

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Estudio de la conectividad
interhemisférica del cuerpo
calloso: papel del receptor
Neuropilina-1 y generación de
un modelo animal de
inactivación condicional para
*Cux1***

Tesis Doctoral

Fernando Martín Fernández

Madrid, 2021

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Estudio de la conectividad interhemisférica del cuerpo calloso: papel del receptor Neuropilina-1 y generación de un modelo animal de inactivación condicional para *Cux1*

Memoria de Investigación presentada por **Fernando Martín Fernández**,
graduado en Biología, para optar al grado de **Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por la Doctora Marta Nieto López

Madrid, 2021

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. Marta Nieto López, en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Fernando Martín Fernández ha sido financiado por una beca “Formación de Profesorado Universitario” con referencia FPU 15/02111 del Ministerio de Universidades desde mayo de 2017 hasta septiembre de 2021.

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

La Dra. D^a Marta Nieto López

CERTIFICA:

Que D. Fernando Martín Fernández ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado “Estudio de la conectividad interhemisférica del cuerpo caloso: papel del receptor Neuropilina-1 y generación de un modelo animal de inactivación condicional para Cux1 con el objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste a todos los efectos, firma el presente certificado.

Fdo.: Marta Nieto López

Madrid, año 2021.

A mi familia, de sangre y de vida.

RESUMEN

La neocorteza de los mamíferos es responsable de la integración más elevada de la información sensorial, de las funciones cognitivas superiores, de los comportamientos complejos, y en parte, de la consciencia. Esto es posible gracias a los complejos circuitos que establecen las neuronas que la pueblan. Uno de estos circuitos es el cuerpo calloso (CC) que, conectando ambos hemisferios cerebrales de los mamíferos placentarios, media la integración bilateral necesaria para el desarrollo de funciones de alto orden. La formación y desarrollo del CC es un proceso complejo en el que intervienen muchos y diversos factores moleculares intrínsecos y extrínsecos a la neurona.

Uno de los factores implicados en el desarrollo axonal de las proyecciones callosas es el receptor Neuropilina-1 (Nrp1). Estudios anteriores describieron que la señalización vía Nrp1 media el cruce de la línea media y determina la elección de las vías dorsal o ventral para la extensión de los axones a lo largo del CC. Alterando el gradiente de expresión de Nrp1 de las neuronas L2/3 mediante electroporación *in utero* y, usando marcadores axonales retrógrados, nosotros hemos demostrado que Nrp1 en el área somatosensorial favorece la organización homotópica de las ramificaciones axonales. Por un lado, observamos que el silenciamiento de Nrp1 reduce la estabilización de las proyecciones callosas procedentes del área somatosensorial secundaria (S2) y, por otro, que su sobre-expresión aumenta el número de proyecciones heterotópicas de las neuronas L2/3 localizadas en el área somatosensorial primaria (S1) y disminuye las homotópicas procedentes de S2.

El factor de transcripción Cux1 aporta identidad de subclase a neuronas corticales de la L2/3 y L4. Una limitación fundamental para el estudio de las funciones de Cux1 es que su inactivación sistémica en ratón produce un fenotipo letal al nacimiento. Por ello, para investigar los efectos de su pérdida de función de manera precisa, de tipo celular específica, y en distintos momentos del desarrollo, generamos un alelo Cux1 flanqueado por secuencias *LoxP*, empleando una tecnología novedosa basada en *CRISPR-Cas9*. Mediante el cruce con una línea transgénica específica de la L4 o la electroporación *in utero* dirigida a las neuronas de la L2/3, demostramos que la recombinación de este alelo por la enzima CRE produce la pérdida de la proteína CUX1 de manera eficiente. Seguidamente iniciamos los estudios funcionales. Si bien, trabajos previos demostraron que el silenciamiento de *Cux1* mediante ARN de interferencia provoca un fallo completo en la estabilización de proyecciones L2/3 callosas, el estudio de nuestra línea condicional demuestra que la inactivación del gen *Cux1* en la L2/3 no provoca una pérdida de inervación contralateral, sino un aumento de las ramificaciones en las zonas más mediales.

En conjunto, nuestros estudios contribuyen a la comprensión del desarrollo de los circuitos corticales y las enfermedades del neurodesarrollo. Esperamos que, en un futuro próximo, las herramientas generadas faciliten la adquisición de conocimiento relevante para el campo de la neurobiología del desarrollo.

ABSTRACT

The mammalian neocortex is responsible for the integration of higher-order sensory information, the execution of complex cognitive functions and behaviors, and in part, consciousness. These functions arise from the complex circuits established by the neurons that compose them. One of these circuits is the corpus callosum (CC). This structure connects the cerebral hemispheres of placental mammals, mediating the integration of bilateral information, necessary for the development of higher-order functions. The formation and development of the CC is a sophisticated process, which involves a multitude of molecular players.

One of the factors involved in the axonal development of callosal projections is the Neuropilin-1 (Nrp1) receptor. Previous studies described that signaling via Nrp1 mediates midline crossing events and that regulates the dorsoventral positioning of callosal axons along with the CC. By altering the Nrp1 expression gradient of L2/3 neurons with *in utero* electroporation, and in combination with retrograde tracing, we have shown that Nrp1 favors homotopic organization of axonal branching in the somatosensory area. On the one hand, we observed that silencing Nrp1 reduces the stabilization of callosal projections from the secondary somatosensory area (S2); and, on the other hand, we found that its overexpression produced an increase in the number of heterotopic projections from L2/3 neurons located in the primary somatosensory area (S1), as well as a reduction of the homotopic projections from S2.

The transcription factor Cux1 provides subclass identity to cortical neurons of L2/3 and L4. A fundamental limitation for the study of Cux1 functions is that its systemic inactivation in mice results in a birth lethal phenotype. Therefore, to investigate the effects of its loss of function in a precise cell type-specific manner and at different developmental time points, we generated a Cux1 allele flanked by LoxP sequences using a novel CRISPR-Cas9-based technology. Using either *in utero* electroporation for L2/3 or an L4-specific transgenic mice line, we demonstrated that recombination of this allele by the CRE enzyme resulted in an efficient loss of the CUX1 protein. Besides that, in a preliminary functional characterization of the mice, we also evaluated the contralateral behavior of callosal neurons. While previous work has shown that silencing *Cux1* by RNA interference causes a complete failure in the stabilization of L2/3 callosal projections, in our conditional line we observe that inactivation of the *Cux1* gene in L2/3 does not cause a loss of contralateral innervation, but an increase in branching in medial areas.

Taken together, our study contributes to the understanding of cortical circuit development and neurodevelopmental diseases. We hope that, in the near future, the tools generated will facilitate the acquisition of knowledge relevant to the field of developmental neurobiology.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	2
La corteza cerebral: evolución y complejidad	2
NEOCORTEZA	3
Organización radial de la neocorteza: las láminas corticales	3
Desarrollo embrionario de la neocorteza: modelo dentro-fuera	4
Organización de la neocorteza: áreas sensoriales y circuitos intracorticales	7
CONECTIVIDAD INTERHEMISFÉRICA	8
CUERPO CALLOSO	9
Desarrollo y formación del Cuerpo Calloso	10
Topografía de los axones callosos	13
NEUROFILINA-1: ESTRUCTURA, LIGANDOS Y FUNCIONES	14
Papel de Nrp1 en el desarrollo del CC	15
IDENTIDAD MOLECULAR DE LAS NEURONAS CORTICALES	16
El factor de transcripción CUX1 y su implicación en corteza cerebral	19
Modelos de ratón para el estudio de <i>Cux1</i>	21
Generación de líneas transgénicas de ratón y la tecnología CRISPR-Cas9	22
RELEVANCIA CLÍNICA DEL DESARROLLO DEL CUERPO CALLOSO ..	24
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Mantenimiento de cepas de ratón	29
Genotipaje de líneas transgénicas de ratón	30
Generación de línea transgénica de ratón	32
Diseño <i>in silico</i> de la estrategia de modificación genética	32
Complejos ribonucleoprotéicos	32
Ensayo <i>in vitro</i> de la eficiencia de corte de los complejos ribonucleoprotéicos	33
Inyección de embriones	33
Genotipado y secuenciación de fundadores	34
Establecimiento fondo genético en C57BL6'J	35
Electroporación <i>in utero</i> de precursores neuronales de la corteza cerebral	35

Construcciones de ADN	37
Amplificación y purificación de vectores plasmídicos de ADN	39
Marcaje retrógrado de neuronas interhemisféricas	39
Inyecciones estereotáxicas de CTB	40
Histología e inmunofluorescencia	41
Histología	41
Inmunofluorescencia	41
Microscopía Confocal	42
Adquisición de imágenes	42
Análisis de imagen	43
Análisis estadístico	44
RESULTADOS	47
Papel del receptor Neuropilina-1 en la formación del Cuerpo Calloso ..	47
Los niveles de expresión de Nrp1 determinan el patrón de inervación contralateral del área somatosensorial	47
Los niveles de expresión de Nrp1 regulan la inervación homotópica de las proyecciones callosas en el área somatosensorial	51
Las alteraciones en la expresión de Nrp1 alteran la dinámica de crecimiento y refinamiento de las proyecciones callosas durante el desarrollo	56
Los niveles de Nrp1 determinan un refinamiento postnatal de los axones callosos de las neuronas de la L2/3 que se detecta en la línea media	59
El silenciamiento de Nrp1, pero no la sobre-expresión, altera las proporciones de neuronas interhemisféricas de las neuronas de la L2/3, afectando su refinamiento	62
Silenciar la expresión de Nrp1 en la lámina 2/3 produce alteraciones en el proceso de refinamiento de las neuronas de la lámina 4	66
Generación de línea transgénica de inactivación condicional para <i>Cux1</i>	69
Diseño <i>in silico</i> de la estrategia experimental	69
Comprobación <i>in vitro</i> de la eficiencia de corte de los complejos ribonucleoprotéicos de Cas9	73
Inyección de ADNcs y complejos ribonucleoprotéicos en embriones de ratón	75
Genotipado de la generación fundadora de la línea <i>Cux1cKO</i>	75
Secuenciación del alelo modificado en la primera generación (F1) de la línea <i>Cux1cKO</i>	77

Generación de <i>Cux1cKO</i> heterocigoto mediante el cruce con la línea <i>Sox2-CRE</i>	79
La inactivación de <i>Cux1</i> en las neuronas de la lámina 2/3 no afecta su identidad interhemisférica	81
Generación de una línea <i>knock-out</i> de <i>Cux1</i> en células <i>Rorβ⁺</i> . Inactivación de <i>Cux1</i> en la lámina 4 de la corteza cerebral del ratón .	88
DISCUSIÓN	91
La diversidad de la circuitería cortical en el contexto del determinismo molecular	91
El receptor de <i>Nrp1</i> y su papel en la organización topográfica de las conexiones callosas	92
La competición axonal como mecanismo de acción de <i>Nrp1</i> durante la formación del CC	93
La posible función dual de <i>Nrp1</i> : guía axonal e influencia durante el refinamiento de proyecciones callosas	96
<i>Cux1</i> y la complejidad de su estudio en el cerebro	98
El silenciamiento y la inactivación del gen <i>Cux1</i> desembocan en fenotipos de inervación contralateral contrarios	100
<i>Cux1</i> como factor de identidad de la lámina 4	103
Los circuitos corticales y su formación: “seremos, sea como sea”	104
CONCLUSIONES	107
REFERENCIAS	109
ANEXOS	137

ABREVIATURAS

- **ADNcs**: ácido desoxirribonucleico de cadena simple
- **ARNInc**: ácido ribonucleico largo no-codificante
- **ARNm**: ácido ribonucleico mensajero
- **ARNhc**: ácido ribonucleico de horquillado corto
- **ATAC-Seq**: *assay for transposase-accessible chromatin using sequencing*
- **Cas9**: *CRISPR-associated protein 9*
- **CASP**: *Cux1 gene Alternatively Spliced Product*
- **CC**: Cuerpo Calloso
- **CGR**: célula de glia radial
- **COUP-TF1**: *COUP Transcription Factor 1*
- **CRE-Dox**: Cre recombinasa dependiente de doxiciclina
- **CRE-ERT**: Cre recombinasa dependiente de tamoxifeno
- **CRISPR**: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- **cRNP**: complejo ribonucleoprotéico
- **crRNA**: *crispr RNA*
- **CTB**: *Cholera Toxin subunit B* o subunidad B de la toxina colérica
- **Ctip2**: *COUP-TF-Interacting Protein 2*
- **Cux1**: *CUT Like Homeobox 1*
- **Cux2**: *CUT Like Homeobox 2*
- **CUB**: dominio CUB (para el complemento **C1r**; **C1s**, **Uegf** y **Bmp1**).
- **CUT**: dominio CUT (del inglés, *cut wing*)
- **DAPI**: 4', 6-diamidino-2phenylindole
- **DCC**: *Deleted in Colorectal Carcinoma*
- **DsRed**: *Discosoma sp. Red*
- **E**: día embrionario
- **EEM**: error estándar de la media
- **EIU**: electroporación *in utero*
- **Emx2**: *Empty Spiracles Homeobox 2*
- **F**: generación en el establecimiento de fondo genético

- **FBS:** *Fetal Bovine Serum* o suero fetal bovino
- **Fezf2:** *FEZ Family Zinc Finger 2*
- **Foxg1:** *Forkhead Box G1*
- **Foxp2:** *Forkhead Box Protein 2*
- **FT:** factor de transcripción
- **GFP:** *green fluorescent protein*
- **HBSS:** *Hank's Balanced Salt solution*
- **IDA assay:** *in vitro digestion assay*
- **IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*
- **kb:** kilobase
- **kDA:** kilodalton
- **Kv1:** *potassium voltage-gated channel family*
- **L:** lámina cortical
- **LB:** medio Luria-Bertani
- **Lhx2:** LIM Homeobox 2
- **MAM:** dominio MAM (**M**eprina, proteína **A5** y receptor **Mu**)
- **miARN:** microARN
- **ms:** milisegundo
- **NLS:** *nuclear location signal* o señal de localización nuclear
- **NMDAR2B:** *N-Methyl D-Aspartate Receptor Subtype 2B*
- **NP:** neurona piramidal
- **NPC:** neurona de proyección callosa
- **NPr:** neurona de proyección
- **NPrl:** neurona de proyección interhemisférica
- **Nrp1:** receptor Neuropilina-1
- **P:** día postnatal
- **Pax6:** *Paired Box 6*
- **PBS:** *Phosphate Buffered Saline* o tampón fosfato salino
- **PDZ:** dominio PDZ (**P**SD-95, **D**IgA y **Z**o-1)
- **PI:** progenitor intermedio
- **PoM:** núcleo talámico Posterior Medial
- **PSD-95:** *post-synaptic density protein 95*

- **Px:** pixel
- **RDI:** región de interés
- **Rmst:** *Rhabdomyosarcoma 2 Associated Transcript*
- **Rorβ:** *RAR Related Orphan Receptor B*
- **S1:** área somatosensorial primaria
- **S1CB:** corteza de barriles del área somatosensorial primaria
- **S2:** área somatosensorial secundaria
- **Satb2:** *SATB Homeobox 2*
- **Sema3:** Semaforina de clase 3
- **Sema3A:** Semaforina de clase 3 tipo A
- **Sema3C:** Semaforina de clase 3 tipo C
- **Slit2:** *SLIT guidance ligand 2*
- **Sox2:** *SRY-box containing gene 2*
- **Sox5:** *SRY-box transcription factor 5*
- **SS:** área o sistema somatosensorial
- **TBE:** tampon tris-borato-EDTA
- **Tbr1:** *T-Box Brain Transcription Factor 1*
- **Tbr2:** *T-Box Brain Transcription Factor 2*
- **tracrRNA:** *trans-activating crispr RNA*
- **UV:** ultravioleta
- **V:** voltio
- **VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*
- **VGLUT2:** *vesicular glutamate transporter 2*
- **VMP:** núcleo talámico Ventral Medial Posterior
- **WT:** *wild-type*
- **Xlr3b:** *XA-linked lymphocyte regulated protein 3B*
- **Xlr4b:** *XA-linked Lymphocyte regulated protein 4B*
- **ZSV:** zona subventricular
- **ZV:** zona ventricular

Introducción

INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral: evolución y complejidad

Desde una amplia perspectiva, la potencialidad evolutiva del ser humano parece residir no tanto en su habilidad para adaptarse al entorno, sino en su capacidad para adaptar el entorno a sí mismo. Por tanto, las capacidades de analizar, interpretar, comprender y modificar el ambiente han sido cruciales en la supervivencia de la especie *Homo sapiens sapiens* y su perpetuación a lo largo de la evolución. Estas capacidades también han evolucionado, no sólo limitándose a la propia supervivencia, sino creando y desarrollando conceptos y herramientas tales como la moral, las creencias, las costumbres, el arte, el lenguaje, la lógica o las matemáticas (Boyd, 2017). Las citadas habilidades se conocen en neurociencia como funciones cognitivas superiores o de alto orden. Estas funciones se extienden desde la capacidad de integrar la información sensorial hasta la propia consciencia. Aportan, principalmente, la capacidad de evaluar, organizar y alcanzar objetivos o la habilidad de adaptar el comportamiento del ser humano al contexto que lo rodea (Paz-Alonso *et al.*, 2014). Toda esta complejidad en funciones mentales viene dada por la complejidad adquirida en el cerebro de los mamíferos durante la evolución. La creencia popular de que un mayor tamaño cerebral aporta una mayor inteligencia es errónea. Mayores y mejores capacidades cerebrales se adquieren con una mayor complejidad estructural y circuital, que llevan consigo una mayor plasticidad y, por ende, un mejor potencial de adaptación (DeFelipe, 2011; Lent and Tovar-Moll, 2015).

La aparición de la corteza cerebral, su expansión y especialización constituyen los grandes avances evolutivos que permiten hoy poder estar desarrollando la presente tesis doctoral, en una paradoja que resume elegantemente a la neurociencia. La corteza es la estructura del sistema nervioso de mamíferos que más ha evolucionado y representa el 85% del volumen cerebral (Douglas and Martin, 2007). Está formada por dos hemisferios y, a su vez, está dividida en dos regiones: neocorteza y allocorteza. La allocorteza es la parte más ancestral de la corteza e incluye a la arquicorteza (formación hipocampal) y la paleocorteza (corteza olfatoria) (Figura 1).

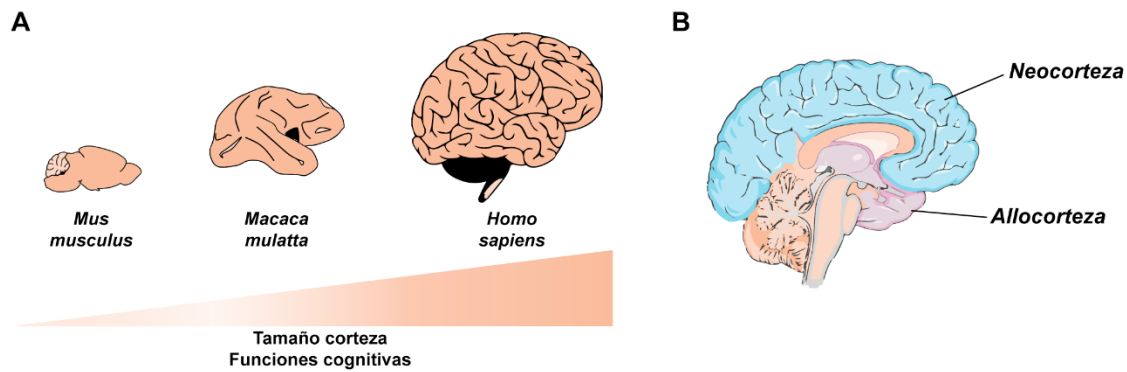


Figura 1: desarrollo de la corteza cerebral de mamíferos. Las funciones cognitivas se ven incrementadas en el mismo sentido que la complejidad de la corteza (A). La corteza cerebral en humanos presenta la neocorteza o neocórtex de mayor tamaño y complejidad dentro de los mamíferos superiores (B).

La neocorteza es la parte más evolucionada y funcionalmente se organiza en tres áreas principales: sensorial, motora y de asociación (Badre and Nee, 2018). Estas áreas funcionales se subdividen dependiendo del tipo de información que procesan y de su citoarquitectura (Cadwell *et al.*, 2019). La complejidad de la neocorteza se basa en su composición y organización. Está formada por cientos de tipos neuronales y diferentes tipos de células gliales que trabajan de manera precisa para ejecutar todas las funciones mencionadas anteriormente. Estas células se organizan de manera radial formando capas o láminas (L) (Rakic, 1988a) y, además, a nivel tangencial formando áreas anatómicas (O'Leary, 1989; Alfano and Studer, 2013; Simi and Studer, 2018) que están especializadas en el desarrollo de funciones concretas (Cadwell *et al.*, 2019).

NEOCORTEZA

Organización radial de la neocorteza: las láminas corticales

La neocorteza se organiza en seis láminas y, cada una, agrupa neuronas con características morfológicas, moleculares y de conectividad similares (Douglas and Martin, 2004; Rakic, 2009). Estas láminas están compuestas por dos tipos de neuronas: interneuronas con actividad inhibitoria, y neuronas piramidales (NP) (Wonders and Anderson, 2006; Bekkers, 2011). Todas las láminas poseen características comunes de conectividad y organización, pero la morfología y longitud radial de las mismas puede variar dependiendo del área funcional (Custo Greig *et al.*, 2013). Se numeran de fuera hacia dentro, en orden ascendente. La lámina (L) 1, también conocida como lámina molecular, está compuesta por un gran número de axones que discurren de forma paralela a la superficie pial y de formaciones dendríticas de las capas inferiores (White, 1989). La L2 y L3 (en el

ratón, una única lámina conocida como 2/3) agrupan neuronas piramidales que proyectan sus dendritas hasta la L1 y sus axones hacia capas inferiores. La diferencia entre la L2 y L3 en humanos reside en la morfología de sus neuronas excitatorias, encontrándose en la L2 las células granulares (neuronas piramidales pequeñas), mientras que la L3 contiene neuronas piramidales medianas. Por contrario, en el ratón, aunque existen diferencias funcionales (Meng *et al.*, 2017), la similitud citoarquitectónica permite agruparlas como solo una. La lámina inmediatamente inferior es la L4, que funciona recibiendo la información que asciende desde el tálamo, y está compuesta por neuronas estrelladas (en inglés, *stellate neurons*) (Petersen and Sakmann, 2000). Bajo la L4, se localiza la L5 que se subdivide en L5A (dorsal) y L5B (ventral). La L5 contiene neuronas piramidales que extienden sus dendritas hasta las láminas más superiores (L1 o L2/3) y proyectan a diferentes regiones cerebrales (Baker *et al.*, 2018). Por último, y como lámina más profunda, se localiza la L6 compuesta por neuronas de morfología diversa que extienden sus árboles dendríticos hasta la L4 (Figura 2) (DeFelipe and Fariñas, 1992).

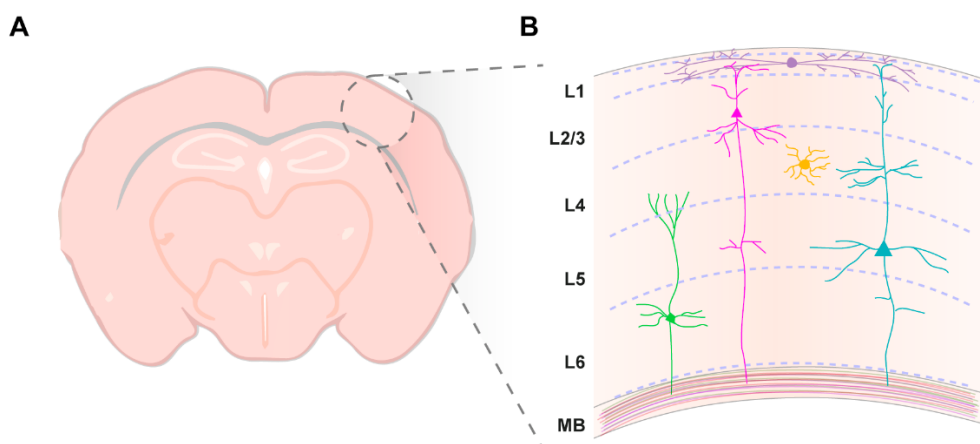


Figura 2: en el cerebro del ratón, la neocorteza (A) se organiza en seis láminas que contienen diferentes tipos de neuronas excitatorias, situadas de forma radial, e interconectadas entre sí formando circuitos columnares (B) (Las láminas 2 y 3 se agrupan en una sola lámina por la dificultad de su distinción morfológica).

Desarrollo embrionario de la neocorteza: modelo dentro-fuera

La neocorteza tiene su origen en el prosencéfalo, cuando las células del neuroepitelio comienzan a diferenciarse en células de glía radial (CGR). Este proceso ocurre alrededor del día embrionario (E) 10 en ratones (Smart, 1973) y, a partir de la quinta semana de gestación en humanos (Müller and O’Rahilly, 1988). Las CGR son progenitores neuronales que, más tarde, producirán las

neuronas que conformarán la neocorteza. Se localizan en la zona ventricular (ZV) (Figura 3A) y, poseen una morfología bipolar, extendiendo proyecciones apicales hacia la superficie pial y, basales hacia la superficie ventricular, de forma radial. Las CGR se dividen asimétricamente para generar una neurona o un progenitor intermedio (PI) (Noctor *et al.*, 2004). Los PI ocupan la zona subventricular (ZSV) y, desde aquí, se dividirán simétricamente expandiendo el número de neuronas postmitóticas (Florio and Huttner, 2014; Sun and Hevner, 2014; Romero and Borrell, 2015). Ambos tipos de células, CGR y PI, poseen diferencias tanto a nivel morfológico como molecular y, además, contribuyen de manera diferencial a la generación de las láminas de la neocorteza. Por un lado, las CGR tienen la potencialidad de generar neuronas de las láminas inferiores y de las láminas superiores, en ocasiones, a través de la generación de PI (Nieto *et al.*, 2004; Englund *et al.*, 2005; Romero and Borrell, 2015). Por el contrario, los PI generan mayoritariamente neuronas de las láminas superiores, sobre todo en mamíferos superiores, aunque se ha demostrado que conservan la potencialidad de generar neuronas de todas las láminas, al igual que las CGR (Figura 3B) (Mihalas *et al.*, 2016).

La producción de neuronas de la neocorteza o corticogénesis ocurre de manera secuencial, desde el día E11 hasta E17 en ratón. Las neuronas excitatorias postmitóticas generadas en la ZV o en la ZSV migran radialmente, adheridas a las proyecciones radiales de las CGR, hasta contactar con la región pial donde se separan y acumulan, conformando una lámina (Rakic, 1988b; Woodworth *et al.*, 2016) . De esta manera, tras sucesivas oleadas de división-migración, se forman las láminas de la corteza siguiendo el modelo conocido como dentro-fuera (en inglés, *inside-out model*) (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1974). Este proceso comienza a día E10,5, cuando las primeras neuronas postmitóticas migran desde la ZV para conformar la capa conocida como preplaca a E11,5 (Allendoerfer and Shatz, 1994; Marín-Padilla, 1998). Las divisiones continúan y, a E12,5, nuevas neuronas generan en la preplaca dos regiones: la zona marginal y la subplaca. Entre estas dos regiones se forma la capa que dará lugar a la L6 (Malatesta *et al.*, 2000; Noctor *et al.*, 2001). Este proceso continúa hasta E13,5, formándose en este momento la L5 (Caviness, 1982). Desde E14,5, se forman las neuronas de las láminas superiores a partir de los PI en la ZSV, generándose

primero las neuronas de la L4 y, después, a E15,5-16,5, las de la L2/3 (Tissir and Goffinet, 2003; Miyata *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2004). Las últimas poblaciones celulares que las CGR generan son células gliales, a partir de E18,5 (Figura 3B) (Malatesta *et al.*, 2000). Como ventaja experimental, la generación sincrónica de cada lámina cortical permite, a través del uso de diferentes aproximaciones como la electroporación *in utero* (EIU), la modificación selectiva de los progenitores en el momento en que darán lugar a una determinada lámina y, por ende, la modificación de las neuronas postmitóticas que la conformarán. Este aspecto resultó fundamental para el estudio de las láminas superiores realizado en esta tesis doctoral.

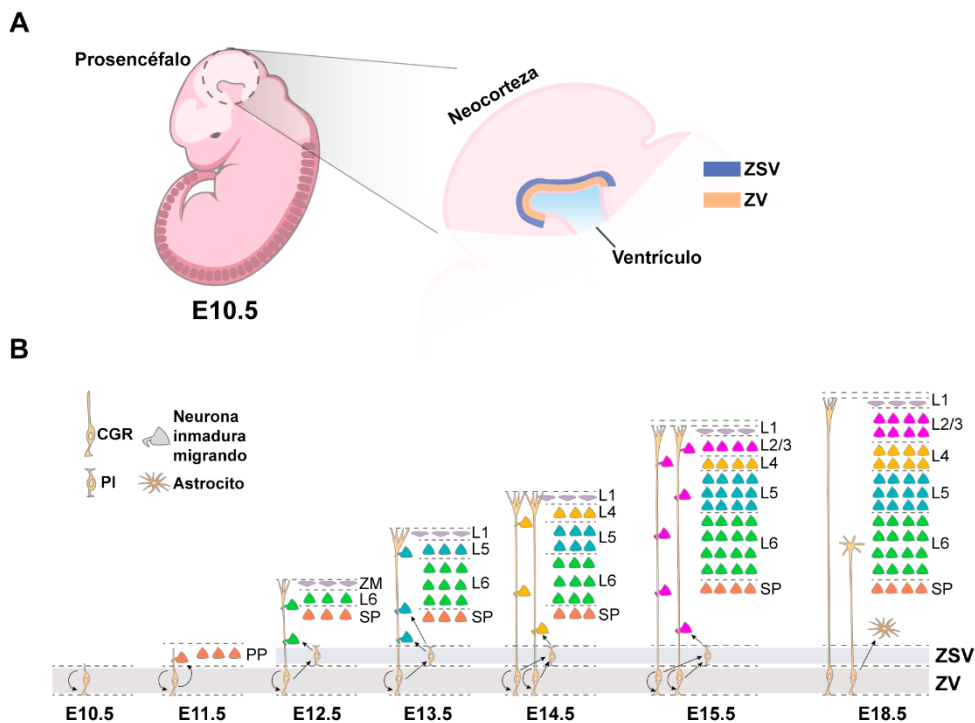


Figura 3: a día embrionario 10.5, en el prosencéfalo del ratón comienza la formación de la neocorteza. Las células del neuroepitelio, situadas en la ZV, comienzan a dividirse para formar los progenitores neuronales (A). En la ZV se sitúan las CGR que extienden proyecciones hacia la superficie pial, sirviendo así como andamio para las futuras neuronas corticales. Las CGR se dividen asimétricamente para dar lugar a neuronas. La formación de la neocorteza sigue un proceso de “dentro hacia fuera”, generándose primero la lámina más profunda (L6) a E13.5, continuando hacia fuera hasta E15.5. En este proceso, las neuronas inmaduras se generan en la ZSV y, gracias a las proyecciones de las CGR, migran ocupando cada lámina de forma secuencial. Es a E18.5 cuando las CGR se dividen para formar células gliales como astrocitos (B). (CGR: célula glía radial, L: lámina, PI: progenitor intermedio, PP: preplaca, SP: subplaca, ZV: zona ventricular, ZSV: zona subventricular).

Un aspecto destacable de la estrategia biológica utilizada en la neurogénesis cortical es que, evolutivamente, ha permitido la expansión de las láminas corticales, aumentando el grosor de la corteza y la complejidad de sus circuitos (Hill and Walsh, 2005), hasta alcanzar funciones cognitivas superiores.

Organización de la neocorteza: áreas sensoriales y circuitos intracorticales

La neocorteza presenta diferencias a lo largo de toda su estructura en cuanto a la disposición de sus láminas o la densidad celular, por lo que pueden distinguirse diferentes áreas anatómicas (Caviness and Frost, 1980; Amunts and Zilles, 2015). Estas áreas anatómicas representan, además, las diferentes áreas funcionales de la corteza que procesan la información sensorial, motora y asociativa de orden superior (Elston, 2003; Watson *et al.*, 2012). Dependiendo del tipo de información y del nivel de procesamiento de la misma, en el ratón se distinguen áreas primarias y secundarias. Las áreas primarias o de primer orden son las encargadas de procesar la información visual, somatosensorial, auditiva o motora; mientras que las áreas secundarias o de orden superior procesan información de tipo y orígenes distintos y, además, son las encargadas de elevar el nivel de procesamiento de esta información (Krubitzer, 1995; Wise *et al.*, 1997; O'Leary *et al.*, 2007). Las áreas asociativas son, por definición, de orden superior o secundario.

El procesamiento de la información en las áreas corticales se ejecuta a través de lo que se conocen como módulos corticales. Estos módulos son circuitos básicos en forma de columna que se consideran la unidad básica de computación cortical (DeFelipe *et al.*, 2002; Amorim Da Costa and Martin, 2010). Estudios funcionales describieron estas unidades en el sistema visual (Hubel and Wiesel, 1962) y somatosensorial (SS) (Mountcastle, 1957), siendo concretamente la corteza de barriles del área somatosensorial primaria (S1CB) un modelo ejemplar de circuito y procesamiento cortical (Lefort *et al.*, 2009). En esta región, los axones procedentes del tálamo transmiten la información sensorial procedente de los bigotes del ratón hacia las neuronas de la L4. La información procedente de cada bigote se procesa de forma individual gracias a que, estructuralmente, los axones talamo-corticales inervan, preferencialmente, a diferentes grupos de neuronas corticales de la L4, creando estructuras conocidas como barriles. De esta manera, cada bigote del ratón posee su representación topográfica y funcional en la L4 de la neocorteza (Petersen and Sakmann, 2000; Jabaudon *et al.*, 2012; Sermet *et al.*, 2019). En este ascenso de información, las neuronas de la L4 conectan con neuronas de la L2/3 de la misma columna y, éstas, integran la información entre bigotes conectándose con neuronas de su misma lámina pero

de otras columnas (Holmgren *et al.*, 2003; Lefort *et al.*, 2009). La L2/3, además, envía la información hacia la L5. Por otro lado, la L6 y la L4 forman un bucle de información que de nuevo conecta con el tálamo (Briggs, 2010; Feldmeyer *et al.*, 2013; Rodríguez-Tornos *et al.*, 2013). De esta manera se organiza el circuito intracortical dentro de la neocorteza pero, además, las NP de cada lámina emiten sus axones hacia diferentes territorios dentro y fuera de la corteza, conociéndose éstas como neuronas de proyección (NPr). Estas neuronas pueden ser: asociativas (o de proyección intracortical local), interhemisféricas (que conectan ambos hemisferios) o corticofugales (que emiten su axón hacia territorios subcorticales o subcerebrales) (Molyneaux *et al.*, 2007). La presente tesis se centra en el estudio de la especificación y diferenciación de las neuronas interhemisféricas (L2/3) y locales (L4) localizadas en el módulo superior de la neocorteza.

CONECTIVIDAD INTERHEMISFÉRICA

La correcta comunicación entre los dos hemisferios cerebrales es fundamental para elevar el nivel de procesamiento de la información (Denenberg, 1981). Cada hemisferio cerebral procesa la información sensorial de forma unilateral, por lo que existe una marcada lateralización. En la lateralización del cerebro, resulta fundamental la comunicación entre ambos hemisferios para procesar e integrar la información que recibe cada uno, elevando así el nivel de procesamiento. Dicha comunicación se realiza a través de tractos interhemisféricos formados por neuronas de proyección interhemisférica (NPri), que permiten un procesamiento bilateral de la información. Estas neuronas emiten sus axones hacia el hemisferio opuesto a través de las conocidas como comisuras cerebrales, conectando con territorios contralaterales. Entre las comisuras cerebrales, se distinguen: la comisura anterior, la comisura hipocampal y el cuerpo calloso (CC) (Suarez *et al.*, 2014). Estas comisuras se diferencian por las regiones que conectan, así como por su tamaño y complejidad. Aunque evolutivamente, una vez establecida la conectividad interhemisférica, el siguiente paso pareció ser el establecimiento de especializaciones en cada hemisferio. En muchos organismos se ha podido demostrar la existencia de asimetría cerebral que resulta en la especialización de un hemisferio en desarrollar y ejecutar funciones sin requerir la información del otro, lo que se conoce como lateralización (Levy *et al.*, 2019). Históricamente,

se postulaba que esta asimetría era propia sólo de humanos, aunque se han podido observar ejemplos de asimetría en multitud de organismos (Corballis and Häberling, 2017). Por ejemplo, en ratón, esta asimetría resulta fundamental para el correcto aprendizaje y la formación de memoria a corto y largo plazo (Goto *et al.*, 2010). Recientemente también se ha descrito como la asimetría cerebral, paradójicamente, está más marcada en muchos grupos de primates que en humanos (Neubauer *et al.*, 2020). Aunque la asimetría cerebral es un aspecto de gran interés en el estudio del cerebro, la presente tesis se centra en el aspecto de la bilateralidad. Por este motivo, nuestro objeto de estudio es el mayor tracto interhemisférico del cerebro de los mamíferos, el CC.

CUERPO CALLOSO

El CC es el mayor tracto interhemisférico de los mamíferos y, en estos, representa la principal vía de conectividad interhemisférica (Fame *et al.*, 2011). Este tracto se encarga de comunicar las neocortezas de ambos hemisferios, permitiendo así ejecutar funciones cognitivas complejas, integrar la información sensorial y motora o elaborar pensamientos complejos (Funnell *et al.*, 2000; Hinkley *et al.*, 2012). De esta manera, el CC se encarga de coordinar la información que recibe cada hemisferio cerebral (Karolis *et al.*, 2019). Fallos durante el desarrollo que provocan su ausencia (agénesis total) o malformación (agénesis parcial) se asocian con un gran número de patologías y déficits neurológicos (Paul, 2011).

El CC está formado por neuronas piramidales con proyección callosa (NPC) que emiten sus axones a través de la línea media, invadiendo la placa cortical del hemisferio contralateral y estableciendo conexiones. Estas conexiones pueden ser de carácter homotópico (conexiones entre las mismas áreas funcionales) o de carácter heterotópico (conexiones entre áreas funcionales diferentes) (Wise and Jones, 1976; Miller and Vogt, 1984; Fenlon *et al.*, 2017; De León Reyes *et al.*, 2020). En ratón, el CC adulto está formado fundamentalmente por neuronas de la L2/3, L5 y L6. La L4 establece muy pocas conexiones interhemisféricas, siendo neuronas de conexión local (Molyneaux *et al.*, 2007; Fame *et al.*, 2011; Suárez, Gobius, *et al.*, 2014; Fenlon *et al.*, 2017). Las proporciones de neuronas que conforman el CC y su localización a nivel de lámina varían dependiendo del

área funcional (Yorke and Caviness, 1975; Dehay *et al.*, 1986, 1988; Wang *et al.*, 2007).

Desarrollo y formación del Cuerpo Calloso

La formación del CC es un proceso complejo que se divide en diferentes etapas. En primer lugar, es necesaria la presencia de estructuras celulares en línea media que funcionarán como una ruta para el cruce de los axones callosos (Silver *et al.*, 1993; Shu and Richards, 2001; Andrews *et al.*, 2007; Morcom *et al.*, 2021). Gracias a estas estructuras, las neuronas de la corteza cingulada comienzan a proyectar axones hacia la línea media a día embrionario (E) 15, cruzando al otro hemisferio. Estas neuronas se denominan neuronas pioneras y son las primeras en cruzar la línea media. Los axones del cingulado parecen fascicular con otros axones de la corteza, lo que sugiere que podrían ayudar a éstos en su cruce de la línea media (Figura 4A) (Koester and O'Leary, 1994; Rash and Richards, 2001). Después, entre E17 y el día postnatal (P) 3 cruzan los axones del resto de láminas (Figura 4B) (Wang *et al.*, 2007; Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016; De Leon Reyes *et al.*, 2019). En este proceso intervienen numerosas moléculas y receptores de guía axonal expresados en forma de gradientes de concentración que atraen a los axones callosos hacia la línea media, inducen su cruce y los guían en su invasión de la corteza contralateral mediante mecanismos de atracción o repulsión (Bagri *et al.*, 2002; López-Bendito *et al.*, 2007; Unni *et al.*, 2012; Mire *et al.*, 2018). Entre estos factores, se encuentra el receptor Neuropilina-1 (Nrp1) que, a través de la interacción con moléculas de Semaforina 3 (Sema3) interviene en estos procesos (Plachez and Richards, 2005). Una vez los axones han conseguido cruzar, invaden la placa cortical y exploran el territorio contralateral (Figura 4C) (Fenlon and Richards, 2015; Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016). En esta invasión, los axones pueden estabilizar o refinarse, en lugares determinados topográficamente (Mitchell and Macklis, 2005; Curchet *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2014; Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016; Fenlon *et al.*, 2017). La estabilización o el refinamiento de los axones callosos parece depender de la actividad neuronal que registren durante el desarrollo postnatal (Innocenti and Frost, 1979; Koralek *et al.*, 1990; Mizuno *et al.*, 2007; Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016; De Leon Reyes *et al.*, 2019).

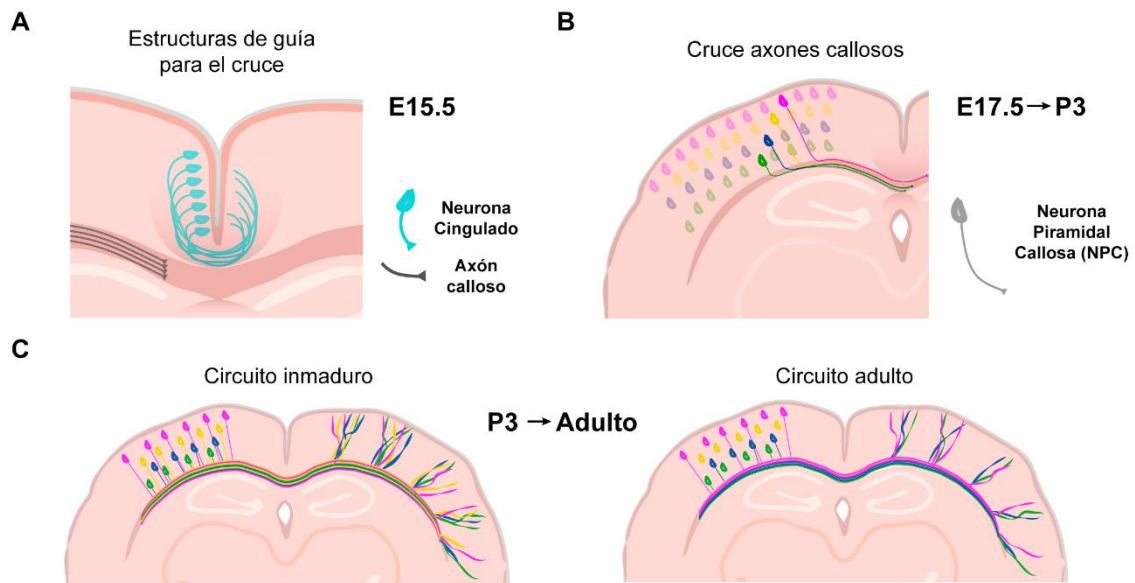


Figura 4: a día embrionario 15.5, los axones de las neuronas de proyección callosa (NPC) están avanzando hacia la línea media, guiados por estructuras y moléculas guía de línea media que intervienen en el proceso del cruce. Una de estas estructuras está formada por axones pioneros pertenecientes a neuronas del cíngulo, que servirán como soporte para el cruce de los axones callosos (A). A partir de E17.5 y hasta P3 los axones de las neuronas piramidales de la corteza se extienden cruzando hacia el hemisferio contralateral (B). A partir de este momento, se produce un fenómeno de exuberancia axonal interhemisférica que, a través de diferentes mecanismos, se refina hasta alcanzar el circuito adulto (C).

Durante el desarrollo postnatal del ratón, este circuito interhemisférico varía en cuanto a la proporción de neuronas corticales que lo constituyen. Numerosos estudios han determinado la existencia de una exuberancia axonal durante la formación del CC (Innocenti *et al.*, 1977; O’Leary *et al.*, 1981; Clarke and Innocenti, 1986; Dehay *et al.*, 1988; C Meissirel *et al.*, 1991; De Leon Reyes *et al.*, 2019) que va esculpiéndose durante el desarrollo gracias a diferentes mecanismos de refinamiento axonal que determinan el circuito interhemisférico final (Figura 4C) (Stanfield *et al.*, 1982; O’Leary, 1987; Aboitiz and Montiel, 2003; Wang *et al.*, 2007; Fenlon and Richards, 2015; Fenlon *et al.*, 2017; De Leon Reyes *et al.*, 2019).

Por otro lado, numerosos trabajos han centrado sus esfuerzos en determinar programas moleculares que puedan estar determinando el destino calloso de las distintas subpoblaciones neuronales. Aunque estos programas aún no se han caracterizado con detalle, sí que se conocen algunos factores de transcripción (FT) esenciales que pueden estar determinando la identidad de proyección muy temprano en la diferenciación neuronal o incluso ya desde el progenitor (Molyneaux *et al.*, 2007). La caracterización de estos FT se ha realizado desde diferentes aproximaciones experimentales como, por ejemplo, intentando alterar la identidad de una lámina con la expresión de factores característicos de otras

láminas. Es el caso de *Fzf2*, cuya sobre-expresión en la L2/3 genera proyecciones ectópicas hacia dianas subcorticales (Rouaux and Arlotta, 2013). La expresión de otro factor, *Tbr1*, en neuronas de la L5 convierte las proyecciones subcerebrales en proyecciones cortico-talámicas (McKenna *et al.*, 2011). Por el contrario, otros factores clásicamente considerados como esenciales, no cumplen por completo este criterio. Por ejemplo, en el trabajo de Leone *et al.* 2015, se determinó que a E18,5 la inactivación del FT *Satb2* en la corteza provocaba una reducción de proyecciones interhemisféricas y un incremento de proyecciones subcorticales, asumiéndose así una reprogramación de neuronas de la L2/3 en neuronas con identidad de láminas inferiores (Leone *et al.*, 2015). Sin embargo, posteriormente se descubrió que inactivando *Satb2* mediante EIU, las neuronas de la L2/3 mantenían sus proyecciones callosas y desarrollaban proyecciones subcorticales, poniendo de manifiesto la complejidad en la toma de decisiones en la adquisición de la identidad de proyección. Esta misma aproximación en neuronas de láminas inferiores provoca una reducción en las proyecciones interhemisféricas de las mismas. Por tanto, *Satb2* regula diferentes programas genéticos de forma laminar- y temporalmente-dependiente (Paolino *et al.*, 2020). Otro ejemplo es el FT *Cux1*, que se expresa de forma natural en el módulo superior y que resulta necesario para que la L2/3 mantenga sus proyecciones callosas a través de la regulación de la expresión de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016), pero este FT también se expresa en neuronas L2/3 locales o neuronas L4, por lo que no determina un destino único calloso en las neuronas que lo expresan. Además, en el caso de la L4, se ha demostrado recientemente que la coordinación entre los factores *Foxg1* y *COUP-TF1* regula la adquisición de conectividad local de esta lámina (Hou *et al.*, 2019).

En definitiva, existen diferentes procesos de selección que determinan el circuito final del CC, pero, en la presente tesis, nos centramos en dos aspectos fundamentales: la topografía de los axones (controlada por gradientes de expresión de determinadas moléculas) y los programas moleculares (determinados por factores de transcripción que controlan la potencialidad callosa de las neuronas corticales).

Topografía de los axones callosos

La correcta topografía de los axones que forman el CC se adquiere durante su formación. Durante este proceso, los mecanismos de guía axonal juegan un papel principal, definiendo las rutas que adquieren los axones callosos con señales de atracción/repulsión. Durante las últimas etapas del desarrollo embrionario y hasta los primeros estadios postnatales del ratón (entre E17-P5), los axones de las láminas corticales comienzan a descender hasta la zona intermedia (que posteriormente será la materia blanca cortical), siguiendo las mismas rutas establecidas por la glía radial durante el desarrollo de la neocorteza. Posteriormente, giran y se orientan hacia la línea media, cruzándola. Tras su cruce, continúan su viaje hacia la base de la placa cortical, ascendiendo de nuevo e invadiendo la corteza contralateral en regiones específicas (Plachez and Richards, 2005). Durante este viaje, múltiples moléculas de guía axonal actúan estableciendo la ruta que estos axones deben seguir hasta alcanzar su punto final. En primer lugar, Sema3A ejerce una señal de repulsión desde la L1, enviando los axones hacia la zona intermedia (Polleux *et al.*, 1998). En este momento, el sistema de Slit2/Robo interviene en la decisión interhemisférica o subcortical de estos axones (Bagri *et al.*, 2002). Además, la señalización mediada por Netrina-1/DCC, modula la señalización de Slit2, permitiendo que los axones callosos invadan la línea media (Fothergill *et al.*, 2014). Una vez alcanzada esta región, los axones son atraídos hacia la línea media gracias a un gradiente de Sema3C expresado en esta región (Niquille *et al.*, 2009) y parecen fascicular con los axones pioneros del cíngulo que ya han cruzado (Rash and Richards, 2001). En este punto, intervienen estructuras gliales y poblaciones neuronales encargadas de generar un entorno de señales idóneo para generar la correcta ruta que los axones callosos deben tomar (Lindwall *et al.*, 2007). Una vez ha ocurrido el cruce, se produce un apagado en la recepción de las señales de atracción hacia la línea media mediado por efrina-B1 y el receptor Nrp1 (Mire *et al.*, 2018), evitando así que los axones queden retenidos y puedan continuar su viaje. Ya en la placa cortical contralateral, los mecanismos que regulan el posicionamiento de los axones en su invasión contralateral aún no están del todo definidos. Se postula que, de nuevo, los axones usan el andamiaje presente de la glía radial para ascender por la placa cortical (Norris and Kalil, 1991; Sehara

et al., 2012). Los axones callosos, tal y como se indicaba anteriormente, ascienden preferencialmente por regiones específicas. Estas regiones pueden ser similares a las regiones dónde se localizan los somas neuronales (homotópicas) (Yorke and Caviness, 1975) o de otras áreas funcionales (heterotópicas) (Mitchell and Macklis, 2005; Suárez, Fenlon, *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado que existe una exuberancia axonal en este punto, de manera que la corteza contralateral es invadida por una gran cantidad de axones que, durante el desarrollo y gracias a diferentes mecanismos, son refinados hasta alcanzar el circuito final (De León Reyes *et al.*, 2020). Este refinamiento se produce mediante la retracción de los axones y no por la muerte de las neuronas corticales, como demostraron los trabajos de O'Leary y Killackey (O'Leary *et al.*, 1981; Chalupa and Killackey, 1989). Los procesos de selección y refinamiento de estas conexiones se relacionan con la actividad neuronal, aunque aún no están completamente desentrañados.

NEUROPILINA-1: ESTRUCTURA, LIGANDOS Y FUNCIONES

El receptor de Nrp1 está implicado en el desarrollo del sistema vascular y del sistema nervioso. Pertenece a la familia de las neuropilinas y suele actuar como co-receptor asociado a otras familias de receptores, principalmente, la familia de las plexinas y de los receptores VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*). Este receptor, en su forma transmembrana, posee 5 dominios extracelulares: dos dominios CUB (a1/a2), dos dominios FV/VIII (b1/b2) y un dominio MAM (c). El dominio transmembrana y, además, un dominio de andamiaje PDZ en su parte intracelular (Pellet-Many *et al.*, 2008). La región de unión a semaforinas comprende los dominios a1, a2 y b1; mientras que los dominios de reconocimiento de VEGF son b1 y b2 (Gu *et al.*, 2002). El dominio MAM tiene la función de posibilitar la oligomerización de Nrp1 (Chen *et al.*, 1998). El dominio PDZ presente le aporta la capacidad de anclarse a PSD-95 y situarse en regiones de andamiaje (como, por ejemplo, en el cono axonal) (Cai and Reed, 1999).

Los ligandos de alta afinidad descritos para Nrp1 son, principalmente, las semaforinas de clase 3 (Sema3) y algunos miembros de la familia VEGF. A través de la unión de estos ligandos y la interacción con sus correspondientes co-receptores, Nrp1 ejerce diferentes funciones durante el desarrollo del sistema

nervioso y vascular (Pellet-Many *et al.*, 2008). En el caso de la presente tesis, el interés está centrado en el papel de este receptor durante la formación del CC.

Papel de Nrp1 en el desarrollo del CC

Existen múltiples moléculas implicadas en guía axonal que intervienen durante la formación del CC. Nrp1 es una de estas moléculas con un papel clave en el desarrollo de este tracto. Cabe señalar que las funciones hasta ahora descritas para este receptor están mayoritariamente asociadas a uno de sus ligandos, las semaforinas de clase 3. Además y, debido a su incapacidad de señalizar intracelularmente, Nrp1 necesita de las Plexinas de clase A para detectar y transducir las señales inducidas por Sema3 (Takahashi *et al.*, 1999; Takahashi and Strittmatter, 2001; Suto *et al.*, 2003). Dentro de las semaforinas de clase 3, Sema3A y Sema3C son las más estudiadas por su papel en el desarrollo del CC, aunque otras variantes también actúan en otros procesos durante el desarrollo cortical (Plachez and Richards, 2005).

Nrp1 actúa desde estadios iniciales de la formación de la neocorteza, influyendo en la migración radial de las neuronas post-mitóticas desde la zona subventricular hacia la superficie pial (Chen *et al.*, 2008). Posteriormente, Nrp1 percibe la señal repulsiva de Sema3A que guía a los axones corticales hacia la zona intermedia (Polleux *et al.*, 1998) para, a continuación, influir en su cruce por la línea media. Se ha demostrado que la señalización inducida por la interacción entre Sema3C y Nrp1 es crucial para que se produzca el cruce de los axones pioneros del cíngulo (Piper *et al.*, 2009). Además, esta interacción también resulta fundamental para el cruce de los propios axones callosos ya que Sema3C funciona como una señal atrayente sobre los axones corticales en desarrollo que expresan Nrp1 (Niquille *et al.*, 2009). De hecho, se han descrito defectos en línea media en mutantes de Nrp1 para el dominio de unión a semaforinas (Gu *et al.*, 2003). Por otro lado, Nrp1 influye en la organización dorso-ventral que adquieren los axones callosos en el tracto. Los axones que provienen de regiones corticales más laterales, se sitúan en posiciones más ventrales, mientras que los axones de neuronas más mediales, se localizan en posiciones dorsales del tracto. Este ordenamiento responde al gradiente de expresión de Nrp1 presente en las láminas superiores de la corteza, siendo mayores los niveles en regiones mediales y decreciendo en zonas laterales (Zhou *et al.*, 2013). El trabajo de Zhou

et al. propone que el gradiente de Sema3A presente en la neocorteza, que es opuesto y complementario al de Nrp1 (Tamamaki *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2011), es responsable de esta organización topográfica de los axones. Además, se ha demostrado que la unión de Sema3A al complejo de Nrp1-PlexinA1 induce el colapso de los conos axonales en crecimiento, produciendo así la repulsión de los mismos (Takahashi *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2014). Sin embargo, estos estudios no investigaban el papel de estos gradientes en etapas posteriores del desarrollo de los axones callosos ni tampoco la influencia que estas repulsiones pudieran tener en la organización de la conectividad callosa dentro de los dominios funcionales de las áreas. Uno de los objetivos que se plantean en la presente tesis es profundizar en el estudio del papel de Nrp1 como determinante de la topografía de los axones callosos en el área somatosensorial (SS), así como evaluar su función en los procesos de refinamiento axonal que ocurren durante el desarrollo postnatal del CC.

IDENTIDAD MOLECULAR DE LAS NEURONAS CORTICALES

Las neuronas corticales presentan una gran diversidad en cuanto a morfología, localización, procedencia o patrones de conectividad. Estas diferencias hacen que puedan clasificarse en base a diferentes criterios. Dentro de las neuronas corticales, las neuronas piramidales presentan ciertas similitudes morfológicas, aunque pueden diferir en su origen a nivel de progenitor o en sus patrones de conectividad. A nivel de lámina, aunque sus funciones puedan ser similares, no existe homogeneidad en las poblaciones neuronales. Es por ello que, dentro del campo, los esfuerzos se están centrando en la identificación de perfiles moleculares concretos que puedan estar determinando la identidad completa de cada subpoblación neuronal.

La diferenciación desde el progenitor hasta la neurona madura se produce gracias a la activación secuencial de diferentes programas regulados por factores de transcripción. Estos programas actúan desde el progenitor hasta el establecimiento del patrón de conectividad cortical (Molyneaux *et al.*, 2007; Fame *et al.*, 2011). Desde las primeras fases de la neurogénesis, comienzan a expresarse diferentes combinaciones de FT que activan la expresión de programas moleculares específicos que regulan diferentes aspectos. Entre ellos,

el tipo de progenie neuronal que generará cada progenitor, la posición de las neuronas postmitóticas a nivel de área o de lámina e, incluso, la región que inervará cada subpoblación neuronal. Por tanto, pueden encontrarse FT específicos de área, de lámina o de proyección.

En las primeras etapas de la corticogénesis, FT como *Emx2*, *Lhx2*, *Pax6* y *Foxg1* activan sus programas para determinar la identidad cortical de los progenitores y la arealización cortical. El papel de estos factores en dichos procesos se ha determinado a través del estudio de mutantes defectivos, observando como la manipulación de la expresión de dichas proteínas afecta a la formación de la neocorteza y a la representación de cada área funcional (Bishop *et al.*, 2000; Bulchand *et al.*, 2001; Mallamaci and Stoykova, 2006; Quinn *et al.*, 2007; Manuel *et al.*, 2010). Existe un segundo grupo de factores que se expresan en etapas posteriores, durante la diferenciación de los progenitores, así como en la neurona postmitótica. Estos son específicos de cada tipo neuronal, de cada lámina o de cada área. Entre estos factores de transcripción se encuentran *Cux1*, *Cux2*, *Satb2*, *Tbr2*, *Ctip2*, y un largo etcétera que aún no está totalmente caracterizado. Es importante destacar que la influencia de estos programas no reside únicamente en su activación, sino también en el momento del desarrollo, la duración o el contexto molecular en el que se produzca (Mérot *et al.*, 2009).

Una vez formada la neocorteza, se han descrito diferentes marcadores moleculares que caracterizan a cada lámina. La expresión en el espacio y en el tiempo de estos FT puede variar, ya que en algunos casos se presentan en toda una lámina o en subpoblaciones específicas de la misma. De dentro a fuera, *Ctip2*, *Fezf2* y *Foxp2* son marcadores de la L5 y L6 (Ferland *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004; Leid *et al.*, 2004). *Rorb* se expresa específicamente en la L4 (Schaeren-Wiemers *et al.*, 1997) y *Cux1*, *Cux2* o *Lhx2* se expresan en el conjunto del módulo superior (Bulchand *et al.*, 2001; Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004). Por otro lado, factores como *Ctip2* (Arlotta *et al.*, 2005) o *Sox5* (Lai *et al.*, 2008) determinan diferentes subpoblaciones de neuronas subcorticales en las láminas inferiores de la corteza (Figura 5).

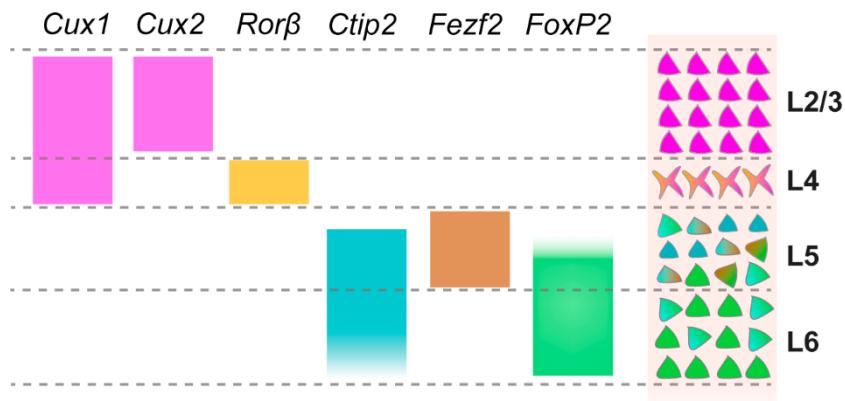


Figura 5: muchos factores de transcripción han sido descritos como identificadores moleculares de subpoblaciones de neuronas corticales. Desde los factores *Cux* para las láminas superiores, *Rorb* para la lámina 4, *Ctip2* y *FoxP2* para las láminas profundas, o *Fezf2* para la lámina 5.

En relación a la identidad molecular de neuronas de proyección interhemisférica, múltiples estudios han centrado su objetivo en identificar los instructores encargados de definir la identidad callosa (Molyneaux *et al.*, 2009, 2015; Lodato and Arlotta, 2015), aunque aún no se han encontrado factores completamente definitorios. Por el momento, se conocen FT que son necesarios para la formación y estabilización de una proyección callosa, pero que individualmente no son determinantes. Entre estos factores se encuentra *Satb2* que, en principio, fue propuesto como un candidato para definir la identidad callosa (C Meissirel *et al.*, 1991; Alcamo *et al.*, 2008). Sin embargo, más tarde se demostró que necesita de la cooperación de *Ctip2* para regular el destino callosa o subcortical de las neuronas de la L5 (Harb *et al.*, 2016). Además, la eliminación selectiva de este factor no compromete la identidad interhemisférica de las neuronas de la L2/3 (Paolino *et al.*, 2020). Otro candidato a posible instructor callosa es *Cux1*. La eliminación selectiva de este factor en neuronas de la L2/3 provoca la pérdida de las proyecciones interhemisféricas, por lo que parece ser necesario para adquirir dicha identidad (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016). Sin embargo, *Cux1* también se expresa en subpoblaciones no callosas de la L2/3, así como en la L4, de identidad intrahemisférica. Por lo tanto, tampoco parece que este FT funcione como un “instructor callosa total”. Esta dualidad en las posibles funciones de *Cux1* controlando el desarrollo del módulo superior de la corteza supone un terreno aún por explorar. Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente tesis reside en ahondar en el conocimiento del papel de *Cux1* en la adquisición de identidad de las neuronas del módulo superior de la neocorteza del ratón.

El factor de transcripción CUX1 y su implicación en corteza cerebral

El FT CUX1 pertenece a la familia de genes *Cux*. Estos genes, altamente conservados en eucariotas, codifican para proteínas de unión al ADN y pertenecen a la familia de FT de homeodominio. En ratón, CUX1 está codificado por 24 exones que, ya sea por diferentes sitios de iniciación o poliadenilación de la transcripción, o por mecanismos de *splicing* (empalme) alternativo, produce distintos ARN mensajeros (ARNm) que codifican para diferentes isoformas (Figura 6A) (Rong Zeng *et al.*, 2000). Además, la región genómica de *Cux1* contiene exones adicionales que codifican para otra proteína, CASP (del inglés, *CUX1 alternatively spliced product*), una proteína de membrana del aparato de Golgi (Figura 6B) (Gillingham *et al.*, 2002). CUX1, en su isoforma completa, es una proteína de unos 200 kDa que contiene cuatro dominios de unión a ADN: homeodominio (donde se localiza la señal de localización nuclear (en inglés, *NLS: nuclear location signal*), y 3 repeticiones CUT. Gracias a estos dominios, Cux1 puede ejercer sus funciones de FT, siendo importado al núcleo y pudiéndose unir al ADN (Figura 6C).

Durante la formación de la neocorteza, CUX1 presenta niveles de expresión muy bajos en los precursores, que se ven incrementados cuando la neurona postmitótica comienza su migración por la glía radial. A partir de este momento, el perfil de expresión se mantiene incluso durante la etapa adulta y se restringe a las neuronas de la L2/3 y L4, en el ratón (Nieto *et al.*, 2004; Weiss and Nieto, 2019). La expresión difiere entre áreas y entre láminas, encontrándose los niveles más altos en la corteza somatosensorial respecto a otras áreas (Nieto *et al.*, 2004). En el telencéfalo dorsal de humanos, *CUX1* se expresa en la mayoría de las neuronas piramidales de las L2-L5 de la corteza y, en subpoblaciones de neuronas piramidales de CA2 y CA3 en hipocampo (Uhlén *et al.*, 2015; Cipriani *et al.*, 2016).

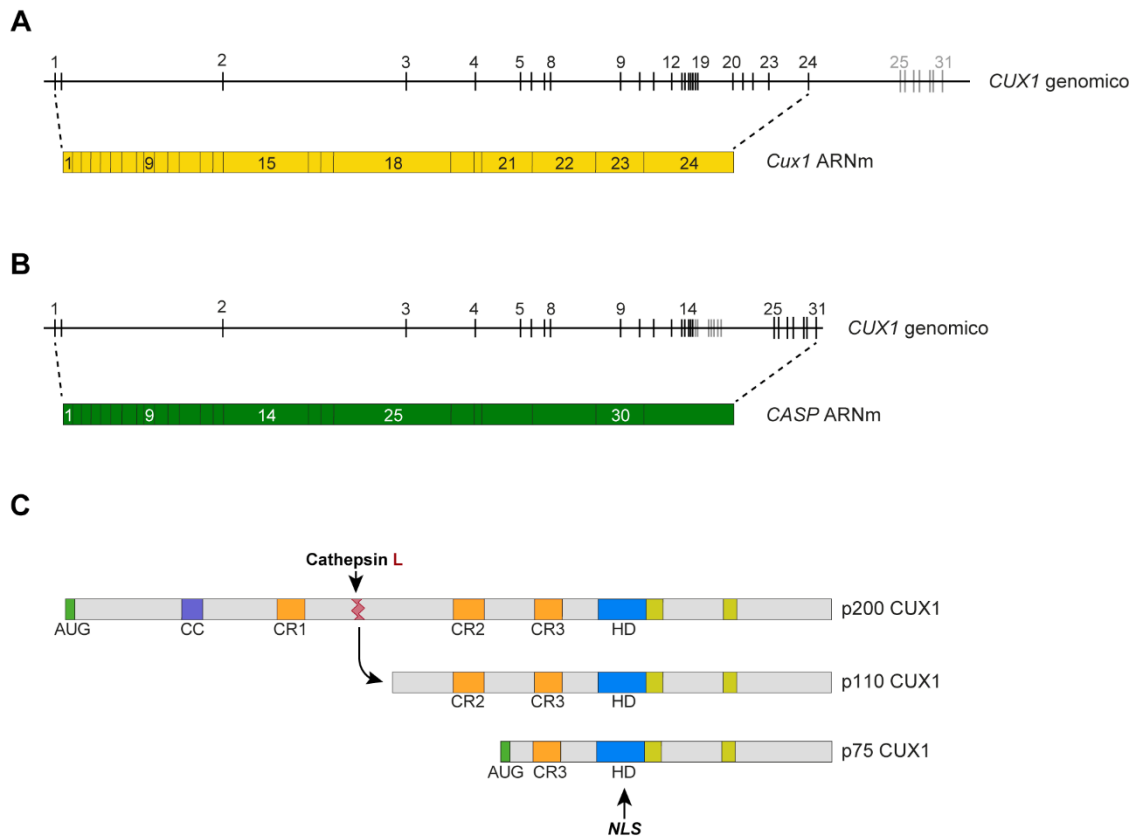


Figura 6: en el genoma del ratón, el factor de transcripción *Cux1* presenta una estructura dividida en 24 exones que son transcritos a un ARNm que se traducirá en la isoforma de mayor peso molecular descrita, p200 CUX1 (A). Por otro lado, y en la misma región compartiendo un gran número de exones, encontramos codificada otra proteína, CASP (B). Diferentes isoformas de *Cux1* han sido descritas, formándose tanto por mecanismos de splicing alternativo, como por procesamiento post-traduccional. p200 CUX1 presenta cuatro dominios de unión a ADN (CR1-3 y HD) y, además, contiene una señal de localización nuclear (NLS) codificada en el exón 23 (C).

La función de *Cux1* durante la neurogénesis aún no es completamente conocida, pero, a nivel post-mitótico, se sabe que junto a *Cux2*, regula el desarrollo de las dendritas y la sinaptogénesis de las neuronas del módulo superior de la corteza. Estas funciones parecen estar relacionadas con la regulación que ejercen sobre las proteínas sinápticas NMDAR2B y PSD95 o sobre los genes *Xlr4b* y *Xlr3b* (Cubelos *et al.*, 2010). También se ha descrito su papel en la estabilización de las proyecciones interhemisféricas de la L2/3, regulando la expresión de receptores de potasio dependientes de voltaje de la familia Kv1. En este trabajo previo del laboratorio, se demostró como la L2/3 pierde la capacidad de mantener sus proyecciones callosas cuando se silencia la expresión de *Cux1*. Estas proyecciones se recuperan cuando se sobre-expresan los receptores Kv1 (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016). Estos datos indican que *Cux1* parece estar relacionado con la capacidad callosa de la L2/3 y que, aunque su sobre-expresión no es suficiente para establecer conexiones interhemisféricas, tiene un papel en la generación de proyecciones callosas (Rodríguez-Tornos *et al.*,

2016). En cuanto a la L4, las posibles funciones de Cux1 tampoco están del todo caracterizadas. Se ha demostrado que, en la corteza somatosensorial de adultos, sus niveles de expresión son superiores a los de la L2/3. Este incremento se relaciona con la entrada de inervación talámica glutamatérgica que esta lámina recibe ya que, en ratones transgénicos que tienen la expresión de *VGLUT2* suprimida en el tálamo, los niveles de expresión de CUX1 en la L4 se ven reducidos y las neuronas mantienen morfología piramidal (Li *et al.*, 2013). Aunque los mecanismos moleculares precisos a través de los cuales Cux1 puede estar influyendo en la identidad de las láminas superiores aún se desconocen, estudios recientes de ATAC-seq predicen que los factores Cux pueden estar reprimiendo FT específicos de láminas inferiores, tales como *Fezf2* o *Sox5*, para mantener la identidad neuronal de la L2/3 y la L4 (Tasic *et al.*, 2016). Por tanto, aún quedan muchas cuestiones abiertas con respecto a la importancia de Cux1 en el mantenimiento de la identidad neuronal del módulo superior.

Modelos de ratón para el estudio de *Cux1*

CUX1 se expresa en diferentes tejidos y se relaciona tanto en la progresión de tumores, como en su supresión ya que tiene un papel fundamental en el ciclo celular (Nepveu, 2001; Hulea and Nepveu, 2012; Ramdzan and Nepveu, 2014). Para el estudio de las funciones de Cux1 en estos procesos, se han desarrollado varios modelos de inactivación (*knock-out*) de *Cux1*. La primera estrategia que se siguió fue desarrollada por el grupo de Neufeld y consistió en eliminar el primer exón que codifica para el primer dominio CUT de CUX1. Esta delección resulta en la expresión de una forma mutada de la proteína que mantiene el extremo C-terminal intacto y tiene una distribución similar al tipo *salvaje* (Tufarelli *et al.*, 1998). Las siguientes estrategias se basaron en eliminar el extremo C-terminal de la proteína, incluyendo el homeodominio. De esta manera, se consiguió que las formas mutadas de la proteína no se localizasen en el núcleo (Ellis *et al.*, 2001; Sinclair *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002). Cuando se mantienen en homocigosis, ambas líneas presentan defectos en el pelaje, en el sistema hematopoyético y en la maduración del epitelio pulmonar que llevan a un porcentaje de letalidad postnatal muy elevado (Ellis *et al.*, 2001; Sinclair *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002; Cubelos *et al.*, 2008). Por tanto, en el contexto del estudio del desarrollo de la neocorteza, evaluar la implicación de Cux1 más allá

de estadios embrionarios usando estos modelos resulta inviable. Por estos motivos, la generación de un modelo *knock-out* similar a los anteriores, que afecte de igual manera al transporte de CUX1 al núcleo, impidiendo sus acciones como FT, pero que sortee la letalidad postnatal, se presenta como uno de los objetivos de la presente tesis.

Generación de líneas transgénicas de ratón y la tecnología CRISPR-Cas9

La tecnología *CRISPR-Cas9* (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* y *CRISPR-associated protein 9*) es un mecanismo de defensa presente, de forma natural en bacterias, contra las infecciones de bacteriófagos y la transferencia de plásmidos (Mojica *et al.*, 2000, 2005; Garneau *et al.*, 2010). Desde su descubrimiento y caracterización, se postuló como la herramienta de edición genética más potente hasta el momento (Hsu *et al.*, 2014). Es por ello que su aplicación en edición genética supuso el premio Nobel de Química 2020 a las doctoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna por su trabajo demostrando el potencial de este sistema (Jinek *et al.*, 2012; Charpentier and Doudna, 2013). En este contexto, *CRISPR-Cas9* se ha empleado en modificaciones genéticas de mamíferos desde el año 2013, cuando se demostró capaz de editar el genoma en células en cultivo (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Desde este momento, el potencial como herramienta para la generación de modelos animales creció exponencialmente, obteniéndose los primeros resultados satisfactorios en este mismo año (Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013), tanto para la generación de *knock-out* como de transgénicos por inserción de secuencias o de genes completos. En el caso de la generación de transgénicos, comenzaron a surgir diferentes aproximaciones experimentales cuyo factor común reside en la facilidad y rapidez del sistema. Para la generación de *knock-out* condicionales, se empleaban secuencias cortas con brazos de homología a la región del corte en combinación con el sistema CRISPR, que eran inyectadas directamente en el cigoto (Bishop *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2013; Miano *et al.*, 2016). Estas estrategias demostraron que la eficiencia en las modificaciones era muy variable y, en muchas ocasiones, con un porcentaje de éxito muy reducido. Además, para la inserción de transgenes, la eficiencia de la inserción es aún menor (Ma *et al.*, 2014; Horii and Hatada, 2016). Posteriormente, y con el objetivo de incrementar la eficiencia de inserción

de secuencias se apostó por modificar células madre embrionarias e implantarlas en embriones (Figura 7A) (Flemr and Bühler, 2015; Oji *et al.*, 2016). Pero esta aproximación hacia el proceso más largo y complejo y, además, resultaba en la obtención de quimeras entre los fundadores. Los últimos avances en el campo se basaron en el trabajo en 2017 de Quadros, R.M. *et al.* denominado *Easi-CRISPR* y que presenta una aproximación más robusta y eficiente de generación de alelos condicionales o inserción de transgenes en ratón. Este trabajo se basa en el uso combinado de la secuencia donante (que contiene la secuencia a insertar deseada y brazos de homología) en forma de ADN de cadena simple (ADNcs) y complejos ribonucleoproteicos (cRNP) de Cas9 (proteína ya ensamblada con los ARN necesarios para su actividad endonucleasa), inyectados directamente en el cigoto (Figura 7B) (Quadros *et al.*, 2017; Miura *et al.*, 2018). Actualmente, se siguen incorporando mejoras en estos procesos relacionadas con la expresión materna de Cas9 (Sakurai *et al.*, 2020) o con la liberación de los cRNP directamente en los oviductos de una hembra gestante (Ohtsuka *et al.*, 2018).

El avance de esta tecnología, su versatilidad y su rapidez ha permitido generar un nuevo modelo de ratón para el estudio del FT CUX1 en el presente trabajo. Gracias a la tecnología *Easi-CRISPR*, hemos generado un *knock-out* condicional de *Cux1* a través de la inserción de secuencias *LoxP* que permiten eliminar de manera selectiva regiones genómicas de interés. Debido a las funciones de CUX1 como FT, la manera más sencilla de evitar su acción es eliminar la secuencia que permite localizar a la proteína en el núcleo. Con esta modificación, y en combinación con otras líneas transgénicas que contienen la CRE recombinasa o con el uso de otras técnicas de modificación genética, se puede conseguir la supresión de las funciones de CUX1 en el tejido de estudio. De esta manera, ampliar el conocimiento sobre las implicaciones de *Cux1* durante el desarrollo de la neocorteza o en el mantenimiento de la identidad neuronal durante la vida del ratón resultará una tarea más sencilla que con las líneas transgénicas existentes hasta el momento.

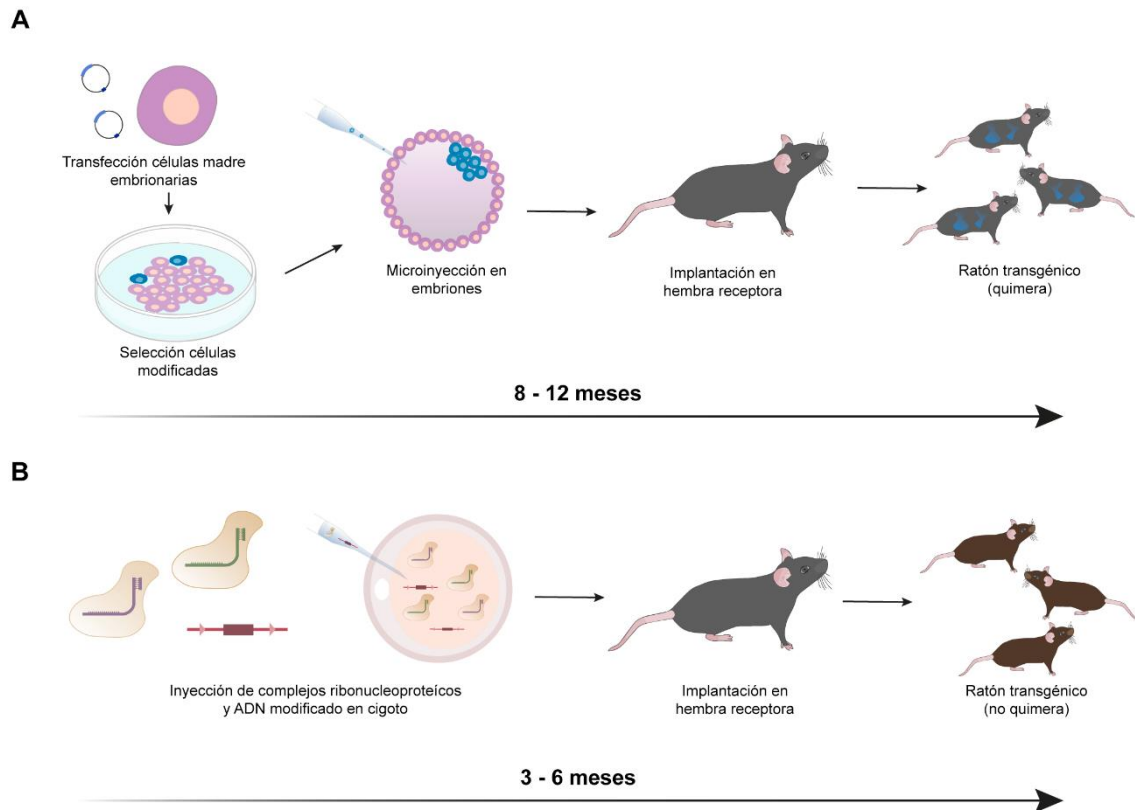


Figura 7: la tecnología tradicional para la generación de líneas transgénicas de ratón está basada en la transfección de células madre embrionarias para generar la modificación deseada en el genoma. Posteriormente, estas células se inyectan en embriones y éstos, son implementados en hembras receptoras. Los ratones generados son, en la mayoría de los casos, quimeras cuya modificación puede estar o no presente en el tejido deseado o en línea germinal. Este proceso necesita de entre 8-12 meses para ser llevado a cabo (A). La tecnología CRISPR-Cas9 ha posibilitado el desarrollo de otras metodologías más rápidas y eficientes. A través de la inyección directa de cRNP y ADN modificado en cigotos, y su posterior implementación en hembras, puede conseguirse la línea modificada. Esta aproximación reduce el tiempo de desarrollo y los animales empleados para ello (B).

RELEVANCIA CLÍNICA DEL DESARROLLO DEL CUERPO CALLOSO

La formación del CC implica numerosos y complejos procesos que han de funcionar con extremada precisión. Es por ello que, si alguno de estos procesos falla, puede resultar en distintas patologías asociadas. El CC puede presentar diferentes alteraciones estructurales que habitualmente aparecen relacionadas con desórdenes neurológicos (Aboitiz and Montiel, 2003; Edwards *et al.*, 2014). Estas alteraciones estructurales pueden tratarse desde la ausencia total del CC o agenesia del CC hasta la ausencia parcial de alguna región o agenesia parcial del CC. También se han descrito trastornos relacionados con el espectro autista, algunas formas de esquizofrenia, desórdenes en funciones superiores como el lenguaje, o falta de ciertas capacidades motrices con fallos en la funcionalidad del CC (Keshavan *et al.*, 2002; Frazier and Hardan, 2009; Paul, 2011). La variedad de patologías asociadas, así como la variabilidad fenotípica entre pacientes, dificultan a clínicos el tratamiento y la predicción del trastorno neuropsiquiátrico asociado. Por otro lado, las causas de estos fallos

estructurales durante el desarrollo del CC son muy diversas, abarcando desde mutaciones genéticas hasta la influencia de diferentes agentes externos durante el embarazo o las primeras etapas de la vida (O'Driscoll *et al.*, 2010; Fitsiori *et al.*, 2011). Por este motivo, desentrañar a nivel molecular los principales actores que regulan y controlan la formación del CC es el reto para contribuir a la mejoría del diagnóstico y el posible tratamiento de estas afecciones e incluso, en un futuro probable, intentar corregir estos defectos. Y, contribuir a este reto, es lo que el trabajo presentado en esta tesis pretende aportar, mostrando nuevos mecanismos controlados por Nrp1 en el desarrollo y establecimiento de conexiones interhemisféricas y generando un nuevo modelo para el estudio de *Cux1*.

Objetivos

OBJETIVOS

Las conexiones interhemisféricas que conforman la mayor comisura cerebral, el Cuerpo Caloso, se generan gracias a mecanismos y procesos complejos, regulados de forma precisa en el tiempo y en el espacio por diversas redes moleculares. Por un lado, mecanismos de guía conducen las proyecciones en su viaje por la corteza cerebral y el refinamiento axonal selecciona las que estabilizarán. Por otro lado, las neuronas de proyección callosa poseen unas redes transcripcionales que determinan la capacidad de forma parte de esta comisura. En este contexto, la molécula de Neuropilina-1 está caracterizada como un factor crucial durante las primeras etapas en la formación del Cuerpo Caloso, aunque no se conocen otras funciones en etapas más avanzadas. Por otro lado, el FT CUX1 se postula como un regulador clave de la identidad molecular de las neuronas del módulo superior de la corteza y, además, esencial para el desarrollo de las conexiones callosas de la L2/3. Sin embargo, el estudio de sus funciones en la corteza plantea un importante reto técnico debido a su expresión ubicua en el organismo.

Este trabajo de investigación responde a los siguientes objetivos:

1. Determinar posibles funciones de Nrp1 en el desarrollo tardío de las proyecciones interhemisféricas de la L2/3.
2. Estudiar los mecanismos por los cuales Nrp1 controla la formación del CC.
3. Comprender la influencia de Nrp1 durante los procesos de refinamiento y la organización topográfica de las conexiones interhemisféricas.
4. Desarrollar un modelo transgénico de ratón para la inactivación condicional de *Cux1*.
5. Analizar los efectos en la expresión de la proteína de Cux1 de la recombinación del alelo *floxeado* de *Cux1*.
6. Estudiar los fenotipos asociados a la inactivación del gen *Cux1* en el desarrollo de las proyecciones callosas de las neuronas de la L2/3.
7. Determinar el papel de CUX1 durante el proceso de maduración de las neuronas de la L4.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de cepas de ratón

En la presente tesis se emplea como modelo animal experimental el ratón común (*Mus musculus*), en concreto, ratones de la cepa salvaje (del inglés, *wild-type*; WT) de los fondos genéticos C57BL6/J (*Jackson Laboratory, JAX. Mice and Services, US. Ref.: #000664*) y B6CBAF1/J (*Jackson Laboratory, JAX. Mice and Services, US. Ref.: #100011*). Además, se emplearon dos cepas transgénicas de ratón.

La cepa *Rorβ-IRES2-Cre-D* (*Jackson Laboratory, JAX. Mice and Services, US. Ref.: 023526*) (en adelante, *Rorβ-CRE*) que presenta una inserción genética en la que la secuencia de la proteína recombinasa *Cre* se inserta, separados por una secuencia IRES (del inglés *Internal Ribosome Entry Site*), tras el gen del FT *Rorβ* (del inglés *RAR related Orphan Receptor beta*). Esta cepa está diseñada para dirigir la expresión de la proteína CRE en las células que expresan el FT *RORβ*, sin alterar el patrón natural de expresión del mismo.

La cepa *Sox2-CRE* (*Jackson Laboratory, JAX. Mice and Services, US. Ref.: 008454*) que presenta una inserción genética en la que la secuencia de la proteína recombinasa *Cre* se encuentra bajo el control del promotor del FT *Sox2* (del inglés *SRY-box containing gene 2*). Esta cepa está diseñada para dirigir la expresión de la proteína CRE en los tejidos donde la proteína *SOX2* se expresa, es decir, desde el día E6.5 en el epiblasto. Esta línea se emplea para la generación de mutaciones condicionales en tejidos derivados de epiblasto cuando se cruza con líneas transgénicas condicionales de ratón.

La línea transgénica generada en la presente tesis, nombrada como *Cux1cKO*, presenta la inserción de dos secuencias *LoxP* que flanquean el exón 23 de la secuencia del FT *CUX1* (modificación que se nombra como *floxeado* o *f* en la presente tesis). En este exón se localiza la secuencia *NLS* (del inglés *Nuclear Localization Sequence*) por lo que, al ser eliminado por acción de la CRE recombinasa, este FT no puede ser transportado al núcleo de la célula.

La línea transgénica $Cux1^{ff/-}$ surge del cruce de ratones homocigotos $Cux1cKO$ ($Cux1^{ff}$) y hemicigotos Sox2-CRE. Esta línea presenta un alelo con la modificación de la línea $Cux1cKO$ y otro alelo con el exón 23 de $Cux1$ eliminado.

Los animales transgénicos que denominamos $Cux1L4KO$ se obtienen a partir del cruce de ratones heterocigotos $Ror\beta-Cre$ y homocigotos $Cux1cKO$ ($Cux1^{ff};Ror\beta-CRE$). En estos animales, la expresión funcional de CUX1 se elimina en aquellas células que expresen el FT ROR β (preferencialmente, las neuronas corticales de L4 y neuronas de algunos núcleos talámicos (Nakagawa and O'Leary, 2003)).

Los animales fueron criados y cuidados bajo las directrices de la Unión Europea (*European Parliament and of the Council 2010/63/EU*). Tales directrices implementan la normativa bajo la cual se realizaron los procedimientos con estos animales, que siguen la normativa 2010/63/EU de la Comisión Europea. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Comité Ético de Experimentación Animal de la Comunidad de Madrid siguiendo la normativa nacional y europea (códigos PROEX: 124/17, 233/16, 234/16, 215/19). Las colonias se mantuvieron en el servicio de animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid, España) bajo condiciones controladas y monitorizadas de temperatura y humedad, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y, con suministro de agua y alimento *ad libitum*.

Genotipaje de líneas transgénicas de ratón

El genotipado de las líneas transgénicas de ratón es una tarea imprescindible para el correcto mantenimiento de las mismas, así como para el desarrollo experimental. Para ello, se emplea la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) con el objetivo de determinar la presencia de las secuencias de interés dentro del genoma del ratón. El ADN genómico se obtiene a partir de una biopsia de oreja o cola empleando un kit de extracción de ADN comercial (*MyTaq Extract-PCR Kit. Bioline*. Ref.: BIO-21127). Las reacciones PCR se realizaron empleando los cebadores diseñados para cada genotipo en particular (Tabla 1) y empleando un kit comercial de PCR (*DNA AmpliTools Master Mix. Biotools. Promega*. Ref.: 10.402-4558). Todos los cebadores empleados fueron obtenidos usando el

servicio de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri). Los programas de amplificación empleados para cada tipo de genotipaje se obtuvieron siguiendo las recomendaciones de *Jackson Laboratory*, en el caso de las líneas comerciales y, para las líneas generadas en la presente tesis, se optimizaron durante el desarrollo de las mismas (Tabla 2). Las reacciones de amplificación se sometieron a una electroforesis (usando como tampón de electroforesis TBE) en gel de agarosa (*GellyPhor. Euroclone, S.p.A. Ref.: EMR010500*) empleando el agente comercial RedSafe (*Ecogen. Ref.: 21141*) como agente intercalante para la visualización del ADN. Los geles resultantes fueron revelados usando un equipo *ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories)*.

Línea	Cebadores
RorB-IRES-2-Cre-D	1 5' - AACTTGCATGGGGAGAAGC - 3'
	2 5' - CCCTCACATTGCCAAAAGAC - 3'
Sox2-Cre	1 5' - CCAGTGCAGTGAAGCAAATC - 3'
	2 5' - TAGTGCCCCATTTTTGAAGG - 3'
Cux1-cKO	1 5' - CTCTGCCAGCAGGGTATTAC - 3'
	2 5' - CTAGATGAACTGATGGCGAGCTCAG - 3'

Tabla 1: secuencias de los cebadores empleados para el genotipaje de las líneas transgénicas de ratón.

Programa PCR para genotipado de las líneas RorB-Cre y Sox2-Cre		
1x	94°C	2'
	94°C	30"
10x	65°C	45"
	$\Delta-0,5^\circ\text{C}/\text{ciclo}$	
	68°C	50"
28x	94°C	15"
	60°C	45"
	72°C	50"
1x	72°C	2'
1x	12°C	∞

Programa PCR para genotipado de la línea Cux1-cKO		
1x	95°C	2'
	95°C	30"
30x	65°C	30"
	72°C	45"
1x	72°C	5'
1x	12°C	∞

Tabla 2: programas de PCR para el genotipado de las líneas transgénicas empleadas.

Generación de línea transgénica de ratón

Diseño *in silico* de la estrategia de modificación genética

Las secuencias empleadas como ARN guía para el sistema CRISPR-Cas9 se diseñaron empleando la herramienta *Breaking-Cas* (Oliveros, J.C., et al., 2016). Se escogieron 4 secuencias candidatas, dos para el corte en el extremo 5' y dos para el corte en el extremo 3' (Tabla 3). El ADNcs donante se diseñó usando como referencia la secuencia consenso de *Cux1* (ENSMUSG00000029705.17) obtenida de la herramienta *web Ensembl* (Cunningham, F. et al., 2019).

ARNcr (<i>crRNA</i>)	Secuencia
5' 1	5' - CATATAGTCTGAGTGTGGTAGGG - 3'
5' 2	5' - TACATACTAAGACCTAGAGTGGG - 3'
3' 1	5' - GTCCATCCCAAGGTCCTATAAGG - 3'
3' 2	5' - CAACCACCTTATAGGACCTTGGG - 3'

Tabla 3: secuencias de ARNcr (en inglés, *crRNA*) diseñados para producir los cortes flanqueantes al exón 23 del gen *Cux1* de ratón (en **negrita**, la secuencia del motivo adyacente de protoespaciador (MAP, en inglés PAM sequence)).

Complejos ribonucleoprotéicos

La estrategia de CRISPR-Cas9 elegida en la presente tesis se basa en la inyección embrionaria de complejos ribonucleoprotéicos. Para ello, se empleó la aproximación comercial de *Integrated DNA Technologies* (IDT) basada en el uso de la proteína Cas9 acomplejada con dos fragmentos de ARN: *tracrRNA* (del inglés *trans-activating crisper RNA. Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA. IDT. Ref.: 1072533*) y *crRNA* (del inglés *crisper RNA. Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA. IDT*). Las secuencias de los *crRNA* fueron diseñadas durante el proceso *in silico*, mientras que la secuencia de *tracrRNA* se encuentra bajo patente. Para el posterior ensayo de eficiencia, se forman dúplex de ARN alineando el *tracrRNA* y el *crRNA* en proporción 2:1 (5 µg *crRNA* y 10 µg *tracrRNA*) con una incubación a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, los dúplex de ARN se acomplejarán con la proteína Cas9 durante la reacción de digestión *in vitro* de comprobación.

Ensayo *in vitro* de la eficiencia de corte de los complejos ribonucleoprotéicos

Para comprobar la eficiencia de corte de las secuencias guía de ARN, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* conocido como *IDA Assay* (Mehravar *et al.*, 2019) (del inglés, *in vitro digestion of DNA assay*). Este ensayo se basa en la incubación de fragmentos de ADN obtenidos por PCR, con los diferentes complejos ribonucleoprotéicos de Cas9. El producto de digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN se obtuvieron empleando cebadores que amplifican un fragmento del extremo 5' del diseño y otro fragmento del extremo 3' (Tabla 4). El ensayo se lleva a cabo empleando una mezcla de reacción compuesta por: 1 µg de los dúplex de ARN, tampón de reacción Cas9 (*IDT*), *Alt-R S.p. Cas9 nuclease* (*IDT*. Ref.: 1081058) y el producto de PCR correspondiente. Esta reacción se lleva a cabo con una incubación a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se inactiva la reacción con una incubación a 65°C durante 10 minutos con la enzima proteinasa K (*ThermoFisher Scientific*. Ref.: EO0491). El producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa (*GellyPhor. Euroclone, S.p.A.* Ref.: EMR010500) usando el compuesto comercial *RedSafe* (*Ecogen*. Ref.: 21141) como agente intercalante para la visualización del resultado de la digestión. Los geles resultantes fueron revelados usando un equipo *ChemiDoc* (*Bio-Rad Laboratories*).

Cebador	Producto PCR	Secuencia
5' FW	901 pb	5' - CTCTGCCAGCAGGGTATTCAC - 3'
5' RV		5' - GTTCACACTGCATGCTTTGGC - 3'
3' FW	848 pb	5' - CGAGGAACTTGCCACACAAC - 3'
3' RV		5' - GTAGGCTTTGGAGGGTGTAGG - 3'

Tabla 4: secuencias de los cebadores empleados para la obtención de fragmentos diana para el ensayo *in vitro* de eficiencia de las guías de corte del diseño CRISPR. Se amplifica un fragmento del intrón 5' al exón 23 y, otro fragmento del intrón 3'. El corte de estos productos de PCR genera fragmentos de diferente tamaño.

Inyección de embriones

La mezcla de ADNcs y complejos ribonucleoprotéicos fueron microinyectados en embriones de ratón por parte del servicio de transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) en embriones en estadio de 8 células. Los

embriones se implantaron en hembras receptoras del fondo genético B6/CBA(F1) para llevar a cabo la gestación de los embriones inyectados.

Genotipado y secuenciación de fundadores

Los animales fundadores (F0) se genotiparon por PCR con diferentes combinaciones de cebadores (Tabla 5) diseñados para comprobar la correcta inserción del ADN modificado y la integridad de este inserto. El programa de PCR usado se recoge en la tabla 2. Posteriormente, para facilitar la secuenciación de la región insertada en el genoma del ratón, se empleó la técnica *TA Cloning* (Holton and Graham, 1991) para clonar fragmentos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de la F1 usando cebadores específicos (Tabla 5) y la polimerasa de alta fidelidad *Expand High Fidelity PCR System* (Roche. Ref.: 11732641001).

Cebador	Secuencia
# 1	5' - CTCTGCCAGCAGGGTATTAC - 3'
# 2	5' - GTGATGGGTATGGCTTCTGCT - 3'
# 3	5' - GTCAGTGACAGTCAGCCTTGT - 3'
# 4	5' - GTAGGCTTTGGAGGGTGTAGG - 3'
# 5	5' - CATATGCCCTACGATATCATAACTTCG - 3'
# 6	5' - CTAGATGAACTGATGGCGAGCTCAG - 3'
# 7	5' - ACGAAGTTATGATATCGTAGGGCA - 3'
# 8	5' - GTCTGAGCTCGCCATCAGTT - 3'

Tabla 5: secuencias de los cebadores empleados para el genotipaje de los fundadores (F0) y de la primera generación (F1) de la línea transgénica *Cux1-cKO*. Las diferentes combinaciones de los mismos permiten comprobar la correcta inserción de la modificación. En **negrita**, los cebadores empleados para la obtención de fragmentos que fueron clonados en el proceso de secuenciación de la F1.

El clonaje de estos fragmentos se realizó con el kit comercial *pGEM-T Easy Vector System* (Promega. Ref.: A1360). Posteriormente, se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5 α (New England Biolabs. Ref.: C2988J) mediante el método de choque térmico. Las bacterias transformadas se crecieron en inóculos usando medio LB (del inglés, *Luria-Bertani broth*) suplementado con ampicilina a 37°C durante 16 horas en agitación. El ADN plasmídico se purificó usando un kit comercial de *miniprep* (Qiagen. Ref.: 27104)

y se cuantificó usando el espectrofotómetro *Nanodrop-1000* (*NanoDrop Technologies*). Los vectores obtenidos tras este clonaje, se secuenciaron usando el servicio de secuenciación *EZ-Seq* ofrecido por la empresa *Macrogen* con los cebadores M13 (secuencias presentes en el vector plasmídico del kit comercial. Tabla 6). Los resultados de secuenciación se analizaron usando el software *Geneious Prime v11.1.5* (*Biomatters, Ltd.*).

Cebador	Secuencia
M13 FW	5' - CTCTGCCAGCAGGGTATTAC - 3'
M13 RV	5' - GTGATGGGTATGGCTTCTGCT - 3'

Tabla 6: secuencias de los cebadores M13. Estas secuencias están situadas en el sitio de clonación del plásmido pGEMT-Easy (empleado para la clonación de productos de PCR del genoma de la F1 de la línea *Cux1-cKO*).

Establecimiento fondo genético en C57BL6'J

Una vez obtenida la F1, se procedió a obtener una línea congénica de *Cux1cKO* sobre el fondo genético C57BL6'J. Para ello, se realizaron cruces sucesivos a partir de la F1 con animales C57BL6'J durante 10 generaciones hasta obtener este fondo genético (Martín Zúñiga *et al.*, 2011).

Electroporación *in utero* de precursores neuronales de la corteza cerebral

La electroporación *in utero* (EIU) es una técnica que se emplea para manipular genéticamente precursores neuronales y, por tanto, su progenie, dentro del cerebro ratón. En la presente tesis, se realiza EIU para la modificación de precursores neuronales de la corteza cerebral del ratón. Durante el procedimiento, el ADN se inyecta en el sistema ventricular del cerebro del embrión para que entre en contacto con los precursores neuronales de la corteza que se localizan en la pared de la ZV (Figura 3). El ADN es incorporado por los precursores en división gracias a la aplicación de pulsos eléctricos sobre la cabeza del embrión. Dependiendo del estadio de desarrollo embrionario y, teniendo como objetivo la corteza cerebral, se puede dirigir la incorporación de ADN a diferentes grupos de precursores que, durante el desarrollo, se localizarán en una lámina específica de la corteza cerebral. Por ello, esta técnica resulta muy útil para el estudio del desarrollo cerebral. Además, y gracias a la posición y polaridad del campo eléctrico aplicado, la incorporación del ADN puede

dirigirse específicamente a áreas funcionales concretas. Gracias a la versatilidad de la técnica, se han podido modificar diferentes grupos neuronales de forma controlada. Para determinar el estadio embrionario (E) en el cual se realizaron las cirugías, se define el día de gestación E 0,5 como el día en el que se observa la aparición de tapón vaginal en las hembras de ratón puestas a cruce. En la presente tesis, se realizaron modificaciones de neuronas de la L4 y de la L2/3 de la corteza del ratón, por lo que las cirugías se realizaron el día E14,5 y el día E15,5, respectivamente. Las hembras gestantes se anestesiaron con isoflurano (*IsoFlo*. Zoetis Inc.) vaporizado en oxígeno. Una vez inducido el plano anestésico, se mantiene la anestesia durante todo el procedimiento que comienza con el rasurado de la zona abdominal y su posterior desinfección con alcohol y povidona yodada. Además, se aplica una solución de carprofeno (*Rymadil*. Zoetis Inc.) intraperitonealmente con el objetivo de mejorar el bienestar del animal durante la etapa post-operatoria. Posteriormente, se realiza una incisión longitudinal en el tejido epitelial y, debajo, una laparotomía (Figura 8A). A continuación, se procede a la extracción de los cuernos uterinos sobre campo quirúrgico previamente humedecido con medio HBSS Mg^{2+}/Ca^{2+} (del inglés, *Hank's Balanced Salt solution*. Gibco. FisherScientific. Ref.: 24020117) suplementado con penicilina/estreptomicina (*Gibco*. FisherScientific. Ref.: 15140122). Esta solución se mantiene a temperatura a 37°C durante la intervención y es empleada para humedecer de forma constante a los embriones. La mezcla de ADN es inyectada en uno de los ventrículos laterales del cerebro empleando micropipetas de vidrio para electroporar únicamente los precursores neuronales situados en uno de los hemisferios cerebrales. Una vez inyectada la mezcla, la cabeza del embrión se somete a la electroporación aplicando 5 pulsos de 50 ms y 36 V para embriones E14,5, y 38 V para los E15,5, situando el polo positivo en el hemisferio inyectado y, el negativo en el contrario (Figura 8B). Para aplicar los pulsos se emplean unas pinzas de electroporar de platino de 5 mm de diámetro (Ref.: CUY650P5. *Sonidel Limited*) y un electroporador ECM 830 (*BTX*. Ref.: 450052). Una vez electroporados todos los embriones, se reintroducen en el abdomen para, posteriormente, suturar el tejido muscular con sutura reabsorbible (*Polysorb Braided absorbable suture 6-0, 0.7 metric*. Covidien TM. Ref.: UL-101) y grapar el tejido epitelial con grapas quirúrgicas de 9mm (*Stoelting*. Ref.: 59027). Tras la intervención, se procede a la reanimación de la

hembra mediante la aplicación de calor. Los embriones electroporados continuaron su desarrollo gestacional y, tras el nacimiento, fueron chequeados para su clasificación según el tamaño y zona de electroporación (Figura 8C). Después de esta clasificación, se dejaron crecer normalmente hasta el estadio de estudio de interés.

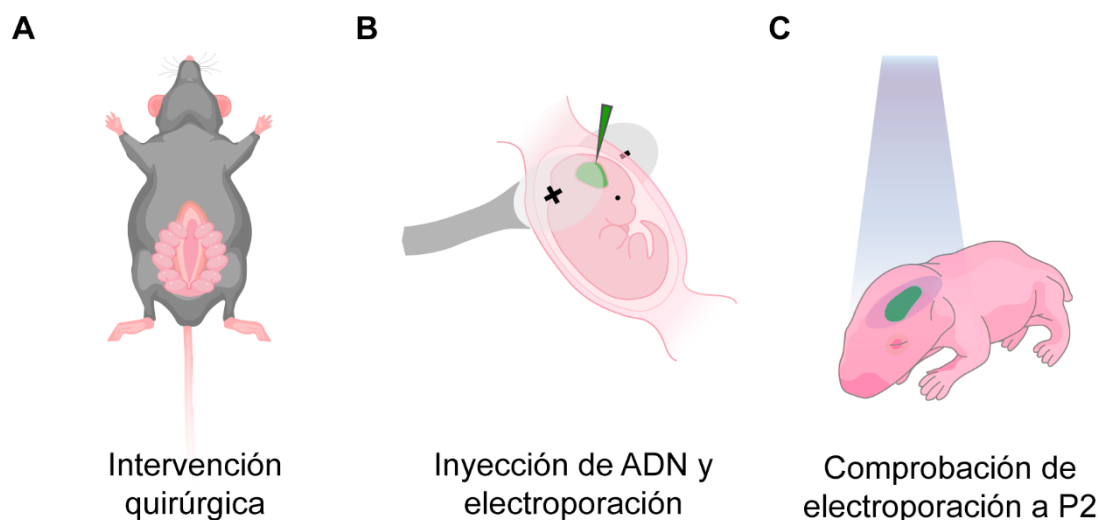


Figura 8: electroporación in utero. En primer lugar (A), se realiza una intervención quirúrgica a una hembra de ratón gestante a día de desarrollo embrionario 14,5 o 15,5, basada en una laparotomía bilateral para exponer los cuernos uterinos. Posteriormente (B), se inyecta la mezcla de ADN en uno de los ventrículos y se aplican pulsos eléctricos con pinzas de electroporación para conseguir la modificación genética deseada en los precursores neuronales. Finalmente (C), y tras la recuperación post-operatoria y el posterior parto, se comprueba la zona y eficiencia de electroporación en ratones a día postnatal (P) 2.

Construcciones de ADN

Los diferentes vectores plasmídicos de ADN fueron electroporados a diferentes concentraciones y en diferentes combinaciones, dependiendo del experimento realizado. Se inyectan en una disolución con el pigmento *Fast Green* al 0,1% (*Sigma-Aldrich*. Ref.: F7252). De esta manera se puede visualizar correctamente la inyección de la mezcla de ADN en el ventrículo cerebral durante la cirugía de la EIU. Los plásmidos empleados durante la presente tesis son:

- pCAG-GFP (*AddGene Plasmids* #111150): este vector contiene la secuencia del gen de la proteína GFP (del inglés, *green fluorescent protein*) bajo la regulación del promotor sintético CAG (Jun-ichi, M. et al. 1989). Este promotor genera altos niveles de expresión de forma constitutiva. La proteína EGFP permite la visualización morfológica de las neuronas modificadas y de sus proyecciones axonales.

- pCAG-DsRed (*Addgene Plasmids #11151*): este vector contiene la secuencia del gen de la proteína DsRed (*Discosoma sp. Red*) bajo el control del promotor CAG. La proteína DsRed permite la visualización morfológica de las neuronas modificadas y de sus proyecciones axonales.
- pCALNL-GFP (*Addgene Plasmids #13770*): este plásmido contiene la secuencia del gen de la proteína GFP *floxeada*, es decir, precedida de una secuencia de recombinación *LoxP-STOP-LoxP*, todo ello bajo el control del promotor CAG. Este plásmido permite la expresión dirigida de GFP a aquellas células que posean la expresión de la recombinasa Cre, que, tras recombinar las secuencias *LoxP*, elimina la señal *STOP*, y permite la expresión de GFP.
- pCALNL-DsRed (*Addgene Plasmids #13769*): este vector contiene la secuencia del gen de la proteína DsRed *floxeada*. Este plásmido permite la expresión dirigida de DsRed a aquellas células que posean la expresión de la recombinasa CRE.
- pCAG-iCre (*Addgene Plasmids #89573*): este vector plasmídico contiene la secuencia del gen de la recombinasa Cre bajo la regulación del promotor CAG. Con este plásmido se consigue la expresión selectiva de esta recombinasa en neuronas electroporadas. Este vector se empleó tanto para generar neuronas *knock-out* de *Cux1*, como para la visualización de neuronas individuales (a concentraciones bajas de 50 ng/μL), en combinación con los plásmidos pCALNL-GFP y pCALNL-DsRed.
- pCAG-Nrp1 (cedido por el Dr. Mu-ming Poo): este vector contiene la secuencia del gen murino del receptor NRP1 cuya expresión está regulada por el promotor CAG. Este vector permite la sobre-expresión de este receptor en las neuronas electroporadas y, por tanto, el estudio de sus implicaciones en el desarrollo neuronal.
- pLKO.1-sh*Nrp1* (*Sigma-Aldrich #TRCN0000029859*): este vector lentiviral contiene una secuencia de ARN de horquillado corto empleado para el silenciamiento de la expresión del gen *Nrp1* en neuronas corticales.
- pLKO.1-sh*Cux1* (*Sigma-Aldrich #TRCN0000070561*): este vector lentiviral contiene una secuencia de ARN de horquillado corto empleado

para el silenciamiento de la expresión del gen *Cux1* en neuronas corticales.

Amplificación y purificación de vectores plasmídicos de ADN

Para el uso de los vectores anteriormente referenciados, estas construcciones se introducen en bacterias competentes DH5 α (*Invitrogen*. Ref.: 18265017) mediante el método de transformación por choque térmico. Posteriormente, estas bacterias transformadas se crecen en medio LB suplementado con los antibióticos concretos con los que los plásmidos confieren resistencia a las bacterias transformadas (ampicilina o kanamicina). La extracción de los plásmidos se realizó mediante el kit comercial de purificación de plásmidos de ADN *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (*Qiagen*. Ref.: 12163). Tras la purificación, la integridad de los plásmidos se comprobó mediante ensayo de restricción y electroforesis en gel de agarosa. La cantidad se analizó mediante espectrofotometría de UV empleando un *Nanodrop* (*NanoDrop Technologies ND-1000*).

Marcaje retrógrado de neuronas interhemisféricas

Una de las técnicas más ampliamente empleadas para la caracterización de diferentes tipos de neuronas de proyección es el uso de trazadores retrógrados a través del axón. Existen distintos tipos de trazadores que se extienden desde moléculas orgánicas o inorgánicas, proteínas recombinantes o el uso de virus modificados. Todos estos marcadores hacen uso de los mecanismos endógenos de transporte retrógrado presentes en el axón neuronal. De este modo, pueden trazarse los puntos dónde determinados grupos de neuronas proyectan su axón. Cuando se inyecta alguno de estos marcadores en una zona concreta del cerebro, el soma de las neuronas cuyo axón se localice en tal zona quedará marcado. En la presente tesis, para el análisis de neuronas de proyección interhemisférica, se empleó la técnica de marcaje retrógrado basada en la inyección estereotáxica de la molécula recombinante CTB (del inglés, *Cholera Toxin subunit B*) conjugada con el fluoróforo Alexa-555 (*ThermoFisher Scientific*. Ref.: C-34776).

Inyecciones estereotáxicas de CTB

En la presente tesis, para determinar las proporciones de neuronas interhemisféricas que conforman el CC y la topografía de las columnas axonales del área somatosensorial en las condiciones experimentales analizadas, se realizaron cirugías estereotáxicas para inyectar CTB-555. Se empleó un aparato esterotáxico (*Harvard Apparatus*) para determinar con precisión el punto de inyección del marcador. La inyección se realizó con un sistema de nano-inyección hidráulica (*Nanoject II Auto-Nanoliter Injector. Drummond Scientific Co.*) utilizando micropipetas de vidrio de 30 mm y aceite mineral de inyección (*Sigma-Aldrich. Ref.: M8410*). Las coordenadas, volúmenes y velocidades de inyección para cada tipo de experimento se detallan en la tabla 7.

Tipo de inyección	Estadío	Coordenada	Volumen CTB	Velocidad
Cuerpo Caloso	P14	18°; AP -1,4; ML +0,7; DV +1,8	460 nL	23 nL/s
	P28	18°; AP -1,4; ML +0,7; DV +1,9-2,0	575 nL	23 nL/s
Columna S1/S2	P28	0°; AP -1,34; ML +3,7; DV +0,4-0,5	100 nL	4 nL/s
Columna S2	P28	0°; AP -1,34; L +3,7; DV +0,7-0,8	100 nL	4 nL/s

Tabla 7: coordenadas, volúmenes y velocidades de inyección de CTB empleados en las cirugías estereotáxicas. Todas las coordenadas están expresadas en mm y usan como referencia Bregma.

En primer lugar, y tras inducir el plano anestésico profundo en el ratón, se procede a inmovilizar la cabeza del mismo en el aparato estereotáxico. Tras ello, se rasura y desinfecta la parte dorsal de la cabeza para realizar una incisión longitudinal y separar la piel del cráneo. Una vez descubierto el cráneo, se procede a localizar y marcar la referencia estereotáxica *Bregma* (lugar donde la sutura craneal coronal interseca perpendicularmente con la sutura longitudinal). Una vez marcada, se marca la coordenada del sitio de inyección para proceder con una pequeña perforación del cráneo evitando dañar la superficie pial. Tras exponer el cerebro, se procede a la inyección controlada del marcador retrógrado. Una vez inyectado el volumen deseado, se mantiene el capilar introducido en el cerebro para evitar la escapada del volumen inyectado por difusión. Tras la retirada del capilar, se sutura la piel empleando grapas quirúrgicas de 9 mm (*Stoelting. Ref.: 59027*) y se retiran de la anestesia, para ser recuperados de la anestesia a través de la aplicación de calor.

Histología e inmunofluorescencia

Histología

Para la obtención del tejido de estudio en la presente tesis, en el día postnatal objeto de estudio, los ratones fueron perfundidos intra-pericardialmente con la solución de fijación formalina (*Formalin solution, neutral buffered, 10%. Sigma-Aldrich*. Ref.: HT501128-4L) a 4°C. Para esta intervención, los animales fueron debidamente anestesiados con una solución en PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*) de xilacina (*Xilagesic 20mg/mL. Laboratorios Calier*) y ketamina (*Imalgene 100mg/mL. Merial Laboratorios*) administrada intraperitonealmente a una dosis de 10mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Una vez extraídos los cerebros, estos se mantuvieron durante 12 horas en la solución de formalina a 4°C. Posteriormente, se someten a una incubación de 48 horas para su crioprotección en una solución de sacarosa (*Sucrose for molecular biology, ≥99.5% (GC). Merck*. Ref.: S0389-500G) al 30% en PBS. Una vez crioprotectados, se congelaron en medio *Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Products*. Ref.: 4583). Para el procesamiento histológico, se realizaron secciones coronales flotantes del tejido en un Criostato CM1950 (*Leica Biosystems*), de 50 µm de grosor.

Inmunofluorescencia

Para la visualización de las diferentes proteínas de estudio, las secciones flotantes se someten a un protocolo de inmunofluorescencia adaptado a cada combinación de anticuerpos (Tabla 8). La incubación con anticuerpos primarios y secundarios se realizó en soluciones de bloqueo y permeabilización compuestas por PBS suplementado con FBS (del inglés, *Fetal Bovine Serum. Sigma-Aldrich*. Ref.: F2442) al 5% o BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*. Ref.: A2058) al 3%, en y TritónX100 (*Sigma-Aldrich*. Ref.: X100) al 0,5% o 1%, en agitación. Tras la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, las secciones se lavaron 3 veces con una solución de PBS-Tx. Todas las inmunofluorescencias finalizan con la tinción nuclear empleando el compuesto DAPI (4', 6-diamidino-2phenylindole. *Sigma-Aldrich*. Ref.: #D9542). Por último, las secciones se montaron en portaobjetos de 76x26 mm (ThermoScientific: 12184682) con medio de montaje acuoso (*Aqua-Poly/mount. Polysciences, Inc.*

Ref.: 18606) y cubiertos con cubreobjetos de 24x60 mm (ThermoScientific. Ref.: 11778691).

Información de los protocolos de inmunofluorescencia						
Anticuerpo primario	Referencia comercial	Tipo	Dilución	Solución de incubación	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
Anti-GFP	<i>Life-Technologies</i> Ref.: A11122	Policlonal de conejo	1:500	PBS-Tx 0,5% + FBS 5%	16 horas	4°C
Anti-Cux1	<i>SantaCruz Biotechnology</i> Ref.: sc-13024 X	Policlonal de conejo	1:500	PBS-Tx 0,5% + FBS 5%	16 horas	T ^a A
Anti-RorB	<i>Perseus Proteomics</i> Ref.: PP-H3925-00	Monoclonal de ratón	1:300	PBS-Tx 1% + BSA 3%	48 horas	4°C
Anti-VGlut2	<i>Merck Millipore</i> Ref.: AB2251	Policlonal de cobaya	1:1000	PBS-Tx 1% + FBS 5%	48 horas	4°C
Anti-Nrp1	<i>R&D Systems</i> Ref.: AF566-SP	Policlonal de cabra	1:100	PBS-Tx 1% + FBS 5%	48 horas	4°C
Anticuerpo secundario	Referencia comercial	Tipo	Dilución	Solución de incubación	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
Anti-conejo 488	<i>ThermoFisher Scientific</i> Ref.: A11034	Policlonal de cabra	1:500	*Misma solución que el Ac primario	1 hora	T ^a A
Anti-cabra 488	<i>ThermoFisher Scientific</i> Ref.: A11055	Policlonal de burro	1:500	*Misma solución que el Ac primario	1 hora	T ^a A
Anti-conejo 647	<i>ThermoFisher Scientific</i> Ref.: A21245	Policlonal de cabra	1:500	*Misma solución que el Ac primario	1 hora	T ^a A
Anti-ratón 647	<i>ThermoFisher Scientific</i> Ref.: A21236	Policlonal de cabra	1:500	*Misma solución que el Ac primario	1 hora	T ^a A
Anti-cobaya 647	<i>Life-Technologies</i> Ref.: A21450	Policlonal de cabra	1:500	*Misma solución que el Ac primario	1 hora	T ^a A

Tabla 8: anticuerpos empleados en inmunofluorescencia. Los anticuerpos secundarios tienen acoplado el fluoróforo Alexa en sus variantes 488 y 647. (T^aA: temperatura ambiente).

Algunas de las proteínas de estudio necesitan de un protocolo de exposición de epítopos mediante la aplicación de calor (en inglés, *Heat-Induced epitope retrieval; HIER*) previo al protocolo de inmunofluorescencia. Este protocolo comienza colocando el tejido en una solución de citrato pH 6,1 (*Sigma-Aldrich*. Ref.: C9999) y sometiéndolo a un ciclo de calor de 110°C durante 1 minuto en una olla a presión de laboratorio (*Biocare Medical*. Ref: DC2012).

Microscopía Confocal

Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes de inmunofluorescencia fue realizada empleando el microscopio TCS-SP5 (*Leica-Microsystems*). Para el análisis global de la arquitectura cortical, se realizaron mosaicos de fotos (en inglés: *tile-scan*)

empleando un objetivo 10x y resolución de 512x512 píxeles (px), dónde se consigue la adquisición de cortes coronales completos. Estas fotos, de manera individual, se adquieren en diferentes planos confocales distribuidos cada 5 μm (unos 8-10 planos que abarcan el total de 50 μm del corte histológico). Para el análisis de fluorescencia, la adquisición del mosaico se restringe al hemisferio de interés, empleando también el objetivo de 20x, resolución de 512x512 px pero, en este caso, se toman planos confocales empleando secciones ópticas de 3,5 μm . Los mosaicos se reconstruyeron usando el software LAS-X (*Leica-Microsystems*). La cuantificación de las poblaciones neuronales CTB⁺GFP⁺ se realizó sobre imágenes adquiridas con magnificación 20x, resolución de 1024x1024 px, zoom de 2x y secciones ópticas de 3,5 μm del área cortical de interés. La cuantificación de la localización subcelular de proteínas se realizó sobre imágenes obtenidas con el objetivo de 100x, resolución 1024x1024 px y sección óptica de 0,5 μm .

Análisis de imagen

El análisis de fluorescencia de las poblaciones neuronales electroporadas se realizó sobre mosaicos independientes del hemisferio ipsilateral electroporado y del contralateral. Para la adquisición, se ajustaron los parámetros de intensidad de láser y ganancia a valores en los que se eliminara la señal de fondo y existiera un equilibrio entre la máxima y mínima intensidad de señal, evitando puntos de saturación. Estos ajustes permiten la correcta visualización de las estructuras neuronales (somas, dendritas y axón) en todos los planos confocales. Una vez obtenidos y reconstruidos los mosaicos, estos se someten a una proyección máxima de todos los planos, obteniendo una imagen donde existe linealidad en la señal de fluorescencia y que permite su posterior cuantificación. La cuantificación se realizó usando *Fiji-ImageJ* (Schindelin *et al.*, 2012), ajustando los límites de señal con el objetivo de eliminar al máximo el fondo. Una vez ajustado el umbral de señal, la imagen se convierte a un formato binario y se midió la señal recogida en la región de interés (RDI. En inglés, *ROI*) del análisis. Los valores de fluorescencia de los axones se relativizaron a la intensidad de fluorescencia del área ipsilateral electroporada o de otras áreas contralaterales de interés.

El análisis del perfil de señal del CC en la línea media se realizó sobre la proyección máxima del mosaico adquirido en esta zona. En este caso, usando *Fiji-ImageJ*, se delimitó una RDI que abarcara toda la longitud del tracto y se empleó la herramienta *Plot profile* de *Fiji* para representar el perfil de fluorescencia (Figura 9).

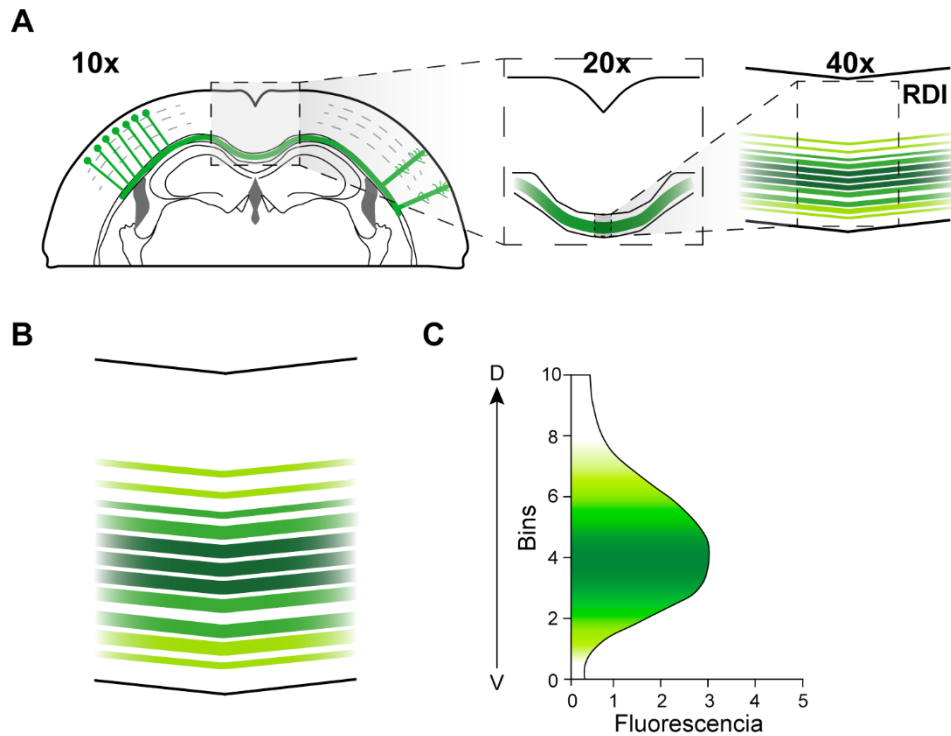


Figura 9: cuantificación del CC en línea media. (A) En una sección coronal (10x aumentos) de un cerebro electroporado en el área somatosensorial a día E15,5, se elige una región de interés (RDI) en el punto central de la línea media (20x), (B) analizándose con detalle la disposición y grado de fasciculación de los axones (40x). (C) Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia a lo largo de la distancia dorso-ventral del CC.

La cuantificación de poblaciones neuronales marcadas con CTB se realizó eligiendo manualmente y al azar, neuronas GFP⁺ o núcleos DAPI⁺, en los diferentes planos confocales obtenidos, estableciendo proporciones de neuronas CTB⁺ sobre la población de referencia elegida en caso (GFP⁺, GFP⁻ o DAPI⁺). Las cuantificaciones se realizaron distinguiendo entre lámina cortical y área funcional, empleando como marcador estructural la población de núcleos teñidos con DAPI y con la ayuda del atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2004).

Análisis estadístico

Todos los análisis de la presente tesis se realizaron con un mínimo de tres réplicas biológicas (3 ratones), analizando dos secciones por cerebro. Se

excluyeron del análisis aquellos animales en los que el proceso de EIU o las inyecciones de CTB no fueron exitosos. El procesamiento y almacenamiento de todos los datos obtenidos se realizó empleando el software Excel (*Microsoft Office*) y su análisis estadístico con *Graphpad Prism 8 (GraphPad Software)*. La representación de los datos se realizó con la media de la muestra y el error estándar de la media (EEM). Los resultados se compararon empleando diferentes métodos estadísticos, dependiendo de la naturaleza del experimento y de las variables a comparar. En resumen, se empleó el análisis de la varianza (ANOVA, del inglés *Analysis of variance*) de una o dos vías para comparar entre tres o más grupos de datos. Para la comparación de dos grupos, se empleó el test T de Student. Cada grupo estadístico se determinó en base a la modificación genética derivada de la electroporación, el genotipo, el área funcional, la lámina cerebral o el estadio postnatal analizado.

Resultados

RESULTADOS

Papel del receptor Neuropilina-1 en la formación del Cuerpo Caloso

Los niveles de expresión de Nrp1 determinan el patrón de innervación contralateral del área somatosensorial

El receptor de Nrp1 se expresa en forma de gradiente medio-lateral en las láminas superiores de la corteza cerebral del ratón (Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Muche *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta este patrón de expresión, para investigar si Nrp1 determina el mapa de conexiones interhemisféricas, decidimos alterar este gradiente. Para ello, realizamos electroporación *in utero* a día E15,5 en hembras gestantes de ratón con el objetivo de alterar los niveles de expresión de Nrp1 en las neuronas de la L2/3. Para ello, empleamos diferentes vectores plasmídicos: un vector para silenciar la expresión de Nrp1 que porta una secuencia de ARN de horquillado corto (de aquí en adelante, shNrp1), otro para inducir la sobre-expresión de Nrp1 con un promotor ubicuo (CAG-Nrp1) y, en combinación con los anteriores, un vector para visualizar la morfología de las neuronas electroporadas gracias a la proteína fluorescente GFP (CAG-GFP) (Figura 10A). Las electroporaciones se realizaron dirigiendo la polaridad del campo eléctrico hacia la región que formará el área SS. Se eligió esta área porque el desarrollo y la topografía final de los axones del CC está ampliamente caracterizada. La corteza SS en el ratón está dividida en dos áreas funcionales conocidas como: área somatosensorial primaria (S1) y somatosensorial secundaria (S2). Estas áreas se diferencian anatómicamente y funcionalmente ya que, por un lado, S1 contiene la corteza de barriles y recibe información sensorial de núcleos talámicos de primer orden, mientras que S2 es un área asociativa que recibe información de núcleos talámicos de orden superior (Rakic, 1988b; Watson, 2012). Los animales con el área SS electroporada, se dejaron crecer hasta día P30, momento en el que es considerado que los circuitos corticales han alcanzado un desarrollo maduro, muy similar al de adulto. Sobre secciones coronales que contienen el área SS, se realizaron los análisis de innervación contralateral, distinguiendo S1 gracias a la alta densidad de núcleos presentes en la L4 de la corteza de barriles y, el área S2, en la región más lateral (Figura 10B) (Paxinos and Franklin, 2004).

En primer lugar, estudiamos el fenotipo de invasión contralateral de secciones coronales de cerebros electroporados con CAG-GFP, usados como control de fenotipo *salvaje*. Estos cerebros presentaron proyecciones callosas procedentes de neuronas iluminadas en verde (de aquí en adelante, GFP⁺) de la L2/3 del hemisferio electroporado (o ipsilateral) en el otro hemisferio (no electroporado o contralateral). Estas proyecciones reprodujeron los fenotipos descritos para el área SS (Courchet *et al.*, 2013; Suárez, Fenlon, *et al.*, 2014), que describen la formación de dos principales columnas axonales que ascienden de forma tangencial desde la materia blanca hacia la pía. Estas columnas se sitúan en el borde entre S1 y S2 (columna S1/S2) y en el borde entre S2 y el área auditiva (columna S2) (Figura 10A-C) (Allen Institute for Brain Science, 2021). La columna S1/S2 se ramifica de forma pronunciada en la L5 y L2/3, mientras que la columna S2 presenta estas ramificaciones, sobre todo, en la L2/3 (Figura 10C). Analizando *de visu* el fenotipo de las neuronas silenciadas, no observamos grandes cambios en el

patrón de invasión contralateral con respecto al fenotipo *salvaje* (Figura 10D). En el caso de la sobre-expresión, sí observamos dos principales alteraciones morfológicas: por un lado, un incremento de invasión

deslocalizada en el área S1 y, por otro, una visible reducción de axones en la columna S2 (Figura 10E).

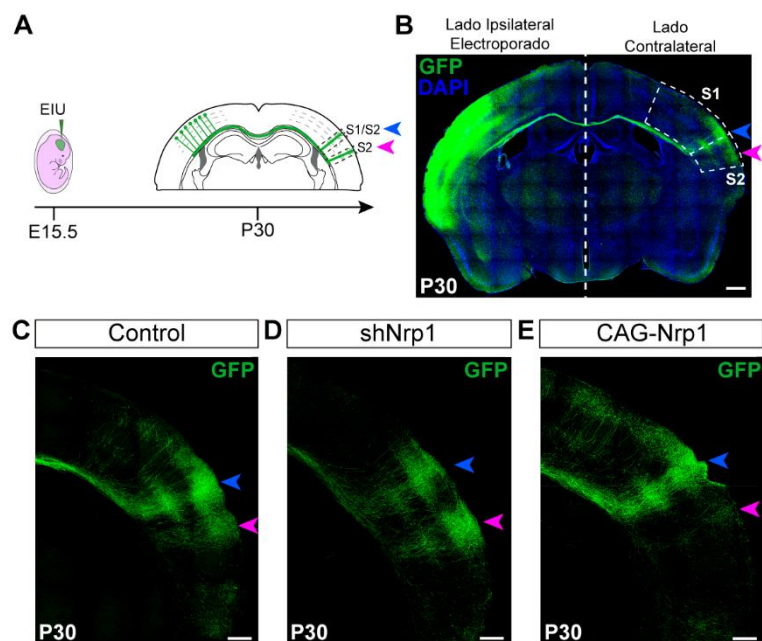


Figura 10: análisis de la distribución contralateral de los axones callosos tras la modificación de los niveles de expresión de *Nrp1*. (A) Esquema de la aproximación experimental. En el hemisferio contralateral, los axones de la L2/3 forman dos columnas: columna S1/S2 (flecha azul) y columna S2 (flecha magenta). (B) Sección coronal de un cerebro control P30 electroporado a E15.5 con CAG-GFP. La corteza SS está dividida en dos áreas funcionales: área SS primaria (S1) y área SS secundaria (S2). GFP = verde, DAPI = azul. Escala = 500 μ m. (C-E) Magnificaciones de hemisferios contralaterales de cerebros P30 electroporados donde se muestran axones GFP⁺ formando la columna S1/S2 (flecha azul) y la columna S2 (flecha magenta). Escala = 300 μ m.

Seguidamente, procedimos a cuantificar los fenotipos. Para ello, medimos la densidad de píxeles que ocupan los axones GFP⁺ en regiones anatómicas específicas del área SS. Las regiones de interés (RDI) seleccionadas encuadran las áreas funcionales S1 y S2 y, además, las columnas axonales (columna S1/S2 y columna S2). Para tener en cuenta las posibles diferencias debidas a la eficiencia de la electroporación, los valores de fluorescencia contralateral se normalizaron a la señal que presenta el hemisferio ipsilateral electroporado (para más detalles, consultar sección de *Materiales y Métodos*). En primer lugar, la cuantificación global de la invasión contralateral mostró que no existen diferencias significativas entre las condiciones experimentales, ya que se observaban valores medios y de dispersión similares entre las tres (Figura 11A). En el análisis de las columnas contralaterales, observamos que el silenciamiento de Nrp1 no altera el patrón de la columna S1/S2 (Figura 11B) ni de la columna S2 (Figura 11C). Por otro lado, la sobre-expresión de Nrp1 no produjo cambios significativos en la columna S1/S2 (Figura 11B), pero indujo una reducción significativa de la columna S2 (Figura 11C). El análisis del área S1 mostró que la condición de sobre-expresión produce un incremento de invasión, localizándose axones distribuidos en la corteza de barriles (Figura 11D). Alternativamente a este análisis, realizamos otros análisis basados en la distribución relativa de los axones dentro del hemisferio contralateral (sin tener en cuenta la región ipsilateral electroporada). Con estos análisis, obtuvimos resultados similares a los anteriores, confirmando la reducción de la columna S2 y el aumento de invasión en el área S1 observados en la condición de sobre-expresión (Figura 11E y F). Por último y para descartar esta posibilidad, evaluamos si la reducción observada en la invasión contralateral se debiera a la muerte de neuronas electroporadas debido a la sobreexpresión de Nrp1. La cuantificación de las proporciones de neuronas GFP⁺ en el área ipsilateral mostró porcentajes similares entre las condiciones experimentales (Figura 12). Por tanto, pudimos descartar la posibilidad de que la sobre-expresión pudiera afectar a la supervivencia de las neuronas y, a su vez, postular la presencia de cambios en las proyecciones contralaterales.

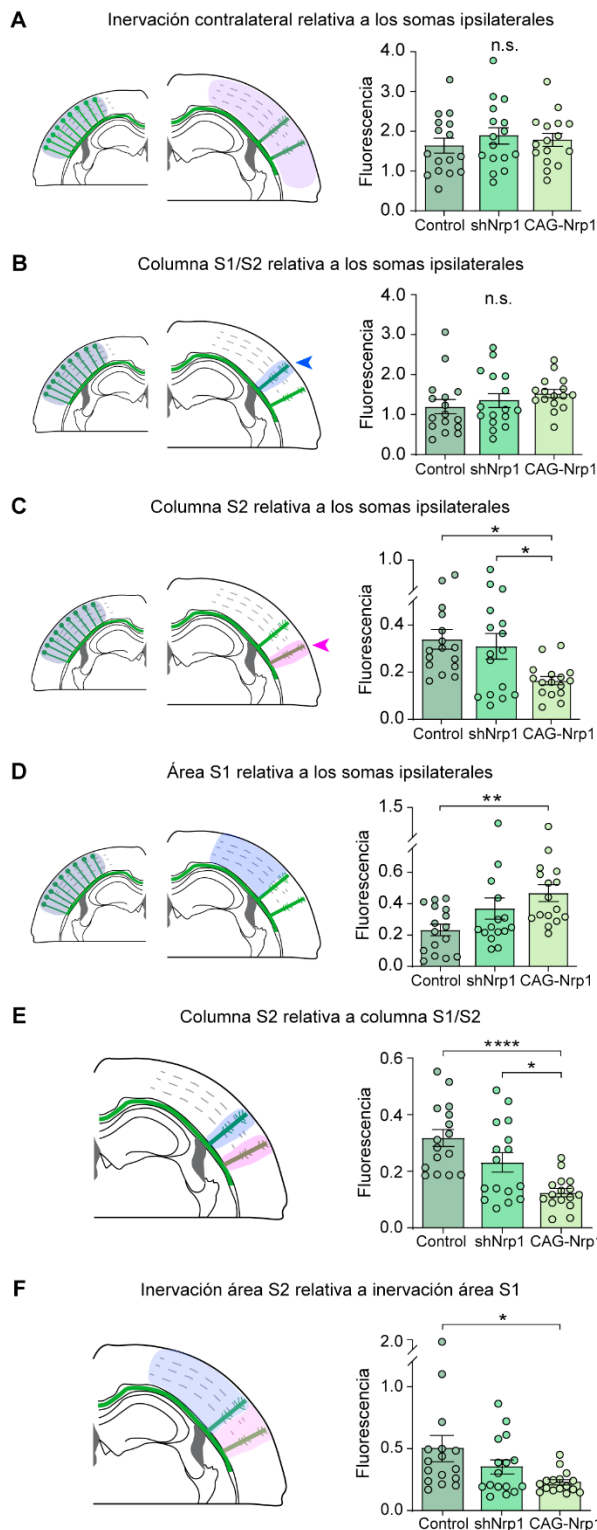


Figura 11: cuantificaciones de la distribución de los axones callosos tras las alteraciones de los niveles de Nrp1 a P30. (A-F) Los esquemas de la izquierda muestran las RDI seleccionadas para cuantificar fluorescencia. Los gráficos muestran los valores obtenidos tras relativizar la fluorescencia de las diferentes RDI. Media \pm EEM ($n = 8$ cerebros, 2 secciones por cerebro, para todas las condiciones). A) Inervación contralateral relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P -valor = 0,6625 (n.s.)). B) Columna S1/S2 relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P -valor = 0,3478 (n.s.)). C) Columna S2 relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0085 (**). Test Post-hoc Tukey: * p -valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0106, * p -valor shNrp1 – CAG-Nrp1 = 0,0393). D) Inervación área S1 relativa a los somas ipsilaterales (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0129 (*). Test Post-hoc Tukey: ** p -valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0095). E) Inervación de la columna S2 relativa a la inervación de la columna S1/S2 (ANOVA de una vía: P -valor < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: **** p -valor Control – CAG-Nrp1 < 0,0001; * p -valor shNrp1 – CAG-Nrp1 = 0,0231). F) Inervación del área S2 relativa a la inervación del área S1 (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0329. Test Post-hoc Tukey: * p -valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0252).

Con estos resultados, inferimos que, con el silenciamiento de Nrp1, no se detectan cambios en el patrón de inervación contralateral establecido por los axones de neuronas de la L2/3. Por el contrario, demostramos que, incrementar los niveles de expresión de Nrp1, bloquea la capacidad para desarrollar proyecciones callosas en el área S2 y, a su vez, promueve la aparición de

ramificaciones deslocalizadas en el área S1. Estos datos sugirieron que Nrp1 tiene un papel en la determinación de la distribución de la invasión callosa, al menos, a nivel área-específico.

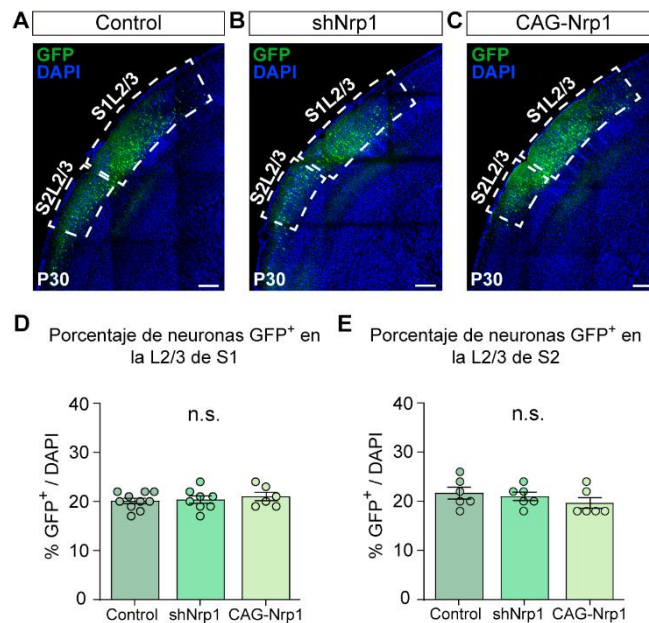


Figura 12: análisis de las proporciones de neuronas electroporadas en el lado ipsilateral de las áreas SS. (A-C) Detalle del hemisferio ipsilateral electroporado de cerebros P30 de todas las condiciones (S1L2/3 = área S1 electroporada, S2L2/3 = área S2 electroporada. Verde = GFP, Azul = DAPI. Escala = 300 μ m). (D-E) Porcentaje de neuronas GFP⁺ sobre todas las células (núcleos DAPI⁺) en la L2/3 del área S1 y S2. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro, para todas las condiciones). D) Área S1 (ANOVA de una vía: P-valor = 0,6769 (n.s.)). E) Área S2 (ANOVA de una vía: P-valor = 0,4172 (n.s.)).

Los niveles de expresión de Nrp1 regulan la invasión homotópica de las proyecciones callosas en el área somatosensorial

Tras analizar los patrones de invasión contralateral, decidimos determinar si en los animales electroporados con shNrp1 o CAG-Nrp1, la composición de las columnas contralaterales había sufrido cambios con respecto a la condición control. Con ello, exploramos si estas columnas, reducidas o no, estaban formadas por axones provenientes de neuronas L2/3 localizadas en las mismas áreas que en el animal *salvaje* o si, por el contrario, había cambios en estos mapas. La columna S1/S2 está compuesta mayoritariamente por axones que provienen del área S1 (proyecciones *homotópicas*), mientras que la columna S2 está formada por axones del área S2. Ambas columnas contienen cierto contenido de proyecciones provenientes del otro área (proyecciones *heterotópicas*) (Wise and Jones, 1976; Miller and Vogt, 1984; Fenlon *et al.*, 2017; De León Reyes *et al.*, 2020).

Para estudiar la composición topográfica de las proyecciones callosas de las neuronas electroporadas, realizamos inyecciones estereotáxicas clásicas en la placa cortical del marcador retrógrado axonal CTB-555 en animales P28. Inyectamos este marcador en el hemisferio contralateral no electroporado en las coordenadas correspondientes al borde entre el área S1 y S2, para el estudio de las neuronas que contribuyen a formar la columna S1/S2. Para analizar la composición de la columna S2, inyectamos en las coordenadas correspondientes al borde más lateral del área S2 (Figura 13A). Con esta aproximación experimental es posible determinar los grupos de neuronas que poseen una proyección axonal en el sitio de inyección y, en nuestro contexto, nos permitió estudiar la existencia de posibles alteraciones topográficas debidas a los cambios en los niveles de expresión de Nrp1. Tras las inyecciones, analizamos en secciones coronales de cerebros P30, las proporciones de neuronas doblemente marcadas (GFP⁺CTB⁺) presentes en cada área del hemisferio electroporado (Figura 13B y C).

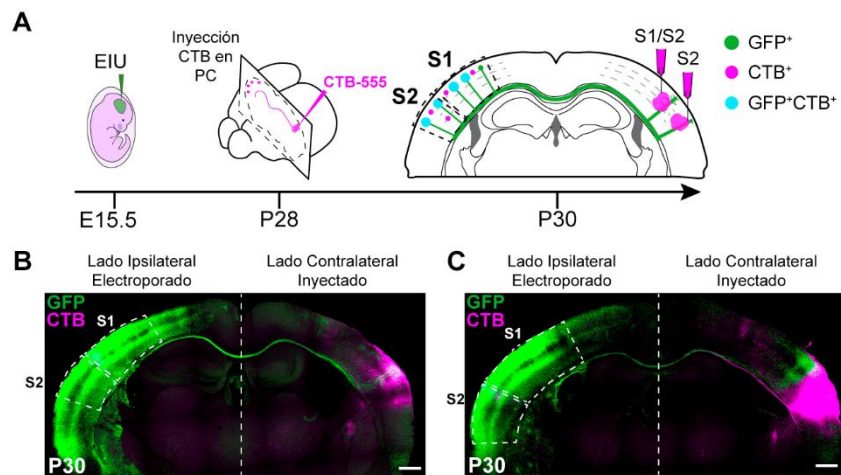


Figura 13: análisis de las proyecciones homotópicas y heterotópicas en la condición control, condición *shNrp1* y condición *CAG-Nrp1*. (A) Flujo de trabajo experimental. Tras las EIU a día E15,5, los cerebros fueron inyectados usando coordenadas estereotáxicas con CTB en la placa cortical a día P28. Los animales se inyectaron, por un lado, en la columna S1/S2 y, por otro, en la columna S2. Después, se cuantificaron los números de neuronas GFP⁺CTB⁺ localizadas en el hemisferio ipsilateral, en las áreas S1 y S2, a día P30. (B-C) Mosaicos de imágenes de secciones coronales de cerebros electroporados control a P30 inyectados en la coordenada de la columna S1/S2 (B) o en la coordenada de la columna S2 (C). A la izquierda de cada imagen, en el lado ipsilateral, se localizan los somas GFP⁺ y CTB⁺. En la derecha, el hemisferio contralateral, sitio de inyección de CTB. (Verde = GFP. Magenta = CTB-555. Escala = 500 μ m).

Como control retrospectivo de la precisión de las coordenadas estereotáxicas, analizamos la presencia de neuronas talámicas marcadas con CTB y comprobamos que las inyecciones en la columna S1/S2 marcaban,

preferencialmente, neuronas tálamo-corticales del núcleo VMP (ventral medial posterior) (Figura 14A-C) mientras que las realizadas en la columna S2 iluminaban neuronas del núcleo PoM (posterior medial) (Figura 14D-F).

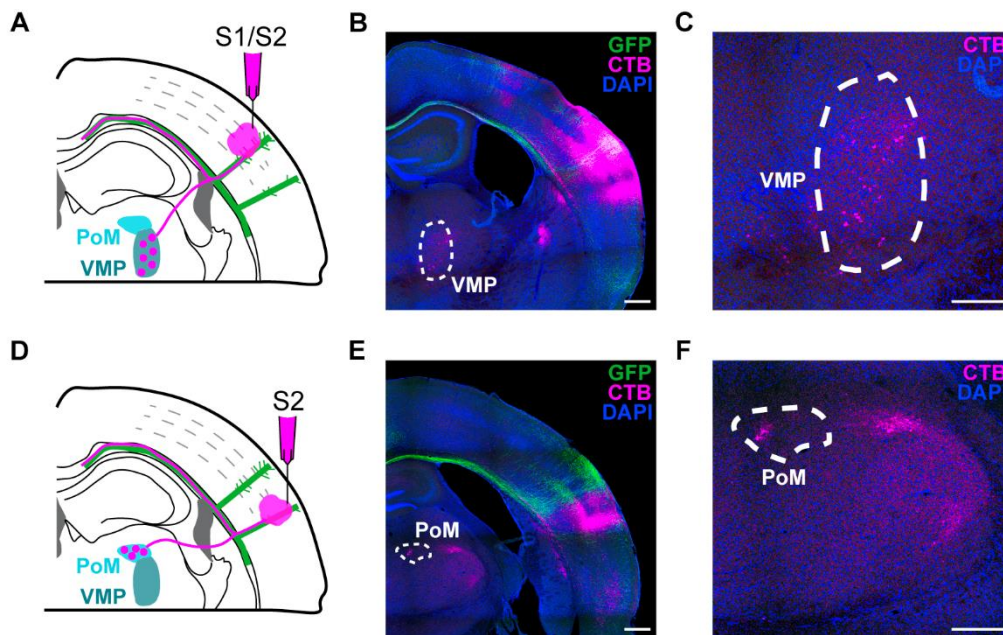


Figura 14: control retrospectivo de la precisión en las inyecciones estereotáxicas en las columnas contralaterales. (A) Esquema de una sección coronal de un cerebro P30 inyectado en la columna S1/S2. El núcleo talámico VMP extiende axones tálamo-corticales a la columna S1/S2. (B) Imagen en detalle del hemisferio contralateral inyectado en la columna S1/S2. El núcleo VMP está delimitado usando la densidad de núcleos DAPI+ y es donde se localizan neuronas talámicas CTB+ (Verde = GFP. Magenta = CTB. Azul = DAPI. Escala = 200 μ m). (C) Detalle del núcleo VPM (Magenta = CTB. Azul = DAPI. Escala = 200 μ m). (D) Esquema de una sección coronal de un cerebro P30 inyectado en la columna S2. El núcleo talámico PoM extiende axones tálamo-corticales a la columna S2. (E) Imagen en detalle del hemisferio contralateral inyectado en la columna S2. El núcleo PoM está delimitado usando la densidad de núcleos DAPI+ y es donde se localizan neuronas talámicas CTB+ (Verde = GFP. Magenta = CTB. Azul = DAPI. Escala = 200 μ m). (F) Detalle del núcleo PoM (Magenta = CTB. Azul = DAPI. Escala = 200 μ m).

Estos resultados confirmaron que las coordenadas elegidas para las inyecciones eran correctas y podían permitirnos estudiar la composición de las columnas axonales contralaterales. Una vez realizadas estas comprobaciones, contabilizamos las neuronas de la L2/3 doblemente marcadas (GFP⁺CTB⁺) situadas en S1 o en S2. En las condiciones control, lo primero que corroboramos es que los patrones de marcaje obtenidos con las inyecciones de CTB son característicos de un circuito calloso adulto, con neuronas CTB⁺ situadas en la L5 y en la L2/3 del hemisferio contrario al sitio de inyección, en ambos tipos de coordenada (Figura 15 A y D). También que la distribución de las neuronas marcadas era distinta en los dos tipos de inyección (Figura 15 A y D). Para caracterizar estas distribuciones, en el caso de las inyecciones en la columna S1/S2, calculamos la relación entre neuronas doble-positivas GFP⁺CTB⁺ localizadas en S1 y las contabilizadas en S2. De esta manera, establecimos la

relación entre proyecciones homotópicas y proyecciones heterotópicas. De manera similar, para las inyecciones en la columna S2, establecimos la relación de las neuronas GFP⁺CTB⁺ contadas en S2 y las identificadas en S1. Este análisis mostró que, en la condición control, la columna S1/S2 está compuesta por ramificaciones axonales procedentes, mayoritariamente, de neuronas del área S1 (relación de marcaje relativo de 1,5) (Figura 15 A y G). Este análisis para las condiciones de silenciamiento y sobre-expresión de Nrp1 no mostró cambios significativos con respecto a la condición control, aunque sí observamos una pequeña tendencia a disminuir la contribución del área S1 a esta columna en ambas condiciones (Figura 15 B-C y G). Para la columna S2, pudimos detectar que está formada principalmente por proyecciones de neuronas localizadas en el área S2, es decir, por proyecciones homotópicas. Encontramos neuronas doblemente marcadas con una frecuencia 2,5 veces mayor en S2 que en S1 (Figura 15 D y H). En el caso del silenciamiento de Nrp1, esta proporción disminuye significativamente (Figura 15 E y H). Teniendo en cuenta que los análisis previos no mostraron alteraciones en la densidad de las ramificaciones de la columna S2 (Figura 10D; Figura 11C, E y F), inferimos que, en los animales electroporados con shNrp1, esta columna está formada por un exceso de proyecciones heterotópicas procedentes de S1 que compensarían la falta de proyecciones homotópicas de S2. Con el mismo análisis en animales inyectados en la columna S2 y electroporados con CAG-Nrp1, detectamos un menor número de neuronas GFP⁺ marcadas con CTB y situadas en S2, relativo a las que contabilizamos en S1 (Figura 15 F y H). Este dato, unido a la pérdida de la columna S2 que habíamos descrito previamente (Figura 10E; Figura 11C, E y F), nos confirmó una disminución de proyecciones homotópicas del área S2 electroporada.

Tras obtener estos resultados y para confirmar la pérdida de proyecciones homotópicas, fue necesario comprobar la influencia de las posibles diferencias de eficiencia en la saturación de las inyecciones. Para ello, calculamos las mismas relaciones que anteriormente, pero sólo sobre la población CTB⁺GFP⁻ (no electroporada). Es decir, en los mismos animales inyectados, analizamos los patrones de contribución a la inervación de la población donde no alterábamos los niveles de Nrp1. No observamos diferencias significativas entre nuestras

condiciones experimentales (Figura 16), descartando así la posible influencia de la eficiencia de inyección y, por ende, apoyando los resultados que indican cambios en la configuración de los mapas callosos ante las modificaciones de los niveles de expresión de Nrp1.

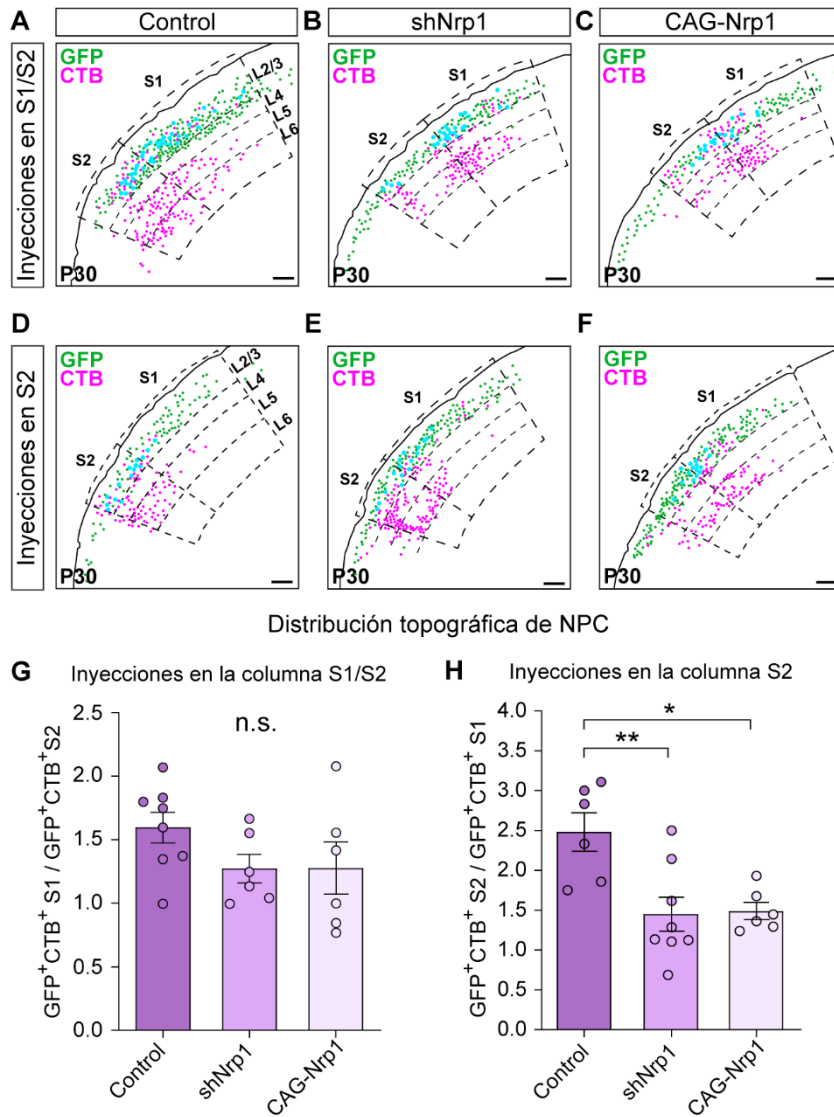


Figura 15: análisis cuantitativo de las proyecciones homotópicas y heterotópicas en cerebros Control, shNrp1 y CAG-Nrp1. (A-F) Esquemas del lado ipsilateral de secciones coronales reales de cerebros inyectados en la columna S1/S2 (A-C) o en la columna S2 (D-F) del lado contralateral. Pueden encontrarse marcadas neuronas GFP+ (puntos verdes), neuronas CTB+ (puntos magenta) y GFP+CTB+ (puntos azules) (Escala = 300 μ m). (G) Cuantificación de la distribución de GFP+CTB+ en cerebros inyectados en la columna S1/S2. La ratio representa el número de neuronas GFP+CTB+ localizadas en el área S1 dividido entre el número de neuronas doble positivas localizadas en S2. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro en todas las condiciones. ANOVA de una vía: P-valor = 0,2096 (n.s.)). (H) Cuantificación de la distribución de GFP+CTB+ en cerebros inyectados en la columna S2. La ratio representa el número de neuronas GFP+CTB+ localizadas en el área S2 dividido entre el número de neuronas doble positivas localizadas en S1. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro en todas las condiciones. ANOVA de una vía: P-valor = 0,0036 (**). Test Post-hoc Tukey: ** p-valor Control - shNrp1 = 0,0052; * p-valor Control - CAG-Nrp1 = 0,0109).

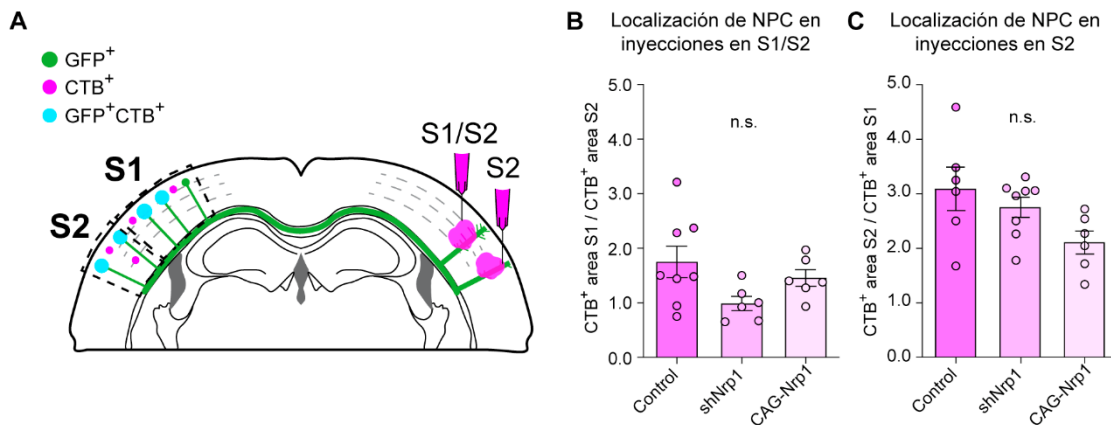


Figura 16: análisis de la localización de NPC a P30 en la corteza somatosensorial. (A) Esquema de una sección coronal de un cerebro P30 electroporado e inyectado. Las inyecciones se realizaron en las coordenadas de la columna S1/S2 y de la columna S2. Las poblaciones GFP⁺CTB⁺ y GFP-CTB⁺ fueron cuantificadas individualmente y entre las áreas S1 y S2, para cada tipo de inyección. (B-C) Localización de NPC CTB⁺ de inyecciones en columna S1/S2 y en columna S2. Para las inyecciones S1/S2, la ratio se calculó entre neuronas CTB⁺ de S1 y neuronas CTB⁺ de S2. Para inyecciones en columna S2, la ratio se calculó entre neuronas CTB⁺ de S2 y neuronas CTB⁺ de S1. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro en todas las condiciones. B) Inyecciones en columna S1/S2 (ANOVA de una vía: P-valor = 0,0840 (n.s.)). C) Inyecciones en columna S2 (ANOVA de una vía: P-valor = 0,0669 (n.s.)).

Con estos resultados pudimos concluir que la influencia de Nrp1 incide sobre diferentes aspectos de la topografía de los axones callosos. El silenciamiento de Nrp1 afecta notablemente el desarrollo de proyecciones callosas homotópicas de S2 que son compensadas por proyecciones heterotópicas de S1. Por el contrario, sobre-expresar este receptor bloquea, de la misma forma, las proyecciones homotópicas de S2 y las heterotópicas de S1 y, por ello, la columna S2 experimenta una reducción significativa de axones. Por tanto, con estos resultados, pudimos confirmar la hipótesis de que son necesarios niveles muy precisos de expresión de Nrp1 en las neuronas de la L2/3 del área SS para establecer una correcta topografía callosa.

Las alteraciones en la expresión de Nrp1 alteran la dinámica de crecimiento y refinamiento de las proyecciones callosas durante el desarrollo

En base a los resultados obtenidos, nos propusimos determinar en qué momento del desarrollo se producen las alteraciones del circuito callosa debidas a cambios en la expresión de Nrp1. Por consiguiente, analizamos los patrones de inervación en nuestras condiciones experimentales a día postnatal 16. En este estadio, en el área somatosensorial, las neuronas de la L2/3 ya producen dos columnas axonales contralaterales similares a las del circuito adulto, pero continúa el proceso de crecimiento, estabilización y remodelación de axones y sinapsis. El análisis *de visu* de los cerebros en los que se indujo el silenciamiento o la sobre-

expresión de Nrp1 mostró la presencia de fenotipos de invasión contralateral reducida, con disminuciones generalizadas en todas las áreas de la corteza y columnas

contralaterales menos ramificadas que en la condición control (Figura 17A-C). La cuantificación de fluorescencia confirmó, en primer lugar, una reducción global de la invasión contralateral (Figura 17D) en los cerebros electroporados con shNrp1 o CAG-Nrp1. Además, tanto en el análisis de la columna S1/S2 como de la columna S2 pudimos detectar reducciones significativas y, de forma más acusada, en el caso de la columna S2, tanto en el silenciamiento como con la sobre-expresión (Figura 17 E y F).

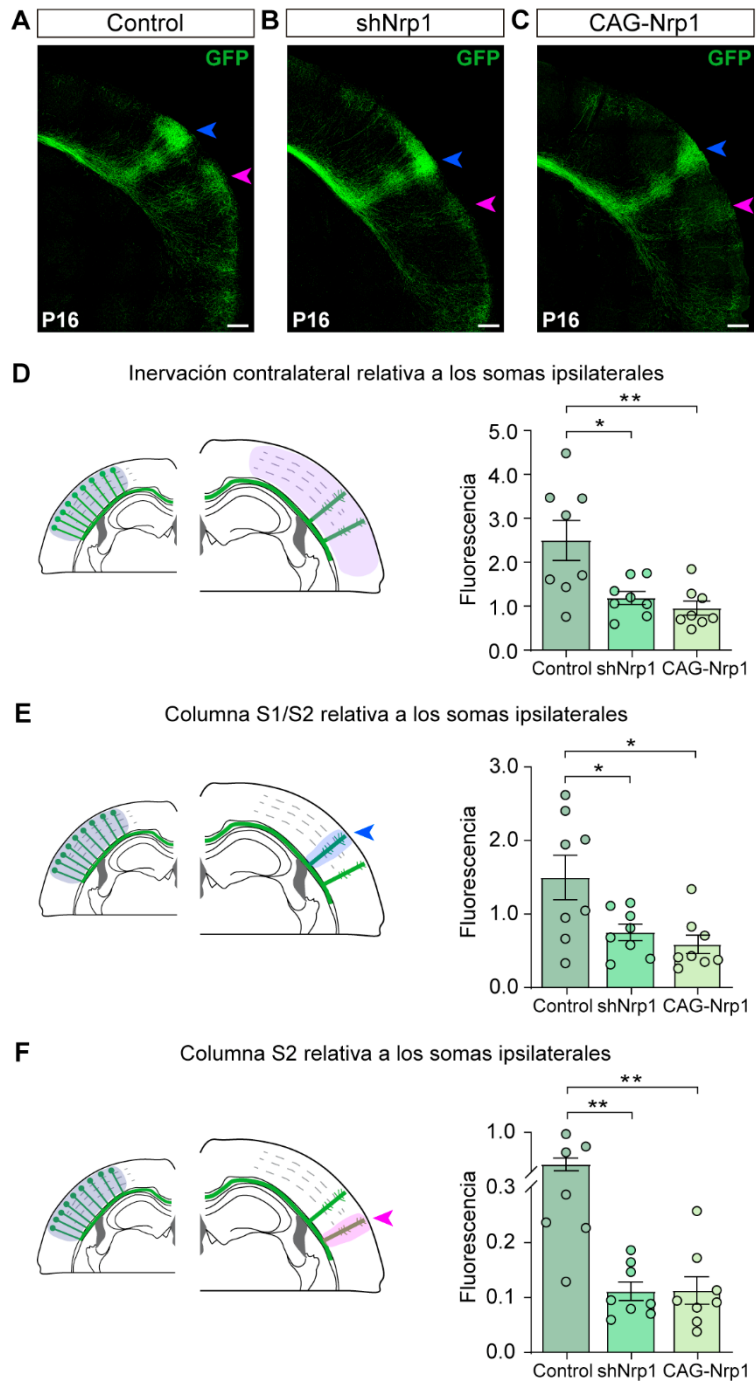


Figura 17: análisis y cuantificaciones de la distribución de los axones callosos tras las alteraciones de los niveles de Nrp1 a P16. (A-C) Magnificaciones de hemisferios contralaterales de cerebros P16 electroporados donde se muestran axones GFP+ formando la columna S1/S2 (flecha azul) y la columna S2 (flecha magenta). Escala = 300 μ m. (D-F) Los esquemas de la izquierda muestran las RDI seleccionadas para cuantificar fluorescencia. Los gráficos muestran los valores obtenidos tras relativizar la fluorescencia de las diferentes RDI. Media \pm EEM (n = 4 cerebros, 2 secciones por cerebro, para todas las condiciones). D) Inervación contralateral relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P-valor = 0,0024. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control – shNrp1 = 0,0122 (*); p-valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0033 (**)). E) Columna S1/S2 relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P-valor = 0,0094. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control – shNrp1 = 0,0392 (*); p-valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0110 (*)). F) Columna S2 relativa a los somas ipsilaterales. (ANOVA de una vía: P-valor = 0,0009. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control – shNrp1 = 0,0024 (**); p-valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0025 (**)).

Para estudiar la dinámica axonal en la ventana temporal que comprende el periodo de P16 a P30, comparamos los valores de fluorescencia obtenidos en las diferentes condiciones experimentales y, además, entre ambos estadios del desarrollo. Estas comparaciones indicaron que, en los cerebros control, la densidad de ramificaciones axonales en el hemisferio contralateral se reduce durante la segunda quincena del desarrollo postnatal (Figura 18), de acuerdo a los procesos de “poda” axonal (del inglés, *axonal pruning*) que sufre el circuito calloso descritos en la literatura (O’Leary, 1992; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Por el contrario, tanto el silenciamiento como la sobre-expresión de Nrp1, producen dinámicas contrarias al control, con una ganancia generalizada de ramificaciones contralaterales. Esta ganancia conlleva que, al final de esta ventana temporal, se alcancen valores indistinguibles de los del control a P30 (Figura 18A-C). En este proceso de ganancia, observamos una excepción para la columna S2 de la condición de sobre-expresión, dónde pudimos comprobar que la recuperación de ramificaciones no alcanza los valores control y se mantiene igualmente reducida en ambos estadios del desarrollo, P16 y P30 (Figura 18C-E).

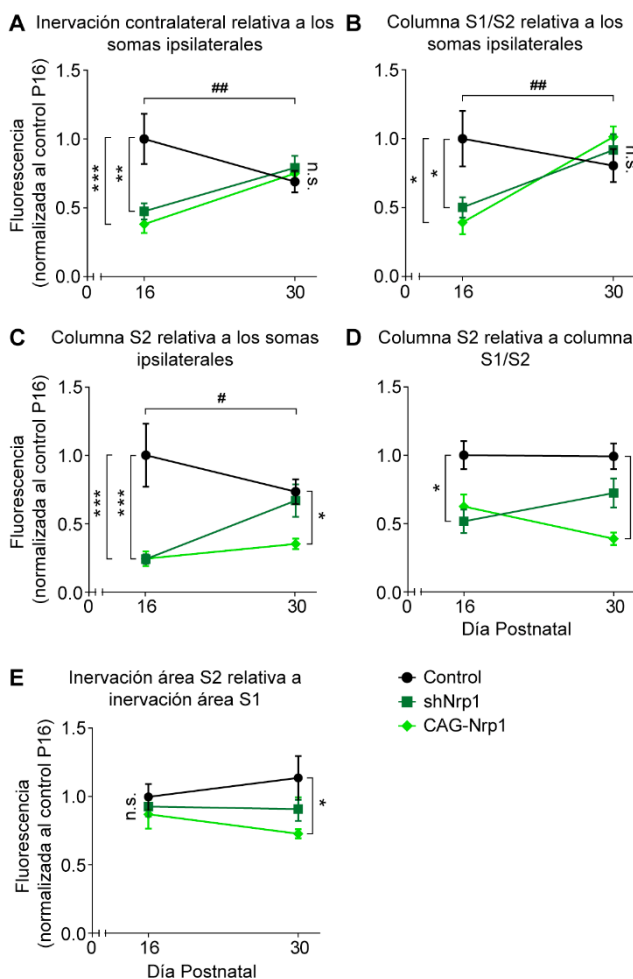


Figura 18: comparaciones de los cambios durante el desarrollo de los axones contralaterales durante el periodo P16 a P30 tras las modificaciones en los niveles de expresión de Nrp1. (A-E) Gráficos de las ratios de la inervación GFP+ del área indicada, relativizada al hemisferio ipsilateral electroporado o al área descrita y, normalizado al valor del control a P16. Media \pm EEM ($n \geq 4$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). A) Inervación contralateral en el área SS (ANOVA de dos vías: P-valor Dinámica de la inervación contralateral = 0,0012 (##); P-valor Día postnatal = 0,1224; P-valor Condición experimental = 0,0149. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 = 0,0044 (**); p-valor Control P16 – CAG-Nrp1 P16 = 0,0007). B) Columna S1/S2 (ANOVA de dos vías: P-valor Dinámica de la columna S1/S2 = 0,0052 (##); P-valor Día postnatal = 0,0080; P-valor Condición experimental = 0,2043. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 = 0,0465 (*); p-valor Control P16 – CAG-Nrp1 P16 = 0,0116 (*). C) Columna S2 (ANOVA de dos vías: P-valor Dinámica de la columna S2 = 0,0114 (#); P-valor Día postnatal = 0,3331; P-valor Condición experimental < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 = 0,0003 (***); p-valor Control P16 – CAG-Nrp1 P16 = 0,0003 (***); p-valor Control P30 – CAG-Nrp1 P30 = 0,0123 (*). D) Columna S2 relativa a columna S1/S2 (ANOVA de dos vías: P-valor Dinámica de la columna S2 relativa a columna S1/S2 = 0,2098 (n.s.); P-valor Día postnatal = 0,8770; P-valor Condición experimental < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 = 0,0102 (*); p-valor Control P30 – CAG-Nrp1 P30 < 0,0001 (****)).

En conjunto, los resultados nos permitieron concluir que, durante el desarrollo, alterar los niveles de Nrp1 retrasa el proceso de invasión y ramificación callosa y que, además, este retraso finalmente se ve compensado por el crecimiento de otras ramificaciones topográficamente aberrantes (heterotópicas), como demostraban las inyecciones estereotáxicas en la placa cortical.

Los niveles de Nrp1 determinan un refinamiento postnatal de los axones callosos de las neuronas de la L2/3 que se detecta en la línea media

El CC se organiza siguiendo una topografía dorso-ventral que determina que las neuronas situadas en regiones mediales de la corteza tengan su axón caloso localizado en rutas dorsales, mientras que los axones de neuronas de regiones más laterales cruzarán por regiones más ventrales. Esto se dedujo de un estudio de otro grupo de investigación que demostró que disminuir los niveles de expresión de Nrp1 en neuronas de la corteza motora, situada en las regiones más mediales de la corteza, producía que sus axones calosos crucen por rutas correspondientes a las empleadas por los axones de las neuronas localizadas en áreas más laterales, como el área somatosensorial (Zhou *et al.*, 2013). De manera análoga, decidimos analizar la distribución en el CC de los axones con nuestras modificaciones, a nivel de línea media, tanto a P16 como a P30. Para ello, cuantificamos la señal de los axones GFP⁺ y representamos los valores de fluorescencia a lo largo del eje dorso-ventral del tracto (Figura 19).

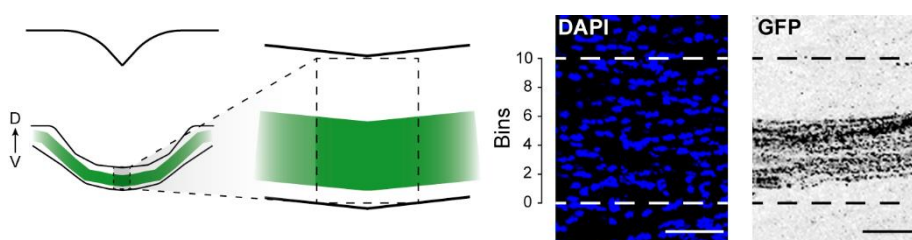


Figura 19: análisis de la distribución dorsoventral de los axones callosos electroporados en línea media. (A) Esquema del análisis. El panel de la izquierda muestra la RDI seleccionada en línea media. El panel de la derecha muestra la división en 10 unidades de la RDI y aplicado a una imagen real de una sección coronal. Se muestra una RDI de los núcleos DAPI+ (azul) y una RDI de los axones GFP+ (blanco y negro) (Escala = 50 μ m).

En primer lugar, con este análisis pudimos determinar que, en todas las condiciones de electroporación, los axones callosos GFP⁺ se sitúan preferencialmente en las posiciones más ventrales del CC (entre los *bins* 1-7) en ambos estadios del desarrollo. Cabe destacar que pudimos observar algunos

axones cruzando por posiciones más dorsales (*bins* 7-10), siendo estos más abundantes a P16 que a P30, pero en números claramente inferiores a los ventrales (Figura 20A-D y H). Por tanto, este primer análisis nos indicó que las alteraciones en los niveles de expresión de Nrp1 no modificaban la elección de la vía ventral como camino principal para cruzar la línea media. La comparación de las distribuciones a P16 de nuestras distintas condiciones experimentales no mostró cambios sustanciales en las mismas, presentándose únicamente pequeñas diferencias entre los *bins* 3 y 5 (Figura 20A-D). Esta misma comparación a P30 indicó que, durante el proceso de refinamiento axonal, estas pequeñas diferencias se incrementaban. A P30, los axones de neuronas electroporadas con shNrp1 o CAG-Nrp1 se situaban preferencialmente en rutas más dorsales (*bins* 4-10) en comparación con los de la condición control. Además, presentaban una mayor desorganización (Figura 20E-H). Este análisis reveló, por tanto, que la alteración en los niveles de expresión de Nrp1 produce cambios en la posición dorso-ventral final de los axones callosos, muy probablemente debidos a la alteración en el refinamiento de los axones contralaterales. Para poder caracterizar más en detalle el proceso de refinamiento en línea media con nuestro análisis, realizamos la comparación de los perfiles entre P16 y P30 dentro de cada condición experimental. En la condición control, pudimos observar que los axones callosos que cruzan por regiones más dorsales del CC se refinan entre P16 y P30, lo que sugería la existencia de una eliminación topográfica de axones del área somatosensorial durante el desarrollo (Figura 21A). Esta eliminación selectiva no era tan patente en los axones silenciados, ya que únicamente observamos diferencias significativas en las intensidades de los axones de posiciones ventrales, mientras que las posiciones dorsales mantenían un perfil similar (Figura 21B). Por otro lado, no detectamos remodelación axonal en línea media cuando sobre-expresamos Nrp1, ya que el perfil a P16 resultó ser similar al de P30 (Figura 21C).

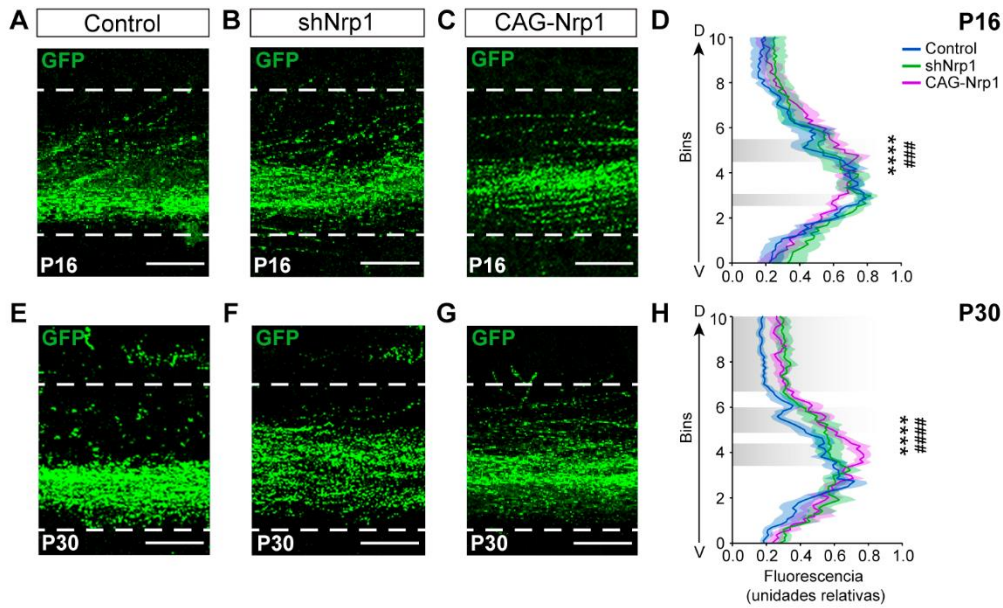


Figura 20: análisis de la distribución dorsoventral de los axones callosos electroporados en línea media. (A-C) Imágenes del CC en línea media en cerebros a P16 de todas las condiciones (Verde = GFP. Escala = 50 μ m). (D) Cuantificación de la distribución dorsoventral de la señal GFP a P16 (posición ventral: bins = 0; posición dorsal: bins = 10). El perfil presenta la media \pm EEM (sombreado) ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). Las áreas sombreadas en gris indican las regiones con diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de dos vías: P -valor Distribución CC = 0,9992; P -valor Bins < 0,0001; P -valor Condición Experimental < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: **** p -valor Control – shNrp1 \leq 0,0001; ### p -valor Control – CAG-Nrp1 = 0,0006). (E-G) Imágenes del CC en línea media en cerebros a P30 de todas las condiciones (Verde = GFP. Escala = 50 μ m). (H) Cuantificación de la distribución dorsoventral de la señal GFP a P30 (posición ventral: bins = 0; posición dorsal: bins = 10). El perfil presenta la media \pm EEM (sombreado) ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). Las áreas sombreadas en gris indican las regiones con diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de dos vías: P -valor Distribución CC = 0,9925; P -valor Bins < 0,0001; P -valor Condición Experimental < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: **** p -valor Control – shNrp1 \leq 0,0001; ##### p -valor Control – CAG-Nrp1 < 0,0001).

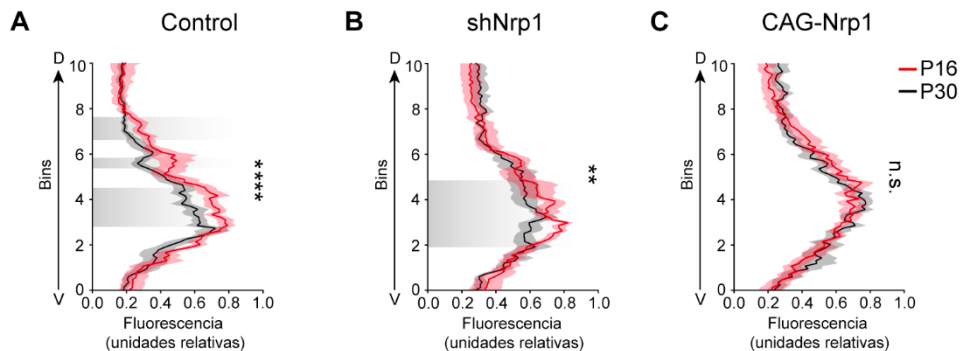


Figura 21: análisis de la distribución dorsoventral de los axones callosos electroporados en línea media. (A-C) Comparación de la distribución de axones en el CC entre cerebros P16 y P30 en cada condición. El perfil presenta la media \pm EEM (sombreado) ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). A) Control (ANOVA de dos vías: P -valor < 0,0001 (****)). B) shNrp1 (ANOVA de dos vías: P -valor = 0,0021 (**)). C) CAG-Nrp1 (ANOVA de dos vías: P -valor = 0,5513 (n.s.)).

El análisis de los axones en línea media sugería que Nrp1 pudiera intervenir en el proceso de refinamiento axonal que las neuronas corticales sufren durante el desarrollo (Innocenti *et al.*, 1977; O’Leary *et al.*, 1981; C. Meissirel *et al.*, 1991; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Esto estaba apoyado por los resultados previos que

indicaban que Nrp1 podría estar controlando la organización topográfica de las conexiones callosas.

El silenciamiento de Nrp1, pero no la sobre-expresión, altera las proporciones de neuronas interhemisféricas de las neuronas de la L2/3, afectando su refinamiento

Los resultados presentados apuntaban a que Nrp1 influye en el proceso de refinamiento de las conexiones callosas de las neuronas de la L2/3. Todas las neuronas de la L2/3 emiten proyecciones callosas exuberantes como parte de su proceso normal de desarrollo (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Durante el desarrollo, estas conexiones se eliminan diferencialmente de forma área-específica mediante mecanismos de refinamiento dependientes de actividad (Innocenti and Clarke, 1984a; Koralek and Killackey, 1990; Mizuno *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2014; Antón-Bolaños *et al.*, 2019; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Este proceso de refinamiento se produce de manera progresiva y continuada durante las primeras semanas de vida del ratón. El periodo de mayor intensidad de refinamiento para la L2/3 se da entre P7 y P16. A partir de P16, el refinamiento de los axones callosos de neuronas de la L2/3 continua durante un par de semanas más, pero con tasas mucho menores, hasta que a P30 encontramos las poblaciones finales locales y callosas que permanecerán como tales en el adulto, según han refinado o no, respectivamente (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Para investigar el posible papel que pudiera estar jugando Nrp1 en este proceso, empleamos inyecciones estereotáxicas en el CC, con coordenadas cercanas a la línea media y en el hemisferio opuesto al electroporado (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Esta técnica permite determinar con precisión las proporciones de neuronas que tienen un axón que, habiendo cruzado la línea media, se encuentre en el hemisferio contralateral en el momento de la inyección. Identifica, por tanto, los axones que están en ese momento en proceso de extensión hacia sus dianas finales y aquellos que están en proceso de retracción (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Realizamos estas inyecciones en animales de 14 y 28 días, electroporados con los plásmidos control, de silenciamiento y sobreexpresión de Nrp1, utilizando coordenadas que marcan neuronas del área somatosensorial. Dos días después de las inyecciones, y tras permitir el viaje retrógrado del CTB,

analizamos los cerebros para contabilizar las neuronas electroporadas marcadas con CTB⁺ (Figura 22).

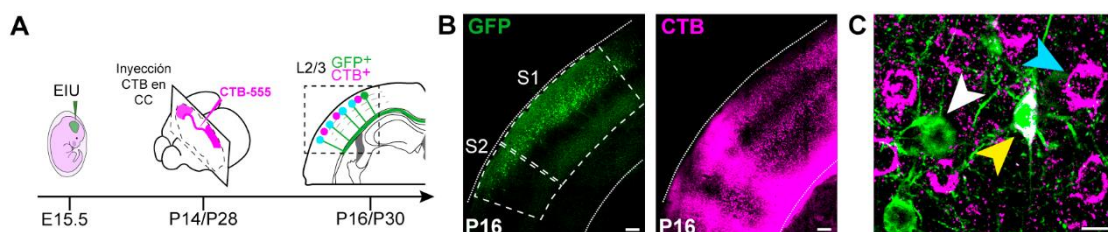


Figura 22: proporciones de NPCs durante el desarrollo postnatal (P16 a P30). (A) Esquema del flujo experimental donde, para analizar el efecto del refinamiento en el número de NPC electroporadas, se realizaron inyecciones de CTB en línea media en los estadios P14 y P28. Los cerebros se analizaron a P16 o P30. (B) Imágenes de secciones coronales de un cerebro P16 donde aparecen delimitadas las áreas S1 y S2. El panel izquierdo muestra las neuronas GFP⁺ electroporadas. El panel de la derecha contiene la señal de CTB que produce la inyección en línea media (Verde = GFP. Magenta = CTB-555. Escala = 300 μ m). (C) Magnificación de una imagen donde aparecen neuronas de la L2/3 en un cerebro P16 inyectado con CTB (GFP⁺: flecha blanca, CTB⁺: flecha azul, GFP⁺CTB⁺: flecha amarilla. Escala = 10 μ m).

Los resultados mostraron, en primer lugar, que tanto a P16 como a P30, las proporciones de neuronas CTB⁺GFP⁺ L2/3 son indistinguibles de las proporciones descritas previamente en ratones P16 y P30 de la cepa *salvaje* (Figura 23 G y H; Figura 24 G y H). Esto nos permitió concluir que el proceso de EIU no altera la dinámica de desarrollo de las NPCs (Fame *et al.*, 2011; De Leon Reyes *et al.*, 2019). A P16, en la condición control, las proporciones de NPCs presentes en la L2/3 del área S1 es de alrededor de un 50%, tanto en la población electroporada (GFP⁺), como en la no electroporada (GFP⁻) (Figura 23 A y G). El área S2, presentó alrededor de un 40% de NPCs, tanto GFP⁺ como GFP⁻ (Figura 23 D y H). Los contajes sobre los cerebros donde silenciamos Nrp1 mostraron un aumento significativo de NPCs en la población L2/3GFP⁺, sin alterar las proporciones de NPCs en la población L2/3GFP⁻ (Figura 23 B y G). En el área S2, la condición de silenciamiento no alteró las proporciones de NPCs (Figura 23 E y H). Finalmente, a P16, los contajes no identificaron cambios en las proporciones de NPCs totales (GFP⁺ y GFP⁻) en ninguna de las dos áreas funcionales analizadas cuando sobre-expresamos Nrp1 (Figura 23C, F, G y H).

En un estadio posterior, a P30, los contajes de NPCs GFP⁺ mostraron que, cuando silenciamos Nrp1, las proporciones en el área S1 alcanzaban valores similares al control (Figura 24A, B y G). Por tanto, el incremento de NPCs electroporadas que detectamos a P16 en el área S1 en la condición de silenciamiento, se vio normalizado durante la ventana temporal P16-P30. En cambio, en el área S2, observamos una pérdida significativa de NPCs

electroporadas con shNrp1 (Figura 24 E y H). Los valores del control y de la sobre-expresión presentan proporciones indistinguibles en las dos áreas analizadas (Figura 24A, C, D, F, G y H). Con la determinación de las proporciones de NPCs pudimos concluir que la reducción de los niveles de expresión de Nrp1 afecta la dinámica de refinamiento de las proyecciones callosas de la L2/3 en el área somatosensorial.

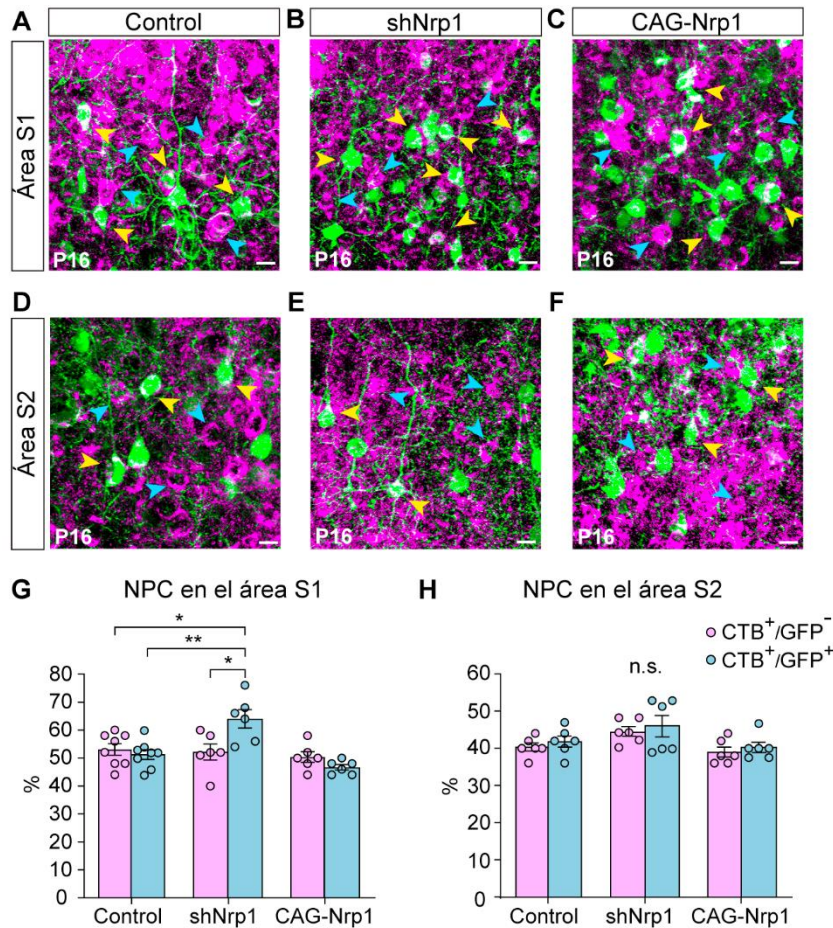


Figura 23: proporciones de NPC en las poblaciones no electroporadas y electroporadas de la lámina 2/3 a P16. (A-F) Imágenes en detalle de las poblaciones neuronales de la L2/3 (CTB⁺: flecha azul, GFP+CTB⁺: flecha amarilla. Escala = 10 μ m). A-C) Neuronas de L2/3 del área S1. D-F) Neuronas de L2/3 del área S2. (G-H) Proporciones de neuronas CTB⁺/GFP⁻ y de neuronas GFP+CTB⁺/GFP⁺ en las áreas S1 y S2. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). G) NPC en S1 (ANOVA de dos vías: P-valor Condición experimental = 0,001; P-valor Población = 0,242. Test Post-hoc Tukey: p-valor shNrp1 CTB⁺/GFP⁻ - shNrp1CTB⁺ GFP⁺ = 0,0127 (*); p-valor Control CTB⁺/GFP⁺ - shNrp1 CTB⁺/GFP⁺ = 0,0033 (**); p-valor Control CTB⁺/GFP⁻ - shNrp1 CTB⁺/GFP⁻ = 0,0135 (*)). H) NPC en S2 (ANOVA de dos vías: P-valor Condición experimental = 0,072 (n.s.); P-valor Población = 0,2842).

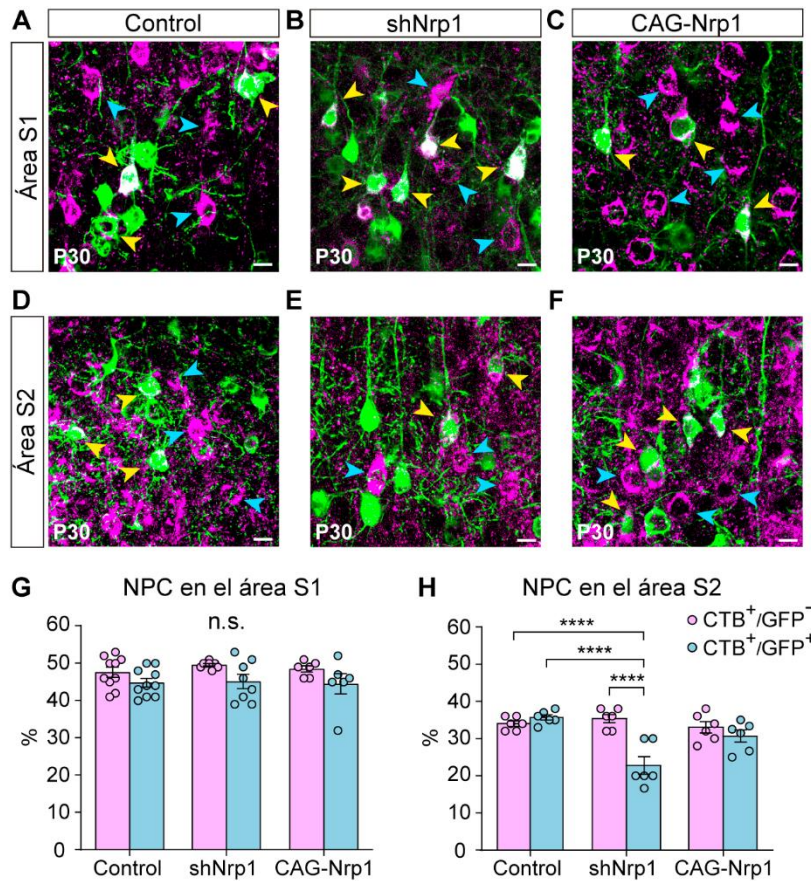


Figura 24: proporciones de NPC en las poblaciones no electroporadas y electroporadas de la lámina 2/3 a P30. (A-F) Imágenes en detalle de las poblaciones neuronales de la L2/3 (CTB⁺: flecha azul, GFP+CTB⁺: flecha amarilla. Escala = 10 μ m). A-C) Neuronas de L2/3 del área S1. D-F) Neuronas de L2/3 del área S2. (G-H) Proporciones de neuronas CTB⁺/GFP⁻ y de neuronas GFP+CTB⁺/GFP⁺ en las áreas S1 y S2. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones). G) NPC en S1 (ANOVA de dos vías: P-valor Condición experimental = 0,699 (n.s.); P-valor Población = 0,0041. H) NPC en S2 (ANOVA de dos vías: P-valor Condición experimental = 0,0018; P-valor Población = 0,0008. Test Post-hoc Tukey: p-valor shNrp1 CTB+GFP- - shNrp1 CTB+GFP+ < 0,0001 (****); p-valor Control CTB+GFP+ - shNrp1 CTB+GFP+ < 0,0001 (****); p-valor Control CTB+GFP- - shNrp1 CTB+GFP+ < 0,0001 (****)).

Las alteraciones en las proporciones de NPCs observadas a P16 y a P30, nos llevaron a estudiar la dinámica de refinamiento de las poblaciones electroporadas. Para ello, enfrentamos los datos obtenidos a P16 y P30 en las áreas S1 y S2 para todas las condiciones. El silenciamiento de Nrp1 en las neuronas L2/3 del área S1 indujo un retraso en el refinamiento de las proyecciones callosas que, posteriormente, acabó normalizándose. Por tanto, esta subpoblación sufrió un refinamiento más acusado entre P16-P30 que en una condición control (Figura 25A). Por el contrario, la dinámica de refinamiento en neuronas con Nrp1 sobre-expresado no se vio alterada (Figura 25A). De este análisis, y junto a los datos anteriores, pudimos inferir que la reducción de inervación contralateral observada a P16 se debe a unas ramificaciones

axonales menos elaboradas y no a una menor proporción de neuronas interhemisféricas. El análisis del área S2 también mostró alteraciones en la dinámica de refinamiento ante el silenciamiento de Nrp1, y no ante su sobreexpresión (Figura 25B). Esta alteración se traduce en un exceso de refinamiento de NPCs del área S2 y, basándonos en los fenotipos inalterados de invasión observados a P30 en la condición de silenciamiento, pudimos reforzar la hipótesis de la presencia de ramificaciones heterotópicas de S1 que conforman la columna S2. De esta manera, pudimos asumir que, ante el silenciamiento de Nrp1 en neuronas de la L2/3, se producen cambios en las dinámicas de refinamiento y en la topografía de los axones callosos que, finalmente, derivan en una invasión contralateral compensada y similar a una condición control a P30.

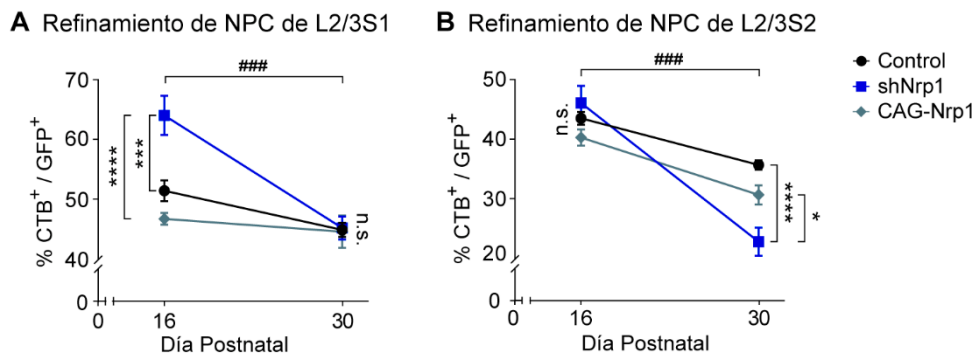


Figura 25: dinámica de refinamiento durante el desarrollo de NPC de la lámina 2/3 (desde P16 a P30). (A) Gráfica de la proporción de NPC (GFP+CTB+/GFP+) en el área S1 desde P16 a P30. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones) (ANOVA de dos vías: P-valor Refinamiento de NPC de L2/3 en S1 = 0,0007 (###); P-valor Día postnatal < 0,0001; P-valor Condición experimental = 0,0003. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 = 0,0003 (***), p-valor shNrp1 P16 – CAG-Nrp1 P16 < 0,0001 (****)). (B) Gráfica de la proporción de NPC (GFP+CTB+/GFP+) en el área S2 desde P16 a P30. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones) (ANOVA de dos vías: P-valor Refinamiento de NPC de L2/3 en S2 = 0,0003 (###); P-valor Día postnatal < 0,0001; P-valor Condición experimental = 0,0199. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P30 – shNrp1 P30 < 0,0001 (****), p-valor shNrp1 P16 – CAG-Nrp1 P16 = 0,0127 (*).

Silenciar la expresión de Nrp1 en la lámina 2/3 produce alteraciones en el proceso de refinamiento de las neuronas de la lámina 4

Los resultados demostraban que el receptor de Nrp1 influye en los procesos de crecimiento axonal y refinamiento y, de esta manera, determina la conectividad homotópica de las neuronas callosas de la L2/3 electroporadas. Por el contrario, las manipulaciones de la expresión de Nrp1 no parecían alterar el desarrollo normal de las neuronas L2/3 no electroporadas. Para estudiar en más detalle si las alteraciones en la población L2/3 electroporada pudieran estar a otras

neuronas vecinas, analizamos la dinámica de refinamiento de la lámina inmediatamente inferior a la L2/3, la L4. Para ello, empleamos las secciones coronales de ratones P16 y P30 electroporados con nuestras construcciones e inyectados con CTB en línea media. Los estudios anteriores de nuestro grupo habían demostrado que, en ratones de la cepa *salvaje*, en el área S1, la L4 sufre un refinamiento generalizado durante el desarrollo. En estadios tempranos (P3) se observan proporciones de NPCs cercanas a máximos de 100%. A lo largo del periodo postnatal comprendido entre las tres primeras semanas del desarrollo (P0-P21), las neuronas S1L4 refinan gradualmente estas proyecciones callosas transitorias para finalizar, alrededor de P21, en proporciones de NPCs que suponen un 5% de las neuronas totales. Este porcentaje representa a las NPCs de la S1L4 que se mantendrán a lo largo de la vida del animal adulto. Por el contrario, en el área S2, la L4, partiendo de números máximos similares a estadios tempranos, estabiliza alrededor de un 30% de estas conexiones callosas durante el desarrollo. Como resultado de esta menor tasa de refinamiento, las neuronas de la L4 en el área S2 presentan una mayor conectividad interhemisférica en el circuito adulto que las del área S1 (De Leon Reyes *et al.*, 2019).

Con nuestro análisis y, tras establecer las proporciones de NPCs a P16 y P30, pudimos observar que, en el área S1, la L4 de la condición control experimentó un refinamiento similar al descrito previamente por nuestro laboratorio, partiendo de alrededor de un 30% de NPCs a P16 hasta alrededor de un 5% a P30 (Figura 26A, D y G; Figura 27A, D y G) (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Cuando sobre-expresamos *Nrp1* en la L2/3, la dinámica de refinamiento de la L4S1 no se vio alterada significativamente, presentando valores indistinguibles de los del control (Figura 26A, C, D, F y G). Sorprendentemente, el silenciamiento de *Nrp1* en la L2/3 indujo alteraciones en la dinámica de refinamiento de la L4. A P16, contabilizamos cerca de un 70% de NPCs en S1 que se normaliza a P30, alcanzando valores control (Figura 26B, E y G). Por tanto, en el área S1, detectamos una alteración en la dinámica de refinamiento de la L4 en la condición *shNrp1*. Esta alteración produce un retraso en el proceso durante el desarrollo de la misma manera que en las neuronas vecinas, las NPCs

silenciadas de la L2/3. En el área S2, la L4 mantiene en el circuito adulto un porcentaje de NPCs cercano al 30%, presentando a P16 alrededor de un 40% de neuronas interhemisféricas (Figura 27A, D y G) (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Con nuestras manipulaciones, a P16, no detectamos diferencias en estas proporciones (Figura 27G). En cambio, a P30, pudimos contabilizar una reducción en el porcentaje de NPCs en la condición de silenciamiento (Figura 27B, E y G). La sobre-expresión de Nrp1 en la L2/3 no alteró el refinamiento de la L4 (Figura 27C, F y G). Por tanto, de nuevo, podemos aseverar que silenciar la expresión de Nrp1 afecta la dinámica de refinamiento, no sólo de las neuronas modificadas, sino de poblaciones de la L4 del área S2 que son incapaces de estabilizar sus proyecciones interhemisféricas.

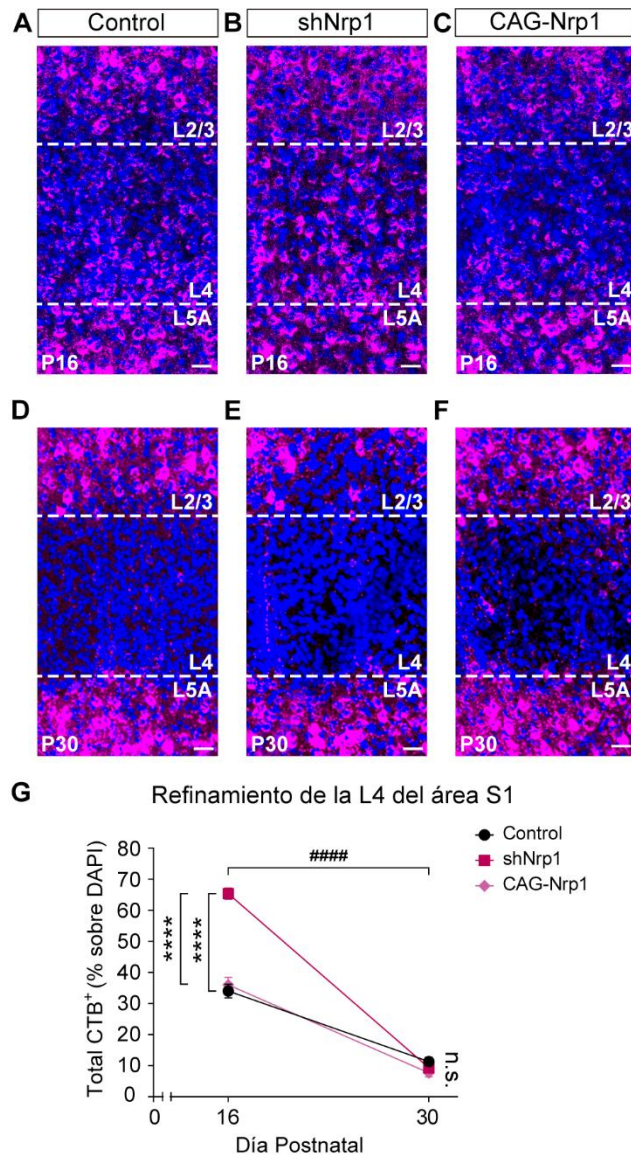


Figura 26: dinámica de refinamiento durante el desarrollo de NPC de la lámina 4 (desde P16 a P30) en el área S1. (A-F) Imágenes en detalle de columnas corticales del área S1 donde se presenta el marcaje obtenido por inyecciones de CTB-555 en línea media de cerebros electroporados (Magenta = CTB-555. Azul = DAPI. Escala = 25 μ m). A-C) Imágenes de secciones coronales de cerebros P16 electroporados en L2/3. D-F) Imágenes de secciones coronales de cerebros P30 electroporados en L2/3. (G) Gráfica de la proporción de NPC de L4 (CTB+/DAPI) en el área S1 desde P16 a P30. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones) (ANOVA de dos vías: P-valor Refinamiento de NPC de L4 en S1 < 0,0001 (#####); P-valor Día postnatal < 0,0001; P-valor Condición experimental < 0,0001. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P16 – shNrp1 P16 < 0,0001 (****), p-valor shNrp1 P16 – CAG-Nrp1 P16 < 0,0001 (****)).

Las alteraciones descritas en la dinámica de refinamiento de la L4 debidas al silenciamiento de Nrp1 en la L2/3 pueden explicarse mediante la presencia de mecanismos de competición-cooperación axonal. El retraso en el refinamiento que hemos descrito en el área S1 para neuronas del módulo superior podría

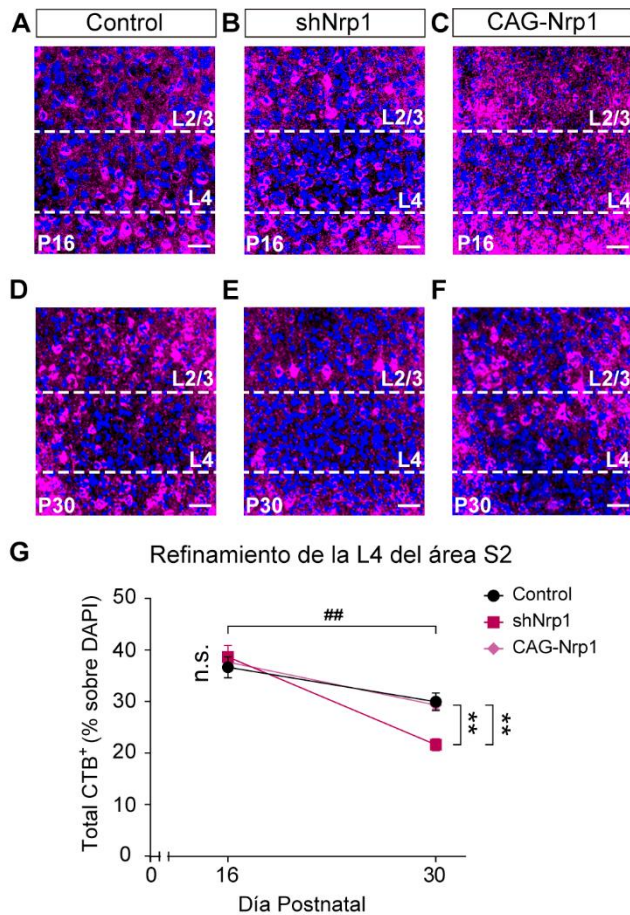


Figura 27: dinámica de refinamiento durante el desarrollo de NPC de la lámina 4 (desde P16 a P30) en el área S2. (A-F) Imágenes en detalle de columnas corticales del área S2 donde se presenta el marcaje obtenido por inyecciones de CTB-555 en línea media de cerebros electroporados (Magenta = CTB-555. Azul = DAPI. Escala = 25 μ m). A-C) Imágenes de secciones coronales de cerebros P16 electroporados en L2/3. D-F) Imágenes de secciones coronales de cerebros P30 electroporados en L2/3. (G) Gráfica de la proporción de NPC de L4 (CTB+/DAPI) en el área S2 desde P16 a P30. Media \pm EEM ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones) (ANOVA de dos vías: P-valor Refinamiento de NPC de L4 en S2 = 0,0098 (##); P-valor Día postnatal < 0,0001; P-valor Condición experimental = 0,1002. Test Post-hoc Tukey: p-valor Control P30 – shNrp1 P30 = 0,0041 (**), p-valor shNrp1 P30 – CAG-Nrp1 P30 = 0,0084 (**)).

indicar que, la falta de unos niveles correctos de expresión de Nrp1 para una de las subpoblaciones, incapacita a todas las proyecciones del módulo para decidir entre estabilizarse o retraerse. Aunque esta incapacidad no se mantiene en el tiempo ya que, en un estadio adulto, las proporciones de NPCs alcanzan unos valores de NPC control. En el caso del área S2, las neuronas L2/3 silenciadas ven afectada su capacidad de estabilización en el circuito adulto y, por tanto, esta incapacidad también se transfiere a neuronas de la lámina adyacente, la L4.

Generación de línea transgénica de inactivación condicional para *Cux1*

Diseño *in silico* de la estrategia experimental

El FT CUX1 se expresa en muchos de los tejidos del organismo, aunque el interés del presente trabajo, se basa en su patrón de expresión en corteza cerebral. En el telencéfalo dorsal del ratón, CUX1 se expresa en las láminas superiores de la corteza (Nieto *et al.*, 2004; Weiss and Nieto, 2019). La región del genoma que codifica para CUX1 contiene 24 exones que dan lugar a

diferentes ARN mensajeros. Los exones codifican para cuatro dominios de unión a ADN: tres dominios CUT y un homeodominio. El exón 23 codifica la parte C-terminal del homeodominio que incluye la señal de localización nuclear de la proteína (Ramdzan and Nepveu, 2014). Gracias a la presencia de esta señal, CUX1 es traslocado al núcleo, pudiendo así ejercer sus funciones reguladoras de la transcripción. Para generar un alelo condicional nulo con garantías de eliminar la expresión y la funcionalidad de Cux1, nuestra estrategia se basó en *floxear* el exón 23. El anglicismo *floxear* da nombre a la estrategia que consiste en insertar secuencias *LoxP* flanqueantes a la región que se desea eliminar. Estas secuencias son reconocidas por la enzima CRE recombinasa, que actúa produciendo un bucle en el ADN y elimina la secuencia dentro del bucle (Figura 28A) (Sauer, 1998; Kim *et al.*, 2018). De esta manera, la eliminación de la localización nuclear de CUX1 se conseguiría de forma tejido-específica a través del uso de CRE-recombinasas específicas (Kim *et al.*, 2018) y/o, en la ventana temporal deseada con el uso de CRE-recombinasas inducibles (como la CRE-ERT o CRE-Dox) (Figura 28B) (Brocard *et al.*, 1997).

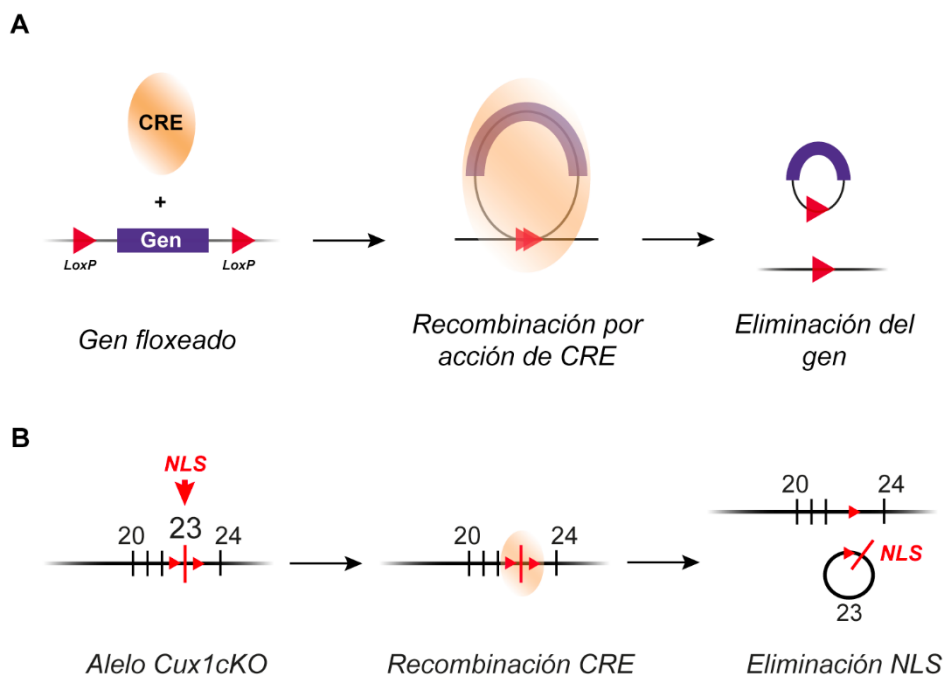


Figura 28: acción de la recombinación mediada por CRE en el modelo de inactivación condicional de Cux1. (A) Mecanismo de acción de la CRE recombinasa. Ante la presencia de secuencias *LoxP*, esta recombinasa media la generación de un bucle en el ADN y, posteriormente, corta este bucle, eliminándolo del genoma. Por tanto, con la inserción de secuencias *LoxP* se logra la eliminación de regiones concretas de un gen en el genoma deseado. (B) En el locus donde se encuentra codificado Cux1, el modelo condicional de inactivación contiene dos secuencias *LoxP* flanqueando al exón 23. Este exón contiene codificada una señal de localización nuclear (NLS) que, con la modificación realizada, se eliminará tras la recombinación mediada por CRE.

Para generar el alelo mutante recurrimos al abordaje experimental basado en la publicación del sistema *Easi-CRISPR* (Quadros *et al.*, 2017; Miura *et al.*, 2018). Esta aproximación utiliza el sistema CRISPR/Cas9 combinado con el uso de moléculas de ADN sintético de cadena simple (ADNcs) con secuencia homóloga a la región objetivo. Mediante el empleo de guías de ARN específicas se producen cortes de doble cadena (del inglés, *double-strand breaks-DSB*) en la región objetivo del genoma del ratón. Estos cortes, idealmente, serían reparados por reparación directa homóloga (del inglés, *homologous-direct repair-HDR*) usando como molde la molécula sintética de ADNcs que, en nuestro caso, se correspondía al exón 23 *salvaje* de *Cux1* flanqueado por dos secuencias *Loxp*. *Easi-CRISPR* presenta la limitación del tamaño de las moléculas donantes de ADNcs que no deben superar las 2 kilobases. Teniendo en cuenta estos parámetros, el primer paso consistió en el diseño de guías de ARN para inducir dos cortes en el genoma, en los intrones que flanquean al exón 23. Con estos cortes, dirigimos la reparación de la región a la inserción por HDR de la molécula sintética de ADNcs que contiene las secuencias *LoxP* rodeando al exón. Para el diseño de estas secuencias de ARN, empleamos la herramienta desarrollada por el grupo de Oliveros, J. C. en el Centro Nacional de Biotecnología-CSIC denominada *Breaking-Cas* (Oliveros *et al.*, 2016) usando la secuencia consenso de *Cux1* (ENSMUSG00000029705) de la plataforma *Ensembl* para el fondo genético C57BL/6J del ratón (Chinwalla *et al.*, 2002; Howe *et al.*, 2021). De esta secuencia, analizamos el intrón 5' al exón 23 y el intrón 3' con la herramienta *Breaking-Cas*. Debido a que, con esta estrategia, sólo son necesarios unos brazos de homología de unos 150 pb, analizamos estos fragmentos *aguas arriba* y *aguas abajo* al exón 23, obteniendo múltiples candidatos de los cuales fueron seleccionados los dos con mejor puntuación de cada región (Figura 29).

En cuanto al tipo de sistema de *CRISPR-Cas* empleado, basamos nuestro trabajo en el uso del sistema "clásico" de cRNP, conformados por la proteína Cas9 y dos ARN: ARNcr (en inglés, *crisprRNA-crRNA*) y ARNtracr (en inglés, *trans-activating crispr RNA-tracrRNA*). Las secuencias de ARN diseñadas anteriormente son las correspondientes a los ARNcr, secuencias que reconocen específicamente regiones del genoma mediante el sistema de *CRISPR-Cas9*.

Por otro lado, las secuencias de ARNtracr están determinadas por la casa comercial donde adquirimos el sistema (IDT[®]).

A

START↓	END↓	STRAND↓	OLIGO↓	ONTARGETS↓	OFFTARGETS↓	GENES↓	SCORE↓
63	82	-	TACATACTAAGACCTAGAGTGGG	1	131	70	83.1
151	170	-	CATATAGTCTGAGTGTGGTGGG	1	100	49	82.4
19	38	+	TGAGCTACAGCCCAGCTATTGG	1	142	97	80.7
62	81	-	ACATACTAAGACCTAGAGTGGG	1	136	63	80.5
61	80	-	CATACTAAGACCTAGAGTGGG	1	102	44	77.6
64	83	-	CTACATACTAAGACCTAGAGTGG	1	130	75	77.4

ARN guías para la región 5'

B

START↓	END↓	STRAND↓	OLIGO↓	ONTARGETS↓	OFFTARGETS↓	GENES↓	SCORE↓
190	209	+	CAACCACCTTATAGGACCTTGGG	1	72	46	87
196	215	-	CATCCCAAGTCCCTATAAGGTGG	1	109	71	85.5
199	218	-	GTCCATCCCAAGTCCCTATAAGG	1	112	57	83
192	211	-	CCAAGTCCCTATAAGGTGGTGG	1	112	67	82.4
255	274	-	GCACCACCAGTGAACCAGCAGG	1	98	75	80.7
144	163	+	ATGTGCATGCTCGAAGTCAGAGG	1	124	80	80.6

ARN guías para la región 3'

Figura 29: resultado del análisis *in silico* de las regiones intrónicas flanqueantes al exón 23 de *Cux1*, para la búsqueda de dianas para el sistema CRISPR-Cas9. Se emplea la herramienta *Breaking-Cas* (Oliveros, J.C., et al. 2016). (A) Resultado de las seis mejores dianas para el extremo 5' del intrón que flanquea al exón 23. En rojo se muestran marcadas las dos dianas candidatas seleccionadas. (B) Resultado de las seis mejores dianas para el extremo 3' del intrón que flanquea al exón 23. En rojo se muestran marcadas las dos dianas candidatas seleccionadas.

Por otro lado, el diseño del ADNcs sintético se realizó usando, de nuevo, la secuencia consenso de *Cux1* de *Ensembl*. Escogimos unas 250 pb 5' al exón 23 donde, *in silico*, insertamos la secuencia *LoxP* wt (Missirlis *et al.*, 2006) y una diana única de restricción (*EcoRV*). En el intrón 3', seleccionamos 311 pb e insertamos otra secuencia *LoxP* largo sintético (80 pb) y otra diana única de restricción (*XbaI*). Este *LoxP* modificado añade dos extremos a la secuencia central palindrómica que facilitan el posterior genotipado de la línea. El resultado fue una molécula de ADNcs de 950 pb, con ambas secuencias *LoxP* insertadas y con los brazos de homología requeridos por el sistema *Easi-CRISPR*. Esta molécula se sintetizó por el servicio externo *Megamer ssDNA Fragments* ofrecido por la compañía IDT[®] (Figura 30).

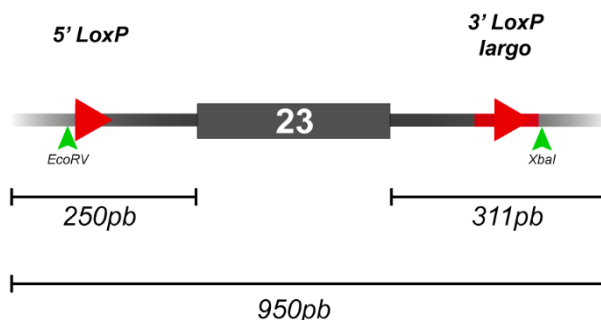


Figura 30: esquema del diseño del ADNcs empleado para el procedimiento de *Easi-CRISPR* llevado a cabo en la generación del modelo de inactivación condicional de *Cux1*. Se añaden dos secuencias *LoxP* flanqueando al exón 23. En el extremo 5', se añade una secuencia *LoxP* y una diana para *EcoRV*. En el extremo 3', se añade una secuencia *LoxP* largo (que contiene añadida una secuencia que, posteriormente, servirá para optimizar el genotipado) y una diana para *XbaI*. El tamaño total del ADNcs sintético es de 950 pb.

Comprobación *in vitro* de la eficiencia de corte de los complejos ribonucleoprotéicos de Cas9

Previamente a las inyecciones en embriones comprobamos la eficiencia de corte de las secuencias guía seleccionadas. Para ello, llevamos a cabo un ensayo *in vitro* de digestión de ADN (del inglés, *IDA assay*) que presenta ventajas tales como su rapidez y facilidad técnica (Mehravar *et al.*, 2019). El ensayo consiste en la generación de productos de PCR que contengan la secuencia diana de la guía en una región intermedia. Tras la digestión, el resultado de la misma se somete a una electroforesis que permite medir la eficiencia de corte en base a la cantidad de producto digerido respecto a la cantidad inicial de ADN molde. Es por este tipo de análisis que es necesario diseñar los cebadores de manera que el producto de PCR generado contenga a la diana de la guía a ensayar en la región intermedia, generándose así fragmentos de menor tamaño que representan el producto de PCR digerido (Figura 31).

Para este ensayo, diseñamos dos parejas de cebadores. Una para el producto en el que se ensayaron las guías del extremo 5' al exón 23 y, la otra pareja, para el molde del extremo 3' (Figura 31A). Una vez obtenidos los productos de PCR deseados, procedimos a formar los cRNP. Estos complejos se auto-ensamblan en presencia de la proteína Cas9, el ARNtracr y el ARNcr (que contiene la secuencia guía), en una incubación a 25°C. Tras la formación de los cuatro complejos, dos para cada producto de PCR (o extremo a ensayar), estos se emplearon para digerir los productos en una incubación a 37°C durante dos horas (Figura 31B). La digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa (Figura 31C). El resultado se analizó por densitometría de las bandas, obteniendo una eficiencia de corte de la guía 1 del extremo 5' y de la guía 1 del extremo 3' cercana al 40% (Figura 31D), siendo estas guías las elegidas finalmente para la inyección en embriones.

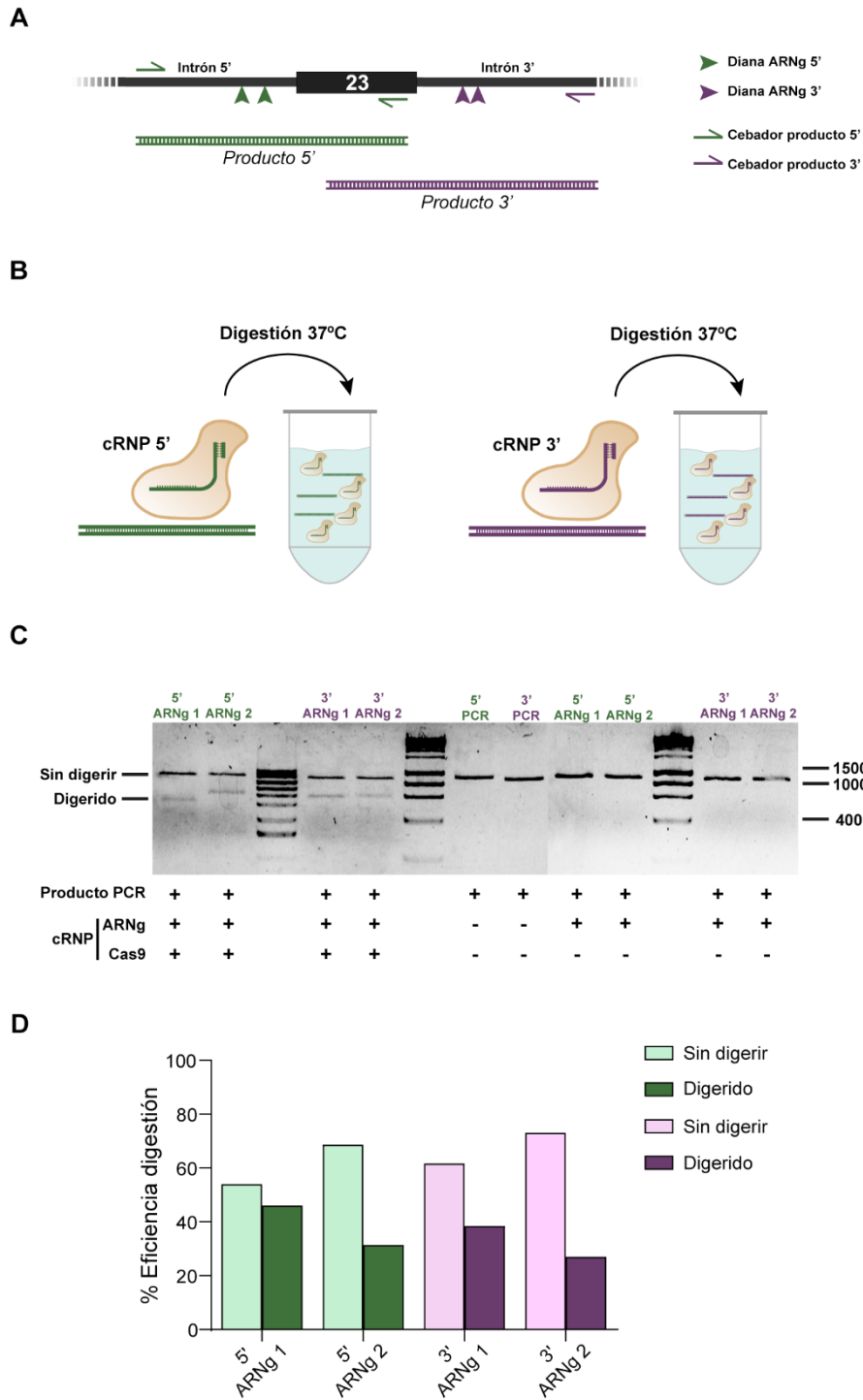


Figura 31: ensayo de eficiencia *in vitro* de las guías de ARN para el sistema CRISPR-Cas9. (A) En primer lugar, se diseñaron cebadores para amplificar dos productos de PCR que servirán como sustrato en el ensayo de eficiencia. Por un lado, se obtienen por PCR dos productos que contienen al intrón 5' y parte del exón 23 (producto 5') y, al intrón 3' y parte del exón 23 (producto 3'). Estos productos contienen en su secuencia las dianas de las guías escogidas para cada extremo, en regiones intermedias de los mismos. (B) El ensayo se lleva a cabo en una incubación a 37°C de los productos de PCR obtenidos con los cRNP correspondientes a cada guía. Los productos se ensayan individualmente dependiendo del extremo y la guía ensayada. (C) Resultado de la electroforesis en gel de agarosa del ensayo de digestión. El corte producido por los cRNP produce el cambio de migración del producto de PCR, presentando bandas de menor tamaño. (D) Cuantificación de la eficiencia de digestión. Se cuantificó la intensidad de cada banda digerida y se relativizó al valor del producto de PCR sin digerir (los valores se expresan en porcentaje de intensidad de banda con respecto a la intensidad de la banda del producto sin digerir).

Inyección de ADNcs y complejos ribonucleoprotéicos en embriones de ratón

Una vez comprobada la eficiencia de los complejos RNP, procedimos a la microinyección de embriones. Para ello, empleamos una mezcla del ADNcs y dos RNP: uno para el corte en el intrón 5' (cRNP-5') y otro para el corte en el intrón 3' (cRNP-3'). La inyección fue realizada por el servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología, en colaboración con Verónica Domínguez y M^a Belén Pintado, en embriones en estadio de 8 células, siguiendo sus procedimientos experimentales. Una vez realizadas las inyecciones, los embriones se implantaron en hembras receptoras de fondo genético B6/CBA(F1) que llevaron a cabo la gestación de los mismos. Este fondo genético híbrido es el resultado del cruce entre hembras de fondo C57BL/6J y machos CBA/J, presentando heterocigosis en todos sus loci. Presenta la ventaja de ser uniforme genética y fenotípicamente, confiriendo estabilidad para el establecimiento de mutaciones o la inserción de secuencias exógenas o transgenes.

Genotipado de la generación fundadora de la línea *Cux1cKO*

Los animales nacidos de las hembras receptoras constituyen la generación fundadora (F0) de la línea transgénica generada en la presente tesis doctoral. Para su genotipado, diseñamos una batería de cebadores que permite comprobar los posibles alelos generados tras la modificación. El escenario ideal es aquel en el que los cRNP han generado los dos cortes flanqueantes al exón 23 de *Cux1* y, mediante reparación homóloga directa, se ha insertado el ADNcs modificado en el genoma, pero pueden ocurrir otros eventos que han de ser analizados. En primer lugar, el corte de doble cadena inducido por acción de Cas9 puede ser reparado por otras vías (Cubbon *et al.*, 2018; Scully *et al.*, 2019). Una de estas vías es la unión de extremos no homóloga (en inglés, *non-homologous end-joining* o *NHEJ*) que eliminaría la región situada entre ambos cortes, eliminándose así el exón 23. Otra posibilidad es la de la inserción parcial del ADNcs bien por la ineficiencia de corte de uno de los cRNP, bien por la posible degradación de esta molécula donante. Por ello, era necesario diseñar una estrategia de genotipado que abarque todas estas posibilidades (Figura 32A).

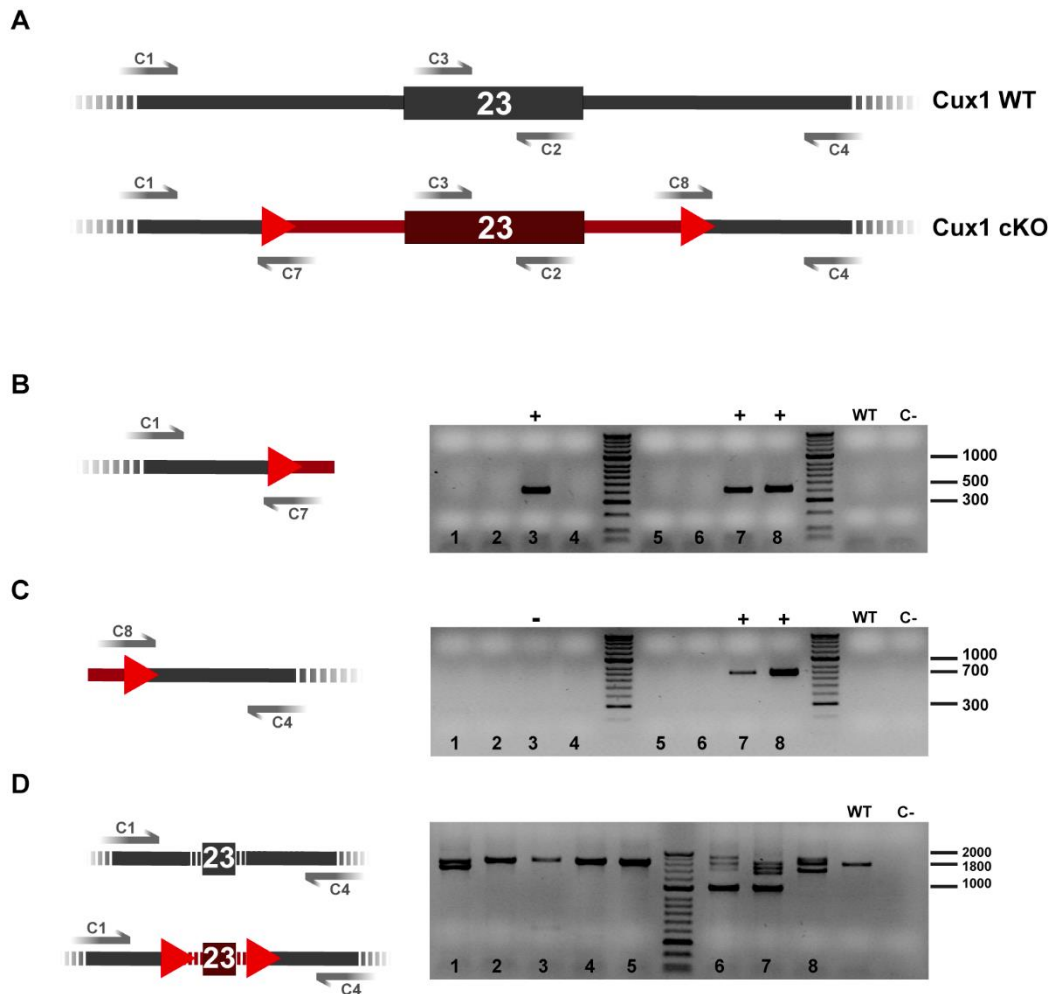


Figura 32: genotipado de la generación fundadora (F0) de la línea de inactivación condicional para *Cux1* (*Cux1* cKO). (A) Diseño de los diferentes cebadores para el genotipado completo de la modificación realizada en los intrones flanqueantes al exón 23 de *Cux1*. (B) La pareja de cebadores C1 y C7 permite comprobar la inserción del *LoxP* 5' en el intrón deseado. En el panel de la derecha se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de una PCR con esta combinación de cebadores sobre ADN genómico extraído de biopsias de los animales de la F0 (producto de 402 pb). En esta camada, se obtuvieron tres animales positivos para esta inserción (#3, #7 y #8). (C) La pareja de cebadores C8 y C4 sirve para comprobar la inserción del *LoxP* largo 3' en el intrón deseado (producto de 609 pb). En el panel de la derecha, se muestra el resultado de la PCR, observándose dos animales positivos para esta inserción (#7 y #8). (D) La combinación de los cebadores C1 y C4 permite analizar los diferentes alelos presentes en cada animal de la F0, distinguiéndose estos por las diferencias de tamaño de los productos de PCR obtenidos. En este caso, los candidatos #7 y #8, que resultaron positivos para las PCR anteriores, presentan el alelo WT (1570 pb) y el alelo *Cux1* cKO (1696 pb), aunque el candidato #7 también presenta un alelo con una delección (~1000 pb), por lo que el candidato elegido como fundador fue el #8.

En primer lugar, comprobamos la inserción de los *LoxP*. En el caso del *LoxP*-5' obtuvimos 3 posibles candidatos positivos (Figura 32B). Para el *LoxP*-3', sólo dos de los tres candidatos anteriores fueron positivos (Figura 32C). Ambos *LoxP* estaban insertados en el locus de *Cux1* en estos animales. El siguiente paso fue comprobar si el ADN sintético estaba integrado por completo. Uno de los candidatos presentaba un alelo con la modificación íntegra y, además, su otro alelo no presentaba el exón deleccionado, al contrario que el otro candidato

(Figura 32D). Por tanto, el mejor candidato resultó ser la hembra #8. Esta hembra se cruzó con un macho de fondo C57BL/6J con el primer objetivo de comprobar si existía transmisión hereditaria de la modificación (Figura 33A). En la estrategia original de *Easi-CRISPR*, esta comprobación no es necesaria ya que la modificación se realiza a nivel de cigoto, pero en nuestro caso, realizamos las inyecciones a estadio de 8 células y cabía la posibilidad de que la modificación afectase únicamente a células somáticas. El segundo objetivo de este cruce fue el de comenzar el establecimiento del fondo genético puro C57BL/6J (con el alelo *salvaje* de *Cux1*, en adelante *Cux1^{wt}*), partiendo del fondo mixto de la hembra fundadora. Tras la obtención de la primera camada, genotipamos los animales y confirmamos la transmisión del alelo modificado *floxeado* (en adelante, alelo *Cux1^f*), en proporciones mendelianas de acuerdo con la heterocigosis de la hembra del cruce parental (Figura 33B-D).

Secuenciación del alelo modificado en la primera generación (F1) de la línea *Cux1cKO*

Una vez que pudimos comprobar por PCR que la inserción de la secuencia modificada en la región de *Cux1* se había producido correctamente, fue necesario también secuenciar la región para descartar posibles mutaciones que pudiesen alterar la integridad de los *LoxP*, de los intrones o el marco de lectura del exón 23. Para ello, diseñamos cebadores que amplifican un fragmento de unas 1700 pb que contiene a la secuencia insertada. De los 6 animales positivos obtenidos en la F1, escogimos tres machos de los que se extrajo una muestra de su ADN genómico. Usando este ADN como molde, realizamos PCR de alta fidelidad usando una polimerasa basada en *Taq*. Con los productos de PCR, realizamos un clonaje usando la técnica *TA cloning* (Holton and Graham, 1991). Posteriormente, tras la transformación de bacterias competentes, se secuenciaron seis colonias procedentes de cada clonaje, es decir, del genómico de cada animal (Figura 34). Los resultados de la secuenciación no mostraron ninguna mutación significativa ni en las secuencias *LoxP*, el exón 23 ni en los intrones. Tras estas comprobaciones, comenzamos el establecimiento del fondo genético en C57BL/6J a través de cruces sucesivos de heterocigotos *Cux1^{wt/f}*

hasta alcanzar la F9 (donde el fondo genético será un 99,8% el deseado) (Martín Zúñiga *et al.*, 2011).

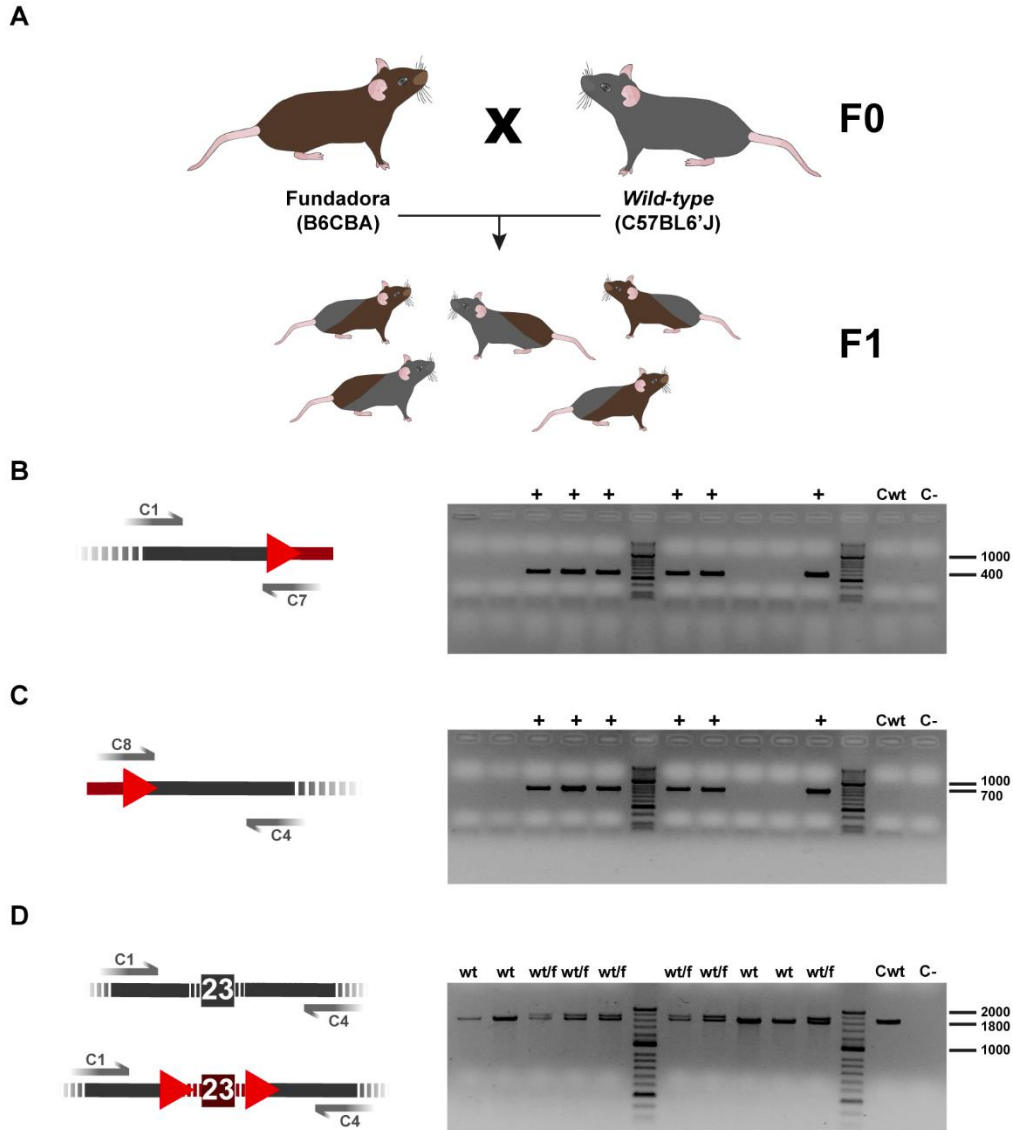


Figura 33: genotipado de la primera generación (F1) de la línea de inactivación condicional para *Cux1* (*Cux1* cKO). (A) El animal fundador (F0) obtenido se cruzó con un ratón de fondo C57BL6'J para comprobar la transmisión hereditaria de la modificación. (B) Con los cebadores C1 y C7 se comprobó la inserción del LoxP 5' (producto de 402 pb). En el panel de la derecha se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la PCR, donde se observan 6 animales positivos. (C) Con los cebadores C8 y C4 se comprobó la inserción del LoxP largo 3'. En el panel de la derecha se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la PCR (producto de 609 pb), donde se observan los mismos animales positivos. (D) Los cebadores C1 y C4 permiten comprobar los alelos presentes de *Cux1* para la modificación realizada (wild-type: 1570 pb, floxeado: 1696 pb). Los resultados obtenidos en el gel de agarosa muestran unos porcentajes de heterocigosis correctos (40% homocigotos wild-type y 60% heterocigotos) y, además, la ausencia de posibles alelos deletados.

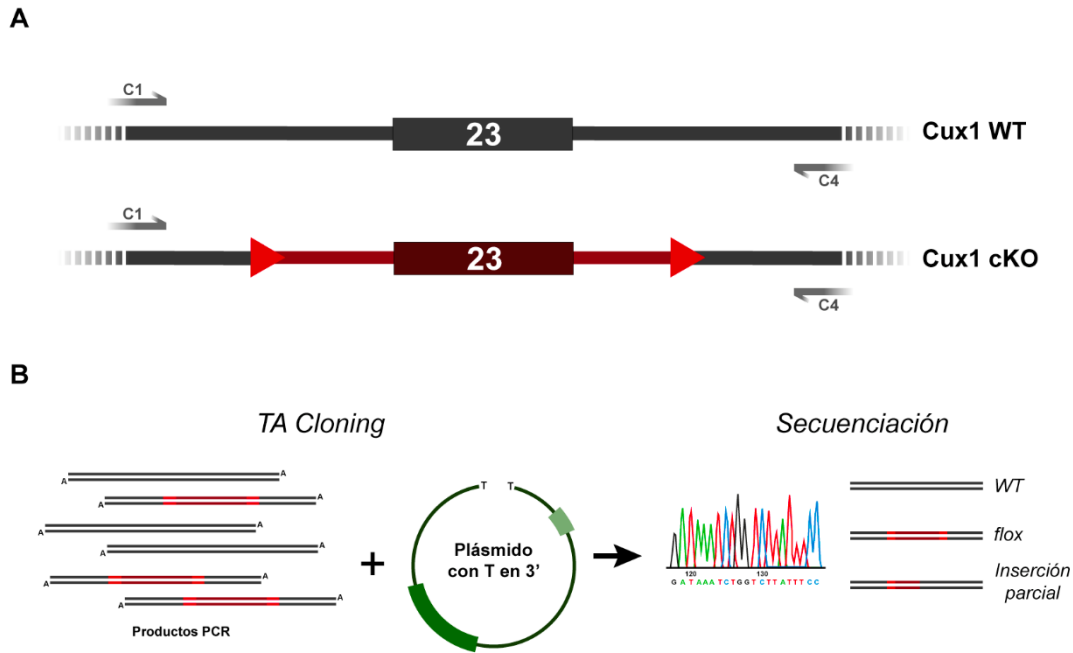


Figura 34: estrategia de secuenciación de la F1 de la línea de inactivación condicional de *Cux1*. (A) En primer lugar, se obtienen productos de PCR empleando los cebadores C1 y C4 con una polimerasa de alta fidelidad que no introduzca errores durante la amplificación. (B) Estos productos de PCR obtenidos, que representan tanto al alelo wt como al alelo floxeado, se clonan usando la estrategia TA Cloning, y se transforman en bacterias competentes. Las colonias obtenidas se secuencian individualmente para comprobar los posibles alelos presentes en la F1 y posibles mutaciones generadas en el proceso.

Generación de *Cux1cKO* heterocigoto mediante el cruce con la línea *Sox2-CRE*

La inactivación completa en línea germinal de *Cux1* en ratón es letal al nacimiento (Tufarelli *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002). Por ello, una forma de comprobar si la modificación que hemos realizado posee un fenotipo de inactivación génica similar a líneas transgénicas previas, cruzamos un animal heterocigoto para nuestra modificación (*Cux1^{wt/f}*) con un heterocigoto *Sox2-CRE*. La línea *Sox2-CRE* es una línea transgénica que expresa CRE recombinasa bajo el control del promotor del gen *Sox2*. Cuando esta línea se cruza con ratones que contengan secuencias *floxeadas*, la recombinación mediada por CRE resulta en la eliminación de estas regiones en las células que expresan activamente *Sox2*. En este caso, se genera la modificación en células derivadas del epiblasto durante el desarrollo embrionario de la progenie del cruce aunque, además, la expresión de CRE es activa en línea germinal en las hembras, permitiendo así la transmisión hereditaria de la modificación (Hayashi *et al.*, 2002).

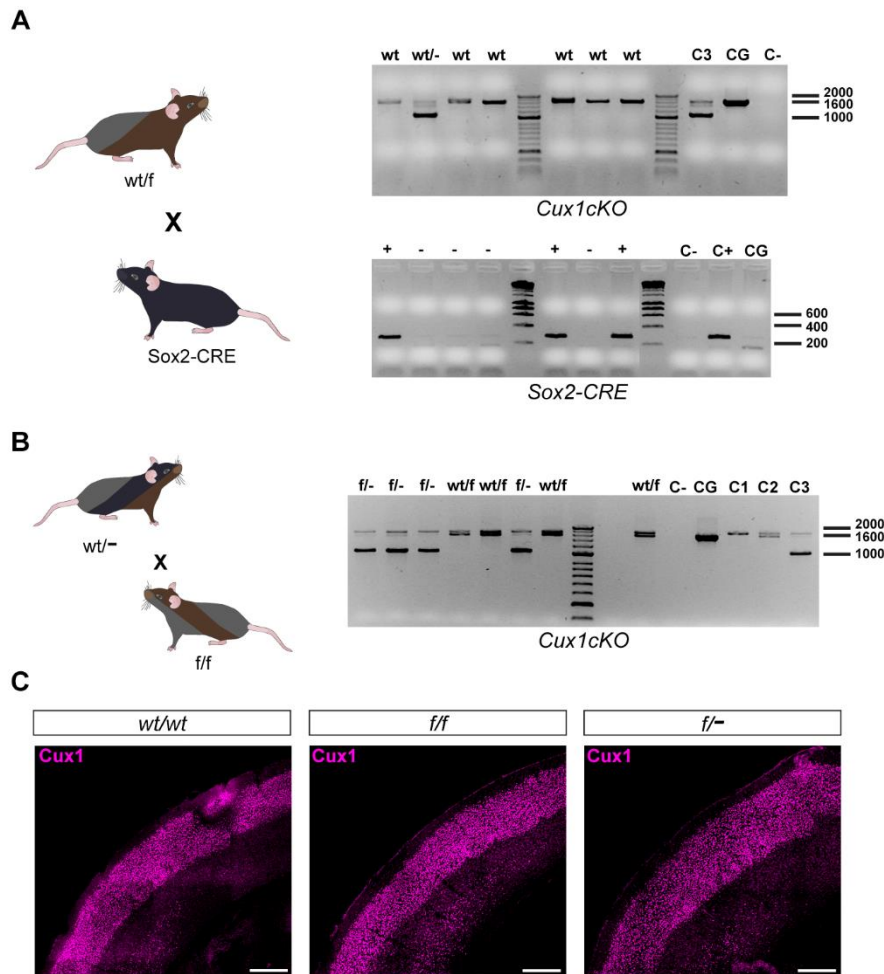


Figura 35: obtención de una línea de *Cux1* cKO en heterocigosis. (A) Animales heterocigotos *wt/f* se cruzaron con animales hemocigotos *Sox2-CRE* para inducir el corte del exón 23 de *Cux1* en todo el organismo. En el primer gel de agarosa se muestra el resultado del genotipado con los cebadores C1 y C4 de la camada obtenida del cruce anterior, observándose únicamente 1 animal con el exón 23 deletado. En el segundo gel se muestra el resultado del genotipado para el gen *Sox2*. El candidato con el alelo de *Cux1* deletado resultó no tener la modificación de CRE, por lo que fue seleccionado para establecer la línea heterocigota. (B) El animal con el alelo deletado se cruzó con un animal homocigoto *f/f* para obtener el genotipo *f/-*. En el gel de agarosa del panel de la derecha se observa la obtención de 4 animales *f/-* y 4 *wt/f*, en unas proporciones de heterocigosis correctas. (C) Caracterización de la expresión de *Cux1* en corteza. Los animales de los genotipos *wt/wt*, *f/f* y *f/-* presentan un patrón de expresión indistinguible (Magenta = *Cux1*. Escala = 300 μ m).

La descendencia del primer cruce resultó en animales heterocigotos para *Cux1*, presentando el alelo *wt* de *Cux1* (provenientes del genoma de la línea *Sox2-CRE*) y el alelo con el exón 23 eliminado por acción de CRE (en adelante, alelo *Cux1*⁻) (Figura 35A). Posteriormente, cruzamos los animales *Cux1*^{wt/-} de esta camada que no heredaron el alelo modificado *Sox2-CRE* con animales *Cux1*^{f/f} y, de esta manera, obtuvimos animales heterocigotos para nuestra modificación (*Cux1*^{f/-}) (Figura 35B). Estos animales presentan un patrón de expresión de CUX1 en corteza similar al patrón *salvaje* (Figura 35C). Tras la obtención de los

heterocigotos, los cruzamos entre sí para expandir la línea y así comprobar la posible inviabilidad del genotipo de inactivación en homocigosis (*Cux1*^{-/-}) predicha en base a los estudios anteriores. En el momento del destete, ningún animal resultante de este último cruce presentó el genotipo homocigoto de inactivación, por lo que pudimos inferir que la eliminación del exón 23 de *Cux1* en homocigosis y de forma ubicua en el ratón, presenta un fenotipo de letalidad postnatal similar a las otras líneas transgénicas *knock-out* descritas anteriormente.

La inactivación de *Cux1* en las neuronas de la lámina 2/3 no afecta su identidad interhemisférica

La línea transgénica que hemos generado en la presente tesis permite eliminar la expresión de *Cux1* de forma selectiva, tanto a nivel de área funcional, de lámina cortical o de momento del desarrollo. En este caso, decidimos centrar nuestro interés en estudiar la L2/3 de la corteza SS. Trabajos previos del laboratorio demostraron que el silenciamiento de este FT impedía la estabilización de proyecciones interhemisféricas de la L2/3 en el área SS de la corteza cerebral del ratón. *Cux1* parece regular este proceso a través del control transcripcional de canales iónicos de potasio dependientes de voltaje, que establecen propiedades electrofisiológicas en estas neuronas que les permiten estabilizar sus proyecciones callosas (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016). En base a estos resultados, nos propusimos explorar las consecuencias derivadas de la inactivación de *Cux1* en neuronas L2/3. Para ello, empleamos animales con genotipo *Cux1*^{ff} y *Cux1*^{f/-} para estudiar el fenotipo de inervación contralateral que se produce ante la inactivación génica de *Cux1*. Realizamos EIU a E15,5 con una combinación de plásmidos para visualizar las neuronas L2/3 y sus proyecciones, con GFP y, además, inducir la inactivación de *Cux1* con CRE recombinasa (Figura 36A). En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de CUX1 en las neuronas GFP⁺ a día P21. Las neuronas electroporadas de la condición control presentan un marcaje de CUX1 situado, principalmente, en el núcleo (Figura 36B). Las neuronas GFP⁺ de animales *Cux1*^{ff} y *Cux1*^{f/-} ven reducida la expresión y localización nuclear de CUX1 de forma significativa (Figura 36C-D y F). La expresión y localización nuclear se recupera en animales

Cux1^{ff} en los que electroporamos, además de las construcciones anteriores, un plásmido para sobre-expresar CUX1 (CAG-Cux1) (Figura 36E y F).

En cuanto al análisis de la invasión contralateral, estudiamos los patrones de invasión sobre secciones coronales de cerebros a día P21 y electroporados con las combinaciones de plásmidos descritas en anteriormente (Figura 37A). Los genotipos *Cux1^{ff}* y *Cux1^{f/-}* presentaron un incremento de invasión contralateral en el área S1, contrariamente a los resultados obtenidos previamente con el silenciamiento de *Cux1* (Figura 37D, F y H). El patrón de invasión en la situación de sobre-expresión de CUX1 sobre animales *Cux1^{ff}* (L2/3 *Cux1^{-/-}*) presenta un fenotipo más cercano a la condición control, sin presentar las ramificaciones deslocalizadas en S1 de las condiciones de inactivación (Figura 37 D y J).

Para cuantificar las diferencias fenotípicas observadas, escogimos RDIs sobre las secciones coronales de estos cerebros y medimos la fluorescencia de los axones contralaterales en cada condición (Figura 38A-C, paneles izquierda). Este análisis reveló un incremento global de invasión contralateral en los animales *Cux1^{ff}* y *Cux1^{f/-}* electroporados con plásmidos CRE a E15,5, que se ve recuperado con la sobre-expresión de CUX1 (Figura 38A). Analizando la región correspondiente al área somatosensorial primaria, observamos un incremento en la invasión contralateral de 2,5 veces en las condiciones de inactivación de *Cux1* con respecto a la invasión detectada en la condición control y de sobre-expresión (Figura 38B). En cuanto al área S2, aunque no detectamos diferencias estadísticamente significativas, sí que observamos una tendencia similar a la del área S1, con incremento de invasión en las condiciones de inactivación (Figura 38C). Con estos resultados pudimos describir la presencia de un fenotipo contrario al observado con el silenciamiento de *Cux1*. La inactivación específica de *Cux1* en neuronas de la L2/3 induce, a día P21, una ganancia de ramificaciones axonales contralaterales mientras que su silenciamiento produce una reducción de invasión. Estos resultados hacen necesaria una exploración en mayor profundidad de los mecanismos que se ven afectados por la inactivación y por el silenciamiento y que provocan efectos contrarios en el patrón de invasión contralateral.

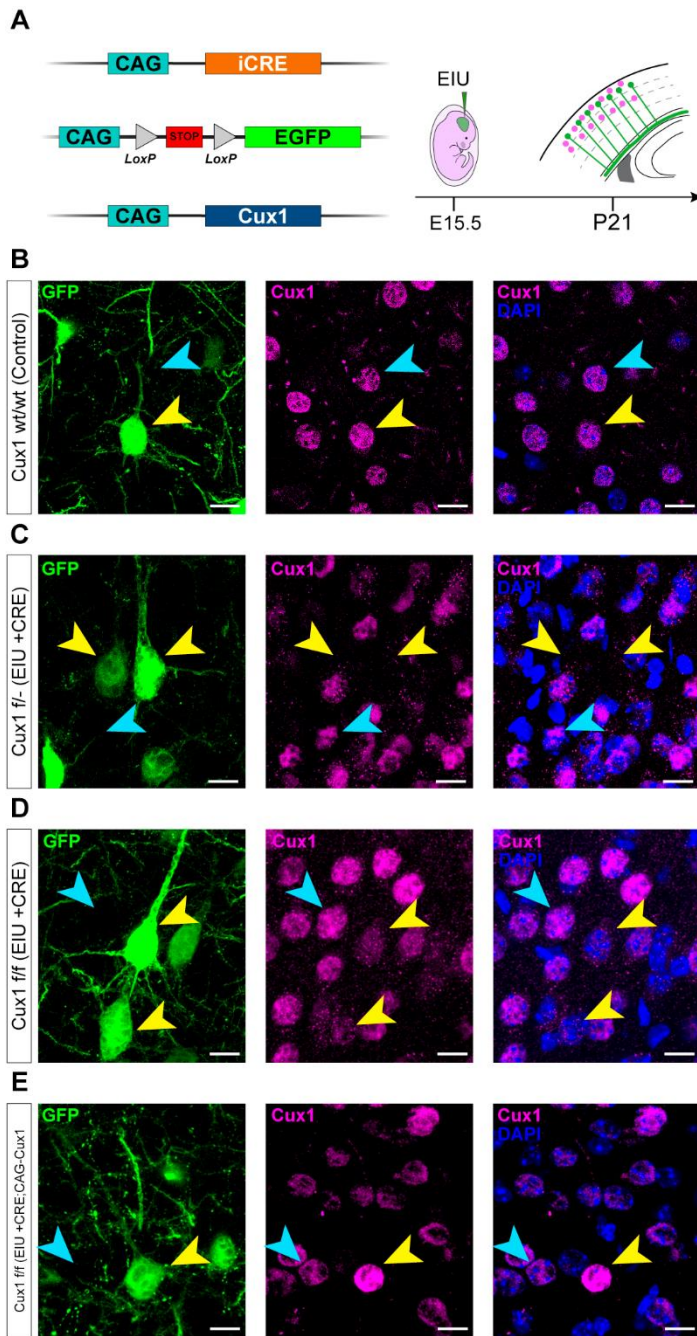
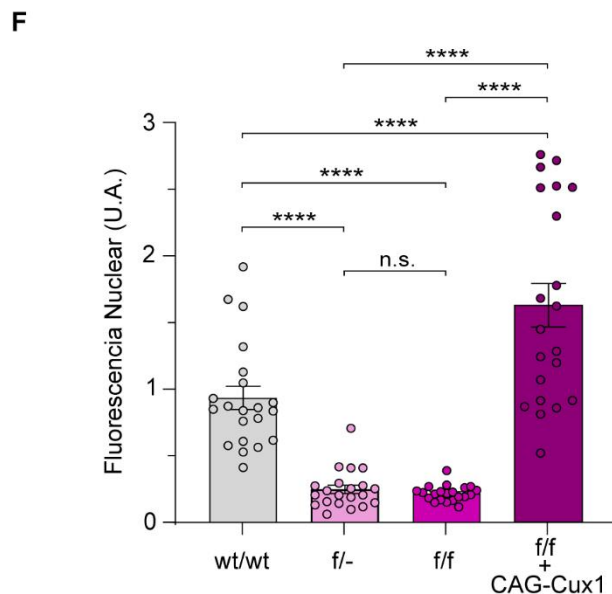


Figura 36: análisis de la expresión de *Cux1* en neuronas de la lámina 2/3 electroporadas. (A) La combinación de plásmidos empleados contiene: CALNL-GFP (vector de expresión condicional de GFP), CAG-iCRE (CRE recombinasa) y/o CAG-Cux1 (sobre-expresión de *Cux1*). En primer lugar, se realizaron EIU a día E15,5 con diferentes combinaciones de los plásmidos anteriores. Los cerebros fueron procesados a día P21 para estudiar el patrón de expresión de CUX1 en las neuronas electroporadas. (B-E) Imágenes de alta magnificación que muestran neuronas electroporadas (flecha amarilla) y no electroporadas (flecha azul) de L2/3 de los cuatro genotipos analizados (Verde = GFP. Magenta = Cux1. Azul = DAPI. Escala = 10 μ m). B) Patrón expresión *Cux1* en neuronas L2/3 control (con genotipo para *Cux1* wt/wt). C) Imágenes de alta magnificación de neuronas L2/3 de un animal heterocigoto (*Cux1* f/- – EIU +CRE). D) Imágenes de alta magnificación de neuronas L2/3 de un animal homocigoto floxeado (*Cux1* f/f – EIU +CRE). E) Imágenes de alta magnificación de neuronas L2/3 de un animal homocigoto floxeado y electroporado con CAG-Cux1 (*Cux1* f/f – EIU +CRE + CAG-Cux1). (F) Señal de fluorescencia nuclear de *Cux1*. Los valores de fluorescencia están normalizados al promedio del valor de fluorescencia de neuronas GFP- de cada condición experimental. Media \pm EEM ($n \leq 3$ cerebros, 21 células para todas las condiciones) (ANOVA de una vía: P -valor $< 0,0001$. Test Post-hoc Tukey: **** p -valor wt/wt – f/- $< 0,0001$, **** p -valor wt/wt – f/f $< 0,0001$, **** p -valor wt/wt – f/f + CAG-Cux1 $< 0,0001$, p -valor f/- - f/f = 0,9963 (n.s.), **** p -valor f/- - f/f + CAG-Cux1 $< 0,0001$, **** p -valor f/f – f/f + CAG-Cux1 $< 0,0001$).



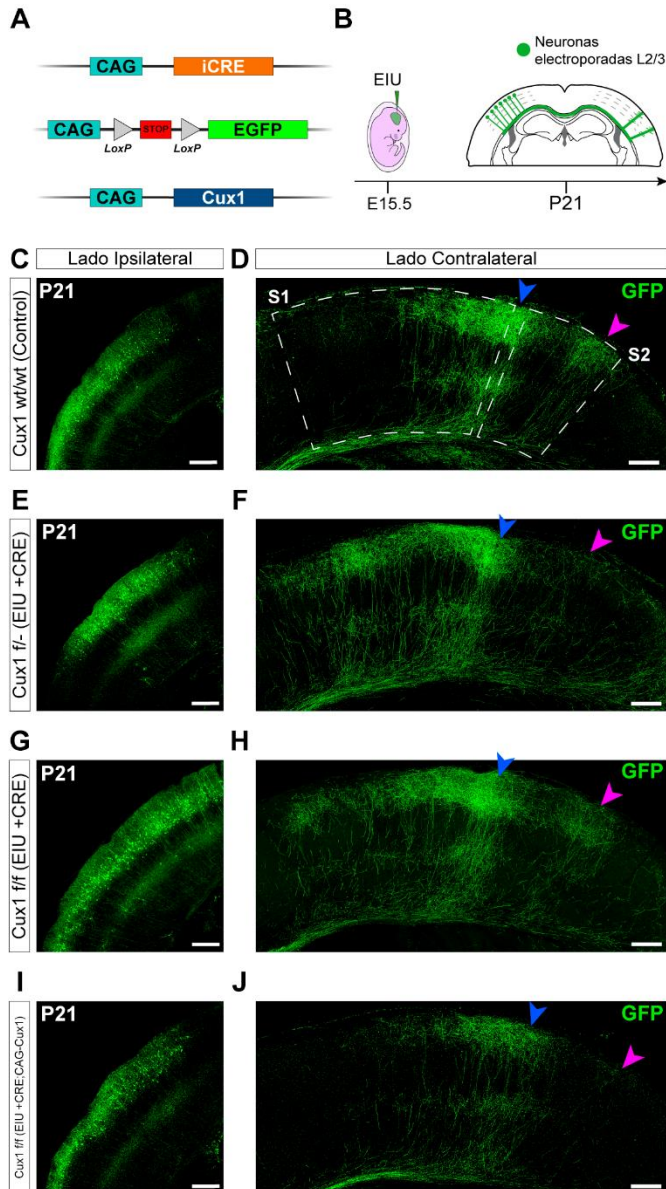


Figura 37: análisis de la innervación contralateral de neuronas L2/3 con Cux1 inactivado. (A) La combinación de plásmidos empleados contiene: CALNL-GFP (vector de expresión condicional de GFP), CAG-iCRE (CRE recombinasa) y/o CAG-Cux1 (sobre-expresión de Cux1). (B) Esquema del flujo experimental. En primer lugar, se realizaron EIU a día E15,5 con diferentes combinaciones de los plásmidos anteriores. Los cerebros fueron procesados a día P21 para estudiar el patrón de innervación contralateral. (C-J) (Paneles izquierda) Imágenes de los hemisferios ipsilaterales electroporados (C, E, G e I) de cerebros de los cuatro genotipos de L2/3 analizados. (Paneles derecha) Imágenes de los hemisferios contralaterales (D, F, H y J) de cerebros de los cuatro genotipos de L2/3 analizados. (Verde = GFP. Escala = 300 μ m). D-E) Fenotipo de un animal control (genotipo de Cux1 wt/wt). Los axones contralaterales (E) se acumulan formando dos columnas (columna S1/S2, flecha azul; columna S2, flecha magenta), sin presencia axonal en otras regiones (área S1 o área S2). F-G) Fenotipo de un animal heterocigoto (genotipo de Cux1 fl- - EIU + CRE). Los axones contralaterales (G) se desorganizan ocupando el área S1 y, además, la columna S2 aparece reducida. H-I) Fenotipo de un animal homocigoto (genotipo de Cux1 fl/fl - EIU + CRE). Los axones contralaterales (I) también aparecen desorganizados ocupando el área S1, aunque la columna S2 parece mantenerse. J-K) Fenotipo de un animal homocigoto (genotipo de Cux1 fl/fl - EIU + CRE + CAG-Cux1). La organización en columnas parece verse recuperada, aunque fundamentalmente en la columna S1/S2, y la columna S2 aparece reducida.

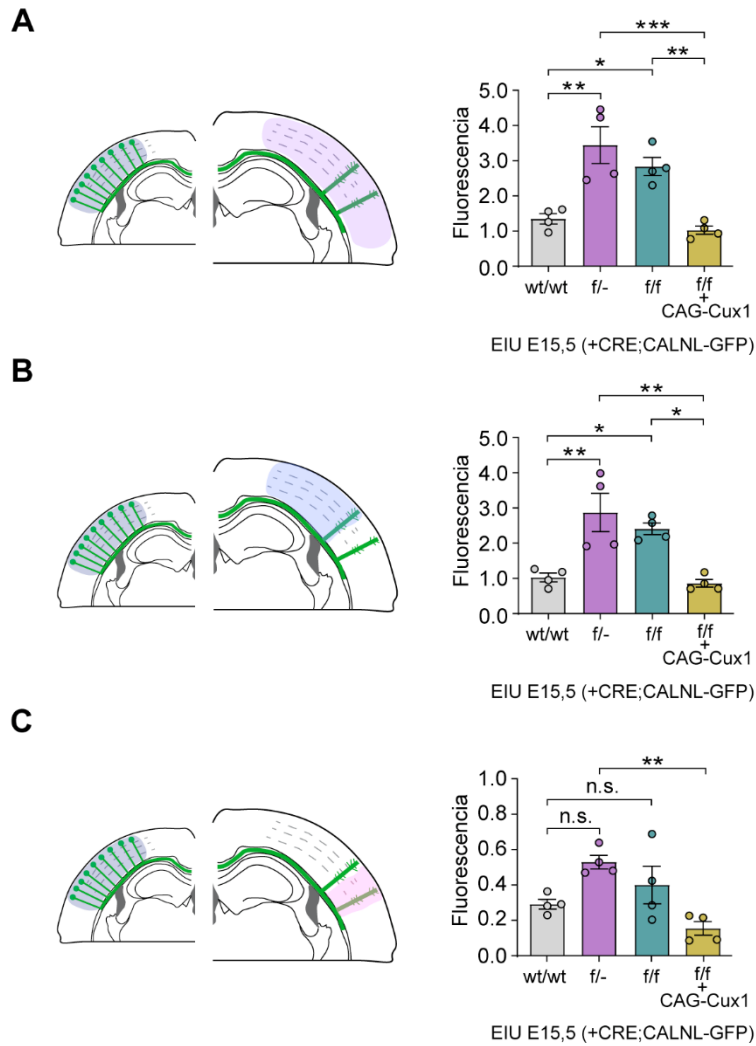


Figura 38: cuantificaciones de la distribución de los axones callosos en los diferentes genotipos de *Cux1* en la L2/3 a P21. (A-C) Los esquemas de la izquierda muestran las RDI seleccionadas para cuantificar fluorescencia. Los gráficos muestran los valores obtenidos tras relativizar la fluorescencia de las diferentes RDI. Media \pm EEM ($n = 2$ cerebros, 2 secciones por cerebro, para todos los genotipos). A) Inervación contralateral relativa a los somas ipsilaterales (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0003. Test Post-hoc Tukey: ** p -valor wt/wt – f/- = 0,0020, * p -valor wt/wt – f/f = 0,0226, *** p -valor f/- – f/f + CAG-Cux1 = 0,0006, ** p -valor f/f – f/f + CAG-Cux1 = 0,0062). B) Inervación del área S1 relativa a los somas ipsilaterales (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0008. Test Post-hoc Tukey: ** p -valor wt/wt – f/- = 0,0041, * p -valor wt/wt – f/f = 0,0278, ** p -valor f/- – f/f + CAG-Cux1 = 0,0021, * p -valor f/f – f/f + CAG-Cux1 = 0,0139). C) Inervación del área S2 relativa a los somas ipsilaterales (ANOVA de una vía: P -valor = 0,0064. Test Post-hoc Tukey: p -valor wt/wt – f/- = 0,0732 (n.s.), p -valor wt/wt – f/f = 0,6063 (n.s.), ** p -valor f/- – f/f + CAG-Cux1 = 0,0047).

El silenciamiento de *Cux1* en las neuronas de la lámina 4 acelera su maduración

Las neuronas de la L4 sufren un proceso de maduración durante los primeros estadios postnatales del desarrollo, adquiriendo conectividad local y morfología estrellada, desde una morfología piramidal y conectividad interhemisférica en etapas inmaduras (Callaway and Borrell, 2011; Li *et al.*, 2013; Pouchelon *et al.*, 2014; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Durante este proceso, diferentes factores moleculares actúan regulando la correcta maduración de estas neuronas (Jabaudon *et al.*, 2012; Oishi *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2020). En este contexto, *Cux1* puede actuar modulando este proceso o participando en conjunción con otros factores como *Rorb* (Oishi *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2020). Para comprobar cómo se afecta este proceso de maduración, y como primera aproximación de estudio del factor *Cux1* en la L4, silenciamos la expresión de *Cux1* en neuronas de la L4 en animales *Rorb-CRE* (Figura 39A). Para ello, empleamos EIU usando un vector de ARNhc dirigido contra *Cux1* (*shCux1*) y, a una concentración baja, un plásmido GFP cuya expresión está condicionada a la recombinasa CRE. De esta manera, pudimos estudiar a nivel de célula individual, la morfología y el estadio de maduración de las neuronas GFP⁺ específicamente de L4. A día P16, momento en el que la maduración de estas neuronas aún no ha finalizado en el área somatosensorial, analizamos la morfología de las mismas. Para ello, establecimos una clasificación basada en el grado de modificación de la dendrita apical, diferenciando tres grupos: piramidales, intermedias y estrelladas (Figura 39B-E).

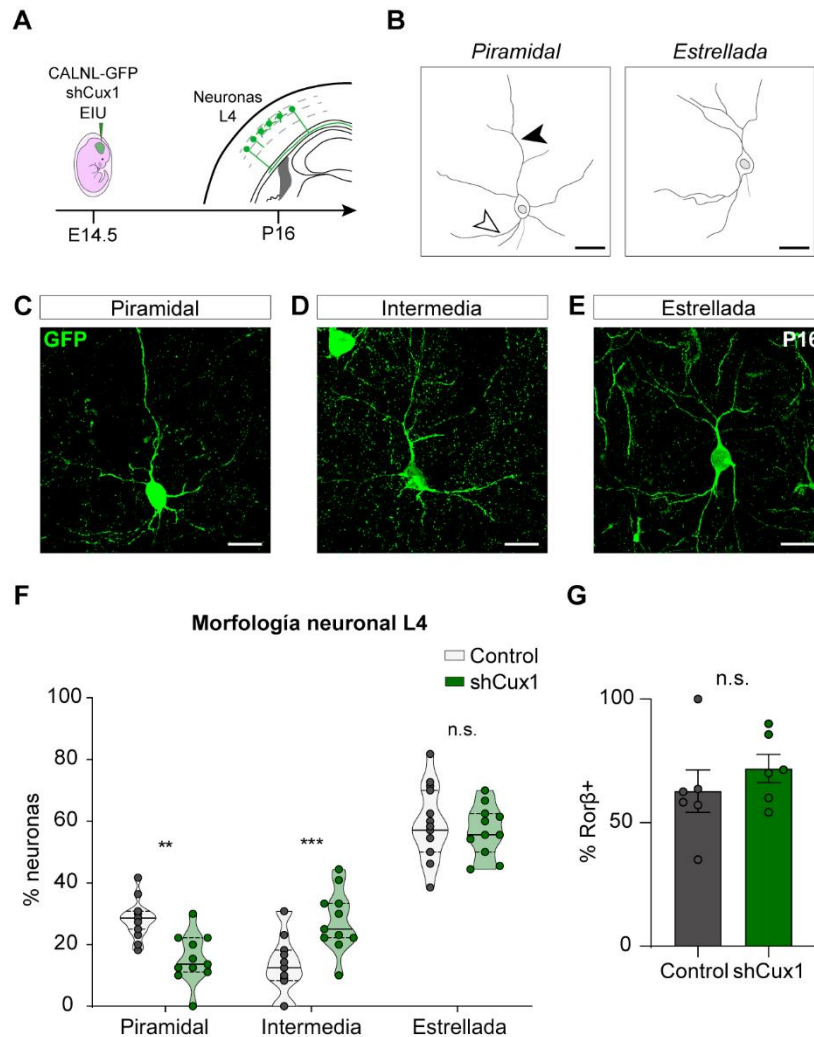


Figura 39: análisis de la influencia del silenciamiento de *Cux1* en el proceso de maduración de las neuronas de la lámina 4. (A) Aproximación experimental. Se realizaron EIU a día E14.5 en ratones *Rorb-CRE* de la combinación de plásmidos: CALNL-GFP y pLKO-shCux1. A P16, se analizaron secciones coronales de cerebros electroporados para estudiar el estado de maduración de las neuronas de la lámina 4 en base a su morfología. (B) Esquema que representa la morfología piramidal (dendrita apical = flecha negra, dendrita basal = flecha blanca) de una neurona L4 inmadura (panel izquierdo) y la morfología estrellada de una neurona L4 madura (panel derecho) (Escala: 20 μ m). (C-E) Imágenes de alta magnificación de neuronas L4 electroporadas en diferentes estadios de maduración. (C) Neurona piramidal L4. (D) Neurona en estado de maduración intermedio, donde ya puede observarse cierta orientación del árbol dendrítico hacia el interior de la estructura de barril, aunque dónde aún puede distinguirse la dendrita apical. (E) Neurona estrellada L4. (Verde: GFP. Escala: 20 μ m). (F) Cuantificación del porcentaje de neuronas presentes a P16 de cada estadio de maduración en situación control y con *Cux1* silenciado (shCux1) ($n \geq 3$ cerebros, 2 secciones por cerebro para todas las condiciones. Se analizaron un mínimo de 30 neuronas por condición). Media y Cuartiles \pm EEM (ANOVA de dos vías: *P*-valor Dinámica maduración a P16 < 0,0001; *P*-valor Estadio maduración < 0,0001; *P*-valor Condición experimental = 0,9963. Test Post-hoc Bonferroni: ** *p*-valor Control-shCux1 Piramidal = 0,0024, *** *p*-valor Control-shCux1 Intermedia = 0,0005, *p*-valor Control-shCux1 Estrellada > 0,9999 (n.s.)) (G) Cuantificación del porcentaje de neuronas *Rorb*⁺ sobre la población electroporada en la L4. Media \pm EEM (Test *T* de Student: *P*-valor = 0,3973 (n.s.)).

Tras cuantificar el número de neuronas detectadas y clasificarlas, pudimos establecer que, en una condición control, alrededor del 60% de neuronas L4 han

adquirido ya su morfología madura, quedando aún un 25% de neuronas con morfología piramidal y un 15% en proceso de maduración (Figura 39F). En la condición de silenciamiento de *Cux1*, estas proporciones se ven alteradas, acelerándose el proceso de maduración. En esta situación, fuimos capaces de detectar un incremento de neuronas intermedias o en proceso de maduración (alrededor de un 30%), quedando únicamente un 10% de neuronas piramidales (Figura 39F). Por otro lado, estudiamos si la expresión de ROR β estaba afectada en las neuronas silenciadas para *Cux1*. Mediante inmunofluorescencia, cuantificamos el número de núcleos ROR β ⁺ sobre la población de neuronas electroporadas. Con este análisis, no observamos diferencias significativas entre la condición control y la condición silenciada (Figura 39G). Por tanto, aunque con el silenciamiento de *Cux1* el proceso de maduración de las neuronas de la L4 se ve afectado en su dinámica, la expresión del FT ROR β no está alterada. Estos resultados serán estudiados en mayor profundidad con el uso de nuestro modelo de inactivación condicional.

Generación de una línea *knock-out* de *Cux1* en células *Ror β ⁺*. Inactivación de *Cux1* en la lámina 4 de la corteza cerebral del ratón

Los resultados indicaban que silenciar *Cux1* en las neuronas de la L4 acelera el proceso de maduración de las mismas. Para poder explorar con mayor profundidad el papel de *Cux1*, generamos una línea con *Cux1* inactivado específicamente en las neuronas de la L4 usando nuestro modelo y cruzándolo con la línea transgénica *Ror β -CRE*. Esta línea presenta asociada la expresión de CRE al gen *Ror β* , marcador específico de L4 en ratón (Harris *et al.*, 2014).

En primer lugar, y tras desarrollar los cruces de animales *Cux1^{ff}* con animales *Ror β -CRE*, establecimos el cruce *Cux1L4KO*. Los animales de estos cruces no presentan ningún fenotipo adverso y se desarrolla con normalidad, además de no presentar expresión de *Cux1* en la L4. Los heterocigotos *Cux1^{w^t/-};Ror β -CRE* presentan un patrón de expresión similar al de la cepa *salvaje* (Figura 40A). Los animales con la inactivación completa de *Cux1* en L4, *Cux1^{ff};Ror β -CRE* presentan una reducción específica de CUX1 en la L4 (Figura 40B). Por tanto, este nuevo modelo de estudio de *Cux1* nos presenta la posibilidad de abrir

nuevas líneas de investigación relativas a la funcionalidad de este FT durante el desarrollo y maduración de la L4.

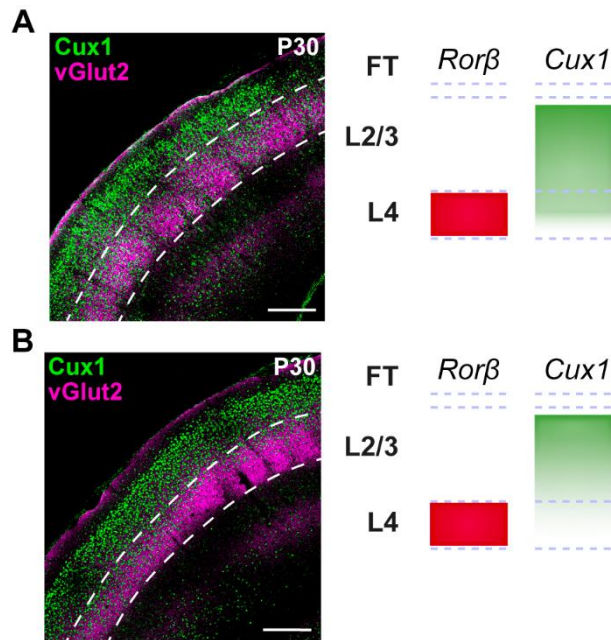


Figura 40: establecimiento de una línea de inactivación de *Cux1* específica de lámina 4. (A) Imagen de una sección coronal de un cerebro P30 con el patrón de expresión de un animal *Cux1^{wt/f};Rorβ^{CRE}*. La estructura de barriles no presenta alteraciones evidentes. La expresión de CUX1 se encuentra reducida en la L4 (Verde: *Cux1*. Magenta: vGlut2). (B) Imagen de una sección coronal de un cerebro P30 con el patrón de expresión de un animal *Cux1^{f/f};Rorβ^{CRE}*. La estructura de barriles se mantiene inalterada. La expresión de CUX1 está eliminada de la L4 (Verde: *Cux1*. Magenta: vGlut2). (Escala: 300 μm).

Discusión

DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral hemos podido demostrar como el receptor Nrp1 juega un papel determinante en el establecimiento de la topografía de los axones callosos del sistema somatosensorial, incidiendo además en el proceso de refinamiento que estas proyecciones sufren durante el desarrollo postnatal. Por otro lado, con la generación de un modelo animal de inactivación para el gen *Cux1*, también hemos podido demostrar que los fenotipos observados con su silenciamiento son contrarios a los producidos con su inactivación. Además, con este modelo, podemos ofrecer un nuevo paradigma de estudio de este factor, pudiendo manipular su expresión espacial y temporalmente.

La diversidad de la circuitería cortical en el contexto del determinismo molecular

La circuitería cortical constituye la base estructural sobre la cual se asientan las funciones cognitivas complejas y ejecutivas. El proceso de formación de estos circuitos, además de ser altamente complejo, presenta una plasticidad que dota a los mismos de la potencial de optar por distintos ensamblajes. Cada una de estas vías de ensamblaje o cableado podrá formar circuitos que, siendo estructuralmente distintos, pueden ser funcionalmente convergentes y, además, producir procesamientos similares de la información. Esta plasticidad se traduce en una diversidad que, en determinadas ocasiones, deriva en la aparición de patologías que aún hoy presentan retos inabarcables desde la clínica. En este contexto de diversidad, la búsqueda de patrones e identidades comunes que categoricen a las poblaciones neuronales desde diferentes niveles, desde el molecular al fisiológico, es uno de los principales retos de la neurociencia. Sumado a esto, encontrar mecanismos comunes controlados por unas pocas moléculas a partir de los cuales pueda construirse toda la complejidad cortical ofrece mejores estrategias terapéuticas para paliar las numerosas patologías asociadas a defectos en el desarrollo de la circuitería de la corteza.

El receptor de Nrp1 y su papel en la organización topográfica de las conexiones callosas

En el primer bloque de esta tesis hemos demostrado como Nrp1 está involucrado en la organización topográfica de las conexiones callosas de la L2/3 de la corteza cerebral del ratón. Este receptor parece estar promoviendo la estabilización o consolidación de las ramificaciones homotópicas de los axones callosos mientras que impide la formación de conexiones heterotópicas, regulando así la topografía callosa en la corteza contralateral (Figura 41A). Previamente, el trabajo de *Zhou, J. et al.* demostró cómo el gradiente de Nrp1 regula la organización de los axones del área motora y somatosensorial en su cruce por la vía callosa que se produce durante las primeras etapas del desarrollo (*Zhou et al., 2013*). En esta tesis se demuestra que, además de esta función, Nrp1 regula el crecimiento, ramificación y refinamiento de los axones callosos en el momento en que están invadiendo la corteza contralateral del área somatosensorial.

Nuestro trabajo revela que Nrp1 regula el desarrollo tardío de las ramificaciones axonales de las neuronas callosas. Puesto que observamos una reducción de axones GFP⁺ a día P16, pero no a P30, concluimos que silenciar la expresión de Nrp1 o sobre-expresarlo en el área SS, retrasa la producción de ramificaciones callosas en la corteza, pero no impide su formación. Este retraso se traduce en disminuciones de axones callosos muy similares en todas las áreas corticales de los animales P16. Es por ello que, a pesar de las reducciones, se mantiene la organización en forma de columnas que observamos en los ratones control. El hecho de que las reducciones sean muy similares en ambas condiciones experimentales de silenciamiento y sobreexpresión, unido a que ocurran tanto en S1 y en S2, no se explica por las funciones conocidas de Nrp1 en la corteza. Más bien apoyan un escenario en el que solo los axones callosos de neuronas capaces de regular los niveles de expresión de Nrp1 de manera muy precisa, sean capaces de ramificarse en la corteza contralateral, de forma que tanto el exceso como la disminución resulten igualmente dañinos. De hecho, teniendo en cuenta los estudios previos en cerebelo (*Telley et al., 2016*), se podría especular con la posibilidad de que los defectos a P16 indiquen un desbalance en la dinámica de estabilización/eliminación de las sinapsis que establecen los axones

callosos durante su diferenciación en la placa cortical. Esto desembocaría en una menor velocidad de producción de ramificaciones axonales estabilizadas y, por tanto, en una ralentización de la invasión interhemisférica cortical (Low and Cheng, 2006; Courchet *et al.*, 2013). En todo caso, observando nuestros análisis de animales P30, podemos afirmar que esta ralentización no desemboca indefectiblemente en una menor invasión contralateral en el circuito adulto, pero sí en un desbalance de los circuitos bilaterales entre el área SS primaria y secundaria. Las áreas primarias y secundarias presentes en la corteza procesan la información de *primer orden* y de *orden superior* procedente del tálamo, respectivamente (Inan and Crair, 2007; Pouchelon *et al.*, 2014). Una vez en la corteza, esta información se procesa de forma bilateral gracias a las conexiones interhemisféricas del CC, que permiten que se compare. A su vez, la información se mantiene segregada gracias a la presencia de esta organización jerárquica dentro de las áreas funcionales (Harris *et al.*, 2019). De esto se deduce, por tanto, que Nrp1, puesto que regula la posición de los axones dentro del área SS y equilibra el grado de interconectividad entre las áreas primarias y secundarias de ambos hemisferios, está determinando una parte fundamental del procesamiento de la información.

La competición axonal como mecanismo de acción de Nrp1 durante la formación del CC

El mecanismo por el cual ocurre el proceso de invasión de la placa cortical ante las disminuciones y aumentos de Nrp1 no queda determinado con nuestros experimentos pero los resultados apuntan hacia mecanismos de competición o de cooperación axonal (Reber *et al.*, 2004; Grueber and Sagasti, 2010; Wang and Marquardt, 2013). Estos mecanismos están muy poco estudiados en el contexto del CC (De León Reyes *et al.*, 2020; Innocenti, 2020), pero nuestros resultados sugieren que juegan un papel en la formación de mapas topográficos corticales. Por ejemplo, la reconstitución a P30 de la columna S2 por ramificaciones procedentes del área S1 que observamos en los cerebros en los que silenciamos Nrp1, sugiere competición axonal entre las proyecciones que expresan mayores y menores niveles de Nrp1 a la hora de inervar la región S2. En esta competición, resultarían favorecidas las proyecciones que expresan menores niveles de Nrp1. En la condición control que representa el circuito

salvaje, éstas se corresponden con las que provienen de neuronas L2/3 localizadas en regiones homotópicas de S2, y en las condiciones de silenciamiento, las heterotópicas de S1 (Figura 41B). De igual manera, podemos razonar que la reducción de la columna S2 observada a P30 en la condición de sobre-expresión va acompañada de una ganancia de axones en el área S1 y, siendo esto, coherente con una incapacidad de los axones S2 que presentan un exceso de Nrp1, de competir por las regiones más laterales de la corteza contralateral (Figura 41C). En este último caso, es sin embargo importante resaltar la salvedad la exclusión de axones con altos niveles de Nrp1 de las zonas más laterales podría explicarse también por fenómenos de repulsión axonal mediados por el gradiente cortical de Sema3A.

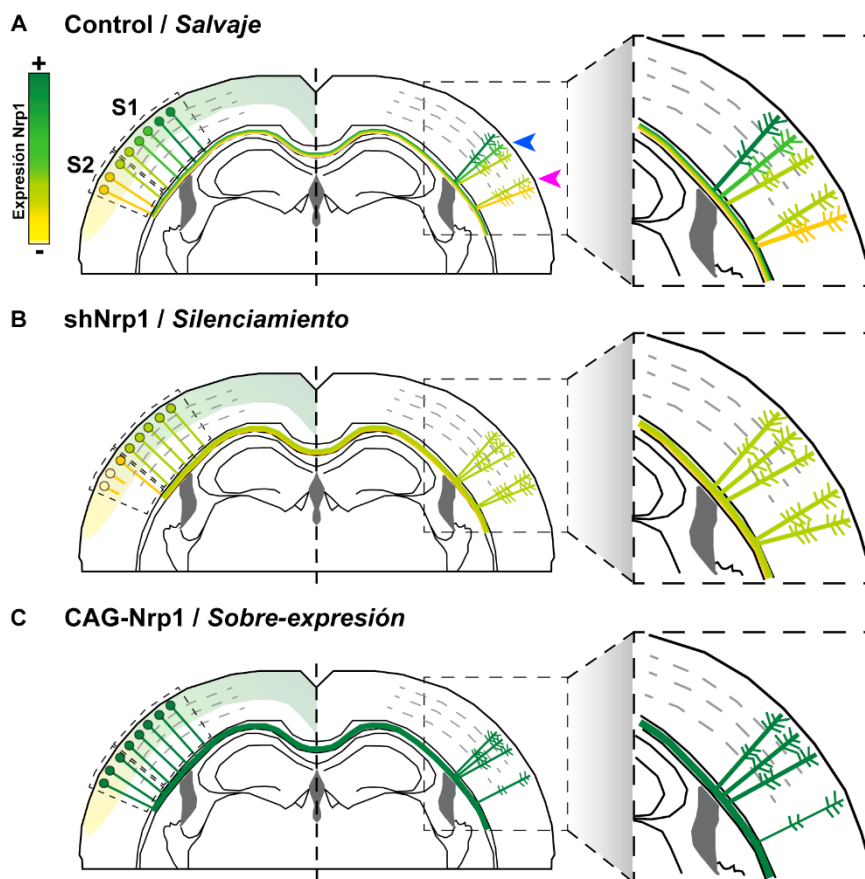


Figura 41: modelo de los efectos de los niveles de expresión de Nrp1 en la conectividad callosa. (A) Nrp1 se expresa en un gradiente medio-lateral en la corteza (niveles altos en verde, niveles bajos en amarillo). Las neuronas de S1 (en verde), expresan niveles altos o intermedios de Nrp1. Las neuronas de S2 (verde claro y amarillo), expresan niveles bajos de Nrp1. Las neuronas L2/3 que expresan niveles altos e intermedios se ramifican, preferencialmente en la columna S1/S2 (flecha azul) mientras que las neuronas de S2, que expresan niveles intermedios y bajos, inervan áreas más laterales (columna S2, flecha magenta). (B) Silenciar Nrp1 reduce los niveles de Nrp1 en el gradiente, por lo que los axones de las NPC L2/3 con niveles intermedios pueden ramificarse en las columnas S1/S2 y S2. Por este motivo, la columna S2 en esta situación está formada por ramificaciones heterotópicas procedentes del área S1. Las neuronas más laterales del área S2, con niveles muy bajos de Nrp1 (amarillo claro) son incapaces de mantener su proyección callosa, no pudiendo competir por inervar homotópicamente en la columna S2 y refinando su proyección callosa en la ventana temporal entre P16 y P30. (C) Las NPC de L2/3 que sobre-expresan Nrp1 pueden inervar en la columna S1/S2, pero no pueden mantener su proyección en el área S2, reduciéndose significativamente la columna S2.

Los resultados obtenidos con nuestras manipulaciones en los niveles de expresión de Nrp1 demuestran que las proyecciones más afectadas pertenecen al área secundaria del sistema SS cualquiera que sea el mecanismo implicado. Este hecho se debe, probablemente a la naturaleza medio-lateral del gradiente de expresión endógeno de Nrp1 (Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Muche *et al.*, 2015). Mientras que la sobre-expresión de Nrp1 a través de la electroporación de plásmidos maximiza los niveles de esta proteína en todas las neuronas por igual, independientemente de su posición dentro del gradiente endógeno, el silenciamiento puede afectarlas de manera desigual. La eficiencia en el silenciamiento varía dependiendo del nivel de expresión endógeno del ARN objetivo. Por tanto, la población en la que se esperan niveles menores de Nrp1 final tras el silenciamiento inducido por electroporación, es la localizada en el área S2, puesto que es la que parte de menores niveles de expresión endógena. De igual manera, la población de neuronas S1L2/3 mantendría unos niveles de expresión intermedios tras el silenciamiento (Figura 41). Esto concuerda con el comportamiento que observamos en los axones de las neuronas L2/3 de S1 silenciadas que, imitando el comportamiento de los axones de S2 en una condición *salvaje*, acaban ramificándose en la columna S2. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, no pudimos detectar los niveles de proteína de Nrp1 en las neuronas electroporadas para confirmar esta hipótesis. En nuestros intentos de inmunodetección, los anticuerpos empleados solo detectaban a Nrp1 en los axones situados en la línea media del CC (Figura 42). Algo muy similar se observa en trabajos previos de otros grupos (Piper *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2015).

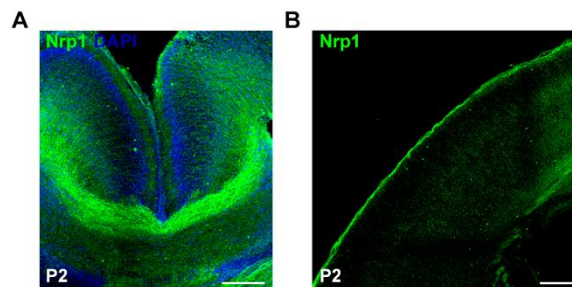


Figura 42: inmunodetección de Nrp1 en sección coronal de cerebro a día postnatal 2. (A) Imagen en detalle de línea media donde se observa el marcaje de Nrp1 en los axones que ya han cruzado a día P2. (B) Imagen en detalle de la corteza de la misma sección donde no se observa un marcaje por encima de la señal del fondo. (Verde = Nrp1. Azul = DAPI. Escala = 200 μ m).

La existencia de estos mapas homotópicos en las conexiones interhemisféricas fue descrito por primera vez en la década de los 70 (Yorke and Caviness, 1975; Wise and Jones, 1976), y la presente tesis añade más información acerca de los mecanismos que generan esta especificación topográfica. La manipulación de los niveles de expresión de Nrp1 en las neuronas corticales de la L2/3 demuestra que, en el circuito *salvaje* canónico, establecen sobre todo conexiones homotópicas debido a sus niveles de Nrp1. Los experimentos de sobre-expresión nos permiten demostrar que, axones interhemisféricos con mayores niveles de expresión de Nrp1 situados en el área S1 en el circuito del ratón de la cepa *salvaje*, inervan preferentemente territorios contralaterales equivalentes, en el área S1 contralateral y evitan las regiones S2 que se sitúan en la corteza más lateral. Los axones con menores niveles de expresión de Nrp1, los de neuronas S2 en un circuito *salvaje* inalterado, producen más conexiones en el área S2, siguiendo el mismo patrón homotópico (Figura 41).

La posible función dual de Nrp1: guía axonal e influencia durante el refinamiento de proyecciones callosas

Nuestros resultados no sólo describen topografía axonal, sino que también muestran alteraciones de los procesos de estabilización y refinamiento de las proyecciones callosas. Observamos que el silenciamiento de Nrp1 disminuía las proyecciones homotópicas del área S2 y que, una fracción de estas neuronas eliminaba sus proyecciones callosas, es decir, sufrían un refinamiento superior a una situación natural. Estas neuronas, presumiblemente, se convierten en neuronas de proyección intrahemisférica. Su refinamiento, en cierto modo, mimetiza el proceso que experimentan, de manera normal, subpoblaciones de la L2/3 y, especialmente, las neuronas de la L4 del área S1, durante el desarrollo cortical (Innocenti and Clarke, 1984b; O'Leary and Koester, 1993; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Este exceso de refinamiento de las neuronas S2 sugiere fuertemente que es necesario un nivel mínimo de expresión de Nrp1 para mantener una proyección callosa y, curiosamente, no apoya la hipótesis de que las restricciones topográficas de las conexiones callosas impuestas por Nrp1 estén mediadas por fenómenos de repulsión axonal. En cambio, sí sugiere que estos axones presentan desventajas para competir por la inervación del área S2. Estudios anteriores describen que la interacción de Nrp1 con la molécula

Sema3A media fenómenos de repulsión. Durante el desarrollo cortical, Sema3A presenta un gradiente de expresión opuesto y complementario al de Nrp1 (Kitsukawa *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). En el contexto de nuestras investigaciones, algunos de los fenotipos observados nos indican que Sema3A se presenta como un candidato responsable de los efectos de Nrp1 en la formación del CC. Por ejemplo, en el caso de la sobre-expresión, observamos que los axones contralaterales no son capaces de ramificarse en los territorios con mayores niveles de expresión endógena de Sema3A como el área S2 y, por el contrario, invadieron regiones con niveles menores como el área S1. Esta concordancia desaparece, sin embargo, en otros casos. La repulsión Sema3A-Nrp1 no explicaría, por ejemplo, el retraso en la invasión de la placa cortical por los axones callosos tanto cuando se sobre-expresa Nrp1 como cuando se silencia, por lo que parece plausible proponer un papel secuencial del receptor Nrp1 en el proceso de formación del CC. En primer lugar, actuando en los procesos de guía axonal y, en última instancia, en el refinamiento de las proyecciones callosas. Esta función dual de Nrp1 ha sido descrita en el cerebelo, donde Nrp1 primero guía a los axones de neuronas inhibitorias hacia neuronas excitatorias y, después determina la formación y estabilización sináptica entre ellas. Así, la eliminación de Nrp1 en estas neuronas bloquea la formación de sinapsis entre las neuronas inhibitorias y las neuronas de Purkinje del cerebelo (Telley *et al.*, 2016), de manera que podría ser similar a la incapacidad de las neuronas de S2 de estabilizar sus proyecciones callosas al silenciar Nrp1. En esta línea de razonamiento y, apoyando un papel de Nrp1 en la estabilización de conexiones durante el desarrollo, se ha descrito que mutantes de PlexinaD1 (correceptor de Nrp1), muestra la presencia de proyecciones callosas heterotópicas aberrantes hacia la región del estriado contralateral en las poblaciones de neuronas L2/3, que podrían ser explicados por fallos de refinamiento postnatal (Velona *et al.*, 2019).

En resumen, nuestros datos demuestran que, dentro de un área funcional, en este caso el área SS, los niveles de Nrp1 regulan el desarrollo de proyecciones callosas de la L2/3 y su posterior refinamiento. De esta manera, el gradiente de expresión de Nrp1 controla el balance homotópico-heterotópico de la conectividad interhemisférica entre circuitos primarios y secundarios.

Cux1 y la complejidad de su estudio en el cerebro

El FT CUX1 se expresa en distintos tipos celulares, tanto durante el desarrollo como a lo largo de toda la vida de las células, ejerciendo diferentes papeles como regulador transcripcional, activando o reprimiendo la expresión de otros genes (Sansregret and Nepveu, 2008). Debido a su amplio patrón de expresión, tanto temporal como espacial, y a sus funciones esenciales en algunos momentos del desarrollo, los trabajos basados en su inactivación completa a nivel de organismo han resultado dificultosos empleando modelos animales. Las líneas de ratones mutantes existentes que inactivan las funciones de CUX1 presentan diferentes defectos del desarrollo que van desde patologías pulmonares que reducen la viabilidad de las camadas, la reducción de la fertilidad en los machos o defectos epiteliales y dificultades en el crecimiento (Tufarelli *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2001; Sinclair *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002). Esto ha hecho que, para el estudio de las funciones de CUX1, muchos estudios escojan diseños experimentales basados en la sobre-expresión (Ledford *et al.*, 2002; Cadieux *et al.*, 2006), el silenciamiento usando ARN de interferencia o de horquillado corto (An *et al.*, 2018), o estudiando los modelos de inactivación, pero en condición de heterocigosis (Porath *et al.*, 2017; Supper *et al.*, 2021). Pero esto tiene la desventaja de no poder describir los fenotipos derivados de la inactivación completa y, por ende, los mecanismos afectados por la falta de CUX1. Por estos motivos, en el laboratorio surgió la necesidad de generar modelos de inactivación condicionales para así eludir estas limitaciones y poder ampliar el conocimiento de sus funciones durante el desarrollo y la vida adulta del ratón.

La generación de líneas transgénicas de modelos animales y, más concretamente, en ratón, ha visto mejorada exponencialmente su eficiencia gracias al descubrimiento y posterior aplicación de la tecnología *CRISPR-Cas9*. En la última década se han desarrollado múltiples aproximaciones experimentales para la generación de modelos animales usando *CRISPR-Cas9*, tanto de inactivación de genes, como de inserción de transgenes (Burgio, 2018). Una de estas tecnologías es *Easi-CRISPR*, empleada en la presente tesis doctoral para la generación de una nueva línea transgénica que porta un alelo mutante que puede producir la inactivación condicional de *Cux1* en ratón. La técnica *Easi-CRISPR* combina tres factores fundamentales que aumentan la

eficiencia y aceleran el proceso de generación de ratones mutantes: el uso de secuencias donantes en forma de ADN de cadena simple, el uso directo de complejos ribonucleoprotéicos de Cas9 y la inyección de los componentes anteriores directamente en el cigoto (Quadros *et al.*, 2017; Miura *et al.*, 2018). En el caso de la modificación de *Cux1*, nuestra estrategia se basó en flanquear el exón 23 con secuencias *LoxP* para así condicionar la expresión funcional del FT, eliminando el exón que codifica el dominio de la proteína que se utiliza en todas las formas de *splicing* que generan isoformas con función de FT. Mutaciones anteriores en el gen *Cux1* de ratón que eliminan la región que codifica para el primer dominio CUT (CR1) de unión a ADN, expresaban proteínas mutantes en niveles ligeramente superiores a la proteína *salvaje*. Además, presentaban una distribución tisular similar y una afinidad similar que la proteína *salvaje* por los sitios de unión al ADN descritos (Tufarelli *et al.*, 1998). Existe otro alelo mutante de *Cux1* en el cual se encuentran eliminadas las regiones del tercer dominio CUT (CR3) y el homeodominio. En ratones homocigotos para esta mutación, la expresión de la isoforma más grande de CUX1 queda eliminada y, además, la proteína mutante generada queda retenida en el citoplasma (Ellis *et al.*, 2001). Posteriormente, se realizó otro mutante en ratón en el que se eliminó el extremo carboxi-terminal, incluyendo el homeodominio. Este modelo presentaba unos niveles bajos de expresión de una proteína mutante que, además, no se detectaba en el núcleo (Luong *et al.*, 2002). Todos estos mutantes de *Cux1* presentaban defectos durante su desarrollo postnatal y muy bajas tasas de supervivencia en homocigosis (Tufarelli *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002). El exón sobre el que nosotros realizamos la modificación codifica para la señal de localización nuclear de CUX1. Elegimos esta mutación debido a que, en el caso de que la eliminación del exón diera paso a la activación de alternativas de *splicing*, éstas serían proteínas incapaces de abandonar el citoplasma y, por tanto, no ejercerían funciones de regulación transcripcional. Los resultados preliminares presentados en esta tesis indican que, cuando inducimos la recombinación genómica y, por tanto, la eliminación del exón 23, las inmunofluorescencias no nos permiten descartar la presencia de ciertos niveles de CUX1 retenidos en el citoplasma, pero sí podemos afirmar que se reduce drásticamente la señal detectada de proteína nuclear. Estos datos se obtienen tanto en animales sometidos a EIU

con un plásmido que codifica para recombinasa CRE, como en el cruce con una línea reportera de CRE para la L4 de la corteza cerebral. En ambas condiciones, las poblaciones neuronales modificadas pero que no han sufrido la recombinación no muestran cambios en la expresión de CUX1 respecto a animales de genotipo *salvaje*. Por tanto, el objetivo de inactivar la función de FT, impidiendo la localización nuclear, se cumple. En el futuro planeamos realizar una descripción más detallada y minuciosa de la expresión de los transcritos y proteínas de *Cux1* empleando técnicas como la secuenciación masiva de ARN (en inglés, *RNA-Seq*), PCR cuantitativa en tiempo real (en inglés, *qRT-PCR*) o *Western Blot*.

El silenciamiento y la inactivación del gen *Cux1* desembocan en fenotipos de invasión contralateral contrarios

En corteza cerebral, CUX1 se expresa en las láminas superiores de la corteza (L2/3 y L4) (Nieto *et al.*, 2004), donde parece ejercer funciones diferentes (Weiss and Nieto, 2019). En primer lugar, *Cux1* determina la identidad molecular de las neuronas de la L2/3, en combinación con su ortólogo, *Cux2*. Su combinación permite la diferenciación y especialización de subpoblaciones de esta lámina y, en concreto *Cux1*, determina la topografía y complejidad del compartimento dendrítico basal de estas neuronas (Cubelos *et al.*, 2015). Por otro lado, *Cux1* también está implicado en la formación del CC, modulando los niveles de expresión de canales de potasio dependientes de voltaje y, por tanto, regulando la excitabilidad intrínseca de las neuronas de la L2/3. El silenciamiento de *Cux1* provoca que las neuronas de esta lámina no sean capaces de estabilizar proyecciones callosas, produciéndose la pérdida de invasión contralateral. Estos defectos de invasión se deben a una reducción de los canales *Kv1.1* y *Kv1.3*, que modulan la capacidad de disparo de estas neuronas. La expresión de estos canales está modulada positivamente por la unión de CUX1 a sus promotores (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016).

Los resultados anteriores fueron obtenidos tras el silenciamiento de *Cux1* empleando ARNhc. En la presente tesis, nos propusimos investigar si la inactivación del gen replicaba este fenotipo de pérdida de axones callosos. Los datos preliminares demuestran que la inactivación génica de *Cux1* en neuronas

de la L2/3 no sólo no produce una pérdida de inervación contralateral, sino que incrementa las ramificaciones axonales en el área somatosensorial. A falta de ser explorados en profundidad, estos resultados muestran un fenotipo contrario entre el silenciamiento y la inactivación de *Cux1*. Paradójicamente, en ambos casos, se demuestra una reducción o pérdida de la proteína por inmunofluorescencia y, en ambos casos, los fenotipos son revertidos mediante la sobre-expresión de CUX1.

Otros estudios muestran que *Cux1* presenta haploinsuficiencia cuando se produce la delección o inactivación de uno de sus alelos y, por tanto, es altamente sensible a efectos dosis-dependientes (McNerney *et al.*, 2013; Arthur *et al.*, 2017; Porath *et al.*, 2017). CUX1 actúa activando o inhibiendo la transcripción de genes a través de su interacción con la cromatina, con secuencias *enhancer* distales y proximales o directamente con los propios promotores. Ante cambios en la concentración de CUX1 puede verse alterada la activación o inhibición de los complejos de transcripción y, por tanto, la identidad molecular de la célula (Arthur *et al.*, 2017). Aplicando este modelo a nuestros resultados, hipotetizamos que el silenciamiento de *Cux1* podría mimetizar una situación de haploinsuficiencia donde existe proteína, pero a niveles insuficientes para llevar a cabo las funciones normales, produciéndose cambios en el perfil de expresión de otras moléculas que incapacitan a las proyecciones callosas a estabilizarse en la corteza contralateral. En cambio, la inactivación de *Cux1* podría determinar un cambio en la estructura genómica y en las redes de regulación transcripcional diferente. Además de la posibilidad de que efectos dosis-dependientes de la regulación transcripcional mediada por CUX1, expliquen los diferentes fenotipos del ARNhc y la eliminación genómica de *Cux1* (Figura 43A).

En el silenciamiento mediado por ARNs de horquillado corto, éstos actúan en el citoplasma, reconociendo ARN mensajero, y activando al complejo RISC. Este complejo degrada los ARNm, impidiendo la traducción de proteína (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Bartlett and Davis, 2006). Por el contrario, en nuestra inactivación génica, afectamos a *Cux1* a nivel de secuencia de ADN al eliminar el exón 23, lo que ineludiblemente afecta a la expresión de las isoformas que lo contienen, que son todas las isoformas de *splicing* descritas por el momento. Sin embargo, no podemos descartar que la

eliminación del exón 23 afecte otros ARN no codificantes presentes en el locus de *Cux1* que, en principio, no tendrían que ser exportados al citoplasma para su traducción y que no se verían afectados por el silenciamiento de los ARNhc.

Entre los ARN reguladores, los ARN largos no-codificantes (ARNInc. En inglés, *long non-coding RNAs* o *lncRNAs*) se han postulado en los últimos años como reguladores clave de procesos como la regulación transcripcional y postranscripcional (Statello *et al.*, 2021). Muchos de ellos se han asociado con la activación de programas genéticos fundamentales para el correcto desarrollo de la corteza por su participación en la regulación del destino neuronal en el marco espacio-temporal (Ramos *et al.*, 2013; Zimmer-Bensch, 2019). Por ejemplo, el ARNInc *Rmst* controla la diferenciación neuronal reclutando al FT Sox2, el cual promueve la expresión de genes promotores de neurogénesis (Ng *et al.*, 2012). Otro ejemplo lo encontramos en el desarrollo de la retina, donde el ARNInc *Tug1* es necesario para la correcta diferenciación de fotorreceptores y su actividad eléctrica (Young *et al.*, 2005). Más recientemente se ha descrito que la traducción del factor *Satb2* está regulada por un microARN regulador, que la inhibe temporalmente, controlando así la transcripción de otros factores tales como *Tbr1*, *Fezf2* o el propio *Cux1* (Martins *et al.*, 2021). En el ratón, *Cux1* presenta un transcrito procesado de ARN que contiene al exón 23 (nombrado en la plataforma *Ensembl* con la referencia *Cux1-202* (ENSMUST00000163906.2) (Howe *et al.*, 2021) y del que, por el momento, no se ha descrito función. Este transcrito se presenta para nosotros como un candidato de ARN regulador digno de estudio en futuros proyectos.

Por otro lado, y siguiendo la hipótesis de los ARN reguladores que pudieran estar influyendo en las funciones de *Cux1*, trabajos recientes han podido describir que el locus de *Cux1* contiene codificados diferentes ARN circulares (Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Estos ARN pueden desempeñar diferentes funciones. En primer lugar, pueden secuestrar microARNs, impidiendo así el silenciamiento que éstos producen. También pueden bloquear el inicio de la transcripción, impidiendo así la producción de ARNm o bien secuestrar proteínas o translocarlas a otros compartimentos subcelulares. Además, sirven también como parte de complejos proteicos (Xie *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021). En vista de todo lo anterior, podríamos especular con la posibilidad de que *Cux1*, en su papel

de regulador de la identidad de las neuronas de la L2/3 y sus roles durante su desarrollo, no actúe sólo como FT, sino que también codifique ARN reguladores. De esta manera, el silenciamiento sólo afectaría la producción de proteína, mientras que nuestro modelo de inactivación podría estar afectando además a ARN reguladores, alterando la red de Cux1 en diferentes niveles y, explicando así, la diferencia fenotípica que hemos caracterizado en esta tesis (Figura 43B).

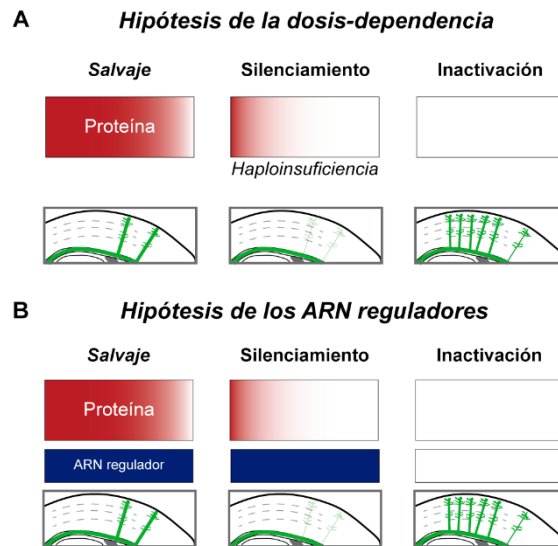


Figura 43: hipótesis que explicarían los fenotipos contrarios observados entre el silenciamiento de Cux1 y su inactivación en neuronas de la L2/3. (A) Hipótesis de la dosis-dependencia. CUX1 es un FT cuyas funciones se ven determinadas por sus niveles de expresión y que, en situación de heterocigosis, pueden generarse situaciones de haploinsuficiencia asociadas. El silenciamiento inducido por ARNhc podría mimetizar esta situación de haploinsuficiencia, generando defectos en la invasión contralateral de las neuronas de la L2/3. La inactivación de Cux1 producida en neuronas de la L2/3 usando la línea condicional generada en la presente tesis, no generaría esta haploinsuficiencia, sino que eliminaría la expresión de CUX1 y, con ello, las alteraciones serían diferentes. (B) Hipótesis de los ARN reguladores. En una situación salvaje, Cux1 regularía la expresión de otros genes como FT y como ARN regulador. En la situación de silenciamiento, sólo se verían afectadas las funciones de FT, pero los ARN reguladores no, pudiendo ejercer sus funciones. De esta manera, se produce un desbalance de regulación que impediría la estabilización axonal de las neuronas de la L2/3. En cambio, con nuestro modelo de inactivación, tanto la función de FT como de ARN regulador se verían igualmente afectadas, derivando en un fenotipo de invasión contralateral diferente a la situación de silenciamiento.

Cux1 como factor de identidad de la lámina 4

Durante el desarrollo, las neuronas de la L4 de áreas sensoriales primarias sufren un proceso de maduración a nivel morfológico y funcional. En el área somatosensorial, las neuronas de la L4 sufren un proceso de maduración en el que pierden su identidad interhemisférica inmadura, conectando a nivel local (De Leon Reyes *et al.*, 2019). Pierden su morfología piramidal inicial, adquiriendo una morfología estrellada donde se remodelan los procesos dendríticos apicales,

madurando hacia un árbol dendrítico compacto (Simons and Woolsey, 1984). Este proceso de maduración parece estar regulado por la actividad neuronal derivada de la recepción de información sensorial del exterior (Callaway and Borrell, 2011; Li *et al.*, 2013; Pouchelon *et al.*, 2014) y en él se han descrito diferentes factores moleculares que pueden estar actuando y cuya relevancia aún no está completamente determinada (Jabaudon *et al.*, 2012; Oishi *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2020). Entre estas moléculas, encontramos FTs como ROR β y CUX1, que parecen tener un papel clave en el mismo (Gray *et al.*, 2017). Los resultados que hemos obtenido en la presente tesis silenciando la expresión de *Cux1* muestran cómo, el proceso de maduración morfológica que sufren las neuronas de la L4, se ve acelerado a P16. Este proceso de maduración depende de la represión mutua que ejerce ROR β en la expresión de *Brn1/2* y viceversa (Oishi *et al.*, 2016) y, en este contexto, postulamos que CUX1 podría reprimir la expresión de *Ror β* para mantener a las neuronas de la L4 en forma piramidal, actuando de freno para su correcta maduración temporal.

Por tanto, nuestro modelo *Cux1L4KO* se presenta como una herramienta en el estudio del proceso de maduración de las neuronas de la L4 y de los factores implicados. Los resultados preliminares muestran que la formación de las estructuras de barriles no parece verse afectada con la inactivación de *Cux1* y, a priori, la maduración de las neuronas de la L4 tampoco, aunque es necesario un análisis más detallado en futuros proyectos.

Los circuitos corticales y su formación: “seremos, sea como sea”

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral he podido observar que la alteración de factores moleculares que actúan durante el desarrollo de la conectividad interhemisférica, no impide en última instancia, la formación de estos circuitos. Muchas neuropatologías del desarrollo se asocian con defectos en la formación del CC o, incluso, con su agenesia completa. Estos defectos se asocian frecuentemente con trastornos del neurodesarrollo tales como la epilepsia, el espectro autista o la esquizofrenia (Lungu and Stip, 2012; Paul *et al.*, 2014; Unterberger *et al.*, 2016). Diversas mutaciones genéticas se han relacionado tanto con estos defectos del CC como con las patologías mencionadas (Edwards *et al.*, 2014). Sin embargo, parece que, en la mayor parte de los casos, estos

circuitos interhemisféricos acaban formándose, canónica o no canónicamente, de forma inevitable a pesar de estas mutaciones. Es por ello que, desde un punto de vista biológico, todo ello parece sugerir que los circuitos corticales deben su robustez a su plasticidad y la capacidad de ser funcionales de maneras altamente diversas. Volviendo a la reflexión inicial del presente trabajo, el cerebro nos presenta su propia paradoja cuando es él mismo el objeto de estudio. Teniendo en cuenta esta paradoja, me gustaría reseñar que, para conseguir ser ejecutor y objeto de su propio estudio, ha sido capaz de establecer complejos circuitos neuronales y, además, salvando todas las diferencias moleculares intrínsecas a la diversidad biológica.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El receptor Nrp1 influye en la dinámica de ramificación y estabilización de los axones callosos de la lámina 2/3 de las áreas somatosensoriales durante el desarrollo.
2. La modificación en los niveles de expresión de Nrp1 altera la dinámica de refinamiento de las proyecciones callosas de las neuronas donde se modifican y, además, de las neuronas vecinas.
3. El silenciamiento de Nrp1 produce un aumento en el refinamiento de las proyecciones callosas de las neuronas de la lámina 2/3 del área somatosensorial secundaria.
4. La sobre-expresión de Nrp1 impide la estabilización de proyecciones callosas en el área S2 contralateral, redirigiéndolas al área S1.
5. Nrp1 controla la formación de las proyecciones homotópicas del Cuerpo Calloso.
6. La inserción de secuencias *LoxP* flanqueantes al exón 23 de *Cux1* no altera el correcto desarrollo del animal.
7. El silenciamiento del factor de transcripción *Cux1* en la lámina 4 acelera su maduración desde neurona piramidal a neurona estrellada.
8. La eliminación del exón 23 del gen *Cux1* elimina la expresión de proteína CUX1 en el núcleo. Por tanto, el alelo *floxeado* de *Cux1* es una herramienta validada para el estudio de las funciones de *Cux1*.
9. La inactivación del gen *Cux1* en neuronas de la lámina 2/3 aumenta la producción de ramificaciones axonales contralaterales.

Referencias

REFERENCIAS

Aboitiz, F. and Montiel, J. (2003) "One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum", *Braz J Med Biol Res*, 36(4), pp. 409–20. doi:10.1590/s0100-879x2003000400002.

Alcamo, E. A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Fariñas, I., Grosschedl, R. and McConnell, S. K. (2008) "Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex", *Neuron*, 57(3), pp. 364–377. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.012.

Alfano, C. and Studer, M. (2013) "Neocortical arealization: Evolution, mechanisms, and open questions", *Developmental Neurobiology*, 73(6), pp. 411–447. doi:https://doi.org/10.1002/dneu.22067.

Allen Institute for Brain Science (2021) © 2021 Allen Institute for Brain Science. *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*. Available from: <https://mouse.brain-map.org>. Available at: https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas (Accessed: June 3, 2021).

Allendoerfer, K. L. and Shatz, C. J. (1994) "The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex", *Annual Review of Neuroscience*, 17, pp. 185–218. doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.001153.

Amorim Da Costa, N. M. M. and Martin, K. (2010) "Whose cortical column would that be?", *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers, 4. doi:10.3389/fnana.2010.00016.

Amunts, K. and Zilles, K. (2015) "Architectonic Mapping of the Human Brain beyond Brodmann", *Neuron*, 88(6), pp. 1086–1107. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.001.

An, N., Khan, S., Imgruet, M. K., Gurbuxani, S. K., Konecki, S. N., Burgess, M. R. and McNerney, M. E. (2018) "Gene dosage effect of CUX1 in a murine model disrupts HSC homeostasis and controls the severity and mortality of MDS", *Blood*, 131(24), pp. 2682–2697. doi:10.1182/blood-2017-10-810028.

Andrews, W. D., Barber, M. and Parnavelas, J. G. (2007) "Slit–Robo interactions during cortical development", *Journal of Anatomy*, 211(2), pp. 188–198. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00750.x.

Angevine, J. B. and Sidman, R. L. (1961) "Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse", *Nature*. Nature Publishing Group, 192(4804), pp. 766–768. doi:10.1038/192766b0.

Antón-Bolaños, N., Sempere-Ferrández, A., Guillamón-Vivancos, T., Martini, F. J., Pérez-Saiz, L., Gezelius, H., Filipchuk, A., Valdeolillos, M. and López-Bendito, G. (2019) "Prenatal activity from thalamic neurons governs the

emergence of functional cortical maps in mice", *Science*, 364(6444), pp. 987–990. doi:10.1126/science.aav7617.

Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R. and Macklis, J. D. (2005) "Neuronal Subtype-Specific Genes that Control Corticospinal Motor Neuron Development In Vivo", *Neuron*, 45(2), pp. 207–221. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.036.

Arthur, R. K., An, N., Khan, S. and McNerney, M. E. (2017) "The haploinsufficient tumor suppressor, CUX1, acts as an analog transcriptional regulator that controls target genes through distal enhancers that loop to target promoters", *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp. 6350–6361. doi:10.1093/nar/gkx218.

Badre, D. and Nee, D. E. (2018) "Frontal Cortex and the Hierarchical Control of Behavior", *Trends in Cognitive Sciences*, 22(2), pp. 170–188. doi:10.1016/j.tics.2017.11.005.

Bagri, A., Marín, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L. R. and Tessier-Lavigne, M. (2002) "Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain", *Neuron*, 33(2), pp. 233–248. doi:10.1016/s0896-6273(02)00561-5.

Baker, A., Kalmbach, B., Morishima, M., Kim, J., Juavinett, A., Li, N. and Dembrow, N. (2018) "Specialized Subpopulations of Deep-Layer Pyramidal Neurons in the Neocortex: Bridging Cellular Properties to Functional Consequences", *The Journal of Neuroscience*, 38(24), pp. 5441–5455. doi:10.1523/JNEUROSCI.0150-18.2018.

Bartlett, D. W. and Davis, M. E. (2006) "Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging", *Nucleic Acids Research*, 34(1), pp. 322–333. doi:10.1093/nar/gkj439.

Bekkers, J. M. (2011) "Pyramidal neurons", *Current Biology*, 21(24), p. R975. doi:10.1016/j.cub.2011.10.037.

Bishop, K. M., Goudreau, G. and O'Leary, D. D. M. (2000) "Regulation of Area Identity in the Mammalian Neocortex by Emx2 and Pax6", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 288(5464), pp. 344–349. doi:10.1126/science.288.5464.344.

Boyd, R. (2017) *A Different Kind of Animal: How Culture Transformed Our Species*. Princeton University Press.

Briggs, F. (2010) "Organizing Principles of Cortical Layer 6", *Frontiers in Neural Circuits*, 4. doi:10.3389/neuro.04.003.2010.

Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P. and Metzger, D. (1997) "Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp. 14559–14563. doi:10.1073/pnas.94.26.14559.

- Bulchand, S., Grove, E. A., Porter, F. D. and Tole, S. (2001) "LIM-homeodomain gene *Lhx2* regulates the formation of the cortical hem", *Mechanisms of Development*, 100(2), pp. 165–175. doi:10.1016/s0925-4773(00)00515-3.
- Burgio, G. (2018) "Redefining mouse transgenesis with CRISPR/Cas9 genome editing technology", *Genome Biology*, 19. doi:10.1186/s13059-018-1409-1.
- Cadieux, C., Fournier, S., Peterson, A. C., Bédard, C., Bedell, B. J. and Nepveu, A. (2006) "Transgenic mice expressing the p75 CCAAT-displacement protein/Cut homeobox isoform develop a myeloproliferative disease-like myeloid leukemia", *Cancer Research*, 66(19), pp. 9492–9501. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4230.
- Cadwell, C. R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M. A., Keefe, M. G. and Nowakowski, T. J. (2019) "Development and Arealization of the Cerebral Cortex", *Neuron*, 103(6), pp. 980–1004. doi:10.1016/j.neuron.2019.07.009.
- Cai, H. and Reed, R. R. (1999) "Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1", *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(15), pp. 6519–6527.
- Callaway, E. M. and Borrell, V. (2011) "Developmental Sculpting of Dendritic Morphology of Layer 4 Neurons in Visual Cortex: Influence of Retinal Input", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 31(20), pp. 7456–7470. doi:10.1523/JNEUROSCI.5222-10.2011.
- Caviness, V. S. (1982) "Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography", *Brain Research*, 256(3), pp. 293–302. doi:10.1016/0165-3806(82)90141-9.
- Caviness, V. S. and Frost, D. O. (1980) "Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse", *Journal of Comparative Neurology*, 194(2), pp. 335–367. doi:https://doi.org/10.1002/cne.901940205.
- Chalupa, L. M. and Killackey, H. P. (1989) "Process elimination underlies ontogenetic change in the distribution of callosal projection neurons in the postcentral gyrus of the fetal rhesus monkey", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 86(3), pp. 1076–1079. doi:10.1073/pnas.86.3.1076.
- Charpentier, E. and Doudna, J. A. (2013) "Rewriting a genome", *Nature*. Nature Publishing Group, 495(7439), pp. 50–51. doi:10.1038/495050a.
- Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K., Xue, X., Zheng, W., Ding, Y. and Yuan, X. (2008) "Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development", *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 36–44. doi:10.1038/nn2018.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A. and Tessier-Lavigne, M. (1998) "Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III

semaphorins", *Neuron*, 21(6), pp. 1283–1290. doi:10.1016/s0896-6273(00)80648-0.

Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Graves, T. A., Hillier, L. W., Mardis, E. R., McPherson, J. D., Miner, T. L., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Pepin, K. H., Pohl, C. S., Ponce, T. C., Schultz, B., Thompson, J., Trevaskis, E., Waterston, R. H., Wendl, M. C., Wilson, R. K., Yang, S.-P., An, P., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Brown, D. G., Butler, J., Daly, M., David, R., Deri, J., Dodge, S., Foley, K., Gage, D., Gnerre, S., Holzer, T., Jaffe, D. B., Kamal, M., Karlsson, E. K., Kells, C., Kirby, A., Kulbokas, E. J., Lander, E. S., Landers, T., Leger, J. P., Levine, R., Lindblad-Toh, K., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., Meldrim, J., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Nicol, R., Nusbaum, C., Seaman, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Singer, J. B., Santos, R., Spencer, B., Stange-Thomann, N., Vinson, J. P., Wade, C. M., Wierzbowski, J., Wyman, D., Zody, M. C., Birney, E., Goldman, N., Kasprzyk, A., Mongin, E., Rust, A. G., Slater, G., Stabenau, A., Ureta-Vidal, A., Whelan, S., Ainscough, R., Attwood, J., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Burton, J., Clamp, M., Clee, C., Coulson, A., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Davies, J., Eyraes, E., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Hunt, A., Jones, M., Joy, A., Leonard, S., Lloyd, C., Matthews, L., McLaren, S., McLay, K., Meredith, B., Mullikin, J. C., Ning, Z., Oliver, K., Overton-Larty, E., Plumb, R., Potter, S., Quail, M., Rogers, J., Scott, C., Searle, S., Shownkeen, R., Sims, S., Wall, M., West, A. P., Willey, D., Williams, S., Abril, J. F., Guigó, R., Parra, G., Agarwal, P., Agarwala, R., Church, D. M., Hlavina, W., Maglott, D. R., Sapojnikov, V., Alexandersson, M., Pachter, L., Antonarakis, S. E., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., Ucla, C., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T. S., Hinrichs, A., Hsu, F., Karolchik, D., Kent, W. J., Roskin, K. M., Schwartz, M. S., Sugnet, C., Weber, R. J., Bork, P., Letunic, I., Suyama, M., Torrents, D., Zdobnov, E. M., Botcherby, M., Brown, S. D., Campbell, R. D., Jackson, I., Bray, N., Couronne, O., Dubchak, I., Poliakov, A., Rubin, E. M., Brent, M. R., Flicek, P., Keibler, E., Korf, I., Batalov, S., Bult, C., Frankel, W. N., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Okazaki, Y., Cawley, S., Kulp, D., Wheeler, R., Chiaromonte, F., Collins, F. S., Felsenfeld, A., Guyer, M., Peterson, J., Wetterstrand, K., Copley, R. R., Mott, R., Dewey, C., Dickens, N. J., Emes, R. D., Goodstadt, L., Ponting, C. P., Winter, E., Dunn, D. M., von Niederhausern, A. C., Weiss, R. B., Eddy, S. R., Johnson, L. S., Jones, T. A., Elnitski, L., Kolbe, D. L., Eswara, P., Miller, W., O'Connor, M. J., Schwartz, S., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Glusman, G., Smit, A., Green, E. D., Hardison, R. C., Yang, S., Haussler, D., Hua, A., Roe, B. A., Kucherlapati, R. S., Montgomery, K. T., Li, J., Li, M., Lucas, S., Ma, B., McCombie, W. R., Morgan, M., Pevzner, P., Tesler, G., Schultz, J., Smith, D. R., Tromp, J., Worley, K. C., Lander, E. S., Abril, J. F., Agarwal, P., Alexandersson, M., Antonarakis, S. E., Baertsch, R., Berry, E., Birney, E., Bork, P., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Butler, J., Bult, C., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Collins, F. S., Copley, R. R., Couronne, O., Cawley, S., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Mouse Genome Sequencing Consortium, Genome Sequencing Center:, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research:, European Bioinformatics Institute:, Wellcome Trust Sanger Institute, Research Group in Biomedical Informatics, Bioinformatics, National Center for Biotechnology Information, Department of Mathematics, Division of Medical

Genetics, Center for Biomolecular Science and Engineering, EMBL, UK MRC Mouse Sequencing Consortium, Lawrence Berkeley National Laboratory, Department of Computer Science, School of Computer Science, The Jackson Laboratory, Laboratory for Genome Exploration, Affymetrix Inc., Departments of Statistics and Health Evaluation Sciences, National Human Genome Research Institute, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Department of Electrical Engineering, Department of Human Anatomy and Genetics, Department of Human Genetics, Howard Hughes Medical Institute and Department of Genetics, Departments of Biochemistry and Molecular Biology and Computer Science and Engineering, Department of Computer Science and Engineering, Baylor College of Medicine, The Institute for Systems Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, Departments of Genetics and Medicine and Harvard-Partners Center for Genetics and Genomics, Department of Statistics, US DOE Joint Genome Institute, Cold Spring Harbor Laboratory, Wellcome Trust, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Genome Therapeutics Corporation, Bioinformatics Solutions Inc., Department of Molecular and Human Genetics, Department of Biology, and Members of the Mouse Genome Analysis Group (2002) "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome", *Nature*. Nature Publishing Group, 420(6915), pp. 520–562. doi:10.1038/nature01262.

Cipriani, S., Nardelli, J., Verney, C., Delezoide, A.-L., Guimiot, F., Gressens, P. and Adle-Biassette, H. (2016) "Dynamic Expression Patterns of Progenitor and Pyramidal Neuron Layer Markers in the Developing Human Hippocampus", *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 26(3), pp. 1255–1271. doi:10.1093/cercor/bhv079.

Clark, E. A., Rutlin, M., Capano, L., Aviles, S., Saadon, J. R., Taneja, P., Zhang, Q., Bullis, J. B., Lauer, T., Myers, E., Schulmann, A., Forrest, D. and Nelson, S. B. (2020) "Cortical ROR β is required for layer 4 transcriptional identity and barrel integrity", *eLife*. Edited by C. Dulac, A. E. West, and N. Sestan. eLife Sciences Publications, Ltd, 9, p. e52370. doi:10.7554/eLife.52370.

Clarke, S. and Innocenti, G. M. (1986) "Organization of immature intrahemispheric connections", *Journal of Comparative Neurology*, 251(1), pp. 1–22. doi:https://doi.org/10.1002/cne.902510102.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F. (2013) "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 339(6121), pp. 819–823. doi:10.1126/science.1231143.

Corballis, M. C. and Häberling, I. S. (2017) "The Many Sides of Hemispheric Asymmetry: A Selective Review and Outlook", *Journal of the International Neuropsychological Society*. Cambridge University Press, 23(9–10), pp. 710–718. doi:10.1017/S1355617717000376.

Courchet, J., Lewis, T. L., Lee, S., Courchet, V., Liou, D.-Y., Aizawa, S. and Polleux, F. (2013) "Terminal Axon Branching Is Regulated by the LKB1-NUAK1

Kinase Pathway via Presynaptic Mitochondrial Capture", *Cell*, 153(7), pp. 1510–1525. doi:10.1016/j.cell.2013.05.021.

Cubbon, A., Ivancic-Bace, I. and Bolt, E. L. (2018) "CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability", *Bioscience Reports*, 38(5). doi:10.1042/BSR20180457.

Cubelos, B., Briz, C. G., Esteban-Ortega, G. M. and Nieto, M. (2015) "Cux1 and Cux2 selectively target basal and apical dendritic compartments of layer II-III cortical neurons", *Developmental Neurobiology*, 75(2), pp. 163–172. doi:10.1002/dneu.22215.

Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M. E., Cisneros, E., Kim, S., Dopazo, A., Alvarez-Dolado, M., Redondo, J. M., Bovolenta, P., Walsh, C. A. and Nieto, M. (2010) "Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex", *Neuron*, 66(4), pp. 523–535. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.038.

Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Kim, S., Redondo, J. M., Walsh, C. and Nieto, M. (2008) "Cux-1 and Cux-2 control the development of Reelin expressing cortical interneurons", *Developmental Neurobiology*, 68(7), pp. 917–925. doi:https://doi.org/10.1002/dneu.20626.

Custo Greig, L., Woodworth, M., Galazo, M., Padmanabhan, H. and Macklis, J. (2013) "Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity", *Nature reviews. Neuroscience*, 14(11). doi:10.1038/nrn3586.

De León Reyes, N. S., Bragg-Gonzalo, L. and Nieto, M. (2020) "Development and plasticity of the corpus callosum", *Development (Cambridge, England)*, 147(18). doi:10.1242/dev.189738.

De Leon Reyes, N. S., Mederos, S., Varela, I., Weiss, L. A., Perea, G., Galazo, M. J. and Nieto, M. (2019) "Transient callosal projections of L4 neurons are eliminated for the acquisition of local connectivity", *Nat Commun*, 10(1), p. 4549. doi:10.1038/s41467-019-12495-w.

DeFelipe, J. (2011) "The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity", *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers, 5. doi:10.3389/fnana.2011.00029.

DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L. and Arellano, J. I. (2002) "Microstructure of the neocortex: comparative aspects", *Journal of Neurocytology*, 31(3–5), pp. 299–316. doi:10.1023/a:1024130211265.

DeFelipe, J. and Fariñas, I. (1992) "The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs", *Progress in Neurobiology*, 39(6), pp. 563–607. doi:10.1016/0301-0082(92)90015-7.

Dehay, C., Kennedy, H. and Bullier, J. (1986) "Callosal connectivity of areas V1 and V2 in the newborn monkey", *The Journal of Comparative Neurology*, 254(1), pp. 20–33. doi:10.1002/cne.902540103.

Dehay, C., Kennedy, H. and Bullier, J. (1988) "Characterization of transient cortical projections from auditory, somatosensory, and motor cortices to visual areas 17, 18, and 19 in the kitten", *J Comp Neurol*, 272(1), pp. 68–89. doi:10.1002/cne.902720106.

Denenberg, V. H. (1981) "Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience", *Behavioral and Brain Sciences*. Cambridge University Press, 4(1), pp. 1–21. doi:10.1017/S0140525X00007330.

Douglas, R. J. and Martin, K. A. C. (2004) "Neuronal circuits of the neocortex", *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews, 27(1), pp. 419–451. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152.

Douglas, R. J. and Martin, K. A. C. (2007) "Mapping the Matrix: The Ways of Neocortex", *Neuron*, 56(2), pp. 226–238. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.017.

Edwards, T. J., Sherr, E. H., Barkovich, A. J. and Richards, L. J. (2014) "Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes", *Brain: A Journal of Neurology*, 137(Pt 6), pp. 1579–1613. doi:10.1093/brain/awt358.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature*, 411(6836), pp. 494–498. doi:10.1038/35078107.

Ellis, T., Gambardella, L., Horcher, M., Tschanz, S., Capol, J., Bertram, P., Jochum, W., Barrandon, Y. and Busslinger, M. (2001) "The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle", *Genes & Development*, 15(17), pp. 2307–2319. doi:10.1101/gad.200101.

Elston, G. N. (2003) "Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function", *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 13(11), pp. 1124–1138. doi:10.1093/cercor/bhg093.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., Kowalczyk, T. and Hevner, R. F. (2005) "Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 25(1), pp. 247–251. doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.

Fame, R. M., MacDonald, J. L. and Macklis, J. D. (2011) "Development, specification, and diversity of callosal projection neurons", *Trends Neurosci*, 34(1), pp. 41–50. doi:10.1016/j.tins.2010.10.002.

Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C. C. H., Poulet, J. F. A., Staiger, J. F., Luhmann, H. J. and Schwarz, C. (2013) "Barrel cortex function",

Progress in Neurobiology. (Conversion of Sensory Signals into Perceptions, Memories and Decisions), 103, pp. 3–27. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.11.002.

Fenlon, L. R. and Richards, L. J. (2015) "Contralateral targeting of the corpus callosum in normal and pathological brain function", *Trends Neurosci*, 38(5), pp. 264–72. doi:10.1016/j.tins.2015.02.007.

Fenlon, L. R., Suárez, R. and Richards, L. J. (2017) "The anatomy, organisation and development of contralateral callosal projections of the mouse somatosensory cortex", *Brain and Neuroscience Advances*, 1, p. 239821281769488. doi:10.1177/2398212817694888.

Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrissey, E. E. and Walsh, C. A. (2003) "Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain", *Journal of Comparative Neurology*, 460(2), pp. 266–279. doi:https://doi.org/10.1002/cne.10654.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391(6669), pp. 806–811. doi:10.1038/35888.

Fitsiori, A., Nguyen, D., Karentzos, A., Delavelle, J. and Vargas, M. I. (2011) "The corpus callosum: white matter or terra incognita", *The British Journal of Radiology*. The British Institute of Radiology, 84(997), pp. 5–18. doi:10.1259/bjr/21946513.

Flemr, M. and Bühler, M. (2015) "Single-Step Generation of Conditional Knockout Mouse Embryonic Stem Cells", *Cell Reports*, 12(4), pp. 709–716. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.051.

Florio, M. and Huttner, W. B. (2014) "Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex", *Development*, 141(11), pp. 2182–2194. doi:10.1242/dev.090571.

Fothergill, T., Donahoo, A.-L. S., Douglass, A., Zalucki, O., Yuan, J., Shu, T., Goodhill, G. J. and Richards, L. J. (2014) "Netrin-DCC Signaling Regulates Corpus Callosum Formation Through Attraction of Pioneering Axons and by Modulating Slit2-Mediated Repulsion", *Cerebral Cortex*, 24(5), pp. 1138–1151. doi:10.1093/cercor/bhs395.

Fournier, A. E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G. and Strittmatter, S. M. (2000) "Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse", *J Cell Biol*, 149(2), pp. 411–22. doi:10.1083/jcb.149.2.411.

Frazier, T. W. and Hardan, A. Y. (2009) "A Meta-Analysis of the Corpus Callosum in Autism", *Biological Psychiatry*. (Autism: Molecular Genetics and Neurodevelopment), 66(10), pp. 935–941. doi:10.1016/j.biopsych.2009.07.022.

Funnell, M. G., Corballis, P. M. and Gazzaniga, M. S. (2000) "Insights into the functional specificity of the human corpus callosum", *Brain*. Oxford Academic, 123(5), pp. 920–926. doi:10.1093/brain/123.5.920.

Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. and Moineau, S. (2010) "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7320), pp. 67–71. doi:10.1038/nature09523.

Gillingham, A. K., Pfeifer, A. C. and Munro, S. (2002) "CASP, the Alternatively Spliced Product of the Gene Encoding the CCAAT-Displacement Protein Transcription Factor, Is a Golgi Membrane Protein Related to Giantin", *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology (mboc), 13(11), pp. 3761–3774. doi:10.1091/mbc.e02-06-0349.

Goto, K., Kurashima, R., Gokan, H., Inoue, N., Ito, I. and Watanabe, S. (2010) "Left–Right Asymmetry Defect in the Hippocampal Circuitry Impairs Spatial Learning and Working Memory in *iv* Mice", *PLOS ONE*. Public Library of Science, 5(11), p. e15468. doi:10.1371/journal.pone.0015468.

Gray, L. T., Yao, Z., Nguyen, T. N., Kim, T. K., Zeng, H. and Tasic, B. (2017) "Layer-specific chromatin accessibility landscapes reveal regulatory networks in adult mouse visual cortex", *eLife*. Edited by S. R. Eddy. eLife Sciences Publications, Ltd, 6, p. e21883. doi:10.7554/eLife.21883.

Grueber, W. B. and Sagasti, A. (2010) "Self-avoidance and Tiling: Mechanisms of Dendrite and Axon Spacing", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(9), p. a001750. doi:10.1101/cshperspect.a001750.

Gu, C., Limberg, B. J., Whitaker, G. B., Perman, B., Leahy, D. J., Rosenbaum, J. S., Ginty, D. D. and Kolodkin, A. L. (2002) "Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165*", *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), pp. 18069–18076. doi:10.1074/jbc.M201681200.

Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L. J., Kolodkin, A. L. and Ginty, D. D. (2003) "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development", *Dev Cell*, 5(1), pp. 45–57. doi:10.1016/s1534-5807(03)00169-2.

Harb, K., Magrinelli, E., Nicolas, C. S., Lukianets, N., Frangeul, L., Pietri, M., Sun, T., Sandoz, G., Grammont, F., Jabaudon, D., Studer, M. and Alfano, C. (2016) "Area-specific development of distinct projection neuron subclasses is regulated by postnatal epigenetic modifications", *eLife*. Edited by J. A. Cooper. eLife Sciences Publications, Ltd, 5, p. e09531. doi:10.7554/eLife.09531.

Harris, J. A., Hirokawa, K. E., Sorensen, S. A., Gu, H., Mills, M., Ng, L. L., Bohn, P., Mortrud, M., Ouellette, B., Kidney, J., Smith, K. A., Dang, C., Sunkin, S., Bernard, A., Oh, S. W., Madisen, L. and Zeng, H. (2014) "Anatomical characterization of Cre driver mice for neural circuit mapping and manipulation", *Frontiers in Neural Circuits*. Frontiers, 8. doi:10.3389/fncir.2014.00076.

Harris, J. A., Mihalas, S., Hirokawa, K. E., Whitesell, J. D., Choi, H., Bernard, A., Bohn, P., Caldejon, S., Casal, L., Cho, A., Feiner, A., Feng, D., Gaudreault,

N., Gerfen, C. R., Graddis, N., Groblewski, P. A., Henry, A. M., Ho, A., Howard, R., Knox, J. E., Kuan, L., Kuang, X., Lecoq, J., Lesnar, P., Li, Y., Luviano, J., McConoughey, S., Mortrud, M. T., Naeemi, M., Ng, L., Oh, S. W., Ouellette, B., Shen, E., Sorensen, S. A., Wakeman, W., Wang, Q., Wang, Y., Williford, A., Phillips, J. W., Jones, A. R., Koch, C. and Zeng, H. (2019) "Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity", *Nature*, 575(7781), pp. 195–202. doi:10.1038/s41586-019-1716-z.

Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L. and McMahon, A. P. (2002) "Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain", *Mechanisms of Development*, 119, pp. S97–S101. doi:10.1016/S0925-4773(03)00099-6.

He, A. T., Liu, J., Li, F. and Yang, B. B. (2021) "Targeting circular RNAs as a therapeutic approach: current strategies and challenges", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), pp. 1–14. doi:10.1038/s41392-021-00569-5.

Hill, R. S. and Walsh, C. A. (2005) "Molecular insights into human brain evolution", *Nature*, 437(7055), pp. 64–7. doi:10.1038/nature04103.

Hinkley, L. B. N., Marco, E. J., Findlay, A. M., Honma, S., Jeremy, R. J., Strominger, Z., Bukshpun, P., Wakahiro, M., Brown, W. S., Paul, L. K., Barkovich, A. J., Mukherjee, P., Nagarajan, S. S. and Sherr, E. H. (2012) "The Role of Corpus Callosum Development in Functional Connectivity and Cognitive Processing", *PLOS ONE*. Public Library of Science, 7(8), p. e39804. doi:10.1371/journal.pone.0039804.

Holmgren, C., Harkany, T., Svennenfors, B. and Zilberter, Y. (2003) "Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex", *The Journal of Physiology*, 551(Pt 1), pp. 139–153. doi:10.1113/jphysiol.2003.044784.

Holton, T. A. and Graham, M. W. (1991) "A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors.", *Nucleic Acids Research*, 19(5), p. 1156.

Horii, T. and Hatada, I. (2016) "Challenges to increasing targeting efficiency in genome engineering", *Journal of Reproduction and Development*, 62(1), pp. 7–9. doi:10.1262/jrd.2015-151.

Hou, P.-S., Miyoshi, G. and Hanashima, C. (2019) "Sensory cortex wiring requires preselection of short- and long-range projection neurons through an Egr-Foxg1-COUP-TFI network", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 3581. doi:10.1038/s41467-019-11043-w.

Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, James, Allen, Jamie, Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., Gall, A., Garcia Giron, C., Grego, T., Gujjarro-Clarke, C., Haggerty, L., Hemrom, A., Hourlier, T., Izuogu, O. G., Juettemann, T., Kaikala, V., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D.,

Gonzalez Martinez, J., Marugán, J. C., Maurel, T., McMahon, A. C., Mohanan, S., Moore, B., Muffato, M., Oheh, D. N., Paraschas, D., Parker, A., Parton, A., Prosovetskaia, I., Sakthivel, M. P., Salam, A. I. A., Schmitt, B. M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Steed, E., Szpak, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Walts, B., Winterbottom, A., Chakiachvili, M., Chaubal, A., De Silva, N., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S. E., Ilsley, G. R., Langridge, N., Loveland, J. E., Martin, F. J., Mudge, J. M., Morales, J., Perry, E., Ruffier, M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S. J., Cunningham, F., Yates, A. D., Zerbino, D. R. and Flicek, P. (2021) "Ensembl 2021", *Nucleic Acids Research*, 49(D1), pp. D884–D891. doi:10.1093/nar/gkaa942.

Hsu, P. D., Lander, E. S. and Zhang, F. (2014) "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering", *Cell*, 157(6), pp. 1262–1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.

Hubel, D. H. and Wiesel, T. N. (1962) "Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex", *The Journal of Physiology*, 160(1), pp. 106-154.2.

Hulea, L. and Nepveu, A. (2012) "CUX1 transcription factors: From biochemical activities and cell-based assays to mouse models and human diseases", *Gene*, 497(1), pp. 18–26. doi:10.1016/j.gene.2012.01.039.

Hutvágner, G. and Zamore, P. D. (2002) "RNAi: nature abhors a double-strand", *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), pp. 225–232. doi:10.1016/S0959-437X(02)00290-3.

Inan, M. and Crair, M. C. (2007) "Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex", *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 13(1), pp. 49–61. doi:10.1177/1073858406296257.

Innocenti, G. M. (2020) "The Target of Exuberant Projections in Development", *Cerebral Cortex*, 30(6), pp. 3820–3826. doi:10.1093/cercor/bhz344.

Innocenti, G. M. and Clarke, S. (1984a) "Bilateral transitory projection to visual areas from auditory cortex in kittens", *Developmental Brain Research*. Netherlands: Elsevier Science, 14(1), pp. 143–148. doi:10.1016/0165-3806(84)90019-1.

Innocenti, G. M. and Clarke, S. (1984b) "The organization of immature callosal connections", *J Comp Neurol*, 230(2), pp. 287–309. doi:10.1002/cne.902300212.

Innocenti, G. M., Fiore, L. and Caminiti, R. (1977) "Exuberant projection into the corpus callosum from the visual cortex of newborn cats", *Neuroscience Letters*, 4(5), pp. 237–242. doi:10.1016/0304-3940(77)90185-9.

Innocenti, G. M. and Frost, D. O. (1979) "Effects of visual experience on the maturation of the efferent system to the corpus callosum", *Nature*. Nature Publishing Group, 280(5719), pp. 231–234. doi:10.1038/280231a0.

- Inoue, K., Terashima, T., Nishikawa, T. and Takumi, T. (2004) "Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex", *European Journal of Neuroscience*, 20(11), pp. 2909–2916. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03763.x>.
- Jabaudon, D., J. Shnyder, S., J. Tischfield, D., J. Galazo, M. and Macklis, J. D. (2012) "ROR β Induces Barrel-like Neuronal Clusters in the Developing Neocortex", *Cerebral Cortex*, 22(5), pp. 996–1006. doi:[10.1093/cercor/bhr182](https://doi.org/10.1093/cercor/bhr182).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012) "A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 337(6096), pp. 816–821. doi:[10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829).
- Karolis, V. R., Corbetta, M. and Thiebaut de Schotten, M. (2019) "The architecture of functional lateralisation and its relationship to callosal connectivity in the human brain", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 1417. doi:[10.1038/s41467-019-09344-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-09344-1).
- Keshavan, M. S., Diwadkar, V. A., Harenski, K., Rosenberg, D. R., Sweeney, J. A. and Pettegrew, J. W. (2002) "Abnormalities of the corpus callosum in first episode, treatment naive schizophrenia", *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. BMJ Publishing Group Ltd, 72(6), pp. 757–760. doi:[10.1136/jnnp.72.6.757](https://doi.org/10.1136/jnnp.72.6.757).
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K. and Fang, S. (2018) "Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes", *Laboratory Animal Research*, 34(4), pp. 147–159. doi:[10.5625/lar.2018.34.4.147](https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147).
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T. and Fujisawa, H. (1997) "Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice", *Neuron*, 19(5), pp. 995–1005. doi:[10.1016/s0896-6273\(00\)80392-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80392-x).
- Koester, S. E. and O'Leary, D. D. (1994) "Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum", *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(11 Pt 1), pp. 6608–6620.
- Koralek, K. A. and Killackey, H. P. (1990) "Callosal projections in rat somatosensory cortex are altered by early removal of afferent input.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(4), pp. 1396–1400. doi:[10.1073/pnas.87.4.1396](https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1396).
- Koralek, K. A., Olavarria, J. and Killackey, H. P. (1990) "Areal and laminar organization of corticocortical projections in the rat somatosensory cortex", *The Journal of Comparative Neurology*, 299(2), pp. 133–150. doi:[10.1002/cne.902990202](https://doi.org/10.1002/cne.902990202).
- Krubitzer, L. (1995) "The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different?", *Trends in Neurosciences*, 18(9), pp. 408–417. doi:[10.1016/0166-2236\(95\)93938-T](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93938-T).

Lai, T., Jabaudon, D., Molyneaux, B. J., Azim, E., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. and Macklis, J. D. (2008) "SOX5 Controls the Sequential Generation of Distinct Corticofugal Neuron Subtypes", *Neuron*, 57(2), pp. 232–247. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.023.

Ledford, A. W., Brantley, J. G., Kemeny, G., Foreman, T. L., Quaggin, S. E., Igarashi, P., Oberhaus, S. M., Rodova, M., Calvet, J. P. and Vanden Heuvel, G. B. (2002) "Deregulated expression of the homeobox gene *Cux-1* in transgenic mice results in downregulation of p27(*kip1*) expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia", *Developmental Biology*, 245(1), pp. 157–171. doi:10.1006/dbio.2002.0636.

Lefort, S., Tamm, C., Floyd Sarria, J.-C. and Petersen, C. C. H. (2009) "The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex", *Neuron*, 61(2), pp. 301–316. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.020.

Leid, M., Ishmael, J. E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V. and Dollé, P. (2004) "CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis", *Gene Expression Patterns*, 4(6), pp. 733–739. doi:10.1016/j.modgep.2004.03.009.

Lent, R. and Tovar-Moll, F. (2015) "How can development and plasticity contribute to understanding evolution of the human brain?", *Frontiers in Human Neuroscience*. Frontiers, 9. doi:10.3389/fnhum.2015.00208.

Leone, D. P., Heavner, W. E., Ferenczi, E. A., Dobрева, G., Huguenard, J. R., Grosschedl, R. and McConnell, S. K. (2015) "Satb2 Regulates the Differentiation of Both Callosal and Subcerebral Projection Neurons in the Developing Cerebral Cortex", *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 25(10), pp. 3406–3419. doi:10.1093/cercor/bhu156.

Levy, R. B., Marquarding, T., Reid, A. P., Pun, C. M., Renier, N. and Oviedo, H. V. (2019) "Circuit asymmetries underlie functional lateralization in the mouse auditory cortex", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 2783. doi:10.1038/s41467-019-10690-3.

Li, H., Fertuzinhos, S., Mohns, E., Hnasko, T. S., Verhage, M., Edwards, R., Sestan, N. and Crair, M. C. (2013) "Laminar and Columnar Development of Barrel Cortex Relies on Thalamocortical Neurotransmission", *Neuron*, 79(5), pp. 970–986. doi:10.1016/j.neuron.2013.06.043.

Li, Huanhuan, Yang, F., Hu, A., Wang, X., Fang, E., Chen, Y., Li, D., Song, H., Wang, J., Guo, Y., Liu, Y., Li, Hongjun, Huang, K., Zheng, L. and Tong, Q. (2019) "Therapeutic targeting of circ-CUX1/EWSR1/MAZ axis inhibits glycolysis and neuroblastoma progression", *EMBO Molecular Medicine*, 11(12), p. e10835. doi:10.15252/emmm.201910835.

Lim, J. W. C., Donahoo, A.-L. S., Bunt, J., Edwards, T. J., Fenlon, L. R., Liu, Y., Zhou, J., Moldrich, R. X., Piper, M., Gobius, I., Bailey, T. L., Wray, N. R., Kessar, N., Poo, M.-M., Rubenstein, J. L. R. and Richards, L. J. (2015) "EMX1

- regulates NRP1-mediated wiring of the mouse anterior cingulate cortex", *Development (Cambridge, England)*, 142(21), pp. 3746–3757. doi:10.1242/dev.119909.
- Lindwall, C., Fothergill, T. and Richards, L. J. (2007) "Commissure formation in the mammalian forebrain", *Current Opinion in Neurobiology*. (Development), 17(1), pp. 3–14. doi:10.1016/j.conb.2007.01.008.
- Lodato, S. and Arlotta, P. (2015) "Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex", *Annu Rev Cell Dev Biol*, 31, pp. 699–720. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125353.
- López-Bendito, G., Flames, N., Ma, L., Fouquet, C., Meglio, T. D., Chedotal, A., Tessier-Lavigne, M. and Marín, O. (2007) "Robo1 and Robo2 Cooperate to Control the Guidance of Major Axonal Tracts in the Mammalian Forebrain", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 27(13), pp. 3395–3407. doi:10.1523/JNEUROSCI.4605-06.2007.
- Low, L. K. and Cheng, H.-J. (2006) "Axon pruning: an essential step underlying the developmental plasticity of neuronal connections", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society London. doi:10.1098/rstb.2006.1883.
- Lungu, O. and Stip, E. (2012) "Agenesis of Corpus Callosum and Emotional Information Processing in Schizophrenia", *Frontiers in Psychiatry*, 3, p. 1. doi:10.3389/fpsy.2012.00001.
- Luong, M. X., van der Meijden, C. M., Xing, D., Hesselton, R., Monuki, E. S., Jones, S. N., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Neufeld, E. J. and van Wijnen, A. J. (2002) "Genetic Ablation of the CDP/Cux Protein C Terminus Results in Hair Cycle Defects and Reduced Male Fertility", *Molecular and Cellular Biology*, 22(5), pp. 1424–1437.
- Ma, Y., Zhang, X., Shen, B., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., Bai, L., Huang, X. and Zhang, L. (2014) "Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9", *Cell Research*, 24(1), pp. 122–125. doi:10.1038/cr.2013.157.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. and Götz, M. (2000) "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage", *Development (Cambridge, England)*, 127(24), pp. 5253–5263.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013) "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 339(6121), pp. 823–826. doi:10.1126/science.1232033.
- Mallamaci, A. and Stoykova, A. (2006) "Gene networks controlling early cerebral cortex arealization", *European Journal of Neuroscience*, 23(4), pp. 847–856. doi:https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04634.x.
- Manuel, M., Martynoga, B., Yu, T., West, J. D., Mason, J. O. and Price, D. J. (2010) "The transcription factor Foxg1 regulates the competence of

telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice", *Development (Cambridge, England)*, 137(3), pp. 487–497. doi:10.1242/dev.039800.

Marín-Padilla, M. (1998) "Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex", *Trends in Neurosciences*, 21(2), pp. 64–71. doi:10.1016/s0166-2236(97)01164-8.

Martín Zúñiga, J., Orellana Muriana, J. M., Tur Marí, J., Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, and Universidad de Alcalá de Henares (2011) *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: formación avanzada de postgrado*. Madrid: Universidad de Alcalá : SECAL.

Martins, M., Galfrè, S., Terrigno, M., Pandolfini, L., Appolloni, I., Dunville, K., Marranci, A., Rizzo, M., Mercatanti, A., Poliseo, L., Morandin, F., Pietrosanto, M., Helmer-Citterich, M., Malatesta, P., Vignali, R. and Cremisi, F. (2021) "A eutherian-specific microRNA controls the translation of *Satb2* in a model of cortical differentiation", *Stem Cell Reports*, 16(6), pp. 1496–1509. doi:10.1016/j.stemcr.2021.04.020.

McKenna, W. L., Betancourt, J., Larkin, K. A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J. L. R. and Chen, B. (2011) "Tbr1 and Fezf2 Regulate Alternate Corticofugal Neuronal Identities during Neocortical Development", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 31(2), pp. 549–564. doi:10.1523/JNEUROSCI.4131-10.2011.

McNerney, M. E., Brown, C. D., Wang, X., Bartom, E. T., Karmakar, S., Bandlamudi, C., Yu, S., Ko, J., Sandall, B. P., Stricker, T., Anastasi, J., Grossman, R. L., Cunningham, J. M., Le Beau, M. M. and White, K. P. (2013) "CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia", *Blood*, 121(6), pp. 975–983. doi:10.1182/blood-2012-04-426965.

Mehravar, M., Shirazi, A., Mehrazar, M. M. and Nazari, M. (2019) "In Vitro Pre-validation of Gene Editing by CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein", 11(3), p. 5.

Meissirel, C., Dehay, C., Berland, M. and Kennedy, H. (1991) "Segregation of callosal and association pathways during development in the visual cortex of the primate", *The Journal of Neuroscience*, 11(11), pp. 3297–3316. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-11-03297.1991.

Meissirel, C., Dehay, C., Berland, M. and Kennedy, H. (1991) "Segregation of callosal and association pathways during development in the visual cortex of the primate", *Journal of Neuroscience*, 11(11), pp. 3297–3316.

Meng, X., Winkowski, D. E., Kao, J. P. Y. and Kanold, P. O. (2017) "Sublaminar Subdivision of Mouse Auditory Cortex Layer 2/3 Based on Functional Translaminar Connections", *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(42), pp. 10200–10214. doi:10.1523/JNEUROSCI.1361-17.2017.

Mérot, Y., Rétaux, S. and Heng, J. I.-T. (2009) "Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex",

Seminars in Cell & Developmental Biology. (Regenerative Biology and Medicine: II and Patterning and Evolving the Vertebrate Forebrain), 20(6), pp. 726–734. doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.003.

Miano, J. M., Zhu, Q. M. and Lowenstein, C. J. (2016) "A CRISPR Path to Engineering New Genetic Mouse Models for Cardiovascular Research", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. American Heart Association, 36(6), pp. 1058–1075. doi:10.1161/ATVBAHA.116.304790.

Mihalas, A. B., Elsen, G. E., Bedogni, F., Daza, R. A. M., Ramos-Laguna, K. A., Arnold, S. J. and Hevner, R. F. (2016) "Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity", *Cell Reports*, 16(1), pp. 92–105. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.072.

Miller, M. W. and Vogt, B. A. (1984) "Heterotopic and homotopic callosal connections in rat visual cortex", *Brain Research*, 297(1), pp. 75–89. doi:10.1016/0006-8993(84)90544-4.

Mire, E., Hocine, M., Bazellières, E., Jungas, T., Davy, A., Chauvet, S. and Mann, F. (2018) "Developmental Upregulation of Ephrin-B1 Silences Sema3C/Neuropilin-1 Signaling during Post-crossing Navigation of Corpus Callosum Axons", *Current biology: CB*, 28(11), pp. 1768-1782.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.04.026.

Missirlis, P. I., Smailus, D. E. and Holt, R. A. (2006) "A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination", *BMC Genomics*, 7, p. 73. doi:10.1186/1471-2164-7-73.

Mitchell, B. D. and Macklis, J. D. (2005) "Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice", *J Comp Neurol*, 482(1), pp. 17–32. doi:10.1002/cne.20428.

Miura, H., Quadros, R. M., Gurumurthy, C. B. and Ohtsuka, M. (2018) "Easi - CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors", *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 13(1), pp. 195–215. doi:10.1038/nprot.2017.153.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. and Ogawa, M. (2004) "Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells", *Development (Cambridge, England)*, 131(13), pp. 3133–3145. doi:10.1242/dev.01173.

Mizuno, H., Hirano, T. and Tagawa, Y. (2007) "Evidence for Activity-Dependent Cortical Wiring: Formation of Interhemispheric Connections in Neonatal Mouse Visual Cortex Requires Projection Neuron Activity", *Journal of Neuroscience*, 27(25), pp. 6760–6770. doi:10.1523/JNEUROSCI.1215-07.2007.

Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E. (2005) "Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from

Foreign Genetic Elements", *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3.

Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G. (2000) "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria", *Molecular Microbiology*, 36(1), pp. 244–246. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Fame, R. M., MacDonald, J. L., MacQuarrie, K. L. and Macklis, J. D. (2009) "Novel Subtype-Specific Genes Identify Distinct Subpopulations of Callosal Projection Neurons", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 29(39), pp. 12343–12354. doi:10.1523/JNEUROSCI.6108-08.2009.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. and Macklis, J. D. (2007) "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex", *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 8(6), pp. 427–437. doi:10.1038/nrn2151.

Molyneaux, B. J., Goff, L. A., Brettler, A. C., Chen, H.-H., Hrvatin, S., Rinn, J. L. and Arlotta, P. (2015) "DeCoN: genome-wide analysis of in vivo transcriptional dynamics during pyramidal neuron fate selection in neocortex", *Neuron*, 85(2), pp. 275–288. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.024.

Morcom, L., Gobius, I., Marsh, A. P., Suárez, R., Lim, J. W., Bridges, C., Ye, Y., Fenlon, L. R., Zagar, Y., Douglass, A. M., Donahoo, A.-L. S., Fothergill, T., Shaikh, S., Kozulin, P., Edwards, T. J., Cooper, H. M., IRC5 Consortium, Sherr, E. H., Chédotal, A., Leventer, R. J., Lockhart, P. J. and Richards, L. J. (2021) "DCC regulates astroglial development essential for telencephalic morphogenesis and corpus callosum formation", *eLife*, 10, p. e61769. doi:10.7554/eLife.61769.

Mountcastle, V. B. (1957) "Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex", *Journal of Neurophysiology*, 20(4), pp. 408–434. doi:10.1152/jn.1957.20.4.408.

Muche, A., Bigl, M., Arendt, T. and Schliebs, R. (2015) "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, VEGF receptor 2 (Flk-1) mRNA, and of VEGF co-receptor neuropilin (Nrp)-1 mRNA in brain tissue of aging Tg2576 mice by in situ hybridization", *International Journal of Developmental Neuroscience*, 43(1), pp. 25–34. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.03.003.

Müller, F. and O'Rahilly, R. (1988) "The first appearance of the future cerebral hemispheres in the human embryo at stage 14", *Anatomy and Embryology*, 177(6), pp. 495–511. doi:10.1007/BF00305137.

Nakagawa, Y. and O'Leary, D. D. M. (2003) "Dynamic Patterned Expression of Orphan Nuclear Receptor Genes ROR α and ROR β in Developing Mouse Forebrain", *Developmental Neuroscience*. Karger Publishers, 25(2–4), pp. 234–244. doi:10.1159/000072271.

Nepveu, A. (2001) "Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development", *Gene*, 270(1), pp. 1–15. doi:10.1016/S0378-1119(01)00485-1.

Neubauer, S., Gunz, P., Scott, N. A., Hublin, J.-J. and Mitteroecker, P. (2020) "Evolution of brain lateralization: A shared hominid pattern of endocranial asymmetry is much more variable in humans than in great apes", *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science, 6(7), p. eaax9935. doi:10.1126/sciadv.aax9935.

Ng, S.-Y., Johnson, R. and Stanton, L. W. (2012) "Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors", *The EMBO journal*, 31(3), pp. 522–533. doi:10.1038/emboj.2011.459.

Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M. and Walsh, C. A. (2004) "Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II–IV of the cerebral cortex", *Journal of Comparative Neurology*, 479(2), pp. 168–180. doi:https://doi.org/10.1002/cne.20322.

Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J. P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y. and Lebrand, C. (2009) "Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C", *PLoS Biol*, 7(10), p. e1000230. doi:10.1371/journal.pbio.1000230.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R. (2001) "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex", *Nature*. Nature Publishing Group, 409(6821), pp. 714–720. doi:10.1038/35055553.

Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. (2004) "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases", *Nature Neuroscience*, 7(2), pp. 136–144. doi:10.1038/nn1172.

Norris, C. R. and Kalil, K. (1991) "Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex", *J Neurosci*, 11(11), pp. 3481–92.

O'Driscoll, M. C., Black, G. C. M., Clayton-Smith, J., Sherr, E. H. and Dobyns, W. B. (2010) "Identification of genomic loci contributing to agenesis of the corpus callosum", *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(9), pp. 2145–2159. doi:10.1002/ajmg.a.33558.

Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., Arifin, N., Nakamura, S., Wada, K. and Gurusurthy, C. B. (2018) "i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases", *Genome Biology*, 19(1), p. 25. doi:10.1186/s13059-018-1400-x.

Oishi, K., Aramaki, M. and Nakajima, K. (2016) "Mutually repressive interaction between Brn1/2 and Rorb contributes to the establishment of neocortical layer

2/3 and layer 4", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 113(12), pp. 3371–3376. doi:10.1073/pnas.1515949113.

Oji, A., Noda, T., Fujihara, Y., Miyata, H., Kim, Y. J., Muto, M., Nozawa, K., Matsumura, T., Isotani, A. and Ikawa, M. (2016) "CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 31666. doi:10.1038/srep31666.

O'Leary, D. D. (1987) "Remodelling of early axonal projections through the selective elimination of neurons and long axon collaterals", *Ciba Foundation Symposium*, 126, pp. 113–142. doi:10.1002/9780470513422.ch8.

O'Leary, D. D. M. (1989) "Do cortical areas emerge from a protocortex?", *Trends in Neurosciences*, 12(10), pp. 400–406. doi:10.1016/0166-2236(89)90080-5.

O'Leary, D. D. M. (1992) "Development of connectional diversity and specificity in the mammalian brain by the pruning of collateral projections", *Current Opinion in Neurobiology*, 2(1), pp. 70–77. doi:10.1016/0959-4388(92)90165-H.

O'Leary, D. D. M., Chou, S.-J. and Sahara, S. (2007) "Area Patterning of the Mammalian Cortex", *Neuron*, 56(2), pp. 252–269. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.010.

O'Leary, D. D. M. and Koester, S. E. (1993) "Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex", *Neuron*, 10(6), pp. 991–1006. doi:10.1016/0896-6273(93)90049-W.

O'Leary, D. D. M., Stanfield, B. B. and Cowan, W. M. (1981) "Evidence that the early postnatal restriction of the cells of origin of the callosal projection is due to the elimination of axonal collaterals rather than to the death of neurons", *Developmental Brain Research*, 1(4), pp. 607–617. doi:10.1016/0165-3806(81)90012-2.

Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P. and Pazos, F. (2016) "Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes", *Nucleic Acids Research*, 44(W1), pp. W267–W271. doi:10.1093/nar/gkw407.

Paolino, A., Fenlon, L. R., Kozulin, P., Haines, E., Lim, J. W. C., Richards, L. J. and Suárez, R. (2020) "Differential timing of a conserved transcriptional network underlies divergent cortical projection routes across mammalian brain evolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 117(19), pp. 10554–10564. doi:10.1073/pnas.1922422117.

Paul, L. K. (2011) "Developmental malformation of the corpus callosum: a review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement", *Journal of neurodevelopmental disorders*, 3(1), pp. 3–27. doi:10.1007/s11689-010-9059-y.

Paul, L. K., Corsello, C., Kennedy, D. P. and Adolphs, R. (2014) "Agenesis of the corpus callosum and autism: a comprehensive comparison", *Brain*, 137(6), pp. 1813–1829. doi:10.1093/brain/awu070.

Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (1 vol). Compact 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.

Paz-Alonso, P. M., Bunge, S. A. and Ghetti, S. (2014) *Emergence of Higher Cognitive Functions*, *Oxford Handbooks Online*. doi:10.1093/oxfordhb/9780199935291.013.003.

Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H. and Zachary, I. (2008) "Neuropilins: structure, function and role in disease", *Biochemical Journal*, 411(2), pp. 211–226. doi:10.1042/BJ20071639.

Petersen, C. C. H. and Sakmann, B. (2000) "The Excitatory Neuronal Network of Rat Layer 4 Barrel Cortex", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 20(20), pp. 7579–7586. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-20-07579.2000.

Piper, M., Plachez, C., Zalucki, O., Fothergill, T., Goudreau, G., Erzurumlu, R., Gu, C. and Richards, L. J. (2009) "Neuropilin 1-Sema signaling regulates crossing of cingulate pioneering axons during development of the corpus callosum", *Cereb Cortex*, 19 Suppl 1, pp. i11-21. doi:10.1093/cercor/bhp027.

Plachez, C. and Richards, L. J. (2005) "Mechanisms of axon guidance in the developing nervous system", *Current Topics in Developmental Biology*, 69, pp. 267–346. doi:10.1016/S0070-2153(05)69010-2.

Polleux, F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L. and Ghosh, A. (1998) "Patterning of Cortical Efferent Projections by Semaphorin-Neuropilin Interactions", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 282(5395), pp. 1904–1906. doi:10.1126/science.282.5395.1904.

Porath, B., Livingston, S., Andres, E. L., Petrie, A. M., Wright, J. C., Woo, A. E., Carlton, C. G., Baybutt, R. and Vanden Heuvel, G. B. (2017) "Cux1 promotes cell proliferation and polycystic kidney disease progression in an ADPKD mouse model", *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 313(4), pp. F1050–F1059. doi:10.1152/ajprenal.00380.2016.

Pouchelon, G., Gambino, F., Bellone, C., Telley, L., Vitali, I., Lüscher, C., Holtmaat, A. and Jabaudon, D. (2014) "Modality-specific thalamocortical inputs instruct the identity of postsynaptic L4 neurons", *Nature*, 511(7510), pp. 471–474. doi:10.1038/nature13390.

Quadros, R. M., Miura, H., Harms, D. W., Akatsuka, H., Sato, T., Aida, T., Redder, R., Richardson, G. P., Inagaki, Y., Sakai, D., Buckley, S. M., Seshacharyulu, P., Batra, S. K., Behlke, M. A., Zeiner, S. A., Jacobi, A. M., Izu, Y., Thoreson, W. B., Urness, L. D., Mansour, S. L., Ohtsuka, M. and Gurusurthy, C. B. (2017) "Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA

- donors and CRISPR ribonucleoproteins", *Genome Biology*, 18(1), p. 92. doi:10.1186/s13059-017-1220-4.
- Quinn, J. C., Molinek, M., Martynoga, B. S., Zaki, P. A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R. F., West, J. D. and Price, D. J. (2007) "Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism", *Developmental Biology*, 302(1), pp. 50–65. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.035.
- Rakic, P. (1974) "Neurons in Rhesus Monkey Visual Cortex: Systematic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 183(4123), pp. 425–427. doi:10.1126/science.183.4123.425.
- Rakic, P. (1988a) "Specification of cerebral cortical areas", *Science (New York, N.Y.)*, 241(4862), pp. 170–176. doi:10.1126/science.3291116.
- Rakic, P. (1988b) "Specification of cerebral cortical areas", *Science*, 241(4862), pp. 170–6. doi:10.1126/science.3291116.
- Rakic, P. (2009) "Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology", *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(10), pp. 724–735. doi:10.1038/nrn2719.
- Ramdzan, Z. M. and Nepveu, A. (2014) "CUX1 , a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers", *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 14(10), pp. 673–682. doi:10.1038/nrc3805.
- Ramos, A. D., Diaz, A., Nellore, A., Delgado, R. N., Park, K.-Y., Gonzales-Roybal, G., Oldham, M. C., Song, J. S. and Lim, D. A. (2013) "Integration of Genome-wide Approaches Identifies lncRNAs of Adult Neural Stem Cells and Their Progeny In Vivo", *Cell Stem Cell*, 12(5), pp. 616–628. doi:10.1016/j.stem.2013.03.003.
- Rash, B. G. and Richards, L. J. (2001) "A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum", *J Comp Neurol*, 434(2), pp. 147–57. doi:10.1002/cne.1170.
- Reber, M., Burrola, P. and Lemke, G. (2004) "A relative signalling model for the formation of a topographic neural map", *Nature*, 431(7010), pp. 847–853. doi:10.1038/nature02957.
- Rodriguez-Tornos, F. M., Briz, C. G., Weiss, L. A., Sebastian-Serrano, A., Ares, S., Navarrete, M., Frangeul, L., Galazo, M., Jabaudon, D., Esteban, J. A. and Nieto, M. (2016) "Cux1 Enables Interhemispheric Connections of Layer II/III Neurons by Regulating Kv1-Dependent Firing", *Neuron*, 89(3), pp. 494–506. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.020.
- Rodríguez-Tornos, F. M., Cubelos, B. and Nieto, M. (2013) "Regulation of Cortical Circuit Formation", in Kageyama, R. and Yamamori, T. (eds.) *Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization*. Tokyo: Springer Japan, pp. 127–151. doi:10.1007/978-4-431-54496-8_6.

Romero, C. D. J. and Borrell, V. (2015) "Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex", *Glia*, 63(8), pp. 1303–1319. doi:<https://doi.org/10.1002/glia.22827>.

Rong Zeng, W., Soucie, E., Sung Moon, N., Martin-Soudant, N., Bérubé, G., Leduy, L. and Nepveu, A. (2000) "Exon/intron structure and alternative transcripts of the CUTL1 gene", *Gene*, 241(1), pp. 75–85. doi:10.1016/S0378-1119(99)00465-5.

Rouaux, C. and Arlotta, P. (2013) "Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo", *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(2), pp. 214–221. doi:10.1038/ncb2660.

Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Kawate, H., Watanabe, S., Sato, M. and Shindo, T. (2020) "Production of genetically engineered mice with higher efficiency, lower mosaicism, and multiplexing capability using maternally expressed Cas9", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 1091. doi:10.1038/s41598-020-57996-7.

Sansregret, L. and Nepveu, A. (2008) "The multiple roles of CUX1: Insights from mouse models and cell-based assays", *Gene*, 412(1), pp. 84–94. doi:10.1016/j.gene.2008.01.017.

Sauer, B. (1998) "Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem", *Methods*, 14(4), pp. 381–392. doi:10.1006/meth.1998.0593.

Schaeren-Wiemers, N., André, E., Kapfhammer, J. P. and Becker-André, M. (1997) "The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm", *The European Journal of Neuroscience*, 9(12), pp. 2687–2701. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01698.x.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.

Scully, R., Panday, A., Elango, R. and Willis, N. A. (2019) "DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 20(11), pp. 698–714. doi:10.1038/s41580-019-0152-0.

Sehara, K., Wakimoto, M., Ako, R. and Kawasaki, H. (2012) "Distinct developmental principles underlie the formation of ipsilateral and contralateral whisker-related axonal patterns of layer 2/3 neurons in the barrel cortex", *Neuroscience*, 226, pp. 289–304. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.010.

Sermet, B. S., Truschow, P., Feyerabend, M., Mayrhofer, J. M., Oram, T. B., Yizhar, O., Staiger, J. F. and Petersen, C. C. (2019) "Pathway-, layer- and cell-type-specific thalamic input to mouse barrel cortex", *eLife*. Edited by S. B.

- Nelson, E. Marder, S. B. Nelson, and D. E. Feldman. eLife Sciences Publications, Ltd, 8, p. e52665. doi:10.7554/eLife.52665.
- Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. and Huang, X. (2013) "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting", *Cell Research*. Nature Publishing Group, 23(5), pp. 720–723. doi:10.1038/cr.2013.46.
- Shu, T. and Richards, L. J. (2001) "Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum", *J Neurosci*, 21(8), pp. 2749–58.
- Silver, J., Edwards, M. A. and Levitt, P. (1993) "Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain", *J Comp Neurol*, 328(3), pp. 415–36. doi:10.1002/cne.903280308.
- Simi, A. and Studer, M. (2018) "Developmental genetic programs and activity-dependent mechanisms instruct neocortical area mapping", *Current Opinion in Neurobiology*. (Developmental Neuroscience), 53, pp. 96–102. doi:10.1016/j.conb.2018.06.007.
- Simons, D. J. and Woolsey, T. A. (1984) "Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex", *Journal of Comparative Neurology*, 230(1), pp. 119–132. doi:10.1002/cne.902300111.
- Sinclair, A. M., Lee, J. A., Goldstein, A., Xing, D., Liu, S., Ju, R., Tucker, P. W., Neufeld, E. J. and Scheuermann, R. H. (2001) "Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice", *Blood*, 98(13), pp. 3658–3667. doi:10.1182/blood.V98.13.3658.
- Smart, I. H. (1973) "Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures", *Journal of Anatomy*, 116(Pt 1), pp. 67–91.
- Stanfield, B. B., O'Leary, D. D. M. and Fricks, C. (1982) "Selective collateral elimination in early postnatal development restricts cortical distribution of rat pyramidal tract neurones", *Nature*, 298(5872), pp. 371–373. doi:10.1038/298371a0.
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L. and Huarte, M. (2021) "Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), pp. 96–118. doi:10.1038/s41580-020-00315-9.
- Suárez, R., Fenlon, L. R., Marek, R., Avitan, L., Sah, P., Goodhill, G. J. and Richards, L. J. (2014) "Balanced interhemispheric cortical activity is required for correct targeting of the corpus callosum", *Neuron*, 82(6), pp. 1289–1298. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.040.

Suarez, R., Gobius, I. and Richards, L. J. (2014) "Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain", *Front Hum Neurosci*, 8, p. 497. doi:10.3389/fnhum.2014.00497.

Suárez, R., Gobius, I. and Richards, L. J. (2014) "Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain", *Frontiers in Human Neuroscience*, 8. doi:10.3389/fnhum.2014.00497.

Sun, T. and Hevner, R. F. (2014) "Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations", *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(4), pp. 217–232. doi:10.1038/nrn3707.

Supper, E., Rudat, S., Iyer, V., Droop, A., Wong, K., Spinella, J.-F., Thomas, P., Sauvageau, G., Adams, D. J. and Wong, C. C. (2021) "Cut-like homeobox 1 (CUX1) tumor suppressor gene haploinsufficiency induces apoptosis evasion to sustain myeloid leukemia", *Nature Communications*, 12(1), p. 2482. doi:10.1038/s41467-021-22750-8.

Suto, F., Murakami, Y., Nakamura, F., Goshima, Y. and Fujisawa, H. (2003) "Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4", *Mechanisms of Development*, 120(3), pp. 385–396. doi:10.1016/S0925-4773(02)00421-5.

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H. and Strittmatter, S. M. (1999) "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors", *Cell*, 99(1), pp. 59–69. doi:10.1016/s0092-8674(00)80062-8.

Takahashi, T. and Strittmatter, S. M. (2001) "Plexin1 autoinhibition by the plexin sema domain", *Neuron*, 29(2), pp. 429–439. doi:10.1016/s0896-6273(01)00216-1.

Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T. and Takauji, R. (2003) "Evidence that Semaphorin 3A and Semaphorin 3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex", *Journal of Comparative Neurology*, 455(2), pp. 238–248. doi:10.1002/cne.10476.

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T. N., Kim, T. K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L. T., Sorensen, S. A., Dolbeare, T., Bertagnolli, D., Goldy, J., Shapovalova, N., Parry, S., Lee, C., Smith, K., Bernard, A., Madisen, L., Sunkin, S. M., Hawrylycz, M., Koch, C. and Zeng, H. (2016) "Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics", *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 19(2), pp. 335–346. doi:10.1038/nn.4216.

Telley, L., Cadilhac, C., Cioni, J.-M., Saywell, V., Jahannault-Talignani, C., Huettl, R. E., Sarrailh-Faivre, C., Dayer, A., Huber, A. B. and Ango, F. (2016) "Dual Function of NRP1 in Axon Guidance and Subcellular Target Recognition in Cerebellum", *Neuron*, 91(6), pp. 1276–1291. doi:10.1016/j.neuron.2016.08.015.

Tissir, F. and Goffinet, A. M. (2003) "Reelin and brain development", *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(6), pp. 496–505. doi:10.1038/nrn1113.

Tufarelli, C., Fujiwara, Y., Zappulla, D. C. and Neufeld, E. J. (1998) "Hair Defects and Pup Loss in Mice with Targeted Deletion of the First Cut Repeat Domain of the *Cux/CDP* Homeoprotein Gene", *Developmental Biology*, 200(1), pp. 69–81. doi:10.1006/dbio.1998.8950.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., Feilitzén, K. von, Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Heijne, G. von, Nielsen, J. and Pontén, F. (2015) "Tissue-based map of the human proteome", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 347(6220). doi:10.1126/science.1260419.

Unni, D. K., Piper, M., Moldrich, R. X., Gobius, I., Liu, S., Fothergill, T., Donahoo, A.-L. S., Baisden, J. M., Cooper, H. M. and Richards, L. J. (2012) "Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum", *Developmental Biology*, 365(1), pp. 36–49. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.004.

Unterberger, I., Bauer, R., Walser, G. and Bauer, G. (2016) "Corpus callosum and epilepsies", *Seizure*, 37, pp. 55–60. doi:10.1016/j.seizure.2016.02.012.

Velona, T., Altounian, M., Roque, M., Hocine, M., Bellon, A., Briz, C. G., Salin, P., Nieto, M., Chauvet, S. and Mann, F. (2019) "PlexinD1 and Sema3E determine laminar positioning of heterotopically projecting callosal neurons", *Molecular and Cellular Neuroscience*, 100, p. 103397. doi:10.1016/j.mcn.2019.103397.

Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S. -m., Xiong, Z.-Q. and Ding, Y.-Q. (2007) "Activity-Dependent Development of Callosal Projections in the Somatosensory Cortex", *Journal of Neuroscience*, 27(42), pp. 11334–11342. doi:10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013) "One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering", *Cell*, 153(4), pp. 910–918. doi:10.1016/j.cell.2013.04.025.

Wang, L. and Marquardt, T. (2013) "What axons tell each other: axon–axon signaling in nerve and circuit assembly", *Current Opinion in Neurobiology*. (Development of neurons and glia), 23(6), pp. 974–982. doi:10.1016/j.conb.2013.08.004.

Watson, C. (2012) "Chapter 21 - The Somatosensory System", in Watson, C., Paxinos, G., and Puelles, L. (eds.) *The Mouse Nervous System*. San Diego: Academic Press, pp. 563–570.

- Watson, C., Paxinos, G. and Puelles, L. (eds.) (2012) *The mouse nervous system*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press.
- Weiss, L. A. and Nieto, M. (2019) "The crux of Cux genes in neuronal function and plasticity", *Brain Research*, 1705, pp. 32–42. doi:10.1016/j.brainres.2018.02.044.
- White, E. L. (1989) "General Organization of the Cerebral Cortex", in White, E. L. (ed.) *Cortical Circuits: Synaptic Organization of the Cerebral Cortex Structure, Function, and Theory*. Boston, MA: Birkhäuser, pp. 5–18. doi:10.1007/978-1-4684-8721-3_1.
- Wise, S. P., Boussaoud, D., Johnson, P. B. and Caminiti, R. (1997) "PREMOTOR AND PARIETAL CORTEX: Corticocortical Connectivity and Combinatorial Computations", *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews, 20(1), pp. 25–42. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.25.
- Wise, S. P. and Jones, E. G. (1976) "The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex", *J Comp Neurol*, 168(3), pp. 313–43. doi:10.1002/cne.901680302.
- Wonders, C. P. and Anderson, S. A. (2006) "The origin and specification of cortical interneurons", *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 7(9), pp. 687–696. doi:10.1038/nrn1954.
- Woodworth, M. B., Greig, L. C., Liu, K. X., Ippolito, G. C., Tucker, H. O. and Macklis, J. D. (2016) "Ctip1 regulates the balance between specification of distinct projection neuron subtypes in deep cortical layers", *Cell reports*, 15(5), pp. 999–1012. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.064.
- Wu, K. Y., He, M., Hou, Q. Q., Sheng, A. L., Yuan, L., Liu, F., Liu, W. W., Li, G., Jiang, X. Y. and Luo, Z. G. (2014) "Semaphorin 3A activates the guanosine triphosphatase Rab5 to promote growth cone collapse and organize callosal axon projections", *Sci Signal*, 7(340), p. ra81. doi:10.1126/scisignal.2005334.
- Xie, R., Zhang, Y., Zhang, J., Li, J. and Zhou, X. (2020) "The Role of Circular RNAs in Immune-Related Diseases", *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00545.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L. and Jaenisch, R. (2013) "One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering", *Cell*, 154(6), pp. 1370–1379. doi:10.1016/j.cell.2013.08.022.
- Yorke, C. H. and Caviness, V. S. (1975) "Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: a study based on anterograde and retrograde methods", *J Comp Neurol*, 164(2), pp. 233–45. doi:10.1002/cne.901640206.
- Young, T. L., Matsuda, T. and Cepko, C. L. (2005) "The Noncoding RNA Taurine Upregulated Gene 1 Is Required for Differentiation of the Murine Retina", *Current Biology*, 15(6), pp. 501–512. doi:10.1016/j.cub.2005.02.027.

Zhang, X., Zhang, J., Liu, Q., Zhao, Y., Zhang, W. and Yang, H. (2020) "Circ-CUX1 Accelerates the Progression of Neuroblastoma via miR-16-5p/DMRT2 Axis", *Neurochemical Research*, 45(12), pp. 2840–2855. doi:10.1007/s11064-020-03132-w.

Zhao, H., Maruyama, T., Hattori, Y., Sugo, N., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Shirasaki, R. and Yamamoto, N. (2011) "A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex", *J Comp Neurol*, 519(5), pp. 834–48. doi:10.1002/cne.22536.

Zhou, J., Wen, Y., She, L., Sui, Y. N., Liu, L., Richards, L. J. and Poo, M. M. (2013) "Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(29), pp. E2714-23. doi:10.1073/pnas.1310233110.

Zimmer, C., Tiveron, M.-C., Bodmer, R. and Cremer, H. (2004) "Dynamics of Cux2 Expression Suggests that an Early Pool of SVZ Precursors is Fated to Become Upper Cortical Layer Neurons", *Cerebral Cortex*, 14(12), pp. 1408–1420. doi:10.1093/cercor/bhh102.

Zimmer-Bensch, G. (2019) "Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs as Drivers of Brain Evolution", *Cells*, 8(11), p. 1399. doi:10.3390/cells8111399.

Anexos

ANEXOS

1 **Role of Nrp1 in controlling cortical interhemispheric circuits**

2 Martín-Fernández, F¹., Briz, C. G.¹, Nieto, M.¹

3 ¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Centro Nacional de Biotecnología,
4 Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Campus de Cantoblanco,
5 Darwin 3, 28049 Madrid, Spain.

6 *Correspondence to: mnlopez@cnb.csic.es

7 **Abstract**

8 Callosal projections establish topographically organized maps between cortical areas.
9 Neuropilin-1 (Nrp1) cortical gradient induces an early segregation of developing callosal
10 axons. We investigated later roles of Nrp1 on the development of callosal projections
11 from layer (L) 2/3 of the primary (S1) and secondary (S2) somatosensory (SS) areas,
12 which express higher and lower levels of Nrp1, respectively. We used *in utero*
13 electroporation to knock down or overexpress Nrp1 combined with retrograde tracers, to
14 map connections at postnatal day 16 and 30. High levels of Nrp1 blocked contralateral
15 S2 innervation while promoted the late postnatal growth of homotopic S1L2/3 and
16 heterotopic S2L2/3 branches into S1. Conversely, knocking down Nrp1 increased the
17 growth of heterotopic S1L2/3 projections into S2, and the overall refinement of S2L2/3
18 branches, thereby diminishing the number of P30 S2L2/3 callosally projecting neurons.
19 Thus, the Nrp1 gradient determines homotopic S2L2/3 callosal connectivity by regulating
20 late postnatal branching and refinement in a topographic manner.

21 **Introduction**

22 The cerebral cortex is responsible for the execution of higher cognitive functions (Hill
23 and Walsh, 2005). During evolution, the cortex had increased in size and complexity
24 permitting eutherian brains to acquire the corpus callosum (CC). The CC is a
25 tridimensional structure of myelinated interhemispheric axons that mediates the higher
26 processing of information by establishing a topographically and hierarchically organized
27 communication. It interconnects neurons located in equivalent areas of the hemispheres
28 (homotopic callosal connections), as well as neurons of different modalities and orders
29 (heterotopic connections) (Wise and Jones, 1976; Miller and Vogt, 1984; Rakic, 1988;
30 Fenlon *et al.*, 2017; De León Reyes *et al.*, 2020).

31 For the correct processing of information, developmental mechanisms must ensure the
32 precise definition of two aspects of the organization of adult CC circuits: firstly, the
33 number of callosally projecting neurons (CPNs) in each cortical area and layer, and
34 secondly, the topographical arrangement of their contralateral axons. Both of these
35 aspects are the result of developmental selection processes including refinement (Aboitiz
36 and Montiel, 2003; Fame *et al.*, 2011; Fenlon and Richards, 2015). Not all cortical areas
37 contain the same number of CPNs. Their precise proportion defines the different
38 functional cortical areas and regions. Associative areas, for instance, contain more CPNs
39 than primary regions. The layer (L) distribution of CPNs also varies within areas,
40 although in general, CPNs are more abundant in L2/3 and L5 of the adult cortex, there
41 are some in L6 and very few in L4. The selection of the axonal targets of these CPNs is
42 also highly specific. Callosal axons branch and synapse in topographically reproducible
43 locations in the contralateral hemisphere. As a rule, they branch more profusely in
44 homotopic areas and less in heterotopic locations. These branches form axonal columns
45 that are usually in proximity to the border between areas (Mitchell and Macklis, 2005;
46 Courchet *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2014; Rodriguez-Tornos *et al.*, 2016; Fenlon *et al.*,
47 2017).

48 As mentioned, axonal refinement plays an important role in CC development. On the one
49 hand, postnatal refinement dictates the elimination of exuberant branches that had
50 invaded the cortical plate but do not establish synapses efficiently. This is thought to
51 select optimal functional connectivity (Stanfield *et al.*, 1982; Innocenti and Clarke, 1984;
52 Dehay *et al.*, 1986; Meissirel *et al.*, 1991; Innocenti, 2020). On the other hand,
53 developmental refinement determines the number of CPNs in each area and layer. Early

54 in development, CPNs are remarkably exuberant. Many cortical neurons, and virtually all
55 neurons located in the upper layers (L2/3 and L4), develop transient callosal axons that
56 invade the contralateral territories and bear the potential to establish a mature callosal
57 connection. Most of these developmental projections do not progress into mature
58 interhemispheric connections and are instead eliminated during the first postnatal weeks
59 of the animal's life (De Leon Reyes *et al.*, 2019). This CPN refinement is mediated by
60 mechanisms that partly depend on activity, but which are largely unknown (Innocenti and
61 Clarke, 1984; Koralek and Killackey, 1990; Innocenti and Price, 2005; Mizuno *et al.*,
62 2007; Huang *et al.*, 2013; Suárez *et al.*, 2014; Antón-Bolaños *et al.*, 2019; De Leon Reyes
63 *et al.*, 2019).

64 In the mouse developing cortex, Neuropilin-1 (Nrp1) is expressed in a high to low
65 mediolateral gradient (Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Mucbe *et al.*, 2015). Nrp1 null
66 mutant mice are embryonically lethal (Kitsukawa *et al.*, 1997). To circumvent lethality,
67 previous studies relied on Nrp1 conditional lines and on mutants of the binding domain
68 of the Semaphorins, which are among its known ligands (Nrp1^{Sema-} mutant). Nrp1 plays
69 several roles during CC development (Hatanaka *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*,
70 2013). At the CC midline, the interaction of Nrp1 with Semaphorin 3 (Sema3) C
71 mediates the crossing of callosal axons (Gu *et al.*, 2003; Niquille *et al.*, 2009; Piper *et al.*,
72 2009; Mire *et al.*, 2018). Sema3A, another ligand of Nrp1, is expressed in the developing
73 neocortex in a gradient that is opposite and complementary to that of Nrp1 (Tamamaki *et al.*,
74 2003; Zhao *et al.*, 2011). The binding of Sema3A to Nrp1-PlexinA1 induces axonal
75 repulsion via the collapse of axonal growth cones (Takahashi *et al.*, 1999; Fournier *et al.*,
76 2000; Wu *et al.*, 2014). Since due to the gradients, callosal axons from motor areas
77 express high Nrp1 and low Sema3A levels, axonal repulsion leads to the segregation of
78 motor and somatosensory (SS) callosal axons, which express the opposite combination
79 (Zhou *et al.*, 2013). This determines that motor and SS axons occupy the dorsal and
80 ventral callosal routes, respectively, and contributes to their guiding to motor and SS
81 contralateral areas. Accordingly, genetic ablations of Sema3A or Nrp1 disrupt this axonal
82 order and disorganizes axonal projections in the contralateral hemisphere (Zhou *et al.*,
83 2013). This effect is mediated by the steep gradient of Nrp1 expression established
84 between motor and SS areas. However, little is known about the consequences of the
85 lower differences that Nrp1 expression gradient creates within each area. Also, it is not
86 known if Nrp1 plays additional functions on callosal development other than guidance.

87 Herein we investigated the roles of Nrpl gradient during the organization of
88 somatosensory interhemispheric maps.

89 **Results**

90 **Nrp1 expression levels determine the pattern of SS contralateral innervation**

91 To investigate the roles of Nrp1 in the development of the callosal circuits of the SS
92 cortex, we performed *in utero* electroporation (IUE) of constructs knocking down
93 (shNrp1) or overexpressing Nrp1 (CAG-Nrp1). IUE was performed at embryonic day (E)
94 15.5 to specifically target L2/3 neurons. Vectors were co-electroporated with a plasmid
95 encoding GFP (CAG-GFP), thus allowing to characterize the electroporated neurons and
96 their projections at selected stages after birth (Figure 1A). Electroporations were targeted
97 to the SS cortex, which is functionally divided into the primary somatosensory cortex
98 (S1) and the secondary somatosensory cortex (S2), which receives first and higher-order
99 sensory inputs from the thalamus, respectively (Rakic, 1988; Watson, 2012). For the
100 analyses, the S1 barrel field area and the more lateral S2 area (Figure 1B) were
101 distinguished by anatomical hallmarks such as the high density of L4 DAPI⁺ nuclei in the
102 barrels (Paxinos and Franklin, 2004). We first examined the effects of our Nrp1
103 manipulations on the mature circuit of postnatal day (P) 30 animals. Coronal sections of
104 brains electroporated with the control plasmid (CAG-GFP) showed that callosal
105 projections from GFP⁺ L2/3 neurons reproducibly elaborate separated axonal columns in
106 the SS areas of the contralateral hemisphere as described (Courchet *et al.*, 2013; Suárez
107 *et al.*, 2014). The main column is located at the border of the S1 and S2 area, hereafter
108 referred to as S1/S2 column (Figure 1A-C, blue arrowheads). Another less dense but very
109 similar column forms in the lateral border of S2, hereafter referred to as the S2 column
110 (Figure 1A-C, magenta arrowheads). Within the S1/S2 column, axons branch more
111 profusely in L2/3 and L5, and within the S2 column, in L2/3 (Figure 1C). When knocking
112 down Nrp1, we did not advert any obvious change in the overall pattern of contralateral
113 innervation (Figure 1D). By contrast, overexpressing Nrp1 in L2/3 neurons caused a
114 visible reduction of S2 axons together with an increase of S1 innervation (Figure 1E). To
115 quantify these phenotypes, we measured the pixels occupied by the GFP fluorescence
116 signal in specific regions of interest (ROI) delineating the main relevant SS areas and
117 columns. To account for any differences in electroporation efficiency, the values of GFP
118 within these ROIs were normalized to the fluorescence signal of the ipsilateral
119 hemisphere (see Methods) (Rodríguez-Tornos *et al.*, 2016; Briz *et al.*, 2017). Firstly, the
120 analysis of the total contralateral innervation showed that the average values and
121 dispersion are indistinguishable in controls, shNrp1, and CAG-Nrp1 conditions (Figure

122 1F). This result confirmed that changing Nrp1 levels does not cause overall impairments
123 of axonal innervation. Secondly, we quantified the number of GFP⁺ branches forming the
124 S1/S2 column (Figure 1G), the S2 column (Figure 1H), and the axons in the remaining
125 S1 area (Figure 1I). This quantification revealed a reduced S2 column and a slight
126 increase of GFP⁺ axons in S1 in CAG-Nrp1 electroporated brains. No differences were
127 detected in brains electroporated with shNrp1 (Figure 1G-I). An alternative analysis of
128 the relative distribution of GFP⁺ axons in the different contralateral areas rendered
129 equivalent results (See Methods and Figure 1 – figure supplement 1). The differences in
130 axonal distribution were not due to neuronal death because the proportions of ipsilateral
131 GFP⁺ neurons were indistinguishable in brains of all conditions (Figure 1 – figure
132 supplement 2). Thus, increasing Nrp1 levels in L2/3 neurons blocks the development of
133 their callosal axons in the contralateral S2 area while promoting branching in S1
134 territories. This suggests the implication of Nrp1 in the area-specific distribution of
135 callosal branches.

Figure 1

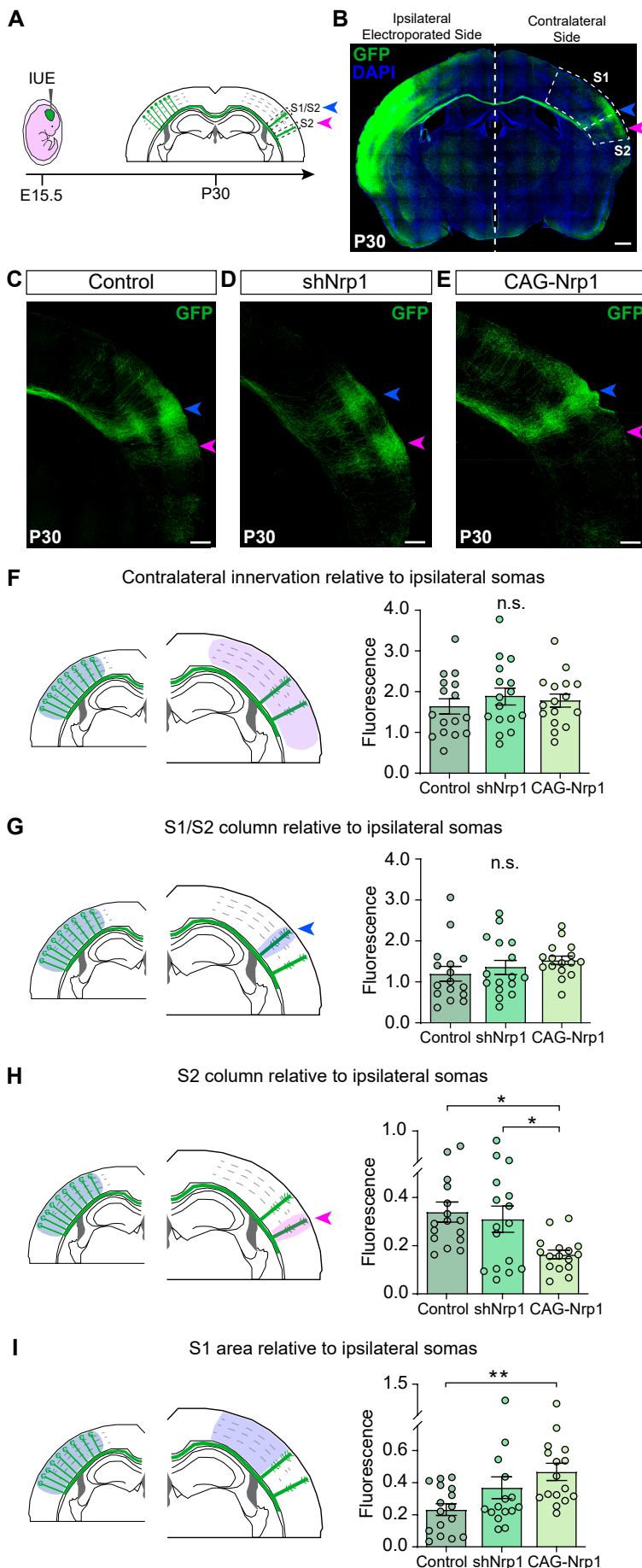


Figure 1. Analysis of the distribution of callosal axons upon alterations in Nrp1 levels. **A)** Scheme of the experimental approach. Contralaterally, L2/3 callosal axons form two main axonal columns, the S1/S2 column (blue arrow) and the S2 column (magenta arrow). **B)** Coronal section of P30 control brain electroperated at E15.5 with CAG-GFP. The SS cortex is divided into two functional areas: primary somatosensory cortex (S1) and secondary somatosensory cortex (S2) (dashed boxes). Green = GFP, Blue = DAPI. Scale bar = 500 μ m. **C-E)** High magnifications of the contralateral hemisphere of P30 IUE brains showing GFP⁺ (green) axons of S1/S2 (blue arrow) and S2 columns (magenta arrow). Scale bar = 300 μ m. **F-I)** Quantification of axonal distribution in the contralateral hemisphere. The left panels depict schemes showing the selected ROIs in which GFP is quantified (shaded areas). Graphs show values of GFP innervation relative to the fluorescence signal in the ipsilateral electroperated side of the same coronal section to normalize to the number of IUE L2/3 neurons. Mean \pm SEM ($n = 8$ brains, 2 sections per brain, in all conditions). S1/S2 column (blue arrow), S2 column (magenta arrow). **F)** The innervation in the contralateral SS area. (One-way ANOVA: P -value = 0.6625 (n.s.)). **G)** S1/S2 column (One-way ANOVA: P -value = 0.3478 (n.s.)). **H)** S2 column (One-way ANOVA: P -value = 0.0085 (**). Posthoc with Tukey's test: * p -value_{Control - CAG-Nrp1} = 0.0106, * p -value_{shNrp1 - CAG-Nrp1} = 0.0393). **I)** S1 area (One-way ANOVA: P -value = 0.0129 (*). Posthoc with Tukey's test: ** p -value_{Control - CAG-Nrp1} = 0.0095).

136 **Nrp1 levels orchestrate callosal homotopic innervation in the somatosensory areas**

137 We next analyzed the topographic location of the electroporated CPNs projecting to S1
138 or S2. Using stereotaxic coordinates, we performed classic axonal retrograde tracing by
139 injecting fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B of (CTB-555) in the cortical
140 plate of the non-electroporated hemisphere. This procedure labels the subset of neurons
141 projecting to the site of injection (Figure 2A). We injected P28 animals either in the S1
142 area, at the level of the S1/S2 column (Figure 2A-B), or in the S2 column (Figure 2A and
143 C), and we analyzed the location of the GFP⁺CTB⁺ L2/3 CPNs at P30 (Figure 2A). As a
144 retrospective control of the injection site, we confirmed that, in addition to cortical
145 neurons, our injections in the S1/S2 column labeled preferentially thalamic neurons of
146 the ventral posteromedial nuclei (VPM) (Figure 2 – figure supplement 1A-C), while our
147 injections in the S2 column labeled neurons of the posterior nucleus (Po) (Figure 2 –
148 figure supplement 1D-F) (see Methods). After counting the CPNs, we calculated the
149 relative distribution of CPNs in S1 and S2 to evaluate changes in their contralateral
150 targeting. For injections in the S1/S2 column, we calculated the ratio of GFP⁺CTB⁺
151 neurons in S1 vs. the number in S2 (homotopic projections vs. heterotopic projections).
152 This analysis showed that in controls, most axons that form the S1/S2 column are
153 homotopic projections from S1 since S1L2/3 CPNs were labeled 1.5 times more
154 frequently than those in S2 (Figure 2D and J). Although there was a tendency to small
155 decreases in the labeling of S1 CPNs, we observed no significant changes in shNrp1 or
156 CAG-Nrp1 populations (Figure 2E-F and J). Hence, S1 innervation is not majorly
157 affected by our manipulations. For animals injected in the S2 column, we calculated the
158 ratio of GFP⁺CTB⁺ neurons found in S2 (homotopic) vs. those labeled in S1 (heterotopic)
159 (Figure 2G-I, and K). This analysis showed that in controls, homotopic S2L2/3
160 projections are the main contributors to the GFP⁺ S2 column (2,5 ratio) (Figure 2G and
161 K). Both knocking down or overexpressing Nrp1 decreased the proportions of S2L2/3
162 CPNs labeled with CTB injected in contralateral S2 (Figure 2H-I and K). The decreases
163 observed in shNrp1 IUE brains indicated that their GFP⁺ S2 column is formed by an
164 excess of heterotopic S1L2/3 axons (Figure 1D and H). Thus, the growth of shNrp1
165 S1L2/3 callosal branches compensates for the loss of Nrp1-deficient homotopic S2L2/3
166 projections. For the CAG-Nrp1 animals, since we had observed a reduction of the GFP⁺
167 S2 column (Figure 1E, and H), the data confirmed the loss of homotopic S2L2/3 branches.
168 These shifts in the distributions of CPNs in shNrp1 and CAG-Nrp1 electroporated brains

169 were not the consequence of differences in labeling efficiency, as we detected no changes
170 in the distributions of non-electroporated CTB⁺ cells between conditions (Figure 2 –
171 figure supplement 2). In sum, knocking down Nrp1 expression impairs the development
172 of homotopic S2L2/3 callosal projections but is insufficient to trigger this effect in more
173 medial S1L2/3 neurons. Contrary, incrementing Nrp1 expression blocks the development
174 of both S1L2/3 and S2L2/3 branches into S2 equally, resulting in a diminished S2 column
175 formed by an equilibrated proportion of S1L2/3 and S2L2/3 projections. These findings
176 demonstrate that the gradient of Nrp1 expression favors homotopic S2L2/3 callosal
177 connectivity.

Figure 2

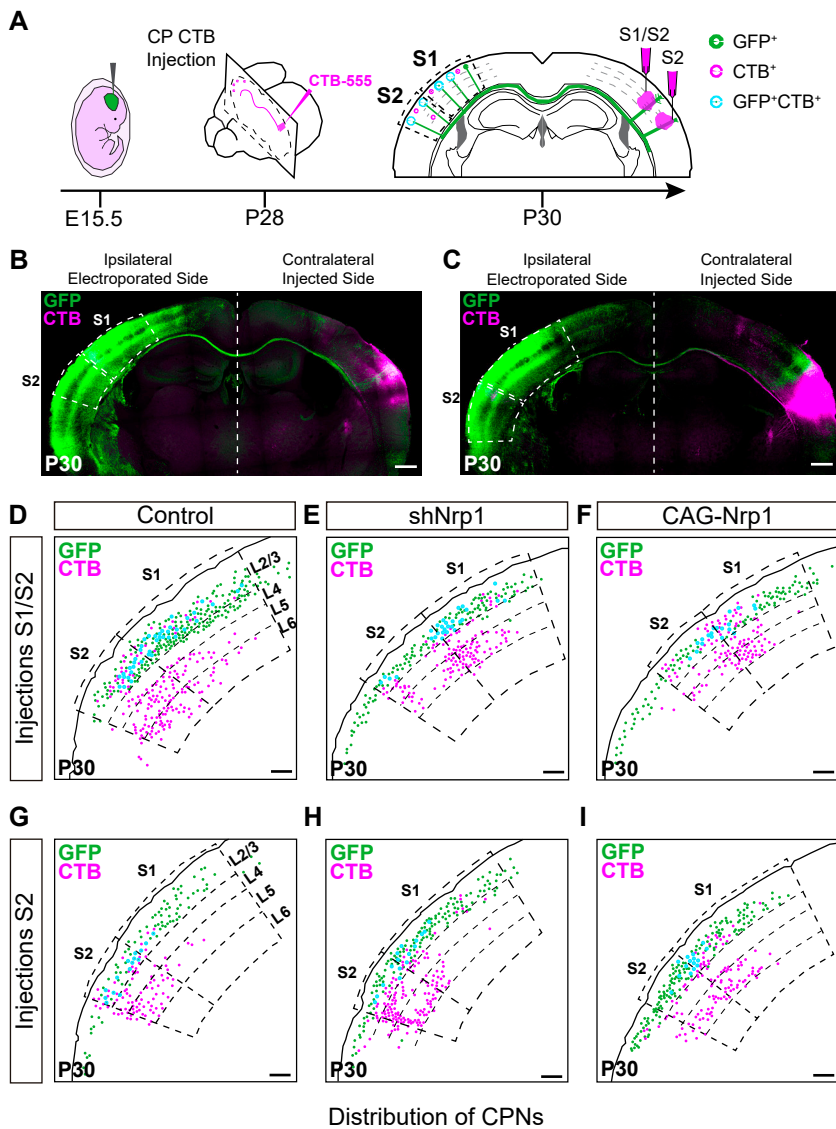


Figure 2. Analysis of homotopic and heterotopic projections in control, shNrp1, and CAG-Nrp1 IUE brains. **A)** Experimental workflow. After IUE at E15.5, brains are stereotactically injected with CTB in CP at P28. Separate animals are injected in the S1/S2 column or the S2 column. Then, the numbers of GFP⁺CTB⁺ CPNs are quantified in S1 and S2 in the ipsilateral electroporated hemisphere at P30. **B-C)** Tiescan images of P30 coronal sections of control IUE brains injected in S1/S2 (B) or S2 coordinates (C). On the left, the ipsilateral side, where GFP⁺ and CTB⁺ somas are found. On the right, the contralateral hemisphere, the site of injections. Green = GFP, Magenta = CTB-555. Scale bar = 500 μm. **D-I)** Schemes reporting examples of the location of GFP⁺ neurons (green dots), CTB⁺ neurons (magenta dots), and GFP⁺CTB⁺ (blue dots) in coronal sections of IUE brains injected with CTB in the cortical plate. Scale bar = 300 μm. **J)** Quantification of the distribution of GFP⁺CTB⁺ after brains were injected in the S1/S2 column. Ratio (Y-axis) of the number of GFP⁺CTB⁺ in S1 divided by the number of GFP⁺CTB⁺ cells in S2 quantified in individual sections. Mean ± SEM (n ≥ 3 brains, 2 sections per brain in all conditions. One-way ANOVA: *P*-value = 0.2096 (n.s.)). **K)** Quantification of the distribution of GFP⁺CTB⁺ after brains were injected in S2. Ratio (Y-axis) of the number of GFP⁺CTB⁺ in S2 divided by the number of GFP⁺CTB⁺ cells in S1 quantified in individual sections. Mean ± SEM (n ≥ 3 brains, 2 sections per brain in all conditions. One-way ANOVA: *P*-value = 0.0036 (**). Posthoc with Tukey's test: ** *p*-value Control – shNrp1 = 0.0052; * *p*-value Control – CAG-Nrp1 = 0.0109).

178 **Changes in Nrp1 expression alter developmental growth and refinement of callosal**
179 **projections**

180 Next, we investigated the mechanisms responsible for the different topography of callosal
181 connectivity in Nrp1 electroporated P30 brains. To do so, we analyzed the innervation of
182 P16 electroporated animals and compared them to P30. P16 control electroporated brains
183 showed recognizable S1/S2 and S2 axonal columns, and quantifications demonstrated a
184 distribution of contralateral branches very similar to that of P30 animals (Figure 3A, D-
185 G). In contrast, P16 brains electroporated with shNrp1 or CAG-Nrp1 constructs showed
186 reduced branching when compared to either P16 or P30 controls (Figure 3A-G). These
187 reductions were observed throughout all contralateral areas (Figure 3 – figure supplement
188 1), although they were higher in S2 (Figure 3F). Besides, in controls, contralateral
189 branches decreased from P16 to P30 (Figure 3D-F) as a consequence of the final pruning
190 of callosal connections (O’Leary, 1992; De Leon Reyes *et al.*, 2019), but in shNrp1 and
191 CAG-Nrp1 electroporated brains, axonal growth followed the opposite trend.
192 Contralateral branches increased in all areas from P16 to P30, except in the S2 of CAG-
193 Nrp1 brains (Figure 3D-G). Thus, abnormally late postnatal axonal growth compensates
194 for the delayed contralateral innervation detected at P16, although with an incorrect
195 topographic organization as revealed by our CTB labeling of CPNs.

Figure 3

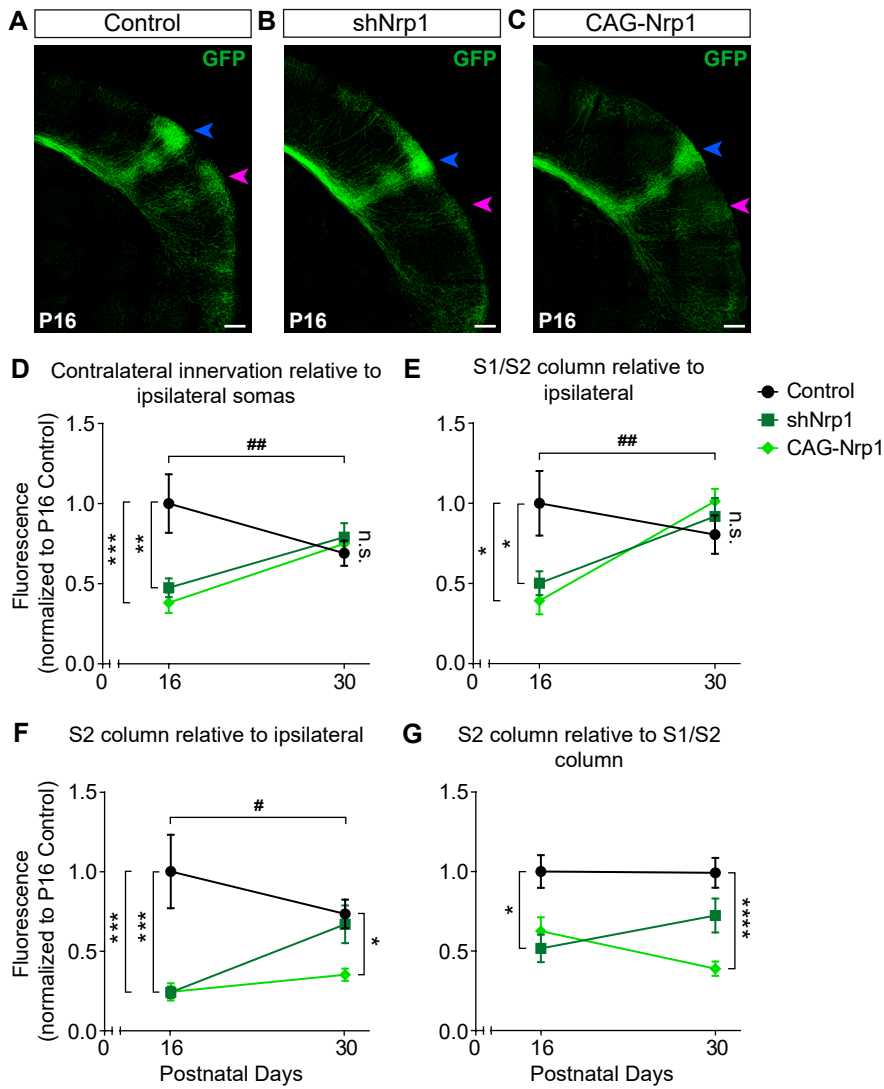


Figure 3. Comparisons of the postnatal changes of contralateral axons during the P16 to P30 window upon manipulations in Nrp1 expression. A-C) High magnification tilescan images of the contralateral hemisphere of IUE brains analyzed at P16 (Blue arrow = S1/S2 column. Magenta arrow = S2 column. Green = GFP). Scale bar = 300 μ m. D-G) Plots of ratios of GFP⁺ innervation in the indicated area, relative to ipsilateral IUE hemisphere and normalized to the value of P16 control. Mean \pm SEM ($n \geq 4$ brains, 2 sections per brain in all conditions). D) Contralateral innervation in all SS area (Two-way ANOVA: P -value Dynamics of contralateral innervation = 0.0012 (##); P -value Postnatal day = 0.1224; P -value Experimental condition = 0.0149. Posthoc with Tukey's test: ** p -value Control P16 - shNrp1 P16 = 0.0044; *** p -value Control P16 - CAG-Nrp1 P16 = 0.0007). E) S1/S2 column (Two-way ANOVA: P -value Dynamics of S1/S2 column = 0.0052 (##); P -value Postnatal day = 0.0080; P -value Experimental condition = 0.2043. Posthoc with Tukey's test: * p -value Control P16 - shNrp1 P16 = 0.0465; * p -value Control P16 - CAG-Nrp1 P16 = 0.0116). F) S2 column (Two-way ANOVA: P -value Dynamics of S2 column = 0.0114 (#); P -value Postnatal day = 0.3331; P -value Experimental condition < 0.0001. Posthoc with Tukey's test: *** p -value Control P16 - shNrp1 P16 = 0.0003; *** p -value Control P16 - CAG-Nrp1 P16 = 0.0003; * p -value Control P30 - CAG-Nrp1 P30 = 0.0123). G) S2 column relative to S1/S2 column (Two-way ANOVA: P -value Dynamics S2 column relative to S1/S2 column = 0.2098 (n.s.); P -value Postnatal day = 0.8770; P -value Experimental condition < 0.0001. Posthoc with Tukey's test: * p -value Control P16 - shNrp1 P16 = 0.0102; **** p -value Control P30 - CAG-Nrp1 P30 < 0.0001). Data for P30 are from Figure 1 and Figure 1 - Figure supplement 1.

196 **Nrp1 levels determine the postnatal refinement of somatosensory L2/3 callosal axons**
197 **at the midline**

198 The CC organizes following dorsal-ventral topography. Decreasing Nrp1 expression in
199 cortical motor neurons shifts callosal axon navigation to the ventral routes used by SS
200 projections (Zhou *et al.*, 2013). Therefore, we analyzed the distribution of electroporated
201 axons at the CC midline by quantifying the signal of GFP⁺ axons and plotting it against
202 the dorso-ventral length of the CC divided into ten equal bins (Figure 4A). These analyses
203 were performed at P16 and P30. In control, shNrp1 and CAG-Nrp1 electroporated brains,
204 SS callosal projections crossed the midline by the most ventral two-thirds parts of the CC
205 (bins 1-7) at both developmental stages. Only a few axons navigated by the most dorsal
206 pathway (bins 7-10) (Figure 4B-I). Control, shNrp1, and CAG-Nrp1 P16 distributions
207 were very similar, showing small differences in bins 3 and 5 (Figure 4B-E). Differences
208 increased at P30. GFP⁺ callosal axons occupied slightly more dorsal routes (bins 4-10) in
209 shNrp1 and CAG-Nrp1 electroporated brains than in controls (Figure 4F-I). We then
210 compared, for each condition, the distributions at P16 and P30. This analysis revealed
211 developmental changes. It showed that in controls, callosal axons that cross through the
212 most dorsal paths (bins 3-8) are refined from P16 to P30, which suggests a topographic
213 developmental elimination of interhemispheric projections (Figure 4B, F and J). This
214 elimination of midline axons was reduced in shNrp1 electroporated brains, especially of
215 those using dorsal routes (Figure 4K). Remodeling was not detected in CAG-Nrp1
216 electroporated brains (Figure 4L). The results suggested that changes in Nrp1 levels
217 modify the developmental elimination of topographically organized callosal connections.

Figure 4

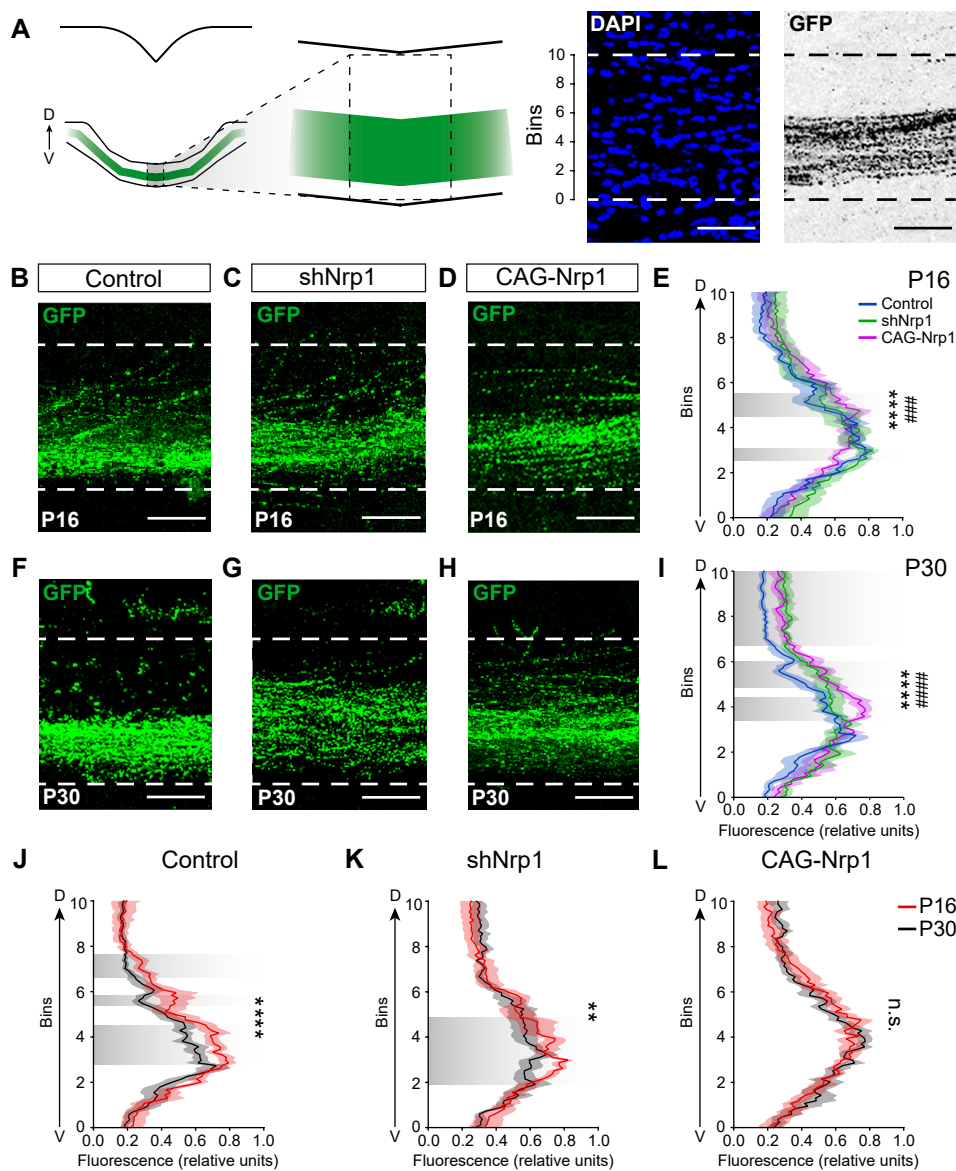


Figure 4. Analysis of the dorsoventral distribution of axons at the midline. **A**) Scheme of the analysis. The left panel depicts the selected ROI. The right panel shows the ROI divided into ten equal bins and applied to an image of the midline. DAPI image (blue) and pixels occupied by the GFP axons (grey). Scale bar = 50 μ m. **B-D**) Images of the CC at the midline in P16 brains. (Green = GFP). Scale bar = 50 μ m. **E**) Quantification of the dorsoventral distribution of GFP signal at P16 (ventral position, bins 0; dorsal position, bins 10). Lines represent mean \pm SEM (shade) ($n \geq 3$ brains, 2 sections per brain in all conditions). Shaded areas in grey indicate statistically significant differences (Two-way ANOVA: P -value CC distribution = 0.9992; P -value Bins < 0.0001; P -value Experimental condition < 0.0001. Posthoc with Tukey's test: **** p -value Control - shNrp1 \leq 0.0001; ### p -value Control - CAG-Nrp1 = 0.0006). **F-H**) Images of the CC at the midline in P30 brains (Green = GFP). Scale bar = 50 μ m. **I**) Quantification of the dorsoventral distribution of GFP signal at P30 (ventral position, bins 0; dorsal position, bins 10). Lines represent mean \pm SEM (shade) ($n \geq 3$ brains, 2 sections per brain in all conditions). Shaded areas in grey indicate bins showing statistically significant differences (Two-way ANOVA: P -value CC distribution = 0.9925; P -value Bins < 0.0001; P -value Experimental condition < 0.0001. Posthoc with Tukey's test: **** p -value Control - shNrp1 < 0.0001; ##### p -value Control - CAG-Nrp1 < 0.0001). **J-L**) Comparison of the distributions of axons at the CC in P16 and P30 brains. Lines represent mean \pm SEM (shade) ($n \geq 3$ brains, 2 sections per brain in all conditions). J) Control (Two-way ANOVA: P -value < 0.0001 (****)). K) shNrp1 (Two-way ANOVA: P -value = 0.0021 (**)). L) CAG-Nrp1 (Two-way ANOVA: P -value = 0.5513 (n.s.)).

218 **Knocking down Nrp1 eliminates populations of S2L2/3 CPNs by refinement**

219 Our results suggested that Nrp1 influences refinement. We recently showed that as part
220 of their normal differentiation, L2/3 neurons first develop axons that project callosally,
221 and subsequently, postnatal activity-dependent refinement eliminates most of these
222 developmental callosal axons in area-specific manners, thereby selecting the populations
223 of adult CPNs. The most intensive refinement of L2/3 CPNs occurs during the first two
224 weeks of postnatal life (P1-P16). From then on, the proportion of L2/3 CPNs is very
225 similar to that of the adult (De Leon Reyes *et al.*, 2019). To investigate a possible
226 influence of Nrp1 in developmental CPN refinement, we set to analyze CPN numbers in
227 the SS cortex of control and Nrp1 electroporated brains at P16 and P30. To this end,
228 instead of in the cortical plate, we injected CTB-555 directly in the CC in the hemisphere
229 opposite to the electroporation (Figure 5A-C). This procedure labels all neurons with an
230 axon crossing the midline, including those in the process of developing or refining their
231 callosal projections (De Leon Reyes *et al.*, 2019). In controls, after the injections,
232 quantifications showed proportions of S1L2/3 and S2L2/3 CPNs undistinguishable to
233 those previously reported in P16 and P30 WT mice, indicating that IUE does not alter
234 CPN development (Figure 5 – figure supplement 1-2) (Fame *et al.*, 2011; De Leon Reyes
235 *et al.*, 2019). Refinement of L2/3 CPNs, in both S1 and S2 areas, was not altered upon
236 overexpression of Nrp1. However, electroporation of shNrp1 modified refinement
237 (Figure 5 D-I). In P16 control brains, 50% of GFP⁺ S1L2/3 neurons were CTB⁺ (CPNs)
238 (Figure 5D and E). This number increased to 65% in shNrp1-targeted S1L2/3 (Figure 5D
239 and F), indicating that low Nrp1 expression delays axonal refinement. In S2, 40% of GFP⁺
240 L2/3 cells were CTB⁺ in controls or shNrp1 P16 electroporated brains (Figure 5G). Thus,
241 since the numbers of P16 L2/3CPNs in these brains are equal or higher than in controls,
242 the reduced GFP⁺ innervation that we observed in shNrp1 or CAG-Nrp1 electroporated
243 brains is due to the scarce branching of GFP⁺ L2/3 axons in the contralateral cortical plate.
244 At P30, 45% of GFP⁺ S1L2/3 and around 36% of GFP⁺ S2L2/3 control neurons were
245 CPNs (Figure 5D and G). In shNrp1 P30 brains, the percentage of GFP⁺ S1L2/3 CPNs
246 was indistinguishable from controls (Figure 5D) but the proportion of S2L2/3 CPNs was
247 significantly reduced (Figure 5G-I). Thus, on the one hand, late postnatal refinement
248 normalizes the transient increases of P16 S1L2/3 CPNs induced by knocking down Nrp1.
249 On the other hand, refinement causes the exceeding elimination of S2L2/3 CPNs resulting
250 in a significant decrease of their final numbers in the mature P30 circuit. Together, the

251 data shows that by regulating axonal growth and refinement, Nrp1 levels determine
 252 homotopic callosal connectivity.

Figure 5

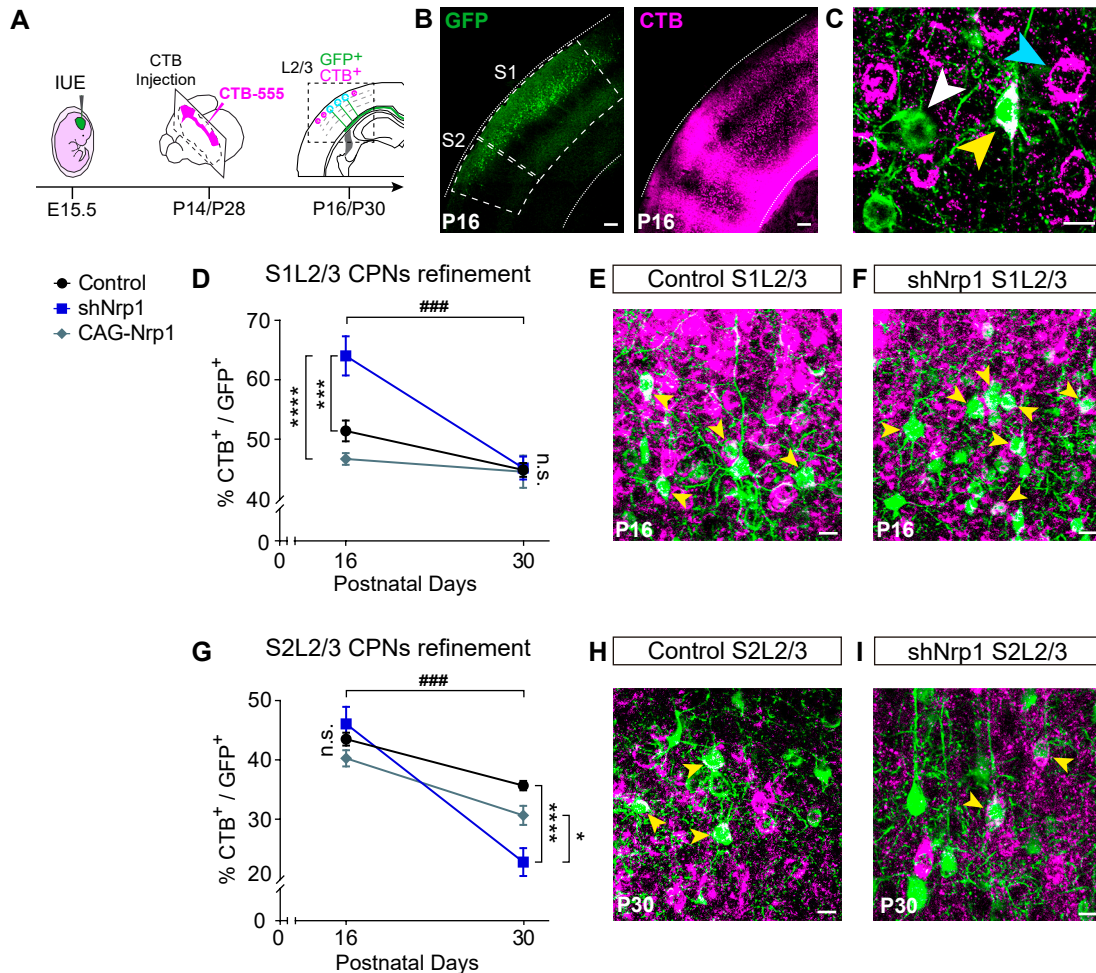


Figure 5: CPNs refinement during development (P16 to P30). **A**) Scheme of the experimental workflow. To analyze the effect of developmental refinement on the number of electroporated CPNs, stereotaxic CTB injection at the midline was performed after IUE at E15.5. **B**) Images showing ipsilateral cortex of P16 brains (delimited by dashed lines). Left panel shows GFP⁺ electroporated neurons. Right panel shows the signal of CTB labeling axonal columns and somas (Green = GFP. Magenta = CTB-555). Scale bar = 300 μ m. **C**) High magnification image of GFP⁺ L2/3 neurons in an injected P16 brain (GFP⁺, white arrowhead), (CTB⁺, blue arrowhead), (GFP⁺CTB⁺, yellow arrowhead). Scale bar = 10 μ m. **D**) Plot of the proportion of CPNs (GFP⁺CTB⁺/GFP⁺) in S1 area at P16 and P30. Mean \pm SEM (n \geq 3 brains, 2 sections per brain in all conditions). (Two-way ANOVA: *P*-value_{S1L2/3 CPNs refinement} = 0.0007 (###); *P*-value_{Postnatal day} < 0.0001; *P*-value_{Experimental condition} = 0.0003. Posthoc with Tukey's test: *** *p*-value_{Control P16 - shNrp1 P16} = 0.0003; **** *p*-value_{shNrp1 P16 - CAG-Nrp1 P16} < 0.0001). **E-F**) Merge images of control (E) and shNrp1 (F) S1L2/3 neurons at P16 (GFP⁺CTB⁺, yellow arrowheads). Scale bar = 10 μ m. **G**) Plot of the proportion of CPNs (GFP⁺CTB⁺/GFP⁺) in S1 area at P16 and P30. Mean \pm SEM (n \geq 3 brains, 2 sections per brain in all conditions). (Two-way ANOVA: *P*-value_{S2L2/3 CPNs refinement} = 0.0003 (###); *P*-value_{Postnatal day} < 0.0001; *P*-value_{Experimental condition} = 0.0199. Posthoc with Tukey's test: **** *p*-value_{Control P30 - shNrp1 P30} < 0.0001; * *p*-value_{shNrp1 P30 - CAG-Nrp1 P30} = 0.0127). **H-I**) Merge images of control (E) and shNrp1 (F) S1L2/3 neurons at P16 (GFP⁺CTB⁺, yellow arrowheads). Scale bar = 10 μ m.

253 Discussion

254 We herein demonstrate that, in the SS cortex, the Nrp1 gradient determines the
255 topographic organization of SSL2/3 callosal connections. Nrp1 promotes homotopic
256 branching and hinders heterotopic innervation (Figure 6). Previous studies have shown
257 that the Nrp1 gradient in the cortex regulates an orderly organization of motor and SS
258 axons during early postnatal development (Zhou *et al.*, 2013). We find that in addition to
259 this function, Nrp1 regulates the late growth, branching, and terminal refinement of
260 callosal axons. S1 and S2 areas process distinct somatosensory information received from
261 first-order and higher-order thalamic nuclei (Inan and Crair, 2007; Pouchelon *et al.*,
262 2014). Thus, Nrp1 mediates a hierarchical organization of the bilateral exchange of
263 sensory inputs. Our findings highlight the complex regulation required for the wiring of
264 interhemispheric cortical maps.

265 We demonstrate that Nrp1 functions regulate the late development of callosal axonal
266 branches. Our results argue in favor of possible mechanisms of competition or axonal
267 cooperation, which are poorly studied in the CC (De León Reyes *et al.*, 2020; Innocenti,
268 2020). They cannot be merely explained by selective repulsion from the cortical plate,
269 although they do not discard its contribution. For instance, we observe that knocking
270 down or overexpressing Nrp1 delays the branching of SSL2/3 callosal axons in the
271 cortical plate of P16 animals. These reductions are similar in all areas and both conditions,
272 thus indicating that axons are not simply following a gradient. Instead, these P16 defects
273 may reflect unbalanced ratios of stabilization/elimination of the synapses of callosal
274 axons with their targets, which would decrease the rate of productive axonal branching
275 and slow, but not block, cortical innervation (Courchet *et al.*, 2013). In agreement, shNrp1
276 and CAG-Nrp1 GFP⁺ callosal axons had innervated contralateral areas by P30.
277 Competition is also suggested by the reconstitution of the S2 column in P30 shNrp1 IUE
278 brains, which indicates that electroporated S1L2/3 branches outcompete homotopic
279 S2L2/3 projections in these brains (Figure 6B). By contrast, the reduced P30 GFP⁺ S2
280 column in brains overexpressing Nrp1 is accounted for by the shift of all callosal
281 projections towards the more medial S1 (Figure 6C). This is not in disagreement with
282 repulsions, nor with other possible mechanisms. In every case, to dissect the connectivity
283 produced by our manipulations of Nrp1, it is useful to examine why our manipulations
284 alter the development of S2L2/3 callosal projections more than S1L2/3 CPNs. This is
285 likely due to the nature of the endogenous gradient. While overexpressing vectors

286 maximize the levels of Nrp1 equally in all neurons, the effects of shRNA constructs
287 depend on the endogenous expression of the targeted transcripts and may result in
288 intermediate and low Nrp1 levels in S1L2/3 and S2L2/3 neurons, respectively (Figure
289 6B). Accordingly, shNrp1-targeted S1L2/3 CPNs branching in S2 mimic the behavior of
290 S2L2/3 WT neurons. Unfortunately, we could not assess the levels of Nrp1 protein in
291 targeted electroporated neurons. In our attempts, antibody staining of Nrp1 did not detect
292 the protein in the neuronal somas but only in the midline, similarly to other reports (Piper
293 *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2015).

294 Hence, the effects of manipulating Nrp1 expression levels agree with that in the canonical
295 WT circuit, interhemispheric axons from S1 neurons, which express higher levels of
296 Nrp1, branch more profusely in homotopic S1 areas. Likewise, those projections from S2
297 CPNs, expressing lower Nrp1 levels, preferentially connect with contralateral homotopic
298 targets in S2 (Figure 6A) (Yorke and Caviness, 1975; Wise and Jones, 1976; De León
299 Reyes *et al.*, 2020). Electroporation of shNrp1 diminished homotopic S2L2/3 projections,
300 which for a fraction of S2L2/3 CPNs, lead to the elimination of their callosal axons. These
301 neurons presumably become ipsilateral-only projecting neurons, as it occurs to WT S1L4
302 and most other L2/3 cortical neurons during developmental normal refinement (Innocenti
303 and Clarke, 1984; O’Leary and Koester, 1993; De Leon Reyes *et al.*, 2019). Interestingly,
304 the refinement of these CPNs indicates that a certain level of Nrp1 expression is required
305 for terminal callosal innervation. This again that not support axonal repulsion, may
306 suggest a disadvantage at a possible axonal competition.

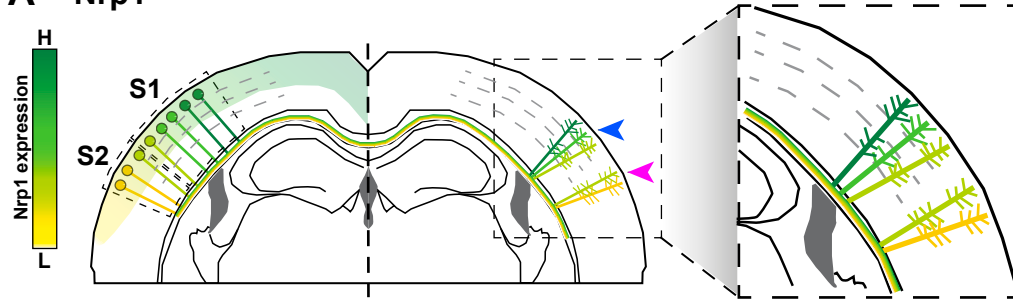
307 Sema3A seems a likely candidate responsible for the late branching phenotypes mediated
308 by Nrp1. It has a developmental expression gradient opposite to Nrp1. This
309 complementary expression determines repulsion (Kitsukawa *et al.*, 1997; Zhao *et al.*,
310 2011; Zhou *et al.*, 2013). In either case, a possible sequential role of Nrp1 in guidance
311 and refinement is in agreement with observations in the cerebellum, where Nrp1 also has
312 a dual function (Telley *et al.*, 2016). First, it guides inhibitory axons to their excitatory
313 neuronal targets, and then, it determines the formation of synapses at specific locations
314 within the neuronal body. The loss of Nrp1 in presynaptic basket cells blocks the
315 formation of axonal synapses with Purkinje neurons, which resembles the inability of
316 those Nrp1 deficient S2L2/3 CPNs to stabilize their callosal projections. In line with the
317 involvement of Nrp1 signaling in refinement, L2/3 PlexinD1 mutant neurons show

318 abnormal heterotopic callosal projections to the contralateral striatum, possibly due to
319 deregulated developmental refinement (Velona *et al.*, 2019).

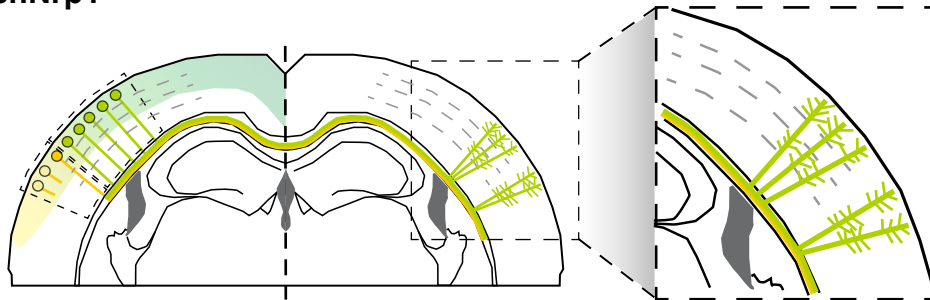
320 In sum, we demonstrate that in the somatosensory cortex, Nrp1 regulates the
321 developmental postnatal growth and refinement of L2/3 callosal axons. In this manner,
322 the Nrp1 gradient determines balanced homotopic and heterotopic interhemispheric
323 connectivity between primary and secondary somatosensory circuits.

Figure 6

A Nrp1



B shNrp1



C CAG-Nrp1

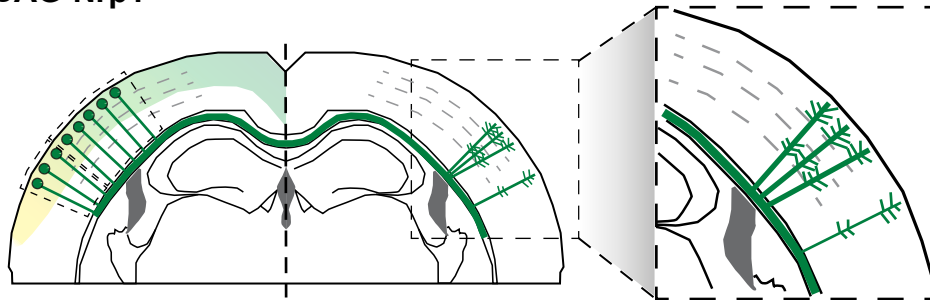


Figure 6. Model of the effects of Nrp1 levels on callosal connectivity. A) Nrp1 is expressed in the cortex in a high-medial, to low-lateral, gradient (higher levels in green, lower levels in yellow). Accordingly, S1L2/3 neurons (green dots) express high to intermediate levels of Nrp1. S2L2/3 neurons express low levels (light green and yellow dots). L2/3 neurons expressing high to intermediate levels of Nrp1 branch preferentially in homotopic S1/S2 column (blue arrow), and S2L2/3 neurons expressing intermediate to low levels into S2 areas (magenta arrow). B) Knocking down Nrp1 reduces the levels of Nrp1 according to the gradient. L2/3 CPNs with intermediate levels of Nrp1 expression can branch both in S1/S2 and S2. As consequence, an exceeding number of heterotopic branches from S1L2/3 CPNs outgrowth ectopically in the S2 column. They may outcompete axons of shNrp1 targeted S2L2/3 neurons that express very low levels of Nrp1 (light yellow dots). Many of these S2L2/3 neurons cannot terminate innervation and refine their callosal axon during the late period of P16-P30 developmental CPN refinement, thus becoming ipsilateral-only connecting neurons. C) Neurons over-expressing Nrp1 branch in the S1/S2 column but are not competent to innervate S2 areas, which is then significantly reduced.

324 **Methods**

325 **Animals**

326 Wild-type (WT) C57BL6JRccHsd (Envigo Laboratories, formerly Harlan. Indianapolis,
327 the U.S.) mice were used in all experiments. The morning of the day of the appearance of
328 a vaginal plug was defined as embryonic day 0.5 (E 0.5). Animals were housed and
329 maintained following the guidelines from the European Union Council Directive
330 (86/609/European Economic Community). All procedures for handling and sacrificing
331 complied with all relevant ethical regulations for animal testing and research. All
332 experiments were performed under the European Commission guidelines (2010/63/EU)
333 and were approved by the CSIC and the Community of Madrid Ethics Committees on
334 Animal Experimentation in compliance with national and European legislation (PROEX
335 124-17; 123-17).

336 ***In utero* electroporation and plasmids**

337 Plasmids used were pCAG-GFP (Addgene, plasmid #11150), pCAG-Nrp1 (gift from
338 Prof. Mu-ming Poo), and shNrp1 in pLKO.1 vector (hairpin sequence:
339 CCTGCTTTCTTCTCTTGGTTTC. #TRCN0000029859, Merck. Darmstadt. Germany).
340 *In utero* electroporation was performed as previously described (Briz *et al.*, 2017).
341 Briefly, a mixture of the specified plasmids at a concentration of 1 µg/µl each (pCAG-
342 GFP or pCAG-Nrp1) or 0.6 µg/µl (pLKO.1-shNrp1) was injected into the embryo's left
343 lateral ventricle using pulled glass micropipette. Five voltage pulses (38 mv, 50ms) were
344 applied using external paddles oriented to target the somatosensory cortex. After birth,
345 P2 GFP⁺ pups were selected and allowed to develop normally until P14 and P28. After
346 sectioning, analyses were performed only in animals in which the electroporated area
347 included both S1 and S2.

348 **CTB injections for retrograde labeling**

349 Retrograde labeling from the CC and the cortical plate were performed by injecting
350 subunit B of cholera toxin (CTB) conjugated to Alexa Fluor 555 (#C-34776,
351 ThermoFisher Scientific. Massachusetts, the U.S.). Injections were performed in the CC,
352 close to the midline, as previously reported (De Leon Reyes *et al.*, 2019), or in the cortical
353 plate; in both cases, in the contralateral non-electroporated hemisphere (right
354 hemisphere). Stereotaxic coordinates, injection volumes, and procedures for different

355 developmental stages for injections in CC were performed as previously described (De
356 Leon Reyes *et al.*, 2019). For cortical plate injections at P30, stereotaxic coordinates
357 (anteroposterior (AP), mediolateral (ML), and dorsoventral (DV) axes from Bregma)
358 were adjusted using the atlas of Paxinos (Paxinos and Franklin, 2004) and used as follow:
359 S1/S2 injections (-1.34 mm AP; +3.7 mm ML; -0.4 ~ -0.5 mm DV) and, S2 injections (-
360 1.34 mm AP; +3,7 mm ML; -0.7 ~ -0.8 mm DV); injecting 100 nL of CTB solution at 4
361 nl s⁻¹. Animals were anesthetized during the surgical procedure with isoflurane/oxygen
362 and placed on a stereotaxic apparatus (Harvard Apparatus. Massachusetts, the U.S.). CTB
363 particles (diluted at 0.5% in phosphate-buffered saline (PBS)) were injected with a
364 Drummond Nanoject II Auto-Nanoliter Injector using 30 mm pulled glass micropipettes
365 (3000205A and 3000203G/X. Drummond Scientific Co. Pennsylvania, the U.S.). Mice
366 were intrapericardially perfused with formalin two days after the surgery and brains were
367 extracted and fixed overnight in formalin at 4°C. After fixation, brains were cryoprotected
368 with 30% sucrose (#S0389. Merck. Darmstadt. Germany) and frozen in Tissue-Tek®
369 O.C.T.TM Compound (#4583, Sakura Tissue-Tek. Tokyo. Japan).

370 **Immunohistochemistry**

371 50 µm free-floating brain cryosections were used for immunofluorescence. Rabbit
372 polyclonal anti-GFP (#A11122, Thermo Fisher Scientific. Invitrogen. Massachusetts, the
373 U.S.) was used as primary antibody and goat anti-rabbit-Alexa 488 (#A11034, Thermo
374 Fisher Scientific. Life Technologies. Massachusetts, the U.S.) as the secondary antibody.
375 Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (#D9542, Merck.
376 Darmstadt. Germany).

377 **Confocal imaging and quantification**

378 Confocal microscopy was performed using a TCS-SP5 (Leica. Wetzlar. Germany) Laser
379 Scanning System on Leica DMI8 microscopes. Up to 50 µm optical z-sections were
380 obtained by taking 3.5 µm serial sections with LAS AF v1.8 software (Leica. Wetzlar.
381 Germany). Tilescan mosaic images were reconstructed with Leica LAS AF software. All
382 images were acquired using a 512 x 512 scan format with a 20x objective.

383 For the acquisition and quantifications of the fluorescence signal (Rodriguez-Tornos *et*
384 *al.*, 2016; Briz *et al.*, 2017), detectors were set to ensure equivalent threshold and signal-
385 to-noise ratios between all samples. The maximum threshold signal was set by ensuring
386 that no pixels were saturated. The threshold for background noise was determined using

387 regions outside of the electroporated area (Rodriguez-Tornos *et al.*, 2016; Briz *et al.*,
388 2017). This approach ensures linearity between samples. Quantification of innervation
389 was performed in tilescan images of electroporated (ipsilateral) and non-electroporated
390 (contralateral) hemispheres. Different areas were measured delimitating manually ROIs,
391 adjusting the threshold above the noise (making a binary image), and measuring the
392 integrated density (using Fiji-ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012)). Measures of contralateral
393 ROIs were normalized to ipsilateral ones to avoid any differences in electroporation
394 efficiency. Contralateral normalizations, without considering ipsilateral signal, were
395 calculated to confirm the results. To quantify CC fasciculation, a midline ROI was
396 selected to measure the fluorescence profile throughout ten equal distance bins. The
397 different profiles were plotted to identify changes in dorsoventral routes.

398 Quantification of CTB⁺ over GFP⁺ cells in the primary (S1) and secondary (S2)
399 somatosensory areas was performed on single plane confocal images from z-stacks (De
400 Leon Reyes *et al.*, 2019). The proportions of CTB⁺ cells were calculated among randomly
401 selected GFP⁺ cells in the ipsilateral (electroporated) hemisphere. For quantification of
402 GFP⁻ populations, the proportions of CTB⁺ cells were calculated over randomly selected
403 DAPI⁺ cells, excluding GFP⁺ cells. Functional areas of the adult mouse brain were
404 identified using the atlas of Paxinos (Paxinos and Franklin, 2004).

405 **Statistical analysis**

406 Sample size was determined to be adequate based on the magnitude and consistency of
407 measurable differences between groups. Each experimental condition was carried out
408 with a minimum of three biological replicates, a minimum of two sections from each
409 brain, and included a minimum total number of 300 counted cells. During experiments,
410 investigators were not blinded to the electroporation condition of animals. Results are
411 expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Results were compared using
412 two-way ANOVA and one-way ANOVA with posthoc comparison with Tukey and
413 Bonferroni's tests. Statistical tests were performed using Prism 8 software (GraphPad
414 Software. California, the U.S.).

415 **Article and author information**

416 Author details:

417 **F. Martín-Fernández**

418 National Center of Biotechnology. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
419 CNB-CSIC. Spain.

420 Contribution: conceptualization, formal analysis, validation, investigation, visualization,
421 methodology, writing.

422 **C. García-Briz**

423 National Center of Biotechnology. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
424 CNB-CSIC. Spain. Present address: Ministry of Consumer Affairs. Spain Govern.

425 Contribution: conceptualization, investigation, methodology.

426 **M. Nieto**

427 National Center of Biotechnology. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
428 CNB-CSIC. Spain.

429 Contribution: conceptualization, writing.

430 **Acknowledgments**

431 We are grateful to R. Gutierrez, A. Morales, S. Gutiérrez-Erlandsson, and A. Oña for
432 technical assistance. J. García-Marqués, L.A. Weiss, N. S. de León, I. Varela, E. Marcos,
433 and L. Bragg for critical reading and advice. F. Martín-Fernández holds an FPU
434 fellowship from the Spanish MEFP, FPU15/02111. C. García-Briz was supported by a
435 fellowship from the Spanish MICINN, FPI-BES-2012-056011. This work was funded by
436 grants from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/Agencia Estatal de
437 Investigación/Fondo Europeo de Desarrollo Regional, European Union (SAF2017-
438 83117-R and RED2018-102553T).

439 **Competing Interests**

440 The authors declare no competing interests.

441 **References**

- 442 Aboitiz, F. and Montiel, J. (2003) "One hundred million years of interhemispheric
443 communication: the history of the corpus callosum", *Braz J Med Biol Res*, 36(4), pp.
444 409–20. doi:10.1590/s0100-879x2003000400002.
- 445 Antón-Bolaños, N., Sempere-Ferrández, A., Guillamón-Vivancos, T., Martini, F. J.,
446 Pérez-Saiz, L., Gezelius, H., Filipchuk, A., Valdeolmillos, M. and López-Bendito, G.
447 (2019) "Prenatal activity from thalamic neurons governs the emergence of functional
448 cortical maps in mice", *Science*, 364(6444), pp. 987–990. doi:10.1126/science.aav7617.
- 449 Briz, C. G., Navarrete, M., Esteban, J. A. and Nieto, M. (2017) "In Utero
450 Electroporation Approaches to Study the Excitability of Neuronal Subpopulations and
451 Single-cell Connectivity", *J Vis Exp*, (120). doi:10.3791/55139.
- 452 Courchet, J., Lewis, T. L., Lee, S., Courchet, V., Liou, D.-Y., Aizawa, S. and Polleux,
453 F. (2013) "Terminal Axon Branching Is Regulated by the LKB1-NUAK1 Kinase
454 Pathway via Presynaptic Mitochondrial Capture", *Cell*, 153(7), pp. 1510–1525.
455 doi:10.1016/j.cell.2013.05.021.
- 456 De León Reyes, N. S., Bragg-Gonzalo, L. and Nieto, M. (2020) "Development and
457 plasticity of the corpus callosum", *Development (Cambridge, England)*, 147(18).
458 doi:10.1242/dev.189738.
- 459 De Leon Reyes, N. S., Mederos, S., Varela, I., Weiss, L. A., Perea, G., Galazo, M. J.
460 and Nieto, M. (2019) "Transient callosal projections of L4 neurons are eliminated for
461 the acquisition of local connectivity", *Nat Commun*, 10(1), p. 4549.
462 doi:10.1038/s41467-019-12495-w.
- 463 Dehay, C., Kennedy, H. and Bullier, J. (1986) "Callosal connectivity of areas V1 and
464 V2 in the newborn monkey", *The Journal of Comparative Neurology*, 254(1), pp. 20–
465 33. doi:10.1002/cne.902540103.
- 466 Fame, R. M., MacDonald, J. L. and Macklis, J. D. (2011) "Development, specification,
467 and diversity of callosal projection neurons", *Trends Neurosci*, 34(1), pp. 41–50.
468 doi:10.1016/j.tins.2010.10.002.
- 469 Fenlon, L. R. and Richards, L. J. (2015) "Contralateral targeting of the corpus callosum
470 in normal and pathological brain function", *Trends Neurosci*, 38(5), pp. 264–72.
471 doi:10.1016/j.tins.2015.02.007.
- 472 Fenlon, L. R., Suárez, R. and Richards, L. J. (2017) "The anatomy, organisation and
473 development of contralateral callosal projections of the mouse somatosensory cortex",
474 *Brain and Neuroscience Advances*, 1, p. 239821281769488.
475 doi:10.1177/2398212817694888.
- 476 Fournier, A. E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G. and
477 Strittmatter, S. M. (2000) "Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-
478 actin colocalization during growth cone collapse", *J Cell Biol*, 149(2), pp. 411–22.
479 doi:10.1083/jcb.149.2.411.

- 480 Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritzsich, B., Richards, L. J.,
481 Kolodkin, A. L. and Ginty, D. D. (2003) "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF
482 signaling during neural and cardiovascular development", *Dev Cell*, 5(1), pp. 45–57.
483 doi:10.1016/s1534-5807(03)00169-2.
- 484 Hatanaka, Y., Matsumoto, T., Yanagawa, Y., Fujisawa, H., Murakami, F. and Masu, M.
485 (2009) "Distinct roles of neuropilin 1 signaling for radial and tangential extension of
486 callosal axons", *J Comp Neurol*, 514(3), pp. 215–25. doi:10.1002/cne.22021.
- 487 Hill, R. S. and Walsh, C. A. (2005) "Molecular insights into human brain evolution",
488 *Nature*, 437(7055), pp. 64–7. doi:10.1038/nature04103.
- 489 Huang, Y., Song, N.-N., Lan, W., Zhang, Q., Zhang, Ling, Zhang, Lei, Hu, L., Chen, J.-
490 Y., Zhao, C.-J., Li, L., Xu, L. and Ding, Y.-Q. (2013) "Sensory input is required for
491 callosal axon targeting in the somatosensory cortex", *Molecular Brain*, 6, p. 53.
492 doi:10.1186/1756-6606-6-53.
- 493 Inan, M. and Crair, M. C. (2007) "Development of cortical maps: perspectives from the
494 barrel cortex", *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology,*
495 *Neurology and Psychiatry*, 13(1), pp. 49–61. doi:10.1177/1073858406296257.
- 496 Innocenti, G. M. (2020) "The Target of Exuberant Projections in Development",
497 *Cerebral Cortex*, 30(6), pp. 3820–3826. doi:10.1093/cercor/bhz344.
- 498 Innocenti, G. M. and Clarke, S. (1984) "The organization of immature callosal
499 connections", *J Comp Neurol*, 230(2), pp. 287–309. doi:10.1002/cne.902300212.
- 500 Innocenti, G. M. and Price, D. J. (2005) "Exuberance in the development of cortical
501 networks", *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), pp. 955–965. doi:10.1038/nrn1790.
- 502 Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T.
503 and Fujisawa, H. (1997) "Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive
504 signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice", *Neuron*, 19(5), pp.
505 995–1005. doi:10.1016/s0896-6273(00)80392-x.
- 506 Koralek, K. A. and Killackey, H. P. (1990) "Callosal projections in rat somatosensory
507 cortex are altered by early removal of afferent input.", *Proceedings of the National*
508 *Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 87(4), pp. 1396–1400.
509 doi:10.1073/pnas.87.4.1396.
- 510 Lim, J. W. C., Donahoo, A.-L. S., Bunt, J., Edwards, T. J., Fenlon, L. R., Liu, Y., Zhou,
511 J., Moldrich, R. X., Piper, M., Gobius, I., Bailey, T. L., Wray, N. R., Kessar, N., Poo,
512 M.-M., Rubenstein, J. L. R. and Richards, L. J. (2015) "EMX1 regulates NRP1-
513 mediated wiring of the mouse anterior cingulate cortex", *Development (Cambridge,*
514 *England)*, 142(21), pp. 3746–3757. doi:10.1242/dev.119909.
- 515 Meissirel, C., Dehay, C., Berland, M. and Kennedy, H. (1991) "Segregation of callosal
516 and association pathways during development in the visual cortex of the primate", *The*
517 *Journal of Neuroscience*, 11(11), pp. 3297–3316. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-11-
518 03297.1991.

- 519 Miller, M. W. and Vogt, B. A. (1984) "Heterotopic and homotopic callosal connections
520 in rat visual cortex", *Brain Research*, 297(1), pp. 75–89. doi:10.1016/0006-
521 8993(84)90544-4.
- 522 Mire, E., Hocine, M., Bazellières, E., Jungas, T., Davy, A., Chauvet, S. and Mann, F.
523 (2018) "Developmental Upregulation of Ephrin-B1 Silences Sema3C/Neuropilin-1
524 Signaling during Post-crossing Navigation of Corpus Callosum Axons", *Current*
525 *biology: CB*, 28(11), pp. 1768-1782.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.04.026.
- 526 Mitchell, B. D. and Macklis, J. D. (2005) "Large-scale maintenance of dual projections
527 by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice", *J Comp Neurol*,
528 482(1), pp. 17–32. doi:10.1002/cne.20428.
- 529 Mizuno, H., Hirano, T. and Tagawa, Y. (2007) "Evidence for Activity-Dependent
530 Cortical Wiring: Formation of Interhemispheric Connections in Neonatal Mouse Visual
531 Cortex Requires Projection Neuron Activity", *Journal of Neuroscience*. Society for
532 Neuroscience, 27(25), pp. 6760–6770. doi:10.1523/JNEUROSCI.1215-07.2007.
- 533 Muche, A., Bigl, M., Arendt, T. and Schliebs, R. (2015) "Expression of vascular
534 endothelial growth factor (VEGF) mRNA, VEGF receptor 2 (Flk-1) mRNA, and of
535 VEGF co-receptor neuropilin (Nrp)-1 mRNA in brain tissue of aging Tg2576 mice by
536 in situ hybridization", *International Journal of Developmental Neuroscience*, 43(1), pp.
537 25–34. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.03.003>.
- 538 Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J. P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C.,
539 Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y. and Lebrand, C. (2009) "Transient neuronal
540 populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C", *PLoS Biol*,
541 7(10), p. e1000230. doi:10.1371/journal.pbio.1000230.
- 542 O’Leary, D. D. M. (1992) "Development of connectional diversity and specificity in the
543 mammalian brain by the pruning of collateral projections", *Current Opinion in*
544 *Neurobiology*, 2(1), pp. 70–77. doi:10.1016/0959-4388(92)90165-H.
- 545 O’Leary, D. D. M. and Koester, S. E. (1993) "Development of projection neuron types,
546 axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex", *Neuron*, 10(6),
547 pp. 991–1006. doi:10.1016/0896-6273(93)90049-W.
- 548 Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (1
549 vol). Compact 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- 550 Piper, M., Plachez, C., Zalucki, O., Fothergill, T., Goudreau, G., Erzurumlu, R., Gu, C.
551 and Richards, L. J. (2009) "Neuropilin 1-Sema signaling regulates crossing of cingulate
552 pioneering axons during development of the corpus callosum", *Cereb Cortex*, 19 Suppl
553 1, pp. i11-21. doi:10.1093/cercor/bhp027.
- 554 Pouchelon, G., Gambino, F., Bellone, C., Telley, L., Vitali, I., Lüscher, C., Holtmaat, A.
555 and Jabaudon, D. (2014) "Modality-specific thalamocortical inputs instruct the identity
556 of postsynaptic L4 neurons", *Nature*, 511(7510), pp. 471–474.
557 doi:10.1038/nature13390.
- 558 Rakic, P. (1988) "Specification of cerebral cortical areas", *Science*, 241(4862), pp. 170–
559 6. doi:10.1126/science.3291116.

- 560 Rodriguez-Tornos, F. M., Briz, C. G., Weiss, L. A., Sebastian-Serrano, A., Ares, S.,
561 Navarrete, M., Frangeul, L., Galazo, M., Jabaudon, D., Esteban, J. A. and Nieto, M.
562 (2016) "Cux1 Enables Interhemispheric Connections of Layer II/III Neurons by
563 Regulating Kv1-Dependent Firing", *Neuron*, 89(3), pp. 494–506.
564 doi:10.1016/j.neuron.2015.12.020.
- 565 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T.,
566 Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J.,
567 Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) "Fiji: an open-source
568 platform for biological-image analysis", *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682.
569 doi:10.1038/nmeth.2019.
- 570 Stanfield, B. B., O’Leary, D. D. M. and Fricks, C. (1982) "Selective collateral
571 elimination in early postnatal development restricts cortical distribution of rat pyramidal
572 tract neurones", *Nature*, 298(5872), pp. 371–373. doi:10.1038/298371a0.
- 573 Suárez, R., Fenlon, L. R., Marek, R., Avitan, L., Sah, P., Goodhill, G. J. and Richards,
574 L. J. (2014) "Balanced interhemispheric cortical activity is required for correct targeting
575 of the corpus callosum", *Neuron*, 82(6), pp. 1289–1298.
576 doi:10.1016/j.neuron.2014.04.040.
- 577 Suarez, R., Gobijs, I. and Richards, L. J. (2014) "Evolution and development of
578 interhemispheric connections in the vertebrate forebrain", *Front Hum Neurosci*, 8, p.
579 497. doi:10.3389/fnhum.2014.00497.
- 580 Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G.,
581 Fujisawa, H. and Strittmatter, S. M. (1999) "Plexin-neuropilin-1 complexes form
582 functional semaphorin-3A receptors", *Cell*, 99(1), pp. 59–69. doi:10.1016/s0092-
583 8674(00)80062-8.
- 584 Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T. and Takauji, R. (2003) "Evidence
585 that *Sema3A* and *Sema3F* regulate the migration of GABAergic neurons in the
586 developing neocortex", *Journal of Comparative Neurology*, 455(2), pp. 238–248.
587 doi:<https://doi.org/10.1002/cne.10476>.
- 588 Tolley, L., Cadilhac, C., Cioni, J.-M., Saywell, V., Jahannault-Talignani, C., Huettl, R.
589 E., Sarrailh-Faivre, C., Dayer, A., Huber, A. B. and Ango, F. (2016) "Dual Function of
590 NRP1 in Axon Guidance and Subcellular Target Recognition in Cerebellum", *Neuron*,
591 91(6), pp. 1276–1291. doi:10.1016/j.neuron.2016.08.015.
- 592 Velona, T., Altounian, M., Roque, M., Hocine, M., Bellon, A., Briz, C. G., Salin, P.,
593 Nieto, M., Chauvet, S. and Mann, F. (2019) "PlexinD1 and *Sema3E* determine laminar
594 positioning of heterotopically projecting callosal neurons", *Molecular and Cellular
595 Neuroscience*, 100, p. 103397. doi:10.1016/j.mcn.2019.103397.
- 596 Watson, C. (2012) "Chapter 21 - The Somatosensory System", in Watson, C., Paxinos,
597 G., and Puelles, L. (eds.) *The Mouse Nervous System*. San Diego: Academic Press, pp.
598 563–570.
- 599 Wise, S. P. and Jones, E. G. (1976) "The organization and postnatal development of the
600 commissural projection of the rat somatic sensory cortex", *J Comp Neurol*, 168(3), pp.
601 313–43. doi:10.1002/cne.901680302.

- 602 Wu, K. Y., He, M., Hou, Q. Q., Sheng, A. L., Yuan, L., Liu, F., Liu, W. W., Li, G.,
603 Jiang, X. Y. and Luo, Z. G. (2014) "Semaphorin 3A activates the guanosine
604 triphosphatase Rab5 to promote growth cone collapse and organize callosal axon
605 projections", *Sci Signal*, 7(340), p. ra81. doi:10.1126/scisignal.2005334.
- 606 Yorke, C. H. and Caviness, V. S. (1975) "Interhemispheric neocortical connections of
607 the corpus callosum in the normal mouse: a study based on anterograde and retrograde
608 methods", *J Comp Neurol*, 164(2), pp. 233–45. doi:10.1002/cne.901640206.
- 609 Zhao, H., Maruyama, T., Hattori, Y., Sugo, N., Takamatsu, H., Kumanogoh, A.,
610 Shirasaki, R. and Yamamoto, N. (2011) "A molecular mechanism that regulates
611 medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex", *J*
612 *Comp Neurol*, 519(5), pp. 834–48. doi:10.1002/cne.22536.
- 613 Zhou, J., Wen, Y., She, L., Sui, Y. N., Liu, L., Richards, L. J. and Poo, M. M. (2013)
614 "Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection",
615 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(29), pp. E2714-23. doi:10.1073/pnas.1310233110.

Figure 1 - figure supplement 1

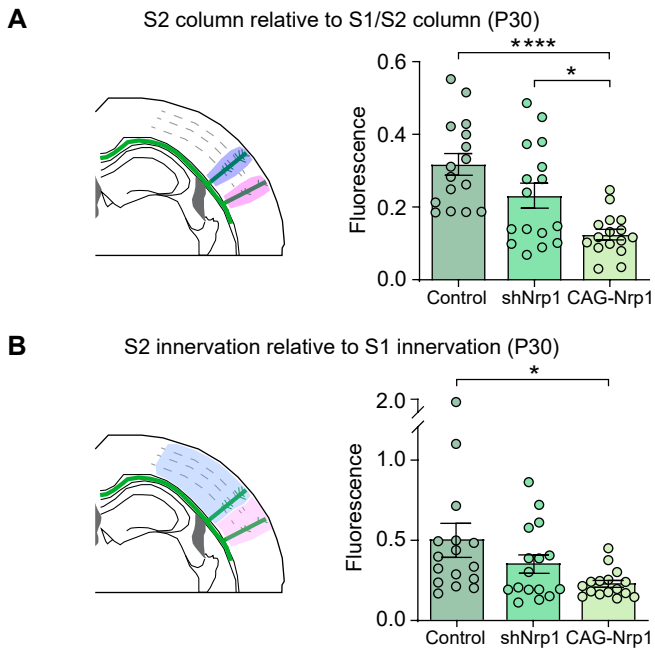


Figure 1 – figure supplement 1. Analysis of contralateral innervation of SS cortex at P30 upon Nrp1 modifications. A-B) Quantification of axonal distribution in the contralateral hemisphere. The left panels depict schemes showing the selected ROIs in which GFP⁺ is quantified (shaded areas). Graphs show values of relative contralateral GFP innervation. Mean \pm SEM (n = 8 brains, 2 sections per brain, in all conditions). A) S2 column relative to S1/S2 column (One-way ANOVA: P -value $<$ 0.0001. Post-hoc with Tukey's test: **** p -value_{Control - CAG-Nrp1} $<$ 0.0001; * p -value_{shNrp1 - CAG-Nrp1} = 0.0231). B) S2 innervation relative to S1 innervation (One-way ANOVA: P -value = 0.0329 Posthoc with Tukey's test: * p -value_{Control - CAG-Nrp1} = 0.0252).

Figure 1 - figure supplement 2

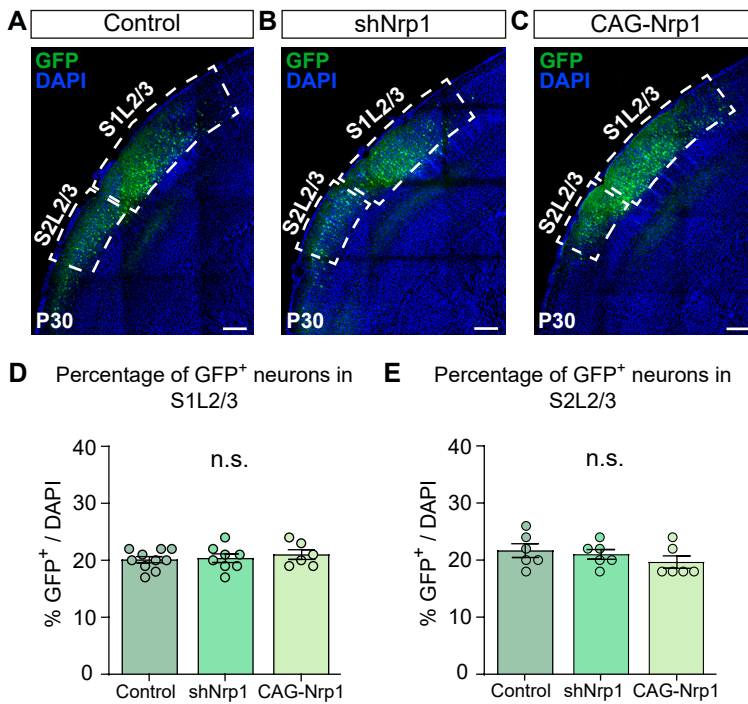


Figure 1 – figure supplement 2. Analysis of proportions of GFP⁺ electroporated neurons in the ipsilateral side in somatosensory areas. A-C) Detail of the ipsilateral hemisphere of P30 electroporated brains from all conditions (Dashed boxes: S1L2/3 electroporated area and S2L2/3 electroporated area). Scale bar = 300 μ m. **D-E**) Percentage of GFP⁺ neurons over cells (DAPI⁺) in S1L2/3 and S2L2/3. Mean \pm SEM ($n \geq 3$ brains, 2 sections per brain in all conditions). **D**) S1 area (One-way ANOVA: P -value = 0.6769 (n.s.)). **E**) S2 area (One-way ANOVA: P -value = 0.4172 (n.s.)).

Figure 2 - figure supplement 1

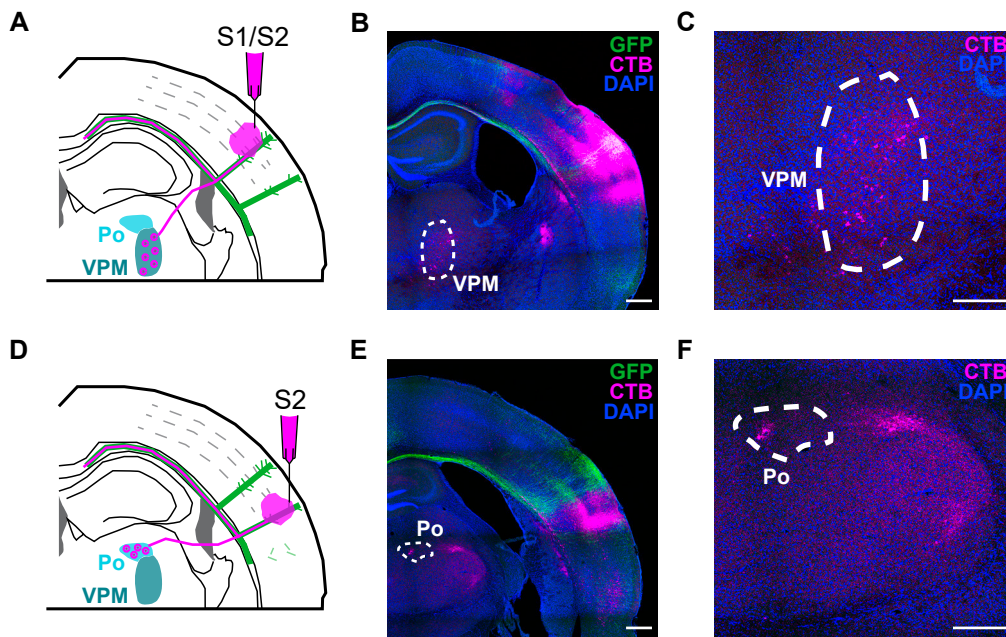


Figure 2 – figure supplement 1. Retrospective control of correct columnar stereotaxic injections. **A)** Scheme of coronal section of P30 injected brain in S1/S2 column. Thalamus nucleus VPM (ventral posterior medial nuclei) extend thalamocortical axons to S1/S2 column. **B)** Merge image of coronal section of the contralateral injected side of S1/S2 injection. Dashed line marks VPM, where thalamic neurons are CTB⁺. Green = GFP, Magenta = CTB, Blue = DAPI. Scale bar = 500 μ m. **C)** Detail of VPM nucleus. Magenta = CTB, Blue = DAPI. Scale bar = 200 μ m. **D)** Scheme of coronal section of P30 injected brain in S2 column. Thalamus nucleus Po (posterior nucleus) extend thalamocortical axons to the S2 column. **E)** Merge image of coronal section of contralateral injected side of S2 injection. Dashed line marks Po, where thalamic neurons are CTB⁺. Green = GFP, Magenta = CTB, Blue = DAPI. Scale bar = 500 μ m. **F)** Detail of Po nucleus. Magenta = CTB, Blue = DAPI. Scale bar = 200 μ m.

Figure 2 - figure supplement 2

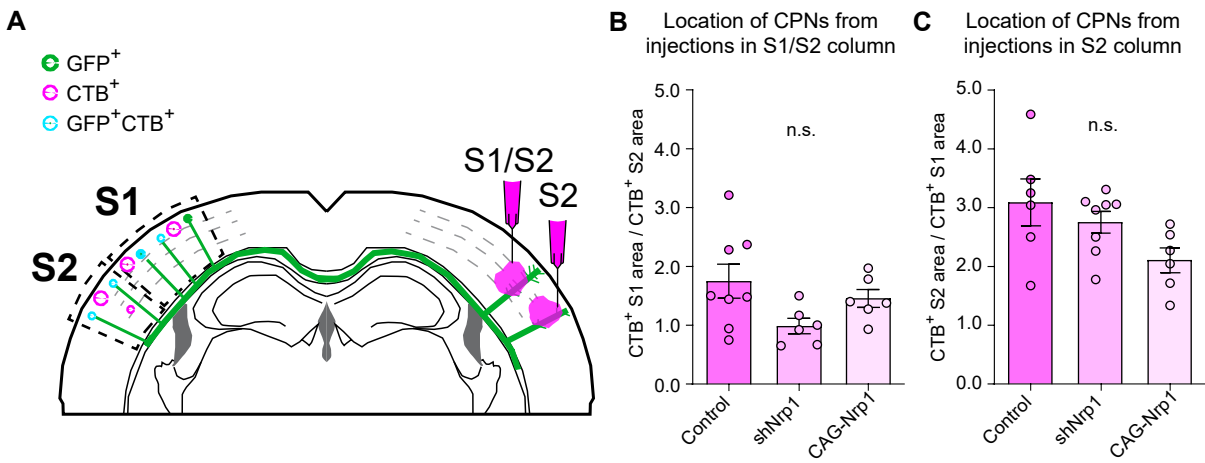


Figure 2 – figure supplement 2. Analysis of location of CPNs neurons at P30 in somatosensory cortex. A) Scheme of coronal section of electroporated and injected brain at P30. The injections were made in S1/S2 column in one group and in S2 column in the other group. CTB⁺ and GFP⁺CTB⁺ populations were quantified individually between the S1 and S2 area and, in the two types of injections. **B-C)** Location of CTB⁺ CPNs from injections in S1/S2 column and S2 column. For S1/S2 injections, ratio was calculated between S1CTB⁺ and S2CTB⁺ neurons. For S2 injections, ratio was calculated between S2CTB⁺ and S1CTB⁺ neurons. Mean ± SEM (n ≥ 3 brains, 2 sections per brain in all conditions. B) S1/S2 injections (One-way ANOVA: *P*-value = 0.0840 (n.s.)). C) S2 injections (One-way ANOVA: *P*-value = 0.0669 (n.s.)).

Figure 3 - figure supplement 1

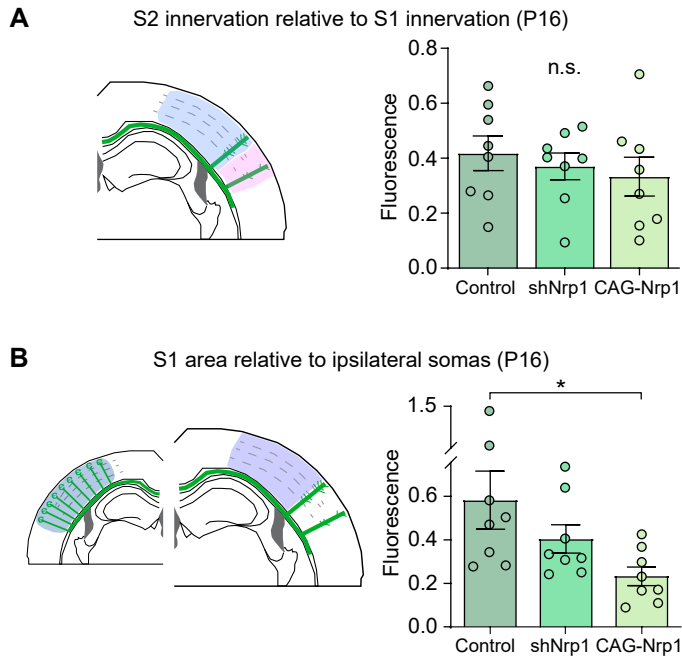


Figure 3 – figure supplement 1. Analysis of contralateral innervation of SS cortex at P16 upon Nrp1 modifications. A-B) Quantification of contralateral GFP⁺ axons. Mean ± SEM (n ≥ 4 brains, 2 sections per brain in all conditions). A) S2 innervation relative to S1 innervation (One-way ANOVA: *P*-value = 0.6260 (n.s.)). B) S1 area (One-way ANOVA: *P*-value = 0.0385. Posthoc with Tukey's test: * *p*-value_{Control-CAG-Nrp1} = 0.0300).

Figure 5 - figure supplement 1

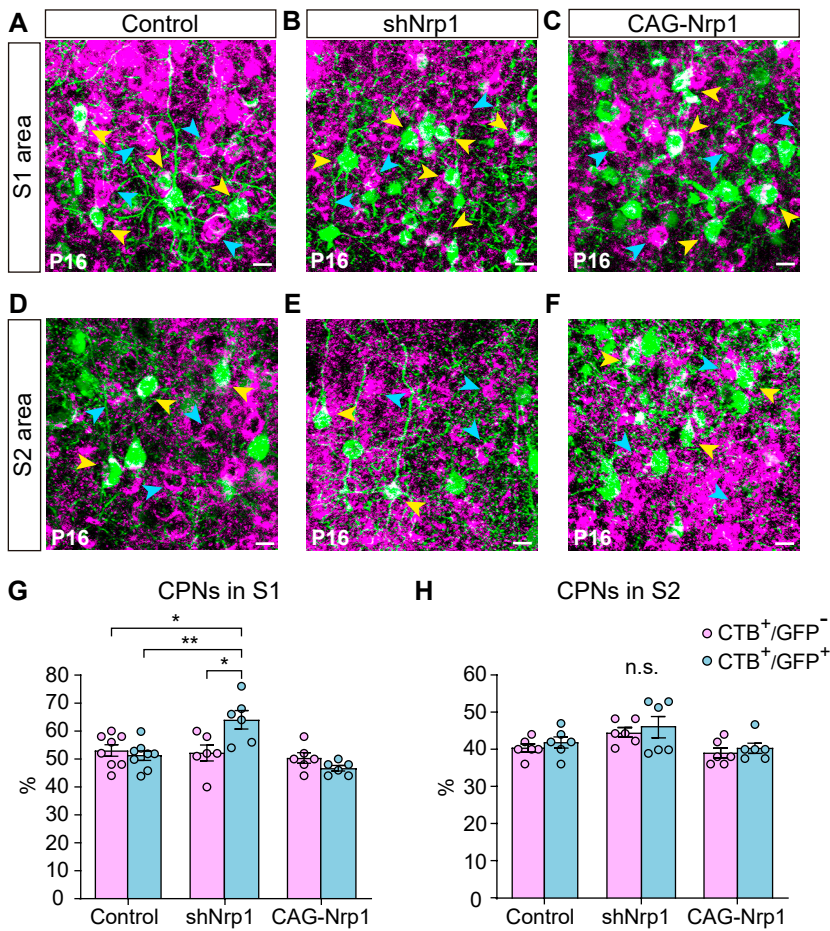


Figure 5 – figure supplement 1. CPNs proportions of non-electroporated and electroporated neurons at P16. A-F Images of L2/3 populations (CTB⁺, blue arrowheads; GFP⁺CTB⁺, yellow arrowheads). Scale bar = 10 μm. A-C) S1L2/3 neurons. D-F) S2L2/3 neurons. **G-H**) Proportion of CTB⁺/GFP⁻ neurons, and GFP⁺CTB⁺/GFP⁺ in S1 area and S2 area. Mean ± SEM (n ≥ 3 brains, 2 sections per brain in all conditions). **G**) S1 CPNs (Two-way ANOVA: *P*-value Experimental condition = 0.001; *P*-value Population = 0.242. Posthoc with Tukey's test: * *p*-value shNrp1 GFP⁻ - shNrp1 GFP⁺ = 0.0127; ** *p*-value Control GFP⁺ - shNrp1 GFP⁺ = 0.0033; * *p*-value Control GFP⁻ - shNrp1 GFP⁺ = 0.0135). **H**) S2 CPNs (Two-way ANOVA: *P*-value Experimental condition = 0.072 (n.s.); *P*-value Population = 0.2842).

Figure 5 - figure supplement 2

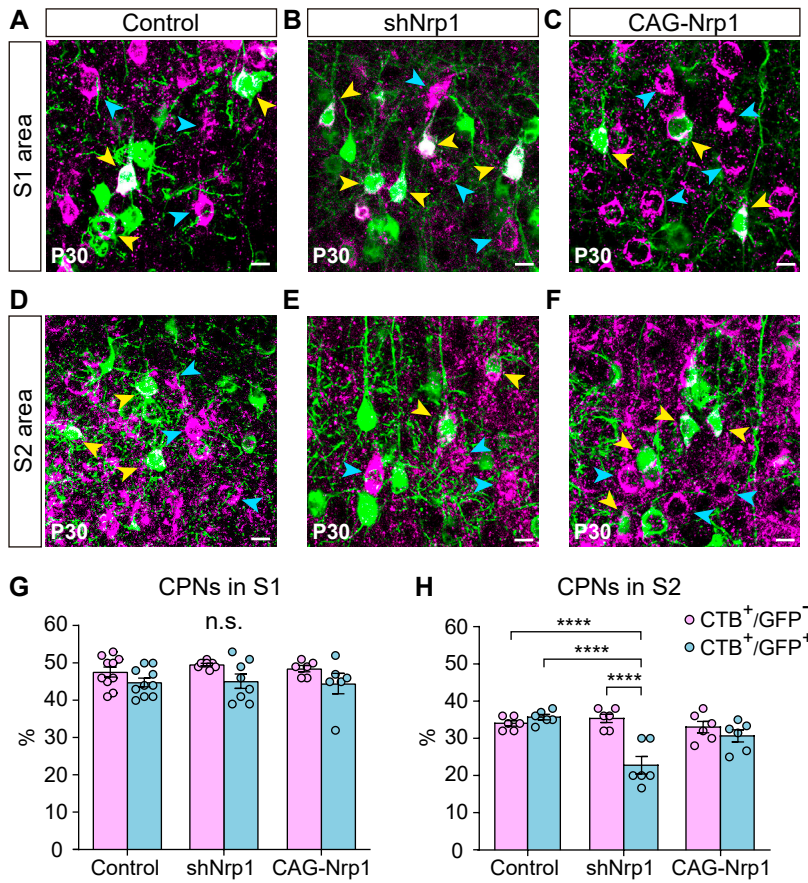


Figure 5 – figure supplement 2. CPNs proportions of non-electroporated and electroporated neurons at P30. A-F Images of L2/3 populations (CTB⁺, blue arrowheads; GFP⁺CTB⁺, yellow arrowheads). Scale bar = 10 μm. A-C) S1L2/3 neurons. D-F) S2L2/3 neurons. **G-H**) Proportion of CTB⁺/GFP⁻ neurons, and GFP⁺CTB⁺/GFP⁺ in S1 area and S2 area. Mean ± SEM (n ≥ 3 brains, 2 sections per brain in all conditions). **G**) S1 CPNs (Two-way ANOVA: *P*-value_{Experimental condition} = 0.6998 (n.s.); *P*-value_{Population} = 0.0041). **H**) S2 CPNs (Two-way ANOVA: *P*-value_{Experimental condition} = 0.0018; *P*-value_{Population} = 0.0008. Posthoc with Tukey's test: **** *p*-value_{shNrp1 CTB+GFP- - shNrp1 CTB+GFP+} < 0.0001; **** *p*-value_{Control CTB+GFP- - shNrp1 CTB+GFP+} < 0.0001; **** *p*-value_{Control CTB+GFP- - shNrp1 CTB+GFP+} < 0.0001).