



Programa de doctorado en Neurociencias

Identificación de nuevos mecanismos moleculares que guían los axones visuales en la línea media durante el desarrollo embrionario

María Teresa López Cascales

Directora de la tesis

Dra. Dña Eloísa Herrera González de Molina

Codirector de la tesis

Dr. D. Ángel Luis Barco Guerrero



La presente tesis doctoral titulada “Identificación de nuevos mecanismos moleculares que guían los axones visuales en la línea media durante el desarrollo embrionario” se presenta bajo la modalidad de tesis convencional con el siguiente indicio de calidad:

*Fernández-Nogales, M., López-Cascales, M. T., Murcia-Belmonte, V., Escalante, A., Fernández-Albert, J., Muñoz-Viana, R., . & Herrera, E. (2022). Multiomic analysis of neurons with divergent projection patterns identifies novel regulators of axon pathfinding. **Advanced Science**, 9(29), 2200615.*

He contribuido en el análisis bioinformático de los datos. Los datos experimentales y experimentos funcionales han sido facilitados por la Dra. Marta Fernández-Nogales, y el resto de contribuidores a la publicación. Las muestras utilizadas para este estudio se pueden encontrar en el repositorio público GEO (GSE133492)



A continuación, se presentan los trabajos en los que he participado durante el proceso de formación en el que se enmarca esta tesis doctoral. Estos trabajos no han sido directamente utilizados en el desarrollo de la presente investigación, pero forman parte del contexto de mi formación académica y contribuyen a la base de conocimiento sobre la cual se ha construido este proyecto. La mención de estos trabajos tiene como objetivo hacer constar los proyectos que han sido relevantes en mi proceso de aprendizaje, así como reconocer la colaboración y el esfuerzo en los que me he visto involucrada, sin que ello implique que se utilicen como base o evidencia directa de los resultados presentados en la tesis. Por la presente, paso a listar los trabajos:

- Del Blanco, B., Guiretti, D., Tomasoni, R., **Lopez-Cascales, MT** et al. CBP and SRF co-regulate dendritic growth and synaptic maturation. *Cell Death Differ* (2019) 26, 2208–2222. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0285-x>

- Fernandez-Albert J, Lipinski M*, **Lopez-Cascales MT***, Rowley MJ, Martin-Gonzalez AM, Del Blanco B, Corces VG, Barco A. Immediate and deferred epigenomic signatures of in vivo neuronal activation in mouse hippocampus. *Nat Neurosci.* (2019) Oct;22(10):1718-1730. doi: 10.1038/s41593-019-0476-2. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31501571; PMCID: PMC6875776.

- Morenilla-Palao, C., **López-Cascales, M. T.**, López-Atalaya, J. P., Baeza, D., Calvo-Díaz, L., Barco, A., & Herrera, E. A Zic2-regulated switch in a noncanonical Wnt/βcatenin pathway is essential for the formation of bilateral circuits. *Science advances*, (2020) 6(46), eaaz8797.

- Proper frequency of perinatal retinal waves is essential for the precise wiring of visual axons in non-image forming nuclei. Authors: Santiago Negueruela, Cruz Morenilla-Palao, Salvador Sala, Patricia Ordoño, Macarena Herrera, Yaiza Coca, **Maria Teresa López-Cascales**, Danny Florez-Paz, Ana Gomis, and Eloisa Herrera. *The Journal of Neuroscience* (2024) <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1408-23.2024>

- Barnada SM, Giner de Gracia A*, Morenilla-Palao C*, **López-Cascales MT***, Scopa C, Waltrich FJ Jr, Mikkers HMM, Cicardi ME, Karlin J, Trotti D, Peterson KA, Brugmann SA, Santen GWE, McMahon SB, Herrera E, Trizzino M. ARID1A-BAF coordinates ZIC2 genomic occupancy for epithelial-to-mesenchymal transition in cranial neural crest specification. *Am J Hum Genet.* (2024) Aug 24:S0002-9297(24)00283-0. doi: 10.1016/j.ajhg.2024.07.022. PMID: 39226899.

- **Lopez-Cascales MT. et al.** Transcriptional regulation mediated by Zic2 across embryonic development. In preparation.

* equal contribution



La Dra. Dña Eloísa Herrera González de Molina, directora, y el Dr. D. Ángel Luis Barco Guerrero, codirector de la tesis doctoral titulada “Identificación de nuevos mecanismos moleculares que guían los axones visuales en la línea media durante el desarrollo embrionario”

INFORMAN:

Que Dña Maria Teresa López Cascales ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Identificación de nuevos mecanismos moleculares que guían los axones visuales en la línea media durante el desarrollo embrionario” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Alicante, a ____ de _____ de 2025

**Directora de la tesis
Dra. Dña Eloísa Herrera
González de Molina**

**Codirector de la tesis
Dr. D. Ángel Luis
Barco Guerrero**



La Dra. Dña Cruz Morenilla Palao, Coordinadora del Programa de Doctorado en el Instituto de Neurociencias de Alicante

INFORMA

Que Dña Maria Teresa López Cascales ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado "Identificación de mecanismos moleculares que guían los axones visuales en la línea media durante el desarrollo embrionario" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Alicante, a ____ de _____ de 2025

Coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias

Prof. Dra. Dña Cruz Morenilla Palao



Esta tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto BFU2016-77605-P, con la referencia de la ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores BES-2017-081298 emitida por la Agencia Estatal CSIC con el título de programa de doctorado Máster Universitario en Neurociencia: de la Investigación a la Clínica. El título del proyecto es "Regulación de la guía axonal y la conectividad durante la formación de los circuitos cerebrales"



UNIVERSITAS Miguel Hernández



ABREVIATURAS

CGRs	Células ganglionares de la retina
CGRc	Células ganglionares de la retina contralaterales
CGRi	Células ganglionares de la retina ipsilaterales
ATAC-seq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
ARN-seq	<i>Short for RNA sequencing</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin immunoprecipitation sequencing</i>
ADN, ARN	ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico
FT	Factor de Transcripción
NGL	Núcleo geniculado lateral en el tálamo
CS	Colículo superior
V1	Corteza visual primaria
TSS	Promotores, <i>Transcription start site</i>
Enhancers	Potenciadores
CREs	Elementos reguladores cis, <i>Cis regulatory elements</i>
MOT	Motivos de unión al ADN
GOF	Ganancia de función, <i>Gain of function</i>
LOF	Perdida de función, <i>Loss of function</i>
VT	ventrotemporal
Sema3D	Semaforina 3D
shRNA	Silenciamiento génico con ARN de horquilla corta, <i>Short hairpin RNA</i>
ROIs	Regiones de interés, <i>Region of interest</i>
BWT	Transformada de Burrows-Wheeler
FDR	Corrección de Benjamini-Hochberg, <i>False Discovery Rate</i>

Padj	P valor ajustado
FASTQ	<i>Fast Sequence text file</i>
SAM	<i>Sequence Alignment/Map file</i>
BAM	<i>Binary Alignment/Map file</i>
MAPQ	<i>Mapping Quality</i>
ZOOPS	<i>zero or one occurrence per sequence</i>
RPKM	<i>Reads Per Kilobase per Million mapped reads</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
LogFC	<i>log2 fold change</i>
FACS	Citometría de flujo activada por fluorescencia, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FANS	<i>Fluorescence-Activated Nuclei Sorting</i>
DEGs	Genes diferencialmente expresados, <i>Differentially expressed genes</i>
DARs	Regiones accesibles de la cromatina, <i>Differential Accesible Regions</i>
BETA	<i>Binding and Expression Target Analysis</i>
Sncg	<i>γ-sinucleína</i>

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 La guía axonal como proceso clave para el establecimiento de los circuitos neuronales	12
2.2 Nuevas herramientas para identificar mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de guía axonal	16
2.3 El cruce de la línea media como modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la guía axonal en mamíferos	18
2.4 Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación de las CGR ipsilaterales y contralaterales	20
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Animales	25
4.2. Electroporación ' <i>in utero</i> ' e ' <i>in ovo</i> '	26
4.3. Ensayo de luciferasa	26
4. 4. Hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica	27
4. 5. Microscopía	29
4. 6. Cuantificación y análisis estadístico de los experimentos funcionales	29
4.7 Obtención de muestras para ARN-seq, ATAC-seq y ChIP-seq	30
4.8. Análisis bioinformático de los datos de ARN-seq y ATAC-seq	33
4.8.1 ARN-seq	33
a) Control de calidad	33
b) Alineamiento	34
c) Análisis de expresión diferencial	34
d) Análisis de enriquecimiento funcional	35
4.8.2 ATAC-seq	36
a) Control de calidad	36
b) Alineamiento	36
c) Análisis de Accesibilidad diferencial	37
d) Análisis de Motivos enriquecidos	38
e) Análisis de footprinting (ocupación de nucleosomas)	39
f) Análisis de enriquecimiento funcional	40
4.8.3 ChIP-seq	40

a) Control de calidad	40
b) Alineamiento	40
c) Identificación de las regiones de unión	41
d) Análisis de Motivos enriquecidos	41
e) Análisis de enriquecimiento funcional	41
4.8.4 Integración de técnicas multiómicas (ATAC-seq, ARN-seq y ChIPseq)	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Perfiles transcriptómicos de las células ganglionares retinales contralaterales e ipsilaterales	43
5.2 Diferencias en la accesibilidad de la cromatina entre CGRi y CGRc	47
5.3 Correlación entre la ocupación diferencial de elementos reguladores cis y la expresión génica	51
5.4 Código extendido de factores de transcripción implicados en las decisiones axonales en la línea media	54
5.5 El factor de transcripción Pou4f1 regula el cruce de la línea media y la expresión de γ - sinucleína	57
5.6 Regulación transcripcional de la repulsión en la línea media	63
5.7 Los factores de transcripción Lhx2/9 co-regulan la trayectoria ipsilateral junto con Zic2	66
6. DISCUSIÓN	70
7. REFERENCIAS	75
8. CONCLUSIONES	82
9. ANEXOS	85
10. AGRADECIMIENTOS	102

1. RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario, el crecimiento de los axones neuronales está controlado por un conjunto de señales moleculares que guían sus trayectorias hacia dianas específicas, permitiendo así la formación precisa de conexiones sinápticas y la organización funcional de los circuitos neuronales. Los receptores de membrana responsables de interpretar estas señales extracelulares están regulados por la actividad de diversos factores de transcripción, que controlan su expresión en la superficie celular siguiendo patrones espaciales y temporales definidos. Estos patrones determinan la orientación axonal al modular la dinámica del citoesqueleto de actina, que condiciona, entre otros aspectos, la capacidad de los axones de ser atraídos o repelidos por señales de guía expresadas por las células de la línea media para cruzar o no al otro hemisferio cerebral. Aunque se han identificado algunos factores de transcripción, receptores y moléculas de guía implicados en este proceso, los mecanismos moleculares y las vías de señalización que lo regulan no se conocen aún en su totalidad.

En esta tesis, nos propusimos aprovechar la divergencia axonal que presentan las células ganglionares de la retina (CGRs) de ratón a la altura del quiasma óptico como modelo para identificar nuevos mecanismos implicados en la guía axonal durante la formación de los circuitos neuronales. Para ello, analizamos datos de accesibilidad a la cromatina (ATAC-seq) y perfiles transcripcionales (ARN-seq) de CGRs con proyecciones ipsilaterales y contralaterales, integrándolos con datos de unión de factores de transcripción a regiones reguladoras del genoma (ChIP-seq). El análisis conjunto de estos datos ha permitido, por un lado, confirmar hallazgos previos del laboratorio y, por otro, revelar nuevos conocimientos sobre los mecanismos reguladores y las vías de señalización implicadas en la guía axonal de las CGRs a su paso por el quiasma óptico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La guía axonal como proceso clave para el establecimiento de los circuitos neuronales

Uno de los mayores retos en neurobiología del desarrollo es entender cómo las miles de millones de neuronas que componen el sistema nervioso de las distintas especies logran conectarse entre sí con una precisión extraordinaria para formar las redes funcionales. Esta conectividad tan precisa y se establece durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas postnatales es esencial para un funcionamiento adecuado del sistema nervioso maduro. La formación de circuitos neuronales implica una serie de pasos altamente coordinados, que incluye la extensión de los axones desde el soma de la neurona hacia los tejidos diana donde finalmente establecerán sinapsis con las células adecuadas, que es un procesos conocido como guía axonal y está dirigido por señales específicas que el axón encuentra en el entorno.

Durante décadas, el fenómeno de guía axonal ha sido objeto de intensa investigación. Gracias a los avances en genética, imagen de alta resolución, biología molecular y más recientemente, tecnologías -ómicas y herramientas cada vez más sofisticadas de análisis computacional, se ha logrado identificar un conjunto diverso de moléculas de guía y muchos de sus receptores, así como descifrar parte de las redes de señalización intracelular que regulan el comportamiento axonal durante el desarrollo embrionario (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996).

En sus detalladas descripciones histológicas del sistema nervioso en desarrollo, Cajal identificó por primera vez los conos de crecimiento como unas estructuras especializadas en los extremos de los axones mientras están creciendo. Estas estructuras en forma de “palma de la mano” son altamente dinámicas y actúan como “sensores” móviles que exploran el entorno extracelular y responden a señales químicas y físicas para dirigir el axón y permitir su correcta orientación hacia su destino (Ramón y Cajal, 1890).

Desde el punto de vista estructural, los conos de crecimiento presentan una organización compleja y polarizada. La región central, o dominio central, contiene microtúbulos, mitocondrias y vesículas, mientras que la periferia está dominada por una densa red de filamentos de actina organizada en

dos tipos de proyecciones: los filopodios, prolongaciones delgadas que exploran el ambiente en busca de señales, y los lamelipodios, extensiones más amplias en forma de velo que permiten el avance del cono y su interacción con el sustrato (**Figura 1**). La coordinación entre la polimerización de actina en la periferia y la dinámica de los microtúbulos en el centro del cono permite su desplazamiento direccional.

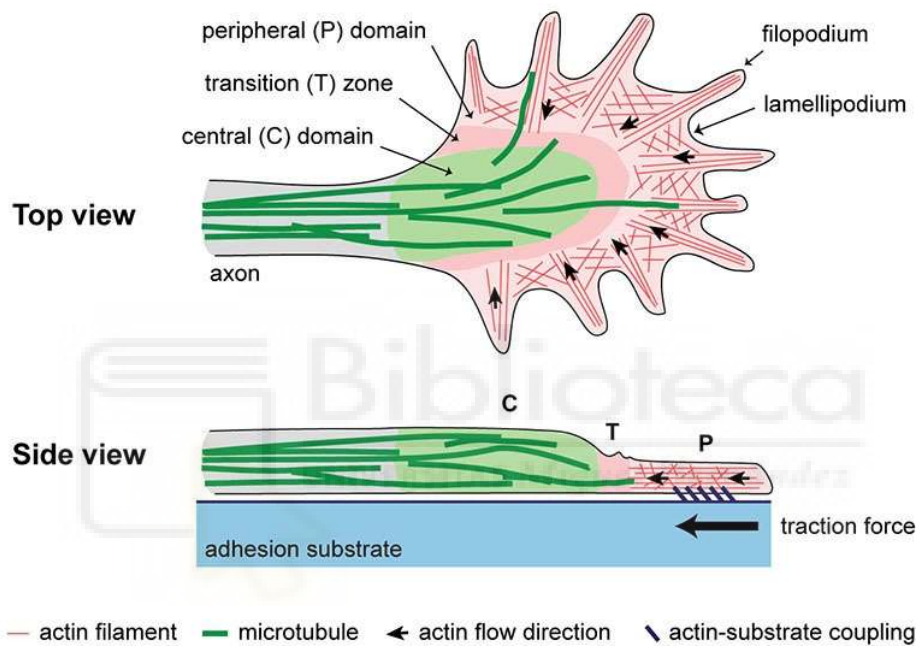


Figura 1. Estructura del cono de crecimiento. Arriba: vista superior. Abajo vista lateral. En verde los microtúbulos. En rojo los filamentos de actina. Se pueden observar las estructuras de la región central (C), y la región periférica (P) con los filopodios y lamelipodios, además de la zona de transición (T) entre ambas.

Los conos de crecimiento interpretan las señales extracelulares gracias a la expresión de repertorios específicos de receptores en su superficie, cuya composición varía según el tipo neuronal, la etapa del desarrollo y el contexto local. Estas señales pueden ser de naturaleza atractiva o repulsiva, y se presentan en formas diversas: como moléculas ancladas a la matriz extracelular, proteínas ancladas en la membrana de otras células, o factores difusibles. Entre las principales familias de moléculas de guía axonal destacan las Netrinas, Slits, Semaforinas, Efrinas, todas ellas con receptores bien caracterizados que se expresan en la superficie del cono de crecimiento (**Figura 2**).

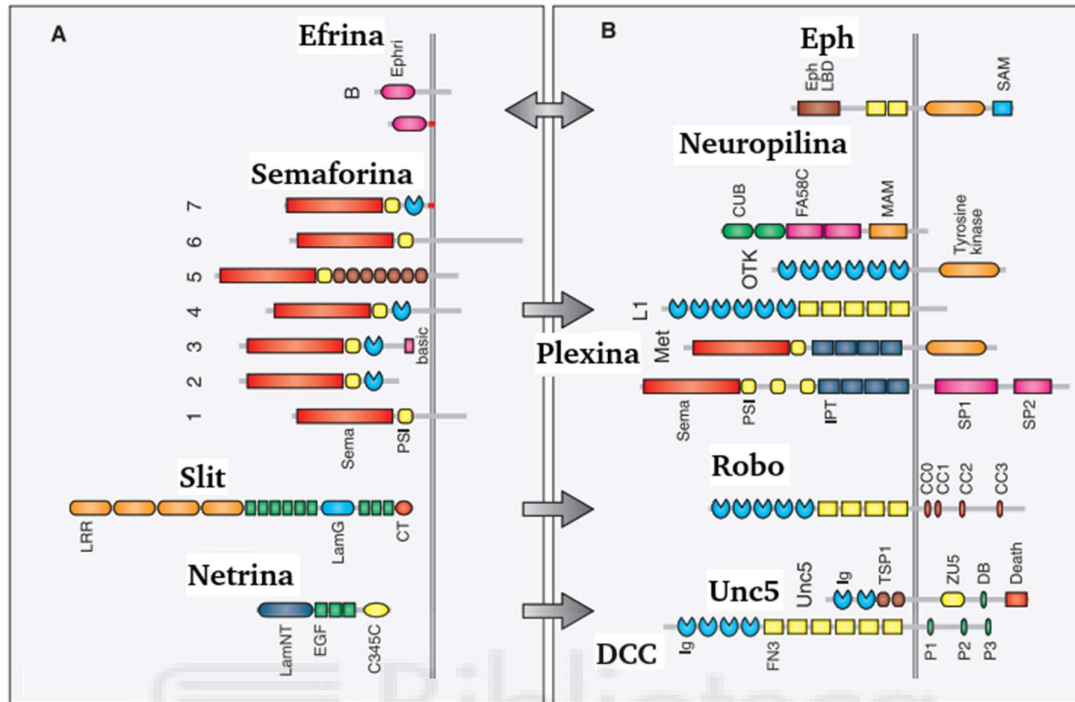


Figura 2. Familias de moléculas guía (A) y sus receptores (B) (Adaptación de Dickson et al. 2002).

La unión de una señal de guía a su receptor en el cono de crecimiento desencadena una cascada de eventos bioquímicos intracelular que convergen sobre el citoesqueleto. Estas cascadas de señalización inducen la polimerización o despolimerización de actina, así como la estabilización o retracción de microtúbulos, modulando la morfología del cono y remodelando su dirección de crecimiento. Entre los actores clave en este proceso se encuentran las Rho GTPasas (como RhoA, Rac1 y Cdc42), que actúan como interruptores moleculares para reorganizar el citoesqueleto y coordinar motilidad, adhesión y polaridad celular (Hall & Lalli, 2010) (**Figura 3**).

Para comprender plenamente el comportamiento de los conos de crecimiento es necesario integrar no solo las señales extrínsecas y su transducción, sino también los mecanismos intrínsecos que definen la identidad y el estado funcional de cada neurona. En este contexto, la regulación de la expresión génica —controlada por factores de transcripción (FT) específicos— desempeña un papel crucial. Estos mecanismos aseguran que cada tipo neuronal exprese los receptores y componentes de señalización adecuados para responder correctamente a las señales de guía presentes en el entorno.

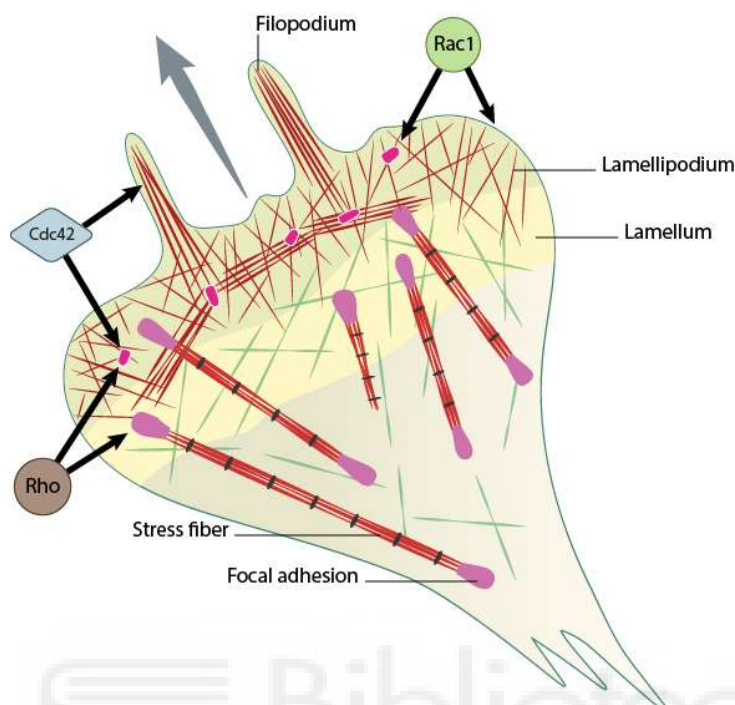


Figura 3. Diferentes GTPasas de la familia Rho actúan en diferentes regiones del cono de crecimiento para orquestar la dirección del crecimiento axonal. Cdc42 controla la polaridad celular y la formación de filopodios y adhesiones focales nacientes. Rho influye en el ensamblaje y la maduración de las adhesiones celulares, además de controlar la formación de fibras y la actividad contráctil. Rac1 controla principalmente el ensamblaje de actina y la formación de adhesiones emergentes en el lamelipodio.

A lo largo de los años se han utilizado numerosos modelos experimentales para investigar los complejos procesos de guía axonal. Los sistemas *in vitro*, como cultivos de neuronas disociadas o explantes tisulares, permiten un control detallado del microambiente y han sido fundamentales para analizar la respuesta de los conos de crecimiento a moléculas específicas. En paralelo se han utilizado también modelos *in vivo* que aportan una visión más integradora, al preservar la arquitectura tridimensional del tejido y las interacciones entre diferentes tipos celulares. Modelos invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* han sido esenciales para descubrir las familias clásicas de moléculas de guía, gracias a su simplicidad genética y accesibilidad para manipulación experimental. En vertebrados, sistemas como el plexo del ala del saltamontes permitieron descubrir el papel de los axones pioneros y la función de la glía en la navegación axonal (Bastiani et al., 1987), hallazgos que fueron validados posteriormente en

modelos como *Danio rerio*, donde la transparencia embrionaria facilita la observación directa de los axones en desarrollo (Eisen et al., 1989; Pike et al., 1992).

Un modelo experimental altamente influyente en el estudio de la guía axonal ha sido el de las células ganglionares de la retina (CGRs) de *Xenopus laevis*, ya que sus conos de crecimiento son excepcionalmente grandes y, por tanto, fáciles de observar al microscopio. Este modelo ha permitido visualizar en tiempo real la dinámica de filopodios y lamelipodios, así como analizar la respuesta del cono a gradientes de moléculas de guía (Holt, 1989; Harris et al., 1990; Chien et al., 1994; Dumoulin et al., 2023).

En conjunto, el proceso de guía axonal representa un extraordinario ejemplo de integración entre señales extracelulares y programas génicos intrínsecos. La comprensión detallada de este proceso no solo es clave para desentrañar los principios que rigen el desarrollo del sistema nervioso, sino también para diseñar estrategias de reparación tras lesiones, donde se busca reactivar o redirigir el crecimiento axonal en el sistema nervioso adulto.

2.2 Nuevas herramientas para identificar mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de guía axonal

Como ya se mencionó en la sección previa, la guía axonal está finamente regulada por mecanismos que controlan la identidad neuronal y la capacidad de las neuronas para interpretar señales extracelulares. Esta regulación depende de patrones específicos de expresión génica, que a su vez están determinados por la acción coordinada de factores de transcripción, la accesibilidad de la cromatina y las señales ambientales presentes en momentos y lugares precisos. Durante el desarrollo, estos mecanismos permiten que las neuronas diferenciadas expresen receptores y componentes de señalización necesarios para responder de forma adecuada a los gradientes de moléculas guía, asegurando así el crecimiento axonal dirigido y la correcta formación de circuitos neuronales.

En el núcleo celular, el ADN está empaquetado en una estructura tridimensional denominada cromatina, cuya conformación física influye directamente en la posibilidad de que determinados

genes sean transcritos. Las regiones de cromatina "abierta" o eucromatina son accesibles a los factores de transcripción, mientras que las regiones de cromatina "cerrada" o heterocromatina suelen estar silenciadas. Esta accesibilidad está regulada por modificaciones epigenéticas de las histonas (como la metilación y la acetilación), que modulan la afinidad de la cromatina por los diferentes complejos transcripcionales (**Figura 4**).

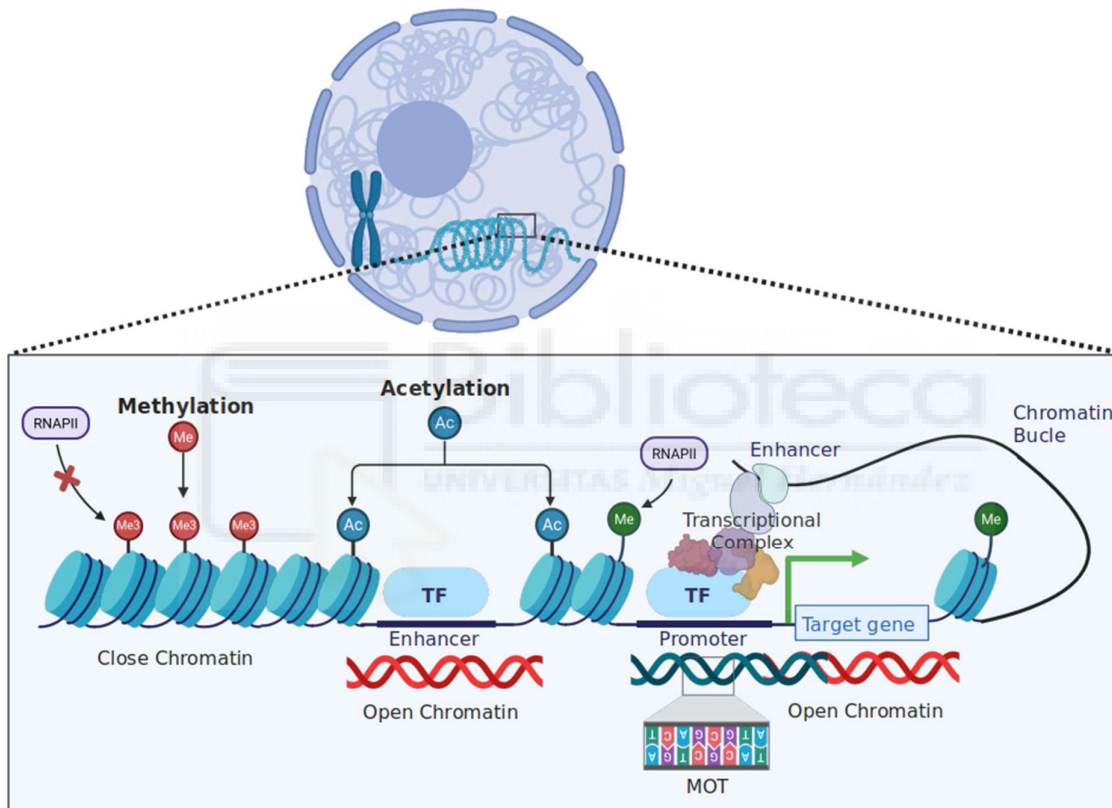


Figura 4. Modelo general de regulación de la cromatina (Imagen generada con BioRender)

Los FT son proteínas que reconocen secuencias específicas del ADN, denominadas motivos (MOT), generalmente localizadas en regiones reguladoras de los genes como promotores (TSS) y potenciadores (*enhancers*). A través de su unión cooperativa a estas regiones, los FT pueden activar o reprimir la transcripción de genes clave implicados en procesos como la diferenciación celular, la extensión axonal o la especificación de la identidad neuronal (Ptashne & Gann, 2002; Stormo, 2000; Bulyk et al., 2001). Además, los *enhancers* pueden encontrarse a gran distancia del gen que regulan, y su función depende de la arquitectura tridimensional del genoma y su naturaleza

flexible, que facilita los contactos físicos entre elementos reguladores y promotores mediante bucles de cromatina (**Figura 4**).

En la última década, la integración de tecnologías -ómicas ha revolucionado el estudio de los mecanismos regulatorios que controlan procesos biológicos determinados. En particular, la combinación de datos transcriptómicos (ARN-seq) con datos de accesibilidad de la cromatina (ATAC-seq) permite no solo identificar genes diferencialmente expresados entre poblaciones neuronales, sino también inferir qué regiones del genoma están funcionalmente accesibles e identificar potenciales FT responsables de la regulación en determinados momentos. Así, las estrategias multi-ómicas están permitiendo completar nuestra visión del programa transcripcional que rige cada fase del desarrollo neuronal.

En el contexto de la guía axonal, pequeñas variaciones en la expresión de un subconjunto de genes —por ejemplo, receptores de señales guía o moduladores de la maquinaria citoesquelética— pueden alterar drásticamente las decisiones de navegación axonal. La activación transitoria de determinados FT puede modificar el repertorio de receptores presentes en el cono de crecimiento y, por tanto, su sensibilidad a señales atractivas o repulsivas. Este nivel de regulación fina explica cómo neuronas con origen común pueden adquirir identidades funcionalmente distintas y proyectar sus axones hacia destinos divergentes.

Avances en técnicas como CUT&RUN, ChIP-seq, ATAC-seq o Hi-C están permitiendo trazar con mayor precisión las redes reguladoras que definen la identidad de subpoblaciones neuronales. En conjunto, el estudio de los mecanismos epigenéticos y transcripcionales que controlan la guía axonal proporciona una perspectiva integradora que conecta señales extracelulares, procesamiento intracelular y función.

2.3 El cruce de la línea media como modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la guía axonal

En animales con simetría bilateral, el cruce o no cruce de la línea media representa una decisión crítica en la trayectoria de muchos axones durante el desarrollo del sistema nervioso, ya que

determina la correcta organización de los circuitos neuronales entre ambos hemisferios del cerebro. Esta bifurcación, por tratarse de una decisión binaria y por tanto relativamente simple, ofrece un excelente modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la navegación axonal en mamíferos. En particular, dos sistemas han sido ampliamente utilizados por su accesibilidad, relevancia funcional y riqueza experimental: (1) las neuronas comisurales espinales, cuyos axones cruzan la línea media en la placa del suelo, y (2) las células ganglionares de la retina (CGR), cuyos axones deciden si cruzan o no la línea media a la altura del quiasma óptico.

El modelo del quiasma óptico destaca como uno de los más potentes para el estudio de la guía axonal por su accesibilidad y su relativa simplicidad. En el desarrollo del sistema visual de mamíferos, las CG se diferencian en la retina y extienden sus axones a través del nervio óptico hasta alcanzar el quiasma, donde la mayoría de ellos cruzan al hemisferio contralateral (CGRc), mientras que una subpoblación menos abundante evita el cruce y proyecta ipsilateralmente (CGRi). Esta bifurcación es esencial para el desarrollo de la visión binocular, ya que permite que cada hemisferio cerebral reciba información de ambos ojos, facilitando la integración de señales visuales en profundidad y contribuyendo a la percepción tridimensional del entorno.

Un rasgo distintivo del sistema visual de mamíferos es que la posición espacial de los cuerpos celulares en la retina predice su trayectoria: las CGRi están restringidas a la región ventrotemporal de la retina, mientras que las CGRc ocupan el resto de la retina. Esta separación anatómica ha permitido estudios moleculares comparativos entre ambas subpoblaciones para identificar FT y receptores diferencialmente expresados en cada una de ellas.

Entre los mecanismos moleculares que rigen la guía axonal en la línea media se encuentran las interacciones entre receptores Eph y sus ligandos efrinas, que actúan como señales de repulsión o atracción en las inmediaciones del quiasma óptico. En las CGRi, la expresión del receptor EphB1 en el cono de crecimiento y la presencia de efrina-B2 en las células de glía localizadas en la línea media inducen la repulsión del axón para impedir el cruce, mientras que las CGRc carecen de esta señalización no son repelidas y continúan su camino cruzando la línea media (Williams et al., 2003;

Petros et al., 2008). Este código molecular se ha validado funcionalmente mediante modelos de pérdida y ganancia de función en ratón (**Figura 5**).

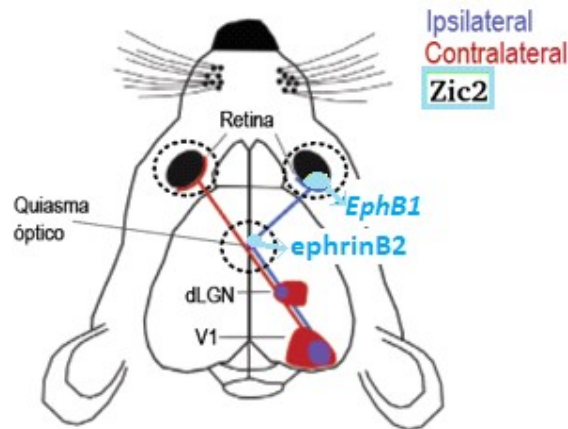


Figura 5. Sistema visual del ratón. Las CGRi se localizan en la región ventrotemporal de la retina. Estas células expresan Zic2 así como el receptor EphB1. El ligando de este receptor, efrina-B2, se expresa en células de glía localizadas en la línea media y provocan una señal de repulsión que impide el cruce a las neuronas que expresan EphB1 (ipsilaterales) pero no a las que no lo expresan (contralaterales).

El quiasma óptico representa, por tanto, un nodo crítico de decisión en la navegación axonal, y permite estudiar cómo la identidad celular, determinada por programas genéticos y epigenéticos, se traduce en decisiones morfológicas que afectan a la organización global de los circuitos neuronales. Una vez que los axones de las CGR atraviesan (o evitan) la línea media, continúan su trayectoria a través de los tractos ópticos hasta alcanzar núcleos diana del cerebro como el núcleo geniculado lateral (NGL) en el tálamo o el colículo superior (CS) en el mesencéfalo (Guido, 2018; Ellis et al., 2016). En estos núcleos, los terminales axónicos arborizan extensamente y forman conexiones sinápticas que posteriormente serán refinadas durante el período postnatal temprano mediante un proceso dependiente de la actividad espontánea. Este refinamiento sináptico es esencial para establecer circuitos maduros, precisos y funcionales. Las neuronas del NGL proyectan a la corteza visual primaria (V1), completando así la vía visual principal (**Figura 5**).

2.4 Factores de transcripción involucrados en la diferenciación de las CGR ipsilaterales y contralaterales

Durante las primeras fases del desarrollo ocular, las células progenitoras del neuroepitelio retinal mantienen un estado multipotente y proliferativo regulado por la expresión de factores de transcripción clave como Pax6, Rax, Six3, Six6, Vsx2 y Sox2 (Turner & Cepko, 1987). Estos factores establecen un entorno permisivo para la generación de los distintos tipos neuronales de la retina, incluyendo las CGR que junto con las horizontales son las primeras neuronas de la retina en diferenciarse.

La especificación del linaje de CGR está estrechamente ligado a la expresión de Atoh7 (también conocido como *Math5*), un factor proneural cuya función es esencial para iniciar el programa genético de estas neuronas. En ausencia de Atoh7, se observa una pérdida casi completa de CGRs, lo que indica su papel determinante en el compromiso de este linaje (Brown et al., 2001; Wang et al., 2001). Posteriormente, otros factores como Isl1, Neurod1, Sox4 y Sox11 cooperan en la progresiva diferenciación y maduración de estas neuronas, aunque los detalles de sus funciones aún han sido completamente definidos.

A medida que las CGRs adquieren su identidad madura, se segregan en dos subpoblaciones según su patrón de proyección a la altura del quiasma óptico: las CGRc y las CGRi. Estas dos poblaciones se distinguen molecularmente por la expresión diferencial de factores de transcripción previamente descritos: Zic2 en las CGRi, que se localizan en la retina ventrotemporal, y Pou4f1 (también conocido como *Brn3a*), en las CGRc, que se distribuyen por el resto de la retina (Herrera et al., 2003; Xiang et al., 1998; Badea et al., 2011).

Experimentos de ganancia (GOF) y pérdida (LOF) de función han demostrado el papel de Zic2 como regulador principal de la lateralidad axonal en el quiasma óptico ya que la delección de Zic2 en embriones de ratón conlleva la desaparición de la proyección ipsilateral, mientras que su expresión ectópica en CGRc, inducida por electroporación *in útero*, reprograma sus axones para que proyecten ipsilateralmente, invirtiendo su trayectoria normal (Herrera et al., 2003). Esta función de Zic2 se correlaciona con el grado de visión binocular entre especies: mamíferos con visión frontalizada y mayor número de proyecciones ipsilaterales, como el hurón, muestran niveles más altos de Zic2 en la retina en desarrollo. En contraste, especies como el pollo —que carecen de

proyecciones ipsilaterales— no expresan Zic2 en la retina. Un ejemplo especialmente ilustrativo es el de *Xenopus laevis*: durante la fase de renacuajo, sin fibras ipsilaterales ni expresión de Zic2, sus ojos son laterales; sin embargo, durante la metamorfosis, al cambiar su estilo de vida y adoptar una visión más frontal, desarrollan proyecciones ipsilaterales y comienzan a expresar Zic2 en las CRGs (Herrera et al., 2003).

Además de su función en las neuronas retinales, Zic2 regula la repulsión a la línea media en otros contextos del sistema nervioso central. En neuronas comisurales de la médula espinal y neuronas talamocorticales —que normalmente proyectan ipsilateralmente—, la pérdida de Zic2 conduce al cruce aberrante de la línea media (Escalante et al., 2013), lo que refuerza su papel como modulador clave de la identidad de proyección axonal (**Figura 6**).

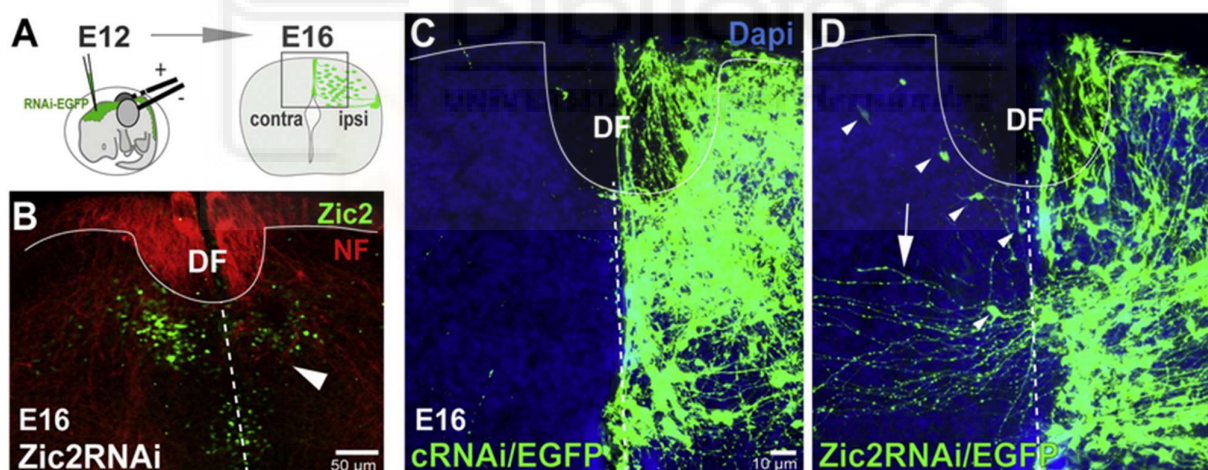


Figura 6. Zic2 es necesario y suficiente para determinar ipsilateralidad axonal en la médula espinal. (A) Representación esquemática de los procedimientos experimentales. Embriones E12 fueron electroporados con Zic2RNAi y utilizados en E16 para el análisis de la cantidad de fibras contralaterales. El área cuadrículada marca la región analizada. (B) Una sección transversal de la médula espinal de un embrión de ratón E16 electroporado unilateralmente con Zic2RNAi muestra la disminución efectiva de la proteína Zic2 (verde) en el lado electroporado (flecha blanca). La línea discontinua marca la línea media. En rojo, tinción de neurofilamento (NF). (C y D) Secciones transversales de la médula espinal de embriones de ratón E16 electroporados en E12 con plásmidos de ARNi/EGFP de control (ARNi/EGFP) o plásmidos que codifican Zic2ARNi/EGFP. La regulación a la baja de Zic2 provoca un cruce aberrante masivo (flecha blanca) en la línea media dorsal (línea blanca discontinua). Las puntas de flecha señalan los cuerpos celulares de las neuronas mal situadas en el lado contralateral a la electroporación.

Entre las dianas transcripcionales de Zic2 que median su efecto en la guía axonal se encuentra EphB1, un receptor tirosina quinasa cuya expresión está restringida a la retina ventrotemporal y

cuya expresión se ha propuesto que está regulada positivamente por Zic2 ya que en embriones mutantes para Zic2, la expresión de EphB1 está marcadamente reducida (García-Frigola et al., 2008) y que como se ha mencionado anteriormente, contribuye a provocar la repulsión de estos axones en la línea media (**Figura 5**). También se ha observado que Unc5c, uno de los receptores de Netrin1 que se expresa en una subpoblación de CGRc, se encuentra ectópicamente extendido hacia la retina ventrotemporal en embriones mutantes para Zic2, lo que sugiere que Zic2 actúa como represor de este receptor en las CGRi (Murcia-Belmonte et al., 2019).

Otros receptores de moléculas de guía también muestran una distribución diferencial entre CGRi y CGRc, aunque su regulación transcripcional directa aún no se ha caracterizado. Por ejemplo, Neuropilina-1 (Nrp1) que es un receptor de Semaforina 3D (Sema3D), se expresa selectivamente en las CGRi. En *Danio rerio*, la interacción Nrp1a–Sema3D regula la bifurcación axonal en el quiasma óptico (Dell et al., 2013; Kita et al., 2014). En mamíferos, Nrp1 también es crítico para la guía axonal, aunque su ligando principal en este contexto es VEGF-A, expresado por células gliales de la línea media (Gu et al., 2003; Erskine et al., 2011).

En cuanto a los reguladores “aguas arriba” de Zic2, el factor de transcripción FoxD1 se ha propuesto como candidato clave. Este factor de transcripción se expresa en progenitores de la retina temporal y es esencial para determinar la identidad de esta región (Herrera et al., 2004). Las retinas de ratones mutantes para FoxD1 muestran ausencia completa de Zic2 y de EphB1 (Carreres et al., 2013).

Los factores de transcripción de la familia SoxC (Sox4, Sox11 y Sox12) también participan en la diferenciación de las CGRs. Estos genes inhiben la vía de señalización Notch, favoreciendo la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal. Estudios en ratones que carecen de los tres miembros de la familia SoxC revelan la aparición de proyecciones ipsilaterales ectópicas, lo que sugiere que los SoxC contribuyen a restringir la lateralidad axonal mediante la activación de genes como Plexin-A1 y Nr-CAM, ambos expresados de forma específica en las CGRc (Kuwayama et al., 2012; Quina et al., 2005).

Finalmente, otros factores como Pou4f1 (Brn3a) y Isl2 también han sido asociados a la identidad de las CGRc ya que ambos se expresan en CGRc pero no en CRGi. Una función potencial de Brn3a en guía axonal no ha sido definida (Quina et al., 2005) pero Isl2 —miembro de la familia LIM— parece restringir la proyección ipsilateral ya que su pérdida da lugar a un aumento anómalo de CRGi a expensas de las CGRc que nacen en las fases tardías de la neurogénesis retinal (Pak et al., 2004). En conjunto, estos datos delinean un paisaje muy complejo en la regulación de la especificación de la lateralidad axonal en las CGRs. Este control preciso es esencial para la correcta formación del circuito visual de mamíferos y proporciona un modelo único para entender cómo los programas de diferenciación neuronal se traducen en patrones específicos de conectividad funcional.



3. OBJETIVOS

Analizar los perfiles transcriptómicos y epigenéticos de las células ganglionares de la retina que presentan patrones de proyección divergentes a la altura del quiasma óptico, con el fin de identificar las familias de factores de transcripción, rutas de señalización y receptores específicos asociados a dichos patrones.



4. MATERIALES Y METODOS

A continuación, se describen los materiales y procedimientos experimentales empleados para la obtención de las muestras biológicas y la generación de los datos de secuenciación que posteriormente han sido utilizados en los análisis bioinformáticos. Aunque el foco principal de esta tesis se centra en el análisis computacional de dichos datos, considero esencial detallar las metodologías experimentales que los preceden, con el fin de proporcionar el contexto necesario para la correcta interpretación de los resultados y para asegurar la reproducibilidad del estudio. La descripción detallada de los análisis bioinformáticos realizados por mi en su totalidad (punto 4.7) se presenta al final de la sección.

4.1. Animales

En este estudio hemos utilizado las siguientes líneas de ratón: 1/ la línea ET33 Sert-Cre, en la que el promotor del transportador de serotonina (Sert, también conocido como *Slc6a4*) dirige la expresión de la enzima Cre-recombinasa (*Cre*) específicamente en células CGRi (Garcia-Frigola et al., 2010), obtenida del repositorio MMRRC (<http://www.mmrrc.org/strains/17260/017260.html>). 2/ La línea Pou4f2-Cre, proporcionada por el Dr. George Vann Bennet (Duke University), que expresa *Cre* bajo control del gen *Brn3b* (Pou4f2), característico de la población CGRc. Ambas líneas se cruzaron con una tercera línea reportera *Sun1GFP⁺* (Jackson Laboratories (stock #021039)). Estos animales expresan una proteína de membrana nuclear (Sun1) fusionada con GFP y Myc, cuya expresión está controlada por un *cassette* loxP-STOP-loxP. Esto nos permitió marcar de forma específica el núcleo de la población de células de interés, facilitando su posterior aislamiento e identificación para análisis transcriptómicos y epigenéticos.

Los experimentos de electroporación *in útero* se realizaron en embriones híbridos C57/DBA F1, criados en condiciones controladas en el Instituto de Neurociencias. Para experimentos con aves, se utilizaron huevos de gallina fecundados adquiridos localmente (Granja Santa Isabel, Córdoba).

4.2. Electroporación '*in utero*' e '*in ovo*'

La electroporación es una técnica que permite introducir ADN en células vivas mediante pulsos eléctricos. Se utilizó tanto en embriones de ratón (*in utero*) como en embriones de pollo (*in ovo*) para estudiar cómo ciertos genes afectan al desarrollo neuronal y a la trayectoria de los axones.

En ratón, se clonaron los factores de transcripción Lhx2 y Lhx9 en el vector pCAG, y se diseñaron secuencias de silenciamiento génico (shRNA) dirigidas a *Pou4f1* y *Sncg* utilizando la herramienta online de GenScript. Estas secuencias se insertaron en el vector pSilencer2.1. Tras microinyección del ADN en los ventrículos cerebrales o en la retina embrionaria, se aplicaron pulsos eléctricos para facilitar la entrada del ADN.

En pollo, se aplicó un protocolo similar, con inyección del ADN en el tubo neural tras tres días de incubación. Los embriones se analizaron dos días después de la electroporación.

4.3. Ensayo de luciferasa

El ensayo de luciferasa se empleó para evaluar la capacidad de una proteína de regular funcionalmente la transcripción de un gen diana. A diferencia de otras técnicas como ChIP o EMSA, que únicamente demuestran interacción física entre una proteína y el ADN, el ensayo de luciferasa permite establecer si dicha interacción tiene un efecto transcripcional, ya sea activador o represor, sobre el promotor analizado.

Este método se basa en el uso de la enzima luciferasa, cuya actividad genera una señal luminosa proporcional al nivel de transcripción. Para ello, se construyó un plásmido reportero en el que la región promotora del gen de interés se clonó por delante de la secuencia codificante de la luciferasa (plásmido pGL3basic). En paralelo, se utilizó un segundo plásmido que expresaba la proteína candidata, en este caso el factor de transcripción Pou4f1 (vector pCDN3). Ambas construcciones se co-transfectaron en células HEK293T, ampliamente utilizadas por su alta eficiencia de transfección y buena respuesta en ensayos reporteros.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. La transfección se realizó mediante el reactivo LipoD293 (SignaGen), con una eficiencia

superior al 90%. Las proporciones de ADN utilizado fueron 1:1:0,1 para el vector reportero, el vector de expresión de Pou4f1 y un control interno con el gen de la β -globina, respectivamente, con un total de 1 μ g de ADN por cada 100.000 células.

Veinticuatro horas tras la transfección, se midió la actividad de la luciferasa utilizando el sistema Dual Luciferase Assay (Promega). Las células fueron lisadas y el extracto se mezcló con el sustrato adecuado, generando una reacción luminosa que se cuantificó mediante un luminómetro. La intensidad de luz producida refleja directamente el nivel de actividad transcripcional inducido por la proteína en estudio sobre el promotor del gen analizado.

Este enfoque permitió establecer si Pou4f1 actúa como un activador o represor de la transcripción de genes diana, proporcionando así información funcional clave para interpretar los datos obtenidos por técnicas -ómicas a nivel de expresión génica.

4. 4. Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica

La hibridación in situ (ISH, por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para detectar y localizar ácidos nucleicos (ADN o ARN) en tejidos o células, utilizando sondas marcadas complementarias a la secuencia diana. Esta metodología permite analizar la expresión espacial de genes en tejidos preservados, resultando especialmente útil para validar hallazgos obtenidos mediante transcriptómica.

En este estudio, se utilizó hibridación in situ para detectar la expresión de ARN mensajero de genes de interés en tejido embrionario y postnatal de ratón, así como en médula espinal de embriones de pollo. Los embriones de ratón E16.5 fueron extraídos de hembras gestantes y perfundidos intracardialmente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Las cabezas se postfijaron durante 4 horas y se lavaron en PBS. A continuación, se procedió a la crioprotección mediante incubación en sacarosa al 30% (p/v), y posteriormente las muestras se incluyeron en compuesto OCT, se congelaron y almacenaron a -80 °C. Las secciones coronales de 20 μ m se obtuvieron con criostato y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Para los ratones postnatales electroporados, se realizó perfusión transcárdial con PBS y PFA al 4%, seguida de fijación cerebral prolongada y obtención de secciones de 80 μm mediante vibratomo. En el caso de embriones de pollo electroporados, la médula espinal se fijó por inmersión en PFA al 4% durante 2 horas y se seccionó también con vibratomo. La hibridación in situ se llevó a cabo siguiendo protocolos previamente descritos (Schaeren-Wiemers N. et al. 1993). Para la detección del ARNm de *Nrp2* en ratón se utilizó una ribosonda proporcionada por la Dra. Lynda Erskine.

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica que permite la detección de proteínas específicas (antígenos) en tejidos mediante el uso de anticuerpos. Estos anticuerpos están conjugados con enzimas o fluoróforos que permiten visualizar la localización del antígeno mediante microscopía, proporcionando información anatómica y celular sobre la expresión de proteínas de interés.

En este trabajo, se empleó inmunohistoquímica con anticuerpos fluorescentes (inmunofluorescencia) para validar la expresión y localización de proteínas identificadas por análisis bioinformáticos. Las secciones tisulares se sometieron inicialmente a recuperación antigénica en tampón citrato pH 6 durante 10 min a temperatura ambiente, seguida de una incubación de 20 min a 90 °C. Tras lavados con PBS, se trató el tejido con metanol al 10% durante 20 min y se bloqueó durante 1 h en PBS suplementado con 5% de suero bovino fetal, 0,25% de Triton X-100 y gelatina al 0,02%.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4 °C en la misma solución de bloqueo. Los anticuerpos utilizados fueron: pollo anti-GFP (Aves Labs), ratón anti-Pou4f1 (Millipore), conejo anti-Sncg (GeneTex), ratón anti-Sncg (Abnova) y conejo anti-Zic2 (laboratorio de Herrera) (Marcucci F. et al. 2016, Murillo B. 2015, Murcia-Belmonte V. et al. 2017, Tiveron MC et al. 2017). Para la detección, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 488, 546 y 647 (Invitrogen, Molecular Probes). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), permitiendo la visualización simultánea de la morfología nuclear y la señal proteica específica.

4. 5. Microscopía

Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 IX81 con el software FV10-ASW. Para la adquisición de imágenes del quiasma óptico, se utilizó un estereoscopio Leica MZ16F. Las imágenes correspondientes a la corteza electroporada se obtuvieron mediante un escáner de diapositivas Zeiss Axioscan.

4. 6. Cuantificación y análisis estadístico de los experimentos funcionales

Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM), que representa la precisión de la estimación de la media poblacional. Para cuantificar las proyecciones retinianas a nivel del quiasma óptico, se definieron regiones de interés (ROIs) cuadradas sobre la anchura del nervio óptico adyacente a la retina electroporada, el nervio óptico contralateral, así como los tractos ópticos ipsilateral y contralateral en regiones próximas al quiasma. La intensidad de fluorescencia en cada ROI se midió utilizando el software Fiji (ImageJ) y se normalizó frente al nivel de fondo. Posteriormente, se calculó y graficó el porcentaje de intensidad de fluorescencia relativa en cada ROI respecto al nervio óptico del lado electroporado.

La cuantificación de proyecciones en secciones del cerebro y la médula espinal siguió el mismo procedimiento: se definieron ROIs en las regiones ipsilateral y contralateral, y se midió la intensidad de fluorescencia para evaluar la distribución de axones proyectados.

El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS, GraphPad Prism 8.0 o R (versión 4.0.4). Para la comparación entre dos grupos se emplearon pruebas t-Student no apareadas de dos colas; para comparaciones entre tres o más grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguido de pruebas post hoc de Bonferroni. La significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$ (denotado como $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$).

4.7 Obtención de muestras para *ARN-seq*, *ATAQ-seq* y *Chip-seq*

El ARN-seq es una técnica que utiliza la secuenciación de última generación para cuantificar las moléculas de ARN en una muestra biológica, proporcionando una imagen instantánea de la expresión génica en la muestra, también conocida como transcriptoma. Para esta técnica, se

diseccionaron las retinas de embriones en E16.5 en tampón HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . En el caso de las retinas de embriones Pou4f2SunGFP se eliminó la región ventrotemporal por disección (para evitar la contaminación por células ipsilaterales). Las retinas fueron digeridas y desagregadas con la ayuda de una pipeta P1000 utilizando una solución enzimática compuesta por colagenasa, tripsina 0,125%, BSA 0,2 mg/mL y ADNase 1µl/mL durante 25' a 37°C. La digestión se detuvo añadiendo DMEM con suero bovino fetal al 10% y se comprobó la disgregación del tejido al microscopio. La suspensión se filtró y se centrifugó a 1.250 rpm durante 5' a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió y se clasificó por citometría de flujo para recoger las células de interés. Se extrajo el ARN de las células clasificadas utilizando el kit de aislamiento de ARN PicoPure™ (Arcturus) y se crearon bibliotecas que se secuenciaron en un secuenciador HiSeq 2500 (Illumina, Inc). Las células Sun1-GFP+ de retinas de embriones Slc6a4SunGFP y Pou4f2SunGFP se aislaron mediante citometría de flujo (FACS) a E16.5 que es el momento en que la mayoría de los axones visuales se acercan al quiasma óptico para cruzar o evitar la línea media. A continuación, se extrajo el ARN de las células seleccionadas y procesaron las muestras para su secuenciación masiva (ARN-seq).

Para identificar nuevos factores transcripción potencialmente implicados en la guía de axones, decidimos buscar diferencias en la accesibilidad y ocupación de la cromatina entre las CGRc y las CGRi utilizando el Ensayo de Cromatina Accesible por Transposasa acoplado a secuenciación masiva (ATAC-seq) (Buenrostro JD et al. 2013), un método popular para determinar la accesibilidad de la cromatina en todo el genoma. Para ello, se recogieron retinas de embriones Slc6a4SunGFP y Pou4f2SunGFP y los núcleos Sun1-GFP+ se sortearon por citometría de flujo mediante fluorescencia (FACS) (Fernández-Albert J. et al. 2019). De nuevo, como se describió para el ARN-seq, en el caso de las retinas Pou4f2SunGFP previamente se eliminó la parte periférica VT.

Al secuenciar regiones de cromatina abierta, esta técnica nos ayuda a descubrir cómo el empaquetamiento de la cromatina y otros factores afectan a la expresión génica. El ATAC-seq se realizó en réplicas biológicas (n = 3) y cada réplica contenía 50.000 células de 8-10 embriones para

cada muestra contralateral y de 30-40 embriones para cada muestra ipsilateral. Las retinas de embriones en E16.5 se diseccionaron en tampón HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . En el caso de las retinas de los embriones Pou4f2SunGFP se eliminó la región ventrotemporal por disección, para evitar la contaminación por células ipsilaterales. Las retinas fueron digeridas y desagregadas con la ayuda de una pipeta P1000 utilizando una solución enzimática compuesta por colagenasa, tripsina 0,125%, BSA 0,2 mg/mL y ADNase 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ durante 25 min a 37°C. La digestión se detuvo añadiendo DMEM con suero bovino fetal al 10% y se comprobó la disgregación del tejido al microscopio. La suspensión se filtró y se centrifugó a 1250 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió y se clasificó por citometría de flujo para recoger 50.000 células verdes fluorescentes. La suspensión celular se centrifugó a 500 g durante 5 min a 4°C y se trató con tampón de lisis frío (10mTrisCl pH7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl_2 , 0,1% Igepal). La suspensión se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante, y nos aseguramos de que el pellet fuera colocado en hielo. Después continuamos con la reacción de transposasa y purificación siguiendo el protocolo como (Buenrostro et al. 2013, 2015). A continuación, las bibliotecas fueron purificadas y secuenciadas por un secuenciador Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc). Este cribado identificó más de 150.000 regiones accesibles en la cromatina en todas las CGR.

La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq) permite identificar regiones genómicas donde proteínas específicas, como factores de transcripción (FT) o modificaciones de histonas, están unidas al ADN. En nuestro estudio, realizamos ChIP-seq para detectar las uniones del FT Zic2. Para los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Seq) en neuronas de retina y médula espinal de embriones de ratón en día gestacional 16 (E16) las muestras se enviaron para secuenciación al Centro de Regulación Genómica (CRG) en Barcelona. El procedimiento experimental comenzó con la disección de retinas completas o médulas espinales de embriones E16. Estos tejidos se fragmentaron y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de neutralización con glicina. Después, la cromatina se fragmentó mediante un biorruptor (Diagenode) y se inmunoprecipitó siguiendo el protocolo detallado en STAR Methods. La cromatina diluida se incubó toda la noche a 4°C con un

anticuerpo específico contra Zic2 (Millipore, AB15392) o con suero preinmune IgG de isotipo control (Abcam, ab27478). Posteriormente, la cromatina inmunoprecipitada se purificó usando el kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen). Para minimizar la variabilidad biológica, cada muestra independiente se obtuvo a partir de la combinación de numerosos ratones (176 para retina y 68 para médula espinal). Finalmente, se prepararon las bibliotecas de secuenciación a partir del ADN purificado de ChIP con anti-Zic2, control IgG y muestras de entrada, siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina). Las bibliotecas se secuenciaron en modo single-end en un secuenciador HiSeq2000 utilizando la química Flow Cell v3, con una longitud de lectura de 50 pb (1 x 50). Se documentó cuidadosamente el método de preparación, el tamaño de las bibliotecas y la asignación al genoma de referencia para garantizar la calidad y reproducibilidad del análisis.

4.8. Análisis bioinformático de los datos de ARN-seq y ATAC-seq

4.8.1 ARN-seq

a) Control de calidad

La calidad inicial de las lecturas obtenidas tras la secuenciación de las muestras de ARN-seq fue evaluada utilizando la herramienta FastQC (Andrews, 2010). Esta aplicación genera una serie de métricas de control de calidad, como la distribución de calidad de base, contenido GC, presencia de adaptadores, secuencias duplicadas o sobre-representadas, entre otras. En nuestro caso, todas las muestras presentaron una calidad elevada a lo largo de todas las posiciones de lectura, sin presencia detectable de adaptadores o contaminaciones, por lo que no fue necesario aplicar procesos de filtrado o recorte (*trimming*).

b) Alineamiento

Posteriormente, las lecturas de ARN-seq se mapearon contra el genoma de referencia del ratón mm10 (GRCm38) utilizando HISAT2 v2.1.0 (Kim et al., 2015). HISAT2 es un alineador diseñado

específicamente para lecturas de ARN-seq. A diferencia de otros alineadores como Bowtie2 o BWA, HISAT2 está optimizado para el alineamiento empalmado (*spliced alignment*), crucial en transcriptómica, ya que permite detectar lecturas que abarcan límites de exones (splicing). Utiliza un índice jerárquico basado en la transformada de Burrows-Wheeler (BWT) y estructuras de tipo FM-index, combinando un índice global del genoma con múltiples índices locales para mejorar la eficiencia en regiones altamente variables o con múltiples isoformas.

Una vez alineadas las lecturas, se procedió a la cuantificación de genes utilizando HTSeq v0.11.1 (Anders et al., 2015). HTSeq cuenta las lecturas alineadas que se superponen con genes anotados (en nuestro caso, anotaciones de Ensembl release GRCm38.89), generando una matriz de recuentos por muestra (raw counts). Para este paso también se requirió un archivo de diseño experimental indicando la condición o grupo experimental de cada muestra.

c) Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete DESeq2 v1.26.0 (Love et al., 2014) en el entorno R (v3.6.1, 2019) y Bioconductor v3.10. En primer lugar, se aplicó la función `filterByExpr`, que permite excluir genes con expresión muy baja, lo cual reduce el ruido estadístico y mejora la sensibilidad del análisis. DESeq2 utiliza un modelo estadístico basado en la distribución binomial negativa para ajustar la variabilidad observada entre réplicas biológicas. Para la normalización, se estiman factores de tamaño por muestra mediante la mediana de ratios entre los *counts* de cada gen y su media geométrica, lo que permite corregir las diferencias en profundidad de secuenciación o composición de bibliotecas.

Una vez normalizados los datos, el análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con la función DESeq, que ajusta un modelo para cada gen e infiere diferencias de expresión entre condiciones experimentales. Los resultados incluyen valores de *log2 fold change*, error estándar, y valores de significancia estadística ajustados por la corrección de Benjamini-Hochberg para el control de la tasa de falsos positivos (*FDR*) que es llamado P valor ajustado (*Padj*). Se consideraron genes

diferencialmente expresados aquellos con un $P_{adj} < 0.1$, englobados en una tabla de genes diferencialmente expresados (*DEGs*)

La separación clara entre condiciones biológicas se evaluó mediante análisis de componentes principales (*PCA*) y la matriz de distancias euclidianas entre muestras mediante la correlación de Pearson, confirmando la coherencia y reproducibilidad de los datos. Los análisis y gráficos fueron generados mediante scripts personalizados en R y Bash. Las muestras están disponibles públicamente en el repositorio GEO (GSE184275).

La visualización de resultados se realizó mediante distintos tipos de gráficos: gráficos de dispersión, gráficos de volcán, mapas de calor (*heatmaps*) y perfiles de expresión génica. Para obtener representaciones visuales detalladas de genes individuales, se generaron archivos bigWig a partir de los archivos BAM ordenados e indexados utilizando la herramienta bamCoverage del paquete DeepTools v3.1.3 (Ramírez et al., 2016). Se ignoraron lecturas duplicadas, se aplicó normalización por RPKM y se extendieron las lecturas en función de la longitud media del fragmento. Estos archivos bigWig fueron visualizados en el visor de genomas IGV v2.3.72 (Robinson et al., 2011), lo que permitió comparar visualmente los niveles de expresión en loci específicos entre muestras.

d) Análisis de enriquecimiento funcional

Finalmente, para obtener información funcional sobre los genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando la base de datos *Gene Ontology* (GO) a través de la plataforma PANTHER (Mi et al., 2019). Se aplicó la prueba exacta de Fisher con corrección de Benjamini-Hochberg (*FDR*), seleccionando términos significativamente enriquecidos con $P_{adj} < 0.1$, ratio de enriquecimiento > 2 , y grupos de entre 3 y 2000 genes por término. Este análisis permitió identificar procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares asociados con los genes más relevantes de nuestro estudio.

a) Control de calidad

Las muestras de ATAC-seq obtenidas mediante secuenciación de última generación se recibieron en formato *FASTQ*, un formato estándar que contiene tanto las secuencias de nucleótidos leídas

(reads) como la información de calidad asociada a cada base. Para evaluar la calidad inicial de estas lecturas sin procesar, se utilizó el software FastQC (Andrews, 2010), que permite realizar controles de calidad rápidos y exhaustivos. FastQC evalúa parámetros clave como la calidad de las bases a lo largo de las lecturas, la presencia de adaptadores, la distribución de contenidos GC, duplicados y la complejidad de la biblioteca. En nuestro caso, las muestras mostraron una calidad muy alta, sin presencia detectable de adaptadores o artefactos técnicos, lo que permitió continuar con el análisis sin necesidad de preprocesamiento adicional.

b) Alineamiento

Para la alineación de las lecturas a un genoma de referencia, en este caso el genoma del ratón mm10, se empleó Bowtie2 v2.3.4.2 (Langmead y Salzberg, 2012), un alineador especializado en secuencias cortas de ADN. Bowtie2 es reconocido por su alta velocidad y bajo consumo de memoria RAM, además de su precisión para mapear lecturas a genomas completos. Dado que las muestras correspondían a *ATAC-seq* (Assay for Transposase-Accessible *Chromatin* using sequencing), es decir, ADN y no ARN, no fue necesario usar alineadores que soporten lecturas empalmadas (spliced alignment). Bowtie2 genera los archivos de salida en formato SAM (Sequence Alignment/Map file), que es un formato de texto plano que describe el alineamiento de cada lectura con respecto al genoma.

Posteriormente, los archivos SAM se procesaron con PicardTools v2.18.21 (Broad Institute, 2019) para eliminar lecturas duplicadas que podrían deberse a la amplificación por *PCR*. La eliminación de duplicados es esencial para evitar sesgos en la cuantificación de accesibilidad. Luego, los archivos de alineación se convirtieron a formato binario *BAM*, se clasificaron e indexaron utilizando SAMtools v1.9 (Li et al., 2009), lo que permite un acceso más eficiente a las regiones genómicas y facilita la manipulación posterior. Además, para normalizar la profundidad de secuenciación entre muestras, se realizó un *downsampling* a un número fijo de lecturas. Como criterio de calidad adicional, se filtraron los alineamientos con una calidad de mapeo (MAPQ, Mapping Quality) inferior a 20, excluyendo así lecturas que podrían mapear a múltiples regiones del genoma o con baja

confiabilidad. Esto es importante para evitar sesgos que podrían inflar artificialmente la señal en determinadas regiones del genoma.

c) Análisis de Accesibilidad diferencial

A continuación, se realizó la llamada de picos para identificar regiones de accesibilidad cromatínica representativas de sitios reguladores activos, utilizando la herramienta MACS2 (Zhang et al., 2008), que es un estándar para este tipo de análisis. La llamada de picos se hizo con los siguientes parámetros:

```
macs2 callpeak -t <ATAC-seq.bam> -f BAM -n <output_prefix> --nomodel --shift -100 --extsize 200 --keep-dup all --call-summits -t <archivo.bam>: archivo BAM con las lecturas alineadas, -f BAM: especifica el formato de entrada, -n <prefijo_salida>: nombre base para los archivos de salida, --nomodel: desactiva la construcción automática del modelo de desplazamiento, ya que en ATAC-seq el tamaño y patrón de fragmentos no siguen el modelo estándar de ChIP-seq, --shift -100: desplaza las lecturas 100 bases hacia atrás, para centrar la señal en el sitio exacto donde la transposasa cortó el ADN, --extsize 200: extiende la lectura a 200 bases, que corresponde aproximadamente al tamaño medio de fragmentos insertados, --keep-dup all: mantiene todos los duplicados, considerando que algunos pueden ser biológicamente relevantes en ATAC-seq, ya que la enzima transposasa Tn5 que se utiliza puede generar duplicados biológicos legítimos, --call-summits: permite identificar y reportar los puntos con máxima señal (cumbres) dentro de los picos llamados.
```

Una vez obtenidas las regiones accesibles (picos), se procedió al análisis de accesibilidad diferencial obteniendo las regiones accesibles de la cromatina (DARs) utilizando el paquete DiffBind v2.6.6 (Ross-Innes et al., 2012) en R. Este análisis detecta diferencias significativas en la accesibilidad de la cromatina entre grupos experimentales, aplicando un criterio estadístico con una tasa de falsos positivos (FDR) inferior al 5% ($FDR < 0.05$) y un cambio absoluto logarítmico en base 2 mayor a 1 ($|\log_2FC| > 1$), que representa al menos un cambio de 2 veces en la accesibilidad.

Para asignar funcionalmente las regiones accesibles, se anotaron los picos a los genes más cercanos según la base de datos Ensembl GRCm38.89 usando el paquete ChIPpeakAnno v3.20.1 (Zhu et al., 2010). Esta anotación permitió relacionar cambios en accesibilidad con genes específicos, facilitando análisis posteriores.

d) Análisis de Motivos enriquecidos

Para identificar factores de transcripción potencialmente reguladores, se llevó a cabo un análisis de motivos (*motif enrichment*) con HOMER v4.11 (Heinz et al., 2010), usando la función findMotifsGenome.pl con configuración por defecto y el parámetro mask para eliminar secuencias repetitivas que podrían sesgar el análisis. HOMER compara el conjunto de secuencias de picos con un fondo para identificar motivos de FT que estén sobrerrepresentados. El método usa un modelo ZOOPS (*zero or one occurrence per sequence*) y aplica una prueba hipergeométrica para calcular la significancia del enriquecimiento, una prueba estadística que se utiliza para determinar si un motivo (por ejemplo, un sitio de unión a un factor de transcripción) aparece con más frecuencia de la esperada por azar en un conjunto de secuencias.

e) Análisis de footprinting (ocupación de nucleosomas)

El análisis de motivos se complementó con el análisis de huellas (*footprinting*) utilizando HINT v0.12.3 (Gusmao et al., 2016), que identifica con alta resolución la ocupación de nucleosomas y sitios específicos donde factores de transcripción protegen el ADN de la transposasa. HINT modela estadísticamente la distribución de cortes para predecir la presencia y ocupación de FT en las regiones accesibles, y permite comparar perfiles de unión entre condiciones.

Para la visualización de los datos de accesibilidad, se generaron archivos bigWig a partir de BAM usando bamCoverage de deepTools v3.1.3 (Ramírez et al., 2016), con parámetros que ignoran lecturas duplicadas y normalizan la señal mediante RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads). Los archivos bigWig permiten la visualización eficiente de datos de cobertura genómica en navegadores genómicos como IGV v2.3.72 (Robinson et al., 2011).

Adicionalmente, se usó bedtools genomecov v2.26.0 (Quinlan y Hall, 2010) para crear perfiles de cobertura genómica que permiten visualizar la intensidad de señal de accesibilidad en todo el genoma, facilitando el análisis exploratorio y la comparación visual entre condiciones que indica cuánta "señal" hay en cada parte del genoma.

f) Análisis de enriquecimiento funcional

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para identificar las rutas y procesos biológicos relacionados con las regiones accesibles, utilizando la base de datos *Gene Ontology* (GO) y otras bases de vías metabólicas.

4.8.3 ChIP-seq

a) Control de calidad

El primer paso en el análisis bioinformático fue el control de calidad de las lecturas brutas mediante FastQC (Andrews, 2010), una herramienta que evalúa parámetros clave de la calidad de secuenciación. Posteriormente, se filtraron las secuencias que contenían bases de baja calidad y adaptadores residuales utilizando el paquete Repitools en R (Statham et al., 2010), con el fin de mejorar la fiabilidad de los datos para el análisis posterior.

b) Alineamiento

Las lecturas filtradas se alinearon contra el genoma de referencia del ratón (mm10) usando Bowtie2 versión 2.3.4.2 (Langmead y Salzberg, 2012), un alineador eficiente para lecturas cortas de ADN, que ofrece un buen compromiso entre velocidad y precisión. Para garantizar la calidad de los alineamientos, se aplicó un filtro de calidad de mapeo (MAPQ) > 20, eliminando lecturas que se mapean de forma no única o con baja confianza.

Los archivos resultantes en formato BAM fueron normalizados a un número fijo de lecturas utilizando SAMtools versión 1.9 (Li et al., 2009), herramienta fundamental para la manipulación y procesamiento de archivos de alineamiento. Esto permite controlar la profundidad de secuenciación y evitar sesgos entre muestras.

c) Identificación de las regiones de unión

Para la identificación de las regiones enriquecidas, o picos, que representan sitios de unión del FT Zic2, se empleó la herramienta MACS2 versión 2.1.1 (Zhang et al., 2008), con los siguientes parámetros:

`macs2 callpeak -t <ChIP-seq BAM file> -c <Control BAM file> -f BAM -g mm -n <output prefix> -p 1.00e-05 -bw 300 -m 10,30`. Donde -t: archivo BAM de la muestra ChIP, -c: archivo BAM de control (input o IgG), -g mm: tamaño efectivo del genoma de ratón, -p 1.00e-05: umbral de significancia para la detección de picos, -bw 300: ancho de banda para estimar el perfil de señal, -m 10,30: rango para modelar el tamaño de fragmentos.

El recuento de lecturas asignadas a regiones genómicas se realizó con featureCounts del paquete Rsubread v1.12.6 (Liao et al., 2014), permitiendo cuantificar la abundancia de señales ChIP en cada pico. Para considerar una región como significativamente regulada se establecieron los criterios de $FDR < 0.05$ y $|\log_2 \text{fold change}| > 1$, definiendo así picos diferencialmente enriquecidos.

El procesamiento y análisis posterior se ejecutaron mediante scripts personalizados en R ("Planting of a Tree", v3.6.1, 2019) y con herramientas de Bioconductor v3.10 (Huber et al., 2015). Dado que los picos detectados en retina y médula espinal coincidían en más del 95%, pero con señal más robusta en médula espinal y débil en retina, se decidió continuar el análisis con los datos de médula espinal.

Para la anotación funcional de los picos y su asociación con genes cercanos, se utilizó la referencia de genes de Ensembl (GRCm38.83) y el paquete ChIPpeakAnno v3.20.1 (Zhu et al., 2010).

La visualización de las regiones con señal de *ChIP-seq* se hizo mediante la herramienta bedtools genomecov v2.26.0 (Quinlan y Hall, 2010) para generar pistas de cobertura a nivel genómico. Además, se crearon archivos BigWig a partir de los archivos BAM ordenados e indexados mediante la función bamCoverage de Deeptools v3.1.3 (Ramírez et al., 2016), con normalización RPKM y exclusión de lecturas duplicadas.

Las pistas resultantes se visualizaron con el software IGV v2.3.72 (Robinson et al., 2011), permitiendo inspección detallada de las señales *ChIP* en regiones específicas del genoma.

d) Análisis de Motivos enriquecidos

El análisis de motivos de secuencia ("*motif analysis*") identifica secuencias de ADN sobrerrepresentadas en los picos, se empleó el software HOMER v4.11 (Heinz et al., 2010) junto con la suite MEME (Bailey et al., 2009). El descubrimiento "*de novo*" se realizó analizando una ventana de ± 75 pb alrededor del centro de cada pico, lo que corresponde a la longitud media del fragmento genómico.

La función findMotifsGenome.pl de HOMER se usó con configuración por defecto y el parámetro mask para eliminar secuencias repetidas, mejorando la fiabilidad del análisis. Los logos gráficos de los motivos enriquecidos se obtuvieron de la base de datos JASPAR 2020 (Fornes et al., 2020).

e) Análisis de enriquecimiento funcional

Finalmente, para interpretar la función biológica de los genes asociados a los picos, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional mediante ontología génica (GO) y análisis de vías metabólicas usando la plataforma PANTHER (Mi et al., 2019), en colaboración con *Gene Ontology Consortium*. El test estadístico utilizado fue la prueba exacta de Fisher con corrección por tasa de falsos descubrimientos de Benjamini-Hochberg (BH). Se consideraron términos GO significativos con $P_{adj} < 0.1$, ratio de enriquecimiento > 2 , y un mínimo de 3 genes en la categoría y número de genes del grupo de familias entre 3 y 2000.

4.8.4 Integración de técnicas multiómicas (ATAC-seq, ARN-seq y ChIPseq)

Para entender mejor cómo se regula la expresión génica y cómo cambia la dinámica de la cromatina en nuestro sistema biológico, integramos la información proveniente de distintos tipos de datos. Primero, evaluamos la relación predictiva entre las regiones de cromatina accesible

diferencialmente (*DARs*) y los cambios en la expresión génica usando *BETA* v1.0.7 (Wang et al., 2013), tomando como referencia los genes anotados en Ensembl (GRCm38.89).

A continuación, para cuantificar la asociación entre la señal de accesibilidad de la cromatina (*ATAC-seq*) y la expresión génica (*ARN-seq*), calculamos la correlación de Pearson entre ambas variables, evaluando así si los cambios en accesibilidad estaban directamente relacionados con los niveles de transcripción en esas regiones.

Para comprobar que la asociación entre los genes cercanos a los picos de *ATAC-seq* y la expresión diferencial no ocurría al azar, aplicamos pruebas exactas de Fisher, basadas en la distribución hipergeométrica, asegurando la significancia estadística de esta relación.

Respecto a los datos de ChIP-seq (Morenilla et al., 2020), los archivos de secuenciación se alinearon contra el genoma de referencia del ratón con Bowtie2. Partiendo de estas lecturas alineadas, identificamos las regiones enriquecidas inmunológicamente (picos) con el software MACS2. Utilizamos bedtools para evaluar la superposición entre intervalos genómicos y luego visualizamos estas alineaciones en IGV, centrándonos en genes de interés para comprender mejor la regulación específica.

5. RESULTADOS

5.1. Perfiles transcriptómicos de las CRGc y CRGi

Durante el desarrollo del sistema visual en mamíferos los axones de las CGRs deben cruzar al hemisferio contralateral o permanecer en el mismo lado del cerebro (ipsilateral) cuando alcanzan la línea media a la altura del quiasma óptico. Estas trayectorias divergentes están determinadas, al menos en parte, por diferencias moleculares entre las CGRs que proyectan de forma contralateral (CGRc) y aquellas que lo hacen ipsilateralmente (CGRi). Sin embargo, la caracterización transcriptómica y epigenética de estas dos subpoblaciones ha estado limitada por dificultades técnicas para identificarlas y separarlas de manera fiable. Las nuevas tecnologías -ómicas y a la identificación previa de genes específicos que se expresan en distintas poblaciones de CGRs nos han permitido ahora superar estas limitaciones y comparar los perfiles transcriptómicos de CGRc e CGRi durante el momento crítico en el que los axones deciden su trayectoria en la línea media. Para ello hemos empleado una estrategia genética basada en el uso de líneas de ratón transgénicas que permiten el marcaje específico de estas dos poblaciones celulares: cruzamos animales portadores del cassette reportero CAG-[Stop]-Sun1-GFP, insertado en el locus Rosa26 y activable por recombinación Cre, con dos líneas Cre específicas, una que marca la población ipsilateral (Slc6a4-Cre) y otra que marca todas las CGRs (Pou4f2-Cre) (**Figura 7A**). Tras la recombinación mediada por la Cre recombinasa, las células diana expresan una versión de la proteína de la envoltura nuclear Sun1 fusionada a GFP (Sun1-GFP), lo que permite su identificación y aislamiento mediante citometría.

La línea Slc6a4-Cre nos permitió etiquetar específicamente a las CGRi, ya que el gen Slc6a4, que codifica el transportador de serotonina (también conocido como Sert), se expresa de forma restringida en esta subpoblación desde el día embrionario E14, cuando los axones de estas neuronas aún no han alcanzado la línea media (Garcia-Frigola et. al 2010). Los ratones Slc6a4-cre::Sun1-GFP mostraban una clara señal de GFP confinada a la envoltura nuclear de células

localizadas en la región ventrotemporal (VT) periférica de la retina, consistente con la ubicación de las CGRi (**Figura 7B**).

Actualmente no se dispone de una línea Cre que marque exclusivamente las CGRc. Por esta razón, utilizamos la línea Pou4f2-Cre, que dirige la expresión de Cre bajo el control de Pou4f2 (también denominado Brn3b), un factor de transcripción que se expresa en todas las CGRs (Pan L. et al. 2005) y para obtener una población enriquecida en CGRc evitando la presencia de CGRi, eliminamos manualmente la región ventrotemporal (**Figura 7C**).

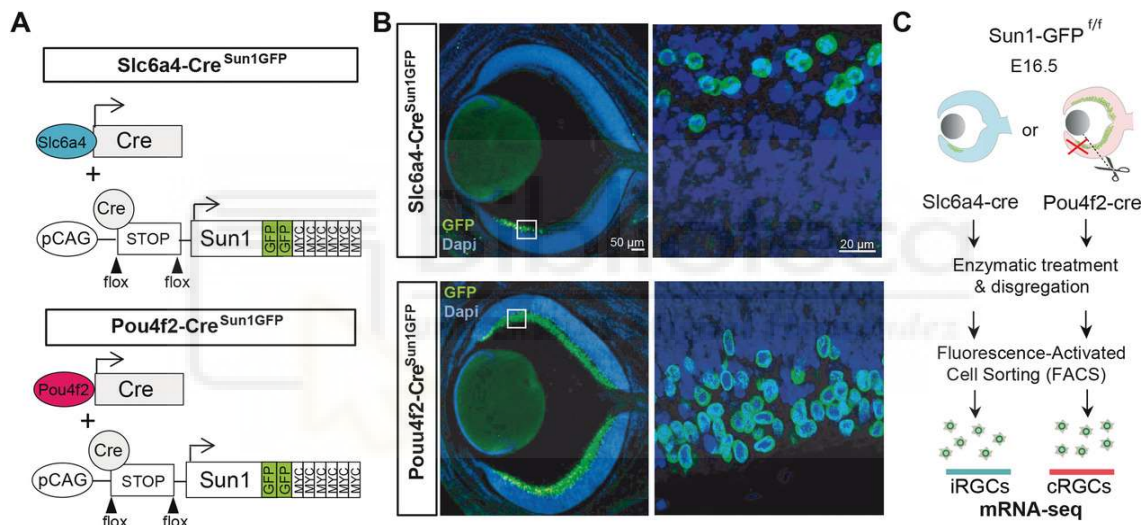


Figura 7. Líneas de ratón utilizadas para aislar las CGRi y las CGRc. A) Diagrama que muestra la generación de las líneas de ratón Pou4f2Sun1GFP y Slc6a4Sun1GFP. Las líneas cre recombinase-driver Slc6a4-Cre y Pou4f2-Cre se cruzaron con una línea reportera condicional que contiene un casete CAG-[Stop] seguido de la secuencia de ADNc de la proteína de la envoltura nuclear Sun1 fusionada a GFP. B) Secciones coronales de la retina de embriones E16.5 Slc6a4-CreSun1GFP o Pou4f2-CreSun1GFP inmunotinción contra GFP y contratinción con DAPI demuestran que esta línea etiqueta específicamente la envoltura nuclear de CGRi o CGRs, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m. A gran aumento del área cuadrada se muestran las CGRi marcadas. Barra de escala: 20 μ m. C) Método experimental utilizado para aislar las CGRi de embriones Slc6a4-CreSun1GFP y las CGRc de embriones Pou4f2-CreSun1GFP tras la eliminación de la región VT, para realizar ARNm-seq y comparar sus transcriptomas.

Una vez generadas ambas poblaciones etiquetadas genéticamente, procedimos a su aislamiento en el estadio embrionario E16.5, una etapa crucial en la que los axones de las CGRs se aproximan al quiasma óptico. Las células Sun1-GFP positivas fueron aisladas por citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) (**Figura 7C**, **Figura 8A**), extrajimos el ARN de estas células purificadas y

llevamos a cabo una secuenciación masiva de ARN (ARN-seq) para analizar y comparar de forma global los transcriptomas de las CGRc e CGRi (**Figura 7 y Figuras 8B, C**).

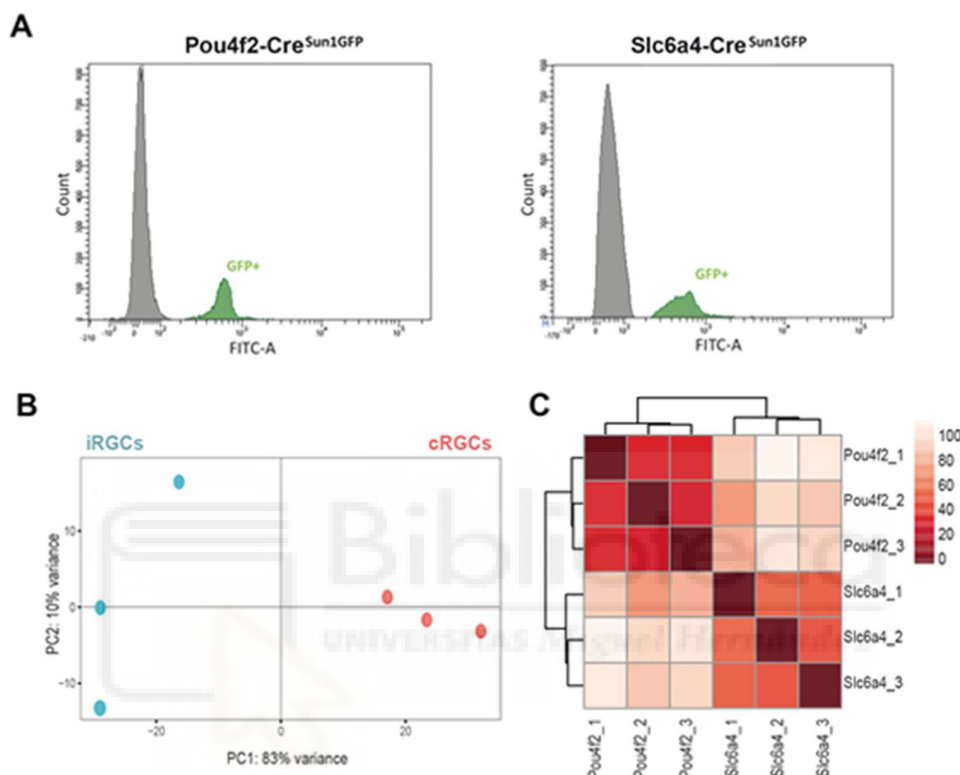


Figura 8. A. Señal de citometría de flujo para el aislamiento específico de células Sun1-GFP+ fluorescentes de retinas de embriones **Slc6a4SunGFP** y **Pou4f2SunGFP**. **B.** Análisis de componentes principales de las muestras de ARN-seq. **Slc6a4SunGFP** n=3; **Pou4f2SunGFP** n=3 muestras independientes. **C.** Correlación de Pearson entre muestras normalizadas de ARN-seq agrupadas por dendrograma euclidiano. **Slc6a4SunGFP** n=3; **Pou4f2SunGFP** n=3 muestras independientes.

El análisis transcriptómico reveló un total de 3968 genes diferencialmente expresados (*DEGs*) entre las dos poblaciones. De ellos, 2100 genes estaban enriquecidos en las CGRi, mientras que 1868 genes mostraban una mayor expresión en las CGRc (**Figura 9A-C, E; Anexos Tabla S1**). Este extenso número de *DEGs* refleja las profundas diferencias moleculares entre ambas subpoblaciones y sugiere la existencia de programas genéticos distintos que podrían sustentar su comportamiento diferencial en el quiasma óptico.

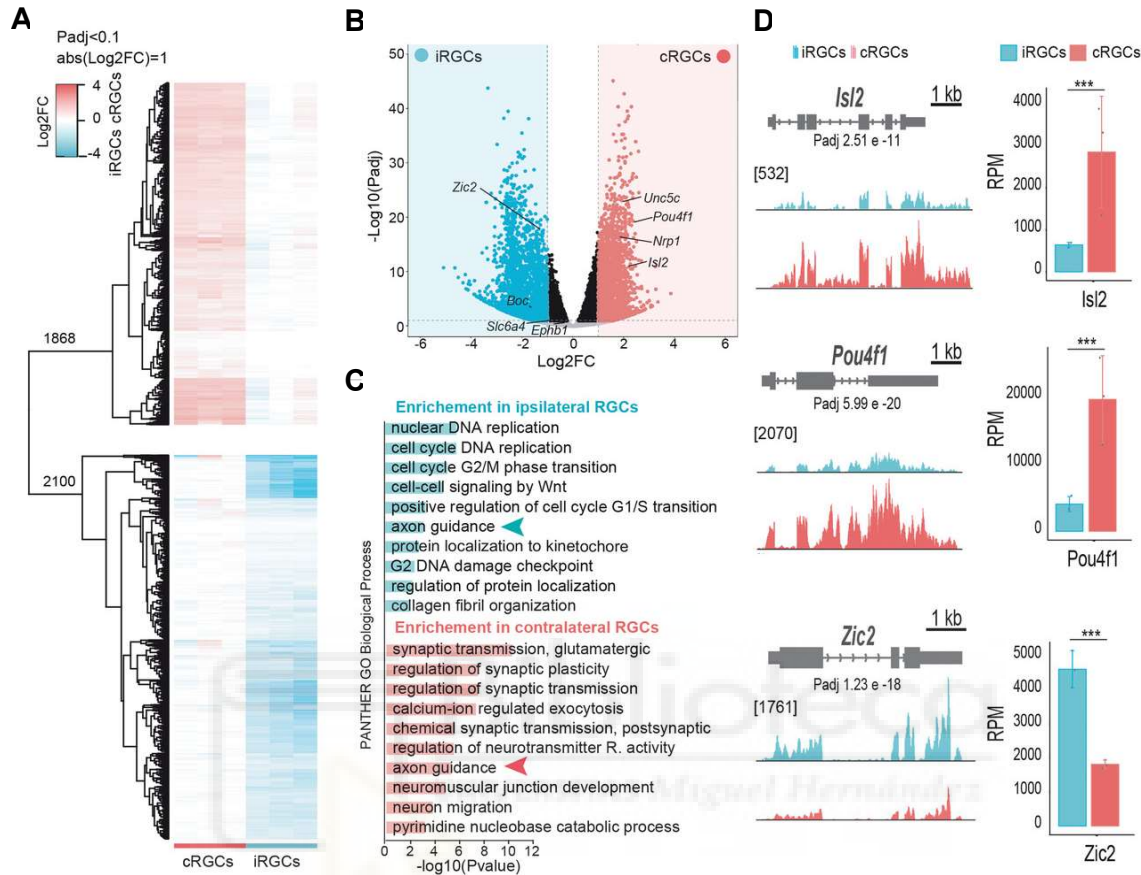


Figura 9. A) Mapa de calor de los cambios de los genes expresados diferencialmente (DEGs) según el cribado de ARN-seq entre CGRi y CGRc. En la parte superior, los DEG de las CGRc se refieren a las medias de las filas de las CGRi y, en la parte inferior, los DEG de las CGRi se refieren a las medias de las filas de las CGRc. **B)** Diagrama de volcán que muestra la significancia y la distribución del valor p tras el análisis de abundancia de transcripción diferencial entre las poblaciones de CGRi y CGRc. **C)** Histograma de los términos de proceso biológico de la ontología génica (GO) de Panther en los DEG de las CGRi y las CGRc. Los gráficos de barras presentan la significación del enriquecimiento. Padj < 0,05 y |log2FC| ≥ 1. **D.** Perfiles de ARN-seq de factores de transcripción conocidos por desempeñar papeles clave en la guía de axones de CGRc (Isl2 y Pou4f1) o CGRi (Zic2). La escala vertical muestra los recuentos en lecturas por millón (RPM). Las RPM medias para cada gen en las poblaciones de CGRi y CGRc se representan en los gráficos de la derecha (***Padj < 0,001).

El desarrollo de la retina en ratón sigue una secuencia temporal y espacial característica, en la que las CGR se generan siguiendo una onda en sentido horario desde la región dorsocentral hacia la periferia de la zona ventral. Como consecuencia de esta progresión, las CGRc se forman entre los días embrionarios E11 y P0, mientras que las CGRi, que se originan en la retina ventrotemporal aparecen más tarde, entre E14.5 y P0 (Dräger et al. 1985, Colello et al. 1990). Dado que nuestra recolección celular tuvo lugar en E16.5, es razonable pensar que, en promedio, las CGRi analizadas eran más jóvenes que las CGRc. Este desfase en la maduración se reflejó en el análisis de

enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO), donde los genes diferencialmente expresados en las CGRi estaban significativamente asociados a procesos vinculados al ciclo celular (**Figura 9C**), como era de esperar para una población más inmadura.

Más allá de las diferencias en el estado proliferativo, el análisis funcional de los *DEGs* también reveló un hallazgo clave: tanto en las CGRc como en las CGRi, se observaron genes asociados al término "guía axonal", lo que resulta coherente con el hecho de que los axones de ambas poblaciones están navegando y siendo dirigidos en ese momento. Entre estos genes encontramos *Unc5c*, *Boc* y *Nrp1*, que codifican receptores implicados en la respuesta a señales químicas expresadas en el quiasma y previamente descritos como específicamente expresados en una u otra población (Murcia-Belmonte et. Al 2019, Fabre et al 2010, Erskine et al. 2011) (**Figura 9B**).

Además, nuestro análisis identificó factores de transcripción que ya se sabe que son específicos de cada de las dos subpoblaciones: *Isl2* y *Pou4f1* en CGRc (Quina et al 2005, Pak et al. 2004), y *Zic2* en CGRi (Herrera et al 2003) (**Figura 9D**). La identificación de estos genes bien establecidos a partir de nuestros datos no sesgados demuestra la fiabilidad del enfoque experimental utilizado y por tanto valida su utilidad para estudiar los mecanismos que regulan las decisiones de guía axonal en el quiasma.

En conjunto, esta primera aproximación transcriptómica nos permitió definir con claridad las identidades moleculares diferenciadas de las CGRc e CGRi, lo que constituye un punto de partida esencial para comprender las bases genéticas que regulan sus trayectorias divergentes en el sistema visual en desarrollo.

5.2. Diferencias en la accesibilidad de la cromatina entre CGRi y CGRc

Una vez caracterizadas las diferencias transcriptómicas entre las CGRi y las CGRc, nos propusimos explorar si estas diferencias de expresión génica podían estar sustentadas por variaciones en la accesibilidad de la cromatina. Esta dimensión de análisis resulta crucial, ya que la organización

estructural del genoma en el núcleo —particularmente la apertura o cierre de regiones reguladoras— condiciona directamente la capacidad de los factores de transcripción para acceder a sus sitios diana y, por tanto, modula la activación o represión de programas génicos específicos.

Con este fin, aplicamos la técnica de ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*), una metodología de alto rendimiento que permite identificar regiones de cromatina accesible en el genoma mediante la inserción preferente de una transposasa (Tn5) en regiones no compactadas (Buenrostro et al. 2013). Para llevar a cabo este análisis, empleamos de nuevo las líneas transgénicas Slc6a4Sun1GFP y Pou4f2Sun1GFP, de las cuales aislamos núcleos positivos para Sun1-GFP mediante FANS (*Fluorescence-Activated Nuclei Sorting*), una técnica análoga al FACS pero adaptada al análisis nuclear (Fernandez-Albert et al. 2019).

Tal como hicimos para los análisis de ARN-seq, en el caso de las retinas Pou4f2Sun1GFP eliminamos previamente la región ventrotemporal para garantizar que la población analizada contuviera exclusivamente CGRc. A partir del análisis ATAC-seq, identificamos un total de más de 150.000 regiones de cromatina accesible en las CGRs. Un número considerable de estas regiones era compartido entre CGRc e CGRi, lo cual resulta esperable dado que ambas poblaciones comparten una ontogenia y funciones neuronales similares. Sin embargo, también detectamos una fracción significativa de regiones diferencialmente accesibles (*DARs*) entre ambas poblaciones (**Figura 10**), lo que sugiere la existencia de programas epigenéticos específicos que podrían estar implicados en la regulación de sus trayectorias axonales.

En concreto, las CGRi presentaron 21.230 regiones con accesibilidad aumentada, lo que representa el 13,6 % del total de regiones accesibles detectadas, mientras que las CGRc mostraron 13.573 regiones diferencialmente accesibles, equivalentes al 8,7 % del total. Estos datos indican que, aunque existe una base común de regulación accesible en ambas poblaciones, también hay una proporción sustancial de elementos reguladores ocupados de manera diferencial según la trayectoria de estas neuronas.

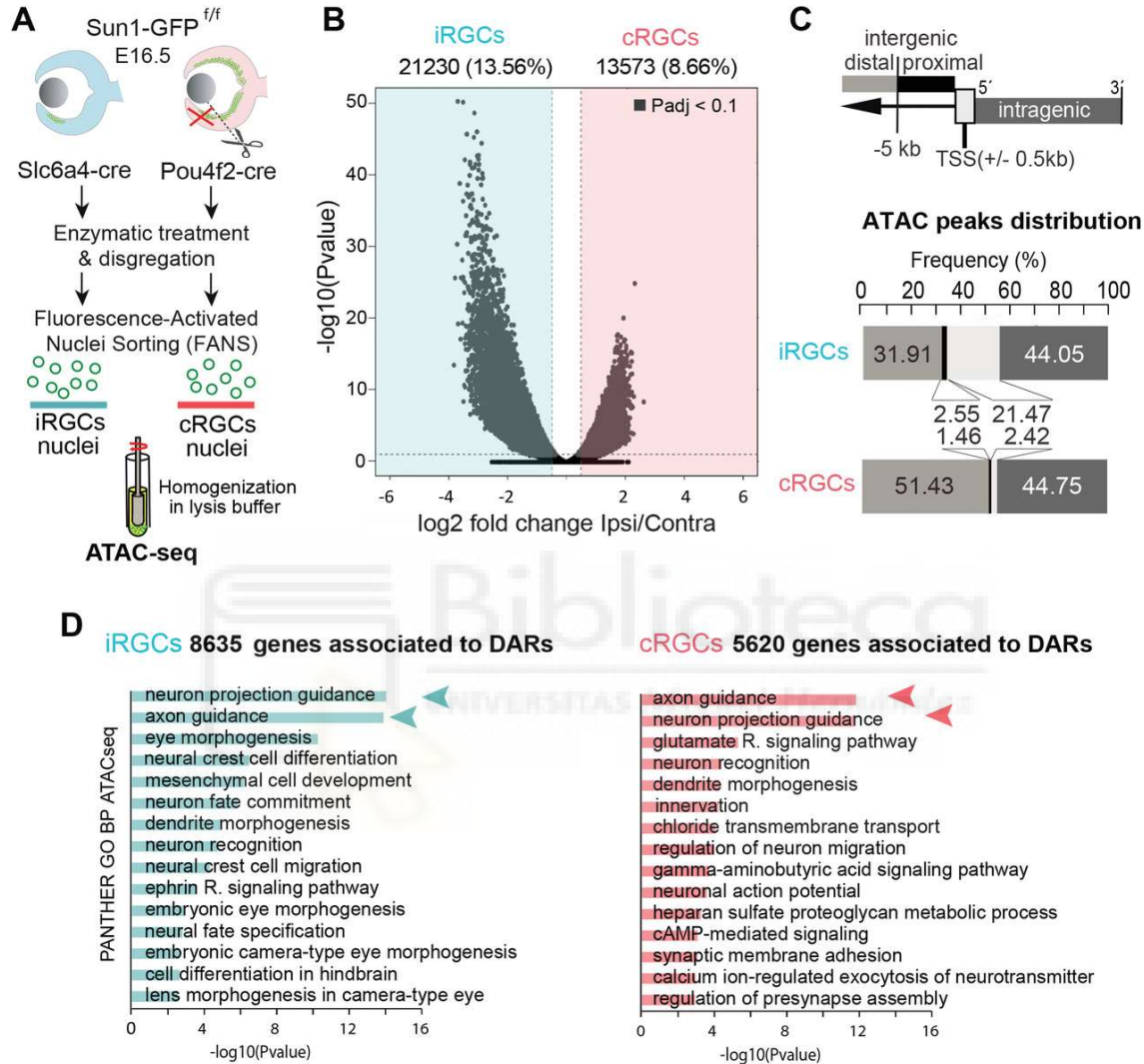


Figura 10. Diferencias de accesibilidad a la cromatina entre las CGRc y CGRi. A) Enfoque experimental utilizado para aislar núcleos de CGRi de embriones Slc6a4-CreSun1GFP y núcleos de CGRc de embriones Pou4f2-CreSun1GFP (con la región VT eliminada) en E16.5 para realizar el ensayo ATAC-seq. B) Diagrama de volcán que muestra la distribución del valor de significación tras el análisis de regiones accesibles diferencialmente (DAR) entre las poblaciones de CGRi y CGRc; los valores superiores indican el número de regiones y el porcentaje de todas las regiones accesibles detectadas (Padj < 0,1). C) Análisis de distribución de picos ATAC de DARs altamente significativas en el promotor (TSS +/- 500 pb), regiones potenciadoras proximales (entre 0,5 y 5 kb aguas arriba de la TSS), regiones potenciadoras distales (más de 5 kb aguas arriba de la TSS), y en las regiones intragénicas. El análisis muestra la frecuencia (%) y el número de picos en cada región en las poblaciones CGRi y CGRc. D) Panther Gene Ontology (GO) Biological Process enrichment analysis of DARs in CGRc and CGRi. Padj < 0,05 y |log₂FC| ≥ 1.

Al analizar la localización genómica de estas regiones diferencialmente accesibles, observamos que en las CGRi, las regiones con mayor accesibilidad se encontraban con mayor frecuencia cerca de

los promotores (± 500 pb del sitio de inicio de la transcripción, *TSS*) o en regiones potenciadoras proximales (entre 0,5 y 5 kb aguas arriba del *TSS*), mientras que las CGRc mostraban una mayor proporción de *DARs* específicas en potenciadores distales, es decir, regiones reguladoras ubicadas a distancias más alejadas del promotor (**Figura 10C**). Esta diferencia sugería la existencia de estrategias reguladoras distintas: mientras las CGRi podrían depender en mayor medida de mecanismos de control transcripcional más directos, las CGRc podrían estar integrando señales a través de vías de regulación más complejas o más modulables por señales extracelulares.

Para explorar el posible significado funcional de estas diferencias en la organización de la cromatina, realizamos un análisis de enriquecimiento de términos GO sobre las regiones accesibles en cada subpoblación. Como era de esperar, el análisis de las regiones accesibles en las CGRi —cuyas células tienen un origen más tardío— reveló un enriquecimiento significativo en términos asociados a la morfogénesis ocular, la especificación del destino neuronal y la diferenciación celular, lo cual refleja su estado más inmaduro respecto a las CGRc (**Figura 10D**). Por otro lado, términos vinculados a la guía axonal fueron identificados en ambos tipos celulares, reafirmando que ambas poblaciones están activamente involucradas en decisiones de navegación en ese momento del desarrollo.

También observamos que muchas de las *DARs* asociadas con funciones de guía axonal no se localizaban en regiones promotoras, sino en elementos reguladores en cis (*cis*-regulatory elements, CREs) como potenciadores proximales, potenciadores distales o regiones intragénicas. De hecho, cuando restringimos el análisis a las *DARs* localizadas en estas regiones reguladoras, el enriquecimiento en términos como “Guía axonal”, “Extensión axonal” o “Guía de prolongaciones neuronales” se mantuvo (**Figura 11**). Este hallazgo sugiere que la selección de la trayectoria axonal no depende exclusivamente de la activación o represión de genes a través de sus promotores, sino que está fuertemente modulada por la ocupación diferencial de factores en *enhancers* y otros elementos reguladores distales.

En conjunto, estos datos indican que las diferencias transcriptómicas entre CGRc e CGRi reflejan, al menos en parte, una organización diferencial de la cromatina en elementos reguladores clave. Esta especificidad en la accesibilidad de la cromatina estarían permitiendo que factores de transcripción distintos modulen la expresión génica de forma específica en cada subpoblación.

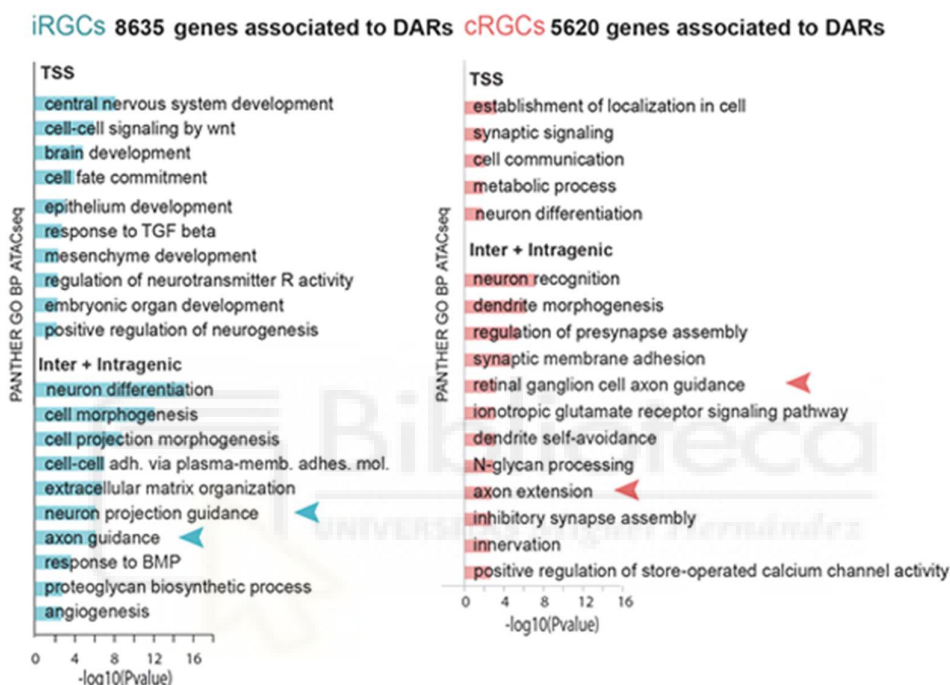


Figura 11. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de regiones accesibles de ATACseq diferenciales entre CGRi y CGRc localizados en el TSS o en potenciadores que incluyen elementos reguladores cis (CRE) distales y proximales y regiones intragénicas. P.adj < 0,05 y |log2FC| ≥ 1 mediante la base de datos PANTHER.

5.3. Correlación entre la ocupación diferencial de elementos reguladores en cis y la expresión génica

Una vez identificadas diferencias sustanciales tanto a nivel transcriptómico como en la accesibilidad de la cromatina entre las poblaciones de CGRc y CGRi, el siguiente paso consistió en integrar ambos conjuntos de datos con el fin de esclarecer la relación entre la organización epigenética y la regulación transcripcional en estas neuronas en desarrollo. Es decir, hasta qué punto las diferencias en la ocupación de elementos reguladores en cis (CREs) —detectadas mediante ATAC-seq— se

correlacionaban con los patrones de expresión génica identificados por ARN-seq.

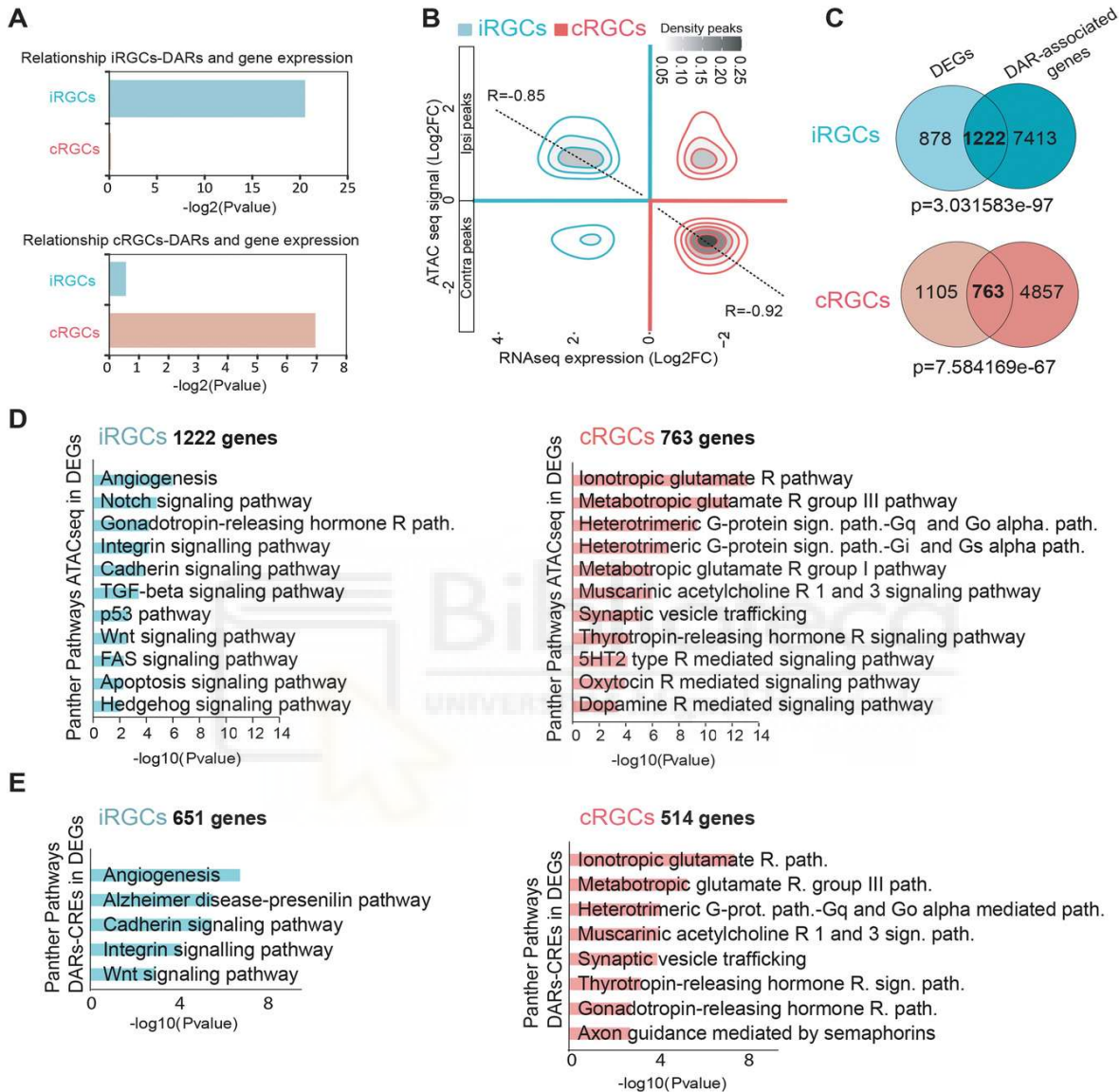


Figura 12. Los perfiles transcriptómicos y de ocupación de la cromatina definen el conjunto de genes expresados diferencialmente en las CGRi y CGRc. A) Los P valores de BETA confirman la asociación entre las regiones accesibles diferencialmente (DARs) y la expresión génica (DEGs) tanto en las CGRi como en las CGRc. B) Diagrama de densidad que muestra las regiones de accesibilidad de la cromatina y la expresión génica. La correlación de Pearson confirmó una relación significativa entre ATAC-seq con ARN-seq de CGRi ($R = 0,85$) y ATAC-seq combinado con ARN-seq para CGRcs ($R = 0,92$). C) Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre genes asociados a picos de ATAC-seq y DEGs de cambios de ARN-seq en poblaciones de CGRi y CGRcs. Se utilizaron pruebas exactas de Fisher para evaluar si el número de picos de ATAC-seq asociados a genes era estadísticamente significativo. Para los picos ATAC-seq ($\text{Padj} < 0,05$ y $|\text{Log2FC}| > 1$) consideramos picos diferenciales entre CGRc e CGRi que están asociados con DEGs. Así, puede haber varios picos asociados al mismo gen. D) Análisis de enriquecimiento en la Ontología de Genes (GO) Panther pathways de los DEGs en CGRc e CGRi. $\text{Padj} < 0,05$ y $|\text{log2FC}| \geq 1$. E) Panther pathways GO análisis de DEGs con DARs en elementos reguladores cis (CREs). $\text{Padj} < 0,05$ y $|\text{log2FC}| \geq 1$.

Para abordar esta cuestión, empleamos la herramienta bioinformática BETA (*Binding and Expression Target Analysis*) (Wang et al. 2013), diseñada específicamente para integrar datos de accesibilidad de la cromatina con perfiles de expresión génica y predecir si una región accesible está asociada con activación o represión transcripcional. Este análisis confirmó que las diferencias en la accesibilidad de la cromatina detectadas entre CGRi y CGRc eran, en muchos casos, buenos predictores de diferencias en la expresión génica (**Figura 12A**).

Realizamos una comparación cruzada entre los genes diferencialmente expresados (*DEGs*) identificados en cada subpoblación y las regiones diferencialmente accesibles (*DARs*) correspondientes. Este análisis reveló una correlación positiva entre ambos conjuntos de datos (**Figura 12B**). En términos cuantitativos, aproximadamente el 58 % de los *DEGs* detectados en CGRi y el 40,8 % de los *DEGs* en CGRc se encontraban asociados a regiones *DARs*, lo que sugiere que en una fracción considerable de genes, las diferencias transcripcionales observadas pueden explicarse por cambios en la organización de la cromatina.

Sin embargo, al considerar la totalidad de los 3968 *DEGs* detectados en el estudio, observamos que sólo 1222 genes (30,8 %) en CGRi y 763 genes (19,2 %) en CGRc presentaban una ocupación diferencial de la cromatina. Este resultado indica que, si bien la accesibilidad a *CREs* es un factor regulador relevante, no es el único mecanismo responsable de las diferencias de expresión génica. Es probable que factores adicionales —como la metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas, represión por microARNs o mecanismos de retroalimentación transcripcional— también desempeñen papeles importantes en la determinación del perfil transcriptómico final de cada subpoblación.

Para comprender mejor la relevancia funcional de los genes cuyo patrón de expresión se correlacionaba con cambios en la ocupación de la cromatina, realizamos un análisis PANTHER sobre los *DEGs* asociados a *DARs* en las CGRi. Este análisis reveló un enriquecimiento notable en genes pertenecientes a las vías de señalización Wnt y Cadherina (**Figura 12D**), hallazgo que resulta coherente con estudios recientes que han demostrado la implicación de ambas vías en el control

de la repulsión a la línea media por parte de los axones de las CGRi (Peng et al 2018, Morenilla-Palao et al 2020).

De hecho, al restringir el análisis exclusivamente a los genes asociados a regiones *DARs* situadas en elementos reguladores cis (*CREs*), el enriquecimiento en estas vías de señalización se mantuvo (**Figura 12E**). Este resultado refuerza la hipótesis de que la regulación ejercida por *CREs* sobre genes clave —especialmente aquellos implicados en la respuesta a señales de guía axonal— es fundamental para establecer las diferencias funcionales entre CGRc e CGRi en el momento en que sus axones se enfrentan a la bifurcación en el quiasma óptico.

En resumen, esta integración de datos transcriptómicos y epigenéticos ha puesto de manifiesto que una proporción sustancial de la divergencia molecular entre CGRc e CGRi puede explicarse por diferencias en la accesibilidad de elementos reguladores no codificantes, en particular *CREs* situados en potenciadores proximales y distales. Estos hallazgos no solo proporcionan una base mecánica para entender cómo se generan y mantienen los perfiles génicos específicos de cada subpoblación, sino que también abren la puerta a futuras investigaciones sobre la arquitectura reguladora que orquesta la especificación de trayectorias axonales en el sistema visual en desarrollo.

5.4. Código extendido de factores de transcripción implicados en las decisiones axonales en la línea media

Una vez establecida la correlación entre la accesibilidad de la cromatina en regiones reguladoras y los patrones de expresión génica específicos de las CGRc e CGRi, nos propusimos identificar los FTs responsables de modular dicha accesibilidad y, en última instancia, de dirigir las decisiones de trayectoria axonal en el quiasma óptico. Dado que el principal modo de acción de los FTs consiste en unirse a secuencias reguladoras específicas del ADN, su huella molecular puede detectarse en los datos de ATAC-seq mediante un análisis detallado de denominado “*footprint analysis*”.

El principio de esta metodología radica en que la unión estable de un FT a su sitio diana protege esa región del genoma frente a la actividad de la transposasa Tn5, utilizada en el ensayo ATAC-seq. Esto genera un patrón característico en la secuencia leída, con una depleción local de lecturas en el centro del sitio de unión y un aumento relativo en los flancos, lo que puede utilizarse como indicador indirecto de ocupación activa de la cromatina por parte del factor (Yan F et al. 2020). Para detectar estas huellas, aplicamos el algoritmo HINT (*HMM-based Identification of Transcription factor footprints*), que permite identificar *footprints* específicos y compararlos entre condiciones (Figura 13A)

El análisis de enriquecimiento de motivos de unión a FTs dentro de los *footprints* detectados reveló diferencias muy notables entre las CGRc e CGRi. En las CGRi, observamos un patrón de ocupación enriquecido en familias de factores de transcripción conocidas por su papel en el desarrollo neuronal, tales como Lhx, Dlx, Sox, En y Zic, tanto en promotores como en elementos reguladores cis. Por el contrario, las CGRc mostraron huellas más abundantes para factores como Ebf1 y miembros de la familia Pou, lo cual resultaba coherente con la expresión conocida de Pou4f1 y Pou4f2 en estas células (Figura 13B).

Con el objetivo de acotar qué miembros concretos de estas familias de FT eran responsables de las huellas observadas, combinamos los resultados del análisis de *footprint* con los datos de expresión obtenidos por ARN-seq. Esta integración nos permitió identificar no solo los motivos de unión ocupados diferencialmente, sino también aquellos factores que se expresaban preferentemente en una de las dos subpoblaciones. Este análisis cruzado reveló que miembros de las familias Pou3f y Pou4f, así como Ebf2, estaban altamente expresados en CGRc y mostraban *footprints* específicos en esta población, mientras que las CGRi se caracterizaban por la expresión y ocupación diferencial de miembros de las familias Lhx, Dlx y Zic.

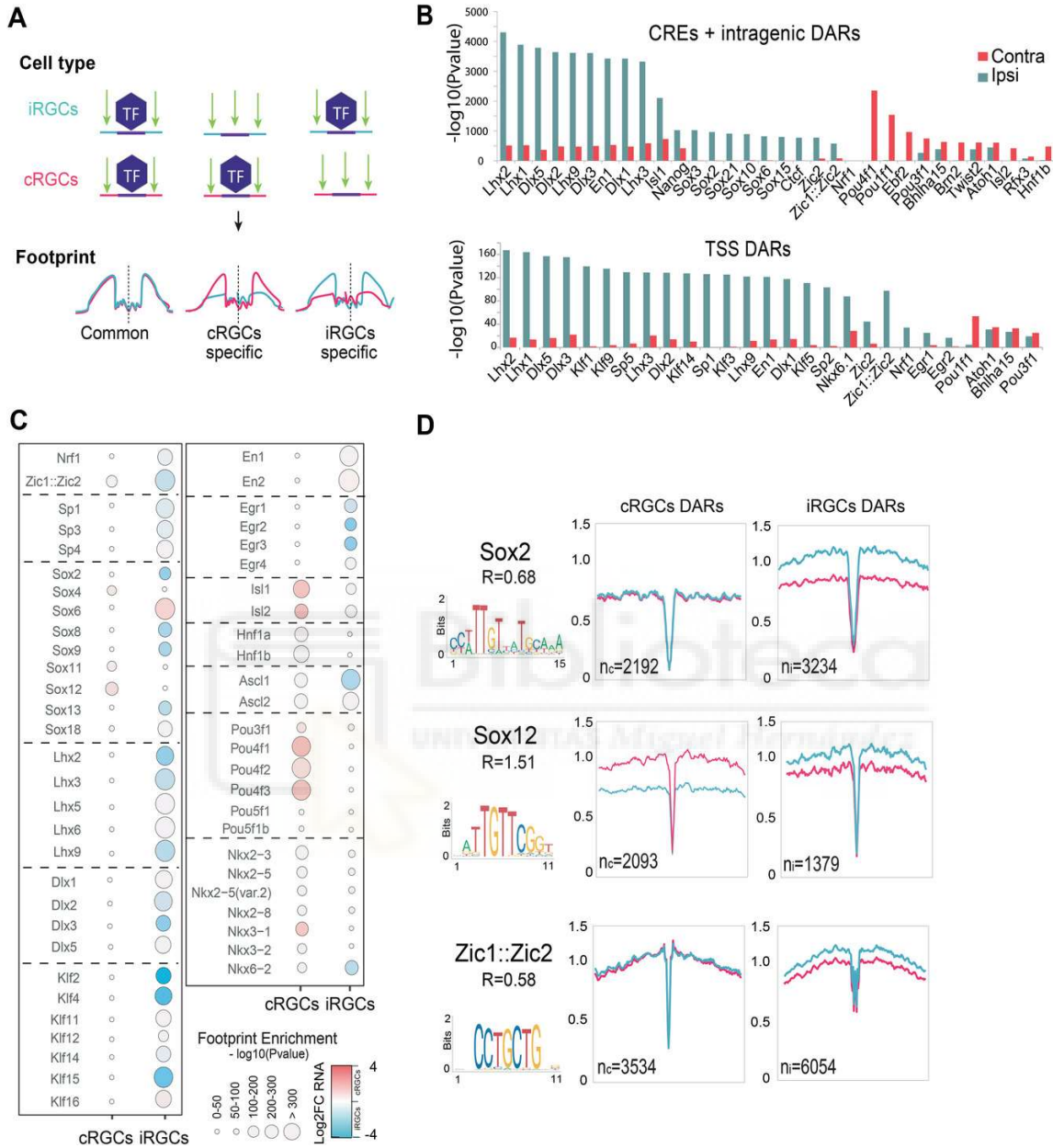


Figura 13. Análisis de footprint y perfiles transcriptómicos para identificar factores de transcripción específicos de CGRi y CGRc. A) Representación esquemática para ilustrar la unión de factores de transcripción (FT) que impone patrones característicos en la cromatina (huella) de las CGRi y las CGRc. B) Enriquecimiento de la huella de FT en regiones accesibles diferenciales (DAR) para CGRc e CGRi. Realizamos análisis separados en las regiones promotoras (TSS) y potenciadoras putativas (CREs). C) Huella digital en los sitios potenciadores/promotores indicando el enriquecimiento de motivos (tamaño del círculo) y el cambio de expresión del FT asociado en los conjuntos de datos de ARN-seq de CGRi o CGRc. Rojo: aumento; azul: disminución; blanco: sin cambios. D) Huella digital en motivos enriquecidos específicos para los factores de transcripción indicados. N = número de motivos detectados en CGRc (nc) o CGRi (ni) (los valores corresponden a inserciones tn5 normalizadas). Se muestra la matriz de motivos de la base de datos JASPAR para cada factor de transcripción. R = nc/ni

Un aspecto particularmente interesante emergió al analizar la familia Sox, que había sido previamente descrita como implicada en el desarrollo neural y la regulación de la identidad celular. Aunque en estudios anteriores algunos miembros de esta familia, como Sox4, se habían asociado con la guía axonal en CGRc (Kuwajima T. et al 2017), nuestro análisis reveló una distribución más compleja y específica entre subtipos. En las CGRi, detectamos *footprints* y expresión diferencial de Sox2, Sox8, Sox9 y Sox13, mientras que en las CGRc predominaban Sox4 y Sox12 (**Figuras 13C, D**). Esta observación sugiere que, dentro de una misma familia de FTs, distintos miembros pueden desempeñar funciones específicas según el contexto celular, modulando de manera fina las respuestas a señales extracelulares como las que gobiernan la navegación axonal.

La identificación de este conjunto de FT que pueden jugar un papel potencial en la determinación de la trayectoria axonal, no solo ha ampliado el repertorio de reguladores implicados en el establecimiento de la proyección retinofugal, sino que también sienta las bases para explorar de forma sistemática cómo diferentes combinaciones de FTs podrían generar identidades axonales específicas a través de programas de regulación transcripcional complejos. En este sentido, nuestros resultados apuntan a la existencia de un código transcripcional extendido que opera a nivel de los elementos reguladores cis y que guía la diferenciación funcional de CGRc e CGRi durante el desarrollo del sistema visual.

A modo de prueba de concepto y con el fin de validar nuestros hallazgos bioinformáticos, decidimos centrar nuestra atención en un conjunto de FTs que cumplieran tres criterios clave: (1) mostrar huellas específicas en las regiones DARs; (2) presentar expresión diferencial clara entre CGRc e CGRi; y (3) estar vinculados previamente, directa o indirectamente, con mecanismos de guía axonal. Para las CGRc seleccionamos los factores Pou4f1 y Pou4f2, mientras que para las CGRi centramos el análisis en Zic2 y los factores Lhx2/9, todos ellos identificados tanto en el análisis de *footprint* como en el ARN-seq.

5.5 El FT Pou4f1 regula el cruce de la línea media y la expresión de γ -sinucleína

Tras identificar al FT Pou4f1 como uno de los candidatos más robustos asociados a la identidad molecular de las CGRc —tanto por su expresión específica como por la presencia de huellas epigenéticas en sitios reguladores clave— decidimos abordar experimentalmente su papel funcional en la toma de decisiones axonales en el quiasma óptico. Quisimos comprobar si Pou4f1 desempeña un papel directo en la regulación del cruce axonal en la línea media, como sugerían nuestros análisis transcriptómicos y epigenéticos integrados.

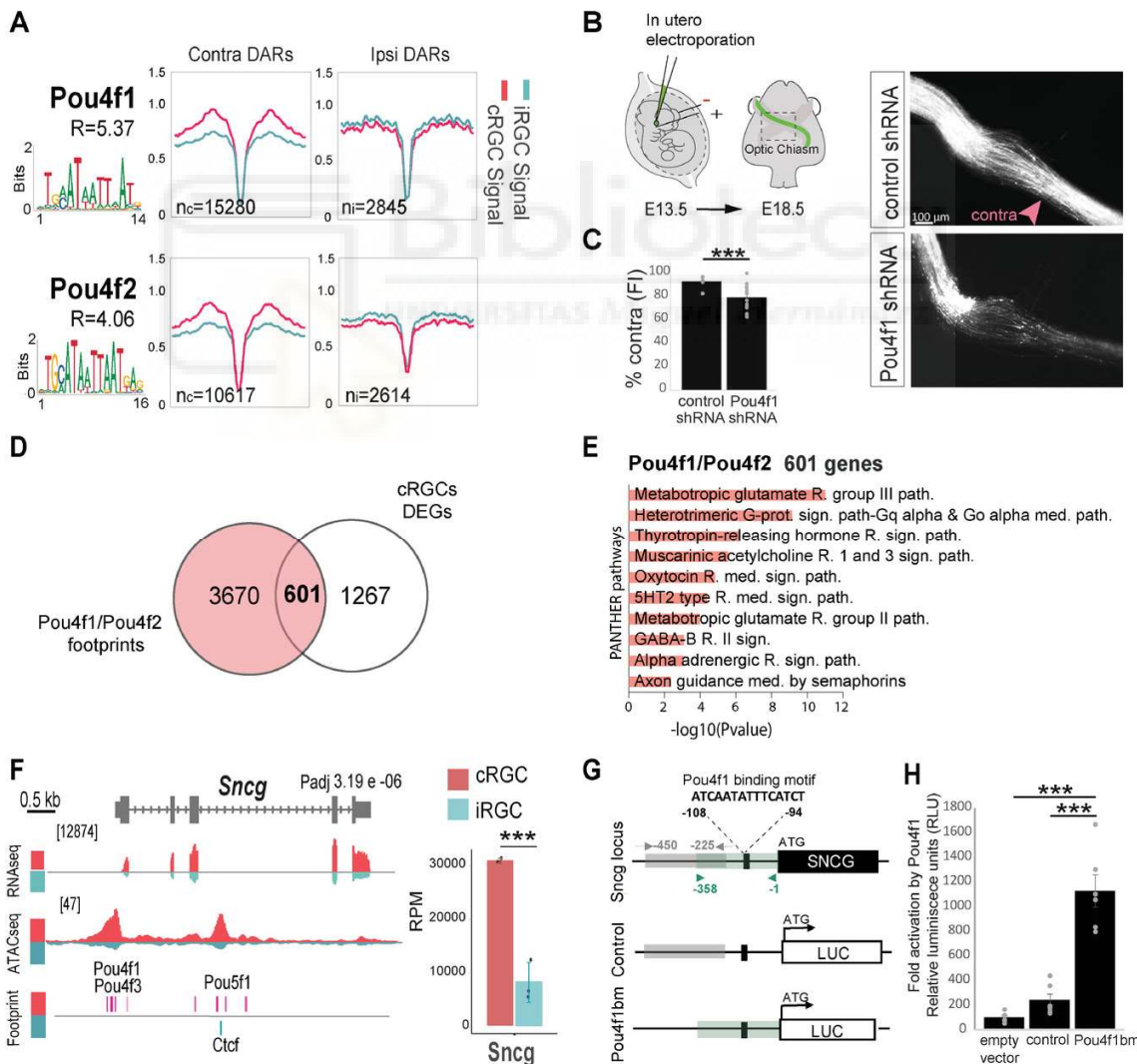


Figura 14. Pou4f1 contribuye a la regulación del cruce axonal en la línea media. A) Huella digital en motivos enriquecidos en Pou4f1 y Pou4f2. n = número de motivos detectados en células ganglionares de la retina contralateral (CGRc; nc) o células ganglionares de la retina ipsilateral (CGRi; ni) (los valores corresponden a inserciones tn5

normalizadas). Se muestra la matriz de motivos de la base de datos JASPAR para cada factor de transcripción. R = nc/ni. B) El panel izquierdo es un dibujo esquemático del enfoque experimental. La electroporación monocular 'in utero' con plásmidos que codifican EGFP se realiza en embriones E13.5 y sus quiasmas ópticos se analizan en E18.5. Paneles de la derecha a pesar de quiasmas ópticos de embriones E18.5 electroporados en E13.5 con plásmidos que codifican para shRNA scramble (control) o Pou4f1 shRNA más plásmidos que codifican EGFP. Barra de escala: 100 μ m. C) Porcentaje de axones proyectados ipsilateralmente en el quiasma óptico normalizado al número total de axones dirigidos (n = número de embriones; Control n = 6, Pou4f1 shRNA n = 16) (prueba t no apareada de dos colas, *** p < 0.001). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM. D) Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre genes expresados diferencialmente (DEGs) en la población de CGRc y las huellas de Pou4f1 y Pou4f2 anotadas al gen más cercano. E) Panther pathways Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DEGs associated to the Pou4f1 and Pou4f2 footprints in CGRc. P_{adj} < 0,1 y $|\log_2 FC| \geq 1$. F. Instantáneas genómicas de perfiles ATAC-seq, ARN-seq y huellas en poblaciones CGRi y CGRc para el gen codificador de γ -sinucleína (*Sncg*). Obsérvese que varias huellas de factores Pou4f situados aguas arriba y dentro de *Sncg* se detectan específicamente para CGRc. Los valores indican los niveles de recuento en lecturas por millón (RPM). Los gráficos representan la expresión de transcritos (en RPM) para *Sncg* obtenida de experimentos ARN-seq de CGRi o CGRc. (** P_{adj} < 0,001). G) Representación esquemática del gen *Sncg* incluyendo el motivo de unión Pou4f1 localizado en la región promotora del gen, la región de 358 pb que contiene el motivo de unión a Pou4f1 (pou4f1bm) amplificada por PCR para ser clonada en un plásmido reportero de luciferasa (pGL3-basic) para generar el plásmido pGL3-*Sncg*-cre y la región de 225 pb junto al *Sncg*-cre excluyendo el motivo Pou4f1 amplificada para ser clonada en el pGL3 y utilizada como control (pGL3-control). H) Ensayo de luciferasa en células HEK293 que muestra una mayor transactivación del gen reportero impulsado por la unión de Pou4f1 a su motivo en el gen *Sncg* respecto a los controles (n = número de muestras; vector vacío n = 6, control n = 6, pou4f1bm n = 6) (prueba ANOVA; seguida de corrección de Bonferroni, *** p < 0,001).

Diseñamos un experimento de pérdida de función (*loss of function*, LOF) utilizando electroporación *in utero* de plásmidos codificantes para ARNs de horquilla corta (*shRNAs*) dirigidos contra Pou4f1 (*Pou4f1 shRNA*) en la retina de embriones de ratón en estadio E13.5. Como control, utilizamos plásmidos con secuencias shRNA inespecíficas (*control shRNA*). Los embriones fueron analizados cuatro días después de la electroporación (E17.5), momento en el que los axones de las CGRs ya han traspasado la zona del quiasma óptico y por tanto se puede evaluar su trayectoria.

Mientras que los embriones electroporados con el plásmido control mostraban una proyección axonal normal donde la mayoría de los axones cruzaban adecuadamente la línea media, los embriones en los Pou4f1 había sido silenciado, presentaban un número reducido de axones cruzando el quiasma. Este fenotipo además estaba acompañado por una acumulación anómala de axones que parecían detenidos antes de entrar en la región quiasmática (**Figuras 14, B, C**). Estos hallazgos demostraron funcionalmente que Pou4f1 es necesario para que los axones de las CGRc crucen correctamente la línea media, confirmando así las predicciones obtenidas a partir de nuestros análisis bioinformáticos.

Con el objetivo de identificar posibles genes diana regulados directamente por Pou4f1, realizamos un análisis cruzado entre los genes diferencialmente expresados en las CGRc y las huellas de

ATAC-seq que contenían motivos de unión para Pou4f1 y/o Pou4f2. Este enfoque permitió identificar 593 genes regulados diferencialmente en CGRc que también presentaban huellas compatibles con la unión de estos factores (**Figura 14D**). El análisis funcional de este conjunto génico mediante GO reveló una representación de términos relacionados con las semaforinas, proteínas conocidas como moléculas de guía clave en la navegación axonal durante el desarrollo (**Figura 14E**) (Erskine et al. 2011, Kuwajima T et al. 2012).

Entre los genes identificados como diferencialmente expresados entre las dos poblaciones se encontraba *Sncg*, que codifica para γ -sinucleína, una proteína tipo chaperona cuya expresión estaba significativamente enriquecida en las CGRc según nuestros datos de ARN-seq (**Figura 14F**). *Sncg* también mostraba regiones reguladoras accesibles con huellas para Pou4f1, lo que sugería una regulación directa por parte de este factor. Para verificar si Pou4f1 era capaz de activar la transcripción de *Sncg*, llevamos a cabo ensayos funcionales mediante análisis de luciferasa en células 293HEK. Amplificamos una secuencia de 358 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Sncg*, que contenía el motivo de unión predicho para Pou4f1, y la clonamos en un plásmido reportero de luciferasa. Como control, usamos una secuencia de tamaño similar, localizada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), pero que no incluía el motivo de unión (**Figura 14G**). La transfección con el plásmido control y un plásmido de expresión para Pou4f1 dio lugar a un aumento moderado en la actividad de luciferasa. Sin embargo, cuando cotransfectamos el plásmido reportero con el motivo de Pou4f1 junto con el plásmido que de expresión de Pou4f1, observamos un incremento superior a 10 veces los niveles de luciferasa en comparación a los niveles basales (**Figura 14H**). Estos resultados demuestran que Pou4f1 puede unirse a esta región reguladora del locus de *Sncg* y activar su transcripción de forma directa.

Para determinar si esta regulación también ocurre *in vivo* en las CGRc, realizamos un experimento de inmunomarcaje triple en cortes de retina de embriones E16.5, utilizando anticuerpos contra γ -sinucleína, Pou4f1 y Zic2. Como esperábamos, observamos una expresión selectiva de γ -sinucleína en las CGRc que colocalizaba significativamente con Pou4f1 con un patrón complementario al de

Zic2 (**Figura 15A**). Seguidamente quisimos evaluar si la expresión de γ -sinucleína dependía funcionalmente de Pou4f1 y para ello, realizamos nuevamente electroporaciones con plásmidos que codificaban para *shRNA* contra Pou4f1 en retinas embrionarias E13.5, y analizamos la expresión de γ -sinucleína en secciones de retinas de embriones a E16.5. Mientras que en las retinas electroporadas con el *shRNA* control, el 50,5 % de las células positivas para Pou4f1 también expresaban γ -sinucleína, esta proporción se redujo a un 22,6 % en las retinas tratadas con *shRNAs* contra Pou4f1 (**Figuras 15B,C**), lo que demostraba que la expresión de γ -sinucleína en CGRc depende directamente de Pou4f1.

La familia de las sinucleínas ha sido ampliamente estudiada en el contexto de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Shao T. Et al. 2018, Liu H. et al. 2005, Oeckl P. Et al. 2016). En particular, se sabe que la γ -sinucleína se localiza predominantemente en axones y terminales presinápticos (Ninkina N. et al 2003), y estudios recientes han demostrado que la exposición prolongada de neuronas jóvenes a α -sinucleína, otro miembro de la misma familia, afecta negativamente al crecimiento axonal y a la orientación del cono de crecimiento (Tilve et al. 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se había descrito un papel de la γ -sinucleína en el desarrollo neuronal.

Para investigar la función de *Sncg* en el contexto del desarrollo del sistema visual, realizamos experimentos de pérdida de función de *Sncg* mediante la electroporación de un plásmido que codifica para un *shRNA* contra este gen (*Sncg shRNA*) en la retina de embriones E13.5 (**Figura 15D**). Cuatro días después, analizamos las trayectorias axonales de las CGRs a nivel del quiasma óptico y observamos un incremento significativo en el número de axones que cambiaban su lateralidad en la línea media (**Figura 15E**), lo que indicaba que la γ -sinucleína no solo se expresa de forma específica en CGRc y es regulada por Pou4f1, sino que participa activamente en el cruce axonal de la línea media a la altura del quiasma óptico.

En conjunto, estos resultados establecen un eje regulador funcional entre el factor de transcripción Pou4f1 y uno de sus efectores, *Sncg*, y revelan que γ -sinucleína es un nuevo actor implicado en el

control del cruce axonal en la línea media, abriendo nuevas vías para la comprensión de los mecanismos moleculares que guían a los axones visuales durante el desarrollo del sistema visual.

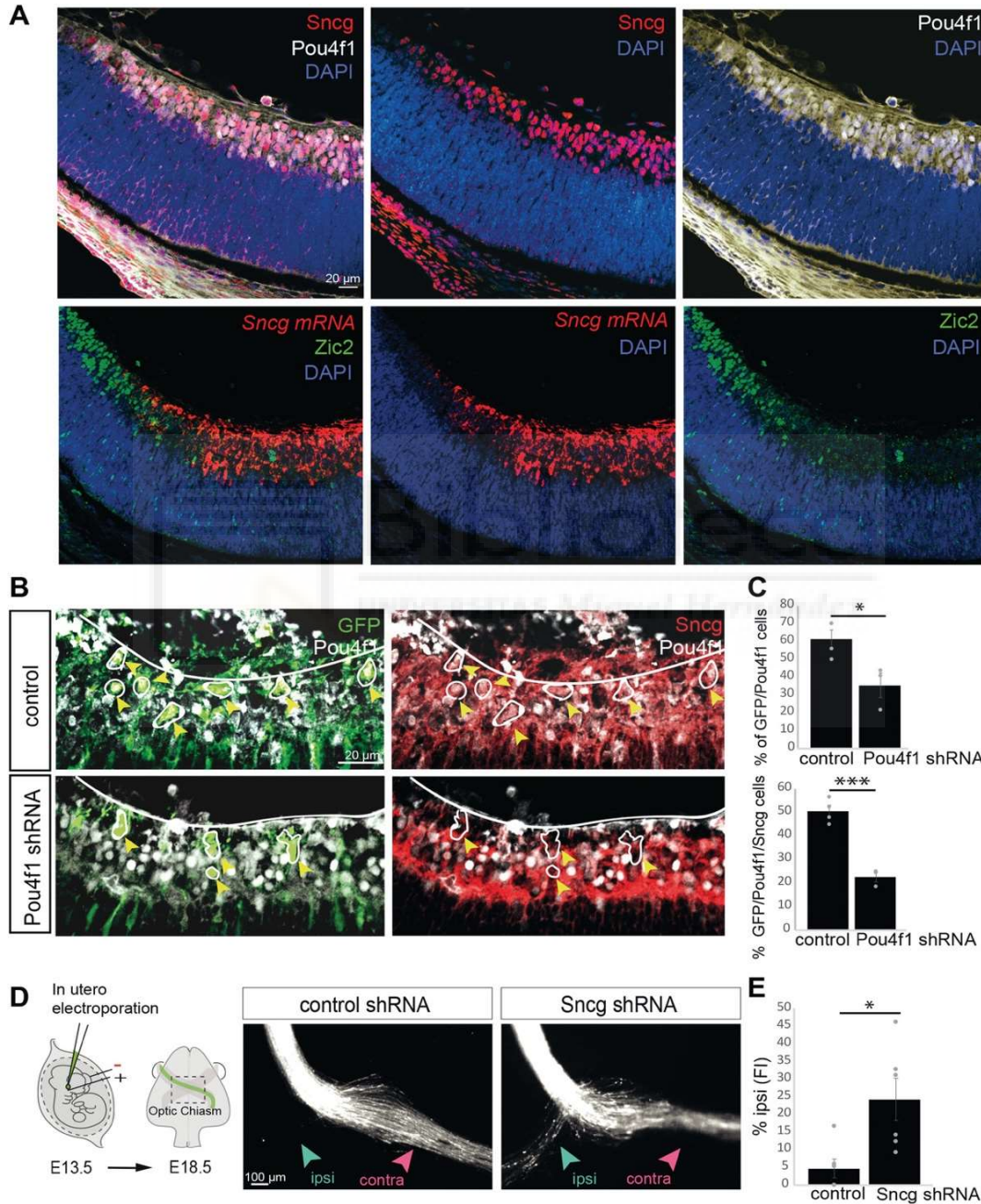


Figura 15. Pou4f1 regula γ -synuclein en RGCc. A) Inmunofluorescencia para *Sncg* combinada con inmunofluorescencia para Pou4f1 (arriba) o Zic2 (abajo) en secciones coroneales de retina de embriones E16.5. Los núcleos están teñidos con Dapi. Los núcleos están teñidos con Dapi. Barra de escala: 20 μ m. B) Inmunofluorescencia para *Sncg* combinada con inmunofluorescencia para Pou4f1 o GFP en secciones coroneales de la retina de embriones E18.5 después de la electroporación de la retina con plásmidos que codifican para *shRNA* scramble (control) (paneles superiores) o *shRNA* Pou4f1 (paneles inferiores) más plásmidos que codifican EGFP. Barra de escala: 20 μ m. C) Cuantificación del porcentaje de células positivas para GFP/Pou4f1 y células positivas para GFP/Pou4f1/*Sncg* en

secciones de retina de embriones E18. 5 después de la electroporación de la retina con plásmidos que codifican para shRNA scramble (control) o shRNA Pou4f1 más plásmidos que codifican EGFP (n = número de embriones; Control n = 4, shRNA Pou4f1 n = 3) (al menos tres secciones por animal) (prueba t no apareada de dos colas, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM. D) El panel izquierdo es un dibujo esquemático del enfoque experimental. La electroporación monocular in utero con plásmidos que codifican EGFP se realiza en embriones E13.5 y sus quiasmas ópticos se analizan en E18.5. Los paneles de la derecha muestran que, a pesar de los quiasmas ópticos, los embriones E13.5 y E18.5 no muestran quiasmas ópticos. Los paneles de la derecha muestran que, a pesar de los quiasmas ópticos, los embriones E13.5 y E18.5 no presentan quiasmas ópticos. Paneles de la derecha a pesar de quiasmas ópticos de embriones E18.5 electroporados en E13.5 con plásmidos que codifican para shRNA scramble (control) o *Sncg shRNA* más plásmidos que codifican EGFP. Barra de escala: 100 μ m. E) Porcentaje de axones proyectados ipsilateralmente en el quiasma óptico normalizado con respecto al número total de axones dirigidos (n = número de embriones; Control n = 6, *Sncg shRNA* n = 6) (prueba t no apareada de dos colas, $*p < 0,05$). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM.

5.6 . Regulación transcripcional de la repulsión axonal en la línea media

Estudios previos de nuestro laboratorio habían identificado al factor de transcripción Zic2 como un regulador clave de la repulsión axonal en la línea media, tanto en el sistema visual como en otros tipos neuronales, incluyendo neuronas espinales y tálamocorticales (Herrera et al. 2003, Escalante et al. 2013). En coherencia con estos trabajos, nuestros análisis mostraron que Zic2 se expresa en las CGRi y no en las CGRc presentando además accesibilidad diferencial en regiones reguladoras (DARs) en CGRi versus CGRc (**Figuras 16A**).

Además, en nuestro análisis detectamos expresión diferencial de Zic5, un gen vecino a Zic2 con orientación invertida y que codifica para un factor de transcripción de la misma familia (Giudice Q.L 2019). No obstante, los niveles de transcripción de Zic5 resultaron considerablemente menores que los de Zic2, lo que sugiere un papel funcional más moderado o limitado para este factor de transcripción en comparación con su homólogo.

Para validar experimentalmente los sitios de unión predichos de Zic2 detectados por ATAC-seq, aprovechamos un análisis de ChIP-seq en retinas y médulas espinales de embriones E16 realizado previamente por el laboratorio (Morenilla-Palao et al. 2020). Al comparar los *footprints* digitales de Zic2 obtenidos mediante HINT con los sitios de unión detectados por ChIP-seq, observamos que aproximadamente un 7% de las huellas predichas por ATAC-seq coincidían con sitios de unión de Zic2 *in vivo* en CRGi. Detectamos dos *footprints* entre los loci de Zic2 y Zic5, y uno de ellos, el

localizado más cerca de *Zic2*, mostraba unión real de *Zic2*, lo que sugería la existencia de un mecanismo de autorregulación positiva o retroalimentación (**Figura 16A**).

La integración de datos transcriptómicos, de accesibilidad de la cromatina y de ChIP-seq permitió identificar varios genes implicados en la guía axonal como posibles dianas directas de *Zic2*. Entre ellos se encontraban *Fzd8*, *Boc* y *Bmpr1*, genes cuyos productos han sido previamente implicados en la navegación axonal (Fabre et al. 2010, Morenilla-Palao et al. 2020, Kuwajima T. al 2017) y que en nuestras muestras mostraron expresión diferencial en CGRi, además de huellas predichas de *Zic2* en sus regiones reguladoras (**Figuras 16B, C D**). En el caso de *Boc*, observamos unión directa de *Zic2* dentro del locus génico, lo que apoya su regulación directa por este factor. Asimismo, el gen *Unc5c*, que codifica para el receptor de Netrina-1 y que es conocido por estar reprimido por *Zic2* (Murcia-Belmonte V. et al. 2019), presentó múltiples sitios de unión de *Zic2* a lo largo de su locus, lo que concuerda con su función represora.

Un aspecto destacable es la localización adyacente e invertida de los genes *Unc5c* y *Bmpr1b*. El análisis de *footprints* predijo motivos de unión de *Zic2* en la región que abarca el inicio de *Unc5c* y el final de *Bmpr1b*, y el análisis de ChIP-seq confirmó la unión real en esta zona, lo que sugiere una regulación coordinada de *Zic2* sobre ambos genes. También detectamos unión de *Zic2* cerca del gen *Nrp1*, que codifica un receptor de semaforinas previamente descrito como expresado específicamente en las CGRc (Erskine L. et al. 2017), lo que sugiere que *Zic2* seguramente actúa como represor de *Nrp1* en las CGRi.

Además, identificamos nuevas dianas potenciales de *Zic2* no descritas anteriormente. Por ejemplo, el gen *Nrp2*, que codifica un parólogo de *Nrp1*, mostró DARs y unión directa de *Zic2* en su región promotora. La colocalización espacial de los ARNm de *Zic2* y *Nrp2* en la retina ventral de embriones E16 y la sobreexpresión ectópica de *Zic2* en CGRc, que incrementó significativamente los niveles de *Nrp2*, confirmaron experimentalmente que *Nrp2* es una diana directa de *Zic2* (**Figura 16E**).

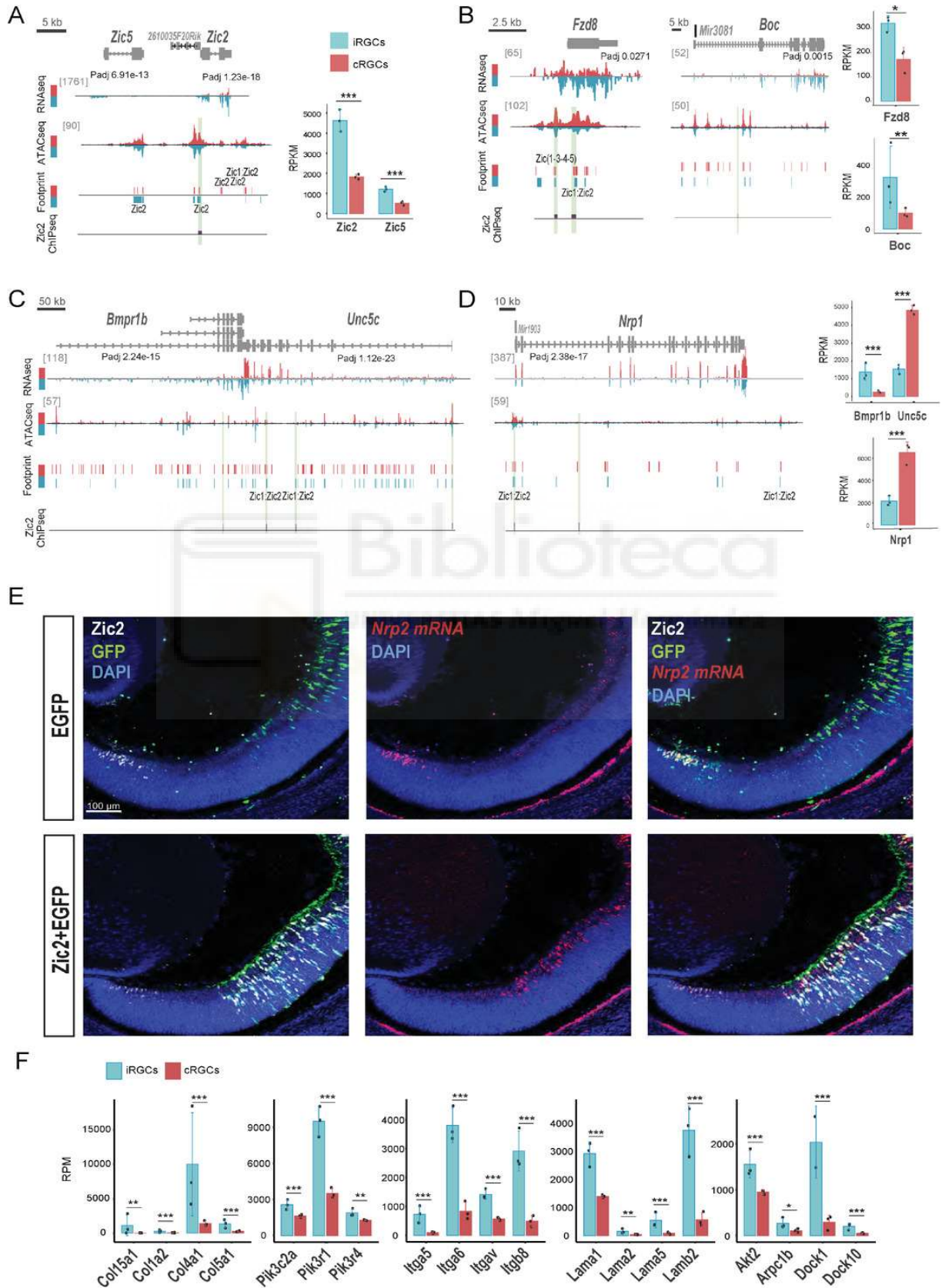


Figura 16. Nrp2 es un efector de Zic2. Nrp2 se expresa alta y específicamente en las células retinales Zic2, pero no en las células diana que expresan EGFP. Sin embargo, cuando Zic2 se expresa ectópicamente, los niveles de ARNm de Nrp2 aumentan considerablemente. Barra de escala: 100 μ m. F) Los gráficos representan la expresión de transcritos (en RPM) obtenidos a partir de experimentos de ARN-seq de CGRi o CGRcs correspondientes a genes que codifican para diferentes integrinas (prueba -t, ***Padj < 0,001).

Curiosamente, Nrp2 se ha vinculado funcionalmente a la vía de reciclado de integrinas en células endoteliales durante la angiogénesis, en particular Itga5 (Alghamdi A.A. et al. 2020). Este hallazgo encajaba con nuestros análisis PANTHER de DEGs asociados a DARs en CRGi, que identificaron la señalización por integrinas como una de las vías más enriquecidas en esta población neuronal. En línea con esto, estudios recientes han sugerido que las integrinas son esenciales para restringir la proyección de las CRGi a subcapas específicas del colículo superior (Su J. et al. 2021) (**Figura 16F**). Nuestros datos mostraron expresión específica de Itga5 y de otros miembros de la familia de integrinas en las CRGi, muchos de los cuales presentan sitios de unión de Zic2 en sus regiones genómicas (**Figura 17**).

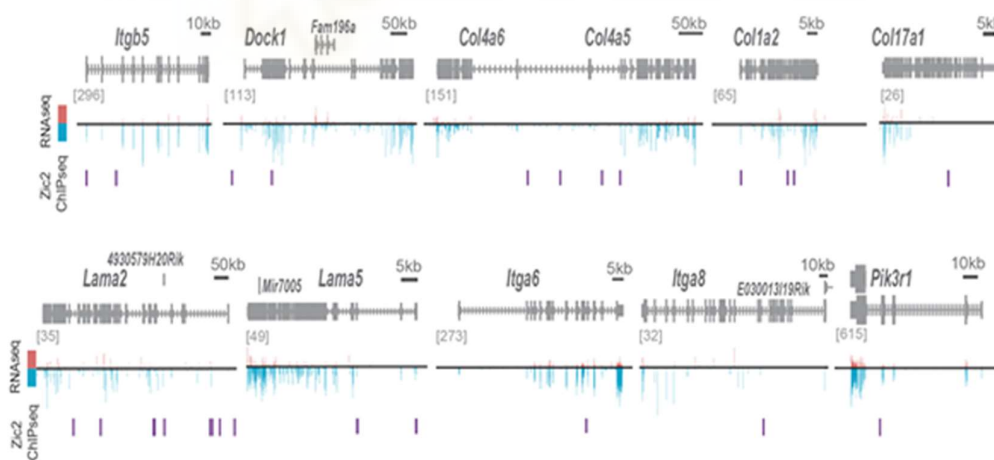


Figura 17. Regulación diferencial de diversos genes de la familia de las integrinas. ARN-seq y ChIP-seq de Zic2 en retina muestran que estas proteínas se unen a secuencias regulatorias de loci que codifican para diferentes genes de integrinas que además se expresan diferencialmente en CGRi y CGRcs.

En conjunto, estos resultados consolidan a Zic2 como un regulador de múltiples receptores de guía axonal y moléculas de adhesión en las CRGi, mediante una combinación de represión y activación transcripcional sobre múltiples dianas, algunas ya conocidas y otras previamente no descritas.

5. 7. Los FTs Lhx2 y Lhx9 son co-reguladores de la trayectoria ipsilateral junto con Zic2

Además de Zic2, nuestros análisis ATAC-seq revelaron una ocupación diferencial de motivos de unión para los factores de transcripción Lhx2 y Lhx9 en las CGRi (**Figura 18A**). Ambos factores se expresan en la retina en desarrollo (De Melo, J. et al. 2016, Balasubramanian R et al. 2014) (**Figura 18B**), aunque hasta ahora no estaba claro si desempeñaban un papel directo en el guiado axonal de las CGRs.

Lhx9 se expresa en niveles bajos pero detectables en ambas subpoblaciones, mientras que Lhx2 presenta una expresión más alta en las CRGi, lo que sugería una contribución funcional más relevante de este último factor en la población de ipsilaterales.

Para explorar la función de este FT en CGRs, realizamos experimentos de ganancia de función mediante electroporación *in utero* de plásmidos codificantes para Lhx2 o Lhx9 en la retina de embriones E13.5. Cuatro días después de la electroporación, analizamos las trayectorias axonales de las CGRc transfectadas y observamos un aumento significativo de axones que proyectaban ipsilateralmente tras la expresión ectópica de cualquiera de los dos factores (**Figuras 18E,F**), lo que indicaba que Lhx2 y Lhx9 favorecen la elección de una trayectoria ipsilateral y, por tanto, modulan activamente la guía axonal.

Dado que Lhx2 se expresa preferentemente en las CGRi, nos planteamos si sus dianas génicas podrían coincidir con las reguladas por Zic2. Al comparar las listas de genes asociados a *footprints* de Zic1/2 y Lhx2/9 en CRGi, observamos que un 36,5 % de los genes con huellas de Lhx2/9 también contenían huellas de Zic1/2 (**Figura 18C**), lo que sugería una convergencia funcional significativa entre ambos programas transcripcionales.

El análisis GO de los genes diferencialmente expresados regulados por Lhx2/9 (n=232) mostró un enriquecimiento claro en términos asociados a las vías de señalización por cadherinas y Wnt, vías que también han sido previamente asociadas a Zic2 (**Figura 18D**). Por tanto, estos datos apuntan

a una regulación coordinada de genes clave para la guía axonal por parte de Lhx2/9 y Zic2 durante la especificación de la trayectoria ipsilateral.

Dado que Lhx2/9 también se expresan en otros tipos neuronales durante el desarrollo embrionario, quisimos explorar un papel potencial de estos factores en la guía axonal de otros circuitos. En las neuronas espinales Lhx2/9 están presentes en las interneuronas dl1 durante el desarrollo. De hecho, los ratones mutantes para Lhx2/9 muestran defectos en el cruce de la línea media en la placa basal del tubo neural, específicamente en las subpoblaciones comisurales e ipsilaterales de las dl1. Para evaluar si Lhx9 era suficiente para inducir la repulsión axonal a la línea media, electroporamos plásmidos que codifican para estos factores en médula espinal de pollo *in ovo* y encontramos un aumento significativo de axones ipsilaterales concomitante con una disminución de comisurales (**Figuras 18G, H**), demostrando que Lhx9, al igual que Zic2, puede promover la repulsión axonal a la línea media en contextos neuronales distintos de la retina.

Por último, exploramos si Lhx2/9 podrían jugar un papel similar en el guiado axonal cortical. Par ello electroporamos plásmidos de expresión en mamífero que contienen la secuencia codificante de Lhx2 o Lhx9 en el telencéfalo de embriones E15 y analizamos las proyecciones corticales en P4. Los axones de neuronas corticales que expresaban ectópicamente estos factores evitaban el cuerpo calloso, fenómeno más acusado en el caso de Lhx2 (**Figuras 18I, J**).

En conjunto, nuestros datos, junto con estudios previos realizados en las neuronas espinales (Wilson et al., 2008) demuestran que Lhx2 y Lhx9 actúan como reguladores de la trayectoria axonal ipsilateral no solo en la retina, sino también en otros circuitos como la médula espinal y la corteza, y que su función puede converger con la de Zic2 a través de programas transcripcionales parcialmente compartidos.

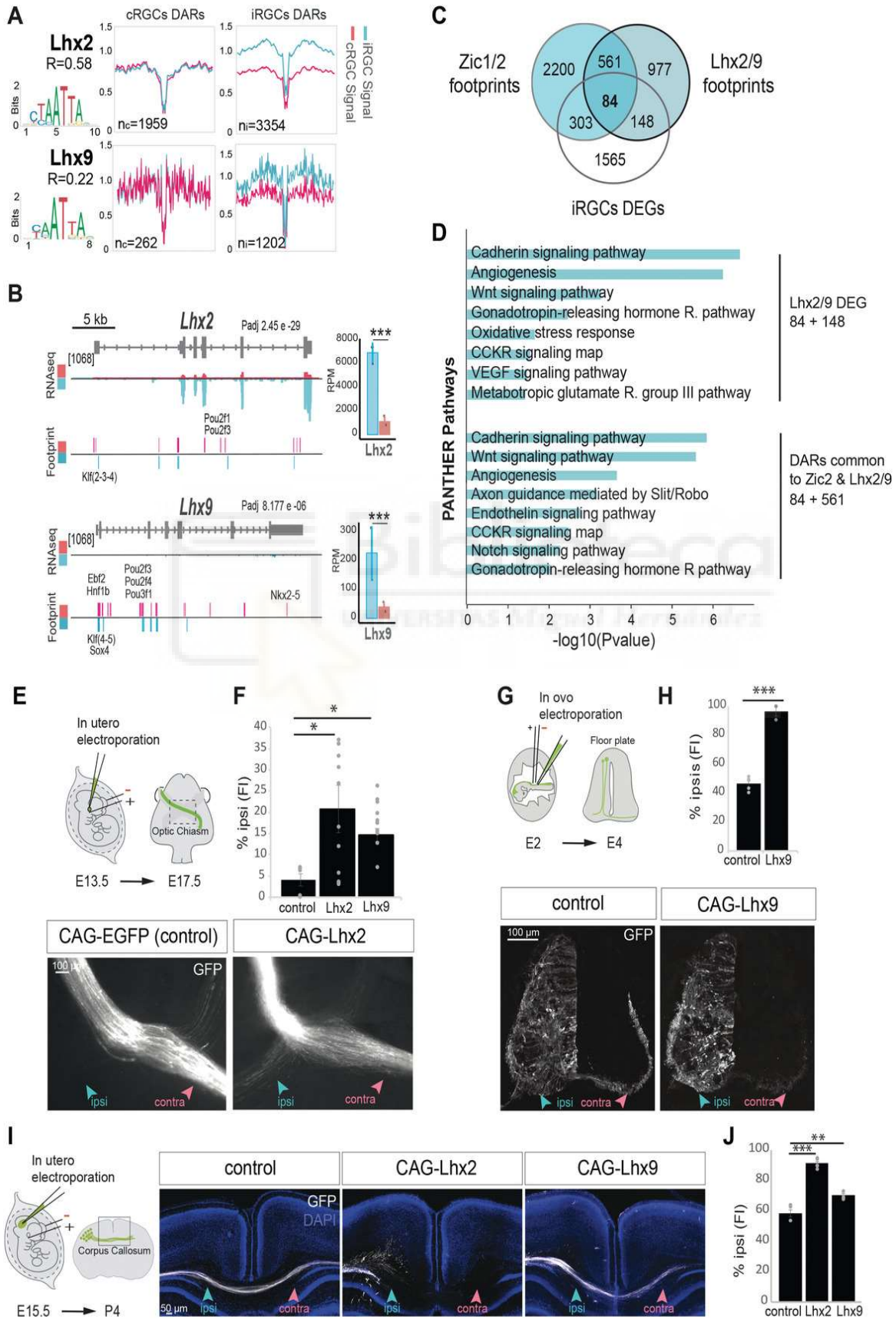


Figura 18. Lhx2/9 contribuyen a la regulación la repulsión axonal en la línea media. A) Huella digital en motivos Lhx2 y Lhx9. n = número de motivos detectados en células ganglionares de la retina contralateral (CGRcs; nc) o células ganglionares de la retina ipsilateral (CGRis; ni) (los valores corresponden a inserciones $tn5$ normalizadas). Se muestra matriz de motivos de la base de datos JASPAR para cada factor de transcripción. $R = nc/ni$. B) Instantáneas genómicas de perfiles ATAC-seq, ARN-seq y enriquecimiento de huellas en CGRis y CGRcs en los loci Lhx2 y Lhx9 representados en lecturas por millón (RPM). *** $P_{adj} < 0,001$ Los gráficos representan la expresión de transcritos (en RPM) para Lhx2 y Lhx9 obtenida a partir de experimentos de ARN-seq en CGRis o CGRcs. C) Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre los genes expresados diferencialmente (DEGs) y las huellas para Zic1/2 y Lhx2/9 anotadas al gen más cercano en la población de CGRis. D) Panther pathways Análisis de enriquecimiento en Gene Ontology (GO) de DEGs asociados a las huellas de Lhx2/9 en CGRis, y comunes a Zic1/2 y Lhx2/9. $P_{adj} < 0,1$ y $|\log_2FC| \geq 1$. E. Arriba se muestra un dibujo esquemático del enfoque experimental. La electroporación monocular in utero con plásmidos que codifican EGFP se realiza en embriones E13.5 y sus quiasmas ópticos se analizan en E18.5. Quiasmas ópticos de embriones E18.5 electroporados monocularmente en E13.5 con plásmidos que codifican para el factor de transcripción Lhx2 y EGFP o EGFP solo como control. Los embriones electroporados con Lhx2 mostraron una proyección ipsilateral ectópica no presente en los controles. Barra de escala: 100 μm . F) El gráfico representa el porcentaje de axones que se proyectan ipsilateralmente en el quiasma óptico normalizado con respecto al número total de axones dirigidos en embriones electroporados con plásmidos que codifican Lhx2, Lhx9 y/o EGFP (n = número de embriones; control $n = 6$, Lhx2 $n = 12$, Lhx9 $n = 11$) (prueba ANOVA; seguida de corrección de Bonferroni, $*p < 0,05$). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM. G) El panel superior es un dibujo esquemático del enfoque experimental. Secciones transversales de médulas espinales de embriones de pollo E4 electroporados unilateralmente en E2 con plásmidos que codifican para Lhx9 y/o EGFP. H) El gráfico representa el porcentaje de axones que se proyectan ipsilateralmente normalizado con respecto al número total de axones dirigidos (n = número de embriones; control $n = 5$, Lhx9 $n = 3$) (prueba t no apareada de dos colas, $***p < 0,001$). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM. I) El panel izquierdo es un dibujo esquemático del enfoque experimental. Secciones coronales de cerebros P4 de ratones electroporados en e15.5 con plásmidos que codifican EGFP y/o Lhx2 o Lhx9. J. El gráfico muestra el porcentaje de axones que se proyectan ipsilateralmente normalizado con respecto al número total de axones dirigidos (n = número de crías; Control $n = 4$, Lhx2 = 5, Lhx9 $n = 5$) (prueba ANOVA; seguida de corrección de Bonferroni, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos llevado a cabo un estudio exhaustivo y comparativo del transcriptoma y de accesibilidad de la cromatina en dos poblaciones de neuronas retinales—las CGRc e CRGi— que, si bien comparten origen y función sensorial, divergen en el patrón de proyección de sus axones. Al combinar análisis transcriptómicos (ARN-seq) con técnicas de accesibilidad y ocupación de la cromatina (ATAC-seq y ChIP-seq), hemos podido identificar un repertorio de genes y elementos reguladores que están potencialmente implicados en la especificación de la trayectoria axonal durante el desarrollo del sistema visual. Esta estrategia no solo nos ha permitido validar hallazgos previos, sino que también ha revelado nuevos actores moleculares y principios reguladores que contribuyen a las decisiones de cruce o no cruce de la línea media por parte de los axones de las CGRs.

Uno de los hallazgos más destacables de nuestro estudio ha sido que la mayoría de los genes diferencialmente expresados entre CRGi y CGRc y relacionados con la guía axonal no están asociados a promotores, sino a elementos reguladores distales en cis (*CREs*). Este hecho pone de relieve un aspecto poco explorado en el campo de la neurobiología del desarrollo: el papel crucial de *enhancers* específicos en la determinación de trayectorias axonales. Nuestros datos refuerzan la idea de que la guía axonal no se apoya únicamente en la transcripción basal, sino en la interacción precisa y dinámica entre FTs y regiones no codificantes del genoma.

Nuestro estudio ha confirmado la mayoría de receptores y proteínas previamente implicados en navegación axonal en el quiasma óptico y además ha identificado una ocupación diferencial por parte de diversos factores de transcripción no previamente descrita. Entre los receptores identificados destaca *Nrp2*, una diana no previamente relacionada con la guía axonal en el quiasma y cuya regulación por *Zic2* se hemos confirmado funcionalmente (Figura 19). . Además identificamos nuevos FTs y genes diana cuya expresión y accesibilidad son específicas de una u otra

subpoblación, acercándonos a una visión más completa del programa transcripcional que gobierna la guía axonal en la línea media.

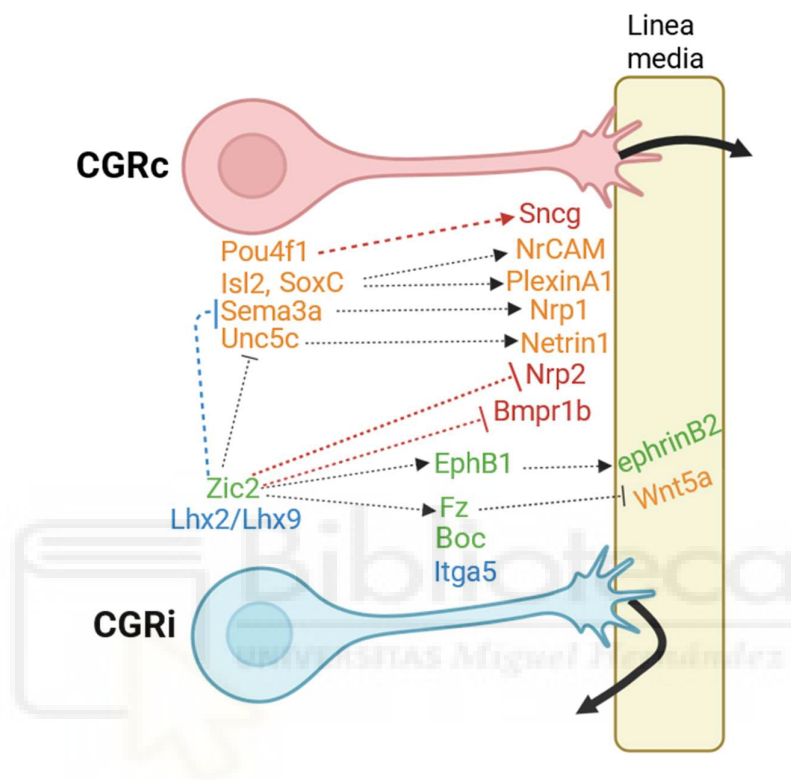


Figura 19. Diagrama resumen de los reguladores del programa transcripcional que gobierna la guía axonal en la línea media de CGRc y CGRi. Los reguladores del programa transcripcional de CGRc que ya se conocen se marcan en naranja, y en rojo se marcan los que se han identificado en este estudio. En el caso de las CGRi, en verde se marcan los que ya se conocen, y en azul los identificados en este estudio.

La formación del quiasma óptico tiene lugar en dos fases. En primer lugar, axones pioneros procedentes de la retina dorsocentral emergen del disco óptico a E12 y atraviesan el tallo óptico para alcanzar el diencefalo ventral, donde la mayoría de los axones cruzan la línea media siguiendo una disposición en V invertida que establece la futura ubicación del quiasma (Avraham O et al, 2009). Una fracción menor de axones proyecta ipsilateralmente pero desaparece abruptamente tras E16 (Godement P et al. 1987, Cowan W.M. 1984, Soares C. A. et al 2015). Esta población neuronal de axones ipsilaterales transitorios no expresa Zic2 ni Slc6a4 (Garcia-Frigola et al. 2010, Herrera E. et al. 2003, Soares C.A. et al. 2015), y no está claro si presentan otros marcadores típicos de las

CRGi. Esto es relevante porque nuestro estudio se realizó en E16, justo cuando esas proyecciones desaparecen, por lo que es probable que esta población transitoria no se detecte en nuestros análisis.

Estudios recientes basados en ARN-seq de célula única han demostrado que la diversificación de tipos de CGRs es un proceso gradual y asincrónico, donde muchas identidades neuronales no se consolidan hasta fases postmitóticas avanzadas (Shekhar K et al. 2022). Estos hallazgos sugieren que la lateralidad axonal se especifica antes de que se establezca completamente la identidad de tipo neuronal, y que las CGRs inmaduras podrían ser moderadamente multipotentes incluso después de haber establecido su trayectoria. Nuestros datos son consistentes con esta idea, y plantean que la lateralidad y el tipo neuronal se co-especifican de manera temprana, y que el programa que establece la lateralidad se desactiva una vez tomada la decisión axonal.

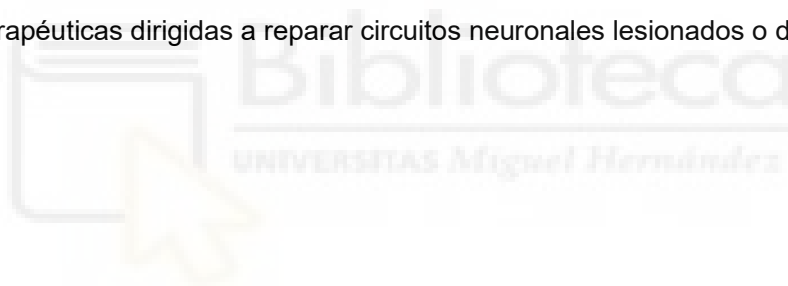
Para validar experimentalmente nuestros hallazgos bioinformáticos, nos centramos en dos familias de factores de transcripción: Pou4f y Lhx. Confirmamos que Pou4f1 es esencial para el cruce de la línea media, que regula directamente la expresión de γ -sinucleína, y que su pérdida de función produce estancamiento axonal a nivel del quiasma. Por contra, la inactivación de γ -sinucleína indujo una proyección ipsilateral ectópica. Esta diferencia fenotípica sugiere que γ -sinucleína actúa como efector de Pou4f1, pero no incluye todas sus funciones.

En cuanto a la familia de las sinucleínas, identificamos a γ -sinucleína como el único miembro con expresión específica en CGRc vinculado funcionalmente a la guía axonal. Aunque se conocía su expresión en CGRs adultas (Surgucheva I. et al. 2008), no se había descrito su papel durante el desarrollo neuronal. Dado su efecto sobre la polimerización de microtúbulos y su interacción con proteínas como MAP1 (Zhang H. et al. 2011), futuros estudios deberían investigar el papel directo de esta proteína en la dinámica del citoesqueleto del cono de crecimiento.

Respecto a los factores Lhx, nuestros experimentos demostraron que Lhx2 y Lhx9 inducen la repulsión de la línea media en diferentes contextos. Aunque Lhx2 parece más efectivo en retina y

corteza, Lhx9 desempeña un papel más prominente en médula espinal. Esto indica que estos factores podrían actuar sobre distintos efectores dependiendo del tipo celular. De acuerdo con esto, se ha descrito que Lhx2 regula *Robo3* en neuronas comisurales dl1, mientras que reprime *Robo1* en neuronas tálamocorticales (Marcos-Mondejar P. et al. 2012). En peces cebra, Lhx2/9 regulan negativamente la expresión de Slit y Sema3a en el diencefalo (Yang J.L.J et al. 2020), lo que sugiere una especificidad contextual en los efectores regulados por estos FTs.

En resumen, nuestro trabajo ha permitido identificar decenas de nuevos genes y elementos reguladores involucrados en la especificación de trayectorias axonales durante el desarrollo del sistema visual de mamíferos. Estos descubrimientos abren nuevas vías para el estudio de la neurogénesis y aportan herramientas conceptuales y moleculares fundamentales para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a reparar circuitos neuronales lesionados o degenerados.



7. REFERENCIAS

1. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science*. 1996;274(5290):1123–33. doi:10.1126/science.274.5290.1123.
2. Ramón y Cajal S. La textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Madrid: Moya; 1890.
3. Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1959–64. doi:10.1126/science.1072165. Erratum in: *Science*. 2003 Jan 24;299(5606):515. PMID: 12471249.
4. Hall AC, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2):a001818. doi:10.1101/cshperspect.a001818.
5. Bastiani MJ, et al. Growth cone guidance by substratum-bound chemoattractants: identification of soluble factors. *Neuron*. 1987;1(6):693–703. doi:10.1016/0896-6273(87)90117-1
6. Eisen MB, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):10933–7. doi:10.1073/pnas.86.23.10933.
7. Pike SE, et al. The role of cell adhesion molecules in axon guidance. *J Cell Biol*. 1992;119(2):349–61. doi:10.1083/jcb.119.2.349.
8. Holt CE. Growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol*. 1989;2(1):71–7
9. Harris WA. Cellular mechanisms of axon guidance. *Curr Opin Neurobiol*. 1990;1(1):50–6. doi:10.1016/0959-4388(89)90030-1.
10. Chien CB, et al. Genetic analysis of neuronal pathfinding in zebrafish. *Development*. 1994;120(7):2081–92.
11. Dumoulin A, Stoeckli ET. Looking for Guidance - Models and Methods to Study Axonal Navigation. *Neuroscience*. 2023 Jan 1;508:30–39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.08.005. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35940454.
12. Ptashne, M., & Gann, A. A. F. (2002). *Genes and signals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
13. Stormo, G. D. (2000). DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics*, 16(1), 16–23.
14. Bulyk, M. L., Huang, X., Choo, Y., & Church, G. M. (2001). Exploring the DNA-binding specificities of zinc fingers with DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(12), 7158–7163. doi:10.1073/pnas.121189998
15. Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M. Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*. 2003 Sep 11;39(6):919–35. doi: 10.1016/j.neuron.2003.08.017. PMID: 12971893.
16. Petros, T.J., Rebsam, A., & Mason, C.A. (2008). Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 295–315

17. Guido, W. Development, form, and function of the mouse visual thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 2018
18. Ellis, E. M., Gauvain, G., Sivyer, B., & Murphy, G. J. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Neurophysiology*, (2016) 116(2), 602–610
19. Turner DL, Cepko CL. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*. 1987 Jul 9-15;328(6126):131-6. doi: 10.1038/328131a0. PMID: 3600789.
20. Brown NL, Patel S, Brzezinski J, Glaser T. Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development*. 2001 Aug;128(13):2497-508. PMID: 11493566
21. Wang SW, Kim BS, Ding K, Wang H, Sun D, Johnson RL, Klein WH. Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes & Development*. 2001 Aug 1;15(15):24–29. PMID: 11485991
22. Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R. A., Dolen, G., Mikoshiba, K., ... & Mason, C. A. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell*, 114(5), 545-557.
23. Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., et al. (1998). Requirement for Brn-3b in early differentiation of postmitotic retinal ganglion cell precursors. *Developmental Biology*, 197(1), 155–169. doi:10.1006/dbio.1998.8760
24. Badea TC, Nathans J. Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Res*. 2011 Jan 28;51(2):269–279. doi:10.1016/j.visres.2010.08.039.
25. Escalante, A.*, et al. (2013). Zic2-dependent axon midline avoidance controls the formation of ipsilateral projections in spinal neurons and the visual system. *Neuron*, 78(3), 530–546.
26. García-Frigola, C., Carreres, M., & Herrera, E. (2008). Zic2 regulates the expression of genes involved in axon guidance and cell migration in the developing retina. *Developmental Biology*, 319(1), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.018>
27. Murcia-Belmonte, V., McEvoy, J., Britto, J. M., Pichaud, F., & Mason, C. A. (2019). Zic2 regulates the ipsilateral projection of retinal ganglion cell axons by repressing Unc5c expression. *Development*, 146(18), dev175049. <https://doi.org/10.1242/dev.175049>
28. Dell, A. L., Fried-Cassorla, E., Xu, H. & Raper, J. A. (2013). cAMP-induced expression of Neuropilin1 promotes retinal axon crossing at the optic chiasm. *Journal of Neuroscience*, 33(27), 11076–11086.
29. Kita, T., Osten, P., & Kita, H. (2014). Rat subthalamic nucleus and zona incerta share extensively overlapped representations of cortical functional territories. *Journal of Comparative Neurology*, 522(18), 4043–4056. doi:10.1002/cne.23655

30. Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, Shu T, Fritsch B, Richards LJ, Kolodkin AL, Ginty DD. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development *Genes Dev.* 2003 May 1;17(1):19-31. DOI: 10.1101/gad.1033903
31. Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, Mason CA, Herrera E, Mann F, Kolodkin AL, Sowden JC. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm *Neuron.* 2011 Apr 28;70(2):273-87. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.049
32. Herrera E, Marcus R, Li S, Williams SE, Erskine L, Lai E, Mason C. Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development.* 2004 Nov;131(22):5727-39. doi: 10.1242/dev.01431.
33. Carreres MI, Erskine L, Karta MR, Herrera E. Foxd1 regulates retinal ganglion cell axon guidance through repression of Zic2 expression *Development.* 2013 Apr;140(7):1375-1383. DOI: 10.1242/dev.089650
34. Kuwajima, T., Yamashita, S., & Kageyama, R. (2012). SoxC transcription factors regulate the differentiation of retinal ganglion cells by modulating Notch signaling. *Developmental Biology*, 371(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.029>
35. Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T. J., Kumanogoh, A., Jessell, T. M., Mason, C. (2012). Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron*, 74(4), 676-690.
36. Quina, L. A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Flagg, R., & Turner, E. E. (2005). Brn3a and Islet1 act epistatically to regulate the gene expression program of sensory differentiation. *The Journal of Neuroscience*, 25(29), 6857–6868. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1058-05.2005>
37. García-Frígola, C., & Herrera, E. (2010). Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. *The EMBO Journal*, 29(18), 3170–3183. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.172>
38. Pan, L., Deng, M., Xie, X., & Gan, L. (2005). Differential expression of transcription factors in retinal ganglion cells and their roles in cell fate determination. *Journal of Neuroscience*, 25(15), 4014–4025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4706-04.2005>
39. Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
40. Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. *et al.* Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* 37, 907–915 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
41. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25. PMID: 25260700; PMCID: PMC4287950.
42. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for ARN-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550 (2014). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

43. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
44. Ramírez, F., Dünder, F., Diehl, S., Grüning, B.A., & Manke, T. (2014). deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W187–W191. <https://doi.org/10.1093/nar/gku365>
45. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., et al. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
46. Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albu, L. P., Mushayamaha, T., & Thomas, P. D. (2021). PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D394–D403. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1106>
47. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods*, 10(12), 1213–1218.
48. Fernandez-Albert, J., Lipinski, M., Lopez-Cascales, M. T., Rowley, M. J., Martin-Gonzalez, A. M., Del Blanco, B., ... & Barco, A. (2019). Immediate and deferred epigenomic signatures of in vivo neuronal activation in mouse hippocampus. *Nature neuroscience*, 22(10), 1718–1730.
49. Langmead, B., & Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
50. Broad Institute. (2019). Picard Toolkit. Broad Institute, GitHub repository. <http://broadinstitute.github.io/picard/>
51. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., et al. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
52. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., et al. (2008). Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9(9), R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
53. Ross-Innes, C.S., Stark, R., Teschendorff, A.E., et al. (2012). Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*, 481(7381), 389–393. (DiffBind was introduced in this context) <https://doi.org/10.1038/nature10730>
54. Zhu, L.J., Gazin, C., Lawson, N.D., et al. (2010). ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics*, 11, 237. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-237>
55. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., et al. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular Cell*, 38(4), 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004> (HOMER website: <http://homer.ucsd.edu/homer/>)

56. Gusmao, E.G., Dieterich, C., Zenke, M., & Costa, I.G. (2016). Detection of active transcription factor binding sites with the combination of DNase hypersensitivity and histone modifications. *Bioinformatics*, 32(8), 1114–1122. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv710>
57. Quinlan, A.R., & Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
58. Statham, A. L., Strbenac, D., Coolen, M. W., Stirzaker, C., Clark, S. J., & Robinson, M. D. (2010). Repitools: an R package for the analysis of enrichment-based epigenomic data. *Bioinformatics*, 26(13), 1662–1663. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>
59. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
60. Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., et al. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 12(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
61. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
62. Fornes, O., Castro-Mondragon, J.A., Khan, A., et al. (2020). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
63. Wang, S., Sun, H., Ma, J., Zang, C., Wang, C., Wang, J., ... & Liu, X. S. (2013). Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. *Nature protocols*, 8(12), 2502-2515.
64. Morenilla-Palao, C., López-Cascales, M. T., López-Atalaya, J. P., Baeza, D., Calvo-Díaz, L., Barco, A., & Herrera, E. (2020). A Zic2-regulated switch in a noncanonical Wnt/ β catenin pathway is essential for the formation of bilateral circuits. *Science advances*, 6(46), eaaz8797.
65. Dräger, Ursula C. "Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse." *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences* 224.1234 (1985): 57-77.
65. Colello RJ, Guillery RW. The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: retinal position and axonal course. *Development*. 1990 Mar;108(3):515-23. doi: 10.1242/dev.108.3.515. PMID: 2340812.
66. Fabre, P. J., Polański, W., Lecaudey, V., & Ruhrberg, C. (2010). Boc is required for the selective guidance of retinal ganglion cell axons at the optic chiasm. *Nature Neuroscience*, 13(4), 440–449. <https://doi.org/10.1038/nn.2494>

67. Pak, W., Hindges, R., Lim, Y. S., Pfaff, S. L., & 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(4), 567-578.
68. Peng, J., Fabre, P. J., Dolique, T., Swikert, S. M., Kermasson, L., Shimogori, T., & Charron, F. (2018). Sonic hedgehog is a remotely produced cue that controls axon guidance trans-axonally at a midline choice point. *Neuron*, 97(2), 326-340.
69. Yan, F., Powell, D. R., Curtis, D. J., & Wong, N. C. (2020). From reads to insight: a hitchhiker's guide to ATAC-seq data analysis. *Genome biology*, 21, 1-16.
70. Kuwajima, T., Ohtsuka, M., Inoue, K., & Kageyama, R. (2017). Pou4f1 (Brn3a) regulates retinal ganglion cell axon guidance at the optic chiasm. *Developmental Neurobiology*, 77(3), 271-283. <https://doi.org/10.1002/dneu.22427>
71. Shao, T., Song, P., Hua, H., Zhang, H., Sun, X., Kong, Q., ... & Jiang, Y. (2018). Gamma synuclein is a novel Twist1 target that promotes TGF- β -induced cancer cell migration and invasion. *Cell death & disease*, 9(6), 625.
72. Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., ... & Liu, J. (2005). Loss of epigenetic control of synuclein- γ gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer research*, 65(17), 7635-7643.
73. Oeckl, P., Metzger, F., Nagl, M., von Arnim, C. A., Halbgebauer, S., Steinacker, P., ... & Otto, M. (2016). Alpha-, beta-, and gamma-synuclein quantification in cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring reveals increased concentrations in Alzheimer's and creutzfeldt-jakob disease but No alteration in synucleinopathies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(10), 3126-3138.
74. Ninkina, N., Papachroni, K., Robertson, D. C., Schmidt, O., Delaney, L., O'Neill, F., ... & Buchman, V. L. (2003). Neurons expressing the highest levels of γ -synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Molecular and cellular biology*, 23(22), 8233-8245.
75. Tilve, S., Difato, F., & Chiergatti, E. (2015). Cofilin 1 activation prevents the defects in axon elongation and guidance induced by extracellular alpha-synuclein. *Sci Rep* 5: 16524.
76. Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA. Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell*. 2003 Sep 5;114(5):545-57. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00684-6. Erratum in: *Cell*. 2003 Oct 3;115(1):125. PMID: 13678579.
77. Giudice, Q. L., Leleu, M., & Fabre, P. J. (2018). Transcriptional logic of cell fate specification and axon guidance in early born retinal neurons revealed by single-cell mRNA profiling. *bioRxiv*, 497081.
78. Erskine, L., François, U., Denti, L., Joyce, A., Tillo, M., Bruce, F., ... & Ruhrberg, C. (2017). VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels. *Development*, 144(13), 2504-2516.

79. Alghamdi, A. A., Benwell, C. J., Atkinson, S. J., Lambert, J., Johnson, R. T., & Robinson, S. D. (2020). NRP2 as an emerging angiogenic player; promoting endothelial cell adhesion and migration by regulating recycling of $\alpha 5$ integrin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 395.
80. Su J, Sabbagh U, Liang Y, Olejníková L, Dixon KG, Russell AL, Chen J, Pan YA, Triplett JW, Fox MA. A cell-ECM mechanism for connecting the ipsilateral eye to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Oct 19;118(42):e2104343118. doi: 10.1073/pnas.2104343118. PMID: 34654745; PMCID: PMC8545493.
81. de Melo, J., Zibetti, C., Clark, B. S., Hwang, W., Miranda-Angulo, A. L., Qian, J., & Blackshaw, S. (2016). Lhx2 is an essential factor for retinal gliogenesis and notch signaling. *Journal of Neuroscience*, 36(8), 2391-2405.
82. Balasubramanian, R., Bui, A., Ding, Q., & Gan, L. (2014). Expression of LIM-homeodomain transcription factors in the developing and mature mouse retina. *Gene Expression Patterns*, 14(1), 1-8.
83. Wang, Q., Marcucci, F., Cerullo, I., & Mason, C. (2016). Ipsilateral and contralateral retinal ganglion cells express distinct genes during decussation at the optic chiasm. *ENeuro*, 3(6).
84. Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., & Klar, A. (2009). Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1. *Neural development*, 4, 1-23.
85. Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., & Bonhoeffer, F. (1987). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, 101(4), 697-713.
86. Cowan, W. M., Fawcett, J. W., O'Leary, D. D., & Stanfield, B. B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science*, 225(4668), 1258-1265.
87. Soares, C. A., & Mason, C. A. (2015). Transient ipsilateral retinal ganglion cell projections to the brain: Extent, targeting, and disappearance. *Developmental neurobiology*, 75(12), 1385-1401.
88. Shekhar, K., Whitney, I. E., Butrus, S., Peng, Y. R., & Sanes, J. R. (2022). Diversification of multipotential postmitotic mouse retinal ganglion cell precursors into discrete types. *Elife*, 11, e73809.
89. Surgucheva, I., Weisman, A. D., Goldberg, J. L., Shnyra, A., & Surguchov, A. (2008). γ -Synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Molecular vision*, 14, 1540.
90. Zhang, H., Kouadio, A., Cartledge, D., & Godwin, A. K. (2011). Role of gamma-synuclein in microtubule regulation. *Experimental cell research*, 317(10), 1330-1339.
91. Marcos-Mondéjar, P., Peregrín, S., Li, J. Y., Carlsson, L., Tole, S., & López-Bendito, G. (2012). The Lhx2 transcription factor controls thalamocortical axonal guidance by specific regulation of robo1 and robo2 receptors. *Journal of Neuroscience*, 32(13), 4372-4385.



92. Yang, J. L. J., Bertolesi, G. E., Hehr, C. L., & McFarlane, S. (2020). Lhx2/9 and Etv1 Transcription Factors have Complementary roles in Regulating the Expression of Guidance Genes slit1 and sema3a. *Neuroscience*, 434, 66-82.



8. CONCLUSIONES

1. Las CGRs contralaterales e ipsilaterales activan programas genéticos divergentes, lo que se refleja en perfiles transcriptómicos y epigenéticos claramente diferenciados, revelando mecanismos reguladores específicos para cada trayectoria axonal.
2. *Zic2* actúa como un regulador de las CGRi, controlando directamente genes implicados en el cruce a la línea media, incluyendo *Unc5c*, *Bmpr1b*, *Nrp2* e integrinas, y modulando tanto represión como activación génica desde *enhancers* accesibles.
3. *Nrp2* es validado como nueva diana directa de *Zic2* en CGRi, y su expresión es inducida por *Zic2* *in vivo*, lo que posiciona a *Nrp2* como un nuevo componente funcional en la guía axonal de la vía ipsilateral.
4. *Pou4f1* regula el cruce de la línea media en CGRc mediante la activación de γ -sinucleína, estableciendo una cascada transcripcional específica que no se había descrito previamente en el desarrollo del sistema visual.
5. La γ -sinucleína, previamente asociada a funciones en neuronas adultas, cumple un papel esencial en la navegación axonal de CGRc, promoviendo el cruce axonal en el quiasma óptico. Su función ha sido confirmada mediante ensayos funcionales *in vivo*.
6. *Lhx2* y *Lhx9* promueven trayectorias ipsilaterales no solo en retina, sino también en corteza y médula espinal, evidenciando que estos factores regulan decisiones de lateralidad en múltiples sistemas neuronales mediante mecanismos compartidos y específicos de contexto.

7. Los programas transcripcionales regulados por *Lhx2/9* y *Zic2* muestran una convergencia funcional parcial, con genes diana comunes asociados a vías de señalización relevantes como Wnt y cadherinas, lo que sugiere cooperación o redundancia funcional en la especificación de la vía ipsilateral.

8. Las decisiones de trayectoria axonal preceden a la consolidación de la identidad de subtipo en las CGRs, indicando que la elección de lateralidad es un proceso temprano y transitorio en la programación del destino neuronal.

9. La mayoría de los elementos reguladores asociados a genes de guía axonal son potenciadores distales accesibles, más que promotores, lo que resalta el papel clave de la arquitectura del genoma y su accesibilidad dinámica en la regulación del desarrollo axonal.

10. La combinación de enfoques multiómicos (ARN-seq, ATAC-seq y *ChIP*-seq) permitió identificar y validar nuevas dianas funcionales, consolidando una estrategia eficaz para descubrir reguladores clave de la navegación axonal con potencial relevancia terapéutica.

9. ANEXOS

Tabla S1 (Link):

<https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1002%2Fadv%202200615&file=adv%204386-sup-0002-TableS1.xlsx>



Multimic Analysis of Neurons with Divergent Projection Patterns Identifies Novel Regulators of Axon Pathfinding

Marta Fernández-Nogales, Maria Teresa López-Cascales, Verónica Murcia-Belmonte, Augusto Escalante, Jordi Fernández-Albert, Rafael Muñoz-Viana, Angel Barco,* and Eloísa Herrera*

Axon pathfinding is a key step in neural circuits formation. However, the transcriptional mechanisms regulating its progression remain poorly understood. The binary decision of crossing or avoiding the midline taken by some neuronal axons during development represents a robust model to investigate the mechanisms that control the selection of axonal trajectories. Here, to identify novel regulators of axon guidance, this work compares the transcriptome and chromatin occupancy profiles of two neuronal subpopulations, ipsilateral (iRGC) and contralateral retinal ganglion cells (cRGC), with similar functions but divergent axon trajectories. These analyses retrieved a number of genes encoding for proteins not previously implicated in axon pathfinding. In vivo functional experiments confirm the implication of some of these candidates in axonal navigation. Among the candidate genes, γ -synuclein is identified as essential for inducing midline crossing. Footprint and luciferase assays demonstrate that this small-sized protein is regulated by the transcription factor (TF) Pou4f1 in cRGCs. It is also shown that Lhx2/9 are specifically expressed in iRGCs and control a program that partially overlaps with that regulated by Zic2, previously described as essential for iRGC specification. Overall, the analyses identify dozens of new molecules potentially involved in axon guidance and reveal the regulatory logic behind the selection of axonal trajectories.

wide variety of birth defects and neurological disorders, such as autism or schizophrenia, that can emerge later in life. The formation of neuronal circuits relies on the coordinated action in time and space of the intracellular signaling proteins, cell-surface receptors, and secreted cues necessary for initiating and guiding axonal trajectories.^[1–3] The expression of these effector molecules depends on differences in chromatin accessibility and occupancy at both genic and extragenic regions that constrain the action of neuronal type-specific TFs.^[4] It is generally accepted that the regulation of gene expression is modular, with particular processes controlled by gene programs in a TF-dependent manner. The set of active enhancers present in a given type of neuron in a particular moment is highly specific and genome-wide active enhancers reflect specific cell identities at specific developmental stages.^[5,6]

Many laboratories are currently trying to uncover the transcriptional mechanisms controlling cell fate determination in neural progenitors. Some studies focus on a specific type of TFs, known as terminal

selectors, that control mature neural features through the coordinated activation of cell-type specific enhancers and maintain neuronal identity throughout life.^[7,8] However, the regulatory mechanisms that specifically control or influence transient and dynamic processes such as axon pathfinding in differentiated but still immature neurons have not been investigated. In fact, although numerous membrane and cytoplasmic proteins that regulate axonal pathfinding have been identified in the last three decades, the epigenetic and transcriptional mechanisms that control their expression remain poorly understood with very few TFs described as directly involved in regulating axon guidance decisions.^[9]

Previous studies have demonstrated the utility of the mammalian visual system as a model to discover general principles ruling the formation of neural circuits.^[10] In mice, axons from neurons located at the ventro-temporal (VT) retina avoid the midline at the level of the optic chiasm to project to the ipsilateral side of the brain while axons from the rest of the retina cross the midline projecting in the opposite hemisphere. This binary decision of visual axons, to cross or not the midline, is essential to perceive

1. Introduction

The proper formation of neuronal circuits during embryonic development is critical for brain functioning and the survival of the organism. As a result, aberrant circuit formation may cause a

M. Fernández-Nogales, M. T. López-Cascales, V. Murcia-Belmonte, A. Escalante, J. Fernández-Albert, R. Muñoz-Viana, A. Barco, E. Herrera Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas -Universidad Miguel Hernández de Elche, CSIC-UMH) San Juan de Alicante
Av. Santiago Ramón y Cajal s/n, Alicante 03550, Spain
E-mail: abarco@umh.es; e.herrera@umh.es

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/adv.202200615>

© 2022 The Authors. Advanced Science published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/adv.202200615

the world in 3D and represents an excellent paradigm to investigate the mechanisms that enable the connection of neurons with distant targets in the brain during late embryonic development.^[9]

To find novel regulatory mechanisms involved in axon pathfinding, we compared the transcriptome and chromatin occupancy profiles of retinal ganglion cell (RGC) neurons that project to the ipsilateral or the contralateral brain hemisphere. These analyses revealed the regulatory logic behind axon trajectories selection and retrieved numerous genes encoding for proteins not previously implicated in axon guidance. We further analyzed some of these candidates throughout gain and loss-of-function (LOF) assays and provide proof-of-principle evidence that validates our screens. Our results demonstrate that the newly identified guidance regulators operate in different contexts and open new venues for further research.

2. Results

2.1. Transcriptomic Signatures of cRGCs and iRGC

To compare the transcriptome of iRGC and cRGCs, we crossed mice bearing the Cre-dependent reporter cassette CAG-[Stop]-Sun1-GFP inserted in the Rosa26 locus^[11,23] with two different Cre-driver lines: Slc6a4-Cre and Pou4f2-Cre (Figure 1A). Upon Cre-mediated recombination, offspring mice express a GFP-tagged variant of the nuclear envelope protein Sun1 (Sun1-GFP) in the targeted population.

The serotonin transporter (Slc6a4, aka Sert) is specifically expressed in iRGCs from embryonic day E14 to early postnatal stages.^[12] Therefore, Slc6a4-Cre; Sun1-GFP mice (from now on referred to as Slc6a4^{Sun1GFP}) display specific labeling of the nuclear envelope of iRGCs. As expected, GFP signal was restricted to the nuclear envelope of cells located in the peripheral VT region in these mice (Figure 1B). In contrast to iRGCs, there is currently no Cre-driver strain that allows the specific tagging of the cRGC population. Pou4f2 (aka Brn3b) is a member of the POU-domain transcription factor family that is expressed in the vast majority of RGCs^[13] and Pou4f2-Cre; Sun1-GFP (from now on referred to as Pou4f2^{Sun1GFP}) mouse embryos display green fluorescence in most nuclei at the inner layer of the entire retina (Figure 1B). To specifically isolate cRGCs, avoiding contamination from iRGCs, we dissected retinas from Pou4f2^{Sun1GFP} embryos and removed the VT region (Figure 1C).

Sun1-GFP⁺ cells were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) from retinas of Slc6a4^{Sun1GFP} and Pou4f2^{Sun1GFP} embryos (Figure S1A, Supporting Information) at E16.5, the time when most axons approach the optic chiasm to cross or avoid the midline. Then, RNA was extracted from sorted cells and an RNA-seq screen was conducted to compare the transcriptome of iRGCs and cRGCs (Figure 1D and Figure S1B,C, Supporting Information). We detected 3968 differentially expressed genes (DEGs) between iRGC and cRGCs. A total of 2100 genes were enriched in the ipsilateral population, while 1868 genes were enriched in the contralateral population (Figure 1D,E and Table S1, Supporting Information).

Mouse RGCs are born following a clockwise wave in the developing retina that initiates at the dorsal-central part of the optic cup and progresses ventrally and peripherally. As a result, cRGCs are generated between E11 and P0 while iRGCs, which arise from

the peripheral VT retina, are born between E14.5 and P0.^[14,15] Therefore, since we collected the cells at E16.5, the iRGC population is, in average, younger than the cRGC population. Consistent with this, Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DEGs retrieved a number of cell cycle-related terms associated with the iRGC population (Figure 1F). Notably, GO analysis also revealed a significant enrichment in genes associated with the term *Axon Guidance* in the gene sets specific for each RGC subpopulation, which likely relates with the divergent guidance decisions that their axons take at the midline. These DEGs included genes such as *Unc5c*, *Boc*, and *Nrp1*, encoding axon guidance receptors previously identified as specifically expressed in either one of the subpopulations^[16–18] (Figure 1E). Consistent with previous studies, our screen also retrieved TFs previously identified as specific of cRGCs (e.g., *Isl2* and *Pou4f1*)^[19,20] or iRGCs (e.g., *Zic2*)^[21] (Figure 1G). Overall, these results underscore the efficacy and reliability of our approach to retrieve genes differentially expressed in iRGC and cRGCs when axon guidance decisions are taking place at the midline.

2.2. Chromatin Accessibility Differences Between iRGCs and cRGCs

To search for novel regulatory mechanisms involved in axon guidance responses, we next sought differences in chromatin accessibility and occupancy between cRGCs and iRGCs using Assay for Transposase-Accessible Chromatin coupled to deep sequencing (ATAC-seq).^[22] For this, we collected retinas from Slc6a4^{Sun1GFP} and Pou4f2^{Sun1GFP} embryos and sorted Sun1-GFP⁺ nuclei to perform fluorescence-activated nuclei sorting (FANS) analysis (Figure 2A).^[23] Again, as described for the RNA-seq screen, in the case of Pou4f2^{Sun1GFP} retinas we first removed the peripheral VT part. This screen retrieved more than 150 000 accessible regions in the chromatin of RGCs. Most of these regions were shared by cRGC and iRGC, reflecting the common ontogeny and function of these two neuron populations. In addition, the comparison of cRGCs and iRGCs ATAC-seq libraries revealed numerous regions displaying differential accessible regions (DARs). The iRGC population presented 21230 specific regions (13,6% of all accessible regions) with enhanced accessibility, whereas cRGCs showed differential accessibility in 13 573 regions (8,7% of total accessible regions) (Figure 2B). Interestingly, the regions displaying enhanced accessibility were more frequently located at the promoter (TSS $\pm$ 500 pb) or at proximal enhancer regions (between 0.5 and 5 kb upstream of the TSS) in iRGC than in cRGCs. In contrast, cRGCs showed more population-specific DARs in distal enhancer locations than iRGCs (Figure 2C).

Consistent with the delayed birth and maturation of iRGCs compared with that of cRGCs, GO analysis of the accessible regions in iRGCs retrieved terms associated to eye morphogenesis, neural fate specification, and cell differentiation that were not detected in cRGCs (Figure 2D). Terms associated with axon guidance were retrieved in both populations. Interestingly, DARs located at putative enhancers (i.e., cis regulatory elements (CRE) upstream of the TSS and in intragenic regions) were associated with terms such as *Axon Guidance*, *Axon Extension*, and *Neuron Projection Guidance* (Figure S2, Supporting Information). This observation suggested that axonal trajectory selection is highly

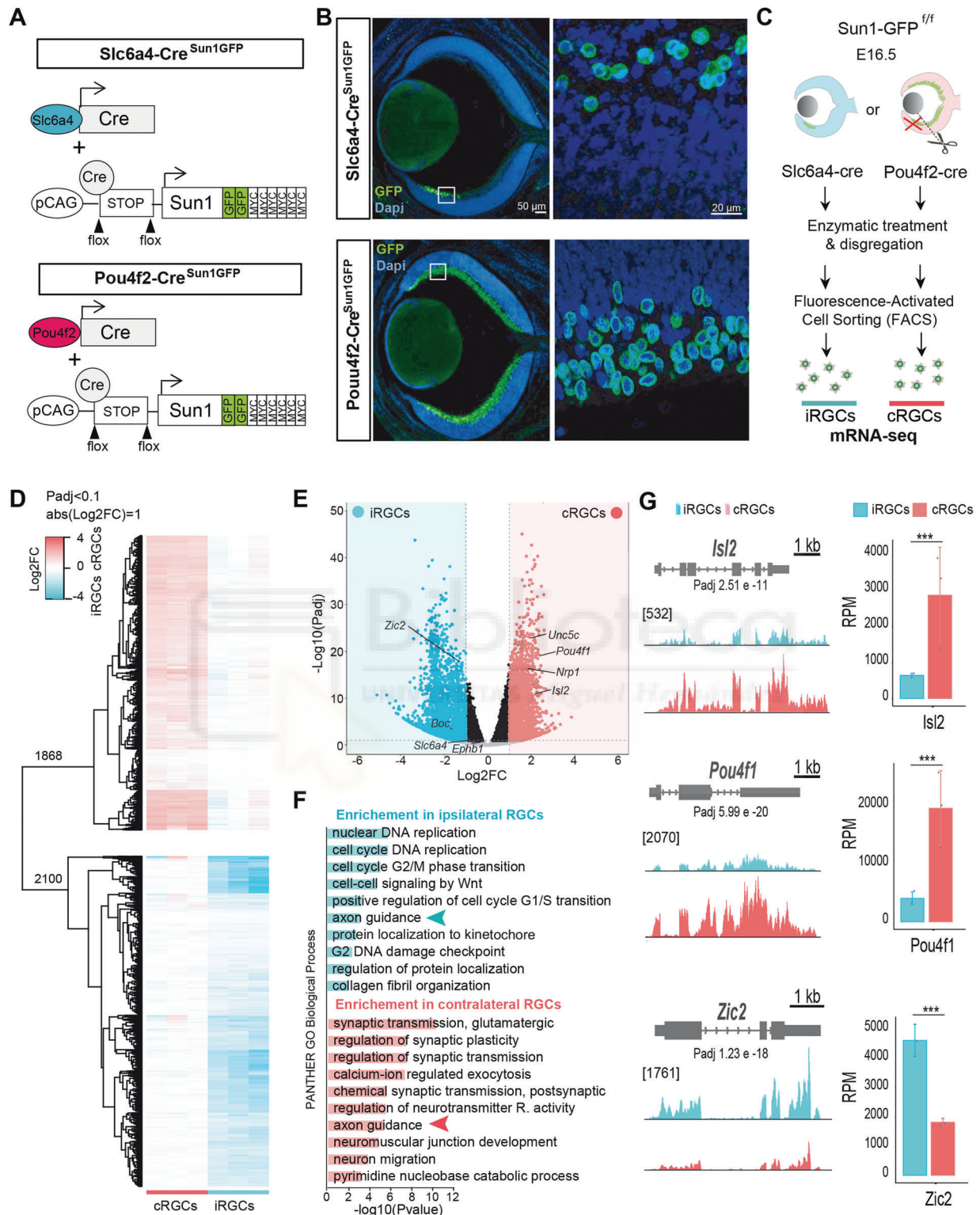


Figure 1. Transcriptome differences among ipsilateral retinal ganglion cells (iRGCs) and contralateral retinal ganglion cells (cRGCs). A) Diagram showing the generation of *Pou4f2^{Sun1GFP}* and *Slc6a4^{Sun1GFP}* mouse lines. The cre recombinase-driver lines *Slc6a4-Cre* and *Pou4f2-Cre* were crossed with a conditional reporter line that contains a CAG-[STOP] cassette followed by the nuclear envelope protein *Sun1* cDNA sequence fused to GFP. B) Coronal retinal sections from E16.5 *Slc6a4-Cre^{Sun1GFP}* or *Pou4f2-Cre^{Sun1GFP}* embryos immunostained against GFP and counterstained with DAPI demonstrate that this line specifically labels the nuclear envelope of iRGCs or RGCs, respectively. Scale bar: 50 μ m. High magnification of the squared area shows labeled iRGCs. Scale bar: 20 μ m. C) Experimental approach used to isolate iRGCs from *Slc6a4-Cre^{Sun1GFP}* embryos and cRGCs from *Pou4f2-Cre^{Sun1GFP}* embryos.

influenced by the differential occupation of CREs rather than by regions located at the promoters.

2.3. Correlation Between Differential CRE Occupancy and Transcription

To determine the relationship between gene transcription and chromatin occupancy in the iRGC and cRGC populations, we next compared the ATAC-seq and RNA-seq datasets. Binding and expression target analysis (BETA)^[24] confirmed that the differences in chromatin accessibility were a good predictor of differential gene expression in both iRGCs and cRGCs (Figure 3A). In addition, both iRGC-DEGs and cRGC-DEGs were compared with the iRGC-DARs and cRGC-DARs. We found a good correlation between the two signals in each cell subtype (Figure 3B). 58% of the DEGs in iRGCs and 40.8% of the DEGs in cRGCs were associated with DARs. Still, only 1,222 out of 3,968 (30.8%) DEGs displayed differential occupancy of the chromatin in iRGC and 763 (19.2%) in cRGCs (Figure 3C), indicating that other mechanisms also contribute to control the final levels of DEG transcripts.

PANTHER analysis of DEGs associated with iRGC-DARs showed a high enrichment of the Wnt and Cadherin signaling pathways (Figure 3D), which agrees with recent studies showing that iRGCs require these pathways for midline avoidance.^[25,26] These pathways were still retrieved when we restricted the PANTHER analysis to DEGs associated with DARs located at CREs (Figure 3E), further underscoring the relevance of CRE regulation in axon guidance.

2.4. Extended TF Code for Axon Midline Decisions

A very useful feature of ATAC-seq is the analysis of TF footprints. The binding of TFs to DNA prevents Tn5 transposase cleavage within the binding site leading to a relative depletion of reads within the open chromatin region; as a result, actively bound TFs enforces characteristic patterns in the chromatin (Figure 4A).^[27] To identify the members of the different families involved in axon guidance regulation, we searched TF footprints differentially detected in iRGC and cRGC-specific DARs by using HINT (Hmmbased Identification of Transcription factor footprints). TF motifs enrichment at footprinted sites revealed remarkable differences between cRGC and iRGC. The ipsilateral trajectory was associated with the presence of TFs belonging to the Lhx, Dlx, Sox, En, and Zic families at promoters and CREs. In contrast, cRGC-specific DARs displayed a significant enrichment for other TFs such as Ebf1 or members of the Pou family (Figure 4B).

We next crossed the ATAC-seq footprint analysis with the results from the RNA-seq analysis to identify the members of the TF families that are differentially expressed in one or the other

population, and therefore are more likely to be responsible for the differences observed in the digital footprints. These bioinformatical analysis retrieved families of TFs potentially involved in specifying the projection of contralateral (e.g., Pou3f and Pou4f, Ebf2) and ipsilateral neurons (e.g., Lhx, Dlx, Zic) thereby extending our knowledge of the transcriptional regulation of axon guidance. Intriguingly, some TF families occupy regulatory regions in both iRGCs and cRGCs depending on the member of the family. The most remarkable example is the Sox family, which has been involved in cRGCs guidance.^[28] While Sox2, Sox8, Sox9, and Sox13 were expressed in iRGC consistently with differences for the footprint of these TFs in iRGC chromatin, other members of the same family (e.g., Sox4 and Sox12) showed differential footprints and higher expression in cRGCs (Figure 4C,D). As a proof-of-principle to functionally validate our screen, next we focused our analysis in the Pou4f TFs for cRGCs and Zic2 and Lhx2/9 for iRGCs because they were retrieved in the footprint analysis and specifically expressed in cRGCs and iRGCs, respectively.

2.5. Pou4f1 Controls Midline Crossing and Regulates γ -Synuclein

Among the TFs with differential footprint occupancy and highly expressed in the cRGCs population we found Pou4f1 and Pou4f2 (Figure 5A). In order to test a putative function of Pou4f TFs in axon midline crossing we performed LOF experiments. Plasmids encoding short hairpin RNAs against Pou4f1 (*Pou4f1shRNA*) or control plasmids (control shRNA) were delivered into the retina of E13.5 mouse embryos by in utero electroporation. The analysis of the electroporated embryos 4 days later, revealed that while RGC axons cross the midline in control embryos, embryos electroporated with *Pou4f1 shRNA* showed a reduced number of crossing axons. Also, a large number of axons stalled before entering the chiasm region (Figure 5B,C), demonstrating that Pou4f1 is essential for midline crossing as predicted by our computational analysis.

We then crossed the footprint analysis with the RNA-seq datasets. This combination revealed that more than 30% of the genes differentially expressed (DEGs) in cRGCs showed footprints for Pou4f1 and/or Pou4f2 (Figure 5D). GO analysis of 593 DEGs with footprint for Pou4f1/2 retrieved terms related to axon guidance mediated by semaphorins (Figure 5E), in agreement with previous reports that demonstrate a role for Sema receptors in midline crossing.^[18,29] Among the genes containing DARs and Pou4f1 footprints at regulatory regions we found *Snca*, which encodes for a chaperon protein known as γ -synuclein and according to this, the RNA-seq profile of *Snca* showed that γ -synuclein mRNA is differentially expressed in cRGCs (Figure 5F), strongly suggesting that Pou4f1 regulates γ -synuclein.

To investigate the potential capacity of Pou4f1 to activate *Snca* transcription, a 358 bp sequence upstream of the *Snca* transcrip-

embryos after removal of the VT region, to perform mRNA-seq and compare their transcriptomes. D) Heatmap of fold changes in differentially expressed genes (DEGs) retrieved in the RNA-seq screen between iRGCs and cRGCs. In the upper part cRGC DEGs refer to the iRGC rowMeans and in the lower part iRGC DEGs refer to the cRGC rowMeans. E) Volcano plot showing the significance and *p*-value distribution after differential transcript abundance analysis between iRGCs and cRGCs populations. F) Histogram for Panther Gene Ontology (GO) Biological Process terms in DEGs in iRGCs and cRGCs. The bar graphs present the significance of the enrichment. $\text{Padj} < 0.05$ and $|\log_2\text{FC}| \geq 1$. G. RNA-seq profiles of transcription factors known to play key roles in the guidance of cRGCs (*Isl2* and *Pou4f1*) or iRGCs (*Zic2*) axons. The vertical scale shows counts in reads per million (RPM). Average RPMs for each gene in the iRGC and the cRGC populations are represented in the graphs at the right. (***) $\text{Padj} < 0.001$.

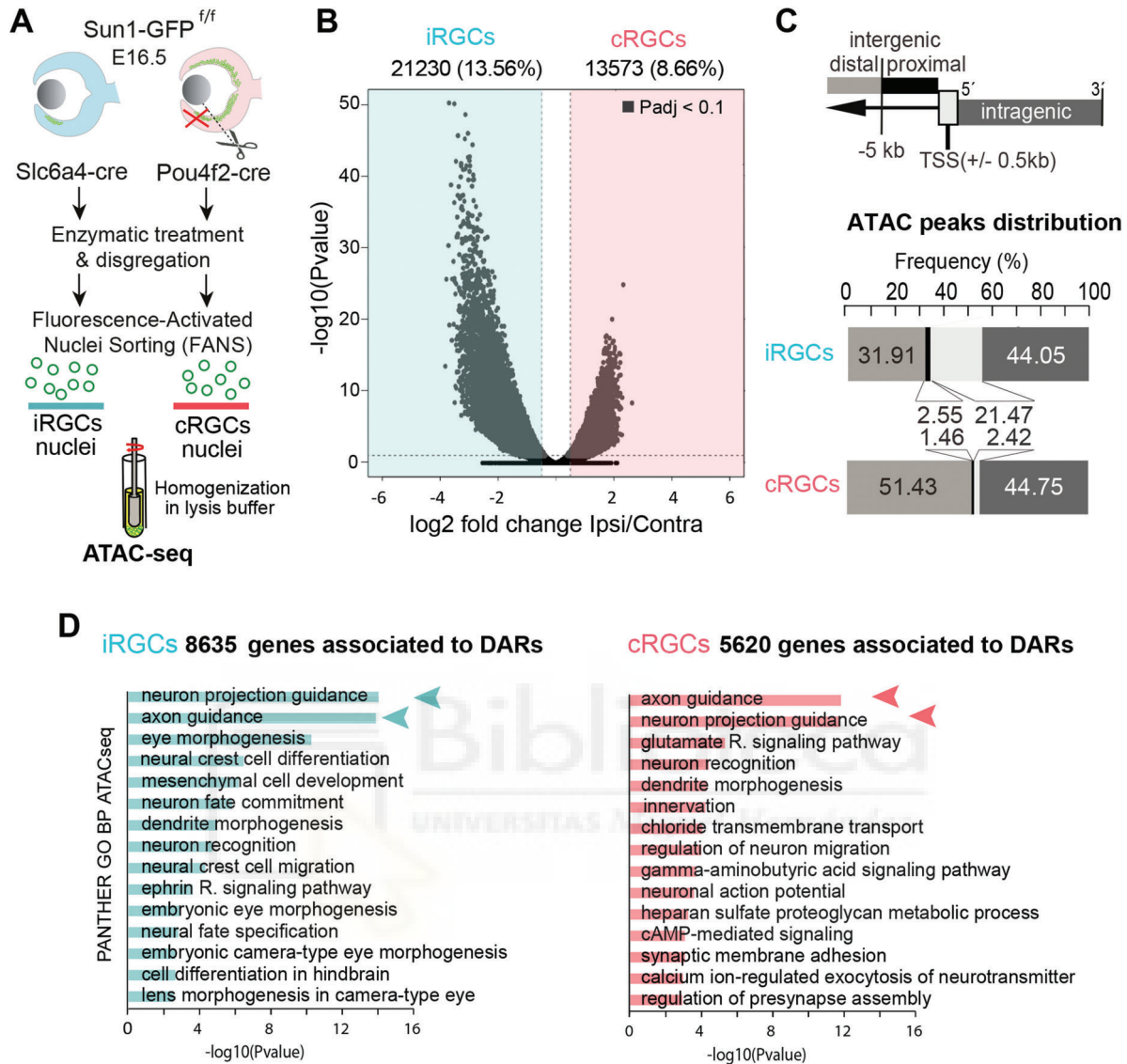


Figure 2. Chromatin accessibility differences between contralateral retinal ganglion cells (cRGCs) and ipsilateral retinal ganglion cells (iRGCs). A) Experimental approach used to isolate iRGCs nuclei from Slc6a4-Cre^{Sun1GFP} embryos and cRGC nuclei from Pou4f2-Cre^{Sun1GFP} embryos (with the VT region removed) at E16.5 in order to perform ATAC-seq assay. B) Volcano plot showing the significance value distribution after differentially accessible region (DAR) analysis between iRGCs and cRGCs populations; upper values indicate number of regions and percentage of all the accessible regions detected (Padj < 0.1). C) ATAC peaks distribution analysis of highly significant DARs at the promoter (TSS +/- 500 pb), proximal enhancer regions (between 0.5 and 5 kb upstream of the TSS), distal enhancer regions (more than 5 kb upstream of the TSS), and in the intragenic regions. The analysis shows the frequency (%) and the number of peaks in each region in the iRGC and cRGC populations. D) Panther Gene Ontology (GO) Biological Process enrichment analysis of DARs in cRGCs and iRGCs. Padj < 0.05 and |log₂FC| ≥ 1.

tion start site that contains the predicted Pou4f1 binding motif was amplified by PCR, cloned into a luciferase reporter plasmid and used for luciferase assays in 293HEK cells. A sequence of similar size also located upstream of the TSS but excluding the Pou4f1 motif was also cloned into the pGL3 and used as a control (Figure 5G). The transfection of the empty control plasmid plus the expression plasmid containing the Pou4f1 coding sequence resulted in basal luciferase activity. When the control plasmid bearing the control sequence was cotransfected with the pCDNA3-Pou4f1 plasmid luciferase activity above the basal level was detected. The Pou4f1-encoding plasmid transfected into

293HEK cells in combination with the plasmid that contained the predicted Pou4f1 motif lead to a more than 10-fold increase in the luciferase levels compared to the basal levels (Figure 5H). This indicates that Pou4f1 can bind to this regulatory region at the *Snrg* locus and activate transcription.

To investigate if Pou4f1 activates γ -synuclein in cRGCs in vivo, we first performed triple immunolabeling for γ -synuclein, Pou4f1 and Zic2 in retinal sections from E16.5 embryos and confirmed the selective expression of γ -synuclein in cRGC, its colocalization with Pou4f1, and its complementary pattern with Zic2 (Figure 6A). Then, we analyzed the expression of γ -synuclein af-

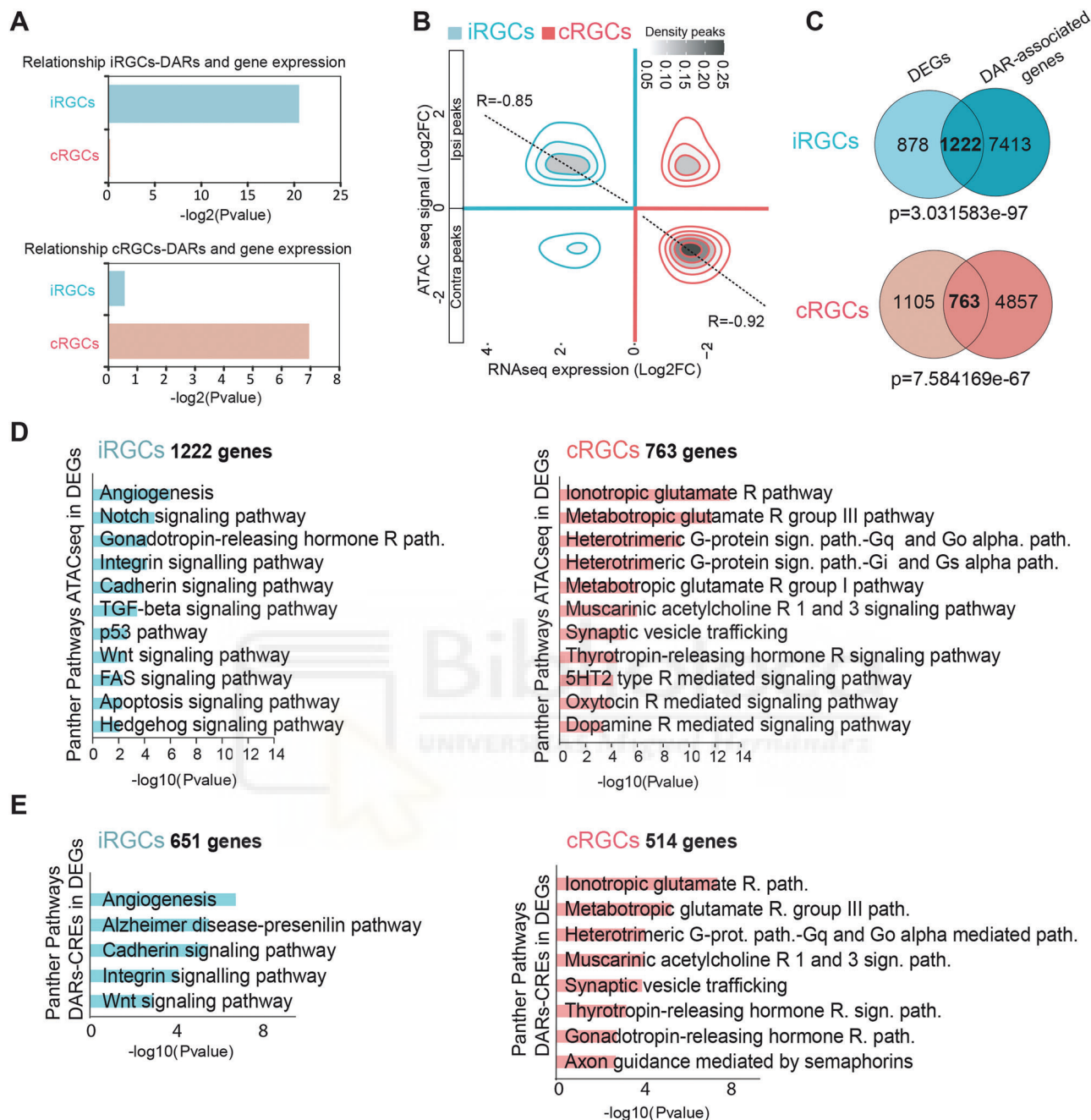


Figure 3. Transcriptomic and chromatin occupancy profiles define the set of genes differentially expressed in ipsilateral retinal ganglion cell (iRGC) and contralateral retinal ganglion cells (cRGCs). A) BETA P values confirm the association between differentially accessible regions (DARs) and gene expression (DEGs) in both iRGCs and cRGCs. B) Density plot showing chromatin accessibility regions and gene expression. Pearson correlation confirmed significant relationship between ATAC-seq with RNA-seq from iRGCs ($R = 0.85$) and ATAC-seq combined with RNA-seq for cRGCs ($R = 0.92$). C) Venn diagrams showing the overlap between peak-associated genes from ATAC-seq and DEGs from RNA-Seq changes in iRGCs and cRGCs populations. Fisher's exact tests were used to evaluate if the number of ATAC-seq peaks associated with genes was statistically significant. For ATAC-seq peaks ($\text{Padj} < 0.05$ and $|\log_2\text{FC}| \geq 1$) we considered differential peaks between cRGC and iRGC that are associated with DEGs. Thus, there may be a number of peaks associated with the same gene. D) Panther pathways Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DARs in cRGCs and iRGCs. $\text{Padj} < 0.05$ and $|\log_2\text{FC}| \geq 1$. E) Panther pathways GO analysis of DEGs with DARs at cis regulatory elements (CREs). $\text{Padj} < 0.05$ and $|\log_2\text{FC}| \geq 1$.



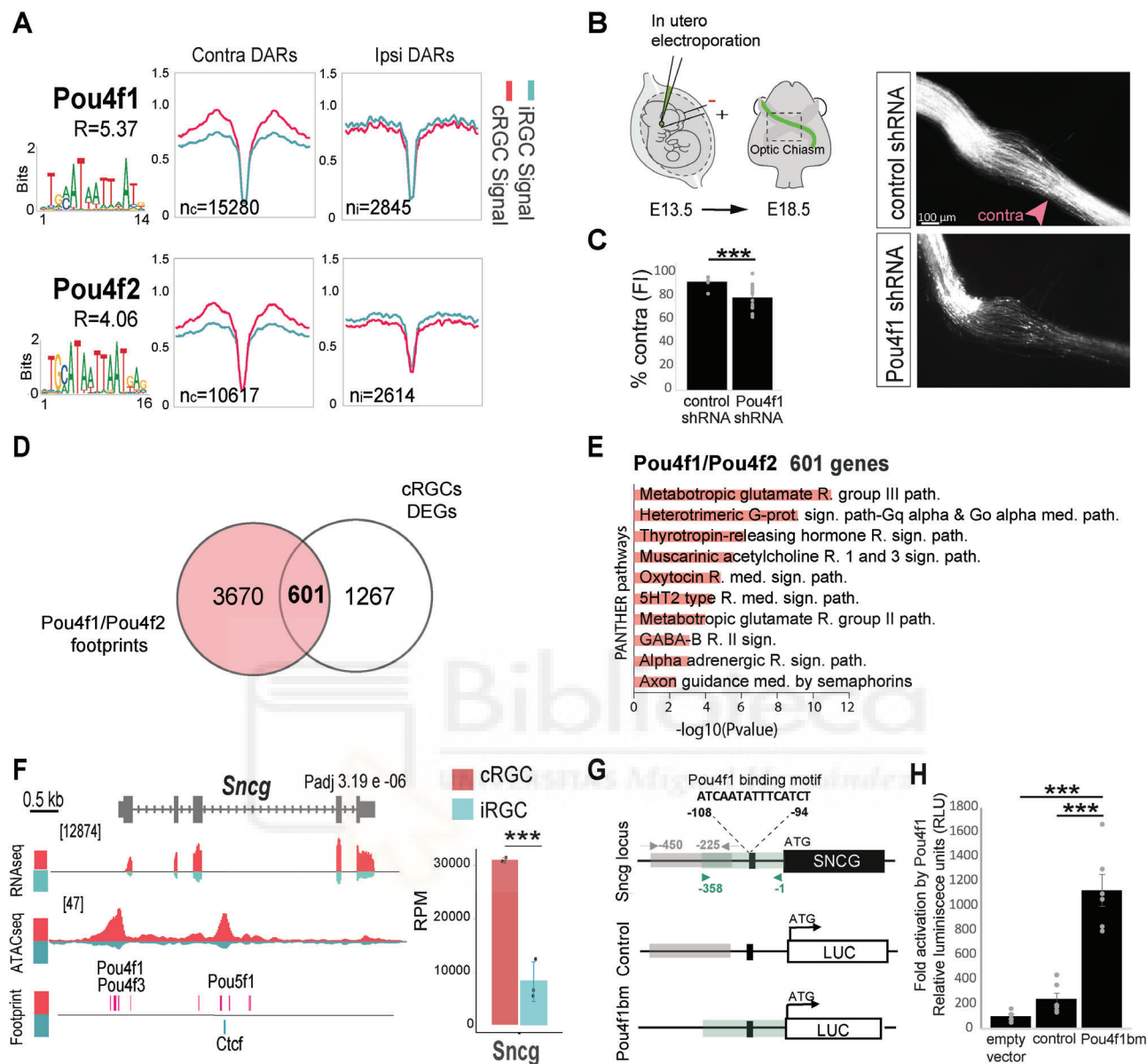


Figure 5. Pou4f1 controls midline crossing. A) Digital footprinting at enriched motifs in Pou4f1 and Pou4f2. n = number of motifs detected in contralateral retinal ganglion cells (cRGCs; n_c) or ipsilateral retinal ganglion cells (iRGCs; n_i) (values correspond to normalized tn5 insertions). Motif matrix from JASPAR database is shown for each transcription factor. $R = n_c/n_i$. B) Left panel is a schematic drawing of the experimental approach. Monocular in utero electroporation with plasmids encoding EGFP is performed in E13.5 embryos and their optic chiasms are analyzed at E18.5. Right panels depict optic chiasms of E18.5 embryos electroporated at E13.5 with plasmids encoding for scramble shRNA (control) or Pou4f1 shRNA plus EGFP encoding plasmids. Scale bar: 100 μ m. C) Percentage of ipsilaterally projecting axons at the optic chiasm normalized to the total number of targeted axons (n = number of embryos; Control n = 6, Pou4f1 shRNA n = 16) (two-tailed unpaired t test, *** p < 0.001). Results show means $\pm$ SEM. D) Venn diagram showing the overlap between differentially expressed genes (DEGs) in the cRGCs population and the footprints of Pou4f1 and Pou4f2 annotated to the nearest gene. E) Panther pathways Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DEGs associated to the Pou4f1 and Pou4f2 footprints in cRGCs. $\text{Padj} < 0.1$ and $|\log_2\text{FC}| \geq 1$. F) Genomic snapshots of ATAC-seq, RNA-seq profiles and footprints in iRGCs and cRGCs populations for the γ -synuclein encoding gene (*Sncg*). Notice that several footprints for Pou4f factors located upstream and inside *Sncg* are detected specifically for cRGCs. Values indicate the levels of counts in reads per million (RPM). Graphs represent transcripts expression (in RPM) for *Sncg* obtained from iRGC or cRGCs RNA-seq experiments. (*** $\text{Padj} < 0.001$). G) Schematic representation of *Sncg* gene including the Pou4f1 binding motif located in the promoter region of the gene, the region of 358 bp containing the Pou4f1 binding motif (pou4f1bm) amplified by PCR to be cloned in a luciferase reporter plasmid (pGL3-basic) to generate the pGL3-*Sncg*-cre plasmid and the region of 225 bp next to the *Sncg*-cre excluding the Pou4f1 motif amplified to be cloned into the pGL3 and used as a control (pGL3-control). H) Luciferase assay in HEK293 cells showing a stronger transactivation of the reporter gene driven by Pou4f1 binding to its motif in *Sncg* gene respect to controls (n = number of samples; empty vector n = 6, control n = 6, pou4f1bm n = 6) (ANOVA test; followed by Bonferroni correction, *** p < 0.001).

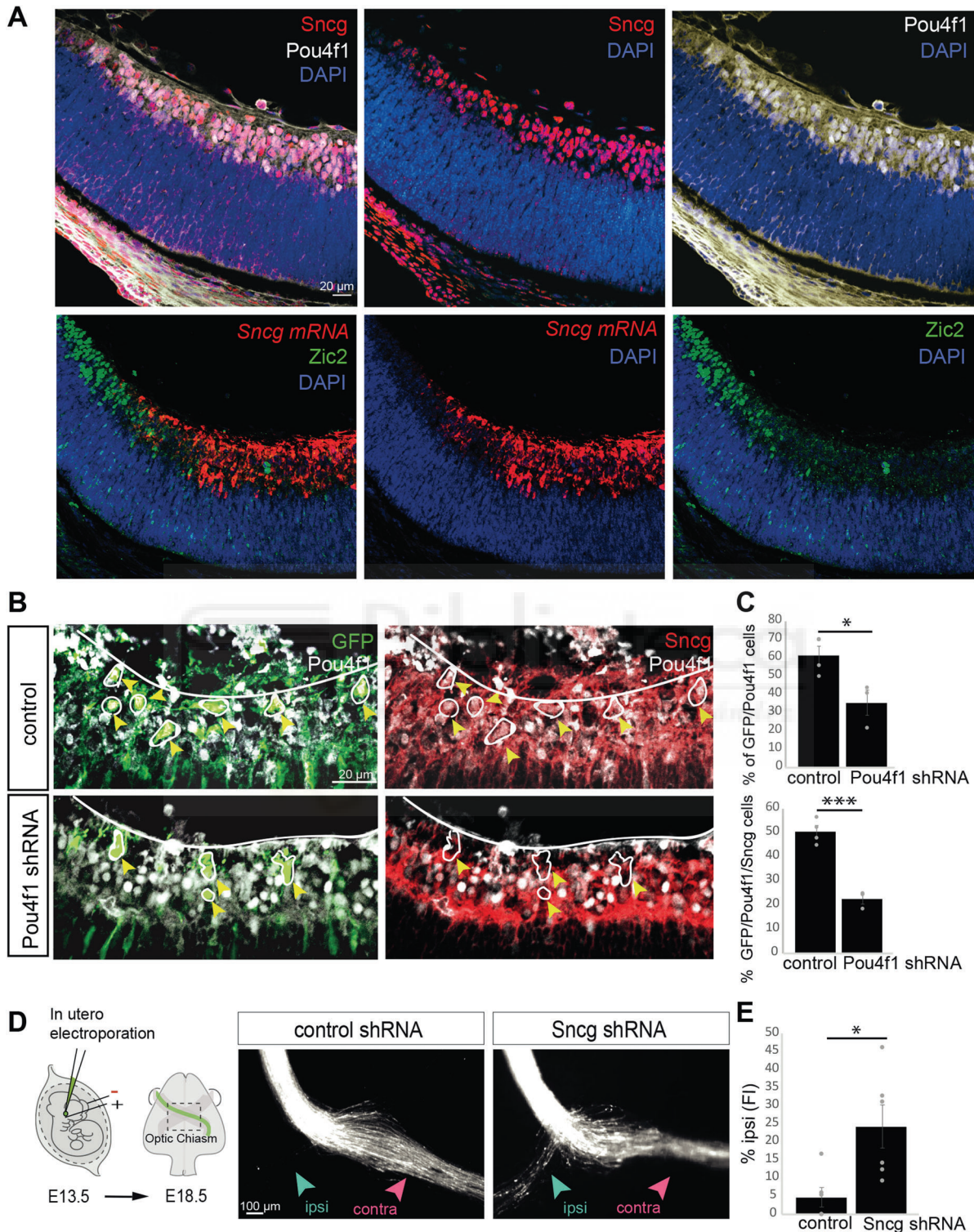


Figure 6. Pou4f1 regulation of γ -synuclein. A) Immunofluorescence for Sncg combined with immunofluorescence for Pou4f1 (upper) or Zic2 (bottom) in coronal retinal sections from E16.5 embryos. Nuclei are counterstained with Dapi. Scale bar: 20 μ m. B) Immunofluorescence for Sncg combined with immunofluorescence for Pou4f1 or GFP in coronal retinal sections from E18.5 embryos after retina electroporation with plasmids encoding for scramble shRNA (control) (upper panels) or Pou4f1 shRNA (bottom panels) plus EGFP encoding plasmids. Scale bar: 20 μ m. C) Quantification of the percentage of GFP/Pou4f1 positive cells and GFP/Pou4f1/Sncg positive cells in retinal sections from E18.5 embryos after retina electroporation with plasmids encoding for scramble shRNA (control) or Pou4f1 shRNA plus EGFP encoding plasmids (n = number of embryos; Control n = 4, Pou4f1 shRNA n = 3) (at least three sections for animal) (two-tailed unpaired t test, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). Results show means $\pm$ SEM. D) Left panel is a schematic drawing of the experimental approach. Monocular in utero electroporation with plasmids encoding EGFP is performed in E13.5 embryos

and a recent study has shown that long-term exposure of young neurons to α -synuclein, another member of the same family, hampers axon elongation and growth cone turning.^[34] However, a role for γ -synuclein in neural development has not been previously reported. Therefore, we investigated γ -synuclein function in RGCs by performing LOF experiments delivering plasmids encoding short hairpin RNAs against *Sncg* (*Sncg* shRNA) into the retina of E13.5 mouse embryos (Figure 6D). The analysis of RGCs axonal trajectories at the optic chiasm level 4 days after electroporation, showed a significant increase in the number of axons switching their laterality at the midline (Figure 6E). Together all these results indicate that γ -synuclein is expressed in cRGCs, participates in midline crossing and is a Pou4f1 target.

2.6. Zic2-Mediated Regulation of Axon Midline Avoidance

Previous studies have identified Zic2 as a key regulator of axon midline avoidance, first in the visual system and later in other neuronal types including spinal and thalamocortical neurons.^[21,35,36] Consistent with these studies, Zic2 showed differential DARs and expression in iRGCs versus cRGCs (Figure 4C,D and Figure 7A). In agreement with a recent scRNA-seq analysis of E15.5 retinas,^[37] we also detected differential expression of Zic5, which is located next to Zic2 in an inverted orientation (Figure 7A) in the RNA-seq analysis of iRGC versus cRGCs. However, the level of Zic5 transcripts abundance was likely neglectable compared to Zic2 transcripts (Figure 7A).

Taking advantage of a published Zic2 ChIP-seq analysis carried out in E16 retinas and spinal cords^[26] we next compared digital Zic2 footprints obtained from the ATAC-seq data with actual Zic2 binding across the genome (see the Experimental Section). About 7% of the Zic2 footprints (ATAC-seq) retrieved using HINT, were occupied by Zic2 (ChIP-Seq) in iRGCs. Interestingly, HINT analysis predicted two Zic2 footprints between the *Zic2* and *Zic5* loci and the ChIP-Seq data demonstrated actual Zic2 binding to the DAR closer to *Zic2* (Figure 7A). This binding of Zic2 to a genomic region close to the *Zic2* locus suggests that Zic2 may be regulated by a feedback or feedforward mechanism.

The combination of transcriptomic, ChIP-seq, and chromatin occupancy data also retrieved many axon guidance receptors encoding for proteins previously implicated in axon pathfinding such as *Fzd8*, *Boc* and *Bmpr1*.^[17,26,38] In line with these reports, we found differential expression of *Fzd8*, *Boc*, and *Bmpr1* in iRGCs (Figure 7B,C) and detected differentially occupied CREs with predicted Zic2 footprints in the *Fzd8* and *Bmpr1* loci (Figure 7B,C). Some of these predicted Zic2 footprints coincided with actual Zic2 binding, in agreement with previous reports demonstrating that these two genes are regulated by Zic2.^[26,38] In the case of *Boc*, we observed actual Zic2 binding inside the gene suggesting that this receptor may be also regulated by Zic2 (Figure 7B,C). *Unc5c*, a Netrin1 receptor negatively regulated by Zic2^[16] also showed Zic2 binding in several regions across its locus (Figure 7C) suggesting that Zic2 binding to this region acts

as a repressor. Interestingly, *Unc5c* and *Bmpr1b* are located next to each other in inverted directions (Figure 7C). According to the footprint analysis, the region that coincides with the beginning of *Unc5c* and the end of *Bmpr1r* contains Zic2 binding motifs and indeed actual Zic2 binding was found in these regions, suggesting that *Unc5c* and *Bmpr1r* may be simultaneously regulated by Zic2.

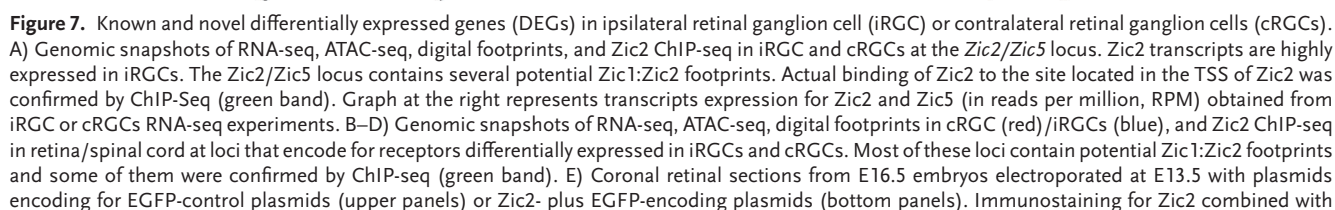
We also found Zic2 binding close to the Semaphorin receptor, *Nrp1*, previously reported as expressed in cRGC and not in iRGCs.^[39] As in the case of *Unc5c*, these results suggested that Zic2 may negatively regulate *Nrp1* in iRGCs. In addition, we identified several receptors potentially enriched in iRGCs not previously reported as specific of this neuronal population. For instance, the *Nrp1* paralog *Nrp2* contains DARs and we detected actual Zic2 binding at the promoter region of this gene. In agreement with a potential role for Zic2 in regulating *Nrp2* expression, Zic2 and *Nrp2* mRNA colocalized in the ventral retina of E16 embryos (Figure 7E). Moreover, ectopic expression of Zic2 in cRGCs by in utero electroporation led to a significant increase of *Nrp2* mRNA levels in the same cells (Figure 7E), experimentally confirming *Nrp2* as a target of Zic2. *Nrp2* has been proposed to promote α 5-Integrin (aka *Itga5*) recycling in migrating endothelial cells during angiogenesis.^[40] Interestingly, our PANTHER analysis of DEGs associated with iRGC-DARs data retrieved Integrin signaling as one of the most enriched terms in iRGCs. In line with these data, a recent study suggested that integrins are essential to restrict iRGCs targeting to the sublamina of the superior colliculus^[41] (Figure 7F). We found *Itga5* as well as many other integrins specifically expressed in iRGCs and most of them present binding of Zic2 in their genomic sequences (Figure S3, Supporting Information). All together, these data strongly suggest that Zic2 regulates the expression of many members of this family of adhesion proteins in iRGCs.

In conclusion, in addition to retrieve many genes previously implicated in axon guidance at the chiasm, our screen led to the unbiased identification of new Zic2 targets potentially involved in this developmental process.

2.7. Lhx2/9 Coregulate with Zic2 the Ipsilateral Trajectory

In addition to the expected differential occupancy of Zic2 footprints, our ATAC-seq screen retrieved differential occupancy of Lhx2/9 binding motifs in iRGCs (Figure 8A). Lhx2 and Lhx9 are both expressed in the developing retina^[42,43] (Figure 8B) but it is unknown whether they contribute to the wiring of RGC axons. Lhx2 zebrafish mutants show disrupted crossing at the chiasmatic midline although this defect has been described as secondary due to a disruption in the patterning of the midline.^[44,45] Thus, we decided to investigate in more detail the role of Lhx2/9 in the guidance of iRGC axons. Lhx9 transcripts levels are higher in iRGCs than in cRGCs albeit its expression is low in both populations. In contrast, Lhx2 transcripts are highly expressed in iRGCs (Figure 8B).

and their optic chiasmata are analyzed at E18.5. Right panels despite optic chiasmata of E18.5 embryos electroporated at E13.5 with plasmids encoding for scramble shRNA (control) or *Sncg* shRNA plus EGFP encoding plasmids. Scale bar: 100 μ m. E) Percentage of ipsilaterally projecting axons at the optic chiasm normalized to the total number of targeted axons (n = number of embryos; Control n = 6, *Sncg* shRNA n = 6) (two-tailed unpaired t test, $*p$ < 0.05). Results show means $\pm$ SEM.



To study a putative role for *Lhx2/9* in axon guidance at the optic chiasm, we performed gain-of-function (GOF) experiments by ectopically expressing *Lhx2* or *Lhx9* in cRGCs. For that, E13.5 mouse embryos were monocularly injected with *Lhx2* or *Lhx9*-encoding plasmids together with GFP-plasmids and electroporated in utero. The axons of targeted cRGCs were examined 4 days later. A significant increase in the number of axons projecting ipsilaterally was clearly observed after ectopic expression of either *Lhx2* or *Lhx9* (Figure 8E,F), indicating that these transcription factors influence axon guidance by promoting ipsilaterality. These results suggest that the occupancy of *Lhx2/9*-CRE is key in the regulation of axon guidance, possibly through the control of the Wnt pathway. Note that although *Lhx2* and *Lhx9* may be interchangeable in their function as axon guidance regulators, *Lhx2* is likely to play a more prominent role in RGCs given its higher expression level in those cells (Figure 8B).

Because these TFs are specifically expressed in iRGCs, we wondered if their targets overlapped with the program potentially regulated by *Zic2*. To address this question, we analyzed the list of genes associated with *Lhx2/9* and *Zic1/2* footprints in iRGCs and found that 36.5% of the genes containing *Lhx2/9* footprints could be also regulated by *Zic1/2* (645 out of 1770) (Figure 8C). GO analysis of DEGs potentially regulated by *Lhx2/9* (84+148=232) retrieved a large enrichment in genes related to the cadherin and Wnt pathways, two pathways previously linked to *Zic2*^[26] (Figure 8D). These results indicate that *Lhx2/9* and *Zic2* may regulate a common set of genes during the guidance of RGC axons to the brain.

Finally, because *Lhx* TFs are expressed in other contexts during development we investigated their participation in axon guidance in other circuits. Previous studies have shown that *Lhx2* and *Lhx9* are both expressed in the dl1 interneuron population during spinal cord development and mice lacking both TFs exhibit midline crossing defects at the floor plate (Wilson et al., 2008). The dl1 spinal population contains both commissural (dl1_c) and ipsilateral (dl1_i) spinal neurons. *Lhx2* and *Lhx9* are both highly expressed in recently differentiated dl1, but are later specifically downregulated in dl1_c (more precisely, *Lhx2* disappears from dl1_i, while *Lhx9* is maintained at high levels in the dl1_i and low levels in the dl1_c population). We performed *Lhx9* GOF by *in ovo* electroporation into the chicken spinal cord and found a significant increase in the number of ipsilaterally projecting axons concomitant with a strong reduction of commissural axons (Figure 8G,H). This result confirms that *Lhx2/9* factors are implicated in defining the laterality of spinal axons and reveals that, like *Zic2*,^[35] *Lhx9* is sufficient to induce axon midline avoidance not only in the retina but also in the spinal cord.

Lhx2/9 factors are also expressed in the developing cortex regulating the specification of cortical neurons.^[46,47] It is, however, unknown whether they play a role in the guidance of cortical axons. To assess this possibility, we electroporated *Lhx2* or *Lhx9*-encoding plasmids plus GFP plasmids into the telencephalon

of E15 embryos and analyzed the projections of targeted cortical neurons at P4. Axons from cortical neurons ectopically expressing either *Lhx2* or *Lhx9* avoided the midline at the corpus callosum. Similar to the results observed in the visual system, the phenotype induced by *Lhx2* was significantly stronger than the one triggered by *Lhx9* (Figure 8I,J).

Together, these data indicate that *Lhx2/9* regulate axon trajectories in different systems, although the specific member of the family that regulate the process may differ between circuits. In addition, we observed an intriguing convergence of *Lhx* and *Zic2* functions which agrees with the large number of common targets between these TFs.

3. Discussion

Here, we profiled in parallel the transcriptome and the accessibility and occupancy of chromatin in two neuronal populations with similar functions but divergent projection behaviors. This strategy allowed us to identify a number of genes potentially involved in the regulation of axon trajectories during development, opening new lines of research. Our analyses also provided molecular insight into the general mechanisms regulating axon guidance decisions in the visual circuit. For instance, the footprint analysis revealed that most of the retrieved DEGs related to axon guidance were associated with DARs located at CRE rather than promoters, underscoring an unexpected contribution of differential enhancers used in axon guidance.

Our screen retrieved the majority of receptors and intracellular proteins previously implicated in the navigation of visual axons at the midline including genes previously described elsewhere^[48] and demonstrated the differential binding of various TFs involved in the selection of axonal trajectories. It also identified novel guidance receptors, such as *Nrp2*, implicated in axon guidance at the midline. The identification of novel TFs and downstream targets brings us a step closer to a complete inventory of factors controlling axon guidance at the midline.

The formation of the optic chiasm in mouse occurs in two sequential steps. In a first phase, pioneer axons arising from dorso-central retina leave the optic cup through the optic disc at E12 and navigate into the optic stalk to enter the developing ventral diencephalon. The majority of these pioneering axons then cross the midline and grow in close relationship with an inverted V-shaped^[49] array of early neurons, establishing the position of the optic chiasm along the anterior–posterior axis of the brain. A small proportion of these axons extend on the same side of the brain, distant from the midline, and form an early and transient uncrossed projection that abruptly disappear after E16.^[50–52] It is known that these transient RGCs growing into the ipsilateral side do not express *Zic2* or *Slc6a4*.^[12,21,52] Since our screen is performed at E16, it remains unclear whether this transient ipsilateral population, that is considered the product of guidance errors, express other typical ipsilateral markers.

in situ hybridization for *Nrp2* mRNA demonstrate that *Nrp2* is highly and specifically expressed in endogenous *Zic2* positive cells in the peripheral retina but not in targeted cells expressing EGFP. However, when *Zic2* is ectopically expressed, *Nrp2* mRNA levels are highly increased. Scale bar: 100 μ m. F) Graphs represent transcripts expression (in RPM) obtained from iRGC or cRGCs RNA-seq experiments corresponding to genes encoding for different integrins ($-t$ test, ****Padj* < 0.001).

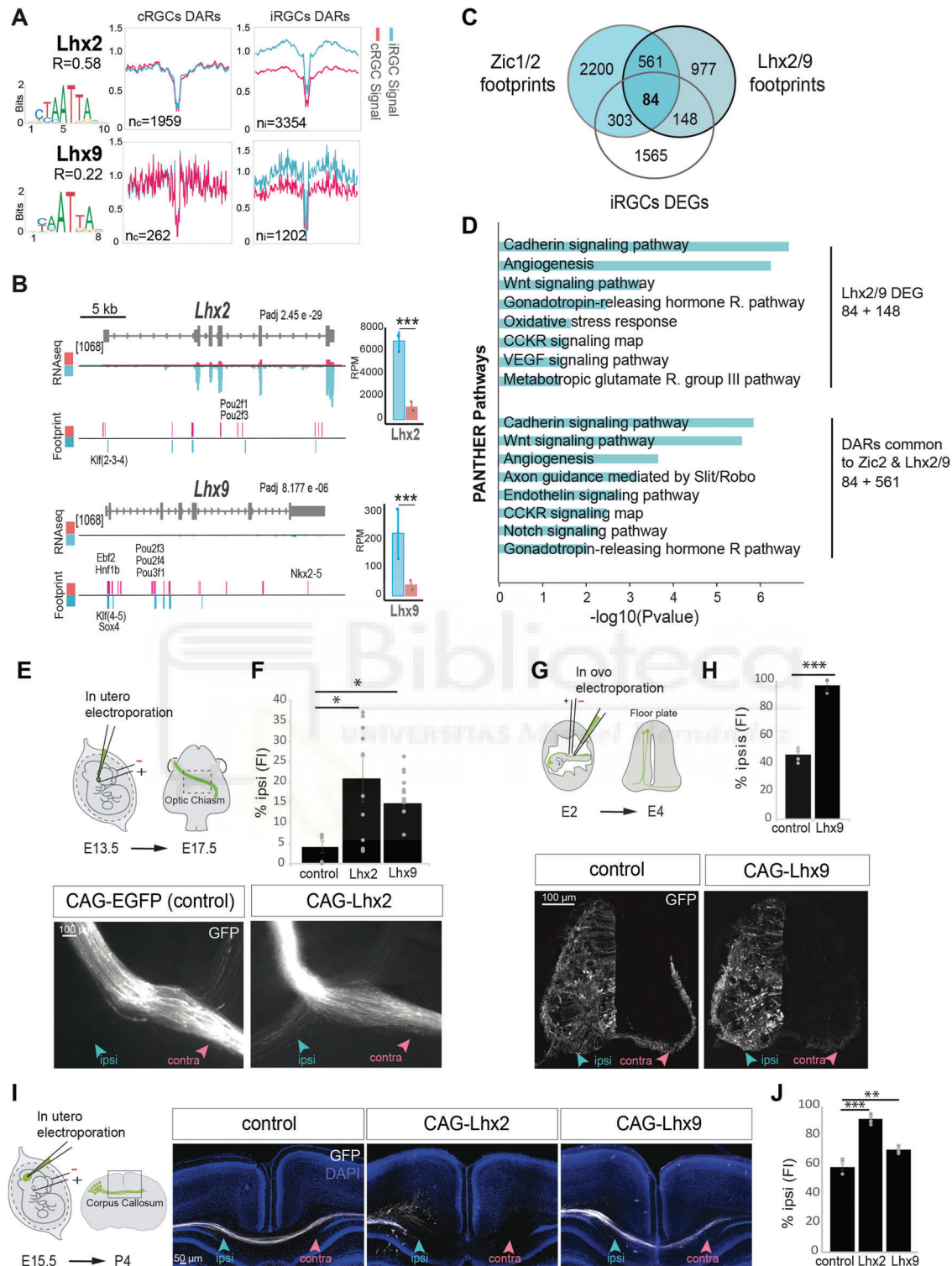


Figure 8. Lhx2/9 as regulators of axon midline avoidance. A) Digital footprinting at Lhx2 and Lhx9 motifs. n = number of motifs detected in contralateral retinal ganglion cells (cRGCs; n_c) or ipsilateral retinal ganglion cells (iRGCs; n_i) (values correspond to normalized $\ln 5$ insertions). Motif matrix from JASPAR database is shown for each transcription factor. $R = n_c/n_i$. B) Genomic snapshots of ATAC-seq, RNA-seq profiles, and footprint enrichment in iRGCs and cRGCs at the *Lhx2* and *Lhx9* loci represented in reads per million (RPM). ***Padj < 0.001. Graphs represent transcripts expression (in RPM) for Lhx2 and Lhx9 obtained from iRGC or cRGCs RNA-seq experiments. C) Venn diagram showing the overlap between the differentially expressed genes (DEGs) and footprints for Zic1/2 and Lhx2/9 annotated to the nearest gene in the iRGCs population. D) Panther pathways Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DEGs associated to the Lhx2/9 footprints in iRGCs, and common to Zic1/2 and Lhx2/9. Padj < 0.1 and $|\log_2FC| \geq 1$. E. Upper is a schematic drawing of the experimental approach. Monocular in utero electroporation with plasmids encoding EGFP is performed in E13.5 embryos

Recent studies using single-cell RNA-seq to profile RGCs from embryonic and postnatal animals have demonstrated that subtype diversification arises as a gradual, asynchronous fate restriction of postmitotic multipotential precursors and some types of neurons are not identifiable until sometime after their differentiation.^[53] In this study, the authors suggest that axonal laterality is specified before type identity is completely fixed and also that immature RGCs are multipotential even after selecting the ipsi or the contralateral trajectory.^[53] Our results support this view and suggest that recently differentiated RGCs are doubly specified by laterality and type but once axonal choice has been made the laterality program is shut down.

To validate our bioinformatic analysis, we explored in greater detail two of the most interesting TF families retrieved in our screen. In particular, we provided further information about the role of Pou4f and Lhx TFs in axon guidance. Pou4f1 has been referred to as a specific marker of cRGCs,^[54] however, no role in axon guidance has been reported for this TF. We discovered that Pou4f1 is essential for midline crossing, is able to activate transcription and essential for the expression of γ -synuclein. The synuclein family consists of three members α -synuclein, β -synuclein and γ -synuclein. We found that γ -synuclein, but no other members of the family, is differentially expressed in cRGCs and both transcriptomics and chromatin occupancy profiles pinpoint γ -synuclein as the only member of the family playing a role in the guidance of visual axons. Although it was known that γ -synuclein is expressed in adult RGCs,^[55] a role for this protein or any other member of the family in neural development had not been described. In vitro assays in HeLa cells revealed that γ -synuclein can bind and promote tubulin polymerization, induce the microtubule bundling, and alter microtubules morphology through the microtubule-binding protein MAP1. However, alterations of γ -synuclein in HEK cells did not lead to any prominent phenotype.^[56] These observations may support the idea that the binding of γ -synuclein to microtubule-regulatory proteins is specific for its function in axonal navigation and future functional assays in RGCs should tackle the postulated link between γ -synuclein and microtubule polymerization in vivo. The phenotypes observed after Pou4f1 and γ -synuclein downregulation were not exactly alike. While Pou4f1 loss-of-function lead to axon stalling at the chiasm, the negative regulation of γ -synuclein induced an ectopic ipsilateral projection. The fact that Pou4f1 LOF produces a stronger phenotype than γ -synuclein downregulation might reflect the finding that γ -synuclein is a Pou4f1 target.

Lhx factors play important roles in cortical fate determination and had been involved in the guidance of spinal axons.^[46,47,57] However, their role in the guidance of visual axons and other

neuronal types had not been investigated. Our results confirmed the role of Lhx TFs in axon guidance decisions in different contexts. We observed that both Lhx2 and Lhx9 induce axon midline turning in retinal and cortical neurons, although Lhx2 appears to be more efficient triggering the midline avoidance program in these two cell types. However, the situation appears to be different in the spinal cord where Lhx9 is highly expressed in ipsilaterally projecting neurons and prevents midline crossing. Thus, it seems likely that Lhx2/9 bind to the CRE of different guidance molecules depending on the cell type. In line with this idea, it has been reported that while Lhx2 regulates Robo3 in d11_c neurons, it seems to repress a different member of the Robo family, Robo1 in thalamocortical neurons.^[58] In zebrafish, Lhx2/9 negatively regulates the expression of Slits and Sema3a in the diencephalon^[44] again arguing cell-type differences in the set of guidance molecules regulated by Lhx TFs.

In summary, our analyses have led to the identification of dozens of new genes potentially involved in axonal trajectory selection. These results open the door for innovative therapeutic approaches aimed to restore damaged neuronal circuits that will benefit from a better understanding of the mechanisms driving and constraining neuronal circuits assembly.

4. Experimental Section

Animals: The ET33 Sert-Cre line was generated by GENSAT^[59] and obtained from the MMRRRC (<http://www.mmrrc.org/strains/17260/017260.html>).

The Pou4f2-Cre mouse line generously donated by Dr. George Vann Bennett, Duke University Medical Center, was generated by gene targeting into the Brn3b locus.^[60] The Sun1-tagged mice (Sun1GFP⁺) were acquired from Jackson Laboratories (Stock number 021039). These mice contain a CAG promoter driving expression of coding sequences for the mouse nuclear membrane protein Sun1 (Sad1 and UNC84 domain containing 1) fused at its C-terminus to 2 copies of superfolder GFP (sfGFP) followed by six copies of Myc, inserted in the Gt(ROSA)26Sor locus. Expression of Sun1-sfGFP-Myc is prevented by an upstream loxP-flanked stop cassette (Mo et al; Fernandez-Albert et al). Cre-dependent removal of the loxP-STOP-loxP cassette allows expression of the Sun1 fusion protein at the inner nuclear membrane in targeted cell types. These nuclei can be immunopurified with antibodies against GFP or MYC for transcriptional and epigenetic studies. All the electroporation experiments were performed using embryos from C57/DBA F1 hybrids. Mice were kept in a timed pregnancy breeding colony at the Instituto de Neurociencias (IN). Fertilized chicken eggs were obtained from a local farm (Granja Santa Isabel, Córdoba, Spain). The animal protocols were approved by the regional IN-Animal Care and Use Committee (Conselleria d'agricultura, desenvolupament rural, emergencia climatica i transicio ecologica, Ref Number: 2021/VSC/PEA/0210) met European and Spanish regulations.

and their optic chiasms are analyzed at E18.5. Optic chiasms of E18.5 embryos monocularly electroporated at E13.5 with plasmids encoding for the transcription factor Lhx2 and EGFP or EGFP alone as a control. Embryos electroporated with Lhx2 displayed an ectopic ipsilateral projection not present in the controls. Scale bar: 100 μ m. F) The graph represents the percentage of ipsilaterally projecting axons at the optic chiasm normalized to the total number of targeted axons in embryos electroporated with Lhx2, Lhx9, and/or EGFP encoding plasmids (n = number of embryos; control n = 6, Lhx2 n = 12, Lhx9 n = 11) (ANOVA test; followed by Bonferroni correction, $*p < 0.05$). Results show means $\pm$ SEM. G) Upper panel is a schematic drawing of the experimental approach. Transverse sections of spinal cords from E4 chick embryos unilaterally electroporated at E2 with plasmids encoding for Lhx9 and/or EGFP. H) The graph represents the percentage of ipsilaterally projecting axons normalized to the total number of targeted axons (n = number of embryos; control n = 5, Lhx9 n = 3) (two-tailed unpaired t test, $***p < 0.001$). Results show means $\pm$ SEM. I) Left panel is a schematic drawing of the experimental approach. Coronal sections from P4 brains of mice electroporated at e15.5 with plasmids encoding EGFP and/or Lhx2 or Lhx9. J) The graph shows the percentage of ipsilaterally projecting axons normalized to the total number of targeted axons (n = number of pups; Control n = 4, Lhx2 = 5, Lhx9 n = 5) (ANOVA test; followed by Bonferroni correction, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). Results show means $\pm$ SEM.

RNA-seq and Analysis: Retinas from embryos at E16.5 were dissected in HBSS buffer without Ca^{2+} and Mg^{2+} . In the case of retinas from Pou4f2^{SunGFP} embryos the ventrotemporal region was removed by dissection. Retinas were digested and disaggregated with the help of a P1000 using an enzymatic solution composed by collagenase, trypsin 0.125%, BSA 0.2 mg mL⁻¹ and DNase 1 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ during 25' at 37 °C. Digestion was stopped by adding DMEM with fetal bovine serum at 10% and disaggregation of the tissue was checked under microscope. The suspension was filtered and centrifugated at 1250 rpm during 5' at RT. The pellet was resuspended and sorted by flow cytometry to harvest the interest cells. RNA was extracted from sorted cells using PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus) and libraries were made and sequenced in a HiSeq 2500 sequencer (Illumina, Inc). Reads were mapped using default parameters from HISAT2 v2.1.0 to the mouse genome (mm10). Mapped reads were annotated to genes from Ensembl (GRCm38.89) and quantified using HTseq v0.11.1 to enumerate the number of reads per sample. Differential expression analysis between tissue types was conducted with DESeq2 v1.26.0. in R and FDR was set to 10% (BH correction). GO enrichment analyses were performed using the platform PANTHER with Fisher's exact test and with the Padj correction, obtaining the top terms using the filters by ratio enrichment of >2, number of GO family group genes between 3 and 2000, number of enrichment genes of >3, and Padj < 0.1. Deeptools bamCoverage (v3.1.3, duplicate reads ignored, RPKM normalized and extended reads) was used to generate bigwig files from sorted and indexed bam files. RNA-seq samples tracks were visualized using IGV (v2.3.72). Further data processing was performed with custom scripts in the R programming language ("Planting of a Tree") (v3.6.1) and bioconductor v3.10.

Reads (fastq)	Read length	Mapped reads (Bamfiles)
Sample1_Slc6a4	42612648	50 36353413 (85.31%)
Sample2_Slc6a4	44101908	50 37853017 (85.83%)
Sample3_Slc6a4	42016591	50 35619716 (84.78%)
Sample4_Pou4f2	42418866	50 37254672 (87.83%)
Sample5_Pou4f2	43345470	50 37726956 (87.04%)
Sample6_Pou4f2	47918156	50 41730677 (87.09%)

ATAC-seq and Analysis: ATAC-seq was performed in biological replicates ($n = 3$) and each replicate contained 50 000 cells from 8–10 embryos for each contralateral sample and from 30–40 embryos for each ipsilateral sample. Retinas from embryos at E16.5 were dissected in HBSS buffer without Ca^{2+} and Mg^{2+} . In the case of retinas from Pou4f2^{SunGFP} embryos the ventrotemporal region was removed by dissection. Retinas were digested and disaggregated with the help of a P1000 using an enzymatic solution composed by collagenase, Trypsin 0.125%, BSA 0.2 mg mL⁻¹ and DNase 1 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ during 25 min at 37 °C. Digestion was stopped by adding DMEM with fetal bovine serum at 10% and disaggregation of the tissue was checked under microscope. The suspension was filtered and centrifuged at 1250 rpm during 5 min at RT. The pellet was resuspended and sorted by flow cytometry to harvest 50 000 green fluorescent cells. Cell suspension was spin down at 500 g for 5 min at 4 °C and treated with cold lysis buffer (10×10^{-3} M TrisCl pH7.4, 10×10^{-3} M NaCl, 3×10^{-3} M MgCl₂, 0.1% Igepal). The suspension was centrifuged at 500 g during 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and was make sure that the pellet was placed on ice. After that the transcription reaction and purification was continued following the protocol.^[22,61] Then, the libraries were purified and sequenced by an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina, Inc). Paired-end reads were aligned with Bowtie2 v2.3.4.2 to mm10 mouse genome. Duplicated reads were removed with Picardtools v2.18.21. MAPQ > 20 was used to filter nonunique alignments. BAM files for bulk ATAC-seq were downsampled to a fixed number of reads using SAMtools v1.9. Peak calling was performed with MACS2 v2.1.1 as indicated in.^[23] DARs analysis was performed using DiffBind v2.6.6. Regions with FDR < 0.05 and $|\log_2\text{FC}| > 1$ were considered significantly regulated. DARs and footprints were annotated to closest genes from Ensembl (GRCm38.89) using the Bioconductor package ChIPpeakAnno v3.20.1. Predictive relationship of DARs to gene expression changes was performed using BETA v1.0.7 using as reference genes from Ensembl (GRCm38.89). Pearson's correlation is the ratio between the covariance of

two variables and the product of their standard deviations, this coefficient was used to calculate the correlation between ATACseq signal and RNAseq signal for DARs. Fisher's exact tests that are based on the hypergeometric distribution, were used to test if the genes associated with peaks of ATAC-seq were statistically significative associated with gene expression.

Motif analysis of ATAC regions was performed using MEME-suite v4.12.0. and JASPAR 2020 database. For digital footprint, the ATAC-seq dedicated software HINT v0.12.3 (Hm-based Identification of Transcription factor footprints) v0.12.3 was used and to discover enrichment of predicted DNA binding motifs for further analysis, the Homer function findMotifsGenome.pl using suggested basic usage settings HOMER v4.11 was employed. The bedtools genomecov function (v2.26.0) was then used to convert the list of locations into a genome coverage track containing the ATAC-seq signal at each genomic position. Deeptools bamCoverage (v3.1.3, duplicate reads ignored, RPKM normalized and extended reads) was used to generate bigwig files from sorted and indexed bam files. ATAC-seq samples tracks were visualized using IGV (v2.3.72). Further data processing was performed with custom scripts in the R programming language ("Planting of a Tree") (v3.6.1) and bioconductor v3.10.

RNA-seq, ATAC-seq, and ChIP-seq Integration: Raw ChIP-seq sequencing data from (Morenilla et al. 2020) were aligned to the mouse genome using Bowtie2. Based on these aligned reads, immuno-enriched areas using the peak caller MACS2 were found. To integrate RNA-seq, ATAC-seq and ChIP-seq, bedtools were used to overlap genomic intervals and visualize the alignment on the IGV/UCSC browser in specific loci.

In Utero and In Ovo Electroporation: Lhx2 and Lhx9 coding sequences were cloned in the mammalian expression plasmid pCAG. Mouse overexpression target sequence was cloned using the following primers for Lhx9: Fw 5'CCTTGGGTACCACCATGGAATAGTGGGGTGCCGAGC 3' and Rv 5'CTTAGCCTCGAGTTAGGGAATTTCAAACGTCGGGA 3' and the following primers for Lhx2: Fw 5'CCTTGGGTACCAGTGCCTGGGCGGTTA 3' and Rv 5'CTTAGCGAATTCAGAGAAATCGTGGGGGCTCG 3'. Pou4f1 shRNA and Sncg shRNA target sequence were designed using the GenScript siRNA Target Finder tool located at <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai> and cloned into the pSilencer2.1 plasmid using the pSilencer Kit (Thermo Fisher Scientific) in accordance with the manufacturer's recommendations. Mouse Pou4f1 shRNA target sequence was cloned using the following primers: Fw 5' GATCCGCCACGTACCACACGATGAATTCAGAGAATTCATCGTGTGCTACGTGGCTTTTGGAAA and Rv 5' AGCTTTTCAAAAAGCCACGTACCACACGATGAATTCCTTGAATTCATCGTGTGGTACGTGGCG. Mouse Sncg shRNA target sequence was cloned using the following primers: Fw 5' GATCCGCCAAGAGTGGAGAAGACTTCAAGA-GAAGTCTTCTCCTCTTGGCTTTTGGAAA 3' and Rv 5' AGCTTTTCAAAAAGCCACGTGGAGAAGACTTCTTGAAGTCTTCTC-CACTCTGGCG 3'. Plasmidic DNA solution was injected into embryonic retinas or ventricles as described previously.^[62] Brains were removed and the optic chiasm exposed in whole mount under a fluorescence dissecting microscope. Fertilized chicken eggs were incubated for 3 days at 38.5 °C under standard conditions. Plasmidic DNA solutions were injected in the lumen of the chick neural tube as previously described.^[35] Chicken embryos were incubated for two more days before analysis.

Cell Culture Assay: For luciferase assay, HEK293 cells were grown in 90% DMEM 10% fetal calf serum supplemented with 2 mM glutamine and penicillin/streptomycin (100 U mL^{-1} to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Invitrogen). HEK293 cells were transfected using LipoD293 (SigmaGen) with efficiency larger than 90%. Plasmids were transfected in a ratio of 1:1:0.1 (construct of interest in pGL3 basic: Pou4f1 in pCDN3: β -globine reporter) with a total DNA amount of 1 μg per 100 000 cells. The luciferase reporter plasmid used in this study was pGL3basic. Luciferase activity was measured at 24 h after transfection, using the Dual Luciferase Assay kit (Promega).

In Situ Hybridization and Immunohistochemistry: E16.5 mouse embryos were extracted from the pregnant mother and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde. Mouse heads were post-fixed in the same fixative for 4 h and washed in PBS three times. The tissue was cryoprotected in 30% (w/v) sucrose in PBS. Once cryoprotected, the samples were included in OCT compound, frozen and stored at -80 °C until use. Coronal sections ($20 \mu\text{m}$) were obtained with a cryostat (SLEE medical GmbH, Mainz)

and stored at -20°C until used. Electroporated postnatal mice were transcardially perfused with PBS and 4% paraformaldehyde. Brains were dissected out and post-fixed in the same fixative overnight and washed in PBS. Coronal sections ($80\ \mu\text{m}$) were obtained with a vibratome (Leica). The spinal cord from electroporated chicken embryos were immersion fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h, washed in PBS, and sectioned with a vibratome (Leica). In situ hybridization was performed according to reported methods.^[63] A riboprobe to detect mouse Nrp2 mRNA was kindly provided by Dr. Lynda Erskine.

For immunohistochemistry, antigen retrieval with Citrate Buffer pH 6 during 10 min at RT. After that, they were incubated during 20 min with Citrate Buffer at 90°C . After two washes with PBS, sections were treated with MetOH at 10% during 20 min. Sections were blocked for 1 h in PBS containing 5% fetal bovine serum, 0.25% Triton-X-100, and gelatine at 0.02%. Sections were incubated overnight at 4°C in blocking solution with the corresponding primary antibodies. The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (Aves Labs); mouse anti-Pou4f1 (Millipore); rabbit anti-Sncg (GeneTex); mouse anti-Sncg (Abnova); rabbit anti-Zic2 (Herrera's lab.^[64–67]). For immunofluorescence detection, Alexa 488, Alexa 546, and Alexa 647 (Invitrogen, Molecular Probes) secondary antibodies were used. Nuclei were counterstained with DAPI ($2\ \mu\text{g mL}^{-1}$).

Microscopy Setup: Images were captured with an Olympus FV1000 confocal IX81 microscope/FV10-ASW software. Chiasm images were acquired using a Leica MZ16F stereoscope. Electroporated cortex images were acquired with a slide-scanner Zeiss AxioScan.

Quantification and Statistical Analysis: Data were presented in a form of mean $\pm$ SEM. To quantify retinal projections at the optic chiasm level, squared regions of interest (ROI) were superimposed on the width of the optic nerve close to the electroporated retina, the opposite optic nerve, the contralateral optic tract, and the ipsilateral optic tract in regions proximal to the chiasm. Fluorescence intensity within each ROI was measured using Fiji software and normalized with respect to the background. The percentage of fluorescence intensity in each ROI relative to the optic nerve ROI on the electroporated side was then represented graphically. Quantification in spinal and brain sections followed the same strategy: ROIs were drawn in the ipsilateral and contralateral regions of projecting axons. SPSS, GraphPad Prism 8.0, or R (version 4.0.4) was adopted for statistical analyses. Two groups were compared by unpaired, two-tailed, Student's *t*-tests and three groups were compared by one-way ANOVA with Bonferroni tests. Statistical significance was calculated according to the log-rank test $p \leq 0.05$ stood for statistical significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors thank Y. Coca and M. Herrera for technical assistance. The authors sincerely thank all members of the Herrera's and Borrell's lab for comments and suggestions. E.H. and A.B. research was supported by the PROMETEO/2020/007 from the Generalitat Valenciana. In addition, the laboratory of E.H. was funded with the following grants: PID2019-110535GB-I00 from the National Grant Research Program, 20191956 from the Ramón Areces Foundation and ERC-282329 from the European Research Council. M.T.L.-C. and J.F.-A. were recipients of an FPI fellowship from the National Grant Research Program, A.E. was a recipient of a La Caixa Foundation Junior Leader fellowship LCF/BQ/PI18/11630005. The laboratory of A.B. was supported by grants PID2020-118169RB-I00 from MICINN co-financed by ERDF, and RGP0039/2017 from the Human Frontiers Science Program Organization (HFSP). The authors also acknowledge the financial support received from the "Severo Ochoa" Program for Centers of Excellence in R&D (SEV-2017-0723).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors Contribution

M.F.N. performed the RNA-seq and ATAC-seq wet experiments. M.T.L.-C., J.F.-A., and R.M.-V. performed the computational analysis of RNA-seq and ATAC-seq data. A.E. performed electroporation experiments in chick and cortex. V.M.B. performed ISH for Nrp2 in Zic2 electroporated embryos. E.H. wrote the original draft and designed, conceived, and supervised the study. A.B. co-wrote the manuscript, helped with the experimental design, and critically revised the manuscript for important intellectual content.

Data Availability Statement

Genomic data sets can be accessed at the GEO public repository using the accession number GSE184275.

The previously published ChIP-seq data re-analyzed in this study are available under accession code GSE133492

Keywords

axon guidance, axon midline decisions, chromatin binding, integrins, Lhx, Nrp2, Pou4f, retinal ganglion cells, RGCs, transcriptional regulation, Zic, γ -synuclein

Received: January 31, 2022

Revised: June 30, 2022

Published online: August 21, 2022

- [1] B. A. Hassan, P. Å. R. Hiesinger, *Cell* **2015**, 163, 285.
- [2] F. D. R. Charron, M. Tessier-Lavigne, *Development* **2005**, 132, 2251.
- [3] A. L. Kolodkin, M. Tessier-Lavigne, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, 3, a001727.
- [4] P. Olivares-Chauvet, Z. Mukamel, A. Lifshitz, O. Schwartzman, N. O. Elkayam, Y. Lubling, G. Deikus, R. P. Sebra, A. Tanay, *Nature* **2016**, 540, 296.
- [5] Ho. S. Rhee, M. Closser, Y. Guo, E. V. Bashkirova, G. C. Tan, D. K. Gifford, H. Wichterle, *Neuron* **2016**, 92, 1252.
- [6] S. Velasco, M. M. Ibrahim, A. Kakumanu, G. Garipler, B. Aydin, M. A. Al-Sayegh, A. Hirsekorn, F. Abdul-Rahman, R. Satija, U. Ohler, S. Mahony, E. O. Mazzoni, *Cell Stem Cell* **2017**, 20, 205.
- [7] O. Hobert, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2016**, 116, 455.
- [8] M. Lipinski, R. Muñoz-Viana, B. Del Blanco, A. Marquez-Galera, J. Medrano-Relinque, J. M. Caramés, A. A. Szczepankiewicz, J. Fernandez-Albert, C. M. Navarrón, R. Olivares, G. M. Wilczyński, S. Canals, J. P. Lopez-Atalaya, A. Barco, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 2588.
- [9] E. Herrera, L. Erskine, C. Morenilla-Palao, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, 85, 48.
- [10] L. Erskine, E. Herrera, *ASN Neuro* **2014**, 6, 175909141456210.
- [11] A. Mo, E. A. Mukamel, F. P. Davis, C. Luo, G. L. Henry, S. Picard, M. A. Ulrich, J. R. Nery, T. J. Sejnowski, R. Lister, S. R. Eddy, J. R. Ecker, J. Nathans, *Neuron* **2015**, 86, 1369.
- [12] C. Garcá-A-Frigola, E-Sa Herrera, *EMBO J.* **2010**, 29, 3170.
- [13] L. Pan, Z. Yang, L. Feng, L. Gan, *Development* **2005**, 132, 703.
- [14] U. C. Drager, *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **1985**, 224, 57.
- [15] R. J. Colello, R. W. Guillery, *Development* **1990**, 108, 515.
- [16] V. Murcia-Belmonte, Y. Coca, C. Vegar, S. Negueruela, C. De Juan Romero, A. J. Valiño, S. Sala, R. Dasilva, A. Kania, V. Borrell, L. M. Martinez, L. Erskine, E. Herrera, *Curr. Biol.* **2019**, 29, 1149.

- [17] P. J. Fabre, T. Shimogori, F. Charron, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 266.
- [18] L. Erskine, S. Reijntjes, T. Pratt, L. Denti, Q. Schwarz, J. M. Vieira, B. Alakakone, D. Shewan, C. Ruhrberg, *Neuron* **2011**, *70*, 951.
- [19] L. A. Quina, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11595.
- [20] W. Pak, R. Hindges, Y.-S. Lim, S. L. Pfaff, D. D. M. O'leary, *Cell* **2004**, *119*, 567.
- [21] E. Herrera, L. Brown, J. Aruga, R. A. Rachel, G. Dolen, K. Mikoshiba, S. Brown, C. A. Mason, *Cell* **2003**, *114*, 545.
- [22] J. D. Buenrostro, P. G. Giresi, L. C. Zaba, H. Y. Chang, W. J. Greenleaf, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 1213.
- [23] J. Fernandez-Albert, M. Lipinski, M.-A. T. López-Cascales, M. J. Rowley, A. M. Martin-Gonzalez, B. Del Blanco, V. G. Corces, A. Barco, *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 1718.
- [24] S. Wang, H. Sun, J. Ma, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 25022515.
- [25] J. Peng, P. J. Fabre, T. Dolique, S. M. Swikert, L. Kermasson, T. Shimogori, F. Charron, *Neuron* **2018**, *97*, 326.
- [26] C. Morenilla-Palao, M.-A. T. López-Cascales, J. P. Lopez-Atalaya, D. Baeza, L. Calvo-Díaz, A. Barco, E. Herrera, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaz8797.
- [27] F. Yan, D. R. Powell, D. J. Curtis, N. C. Wong, *Genome Biol.* **2020**, *21*, 22.
- [28] T. Kuwajima, C. A. Soares, A. A. Sitko, V. Lefebvre, C. Mason, *Neuron* **2017**, *93*, 1110.
- [29] T. Kuwajima, Y. Yoshida, N. Takegahara, T. J. Petros, A. Kumanogoh, T. M. Jessell, T. Sakurai, C. Mason, *Neuron* **2012**, *74*, 676.
- [30] T. Shao, P. Song, H. Hua, H. Zhang, X. Sun, Q. Kong, J. Wang, T. Luo, Y. Jiang, *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 625.
- [31] H. Liu, W. Liu, Y. Wu, Y. Zhou, R. Xue, C. Luo, L. Wang, W. Zhao, J.-D. Jiang, J. Liu, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7635.
- [32] P. Oeckl, F. Metzger, M. Nagl, C. A. F. Von Arnim, S. Halbgebauer, P. Steinacker, A. C. Ludolph, M. Otto, *Mol. Cell. Proteomics* **2016**, *15*, 3126.
- [33] N. Ninkina, K. Papachroni, D. C. Robertson, O. Schmidt, L. Delaney, F. O'Neill, F. Court, A. Rosenthal, S. M. Fleetwood-Walker, A. M. Davies, V. L. Buchman, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8233.
- [34] S. Tilve, F. Difato, E. Chiergatti, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16524.
- [35] A. Escalante, B. Murillo, C. Morenilla-Palao, A. Klar, E. Herrera, *Neuron* **2013**, *80*, 1392.
- [36] E. Herrera, C. Mason, *Cell* **2003**, *114*, 545.
- [37] Q. L. Giudice, M. Leleu, G. La Manno, P. G. Fabre, *Development* **2019**, *146*, dev178103.
- [38] J. Liu, S. Wilson, T. Reh, *Dev. Biol.* **2003**, *256*, 34.
- [39] L. Erskine, U. Françoise, L. Denti, A. Joyce, M. Tillo, F. Bruce, N. Vargesson, C. Ruhrberg, *Development* **2017**, *144*, 2504.
- [40] A. A. Alghamdi, C. J. Benwell, S. J. Atkinson, J. Lambert, R. T. Johnson, S. D. Robinson, *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 395.
- [41] J. Su, U. Sabbagh, Y. Liang, L. Olejníková, K. G. Dixon, A. L. Russell, J. Chen, Y. A. Pan, J. W. Triplett, M. A. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, e2104343118.
- [42] J. De Melo, C. Zibetti, B. S. Clark, W. Hwang, A. L. Miranda-Angulo, J. Qian, S. Blackshaw, *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 2391.
- [43] R. Balasubramanian, A. Bui, Q. Ding, L. Gan, *Gene Expression Patterns* **2014**, *14*, 1.
- [44] J. J. Yang, G. E. Bertolesi, C. L. Hehr, S. Mcfarlane, *Neuroscience* **2020**, *434*, 66.
- [45] A. Seth, J. Culverwell, M. Walkowicz, S. Toro, J. M. Rick, S. C. F. Neuhauss, Z. M. Varga, R. O. Karlstrom, *Development* **2006**, *133*, 725.
- [46] B. Muralidharan, Z. Khatri, U. Maheshwari, R. Gupta, B. Roy, S. J. Pradhan, K. Karmodiya, H. Padmanabhan, A. S. Shetty, C. Balaji, U. Kolthur-Seetharam, J. D. Macklis, S. Galande, S. Tole, *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 194.
- [47] C.-F. Wang, H.-W. Hsing, Z.-H. Zhuang, M.-H. Wen, W.-J. Chang, C. G. Briz, M. Nieto, B. C. Shyu, S.-J. Chou, *Cell Rep.* **2017**, *18*, 849.
- [48] Q. Wang, F. Marcucci, I. Cerullo, C. Mason, *eNeuro* **2016**, *3*, ENEURO.0169-16.2016.
- [49] O. Avraham, Y. Hadas, L. Vald, S. Zisman, A. Schejter, A. Visel, A. Klar, *Neural Dev.* **2009**, *4*, 21.
- [50] P. Godement, J. Vanselow, S. Thanos, F. Bonhoeffer, *Development* **1987**, *101*, 697.
- [51] W. M. Cowan, J. W. Fawcett, D. D. M. O'leary, B. B. Stanfield, *Science* **1984**, *225*, 1258.
- [52] C. A. Soares, C. A. Mason, *Dev. Neurobiol.* **2015**, *75*, 1385.
- [53] K. Shekhar, I. E. Whitney, S. Butrus, Y.-R. Peng, J. R. Sanes, *eLife* **2022**, *11*, e73809.
- [54] L. A. Quina, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11595.
- [55] I. Surgucheva, A. D. Weisman, J. L. Goldberg, A. Shnyra, A. Surguchov, *Mol. Vision* **2008**, *14*, 1540.
- [56] H. Zhang, A. Kouadio, D. Cartledge, A. K. Godwin, *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 1330.
- [57] S. I. Wilson, B. Shafer, K. J. Lee, J. Dodd, *Neuron* **2008**, *59*, 413.
- [58] P. Marcos-Mondejar, S. Peregrin, J. Y. Li, L. Carlsson, S. Tole, G. Lopez-Bendito, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 4372.
- [59] S. Gong, M. Doughty, C. R. Harbaugh, A. Cummins, M. E. Hatten, N. Heintz, C. R. Gerfen, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 9817.
- [60] P. G. Fuerst, F. Bruce, R. P. Rounds, L. Erskine, R. W. Burgess, *Dev. Biol.* **2012**, *361*, 326.
- [61] J. D. Buenrostro, B. Wu, H. Y. Chang, W. J. Greenleaf, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2015**, *109*, 21.29.1.
- [62] C. Garcia-Frigola, M. I. Carreres, C. Vegar, E. Herrera, *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 103.
- [63] N. Schaeren-Wiemers, A. Gerfin-Moser, *Histochemistry* **1993**, *100*, 431.
- [64] F. Marcucci, V. Murcia-Belmonte, Q. Wang, Y. Coca, S. Ferreira-Galve, T. Kuwajima, S. Khalid, M. E. Ross, C. Mason, E. Herrera, *Cell Rep.* **2016**, *17*, 3153.
- [65] B. Murillo, N. Ruiz-Reig, M. Herrera, A. Fairen, E. Herrera, *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 11266.
- [66] V. Murcia-Belmonte, G. Expósito, E. Herrera, *Curr. Protoc. Neurosci.* **2017**, *79*, 3.31.1.
- [67] M.-C. Tiveron, C. Beclin, S. Murgan, S. Wild, A. Angelova, J. Marc, N. Coré, A. De Chevigny, E. Herrera, A. Bosio, V. Bertrand, H. Cremer, *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 10611.

10. AGRADECIMIENTOS

A los que están hoy a mi lado, y los que han seguido su camino... los girasoles nunca dejan de girar”.

Al final, escribir los agradecimientos resulta ser lo más difícil. Tengo tanto que agradecer que no sé por dónde empezar. Esta historia no tendría inicio sin la oportunidad y confianza que muchas personas depositaron en mí. De su mano, aprendí a conocer este maravilloso mundo y a crecer en él. Aunque el trayecto ha sido duro y a veces frustrante, también ha sido profundamente gratificante.

Este viaje del doctorado ha sido como correr un maratón tras otro. Durante mucho tiempo, me pareció que no había un final a la vista. Con varios golpes de revés, incluso en mi salud, me limité a mantener la cabeza fría y dar un paso cansado tras otro, sin estar siempre convencida de que iba a algún lugar. A decir verdad, en numerosas ocasiones me planteé tirar la toalla: por miedo, por inseguridad, por sentirme desubicada. Y sin embargo, de alguna manera, varios años después, levanté la vista y allí estaba la línea de meta.

Por todo ello, quiero en primer lugar dar las gracias a Eloísa por darme la oportunidad de convertirme en doctora en su laboratorio, de conocer la ciencia de su mano, y de crecer a nivel científico durante estos años. Y además sumar este primer agradecimiento a Ángel, por darme la confianza y enseñarme durante los primeros años que pase en el INA. Gracias a los dos por darme vuestro continuo apoyo y ayuda, además de la libertad necesaria para mi proceso de crecimiento. Todo esto suma un total de demasiados años, en los que he crecido muchísimo como persona y espero que también como científica. Aunque parece que fuese ayer cuando una murciana perdida pisó por primera vez el instituto de neurociencias, con mucha incertidumbre, ilusión, y ganas, y con una deficiencia muy importante en el inglés.

Me gustaría extender mi más sincero agradecimiento a todas las personas que a lo largo de los años me han ayudado, colaborado a mí y a mi investigación, aquellas que han hecho posible mi crecimiento personal y profesional durante esta larga carrera de fondo, a todas las personas que me han rodeado para darme las fuerzas necesarias para continuar y llegar al final de la etapa. También a Maite, por toda su ayuda en todos los trámites siempre.

Quiero dar las gracias a los dos laboratorios, al de Eloísa Herrera y de Ángel Barco, por un entorno de trabajo estimulante y un ambiente de trabajo muy bonito. A pesar de que yo estaba siempre en el mismo sitio sentada. Han sido dos etapas muy bonitas que llevaré en mis “retinas” toda la vida. Particularmente voy a comenzar por el laboratorio de Elo, con Vero, muchas gracias por la excelente retroalimentación científica y la sinergia de la cooperación. Además por tu apoyo a la hora de

ayudarme. Ese “brain storming” ha sido muy importante para mí. Y sé que te he dado muchos quebraderos de cabeza con los perfiles y los genes. Marta, perdón por meter la pata cuando no debía, nunca fue con una mala intención, y en especial a ti por los datos que presento en esta tesis y que no son míos, que yo solo los he analizado. Todas los doctores con los que he trabajado de forma más activa desde que comencé mi etapa en el Instituto de Neurociencias: Marilyn Scandaglia, Jordi Fernández-Albert, Beatriz Del Blanco, Cruz Morenilla, Verónica Murcia Belmonte, Aida Giner de Gracia, y Marta Fernández-Nogales, porque el feedback recibido ha sido muy satisfactorio, y sin vuestros datos esta tesis no sería posible. Todos los miembros del laboratorio de Eloísa Herrera y de Ángel Barco: Por un entorno de trabajo estimulante y un ambiente de trabajo muy bonito. A pesar de que yo estaba siempre en el mismo sitio sentada.

Han sido dos etapas muy bonitas que llevaré en mis “retinas” toda la vida.

En mi primera etapa cuando llegué al laboratorio, donde conocí y me llevé a grandes amigos que ya han volado a hacer sus vidas, en especial mi gran amigo Jordi, con el que los cafés, los intercambios de ideas y sobre todo las locuras de futuro junto con la Alhambra en la mano nos hacían reír muchísimo. A Marian por su amistad, por esas charlas psicológicas y por su amistad también incondicional. Marta Alaiz, esa sevillana que siempre me sacaba una sonrisa, además de los peinados excepcionales que me regaló con sus churros con chocolate que compartimos con Jeiny y Vanesa, y nuestras excursiones. Sin olvidar a Juan Medrano por su gran sentido del humor que siempre te sacaba una sonrisa.

En la segunda etapa empezaron a llegar otras personas que se convirtieron también en muy importantes, Sergio Niñerola con el que compartimos muchas ideas sobre análisis, además de olimpiadas en el laboratorio, ser mi hombro en las fiestas y muchas risas y cafés, junto con Miguel, Berta, Isabel, Carina, Samantha, además de los miembros del laboratorio de José Lopez-Atalaya (Jeiny, Carmen, Aysha, y Alejandro) todos en un pack. Sobre todo en nuestras barbacoas, o celebraciones de tesis, donde nos convertíamos en una verdadera revolución. No me puede faltar Juan Paraíso, que conocí durante un Journal club, y hubo una conexión muy bonita. Finalmente no me olvido de los siempre presentes Bea y Román, muchas gracias por vuestra ayuda siempre que la he necesitado.

Luego vino la pandemia, donde desafortunadamente me pase mucho tiempo trabajando desde casa, hasta que volví y vino otra etapa en el laboratorio de Eloísa Herrera, allí pues realmente con todos lo pase muy bien, nos íbamos de comida improvisada de vez en cuando, gracias Marta por iniciar ese proceso para probar esas patatas que ya pasaron a la historia, las decoraciones navideñas, las salidas de la rutina o las comidas campestres familiares, la mañana de churros con chocolate, la verdad se generó un ambiente muy bonito, pero a todos gracias porque el ambiente

en el laboratorio se hacía muy ameno y agradable trabajar allí. Yo me sentaba en la esquina de los virus, y junto con Carlos éramos los más temidos, os menciono a todos los que forman parte de esta etapa: Augusto, Marta, Vero, Isabel, Maca, Yaiza, Cruz, Patricia y Bea, espero que os gustase el detalle navideño al volver de las vacaciones, lo hice con mucho cariño 😊.

- Cristina García Frigola: La primera persona que conocí al llegar aquí, por ser siempre generosa con sus conocimientos, y por su simpatía y cariño.
- Víctor Borrell: Por su ayuda en todos los lab meetings
- Laboratorio de Víctor Borrell: Por la estimulante discusión en los lab meetings.

A mis amigos, la familia que escogemos.

- Susi, Oscar y a mi ahijada Bella por mis tardes de quitar el estrés, las risas, un poco de bachata y una hamburguesa. Gracias por ayudarme con todo lo que siempre he necesitado. Os quiero de manera incondicional, sois mi familia ahora y siempre, cuanto de menos echo las barbacoas.
- Kris mi hermana incondicional en todas las aventuras, no ha pasado una, y está planeando la siguiente.
- Aura: por sus ayudas con el inglés y todas las conversaciones de apoyo, soporte emocional y su cariño, junto con Katy.
- Nathalia: por todas las aventuras que vivimos, y las que nos quedan por vivir.
- Luzia: Por animarme siempre, su amistad incondicional, gracias por tenerme toda la paciencia del mundo.
- Las chicas del vóley por esas tardes en la playa, y esas fútbol-cañas de ánimo quitadoras de estrés.
- Really important this part in English, to all the members of my current lab, who really can't be more 'Cute', starting with my boss Miao, and with all my colleagues, always with a coffee or any tiny things, thanks for your love and support, and to my friends Camila, Steffy, Michelle, Susan, Tatiana, Tiff, Kim, and Sharon, who take me out of the routine and introduce me in the Dutch environment. DANKE LEKKER!!

Una dedicatoria especial

A mi abuelo Porfirio, y a mi Papa Juan, con el recuerdo presente de mi infancia me hacen ver el camino de la persona en la que quiero convertirme, gracias por guiarme.

A mi familia y la familia de mi novia por todo vuestro cariño.

A mis hermanos Juan y Jorge: Por parecer el burro de Shrek y preguntarme cada dos por tres que la tesis pa' cuando. A Jorge por leerse parte de la tesis jajaja

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. El amor recibido, la dedicación, y la paciencia con la que cada día se preocupaban y me impulsaban hacia delante, con el desarrollo de mi carrera profesional, es simplemente único, y se refleja en la persona en la que me he convertido.

Y por último, a mi futura esposa, Anyi R. Cruz Collazos. Recuerdo perfectamente una tarde, hace unos meses, en la que acudí a ti sollozando, con mucha ansiedad, aterrorizada por no tener lo que hacía falta para resolver todo esto. Ni una sola vez dudaste de mi competencia para llevar esto hasta el final. Tu fe inquebrantable en mí y tu apoyo incondicional, incluso cuando mi propia confianza fluctuaba, me ayudaron a perseverar. A pesar de lo orgullosa que estoy de mí misma por haber llegado tan lejos, sé que tú estás aún más orgullosa de mí porque ese es el tipo de novia que eres.

A todos .. Gracias por tanto, por dulce o por amargo, gracias por ser parte de mí. Como en la orilla del mar, el agua viene con caricias que se van. Yo sé muy bien que unos se van y otros vienen, pero con la certeza que respiro yo siempre estaré para quien me necesite, para quien quiera. La vida es dulce, quizás a veces te atragantes y te escueza un poco, pero al rato pasa, y vuelves a disfrutar de su dulzor con ganas renovadas, esto solo tiene un nombre y se llama resiliencia.

“Se va echando el tiempo encima, es el momento, con mis cervecitas y un par de colegas, al menos mereció la pena. ¿A dónde vas? Y yo que se, donde me lleven mis alas, donde se cumplan mis sueños, y siempre ganen mis ganas. Me llevo este aire fresco en la maleta, lecciones de la vida, y mis metas”.

Lo siento, si me he dejado a alguien en el camino, de verdad, muchas gracias por todo.

Ya es hora de acabar.

“Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas” – Frank Clark