB1 se encuentra disminuida en ratones con bajos niveles de Zic2 sugiriendo que la migración de ese tipo de neuronas podría estar mediada por la señalización EphB/efrinas B.

1. Zic2 en las neuronas telencefálicas

Para empezar a investigar un posible papel de Zic2 en migración aislamos el HC de ratones mutantes para Zic2 y ratones control y los cultivamos para analizar el número de células que migran desde los explantes. Estos ensayos *in vitro* mostraron un menor número de CCRs migrando en los ratones mutantes para Zic2 que en los explantes control. Una posible explicación para este fenómeno podría ser que hubiera un menor número de CCRs en el HC de los explantes mutantes que en los controles, pero

también es posible que los defectos migratorios de las CCRs les impidieran salir del explante o que quedaran adheridas a éste. Nuestros resultados favorecían la segunda opción por varios motivos: 1) El análisis de las vesículas telencefálicas no mostró diferencias en cuanto a la abundancia de CCRs entre embriones mutantes y controles, 2) En los mutantes de *Zic2* observamos un mayor número de células adheridas al explante que en los controles, sugiriendo que los defectos observados en la migración de las CCRs les impedirían dejar el explante para distribuirse por toda la placa. Por otra parte, los experimentos de video-microscopía también indicaron un defecto en la migración ya que en ratones control las CCRs se dispersaban normalmente pero en los mutantes parecían adherirse entre ellas. Un resultado que además era similar a la formación de agregados celulares observados en las vesículas telencefálicas de los mutantes.

Como hemos visto en la introducción, las CCRs son las mayores productoras de Relina y esta proteína ejerce un papel crucial en la migración radial de los progenitores neuronales corticales. Los ratones con mutaciones para la Relina o proteínas asociadas a la señalización mediada por Relina presentan un orden alterado de las capas corticales (fenotipo "*reeler*") (Caviness, 1982; D'Arcangelo et al., 1999; Gao and Godbout, 2013; Hoffarth et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Rice and Curran, 2001). Un trabajo reciente había descrito que los mutantes para distintas proteínas *Zic* muestran anomalías en la laminación cortical (Inoue et al., 2008; Murillo et al., 2015). Nosotros hemos confirmado estos defectos en la laminación cortical de los ratones mutantes para *Zic2* observando que su corteza cerebral es irregular, con la aparición de células ectópicas, que en los fenotipos más acusados, se convierten en protrusiones que

atraviesan la ZM. Estos defectos son similares a los encontrados en la lisecefalia tipo II en humanos. En el trabajo en el que por primera vez se describe este fenotipo en los ratones mutantes para *Zic2* (Inoue et al., 2008), estas anomalías se atribuyen a la disminución de *Zic2* en las células de las meninges ya que este factor de transcripción, además de expresarse en las CCRs también se detecta en las células meningeas, que juegan un papel muy relevante en la migración de las CCRs (Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006). Sin embargo, tanto en nuestros experimentos de video-microscopía en las vesículas telencefálicas completas, como en los ensayos *in vitro* usando explantes del HC, diseccionamos las meninges lo que sugiere que *Zic2* tiene un papel intrínseco en las CCRs. No podemos descartar que además *Zic2* intervenga en la biología de las meninges y que los defectos corticales observados en los mutantes puedan ser fruto de su función en las células meningeas. La GR extiende largos procesos desde la ZV/ZSV donde se encuentran sus somas hasta la membrana basal (MB). La parte final de esos procesos se ancla en la MB, generándose el andamiaje de GR necesario para la migración radial de las neuronas piramidales. En dobles mutantes para *Zic1* y *Zic3* se ha observado una alteración de la proliferación de los fibroblastos de las meninges que modifica la formación de la MB. La MB defectuosa altera la estructura de los extremos finales de la GR y este fallo en el anclaje de la GR, podría ser el motivo al menos en parte, de los defectos corticales observados en estos mutantes. En el caso de los mutantes de *Zic2*, estos cambios en la MB y la GR no están claros (Inoue et al., 2008) y un análisis detallado de la GR cortical y de las células meningeas en estos ratones hubiera sido adecuado para investigar la contribución de *Zic2* en estas células.

Además, en el trabajo desarrollado por Inoue et al., 2008 se muestra mediante hibridación *in situ* que Zic2 se expresa débilmente en la ZV y la ZSV. En estas capas se encuentran los progenitores neuronales, y a partir de ellos se producen los diferentes tipos de neuronas piramidales que poblarán la corteza cerebral (Florio and Huttner, 2014; LaMonica et al., 2012; Merot et al., 2009; Tiberi et al., 2012). Es posible, por tanto, que las anomalías corticales descritas en estos mutantes en lugar de deberse a las alteraciones en la migración de las CCRs o a defectos en las células meningeas sean consecuencia de defectos de migración en los progenitores de la ZV y ZSV producidos por la falta de función de Zic2.

Durante la realización de este trabajo también observamos que Zic2 se expresa en el plexo coroideo, una estructura que se ha propuesto recientemente como fuente de CCRs (Imayoshi et al., 2008; Meyer, 2010). Por tanto, también es posible que parte de las CCRs Zic2 positivas que encontramos en la ZM puedan tener un origen coroideo. El ratón transgénico Tg(Zic2^{EGFP}) podría ser una buena herramienta para determinar si realmente se produce migración de CCRs desde el plexo coroideo.

EphA4 y EphB1 son dos receptores tirosina quinasa que responden a los ligandos efrina B2 y efrina B3 para mediar repulsión (Escalante et al., 2013; Garcia-Frigola et al., 2008; Williams et al., 2003). EphB1 es un efector de Zic2 en el Sistema Visual (García-Frigola et al., 2008) mientras que EphA4 es regulado por este factor de transcripción en las neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal (Escalante et al., 2013). Se sabe que la distribución de las CCRs en la superficie cortical esta mediada por la señalización EphB/efrinas: los mutantes EphB1/B2/B3 presentan

una reordenación anormal de las CCRs debido a que se altera la inhibición por contacto necesaria para la correcta dispersión de las CCRs y las células no pueden repelerse unas a otras (Villar-Cervino et al., 2013) lo que conlleva la formación de agregados celulares *in vivo* e *in vitro*. Este fenotipo es similar al que encontramos en los mutantes de Zic2 donde hallamos agregados de CCRs en las vesículas telencefálicas. Esto nos sugirió que Zic2 podría estar controlando la expresión de los receptores EphB al igual que en las neuronas ipsilaterales. Sin embargo, dado que en la médula espinal Zic2 regula EphA4 (Escalante et al., 2013) habría que analizar también la expresión de EphA4 en las CCRs y, en el caso de que haya expresión, compararla con los mutantes de Zic2, ya que EphA4 podría estar mediando también repulsión en las CCRs. Igualmente, también cabe esperar que Zic2 controle alguno de estos receptores (o los dos) en las células de la EAC y sería interesante comparar su expresión con la de los mutantes de Zic2. De hecho, en el *brain atlas* (ver http://developingmouse.brain-map.org/experiment/siv?id_100053200 [imageId_101048978&initImage_ish](http://developingmouse.brain-map.org/experiment/siv?id_100053200)) podemos observar que EphB1 se expresa en lo que parece ser la zona de la EAC.

Además de la señalización mediada por Eph/efrinas otras vías de señalización parecen ser esenciales para la migración tangencial de las CCRs:

- 1) La vía de señalización de la quimioquina Cxcl12 secretada por las meninges y su receptor Cxcr4, expresado por las CCRs derivadas del HC, es crucial para que las CCRs se mantengan en la ZM (Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006). Los mutantes de Zic2 tienen reducida la expresión tanto de Cxcl12 como de Cxcr4 (Inoue et al., 2008) y los mutantes de Cxcr4 muestran células Relina positivas en capas más profundas que la ZM (Borrell and Marin, 2006), un fenotipo similar al que encontramos

en los mutantes de Zic2. A la vista de estas observaciones habría que investigar si Zic2 juega algún papel en la señalización mediada por Cxcl12/Cxcr4.

2) La señalización mediada por Sema3E/Plxnd1 también está involucrada en la migración tangencial de las CCRs. El bloqueo de la señalización Sema3E/Plxnd1 aumenta la migración de las CCRs por lo que Sema3E parece ser un regulador negativo de la migración de las CCRs generadas en el HC. Además, esta regulación negativa dependiente de Sema3E/Plxnd1 parece implicar efectos negativos en la señalización mediada por Cxcl12/Cxcr4, acompañados por un aumento de la fosforilación de la Cofilina (Bribian et al., 2014). Se sabe que un aumento en la fosforilación de la Cofilina reduce el número de extremos libres para iniciar la polimerización de la Actina necesaria para la producción de las protrusiones requeridas para una correcta migración. De hecho, imágenes de video-microscopía *in vitro* han demostrado que las CCRs incubadas con Sema3E-AP reducen su arborización (Bribian et al., 2014). En nuestros experimentos, los mutantes de Zic2 presentan el fenotipo contrario, un aumento en la arborización de las CCRs, lo que sugiere que Zic2 podría regular negativamente la señalización mediada por Sema3E/Plxnd1. De nuevo, sería necesario comprobar la expresión de estas moléculas y cuantificar los niveles de p-Cofilina en los mutantes de Zic2.

2. Zic2 en las neuronas diencefálicas

Diversos estudios habían sugerido la movilización de una población celular con origen en el tercer ventrículo hasta el NGLv que migra entre el tálamo/pretálamo (Golding et al., 2014; Kitamura et al., 1997). Además, se había propuesto que al menos parte de

estas células migratorias eran positivas para Otx2 (Golding et al., 2014). Sin embargo, la existencia de esta migración no había sido realmente demostrada. Nosotros, utilizando experimentos de video-microscopía, observamos una estría de células positivas para Zic2 y Otx2 localizadas en el pretálamo que migran desde la pared del tercer ventrículo lateralmente hasta el NGLv.

A simple vista las células Zic2 positivas de la estría migratoria pretalámica parecían estar localizadas en la frontera entre el tálamo y el pretálamo, en lo que se conoce como zona limitante intratálámica (ZLI). Sin embargo, utilizando Shh como marcador de la ZLI (datos no mostrados en Murillo et al., 2015), observamos que en estadios tempranos del desarrollo (E12.5) las células Zic2 de esta estría migratoria se sitúan rostralmente a la ZLI y por lo tanto tienen una localización pretalámica.

También observamos que los mutantes para Zic2 presentan un menor número de células BrdU positivas en el NGLv que los controles debido, al menos en parte, a un defecto en la migración de células Zic2 positivas en la estría migratoria pretalámica. Por tanto, nuestros resultados no sólo verifican la existencia de una migración de interneuronas desde el ventrículo hasta el NGLv sino que nos han permitido identificar algunos de los componentes esenciales para la migración de estas neuronas y para la formación del NGLv.

Se ha propuesto que algunas de las interneuronas Otx2 que migran por la estría migratoria pretalámica desde el tercer ventrículo hasta el NGLv en estadios prenatales, migran hasta el NGL dorsal en estadios postnatales en una segunda ola de migración (Golding et al., 2014). Hemos observado que la mayoría de las neuronas Otx2 positivas que migran en la estría migratoria pretalámica son a su vez positivas para Zic2. Sin

embargo, en estadios postnatales no encontramos células Zic2 positivas en el NGL dorsal, por lo que la migración postnatal de estas interneuronas parece ser independiente de Zic2.

En la estría migratoria pretalámica el receptor EphB1 se expresa en la misma zona que Zic2 lo que sugería que Zic2 podría regular la expresión de EphB1 también en estas células. De hecho, en los mutantes de Zic2, la expresión de EphB1 está significativamente disminuida. Interesantemente, la suma de las expresiones de efrina B2 y efrina B3 delinea un patrón complementario a la expresión de EphB1 en la frontera tálamo/pretálamo, por lo que es probable que la repulsión mediada por EphB/efrinas esté implicada en la canalización de las interneuronas en la estría migratoria pretalámica.

3. ¿Está Zic2 implicado en migración radial o tangencial?

Las interneuronas Zic2, que migran por la estría migratoria pretalámica, están asociadas a los haces de GR RC2 positivos. Esto, unido a que estas células viajan desde el tercer ventrículo lateralmente hasta el manto, sugiere que migran radialmente. En cambio, las CCRs Zic2 positivas migran tangencialmente desde puntos concretos del palio hasta la ZM telencefálica. A pesar de las diferencias en las rutas de migración y al hecho de que la mayoría de las neuronas piramidales utilicen como sustrato la GR durante parte de su migración mientras que las interneuronas tangenciales sean independientes de dicho soporte (Marin, 2013; Marin et al., 2010; Merot et al., 2009; Rakic, 2007), estudios recientes han sugerido que la mayoría de los procesos migratorios, incluida la migración tangencial de las CCRs, comparten mecanismos

moleculares similares (Marin et al., 2006; Marin et al., 2010). Por tanto, no es sorprendente la implicación del factor de transcripción Zic2 en ambos tipos de migración probablemente actuando como regulador de las mismas moléculas de guía en los dos modos de migración (receptores Eph entre otros), aunque en cada tipo neuronal el comportamiento celular sea diferente dependiendo del contexto. En el caso de la estría migratoria pretalámica, el patrón de expresión de los ligandos de EphB1, efrina B3 y efrina B2 definiría un pasillo por el que migran las interneuronas Zic2/EphB1 lo que sugiere que la repulsión mediada por EphB/efrinas B podría estar delineando la trayectoria de estas células desde el ventrículo al NGLv. En cambio, en las CCRs, Zic2 probablemente regula las EphBs para mediar la repulsión por contacto (Villar-Cervino et al., 2013) que determina la dispersión de estas células por la corteza cerebral.

4. Zic2 en holoprosencefalia y otras patologías del desarrollo

Mutaciones en Zic2 generan una variedad de fenotipos en humanos y otras especies que incluyen defectos en la morfogénesis de la gástrula, HPE tipo IV, espina bífida, anomalías en el desarrollo del cerebelo, defectos en la formación de la cresta neural y esquizofrenia (Aruga et al., 2002b; Brown et al., 2001; Elms et al., 2003; Hatayama et al., 2011). A pesar de las consecuencias negativas que conlleva la expresión aberrante de Zic2, su función precisa en los estadios tempranos del desarrollo no había sido descrita con detalle.

Los estudios previos habían descrito una modesta disminución en el número de células BrdU positivas en el pretálamo de peces cebra con niveles reducidos de Zic2

(Sanek and Grinblat, 2008). Sin embargo, trabajos posteriores en diferentes modelos animales, incluido nuestro artículo, evidencian que las alteraciones en proliferación o muerte celular no explican completamente los distintos fenotipos encontrados en los mutantes de *Zic2* (Elms et al., 2003; Sanek and Grinblat, 2008). Por otra parte, los mutantes de *Zic2* exhiben una reducción en el número de células de la cresta neural durante el desarrollo temprano (Elms et al., 2003), pero en este artículo no investigaban si esta disminución celular deriva de defectos en la proliferación, en la migración o en ambos procesos.

Por otra parte, los mutantes de *Zic2* también muestran defectos en el desarrollo del cerebelo (Aruga et al., 2002a) y se ha descrito que la quimioquina *Cxcl12* es un fuerte quimioatrayente para las células del labio rómbico del cerebelo y previene la migración de las células granulares prematuras positivas para *Cxcr4* fuera de la capa externa granular (Zou et al., 1998). *Cxcr4* se expresa en las CCRs y es esencial para su migración en la corteza cerebral donde se expresa *Cxcl12* en las células de las meninges (Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006) y se ha visto que la expresión de *Cxcr4* se encuentra fuertemente reprimida en los mutantes de *Zic2* (Inoue et al., 2008). Además, análisis realizados en las neuronas postmitóticas positivas para *Zic2* en las astas dorsales de la médula espinal, donde *Zic2* es regulado negativamente mediante ARN de interferencia, muestran células mal posicionadas en el asta dorsal (Escalante et al., 2013), sugiriendo defectos de migración en estas células con bajos niveles de *Zic2*. Por tanto, es probable que *Zic2* no sólo ejerza un papel en la migración de poblaciones neuronales prosencefálicas sino también en neuronas de otras regiones del SNC en desarrollo.

En los mutantes de *Zic2* las células de la EAC migran aberrantemente. En condiciones normales estas células van a formar parte de la amígdala adulta, por lo que defectos en la expresión de *Zic2* podrían dar lugar a problemas de carácter cognitivo y de comportamiento emocional, que son las funciones principales de la amígdala (Swanson and Petrovich, 1998). Por otro lado, en los mutantes de *Zic2* se produce una migración aberrante de las células de la estría migratoria pretalámica, lo que provoca una disminución de estas células en el NGLv. Este núcleo tiene un papel importante en la regulación de los ritmos circadianos y en diversos procesos visuales (Harrington, 1997) por lo que el individuo adulto con bajos niveles de *Zic2* podría tener problemas en la regulación de los ciclos vigilia-sueño y anomalías visuales.

En resumen, la mayoría de las anomalías morfológicas observadas en los ratones mutantes para *Zic2* pueden ser reinterpretadas en función de los resultados presentados en esta tesis en los que atribuimos un papel muy relevante para *Zic2* en la migración celular de diversos tipos neuronales. Tanto la reducción de las células de la cresta neural en los tejidos mesenquimáticos, como los defectos en el desarrollo cerebelar observados en los mutantes de *Zic2*, podrían explicarse por defectos en migración durante el desarrollo temprano de estos tipos celulares. En este sentido, los ratones heterocigotos para *Zic2* presentan un fenotipo de esquizofrenia (Hatayama et al., 2011) y es posible que las características esquizofrénicas observadas en estos ratones sean consecuencia de fallos en la migración de las CCRs y/o de los progenitores corticales, como ha sido descrito para otros genes involucrados en migración de progenitores neuronales (Valiente and Marin, 2010). En cuanto al fenotipo de holoprosencefalia, el ARN mensajero de *Zic2* ha sido detectado en las

células de la placa precordal que son unas células especializadas que migran rostralmente durante estadios mediales de la gastrulación y que son indispensables para la morfogénesis de la línea media del prosencéfalo (Warr et al., 2008). En gástrulas de ratones mutantes para *Zic2* no se ha encontrado un incremento en la apoptosis o alteraciones de la proliferación (Elms et al., 2003; Merzdorf, 2007; Warr et al., 2008) por lo que es también probable que las células mutantes de la placa precordal sufran defectos en la migración durante la gastrulación y que esas alteraciones den lugar a un fallo en la división de las vesículas telencefálicas provocando el fenotipo de HPE.





CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción Zic2 se expresa en al menos tres poblaciones prosencefálicas durante el desarrollo embrionario temprano: las células de Cajal-Retzius, las células de la estría amigdaloides caudal y las células de la estría migratoria pretalámica.
2. La expresión de Zic2 es esencial para la correcta migración de estos tres tipos de neuronas y por tanto para alcanzar sus destinos finales.
3. El receptor EphB1 se expresa en las células de la estría migratoria pretalámica durante su migración al NGLv.
4. Efrinas B2/B3 se expresan de manera complementaria a EphB1 en el tálamo y el pretálamo creando un pasillo permisivo para las células EphB1.
5. Zic2 es necesario para la expresión del receptor EphB1 en las células de la estría migratoria pretalámica y por tanto para que se produzca una correcta señalización repulsiva (probablemente mediada por efrinas B) que mantenga a estas células dentro del pasillo permisivo delimitado por las efrinas B.
6. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Zic2 regula la expresión de los receptores Eph en los distintos tipos de neuronas migratorias en las que se expresa, contribuyendo a su correcto posicionamiento durante el desarrollo embrionario.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

La línea Tg(Zic2^{EGFP})HT146Gsat/Mmcd (número de identificación RP23-158G6) fue generada por GENSAT (Gong et al., 2003) y obtenida del *Mutant Mouse Regional Center* (<http://www.mmrrc.org/strains/17260/017260.html>). La línea hipomórfica Zic2^{kd}(Zic2^{tm1Jarv}) fue obtenida del depósito RIKEN (Japón). Los ratones transgénicos Tg(Zic2^{EGFP}) se cruzaron con ratones heterocigotos para Zic2 (Zic2^{kd/+}) y la progenie F1 resultante se cruzó [(Zic2^{kd/+});Tg(Zic2^{EGFP}) x (Zic2^{kd/+});Tg(Zic2^{EGFP})] para generar embriones [(Zic2^{+/+});Tg(Zic2^{EGFP})] y [(Zic2^{kd/kd});Tg(Zic2^{EGFP})] dentro de la misma camada. Estas líneas de ratones nos permitían visualizar por fluorescencia GFP, las células Zic2 en los embriones control y las células carentes de Zic2 (o con muy bajos niveles de Zic2) en los embriones mutantes. Todas las líneas de ratones fueron mantenidas en un fondo genético C57BL/6 y conservadas hasta el estado embrionario adecuado en el animalario del Instituto de Neurociencias. Los protocolos usados con los animales fueron aprobados por el comité de bienestar animal del Instituto de Neurociencias siguiendo las regulaciones españolas y europeas.

2. Inmunohistoquímica, inyecciones de BrdU e hibridación *in situ*

Para la inmunohistoquímica, los embriones se fijaron toda la noche a 4°C en PFA/PBS al 4%, se lavaron con PBS y se cortaron en el vibratomo (secciones de 70 µm) o en el criostato (secciones de 20 µm). Las secciones se bloquearon en gelatina porcina 0.02%/PBT (0.25%-criostato - 0.75%-vibratomo-Triton X 100/PBS) y se incubaron con el anticuerpo primario adecuado. Los anticuerpos primarios usados en esta tesis son los siguientes: GFP 1/2000 (Aves Lab), ARX 1:500 (Santa Cruz), Tuj1 1/1000 (Covance), RC2

1/100 (Developmental Studies Hybridoma Bank), OTX2 1/500 (Milipore), BrdU 1/1000 (Abcam), Relina-G10 1/2000 (cedido por André Goffinet), Calretinina 1/1000 (Swant), Cofilina 1/2000 (AbCam), Tbr1 1/1000 (AbCam), Zic2 1/5000 (anticuerpo elaborado en el laboratorio tal y como se describe en Brown et al., 2003), COUP/TF2 1/500 (cedido por Michèle Studer), Caspasa 3 1/500 (Cell Signaling Technology) y Trb2 1/500 (Milipore). Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en PBT (0.25%-criostato - 0.75%-vibratomo-Triton X 100/PBS) con el anticuerpo secundario apropiado conjugado a Alexa (Invitrogen). Seguidamente, las rodajas se contrastaron con DAPI.

Para los experimentos con BrdU, una única inyección de 50mg BrdU/Kg de peso corporal se administró intraperitonealmente en ratonas preñadas de estadios E10.5, E11.5, E12.5, E13.5. Los embriones se sacrificaron a E14.5. Posteriormente, las secciones de criostato (20µm) se pretrataron con HCl 2N y tampón borato 0,1M pH=8,3 para llevar a cabo la doble inmunohistoquímica Zic2/BrdU. Las secciones se contrastaron con DAPI. La intensidad de fluorescencia (IF) fue obtenida a partir de la colocación de ambos anticuerpos en las células pretalámicas usando el programa "ImageJ".

Para la cuantificación de las células BrdU en embriones controles y mutantes cuatro/cinco secciones anatómicamente comparables se analizaron por embrión. Se trazaron dos áreas cuadradas complementarias a lo largo de la estría migratoria pretalámica en cada sección. La IF se midió en el área próxima al ventrículo (área medial) y en el área que incluye el NGLv (área lateral) usando "ImageJ".

Para la hibridación *in situ* embriones de estadio de gestación E13.5 se fijaron toda la noche a 4°C en PFA/PBS al 4%, se lavaron con PBS y se cortaron en el vibratomo en secciones de 100 µm. Posteriormente, los cortes se montaron en portaobjetos y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, las secciones: 1) se lavaron dos veces con PBT (PBS + 0.1% Tween 20), 2) se blanquearon con PBT+ H₂O₂ 6% durante 1h, 3) se lavaron de nuevo tres veces con PBT, 4) se incubaron con PBT/proteinasa K 5µg/ml durante 7,5 minutos (tiempo adecuado para embriones de día de gestación E13.5), 5) se lavaron tres veces con PBT, 6) se postfijaron con PFA /PBT al 4% durante 20 minutos, 7) se incubaron con buffer de hibridación (Formamida 50%, 5x SSC pH 4,5, t-RNA 50 µg/ml, 1% SDS, Heparina 50 µg/ml) 60 min a 65°C, 8) se incubaron toda la noche a 65°C con 5-10 µg/ml de ribosonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada a 85°C en buffer de hibridación. Al día siguiente, la sonda se lavó con solución de lavado 1, 3 veces 20 minutos a 65°C (Formamida 50%, 5x SSC y SDS 1%) y después se lavó con solución de lavado 2, 3 veces 20 minutos a 60°C. (Formamida 50%, 2x SSC) posteriormente se lavaron las secciones con TBST (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tris-HCl pH7.5 25 mM, 1% de Tween 20) 3 veces 5 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con solución de bloqueo TBST + 10% de suero de oveja 60 minutos a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4°C con el anticuerpo antidigoxigenina 1:4000 (Roche) en TBST+ 1% de suero de oveja. Un día después, tras lavar el anticuerpo abundantemente con TBST, se reveló la reacción con NBT y BCIP en NTMT (NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM, Tris-HCl pH9.5 100mM, 1% de Tween 20). Tras el revelado las secciones se lavaron y montaron convenientemente.

Las sondas usadas EphB1, efrina B2 y efrina B3 se han descrito en Escalante et al., 2013 y Williams et al., 2003.

3. Preparación de las vesículas telencefálicas y cuantificación de la intensidad de fluorescencia

Se diseccionaron embriones [(Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{EGFP}))] y [(Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{EGFP}))] de día de gestación E12.5 y las vesículas telencefálicas se transfirieron a solución Krebs pH=7,2 (NaCl 126mM, KCl 2,5mM, NaH₂PO₄ 25mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, D-Glucose 10 mM). Se extrajeron las meninges y las vesículas se aplanaron practicando cuatro cortes en el área externa. Las vesículas aplanadas se fijaron posteriormente en PFA/PBS al 4% y se incubaron con anticuerpo anti-GFP. Tras la incubación con el anticuerpo secundario las vesículas se montaron y fotografiaron. Para la cuantificación, las vesículas aplanadas se incluyeron en un ROI rectangular. El ROI se dividió longitudinalmente en 11 columnas de 1040x60 píxeles, siendo la primera columna la más próxima al HC. Se calculó la IF media con “ImageJ” obteniendo un valor numérico para cada una de las 11 columnas que se compararon entre mutantes y controles.

4. Cultivos y análisis de CCRs en los explantes de “hem” cortical

Se diseccionaron embriones [(Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{EGFP}))] y [(Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{EGFP}))] de día de gestación E12.5 y sus cerebros se transfirieron a solución Krebs. Se extrajeron las meninges y los cerebros se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión para seccionarlos en rodajas de 250 µm como se describe previamente en Anderson et al., 1997. Las vibrosecciones se recolectaron en solución Krebs y las que contenían el HC se transfirieron a una membrana Track-Etched (Nucleopore), se incubaron durante una

hora en MEM y se transfirieron a medio Neurobasal durante media hora. La región del HC se diseccionó y se dejó en incubación durante 15 minutos más. Posteriormente, los explantes se depositaron en cubreobjetos de 12 mm (Poly-L-Lysine Cell-ware 12 mm round Coverslips-BD BioCoat) previamente tratados con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de laminina. Los explantes fueron entonces incubados con medio Neurobasal/0.4% metilcelulosa durante 30-40h. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y 5% de CO_2 . Utilizamos la herramienta "M-Track" de "ImageJ" para determinar la longitud de la neurita más larga (LN) y de la neurita más corta (SN). Para cuantificar la complejidad de la CCRs las neuritas se dividieron en dos grupos: 1) Neuritas de primer orden (1ONs), aquellas que crecen directamente desde el soma y 2) Neuritas de segundo orden (2ONs), aquellas que parten de las neuritas de primer orden. La cuantificación fue llevada a cabo en 4 ROIs/explante y en explantes de 6 embriones para cada genotipo.

El número de CCRs se cuantificó manualmente contando el total de células/explante. Se trazó un círculo alrededor del borde del explante y se dibujó un segundo círculo situado concéntricamente a 150 μm del primero para dividir la imagen en 2 áreas: la parte proximal cercana al explante y la parte distal lejana al explante. Tras cuantificar las células manualmente el porcentaje de células de cada área fue referido al total de células del explante.

La cantidad de células adheridas al explante se calculó delineando un área que abarcaba las células adheridas al explante y midiendo la IF usando "ImageJ". La IF fue normalizada al total del área del explante.

5. Experimentos de *time lapse* y rastreo celular

Se diseccionaron los cerebros de embriones [(Zic2^{+/+};Tg(Zic2^{EGFP}))] y [(Zic2^{kd/kd};Tg(Zic2^{EGFP}))] de día de gestación E12.5 para el análisis de las CCRs y de E13 .5 para el análisis de la estría migratoria pretalámica y se aplanaron las vesículas telencefálicas o bien se incluyeron en agarosa 4% de bajo punto de fusión para obtener secciones coronales de 250 μ m. Las vesículas telencefálicas o las secciones pretalámicas se cultivaron en membranas con MEM durante 45 minutos y posteriormente se incubaron con medio Neurobasal durante 30 minutos. Las células GFP positivas se registraron con un microscopio confocal de escáner espectral Leica (TCS SP2) usando un objetivo de corta distancia e inmersión en agua 20X. Se utilizó "ImageJ" para seguir las trayectorias celulares.

6. Análisis cuantitativos y estadísticos.

Todas las cuantificaciones fueron presentadas con el error estándar de la media: "*standard error of the mean*" (SEM). Y la significancia estadística media se fijó a $p < 0.05$. Para los resultados estadísticos se utilizó el test de la "*t de student*" y se representaron en las figuras como: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



REFERENCIAS

- Abellan, A., Menuet, A., Dehay, C., Medina, L., and Retaux, S. (2010). Differential expression of LIM-homeodomain factors in Cajal-Retzius cells of primates, rodents, and birds. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 20, 1788-1798.
- Alcantara, S., Pozas, E., Ibanez, C.F., and Soriano, E. (2006). BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 16, 487-499.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., and Soriano, E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 7779-7799.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science (New York, NY)* 278, 474-476.
- Andoniadou, C.L., and Martinez-Barbera, J.P. (2013). Developmental mechanisms directing early anterior forebrain specification in vertebrates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 3739-3752.
- Angevine, J.B., Jr., and Sidman, R.L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.
- Anton, E.S., Kreidberg, J.A., and Rakic, P. (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22, 277-289.
- Anton, E.S., Marchionni, M.A., Lee, K.F., and Rakic, P. (1997). Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)* 124, 3501-3510.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Aruga, J. (2004). The role of Zic genes in neural development. *Molecular and cellular neurosciences* 26, 205-221.
- Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J., and Mikoshiba, K. (2002a). Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 218-225.

Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S., and Mikoshiba, K. (2002b). Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Developmental biology* 244, 329-341.

Aruga, J., Yokota, N., Hashimoto, M., Furuichi, T., Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (1994). A novel zinc finger protein, zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *Journal of neurochemistry* 63, 1880-1890.

Aumais, J.P., Tunstead, J.R., McNeil, R.S., Schaar, B.T., McConnell, S.K., Lin, S.H., Clark, G.D., and Yu-Lee, L.Y. (2001). NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, RC187.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43.

Bartley, T.D., Hunt, R.W., Welcher, A.A., Boyle, W.J., Parker, V.P., Lindberg, R.A., Lu, H.S., Colombero, A.M., Elliott, R.L., Guthrie, B.A., *et al.* (1994). B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 368, 558-560.

Beccari, L., Marco-Ferrerres, R., and Bovolenta, P. (2013). The logic of gene regulatory networks in early vertebrate forebrain patterning. *Mechanisms of development* 130, 95-111.

Bellenchi, G.C., Gurniak, C.B., Perlas, E., Middei, S., Ammassari-Teule, M., and Witke, W. (2007). N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes & development* 21, 2347-2357.

Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M., and Metin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 5691-5699.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature neuroscience* 8, 1002-1012.

Borrell, V., and Marin, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nature neuroscience* 9, 1284-1293.

Bribian, A., Nocentini, S., Llorens, F., Gil, V., Mire, E., Reginensi, D., Yoshida, Y., Mann, F., and del Rio, J.A. (2014). Sema3E/PlexinD1 regulates the migration of hem-derived Cajal-Retzius cells in developing cerebral cortex. *Nature communications* 5, 4265.

- Brown, L.Y., Kottmann, A.H., and Brown, S. (2003). Immunolocalization of Zic2 expression in the developing mouse forebrain. *Gene expression patterns : GEP* 3, 361-367.
- Brown, L.Y., Odent, S., David, V., Blayau, M., Dubourg, C., Apacik, C., Delgado, M.A., Hall, B.D., Reynolds, J.F., Sommer, A., *et al.* (2001). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Human molecular genetics* 10, 791-796.
- Brown, S.A., Warburton, D., Brown, L.Y., Yu, C.Y., Roeder, E.R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R.C., and Muenke, M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nature genetics* 20, 180-183.
- Cajal SR (1891) Sur la structure de lecorce cerebrale de quelques mammiferes. *Cellule* 7:123–176.
- Caviness, V.S., Jr. (1976). Patterns of cell and fiber distribution in the neocortex of the reeler mutant mouse. *The Journal of comparative neurology* 170, 435-447.
- Caviness, V.S., Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain research* 256, 293-302.
- Ceci, M.L., Pedraza, M., and de Carlos, J.A. (2012). The embryonic septum and ventral pallium, new sources of olfactory cortex cells. *PloS one* 7, e44716.
- Cina, C., Maass, K., Theis, M., Willecke, K., Bechberger, J.F., and Naus, C.C. (2009). Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 2009-2021.
- Cooper, J.A. (2013). Cell biology in neuroscience: mechanisms of cell migration in the nervous system. *The Journal of cell biology* 202, 725-734.
- Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H.H., and Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 288-299.
- Chan, C.H., Godinho, L.N., Thomaidou, D., Tan, S.S., Gulisano, M., and Parnavelas, J.G. (2001). Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 11, 1191-1198.
- Cheung, A.F., Pollen, A.A., Tavare, A., DeProto, J., and Molnar, Z. (2007). Comparative aspects of cortical neurogenesis in vertebrates. *Journal of anatomy* 211, 164-176.

Chiara, F., Badaloni, A., Croci, L., Yeh, M.L., Cariboni, A., Hoerder-Suabedissen, A., Consalez, G.G., Eickholt, B., Shimogori, T., Parnavelas, J.G., *et al.* (2012). Early B-cell factors 2 and 3 (EBF2/3) regulate early migration of Cajal-Retzius cells from the cortical hem. *Developmental biology* 365, 277-289.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479.

D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719-723.

Dawe, A.L., Caldwell, K.A., Harris, P.M., Morris, N.R., and Caldwell, G.A. (2001). Evolutionarily conserved nuclear migration genes required for early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Development genes and evolution* 211, 434-441.

del Rio, J.A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., and Soriano, E. (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 5, 13-21.

Dhavan, R., and Tsai, L.H. (2001). A decade of CDK5. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 749-759.

Egea, J., and Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in cell biology* 17, 230-238.

Elias, L.A., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901-907.

Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A., and Arkell, R. (2003). Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. *Developmental biology* 264, 391-406.

Escalante, A., Murillo, B., Morenilla-Palao, C., Klar, A., and Herrera, E. (2013). Zic2-dependent axon midline avoidance controls the formation of major ipsilateral tracts in the CNS. *Neuron* 80, 1392-1406.

Falconer, D.S., 1951. Two new mutants, trembler and 'reeler', with neurological actions in the house mouse. *J. Genet.* 1 50, 82-201.

Fietz, S.A., and Huttner, W.B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Current opinion in neurobiology* 21, 23-35.

Fishell, G., and Hatten, M.E. (1991). Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development (Cambridge, England)* 113, 755-765.

Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L., and Marin, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44, 251-261.

Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development (Cambridge, England)* 141, 2182-2194.

Folsom, T.D., and Fatemi, S.H. (2013). The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* 68, 122-135.

Forster, E. (2014). Reelin, neuronal polarity and process orientation of cortical neurons. *Neuroscience* 269, 102-111.

Forster, E., Bock, H.H., Herz, J., Chai, X., Frotscher, M., and Zhao, S. (2010). Emerging topics in Reelin function. *The European journal of neuroscience* 31, 1511-1518.

Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R., and Muller, U. (2011). Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron* 69, 482-497.

Franco, S.J., and Muller, U. (2013). Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19-34.

Gao, Z., and Godbout, R. (2013). Reelin-Disabled-1 signaling in neuronal migration: splicing takes the stage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 2319-2329.

Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Mason, C., and Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development (Cambridge, England)* 135, 1833-1841.

Garcia-Moreno, F., Lopez-Mascaraque, L., and De Carlos, J.A. (2007). Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *The Journal of comparative neurology* 500, 419-432.

Gil, V., Nocentini, S., and Del Rio, J.A. (2014). Historical first descriptions of Cajal-Retzius cells: from pioneer studies to current knowledge. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 32.

Golding, B., Pouchelon, G., Bellone, C., Murthy, S., Di Nardo, A.A., Govindan, S., Ogawa, M., Shimogori, T., Luscher, C., Dayer, A., *et al.* (2014). Retinal input directs the recruitment of inhibitory interneurons into thalamic visual circuits. *Neuron* 81, 1057-1069.

Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., *et al.* (2003). A gene expression atlas of the

central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* *425*, 917-925.

Griveau, A., Borello, U., Causeret, F., Tissir, F., Boggetto, N., Karaz, S., and Pierani, A. (2010). A novel role for Dbx1-derived Cajal-Retzius cells in early regionalization of the cerebral cortical neuroepithelium. *PLoS biology* *8*, e1000440.

Grove, E.A., Tole, S., Limon, J., Yip, L., and Ragsdale, C.W. (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development (Cambridge, England)* *125*, 2315-2325.

Guo, J., Yang, Z., Song, W., Chen, Q., Wang, F., Zhang, Q., and Zhu, X. (2006). Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Molecular biology of the cell* *17*, 680-689.

Gupta, A., Tsai, L.H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature reviews Genetics* *3*, 342-355.

Harrington, M.E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neuroscience and biobehavioral reviews* *21*, 705-727.

Hartmann, D., De Strooper, B., and Saftig, P. (1999). Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Current biology : CB* *9*, 719-727.

Hatayama, M., Ishiguro, A., Iwayama, Y., Takashima, N., Sakoori, K., Toyota, T., Nozaki, Y., Odaka, Y.S., Yamada, K., Yoshikawa, T., *et al.* (2011). Zic2 hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and ZIC2 mutations identified in schizophrenia patients. *Scientific reports* *1*, 16.

Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., and Mason, C.A. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* *114*, 545-557.

Hevner, R.F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R.A., and Fink, A. (2003). Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain research Developmental brain research* *141*, 39-53.

Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* *24*, 481-489.

Higginbotham, H.R., and Gleeson, J.G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends in neurosciences* 30, 276-283.

Hippenmeyer, S. (2014). Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Advances in experimental medicine and biology* 800, 1-24.

Hoffarth, R.M., Johnston, J.G., Krushel, L.A., and van der Kooy, D. (1995). The mouse mutation *reeler* causes increased adhesion within a subpopulation of early postmitotic cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 4838-4850.

Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse *disabled-1*. *Nature* 389, 733-737.

Huang, Z. (2009). Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Molecular and cellular neurosciences* 42, 11-22.

Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). *Hes* genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development (Cambridge, England)* 135, 2531-2541.

Inoue, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., and Aruga, J. (2008). *Zic* deficiency in the cortical marginal zone and meninges results in cortical lamination defects resembling those in type II lissencephaly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 4712-4725.

Itoh, Y., Moriyama, Y., Hasegawa, T., Endo, T.A., Toyoda, T., and Gotoh, Y. (2013). Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nature neuroscience* 16, 416-425.

Jossin, Y., and Cooper, J.A. (2011). *Reelin*, *Rap1* and *N-cadherin* orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nature neuroscience* 14, 697-703.

Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron* 87, 492-506.

Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.P., Tuy, F.P., Alvarez, C., Houbon, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Metin, C., *et al.* (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Human molecular genetics* 15, 1387-1400.

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2006). *Cdk5* phosphorylates and stabilizes *p27kip1* contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature cell biology* 8, 17-26.

Kirschuk, S., Luhmann, H.J., and Kilb, W. (2014). Cajal-Retzius cells: update on structural and functional properties of these mystic neurons that bridged the 20th century. *Neuroscience* 275, 33-46.

Kitamura, K., Miura, H., Yanazawa, M., Miyashita, T., and Kato, K. (1997). Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mechanisms of development* 67, 83-96.

Klein, R. (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development (Cambridge, England)* 139, 4105-4109.

Kojima, T., Nakajima, K., and Mikoshiba, K. (2000). The disabled 1 gene is disrupted by a replacement with L1 fragment in yotari mice. *Brain research Molecular brain research* 75, 121-127.

Konno, D., Yoshimura, S., Hori, K., Maruoka, H., and Sobue, K. (2005). Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 280, 5082-5088.

Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in neurosciences* 27, 392-399.

Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., and Cooper, J.A. (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 8578-8586.

LaMonica, B.E., Lui, J.H., Wang, X., and Kriegstein, A.R. (2012). OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Current opinion in neurobiology* 22, 747-753.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.

Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 7881-7888.

Li, J., Lee, W.L., and Cooper, J.A. (2005). NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. *Nature cell biology* 7, 686-690.

Lim, Y., and Golden, J.A. (2007). Patterning the developing diencephalon. *Brain research reviews* 53, 17-26.

- Lisabeth, E.M., Falivelli, G., and Pasquale, E.B. (2013). Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Lopez-Bendito, G., Sanchez-Alcaniz, J.A., Pla, R., Borrell, V., Pico, E., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2008). Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1613-1624.
- Margolin, G., Gregoret, I.V., Cickovski, T.M., Li, C., Shi, W., Alber, M.S., and Goodson, H.V. (2012). The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model. *Molecular biology of the cell* 23, 642-656.
- Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chedotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 442, 130-155.
- Marin-Padilla, M. (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends in neurosciences* 21, 64-71.
- Marin, O. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *The European journal of neuroscience* 38, 2019-2029.
- Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature reviews Neuroscience* 2, 780-790.
- Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience* 26, 441-483.
- Marin, O., Valdeolmillos, M., and Moya, F. (2006). Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends in neurosciences* 29, 655-661.
- Marin, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001834.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science (New York, NY)* 293, 872-875.
- Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development (Cambridge, England)* 136, 41-50.

Merot, Y., Retaux, S., and Heng, J.I. (2009). Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 726-734.

Merzdorf, C.S. (2007). Emerging roles for zic genes in early development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 922-940.

Mesngon, M.T., Tarricone, C., Hebbar, S., Guillotte, A.M., Schmitt, E.W., Lanier, L., Musacchio, A., King, S.J., and Smith, D.S. (2006). Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 2132-2139.

Meyer, G. (2010). Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem. *Journal of anatomy* 217, 334-343.

Meyer, G., Cabrera Socorro, A., Perez Garcia, C.G., Martinez Millan, L., Walker, N., and Caput, D. (2004). Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 9878-9887.

Meyer, G., Goffinet, A.M., and Fairen, A. (1999). What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 9, 765-775.

Meyer, G., Perez-Garcia, C.G., Abraham, H., and Caput, D. (2002). Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 4973-4986.

Miquelajauregui, A., Varela-Echavarria, A., Ceci, M.L., Garcia-Moreno, F., Ricano, I., Hoang, K., Frade-Perez, D., Portera-Cailliau, C., Tamariz, E., De Carlos, J.A., *et al.* (2010). LIM-homeobox gene Lhx5 is required for normal development of Cajal-Retzius cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 10551-10562.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews Neuroscience* 8, 427-437.

Murillo, B., Ruiz-Reig, N., Herrera, M., Fairen, A., and Herrera, E. (2015). Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 11266-11280.

- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature neuroscience* 4, 143-150.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature reviews Neuroscience* 3, 423-432.
- Nagai, T., Aruga, J., Minowa, O., Sugimoto, T., Ohno, Y., Noda, T., and Mikoshiba, K. (2000). Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1618-1623.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K., and Mikoshiba, K. (1997). The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Developmental biology* 182, 299-313.
- Nasrallah, I.M., McManus, M.F., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J.A. (2006). Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in Lis1+/- mice. *The Journal of comparative neurology* 496, 847-858.
- Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., and Tsai, L.H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395, 194-198.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagy, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912.
- Paredes, M.F., Li, G., Berger, O., Baraban, S.C., and Pleasure, S.J. (2006). Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 9404-9412.
- Park, T.J., and Curran, T. (2008). Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 13551-13562.
- Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 462-475.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., and Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development (Cambridge, England)* 129, 3147-3160.

Pozas, E., and Ibanez, C.F. (2005). GDNF and GFR α 1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* 45, 701-713.

Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in neurosciences* 26, 469-476.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *The Journal of comparative neurology* 145, 61-83.

Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia* 46, 882-891.

Rakic, P. (2007). The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain research reviews* 55, 204-219.

Reillo, I., and Borrell, V. (2012). Germinal zones in the developing cerebral cortex of ferret: ontogeny, cell cycle kinetics, and diversity of progenitors. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 22, 2039-2054.

Retzius G (1893) Die Cajal'schen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biologische Untersuchungen* 5:1-8.

Rice, D.S., and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual review of neuroscience* 24, 1005-1039.

Rice, D.S., Williams, R.W., and Goldowitz, D. (1995). Genetic control of retinal projections in inbred strains of albino mice. *The Journal of comparative neurology* 354, 459-469.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, NY)* 302, 1704-1709.

Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., and Ibanez, C.F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305-315.

Rivas, R.J., and Hatten, M.E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 981-989.

- Robertshaw, E., and Kiecker, C. (2012). Phylogenetic origins of brain organisers. *Scientifica* 2012, 475017.
- Roossien, D.H., Miller, K.E., and Gallo, G. (2015). Ciliobrevins as tools for studying dynein motor function. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 252.
- Sanek, N.A., and Grinblat, Y. (2008). A novel role for zebrafish *zic2a* during forebrain development. *Developmental biology* 317, 325-335.
- Sapir, T., Shmueli, A., Levy, T., Timm, T., Elbaum, M., Mandelkow, E.M., and Reiner, O. (2008). Antagonistic effects of doublecortin and MARK2/Par-1 in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 13008-13013.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28, 681-696.
- Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13652-13657.
- Schmid, R.S., Shelton, S., Stanco, A., Yokota, Y., Kreidberg, J.A., and Anton, E.S. (2004). $\alpha3\beta1$ integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development. *Development (Cambridge, England)* 131, 6023-6031.
- Schneider, S., Gulacsi, A., and Hatten, M.E. (2011). Lrp12/Mig13a reveals changing patterns of preplate neuronal polarity during corticogenesis that are absent in *reeler* mutant mice. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 21, 134-144.
- Scholpp, S., and Lumsden, A. (2010). Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends in neurosciences* 33, 373-380.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K., and Nakajima, K. (2011). The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 9426-9439.
- Sekine, K., Kubo, K., and Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neuroscience research* 86, 50-58.
- Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D., and Curran, T. (1997). Scrambler and *yotari*

disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* **389**, 730-733.

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* **44**, 263-277.

Siegenthaler, J.A., and Miller, M.W. (2008). Generation of Cajal-Retzius neurons in mouse forebrain is regulated by transforming growth factor beta-Fox signaling pathways. *Developmental biology* **313**, 35-46.

Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L.H. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nature cell biology* **2**, 767-775.

Soda, T., Nakashima, R., Watanabe, D., Nakajima, K., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2003). Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 6272-6279.

Soriano, E., and Del Rio, J.A. (2005). The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* **46**, 389-394.

Subramanian, L., Remedios, R., Shetty, A., and Tole, S. (2009). Signals from the edges: the cortical hem and antihem in telencephalic development. *Seminars in cell & developmental biology* **20**, 712-718

Super, H., Del Rio, J.A., Martinez, A., Perez-Sust, P., and Soriano, E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* **10**, 602-613.

Swanson, L.W., and Petrovich, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends in neurosciences* **21**, 323-331.

Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 9996-10001.

Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., and Tanabe, Y. (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 2286-2295.

- Tan, X., and Shi, S.H. (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. Wiley interdisciplinary reviews *Developmental biology* 2, 443-459.
- Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and van den Aemele, J. (2012). Cortical neurogenesis and morphogens: diversity of cues, sources and functions. *Current opinion in cell biology* 24, 269-276.
- Tissir, F., Ravni, A., Achouri, Y., Riethmacher, D., Meyer, G., and Goffinet, A.M. (2009). DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16871-16876.
- Tripodi, M., Filosa, A., Armentano, M., and Studer, M. (2004). The COUP-TF nuclear receptors regulate cell migration in the mammalian basal forebrain. *Development (Cambridge, England)* 131, 6119-6129.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701.
- Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383-388.
- Valiente, M., and Marin, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current opinion in neurobiology* 20, 68-78.
- Valverde, F., De Carlos, J.A., and Lopez-Mascaraque, L. (1995). Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 5, 483-493.
- Vallee, R.B., Seale, G.E., and Tsai, J.W. (2009). Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends in cell biology* 19, 347-355.
- Villar-Cervino, V., Molano-Mazon, M., Catchpole, T., Valdeolillos, M., Henkemeyer, M., Martinez, L.M., Borrell, V., and Marin, O. (2013). Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77, 457-471.
- Ward, M.E., Jiang, H., and Rao, Y. (2005). Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration. *Molecular and cellular neurosciences* 30, 378-387.
- Ware, M.L., Fox, J.W., Gonzalez, J.L., Davis, N.M., Lambert de Rouvroit, C., Russo, C.J., Chua, S.C., Jr., Goffinet, A.M., and Walsh, C.A. (1997). Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron* 19, 239-249.

Warr, N., Powles-Glover, N., Chappell, A., Robson, J., Norris, D., and Arkell, R.M. (2008). Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Human molecular genetics* 17, 2986-2996.

Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development (Cambridge, England)* 128, 3759-3771.

Wilkinson, D.G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature reviews Neuroscience* 2, 155-164.

Wilson, S.W., and Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Developmental cell* 6, 167-181.

Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., and Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39, 919-935.

Wykosky, J., Gibo, D.M., Stanton, C., and Debinski, W. (2005). EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme. *Molecular cancer research : MCR* 3, 541-551.

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114, 469-482.

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., *et al.* (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99-103.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809-812.

Yee, K.T., Simon, H.H., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24, 607-622.

Yoneshima, H., Nagata, E., Matsumoto, M., Yamada, M., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., and Mikoshiba, K. (1997). A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/reelin. *Neuroscience research* 29, 217-223.

Yoshida, M., Assimacopoulos, S., Jones, K.R., and Grove, E.A. (2006). Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development (Cambridge, England)* 133, 537-545.

Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23, 473-485.

Zimmer, C., Lee, J., Griveau, A., Arber, S., Pierani, A., Garel, S., and Guillemot, F. (2010). Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development (Cambridge, England)* 137, 293-302.

Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., and Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *The European journal of neuroscience* 28, 62-73.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.





MATERIAL SUPLEMENTARIO

Zic2-dependent axon midline avoidance controls the formation of major ipsilateral tracts in the CNS.

Escalante A, MurilloB, Morenilla-Palao C, Klar A and Herrera E

Neuron.2013 Dec 18;80(6):1392-406. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.007.

Zic2-Dependent Axon Midline Avoidance Controls the Formation of Major Ipsilateral Tracts in the CNS

Augusto Escalante,¹ Blanca Murillo,¹ Cruz Morenilla-Palao,¹ Avihu Klar,² and Eloísa Herrera^{1,*}

¹Instituto de Neurociencias de Alicante (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Miguel Hernández, CSIC-UMH), Campus San Juan, Av. Ramón y Cajal s/n, Alicante 03550, Spain

²Department of Medical Neurobiology, IMRIC, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem 91120, Israel

*Correspondence: e.herrera@umh.es

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.007>

SUMMARY

In bilaterally symmetric organisms, interhemispheric communication is essential for sensory processing and motor coordination. The mechanisms that govern axon midline crossing during development have been well studied, particularly at the spinal cord. However, the molecular program that determines axonal ipsilaterality remains poorly understood. Here, we demonstrate that ipsilateral neurons whose axons grow in close proximity to the midline, such as the ascending dorsospinal tracts and the rostromedial thalamocortical projection, avoid midline crossing because they transiently activate the transcription factor Zic2. In contrast, uncrossed neurons whose axons never approach the midline control axonal laterality by Zic2-independent mechanisms. Zic2 induces EphA4 expression in dorsospinal neurons to prevent midline crossing while Robo3 is downregulated to ensure that axons enter the dorsal tracts instead of growing ventrally. Together with previous reports, our data reveal a critical role for Zic2 as a determinant of axon midline avoidance in the CNS across species and pathways.

INTRODUCTION

The bilaterally symmetrical organization of the nervous system in vertebrates requires routes of communication between the two brain hemispheres. Contralateral (commissural or crossed) and ipsilateral (or uncrossed) tracts distribute sensory information coming from both sides of the body to integrate it in the main processing centers of the brain and generate coordinated motor responses (Burgess et al., 2009; Jen et al., 2004; Kullander et al., 2003; Sperry, 1982).

The mammalian visual system is a classic and particularly well-understood example of bilateral wiring. Optic nerve fibers from each eye segregate at the optic chiasm to either cross or avoid the midline, and this pattern of axonal divergence is critical for allowing binocular vision. Guidance molecules that partici-

pate in axonal navigation at the chiasmatic midline include Slit proteins and their receptors, the Robos (Erskine et al., 2000; Fricke et al., 2001; Hutson and Chien, 2002; Plump et al., 2002), vascular endothelial growth factor that interacts with the Neuropilin1 receptor (Erskine et al., 2011), and the tripartite molecular complex formed by Semaphorin 6D/NrCam and Plexin-A1 (Kuwajima et al., 2012; Williams et al., 2006). The repulsive response of the ipsilateral axons to the chiasm midline is mediated, at least in part, by the guidance receptor EphB1 and its ligand EphrinB2 (García-Frigola et al., 2008; Petros et al., 2009; Williams et al., 2003). In the spinal cord, another well-studied midline-crossing model, the signaling mediated by these molecules also modulates the responsiveness of commissural axons to midline cells in the floor plate (Brose et al., 1999; Chen et al., 2008; Nawabi et al., 2010; Ruiz de Almodovar et al., 2011; Wang et al., 1999), demonstrating that many of the guidance cues involved in axon midline navigation play analogous functions in different parts of the CNS.

Regarding the regulatory mechanisms that specify the crossed versus the uncrossed subpopulations, the LIM homeodomain transcription factor Islet2 (Isl2) has been associated with contralateral features in the retina (Pak et al., 2004), while the zinc finger transcription factor Zic2 is the major determinant of ipsilateral identity (Herrera et al., 2003). In the spinal cord, the generation, distribution, and specification of ipsilateral and contralateral-projecting neurons is not as obvious as in the retina. Spinal dorsal horn neurons are generated in two phases. In the early phase, six types of neurons are born, including relay neurons (dl1–dl3) that project to either ipsilateral or contralateral targets (Gross et al., 2002; Jessell, 2000; Müller et al., 2002). Late-born cells (dlL neurons), generated in a second round of differentiation, comprise inhibitory (dlL_A) and excitatory (dlL_B) cell types and will populate the superficial dorsal horns (Altman, 1984; Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). dlL_B neurons extend axons ipsilaterally within the dorsal fascicle (DF) and the dorsal-lateral fasciculus (DLF) to ascend longitudinally to the brain (Gross et al., 2001, 2002; Szentagothai, 1964). So far, only the Lim homeodomain transcription factors Lhx2/9, through the control of the Robo3 receptor, have been directly involved in axon midline crossing during spinal cord development (Ding et al., 2012; Wilson et al., 2008), and it is unclear whether Isl2 or Zic2, the factors determining axonal laterality in the visual system, are implicated in the bilateral spinal cord wiring.

Our knowledge of the regulatory mechanisms specifying the axonal laterality of thalamic neurons is equally limited. Thalamic nuclei symmetrically distributed at both sides of the midline receive sensory and motor information that is subsequently relayed to the ipsilateral cortex through the thalamocortical (TC) projections. However, the mechanism that directs midline avoidance and consequently the projection to the ipsilateral cortical hemisphere of TC neurons is still unknown.

In an attempt to clarify to what extent different bilateral pathways share regulatory mechanisms that govern axon midline decisions, we investigated the function of *Zic2* in the formation of major ipsilateral pathways: the ascending spinofugal tracts and the thalamocortical projection. We demonstrate that in both systems, *Zic2* is transiently and postmitotically expressed in neurons whose axons approach the midline but then turn to project ipsilaterally. Downregulation of *Zic2* in the dorsal spinal cord and in thalamic neurons elicits aberrant midline crossing, whereas ectopic expression of *Zic2* in spinal commissural interneurons switches axonal laterality and represses the expression of genes that promote crossing (*Lhx2* and *Robo3*). Functional experiments *in vivo* demonstrate that *Zic2* controls the expression of the guidance receptor *EphA4* in a subset of dorsal spinal neurons. Furthermore, we show that *Zic2* activity is dispensable in other ipsilaterally projecting neurons whose axons never approach the midline such as the ipsilateral interneurons from the dl1 spinal domain (dl1i) or the caudolateral TC (cITC) neurons. Together, our results reveal a *Zic2*-dependent mechanism, shared by different neural populations, essential to prevent midline crossing during the development of the nervous system and highlight the generality of regulatory programs controlling bilateral wiring in the CNS.

RESULTS

Zic2 Is Transiently Expressed in Postmitotic Dorsal Horn Neurons during Development

To investigate a possible role of *Zic2* in axon guidance in the spinal cord, we first analyzed its spatiotemporal expression pattern in the developing spinal cord of wild-type mice. As previously reported (Nagai et al., 1997), we detected high levels of *Zic2* expression in the ventricular zone of the dorsal neural tube from embryonic day 10 (E10) to E12 (Figures 1A and 1B). In addition, we found that from E13 to birth, *Zic2* is expressed in two populations of cells at both sides of the dorsal midline (Figures 1C–1F). This pattern was maintained until early postnatal stages when the spinal expression of *Zic2* was downregulated.

Using different markers for progenitors (*Sox2*), postmitotic cells (*HuCD*), and differentiated neurons (*NeuN*), we observed that *Zic2* is first expressed in the dorsal progenitors and then becomes restricted to a subpopulation of postmitotic neurons (Figures 1G–1J). Bromodeoxyuridine (BrdU) uptake experiments showed that the vast majority of *Zic2* postmitotic spinal cord neurons are born at E12 (Figures 1K and 1L; Figure S1 available online).

Zic2⁺ Postmitotic Spinal Neurons Become dIL_B Projection Neurons

To characterize the origin, fate, and projection pattern of *Zic2*⁺ neurons, we used a *Zic2* reporter mouse line referred to as

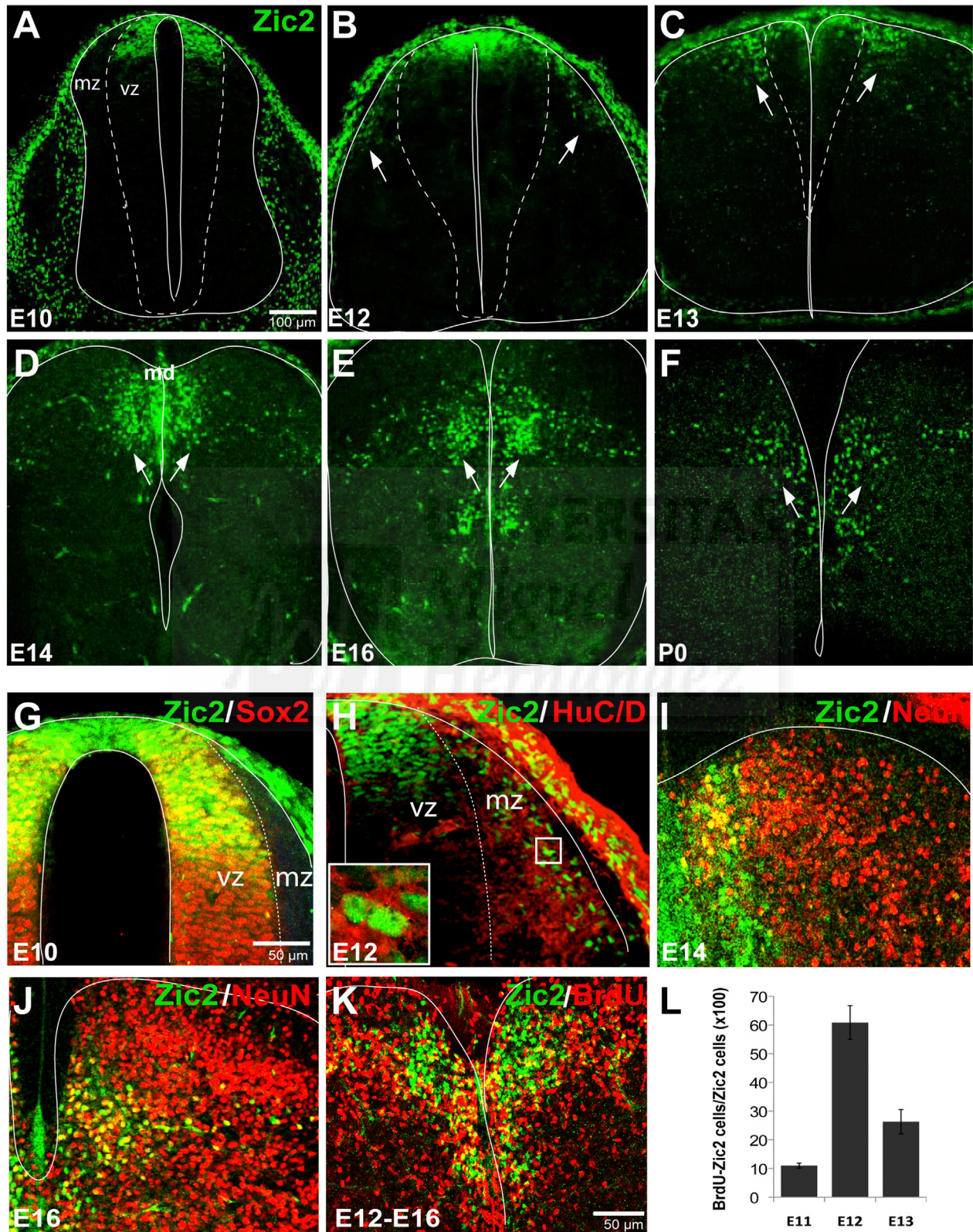
Tg(*Zic2*^{EGFP}). We confirmed that enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression faithfully reproduced the endogenous expression of *Zic2* in different tissues of these mice, including the spinal cord (Figures 2A–2D; Figure S2). Hence, EGFP expression can be used as a transient fate-map reporter for *Zic2* expression. *Zic2*/EGFP double-labeled cells were located in the proximity of the dorsal midline, whereas *Zic2*-derived dorsal horn neurons, which no longer expressed *Zic2* but maintained EGFP expression (*Zic2*⁻/EGFP⁺), populated more lateral areas in the dorsal horns (Figures 2A–2D). We also found that *Zic2*/EGFP expression is preserved across the rostrocaudal extent of the spinal cord (data not shown).

dIL neurons are specified by the expression of *Lbx1* (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Immunostaining for *Lbx1* in transverse spinal cord sections of Tg(*Zic2*^{EGFP}) embryos confirmed that postmitotic *Zic2*/EGFP neurons are dIL neurons (Figure 2E), an expected result based on their late birthdate. The dIL_A neurons are GABAergic interneurons that express the transcription factor *Pax2*, whereas the dIL_B cells are glutamatergic/projection neurons defined by the expression of *Tlx3* and *Lmx1b* (Cheng et al., 2005; Gross et al., 2002; Mizuguchi et al., 2006). From E13 to postnatal day 0 (P0), most *Zic2*/EGFP cells were positive for *Tlx3* and *Lmx1b* but negative for *Pax2* (Figures 2F–2H), indicating that glutamatergic, but not GABAergic, neurons expressed *Zic2* (Figure 2I). In fact, 91.15% ± 0.85% of the *Lmx1b* neurons were also positive for EGFP, suggesting that almost the entire population of dIL_B neurons expressed *Zic2* at some point.

To further confirm the relationship between *Zic2* and glutamatergic fate, we artificially increased the number of GABAergic neurons in the chick spinal cord and tested the expression of *Zic2*. We first corroborated that expression of *Zic2* in the chick spinal cord was similar to mouse *Zic2* expression (Figures S3A–S3E). Next, E2 chick embryos were electroporated with plasmids encoding *Ptf1a*, a transcription factor that determines GABAergic fate during the formation of the dorsal horns (Glasgow et al., 2005; Mizuguchi et al., 2006). As expected, both glutamatergic markers and *Zic2* expression were downregulated (Figures S3F–S3H). Moreover, *Ptf1a*-electroporated spinal cords analyzed at later stages demonstrated that, as previously suggested (Petkó and Antal, 2012), GABAergic neurons project locally and/or contralaterally (Figures S3I–S3K). Altogether, these observations suggest that dIL_B glutamatergic neurons are positive for *Zic2*, whereas GABAergic neurons do not express *Zic2*.

Spinal Neurons that Express Zic2 Postmitotically Project Ipsilaterally

Next, we analyzed the projections of spinal *Zic2* neurons by visualizing EGFP axons in the Tg(*Zic2*^{EGFP}) mice. Between E13 and E14, two populations of EGFP axons were detected. One set of axons extended toward the DF (Figures 3A and 3A'), and another group of fibers grew into the DLF (Figures 3A'' and 3B). By birth, many EGFP axons were observed in both the DF and the DLF (Figure 3B). In open-book preparations from the spinal cord of E16 Tg(*Zic2*^{EGFP}) embryos, EGFP axons ascended ipsilaterally into the DLF (Figure 3C). Neurofilament staining in longitudinal sections at different levels of the dorsal cord



(legend on next page)

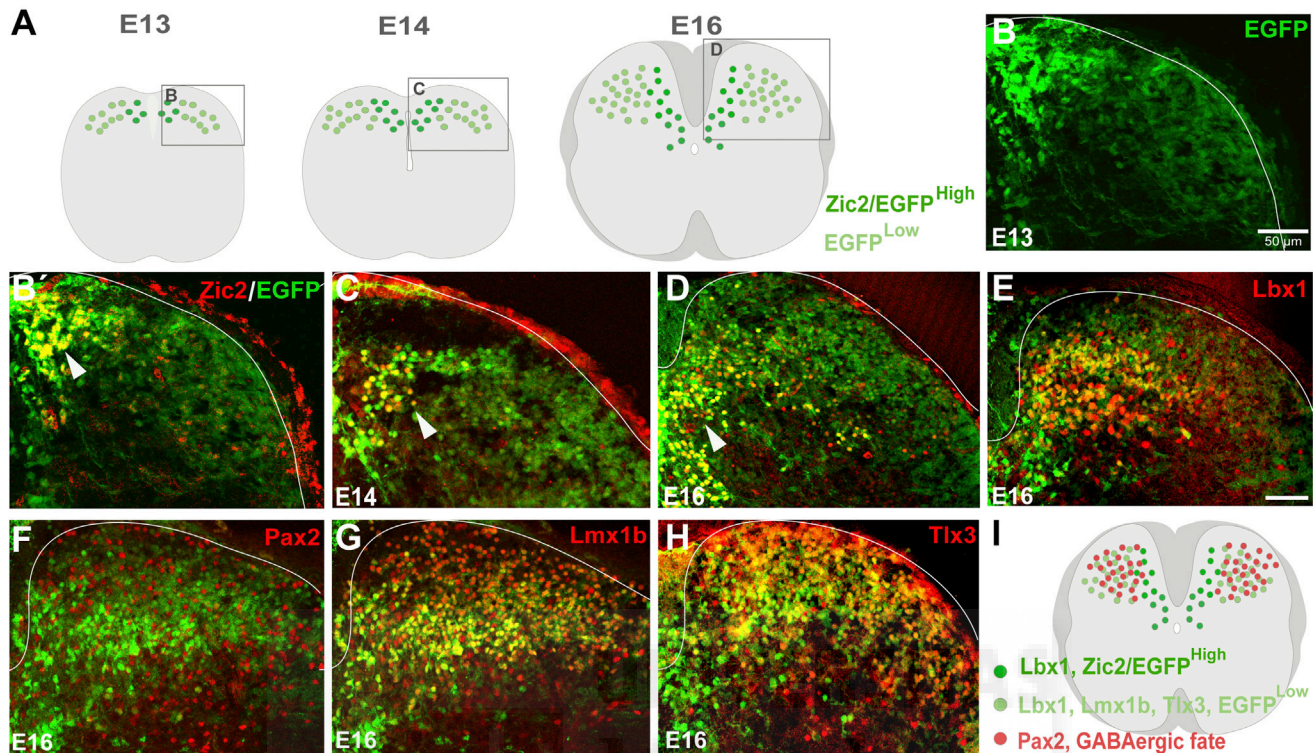


Figure 2. The Spinal Neurons that Transiently Express Zic2 Are dIL_B Projection Neurons

(A) The scheme summarizes the postmitotic spatiotemporal expression of Zic2 and EGFP in Tg(Zic2^{EGFP}) embryos. Zic2-expressing neurons located in dorsocentral regions of the spinal cord express high levels of EGFP (dark green). As these Zic2/EGFP cells move to more dorsal and lateral locations to populate the dorsal horns, they downregulate Zic2, and the levels of EGFP decrease (light green).
 (B) Transverse spinal cord section from an E13 Tg(Zic2^{EGFP}) embryo. EGFP is highly expressed in cells located close to the midline and faintly in dorsal horn cells. (B') The same image combined with Zic2 staining shows that Zic2 cells are highly positive for EGFP.
 (C and D) Zic2 staining in transverse spinal cord sections from Tg(Zic2^{EGFP}) embryos at the indicated stages. White arrows point to the regions with greater concentrations of double-labeled Zic2/EGFP cells.
 (E–H) Transverse spinal cord sections from Tg(Zic2^{EGFP}) E16 embryos stained with the indicated markers.
 (I) Schematic representation summarizing the results. Zic2 neurons (EGFP^{high}) express Lbx1. The Zic2 fate-mapped neurons (EGFP^{low}) express glutamatergic markers, such as Lmx1b and Tlx3, but not GABAergic markers, such as Pax2.

confirmed that EGFP axons run into both the DF and the DLF (Figures 3D and 3E). To further test whether EGFP axons that extend to the DF are ipsilateral axons, we unilaterally electroporated plasmids encoding the red fluorescent protein (pCAG-DsRed2) in the spinal cord of E12 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos. Axons expressing DsRed and EGFP projected ipsilaterally into the DF or the DLF, not crossing the midline (Figure 3F).

These observations, together with previous report demonstrating that dIL_Bs are association neurons (Gross et al., 2002), suggest that Zic2 is expressed in dorsal horn neurons that form the two main ascending ipsilateral tracks in the dorsal spinal cord: (1) association neurons whose axons run into the DLF and connect intraspinal segments, and (2) projection neurons

with axons ascending to supraspinal targets through the DL or the DLF.

Zic2 Expression Prevents Midline Crossing in the Dorsal Spinal Cord

The spinal cord of Zic2 mutant mice is highly distorted due to failures in the closure of the neural tube that result in anencephaly and spina bifida (Brown et al., 1998; Elms et al., 2003; Nagai et al., 2000). This early and strong phenotype makes the assessment of Zic2 function in more mature stages difficult. Therefore, to investigate the role of Zic2 in late-born spinal neurons in vivo, small hairpin RNAs (shRNAs) against Zic2 (Zic2RNAi) were injected and electroporated into the spinal cord of E12 embryos,

Figure 1. Spatiotemporal Expression of Zic2 in the Developing Spinal Cord

(A–F) Zic2 staining in transverse spinal cord sections from wild-type mouse embryos at the indicated stages.
 (G–J) Double immunostaining of Sox2, HuC/D, or NeuN and Zic2 in transverse sections from the spinal cord of wild-type embryos at the indicated stages.
 (K) Double staining for BrdU and Zic2 in transverse spinal cord sections from E16 embryos injected with BrdU at E12.
 (L) Quantification of the number of double-labeled Zic2/BrdU cells in E16 embryos injected with BrdU at E11, E12, and E13. The error bars indicate \pm SEM (**p < 0.01, Student's unpaired t test). Quantifications were performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition.

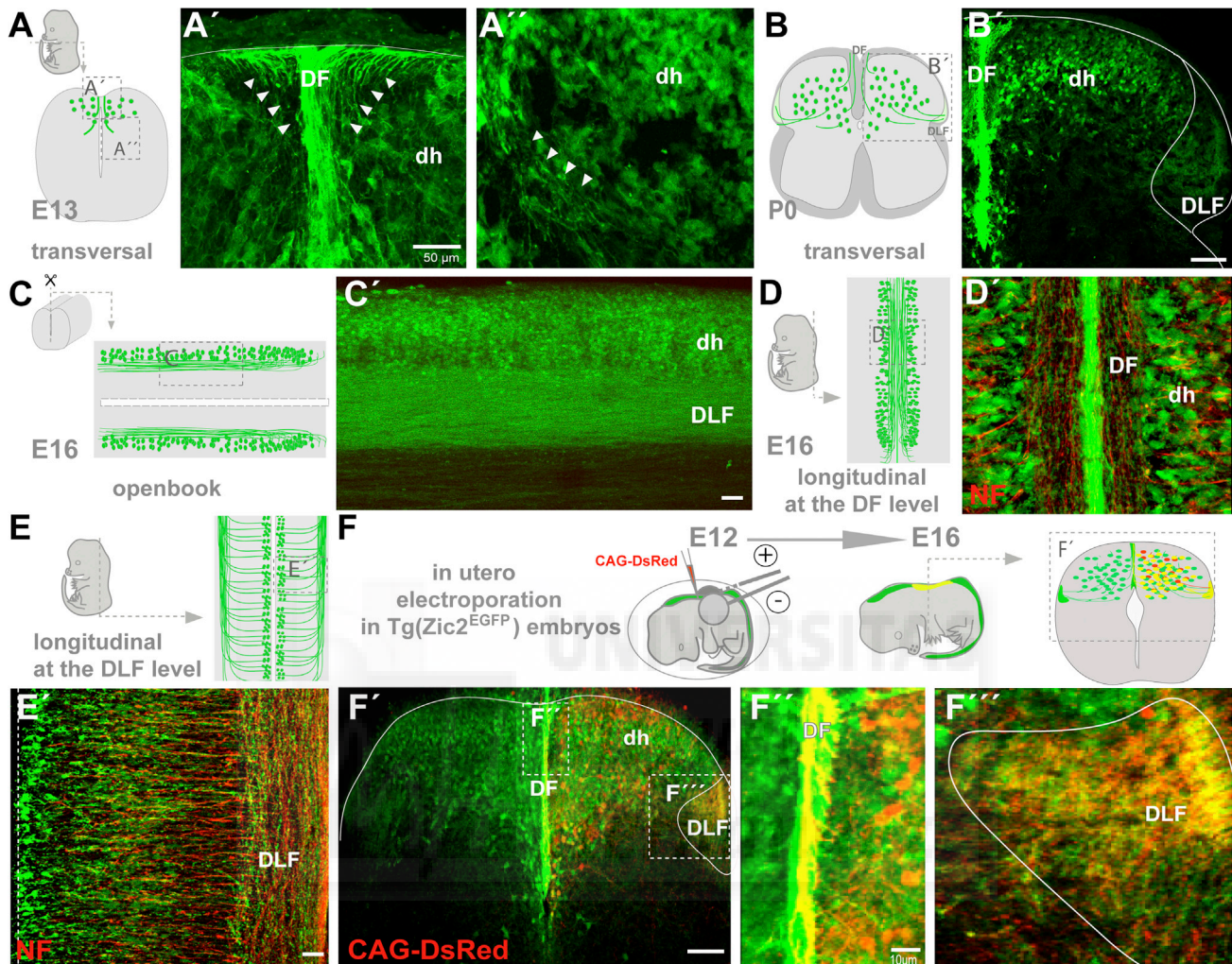


Figure 3. Zic2 Spinal Neurons Project Ipsilaterally

(A–E) The schematics illustrate the location of Zic2 neurons (green) at E13 (A), P0 (B), and E16 (C–E) in transverse (A and B) and longitudinal (D and E) sections as well as in open-book preparations (C). (A'–E') Pictures from Tg(Zic2^{EGFP}) mice despite the squared areas represented in (A–E). Longitudinal sections in (D and E) were stained with neurofilament (NF). (A') Axons from Zic2 neurons (white arrows) exit the spinal cord throughout the future dorsal fascicle (DF). (A'') In the same section, a number of EGFP axons (white arrows) extend turning away from the midline. (B') Transverse spinal sections of newborn Tg(Zic2^{EGFP}) mice show EGFP axons running into both the DLF and the DF. (C') In open-book preparations, EGFP axons project ipsilaterally into the DLF. EGFP axons running into the DF (D') or into the DLF (E') are positive for neurofilament.

(F) Schematic representation of the experimental procedures. Plasmids encoding for DsRed were unilaterally injected in the spinal cords of E12 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos by in utero electroporation, and transverse spinal cord sections from electroporated embryos were analyzed 4 days later. (F') Transverse spinal cord sections of E16 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos unilaterally electroporated with the DsRed-encoding plasmids show that DsRed/Zic2^{EGFP} axons project ipsilaterally into the DF and into the DLF. (F'' and F''') Higher magnifications of the squared areas in (F).

when most Zic2⁺ postmitotic neurons are generated in the mouse (Figure 4A). Four days after Zic2RNAi electroporation, Zic2 expression was reduced by approximately 10% in the targeted side compared to the endogenous expression in the non-electroporated side (nonelectroporated side: 100% ± 2.71%, electroporated side: 90% ± 2.91%; n = 9 embryos) (Figure 4B). The downregulation of Zic2 in the dorsal cord led to a significant increase in the number of targeted axons that aberrantly crossed the dorsal midline compared to the controls (Figures 4C–4E). We also noticed a modest but significant number of Zic2RNAi/EGFP-targeted cell bodies located in the nonelectroporated

side (Figures 4C–4E) and a number of neurons that were mislocated into the superficial layers compared to the embryos electroporated with EGFP alone (data not shown). Together, these results indicate that Zic2 expression is essential in dorsal horn neurons to avoid midline crossing.

Zic2 Is Sufficient to Switch Axonal Laterality in the Spinal Cord

To investigate whether Zic2 is also sufficient to switch the laterality of spinal cord axons, we performed in vivo gain-of-function experiments. Considering that electroporation of E12 mouse

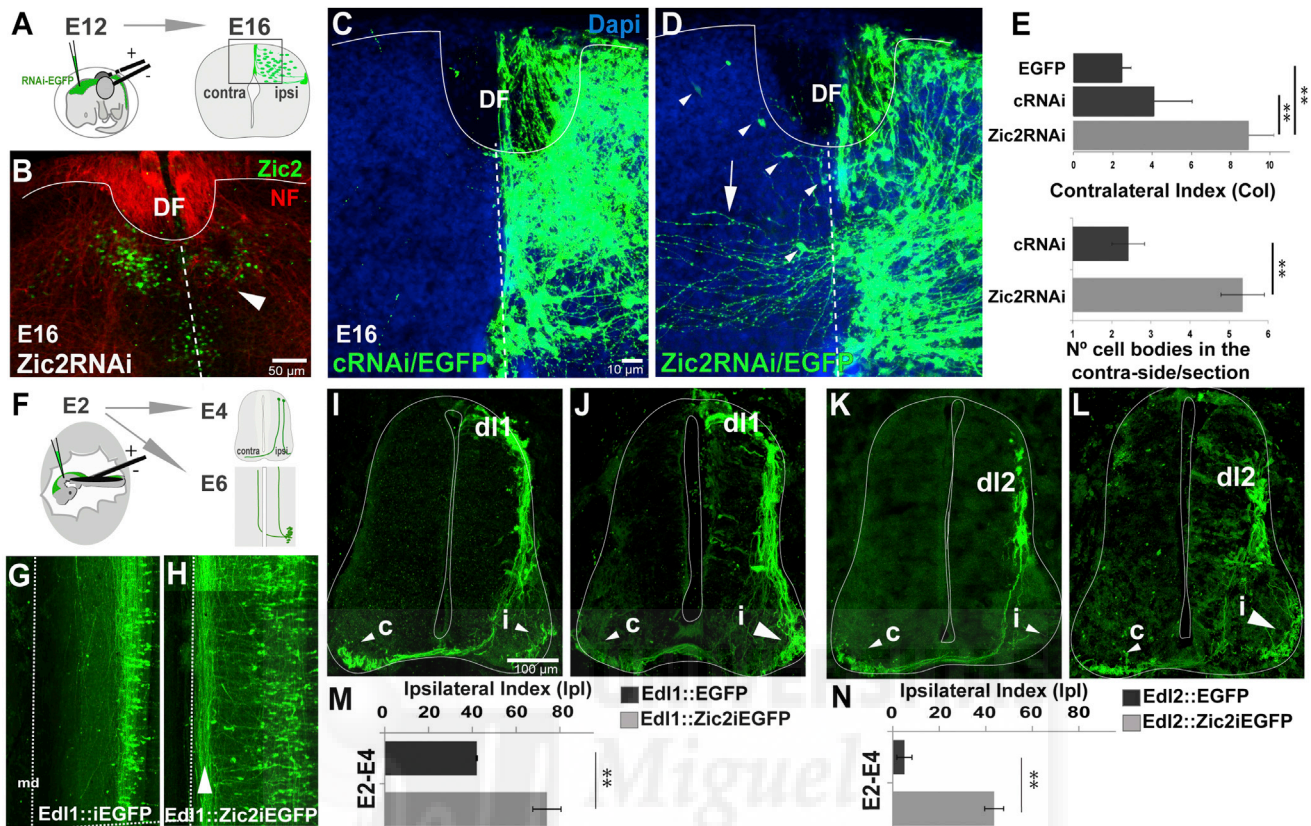


Figure 4. Zic2 Is Necessary and Sufficient to Determine Axonal Ipsilaterality in the Spinal Cord

(A) Schematic representation of the experimental procedures. E12 embryos were electroporated with Zic2RNAi and harvested at E16 for analysis of the contralateral index (Col). The squared area marks the analyzed region.

(B) A transverse spinal cord section of an E16 mouse embryo electroporated unilaterally with Zic2RNAi shows the effective downregulation of Zic2 protein (green) in the electroporated side (white arrow). Dashed line marks the midline. Red is neurofilament (NF) staining.

(C and D) Transverse spinal cord sections from E16 mouse embryos electroporated at E12 with control RNAi/EGFP (cRNAi/EGFP) or Zic2RNAi/EGFP-encoding plasmids. Zic2 downregulation causes massive aberrant crossing (white arrow) at the dorsal midline (dashed white line). The arrowheads point to the cell bodies of mislocated neurons on the side contralateral to the electroporation.

(E) Quantification of the contralateral index (Col) in embryos electroporated with control plasmids (CAG-EGFP or cRNAi) or plasmids encoding Zic2RNAi (top). A significant increase of axons crossing the dorsal midline was observed after downregulation of Zic2. Average number of cell bodies per section counted in the side contralateral to electroporation (bottom). Error bars indicate \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's unpaired t test). Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition.

(F) Schematic representation of the experimental procedures. E2 embryos were electroporated and harvested at E4 or E6 for analysis and quantification of the ipsilateral index.

(G and H) Open-book preparations of E6 chick embryos electroporated at E2 with plasmids driving EGFP or Zic2EGFP expression to the dl1 domain. The dotted line delineates the ipsilateral side of the midline.

(I-L) Transverse spinal cord sections from E4 chick embryos electroporated at E2 with plasmids driving EGFP expression to the dl1 domain (Edl1) or to the dl2 domain (Edl2) show an increase in ipsilateral axons after Zic2 induction compared to the controls. C, contralateral side; I, ipsilateral side.

(M and N) Quantification of the ipsilateral index (Ipl) in E4 chick embryos electroporated at E2 with Edl1:EGFP or Edl2:EGFP plasmids revealed an increase in the number of axons projecting ipsilaterally after the induction of Zic2. Error bars indicate \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's unpaired t test). Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition.

embryos rarely targeted contralateral interneurons, we turned to the chick spinal cord because in ovo electroporations provide access to earlier stages of development, when most of the generated neurons are contralateral (Altman and Bayer, 2001; Nandi et al., 1991; Wentworth, 1984). Vectors driving the expression of EGFP alone (pCAG-EGFP) or Zic2 plus EGFP (pCAG-Zic2iresEGFP) were unilaterally introduced into the spinal cords of chick embryos at E2.5, when most commissural interneurons are generated. At E4, embryos were sacrificed and the expres-

sion of cell-fate markers was studied. Colabeling with markers for the different cell types that populate the dorsal cord (Lhx2/9, Lhx1/5, Isl1, Brn3a, Tlx3, Lbx1, Lmx1b, and Pax2) demonstrated no effect on cell differentiation or fate acquisition after alteration of Zic2 expression (Figure S4). To better visualize and quantify axonal trajectories after ectopic expression of Zic2, we used vectors that drive gene expression specifically in postmitotic dl1 interneurons (pEdl1::EGFP). As expected from previous reports (Avraham et al., 2009), most dl1 axons

projected contralaterally at E4. However, following the electroporation of pEdl1::Zic2iresEGFP, approximately 50% of the targeted commissural axons switched their projection and became ipsilateral (Figures 4F, 4I, 4J, and 4M). This result was confirmed in open-book preparations from embryos electroporated with pEdl1::EGFP or pEdl1::Zic2iresEGFP (Figures 4F–4H).

To address whether Zic2 was also sufficient to switch axonal laterality in spinal domains that contain only commissural neurons, we used enhancers to drive gene expression in the dl2 population (pEdl2::EGFP) (Avraham et al., 2009). As in previous reports (Avraham et al., 2009), only commissural axons were observed in embryos electroporated with pEdl2::EGFP. In contrast, dl2 neurons expressing Zic2iresEGFP showed a significant increase in the number of ipsilateral axons, both in transverse spinal cord sections (Figures 4K, 4L, and 4N) and in open-book preparations (data not shown). These results demonstrate that postmitotic expression of Zic2 is sufficient to switch the axonal laterality of commissural spinal neurons.

Zic2 Is Not Expressed in Ipsilateral Neurons whose Axons Never Approach the Midline

Apart from dlL_B neurons, the dorsal spinal cord contains other populations that project ipsilaterally such as the ipsilateral interneurons from the dl1 domain (dl1i) (Bermingham et al., 2001; Helms and Johnson, 1998; Wilson et al., 2008) and the dl3 neurons (Avraham et al., 2010). The LIM homeodomain transcription factors Lhx2 and Lhx9 are expressed in dl1 interneurons and distinguish between commissural (dl1c) and ipsilateral (dl1i) pools. At early stages, when postmitotic neurons migrate out of the ventricular zone, Lhx2 and Lhx9 are strongly expressed by both dl1c and dl1i neurons. Later, Lhx2, but not Lhx9, disappears from the dl1i. Because dl1i neurons project ipsilaterally, we considered the possibility that Zic2 expression was responsible for their axonal laterality. To address this question, we performed Zic2 immunostaining in Edl1::EGFP-electroporated embryos and found that dl1 targeted neurons never expressed Zic2 (Figure 5A). In addition, double immunolabeling for Lhx2/9 and Zic2 at different stages showed that by the time that Lhx2/9 neurons are differentiating, Zic2 is expressed only in the ventricular layer (Figures 5B and 5C). At E12.5, when the first postmitotic Zic2 neurons leave the cell cycle, most Lhx2/9 neurons were already located in the medial deep dorsal horn (Figure 5D), and although a few Lhx2⁺ cells were still in dorsal areas, Zic2 and Lhx2 were expressed in different cells (Figure 5D'). Moreover, electroporation of control RNAi or Zic2RNAi in the chick spinal cord at E2 produced similar ratios of ipsilateral-projecting axons contrasting to a decrease in the number of ipsilateral axons in Zic2RNAi- versus cRNAi-expressing embryos that were electroporated 2 days later (Figures 5E and 5F). These observations demonstrate that Zic2 is not required to determine the ipsilateral trajectory of dl1i neurons and suggest that Zic2-dependent mechanisms are only needed in those ipsilaterally projecting neurons that actively avoid midline crossing.

Zic2 Expression Is Sufficient to Repress the Commissural Program

To understand the mechanisms underlying the ability of Zic2 to instruct an ipsilateral phenotype, we analyzed its relationship

with *Lhx* genes that are reported to promote midline crossing. Ectopic induction of Zic2 into the spinal cord of chick embryos did not affect *Lhx9* mRNA expression but produced a strong reduction of *Lhx2* mRNA levels (Figures 5G and 5H).

Robo3 is a guidance receptor induced by Lhx2/9 transcription factors and essential for midline crossing in dl1 commissural interneurons (Wilson et al., 2008). A significant decrease in the expression of this guidance receptor (both mRNA and protein) was also detected after ectopic expression of Zic2 (Figures 5I–5K). At later stages, we detected a population of Robo3⁺ neurons located very close to the Zic2 neurons (Figure 5L), and this late expression of Robo3 at E14 was shut down after ectopic expression of Zic2 (Figure 5M). These results led us to postulate that deactivation of Robo3 may be a requisite for midline avoidance of dorsal horn neurons. To explore this possibility, we ectopically expressed Robo3.1 (the Robo3 isoform expressed in precrossing axons; Chen et al., 2008) in dorsal cord cells by in utero electroporation. Strikingly, after ectopic expression of Robo3.1 in the dorsal cord, axons from dorsal horn neurons were aberrantly guided toward ventral regions instead of following their normal path to the dorsal fascicles. A significant number of these Robo3-misrouted axons crossed the ventral midline compared to the controls (Figures 5N–5P). These results support the notion that the downregulation of Robo3 is necessary to prevent axon extension into ventral regions of the spinal cord.

Zic2 Effectors in the Dorsal Spinal Cord

Our results suggest that Robo3 must be downregulated to maintain axonal extension of dorsal horn neurons into the dorsal fascicles. However, although Zic2 downregulation is sufficient to provoke axon crossing at the dorsal midline, ectopic expression of Robo3 alone is not. This suggests that Zic2 regulates other guidance molecules to promote dorsal midline avoidance. The tyrosine kinase receptor EphB1 has been described as the main effector of Zic2 in ipsilateral visual fibers (García-Frigola et al., 2008). Therefore, EphB1 was our first candidate as a possible effector of Zic2 in the dorsal spinal cord. We found, however, that this receptor is not expressed in the dorsal spinal cord at the time that Zic2 is postmitotically expressed in this region (Figure S5). Thus, we analyzed the expression of other guidance receptors known to mediate axon repulsion in different contexts such as EphB2, EphA4, EphA5, EphA6, Robo1, Robo2, Unc5C, PlexinA1, PlexinA2, and Neuropilin1 (Figure S5). None of these molecules matched Zic2 expression in the developing dorsal cord with the exception of EphA4, which appeared to colocalize, at least partially, with Zic2 (Figures 6A and 6B). We also observed that the ligands for EphA4 (ephrinB1 [North et al., 2009], ephrinB2 [Gale et al., 1996], and ephrinB3 [Bergemann et al., 1998]) were highly expressed in the dorsal spinal cord midline at the same stages than Zic2 and EphA4 (Figures 6C–6E). Therefore, EphA4/ephrinB signaling looked like a good candidate to mediate the midline avoidance controlled by Zic2 in dlL_B spinal neurons. To evaluate this hypothesis, we analyzed EphA4 expression levels after induction of Zic2 expression in the dorsal cord and found a significant increase of *EphA4* mRNA levels in the electroporated side compared to the nonelectroporated side (Figures 6F, 6G, and 6I). Conversely, *EphA4* mRNA levels were downregulated after electroporation of Zic2RNAi

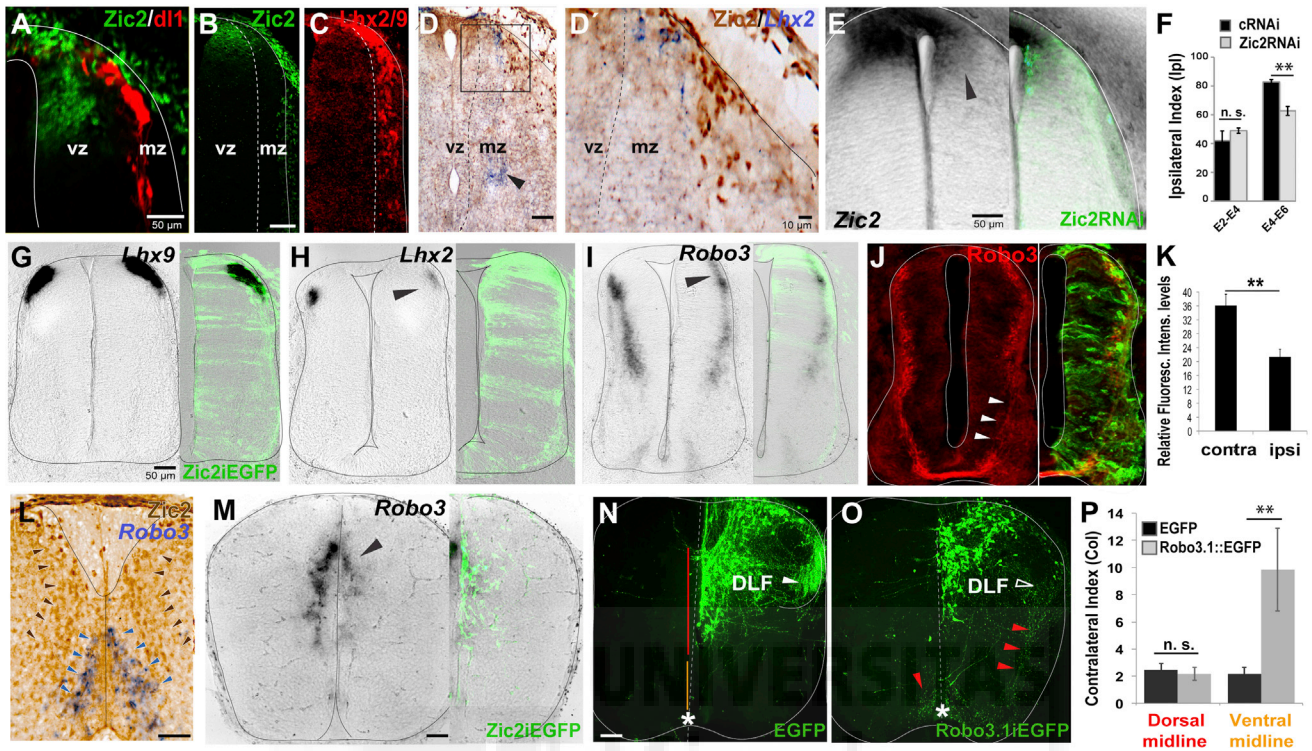


Figure 5. Zic2 Is Able to Repress the Commissural Program

(A) Zic2 immunostaining (green) in transverse spinal sections from an E4 chick embryo electroporated with Ed11:EGFP plasmids (red) show that Zic2 is expressed in progenitors while dl1 neurons are already differentiated and extending their axons ventrally.

(B and C) Zic2 and Lhx2/9 stainings in consecutive transverse spinal cord sections from E11 wild-type embryos show that Lhx2/9 and Zic2 do not localize at this stage.

(D) Zic2 immunostaining (brown) combined with in situ hybridization for Lhx2 mRNA (blue) in transverse spinal cord sections from E12 wild-type mouse embryos show that at this stage, most Lhx2 neurons are located in the deep horn while very few are still in dorsal areas. Neither of these two Lhx2 populations expresses Zic2, which is expressed in more laterally located cells. (D') High magnification of the squared area in (D) confirms no colocalization of Zic2 and Lhx2.

(E) In situ hybridization for Zic2 in transverse spinal cord sections from E4 chick embryos unilaterally electroporated with Zic2RNAi at E2 demonstrates that Zic2 is downregulated in the electroporated side (black arrow).

(F) Quantification of the number of axons projecting ipsilaterally versus total number of targeted axons (Ipl) in chick embryos electroporated at E2 or at E4 with control RNAi (cRNAi) or Zic2RNAi analyzed 2 days later. Downregulation of Zic2 reduced the number of ipsilateral axons in embryos electroporated at late, but not at early, stages. Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition. Error bars indicate \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's unpaired t test).

(G–I) In situ hybridization against Lhx9, Lhx2, and Robo3 in transverse spinal sections from E4 chick embryos unilaterally electroporated with CAG-Zic2iEGFP plasmids showed no alteration of *Lhx9* mRNA levels. However *Lhx2* and *Robo3* mRNA levels decreased after Zic2 induction (black arrows). The electroporated side is shown at the right of each section.

(J) Robo3.1 immunostaining (red) in transverse spinal sections from E4 chick embryos unilaterally electroporated with Zic2-encoding plasmids. Robo3 levels decreased in the commissural axons of the electroporated side (white arrows).

(K) Quantification (measured by fluorescence intensity levels) of Robo3.1 levels on the side electroporated with Zic2-encoding plasmids compared to the nonelectroporated side. Error bars indicate \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's unpaired t test). Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition.

(L) In situ hybridization against Robo3.1 (blue) combined with Zic2 immunostaining (brown) in a transverse spinal section from an E14 embryo. Brown arrows point to the location of Zic2 neurons while blue arrows point to *Robo3.1* mRNA expression.

(M) In situ hybridization in transverse spinal sections from an E14 mouse embryo unilaterally electroporated with Zic2 or EGFP-encoding plasmids reveal that the levels of *Robo3.1* mRNA were reduced (black arrow) in the electroporated compared to the nonelectroporated side.

(N and O) Transverse spinal sections of E16 embryos electroporated at E12 with Robo3.1- or EGFP-encoding plasmids show that axons ectopically expressing Robo3.1 grow ventrally (red arrows) and cross the ventral midline instead of projecting to the dorsal fascicles. Note that after Robo3.1 electroporation, the DLF is nearly empty (empty arrow), whereas in the control many axons are observed in the DLF (white arrow). Red and yellow lines indicate the dorsal and ventral midlines, respectively. Asterisks mark the ventral midline.

(P) Quantification of the number of axons that cross the dorsal and the ventral midline in E16 embryos electroporated at E12 with Robo3.1-encoding plasmids. Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition. Error bars indicate \pm SEM (n. s., nonsignificant; ** $p < 0.01$, Student's unpaired t test). Vz, ventricular zone; mz, mantle zone; DLF, dorsolateral fascicle.

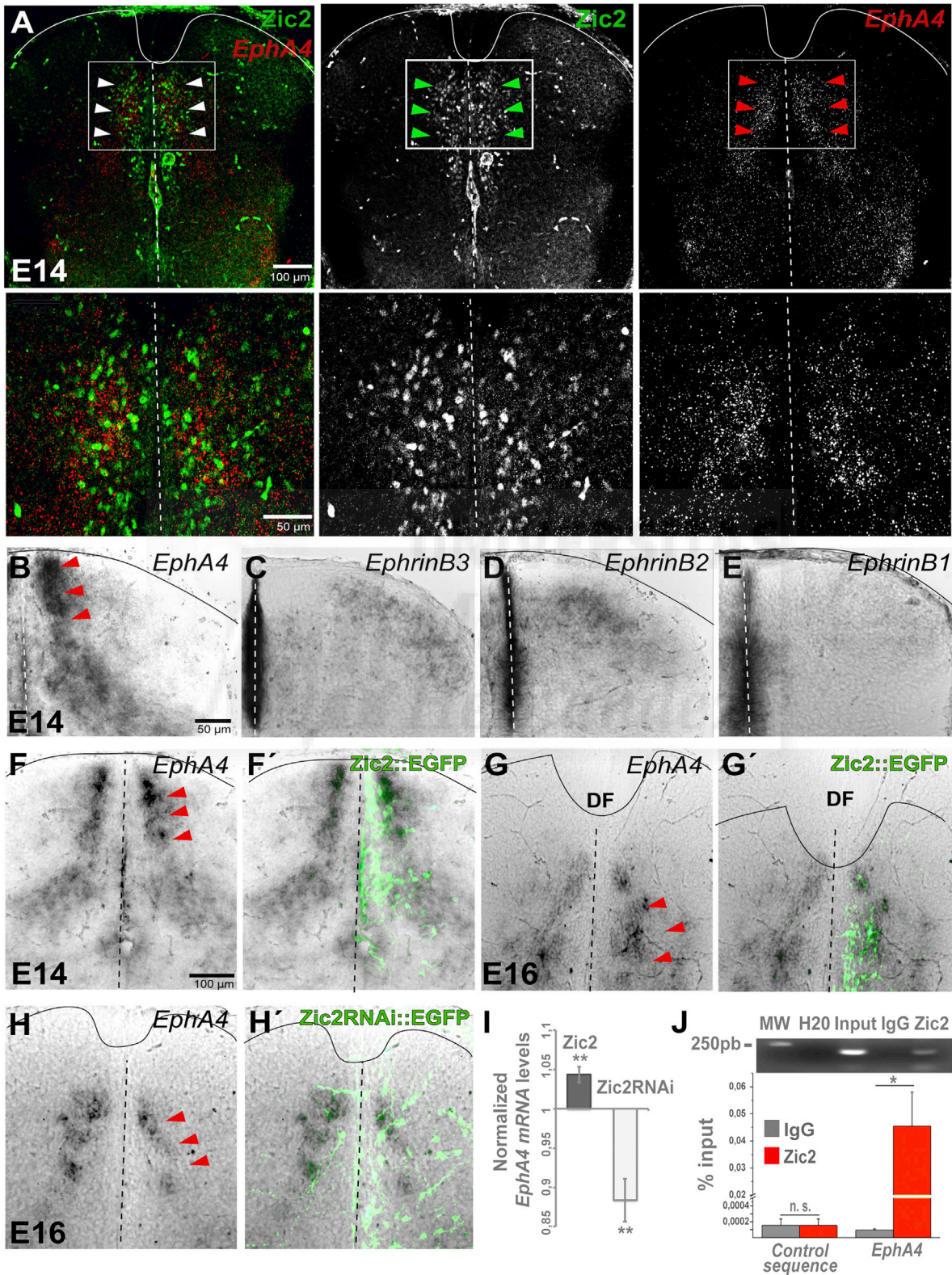


Figure 6. Zic2 Regulates the Expression of EphA4 in the Dorsal Cord

(A) Zic2 immunostaining (green arrows) in transverse spinal cord sections from E16 wild-type embryos combined with in situ hybridization against EphA4 (red). Lower panels show high-magnification images of the squared areas.

(legend continued on next page)

(Figures 6H and 6I). We also investigated whether Zic2 binds to the *EphA4* promoter region by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using E16.5 wild-type spinal cords and anti-Zic2 antibodies. We found specific binding of Zic2 to the sequence located immediately upstream of the *EphA4* transcription starting site (Figure 6J). Together, these results indicate that Zic2 regulates *EphA4* and suggest that *EphA4*/*ephrinB* signaling mediates midline avoidance in at least a subpopulation of dorsal horn neurons, which is consistent with results by Paixão et al. (2013) (in this issue of *Neuron*) demonstrating that in the absence of *EphA4* a subpopulation of dorsal horn neurons aberrantly cross the dorsal midline.

Zic2 Is Also Essential to Prevent Midline Crossing in the Thalamus

To further explore whether Zic2 is a general determinant of axonal laterality in the CNS, we focused on another major ipsilateral pathway, the thalamocortical (TC) projection. For this, we first examined Zic2 expression in the thalamus of embryonic and newborn mice. Zic2 is symmetrically expressed at high levels in rostromedial thalamic areas from E13 to E16 (Figures 7A–7C) and downregulated by P0. BrdU uptake experiments, similar to those performed in the spinal cord, demonstrated that the thalamic neurons that express high levels of Zic2 were late-born thalamic neurons that differentiate predominantly at E13 (Figures 7D–7F).

To visualize the projection phenotype of Zic2 thalamic neurons, we examined the TC axons of Tg(Zic2^{EGFP}) embryos at different stages. At E14, Zic2^{EGFP} TC axons extended ventrally and semiparallel to the midline (Figure 7L). By E16, Zic2^{EGFP} axons had already passed the internal capsule (Figure 7G), and by E18 they reached the cortical layers (Figure 7H). Immunostaining with calretinin and L1 (two markers of TC axons) in thalamic sections of the Tg(Zic2^{EGFP}) mice revealed that Zic2 TC axons are a fraction of the total population of TC axons. In particular, those that ran into the medial area of the internal capsule and project to the cingulate cortex (Figures 7I–7K).

The thalamus of Zic2 hypomorphic mice (Zic2^{kd/kd}) is not as grossly affected as the spinal cord and, therefore, it was possible to analyze the projection phenotypes of TC axons in these mice. Zic2^{EGFP} TC axons aberrantly crossed the midline in E14 Zic2 mutant mice (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{kd/kd}) compared to their control littermates (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{+/+}) (Figures 7L and 7M). This phenotype was even more evident at E16. In seven

out of ten Zic2 mutants, all the EGFP axons crossed the midline (Figures 7N–7P), whereas the three remaining mutants showed a milder phenotype. In contrast, the wild-type littermate embryos (nine out of nine) did not show any defect. By labeling TC axons with calretinin antibodies, we also analyzed single Zic2^{+/+} and Zic2^{kd/kd} hypomorphic mutant mice that do not express EGFP. A significant number of calretinin-positive TC axons were also visualized crossing the midline at E16 in this background (four out of four), contrasting with wild-type littermates in which no midline crossing defects were observed (five out of five) (data not shown). These experiments indicate that Zic2 expression is also required to impede midline crossing in the population of TC neurons rostromedially located in the thalamus (i.e., the rmTC neurons).

DISCUSSION

Our findings contribute to understand how axons acquire their laterality to reach the final targets in the correct side of the CNS in bilaterally symmetrical organisms. Here, we show that the transcription factor Zic2 is necessary in spinal dIL_B and thalamic rmTC neurons to keep their axons away from the midline. However, Zic2 expression is not required in ipsilateral neurons that extend axons laterally and never confront short-range midline cues, such as the spinal dl1i or the caudolateral TC neurons. These results, together with previous observations in the visual system, demonstrate that Zic2 plays a general role in the establishment of bilateral circuits in the CNS by preventing the crossing of ipsilateral axons that approach the midline along their trajectory.

Zic2 Prevents Midline Crossing in the Dorsal Spinal Cord

In addition to the described function of Zic2 in neural progenitors, this transcription factor is expressed in a restricted population of postmitotic spinal neurons located dorsally and near the midline that project to both the ipsilateral DF and the DLF. Mature dorsal horn neurons do not express Zic2. However, because dIL_B neurons in Tg(Zic2^{EGFP}) mice express EGFP, we assume that they arise from the Zic2 postmitotic population generated proximal to the dorsal midline. This observation suggests a rapid downregulation of Zic2 once axons are repelled from the midline and before these neurons reach their final location in the dorsal horns.

Loss-of-function experiments demonstrate that the expression of Zic2 in differentiated neurons is essential to avoid

(B–E) In situ hybridization for *EphA4*, *ephrinB3*, *ephrinB2*, and *ephrinB1* mRNAs in transverse spinal cord sections from E14 embryos. All three *ephrinBs* were expressed at the dorsal midline. In addition, *ephrinB3* and *ephrinB2* were expressed in the prospective dorsal horns.

(F and G) In situ hybridization in transverse spinal cord sections from E14 and E16 embryos electroporated at E12 with Zic2-encoding plasmids show that *EphA4* mRNA levels increased on the electroporated (red arrows) versus the nonelectroporated side. (F' and G') Electroporated side of the same section.

(H) In situ hybridization in transverse spinal cord sections of E16 embryos electroporated with Zic2RNAi at E12 demonstrate that *EphA4* mRNA levels decreased in the electroporated (red arrows) versus the nonelectroporated side. (H') Electroporated side of the same section.

(I) Quantification of *EphA4* mRNA levels in transverse spinal cord sections from E16 embryos electroporated at E12. *EphA4* mRNA levels increased after ectopic expression of Zic2 and decreased after Zic2RNAi electroporation. *EphA4* mRNA levels in the electroporated side were normalized to the levels in the respective nonelectroporated side. Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition. Error bars indicate \pm SEM (**p < 0.01, Student's unpaired t test).

(J) ChIP assay from E16 mouse embryos (n = 7) demonstrated that Zic2 binds to a region upstream of the transcription starting site (TSS) of *EphA4*, but not to the negative control sequence (genomic region with no annotated genes). As an example, the PCR products resulting from one ChIP experiment were loaded in a gel of agarose. Quantitative PCR samples were analyzed by two dilutions and in duplicated (n = 3). Error bars indicate \pm SEM (*p < 0.05, Mann-Whitney test).

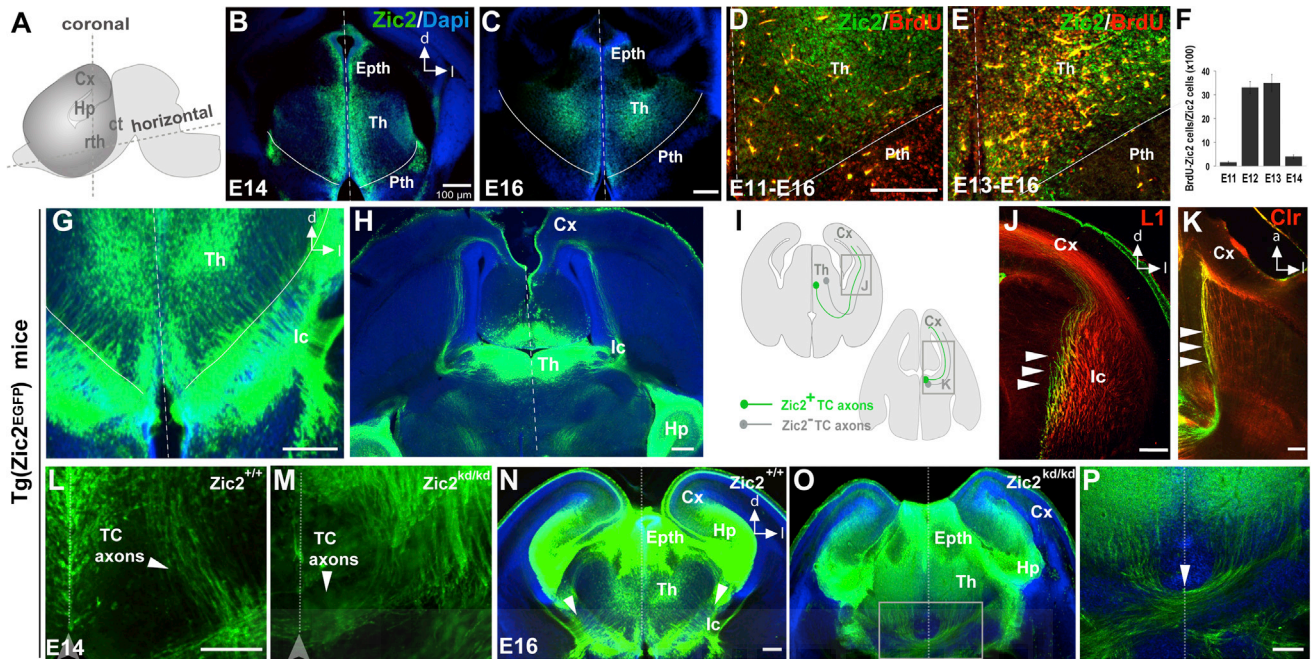


Figure 7. Zic2 Prevents Midline Crossing in Rostromedial TC Axons

(A) Sagittal view of a developing mouse brain. The dashed lines indicate the level of the sections shown in this figure. (B and C) Zic2 immunostaining in coronal thalamic sections from E14 and E16 embryos. (D and E) BrdU (red) and Zic2 (green) double immunostaining in coronal thalamic sections from E16 embryos injected with BrdU at E11 or E13 shows extensive Zic2/BrdU colocalization in embryos injected at E13. (F) Quantification of the number of double-labeled Zic2/BrdU neurons compared to the total number of Zic2 neurons in E16 embryos injected at E11, E12, and E13 with BrdU. Error bars indicate \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's unpaired t test). Quantification was performed in at least four sections per embryo and three embryos per condition. (G and H) Coronal and horizontal sections through the brains of E16 and E18 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos show that the Zic2-rostral thalamic neurons project to the ipsilateral cingulate cortex. (I) Schematic representation of coronal (top) and horizontal (bottom) brain sections summarizes the results in (J and K). (J and K) L1 and calretinin (Clr; red) stainings in coronal and sagittal sections through the brains of E16 Tg(Zic2^{EGFP}) embryos show that axons from Zic2 neurons (green) extend into the internal aspect of the internal capsule, whereas TC axons negative for Zic2 run laterally. (L–O) Coronal sections through the thalamus of E14 and E16 embryos show that EGFP TC axons grow away from the midline to enter the ipsilateral internal capsule in the (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{+/+}) embryos while they aberrantly cross the midline in the (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{kd/kd}) embryos. (P) High magnification of the squared area in (O). Cx, cortex; Hp, hippocampus; cTh, caudal thalamus; Epth, epithalamus; Th, thalamus; m, medial; l, lateral; Pth, prethalamus; md, midline; lc, internal capsule; Ob, olfactory bulb.

crossing at the dorsal midline. In contrast, gain-of-function experiments, in the dl1 and the dl2 populations, indicate that the ectopic expression of Zic2 in differentiated neurons is sufficient to switch axonal laterality. Interestingly, after downregulation of Zic2, in addition to aberrant axon midline crossing, we noticed a number of cell bodies located in the opposite side of the cord (Figures 4D and 4E). This finding is in agreement with the spinal phenotype of EphA4-deficient mice because, as discussed in Paixão et al. (2013), it is known that cell bodies of migrating interneurons follow their axons and it is possible that Zic2/EphA4 neurons that fail to recognize ephrinBs at the midline relocate their cell bodies to more medial positions. In general, these results support the notion that the primary function of Zic2 in postmitotic dorsal cord neurons is to trigger a gene program that impedes dorsal midline crossing.

Our findings address, at least in part, the current uncertainty regarding the regulatory mechanisms that govern axonal lateral-

ity in the spinal cord. Ectopic expression of Zic2 in the spinal cord downregulates Lhx2, but not Lhx9, supporting the previously suggested hypothesis that Lhx2 is implicated in midline crossing while Lhx9 is not (Ding et al., 2012). The function of Lhx9 as a mediator of axonal laterality in dl1i neurons remains unclear and deserves further exploration.

How does Zic2 exert its function in the dorsal cord? Robo3 is an essential guidance molecule that promotes axon crossing at the mouse ventral midline by preventing Robo1 insertion on the growth cone surface (reviewed in Chédotal, 2011). Therefore, ipsilateral neurons should not express this receptor. Accordingly, Robo3 is not expressed in Zic2 neurons and the delivery of Zic2 in contralateral neurons represses Robo3 expression. However, whereas downregulation of Zic2 promotes axon crossing at the dorsal midline, ectopic expression of Robo3.1 in dorsal neurons was not sufficient to induce roof plate crossing. Instead, Robo3.1 gain of function in dorsal horn

neurons provoked axonal misrouting to the ventral cord (Figure 5), suggesting that deactivation of Robo3 is required to become an ipsilateral/dorsal horn neuron. Our results on the ectopic expression of Robo3.1 suggest that Robo3.1 may mediate attraction to the floor plate, as it has been already proposed (Chen et al., 2008; Jaworski et al., 2010; Sabatier et al., 2004). This idea is also supported by Robo3 loss-of-function experiments, including both downregulation of Robo3 by RNAi injections in chick (Philipp et al., 2012) and Robo3 null mutant mice (Sabatier et al., 2004), in which it seems that aberrant ipsilateral axons turn away before reaching the ventral midline to project to the lateral fascicles.

On the other hand, the dramatic axonal turning of Zic2 neurons observed at the dorsal midline (Figure 3) suggested that repulsive signaling leads this process (Figure 3A). EphB2 and PlexinA1 receptors are ubiquitously expressed in the developing cord, and although we cannot completely discard a role for these proteins in midline crossing prevention, this is not a likely possibility because their expression does not coincide with Zic2. ChIP assays, together with functional and anatomical experiments in vivo, demonstrated that Zic2 is necessary and sufficient to trigger EphA4 expression in the dorsal cord and that the three main EphA4 ligands are highly expressed in the dorsal midline. Both EphA4 and EphB1 bind to ephrinB2 (Kullander and Klein, 2002; Murai and Pasquale, 2003), and it is conceivable that the Eph regulatory sequences that respond to Zic2 activity were evolutionarily selected. Therefore, it is not surprising that instead of EphB1, the Eph receptor regulated by Zic2 in the cord is EphA4.

Zic2 Regulates Midline Avoidance, but Not Ipsilaterality Per Se

During development, different distances separate early-born (dl1–dl6) and late-born (dlL_{A-B}) neurons from the midline. At early stages, the dorsal ventricular zone occupies more than half of the thickness of the neural tube wall. By the time that dl1–dl6 interneurons start axonogenesis, they are located laterally in the mantle and separated from the midline by the ventricular zone. dl1–dl3 neurons extend their axons circumferentially along the basal membrane to finally settle their cell bodies in the deep dorsal horn, never encountering short-range midline cues along their trajectory (Avraham et al., 2010; Bermingham et al., 2001; Helms and Johnson, 1998; Wilson et al., 2008). Under these circumstances, establishing an ipsilateral projection may depend on fasciculation with the contralateral axons coming from the other side in the white matter, a process that could depend on Lhx9 function in the case of the dl1 neurons. In contrast, during the differentiation of dlL neurons, the progenitors layer is dramatically reduced in size and, as a consequence, dlL neurons are born in close proximity to the midline. We propose that dlL_B neurons, due to its proximal location to the midline at the time of axon extension, express Zic2 to actively avoid the midline. Intriguingly, some spinothalamic neurons located in the lamina I of the dorsal cord have been described as contralaterally projecting neurons (Todd, 2010). The origin of these dorsal horns commissural neurons and their genetic characterization are currently unknown. We predict they are Zic2 negative neurons, but it will be important to confirm this.

Zic2 is not expressed in the ventral cord, but a number of ventral interneurons are known to project ipsilaterally (V0c, V1, V2a, V2b) (reviewed in Alaynick et al., 2011). This apparent inconsistency may be explained as for the trajectories of the ipsilateral dl1 neurons. The generation of ventral spinal neurons (between E10 and E12) occurs in a period when the ventricle physically separates the layer of postmitotic neurons from the midline. Pioneering axons at this time extend the axon laterally to contact with motor neurons or project into the ventrolateral bundles, never approaching the midline. In contrast to the development of the dorsal spinal cord, in the ventral neural tube a second round of neural differentiation proximal to the midline never takes place and, therefore, there would be no need for Zic2 expression. A similar reasoning may apply to the developing thalamus. Early-born neurons would never have the option of crossing the midline due to the existence of the third ventricle and progenitors located in the medial thalamic regions. At later stages, the ventricle shrinks, progenitors become postmitotic neurons, and the two thalamic leaves fuse in a caudorostral manner. At this time, the late-born population of TC cells (rmTC neurons) located nearby the midline extend their axons, and it is at this time that Zic2 expression starts to impede midline crossing.

In summary, our results show that Zic2 determines midline avoidance in at least three different systems that are crucial for the formation of bilateral circuitry in the CNS (Figure 8). Further investigations comparing the gene profiles of postmitotic Zic2 cells from the retina, dorsal spinal cord, and thalamus will clarify the similarities and differences between the mechanisms governing Zic2-dependent axon guidance laterality in different areas of the CNS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Lines

The Tg(Zic2^{EGFP})HT146Gsat line was obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center. The Zic2^{kd} mouse line was obtained from the RIKEN repository. The transgenic line Tg(Zic2^{EGFP}) was crossed with the Zic2^{kd/+} mouse line, and the resulting F1 progeny was crossed to generate (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{kd/kd}) and (Tg(Zic2^{EGFP}); Zic2^{+/+}) littermate embryos. More information is provided in Supplemental Experimental Procedures.

In Ovo and In Utero Electroporation, In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, BrdU Experiments, and ChIP Assays

Protocols describing these methods are detailed in Supplemental Experimental Procedures. The sources of plasmids, antibodies, and probes for in situ hybridization used in this study are described in Tables S1–S3.

Quantification of Zic2 Downregulation, Cell Bodies Mislocation, and Axonal Misprojections

For quantification of functional experiments in chicks, ImageJ software was used to select two mirror regions of interest (ROIs) (ipsilateral [iROI] and contralateral [cROI]) per image, taken from the white matter (where longitudinal axons were labeled with L1 antibodies). The ipsilateral Index (IpI) was obtained as a measure of EGFP levels in the iROIs and cROIs and expressed as a function of (iROI/iROI + cROI) × 100. To quantify Zic2 downregulation in mouse Zic2, we assessed protein levels by fluorescence intensity after immunohistochemistry in sections of E16 embryos (electroporated at E12). Fluorescence intensities from the electroporated and the nonelectroporated sides were measured and compared. Cell bodies expressing EGFP were also counted in each section and represented in a different graph in Figure 4E. For quantification of functional experiments in mice,

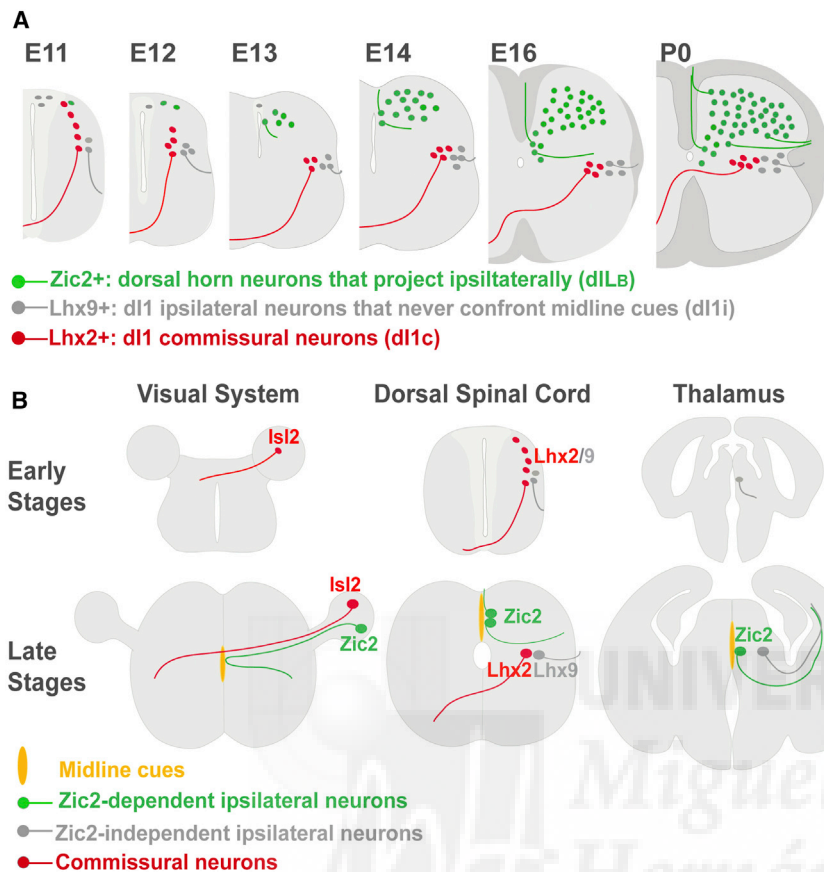


Figure 8. Schematic Summary of the Results

(A) dl1 interneurons become postmitotic as soon as E10 and migrate extending axons ventrally, in the case of Lhx2 neurons (red), or laterally, in the case of Lhx9 neurons (gray). The first postmitotic Zic2 neurons (green) appear around E11, at the time that some dl1 neurons are still being generated. Zic2 postmitotic expression peaks from E13 to E16 and during this period Zic2 neurons extend their axons ipsilaterally to the DF or to the DLF. In contrast to the ipsilateral dl1 neurons whose axons never approach the midline, late-born neurons that express Zic2 and differentiate in the proximity of the dorsal midline are exposed to midline cues soon after differentiation.

(B) In the visual system, Isl2 is expressed in contralateral retinal ganglion cells (RGCs) and Zic2 in the ipsilaterally projecting RGCs. In the early spinal cord, Lhx2/9 are both expressed in dl1 interneurons. Ipsilateral dl1 interneurons migrate ventrally, and their axons navigate laterally and never confront midline cues. In contrast, later-born interneurons (dlL₂) express Zic2, which triggers the expression of a set of molecules that are essential to respond to dorsal midline cues. In the thalamus, axons from early-born neurons extend ventrally at the time that the thalamic halves are physically separated by the third ventricle. Later, as the thalamic halves fuse, later-born neurons located in medial positions express Zic2 to respond to midline cues and avoid crossing.

two ROIs per section were selected in the nonelectroporated side adjacent to the midline. A ROI was created from the central canal to the dorsal fascicle (dorsal crossing ROI [dcROI]) and another from the central canal to the floor plate (ventral crossing ROI [vcROI]). The dcROI and vcROI-EGFP signals were normalized to the EGFP levels in the gray matter of the electroporated side (EGFP ROI). Contralateral indices (Col_s) of the dorsal and ventral cords were obtained as (dcROI/EGFP ROI) × 1,000 and (vcROI/EGFP ROI) × 1,000 function, respectively.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.007>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Barco, CA. Mason, and P. Bovolenta for critical reading of the manuscript. We are also grateful to S. Ferreira for the Zic2^{EGFP} retina picture, C. Vegar for genotyping and maintenance of the mice, Y. Coca for in utero electroporations, and J. López-Atalaya for help with the ChIP assays. We are indebted to T. Jessell, C. Birchmeier, L. Cheng, G. L-Bendito, K. Brose, and S. Martinez for generously providing reagents. We also thank the RIKEN BioResource (Japan) for providing the Zic2^{kd} mice and the MMRRC Repository for the Zic2^{EGFP} mice. A.E. holds an FPU fellowship from the Spanish Government. Research in the laboratory of E.H. is funded by grants from the Regional Government (Prometeo2012-005), the Spanish Government (BFU2010-16563, CONSOLIDER-Ingenio Program-CDS2007-023), and the European Research Council (ERC-2011-StG20101109).

Accepted: September 23, 2013

Published: December 18, 2013

REFERENCES

- Alaynick, W.A., Jessell, T.M., and Pfaff, S.L. (2011). SnapShot: spinal cord development. *Cell* 146, 178–178.e1.
- Altman, J. (1984). Cross-section of the spinal cord. *Nature* 310, 730.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (2001). Development of the Human Spinal Cord: An Interpretation Based on Experimental Studies in Animals, First Edition. (New York: Oxford University Press).
- Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Hong, S., Song, M.-R., and Klar, A. (2010). Motor and dorsal root ganglion axons serve as choice points for the ipsilateral turning of dl1 axons. *J. Neurosci.* 30, 15546–15557.
- Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., and Klar, A. (2009). Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the LIM-HD proteins Lhx9 and Lhx1. *Neural Dev.* 4, 21.
- Bergemann, A.D., Zhang, L., Chiang, M.K., Brambilla, R., Klein, R., and Flanagan, J.G. (1998). Ephrin-B3, a ligand for the receptor EphB3, expressed at the midline of the developing neural tube. *Oncogene* 16, 471–480.
- Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Wang, V.Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen, H.J., Fritsch, B., and Zoghbi, H.Y. (2001). Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 30, 411–422.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795–806.

- Brown, S.A., Warburton, D., Brown, L.Y., Yu, C.Y., Roeder, E.R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R.C., and Muenke, M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat. Genet.* 20, 180–183.
- Burgess, H.A., Johnson, S.L., and Granato, M. (2009). Unidirectional startle responses and disrupted left-right co-ordination of motor behaviors in robo3 mutant zebrafish. *Genes Brain Behav.* 8, 500–511.
- Chen, Z., Gore, B.B., Long, H., Ma, L., and Tessier-Lavigne, M. (2008). Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* 58, 325–332.
- Cheng, L., Samad, O.A., Xu, Y., Mizuguchi, R., Luo, P., Shirasawa, S., Goulding, M., and Ma, Q. (2005). Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat. Neurosci.* 8, 1510–1515.
- Chédotal, A. (2011). Further tales of the midline. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 68–75.
- Ding, Q., Joshi, P.S., Xie, Z.-H., Xiang, M., and Gan, L. (2012). BARHL2 transcription factor regulates the ipsilateral/contralateral subtype divergence in postmitotic dl1 neurons of the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1566–1571.
- Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A., and Arkell, R. (2003). Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. *Dev. Biol.* 264, 391–406.
- Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Mason, C.A. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits. *J. Neurosci.* 20, 4975–4982.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., and Ruhrberg, C. (2011). VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron* 70, 951–965.
- Fricke, C., Lee, J.S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F., and Chien, C.B. (2001). *astray*, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science* 292, 507–510.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., et al. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9–19.
- García-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Mason, C., and Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development* 135, 1833–1841.
- Glasgow, S.M., Henke, R.M., Macdonald, R.J., Wright, C.V.E., and Johnson, J.E. (2005). Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development* 132, 5461–5469.
- Gross, M.K., Moran-Rivard, L., Velasquez, T., Nakatsu, M.N., Jagla, K., and Goulding, M. (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* 127, 413–424.
- Gross, M.K., Dottori, M., and Goulding, M. (2001). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34, 535–549.
- Helms, A.W., and Johnson, J.E. (1998). Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Development* 125, 919–928.
- Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., and Mason, C.A. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114, 545–557.
- Hutson, L.D., and Chien, C.B. (2002). Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of *astray/robo2*. *Neuron* 33, 205–217.
- Jaworski, A., Long, H., and Tessier-Lavigne, M. (2010). Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. *J. Neurosci.* 30, 9445–9453.
- Jen, J.C., Chan, W.-M., Bosley, T.M., Wan, J., Carr, J.R., Rüb, U., Shattuck, D., Salamon, G., Kudo, L.C., Ou, J., et al. (2004). Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304, 1509–1513.
- Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20–29.
- Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475–486.
- Kullander, K., Butt, S.J., Lebet, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydström, A., Klein, R., and Kiehn, O. (2003). Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* 299, 1889–1892.
- Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T.J., Kumanogoh, A., Jessell, T.M., Sakurai, T., and Mason, C. (2012). Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron* 74, 676–690.
- Mizuguchi, R., Kriks, S., Cordes, R., Gossler, A., Ma, Q., and Goulding, M. (2006). *Ascl1* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat. Neurosci.* 9, 770–778.
- Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* 116, 2823–2832.
- Müller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P.A., Lewin, G.R., Jessell, T.M., and Birchmeier, C. (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34, 551–562.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Günther, T., Spörle, R., Schughart, K., and Mikoshiba, K. (1997). The expression of the mouse *Zic1*, *Zic2*, and *Zic3* gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev. Biol.* 182, 299–313.
- Nagai, T., Aruga, J., Minowa, O., Sugimoto, T., Ohno, Y., Noda, T., and Mikoshiba, K. (2000). Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1618–1623.
- Nandi, K.N., Knight, D.S., and Beal, J.A. (1991). Neurogenesis of ascending supraspinal projection neurons: ipsi- versus contralateral projections. *Neurosci. Lett.* 131, 8–12.
- Nawabi, H., Briançon-Marjollet, A., Clark, C., Sanyas, I., Takamatsu, H., Okuno, T., Kumanogoh, A., Bozon, M., Takeshima, K., Yoshida, Y., et al. (2010). A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev.* 24, 396–410.
- North, H.A., Zhao, X., Kolk, S.M., Clifford, M.A., Ziskind, D.M., and Donoghue, M.J. (2009). Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development* 136, 2467–2476.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y.S., Pfaff, S.L., and O'Leary, D.D. (2004). Magnitude of binocular vision controlled by *islet-2* repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell* 119, 567–578.
- Paixão, S., Balijepalli, A., Serradi, N., Niu, J., Luo, W., Martin, J.H., and Klein, R. (2013). EphrinB3/EphA4-mediated guidance of ascending and descending spinal tracts. *Neuron* 80, this issue, 1407–1420.
- Petkó, M., and Antal, M. (2012). Propriospinal pathways in the dorsal horn (laminae I-IV) of the rat lumbar spinal cord. *Brain Res. Bull.* 89, 41–49.
- Petros, T.J., Shrestha, B.R., and Mason, C. (2009). Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J. Neurosci.* 29, 3463–3474.
- Philipp, M., Niederkofler, V., Debrunner, M., Alther, T., Kunz, B., and Stoeckli, E.T. (2012). RabGDI controls axonal midline crossing by regulating Robo1 surface expression. *Neural Dev.* 7, 36.
- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219–232.
- Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P.J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P.C.G., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W.-J., et al. (2011). VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* 70, 966–978.

- Sabatier, C., Plump, A.S., Le Ma, Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., and Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein *rig-1/Robo3* is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117, 157–169.
- Sperry, R. (1982). Some effects of disconnecting the cerebral hemispheres. *Science* 217, 1223–1226.
- Szentagothai, J. (1964). Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa rolandi. *J. Comp. Neurol.* 122, 219–239.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836.
- Wang, K.H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C.S., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771–784.
- Wentworth, L.E. (1984). The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. I. A Golgi analysis of sensory, commissural, and association cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 222, 96–115.
- Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., and Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39, 919–935.
- Williams, S.E., Grumet, M., Colman, D.R., Henkemeyer, M., Mason, C.A., and Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 50, 535–547.
- Wilson, S.I., Shafer, B., Lee, K.J., and Dodd, J. (2008). A molecular program for contralateral trajectory: Rig-1 control by LIM homeodomain transcription factors. *Neuron* 59, 413–424.



