

Universidad Autónoma de Madrid.
Departamento de Biología Molecular.

**Función de los factores de transcripción *Cux1* y
Cux2 en la actividad neuronal y en la
conectividad a través del cuerpo calloso.**

María Fernanda Rodríguez Tornos.

Junio 2014.

Universidad Autónoma de Madrid.
Facultad de Ciencias.
Departamento de Biología Molecular.

**Función de los factores de transcripción *Cux1* y
Cux2 en la actividad neuronal y en la
conectividad a través del cuerpo calloso.**

Memoria de Investigación presentada por

María Fernanda Rodríguez Tornos.

para optar al título de

Doctor en Ciencias

por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por la Doctora Marta Nieto López

Madrid 2014.

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. Marta Nieto en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología. Desde Septiembre de 2010 hasta Junio de 2014 ha sido financiado por una beca/contrato La-Caixa.

Agradecimientos

Índice general

Agradecimientos.	I
Índice de figuras.	VII
Índice de tablas.	IX
Lista de abreviaturas.	XI
Resumen del trabajo.	1
Introducción.	3
1 Conectividad en el sistema nervioso.	3
1.1 Identidad neuronal.	3
1.2 Guía axonal.	4
1.3 Axones pioneros.	5
1.4 Papel de la actividad neuronal.	5
2 Actividad neuronal.	6
2.1 Tipos de actividad.	7
2.2 Canales iónicos	9
2.3 Patrones de disparo	11
2.4 Segmento Inicial del Axón (SIA)	12
2.5 Plasticidad neuronal.	14
3 Corteza cerebral.	16
3.1 Formación de las láminas corticales.	16
3.2 Conectividad.	19
4 Formación del CC.	20
5 Relevancia clínica de la conectividad inter-hemisférica.	23
Objetivos.	25
Materiales y métodos.	27
1 Mantenimiento de las distintas cepas de ratones.	27
2 Genotipado de ratones. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	27
3 Cultivos primarios, transfecciones, ensayos y medios de cultivo.	29
3.1 Cultivo primario de neuronas corticales.	29

3.2	Transfección de cultivos primarios neuronales.	29
3.3	Ensayos de luciferasa.	30
3.4	Inducción de despolarización de neuronas corticales en cultivos primarios. . .	30
4	CONSTRUCCIONES DE ADN.	30
4.1	SARE <i>Cux1</i> /SARE <i>Cux2</i> Luc.	30
4.2	SARE <i>Arc</i> Luc.	31
4.3	Plásmido pCAG GS.	31
4.4	Vector lentiviral ARN de horquillado corto (ARNhc).	31
4.5	Plásmido pEYFPK _v 1,2HA.	32
4.6	Plásmido pEGFPK _v 1,3.	32
4.7	Plásmido Chr2-YFP- <i>NavII - III</i>	32
5	Amplificación y purificación de los plásmidos.	32
6	Técnicas de inmunofluorescencia e histología.	33
6.1	Tinción de células.	33
6.2	Tinción de tejido.	33
7	Anticuerpos.	34
8	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).	34
9	Electroporación <i>in-utero</i> de precursores de neuronas corticales.	35
10	Electrofisiología.	36
11	Estudios <i>in-silico</i> – Análisis genómicos.	36
12	Análisis estadístico.	37
	Resultados.	39
1	La secuencia SARE forma parte de un mecanismo global de respuesta neuronal a la actividad sináptica.	39
1.1	Obtención de una lista de genes potencialmente regulados por la región SARE mediante herramientas bio-informáticas.	39
1.2	Validación de la lista de genes regulados por la región SARE con fuentes externas.	43
1.3	Validación biológica de la lista de genes regulados por la región SARE.	45
1.4	Validación de nuestra lista como fuente de potenciales dianas a estudiar en enfermedades neurológicas.	47
2	Función de <i>Cux1</i> y <i>Cux2</i> en el cruce de la línea media y en el desarrollo axonal de las neuronas de proyección del cuerpo caloso.	47

2.1	La migración neuronal y laminación cortical es correcta en animales electroporados con ARNhc- <i>Cux1</i>	48
2.2	La dinámica de invasión axonal por el cuerpo caloso a estadios tempranos está modificada en neuronas deficientes en <i>Cux1</i> o <i>Cux2</i> , sin embargo la trayectoria no se encuentra alterada.	48
2.3	Papel de los factores de transcripción <i>Cux1</i> y <i>Cux2</i> en el establecimiento y mantenimiento del patrón de invasión contralateral final.	50
2.4	Posible influencia bi-direccional de <i>Cux1</i> sobre la conectividad entre los hemisferios.	54
3	<i>Cux1</i> posibilita la conectividad de los dos hemisferios a través del cuerpo caloso modulando el patrón de disparo de potenciales de acción de las neuronas de las láminas II-III de la corteza cerebral.	56
3.1	Los defectos en la invasión a larga distancia de las neuronas deficientes en <i>Cux1</i> son debidos a actividad neuronal aberrante.	56
3.2	<i>Cux1</i> determina la excitabilidad y patrones de disparo de las neuronas calosas de las láminas II-III.	57
3.3	Los defectos en conectividad originados por <i>Cux1</i> son debidos a la disminuida expresión de K_v1 y a la aparición patrones de disparo irregulares en las neuronas calosas de las láminas II-III.	62
3.4	La modulación de las corrientes iónicas y de los patrones de disparo en el segmento inicial del axón regula las conexiones a larga distancia del cuerpo caloso.	68
3.5	El factor de transcripción <i>Cux1</i> controla la localización neuronal del segmento inicial del axón y esta correlaciona con la correcta invasión contralateral de las neuronas calosas.	71
4	<i>Cux2</i> tiene un efecto autónomo celular sobre la conectividad a través del cuerpo caloso y regula la excitabilidad neuronal en las láminas II-III.	74
4.1	<i>Cux2</i> afecta el patrón de invasión contralateral a través del CC.	74
4.2	Las neuronas <i>Cux2</i> ^{-/-} tienen su excitabilidad alterada.	76
Discusión.		79
1	Coordinación entre factores de transcripción: Un nivel más de complejidad en la regulación de la transcripción génica.	79
2	Importancia del uso de herramientas bio-informáticas de forma complementaria a la aproximación científica clásica.	80
3	Relevancia de los factores de transcripción <i>Cux1</i> y <i>Cux2</i> en la formación del cuerpo caloso.	81
4	<i>Cux1</i> modula los patrones de disparo y las funciones del segmento inicial del axón en las neuronas de las láminas II-III.	84

5	Cux2 es esencial para el establecimiento del patrón de conectividad final en el hemisferio contralateral.	88
	Conclusiones.	89
	Discusión.	91
	Material suplementario.	115

Índice de figuras

1	Definición de la identidad neuronal por FT.	4
2	Desarrollo de la invasión axonal.	5
3	La formación de los circuitos neuronales ocurre gracias a la información genética contenida en las neuronas y a la actividad eléctrica.	7
4	Localización sub-celular de los distintos K_v	11
5	Patrones de disparo presentes en distintas poblaciones neuronales.	12
6	Segmento Inicial del Axón (SIA).	13
7	Plasticidad del SIA.	15
8	Formación y composición de la corteza cerebral.	17
9	Conectividad intra/extra cortical.	19
10	Formación de la corteza cerebral.	21
11	Las secuencias SARE se encuentran en regiones inter-génicas e intrónicas.	40
12	Regulación positiva de los ARNm de los genes que contienen la secuencia SARE y activación de la transcripción por dicha secuencia en respuesta a actividad neuronal.	46
13	La migración neuronal es correcta en animales electroporados con ARNhc <i>Cux1</i>	49
14	Cinética de invasión del CC durante el desarrollo temprano.	52
15	El FT <i>Cux1</i> es esencial para la invasión contralateral del CC, pero no para la ipsilateral.	54
16	El FT <i>Cux2</i> modula el patrón de invasión contralateral del CC.	55
17	La sobre-expresión de <i>Cux1</i> afecta negativamente la invasión contralateral.	56
18	La regulación de la conectividad contralateral callosa por <i>Cux1</i> depende de la actividad eléctrica.	57
19	Propiedades electrofisiológicas de neuronas <i>Cux1</i> ^{-/-} <i>in-vitro</i> en comparación con neuronas WT.	58
20	Las neuronas deficientes en <i>Cux1</i> presentan alteraciones en sus propiedades eléctricas.	61
21	Los defectos en conectividad callosa asociados a <i>Cux1</i> son debidos a una expresión disminuida de los canales iónicos $K_v1,1$ y $K_v1,3$	64

22	Los fallos de inervación por las neuronas deficientes en Cux1 son debidos a patrones irregulares y elevadas frecuencias iniciales.	67
23	La modulación de los patrones de disparo por Cux1 es un mecanismo de desarrollo regulatorio de las proyecciones del CC de las neuronas de la lámina II-III.	70
24	La posición del SIA está alterada en neuronas <i>Cux1</i> ^{-/-} <i>in-vitro</i> y en neuronas diana del ARNhc <i>Cux1</i> <i>in-vivo</i>	73
25	El FT <i>Cux2</i> afecta al patrón de inervación contralateral generando un fenotipo dependiente de actividad.	75
26	El FT <i>Cux2</i> controla la excitabilidad de las neuronas de la lámina II-III.	78

Índice de tablas

1	Secuencias de las parejas de oligonucleótidos empleados para la amplificación del ADNc del gen indicado.	35
2	La regulación por la región SARE afecta genes de distintos aspectos y funciones neuronales.	43
3	Lista de categorías biológicas OG relacionadas con funciones neuronales enriquecidas en nuestra lista de genes SARE.	43
4	Los genes con secuencia SARE se encuentran enriquecidos en listas de genes regulados positivamente tras la inducción de actividad.	44

Lista de abreviaturas

°C: Grados centígrados.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

Arc: Gen de nombre completo *Activity regulated cytoskeletal-associated protein*.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNhc: Ácido ribonucleico de horquillado corto.

Atf 3: Factor de transcripción de nombre completo *Activating transcription factor 3*.

Bdnf: Proteína de secreción de nombre completo *Brain derived neurotrophic factor*.

Bmp: Proteína de nombre completo *Bone morphogenetic protein*.

Brn1: Factor de transcripción de nombre completo *POU-homeodomain transcription factor Pou3f3*.

Brn2: Factor de transcripción de nombre completo *POU-homeodomain transcription factor Pou3f2*.

Ca^{2+} : Cati3n calcio.

CC: Cuerpo caloso.

CGR: C3lulas ganglionares de la retina.

Cl^- : An3n cloro.

Coup: Factor de transcripci3n de nombre completo *Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 5*.

PC: Placa cortical.

CREB: Factor de transcripci3n de nombre completo *cAMP responsive element binding protein*.

Ctip2: Factor de transcripci3n de nombre completo *COUP-TF interacting protein 2*.

Cux1: Factor de transcripci3n de nombre completo *Cut-like1*.

Cux2: Factor de transcripci3n de nombre completo *Cut-like2*.

DAPI: Marcador nuclear diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

Dcc: Receptor transmembrana de nombre completo *Deleted in colorectal cancer*.

DEA: Desórdenes de espectro autista.

DIV: Días in-vitro.

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato.

E(n°): Estadio Embrionario del desarrollo.

EEM: Error estándar de la media

Emx2: Factor de transcripción de nombre completo *Empty spiracles homologue 2*.

FBS: Suero bovino fetal (en inglés, fetal bovine serum).

FMRP: Proteína de retraso mental 1 del síndrome de frágil X (en inglés, fragil X mental retardation 1 protein).

Fezf 2: Factor de transcripción de nombre completo *Fez family zinc finger 2*.

Fgf 8: Factor de crecimiento de fibroblastos 8 (en inglés, fibroblast growth factor 8).

Fgf 17: Factor de crecimiento de fibroblastos 17 (en inglés, fibroblast growth factor 17).

Foxg1: Factor de transcripción de nombre completo *Forkhead box G1*.

FoxP1: Factor de transcripción de nombre completo *Forkhead box P1*.

FoxP2: Factor de transcripción de nombre completo *Forkhead box P2*.

FT: Factor de transcripción.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GFP: Proteína verde fluorescente (en inglés, green fluorescent protein).

GS: Cabestrillo glial (en inglés, glial sling)

GW: Cuña glial (en inglés, glial wedge).

HBSS: Medio de cultivo *Hank's buffered salt solution*.

IG: Glía del *Indusium Griseum*.

ITP: Intervalo temporal entre potenciales de acción.

K^{+} : Catión potasio.

Klf 6: Factor de transcripción de nombre completo *Kruppel-like factor 6*.

KO: Modificación genética para la inactivación de un gen (en inglés, *Knockout*).

K_v : Canal de potasio dependiente de voltaje.

LB: Medio de cultivo *Luria Broth*.

Lhx2: Factor de transcripción de nombre completo *LIM homeobox 2*.

L_v : Variación local de intervalos entre potenciales de acción.

MEF2: Factor de transcripción de nombre completo *Myocyte enhancer factor 2*.

mg: Miligramo.

min: Minutos.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.

mM: MiliMolar.

ms: Milisegundos.

mV: Milivoltios.

MZ: Glía en cremallera de la línea media (en inglés, *midline zipper glia*).

Na^+ : Cation sodio.

Na_v : Canal de sodio dependiente de voltaje.

NC: Neuronas corticales.

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (en inglés, National center for biotechnology information).

Netrin: Netrina.

NP: Neuronas de proyección.

Npn 1: Receptor de membrana *Neuropilina 1*.

OG: Categorías pertenecientes al proyecto “Ontología genética”.

P(nº): Estadio postnatal.

PA: Potencial de acción.

pA: Picoamperios.

PAF: Paraformaldehído.

Pax 6: Factor de transcripción de nombre completo *Paired box 6*.

PBS: Tampón fosfato salino (en inglés, Phosphate buffered saline).

PBST: Tritón X-100 diluido en PBS.

PCDH10: Protocadherina 10

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, Polymerase Chain Reaction).

Plxn: Receptor de membrana de nombre completo plexina.

Q-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real.

rpm: Revoluciones por minuto.

Ror β : Factor de transcripción de nombre completo RAR-related orphan receptor β .

Robo: Receptor de membrana de nombre completo Roundabout homolog.

SARE: Elemento de regulación de la actividad sináptica (Synaptic activity regulatory element).

Satb2: Factor de transcripción de nombre completo Special AT-rich sequence binding protein 2.

Seg: Segundos.

Sema: Molécula de secreción o presente en la superficie celular Semaforina.

SFX: Síndrome de frágil X.

SIA: Segmento inicial del axón.

Slit: Molécula soluble de nombre Slit homolog 2.

SN: Sistema nervioso.

Sox5: Factor de transcripción de nombre completo SRY-box containing gene 5.

Sp8: Factor de transcripción de nombre completo Trans-acting transcription factor 8.

SRF: Factor de transcripción de nombre completo Serum-response-factor.

SS: área somatosensorial de la corteza cerebral.

Svet1: Factor de transcripción de nombre completo Subventricular-expressed transcript 1.

SynoR: Programa bioinformático, Genome Miner for Synonymous Regulation.

Taq: Bacteria Thermophilus aquaticus.

Tbr1: Factor de transcripción de nombre completo T-box brain gene 1.

TRANSFAC: Base de datos biológica (BIOBASE: Transcription factor binding sites).

ToppFun: Programa bioinformático (Transcriptome, ontology, phenotype, proteome, and pharma-come annotations based gene list functional enrichment analysis).

TTX: Tetrodotxina.

utr: Regiones no traducidas (en inglés, untranslated regions).

Wnt: Proteína soluble cuyo nombre proviene de la fusión de wingless + int (integración de MMTV=virus de tumor mamario de ratón).

WT: Fenotipo silvestre (en inglés, Wild Type).

Zic2: Factor de transcripción con dominios de unión a ADN tipo dedos de Zinc (en inglés, Zinc Finger Transcription Factor).

ZSV: Zona subventricular.

ZV: Zona ventricular.

Resumen del trabajo

The cerebral cortex is the most evolved structure of the brain and the site of higher order cognitive functions. These functions are possible due to the large number of overlapping intra-cortical and extra-cortical stereotyped networks that form during embryonic and early postnatal development. The subset of transcription factors (TF), that neuronal sub-populations express, determines their identity as well as their specific connectivity and network integration by mechanisms partially understood. In this thesis we investigate how activity related mechanisms direct the formation of cortical circuits in coordination with TF.

It is unknown how activity influences the modulation of genetic programs and whether it plays a role in neuronal fate specification. Previous studies demonstrated that SARE region (composed of the TF binding sites for SRF, MEF2 and CREB) regulates *Arc* transcription in response to neuronal activity. We showed that SARE sequence is part of a broad activity dependent mechanism of gene expression regulation. Our analysis identified a list of SARE containing genes which expression is possibly up-regulated upon induction of activity and, thus, possible candidates involved in human neurological disorders affecting plasticity. Among these genes we found TF that define neuronal identity; such as *Cux1* and *Cux2* in layers II-III and IV of the cortex. Our results uncover novel transcriptional mechanisms of synaptic plasticity. They describe a mechanism of gene expression regulation requiring the coordinated activity of three different TF, thus adding a grade of complexity in the way neurons regulate their transcriptional programs.

The other part of this thesis shows that subtype specific TF link the acquisition of firing modes to circuit formation during postnatal development, and demonstrates an early role for neuronal coding in selecting connectivity. It is known that different neuronal sub-populations have specific electric properties and firing modes that determine information processing and the functional network. However, the role of firing patterns in selecting neuron's connectivity during development has been barely investigated. We found that *Cux1* and *Cux2* TF are essential and non-redundant for correct corpus callosum (CC) development and connectivity. The CC is the major axonal tract of the brain. It connects the two cerebral hemispheres and it is mainly formed by axons projected from layer II-III neurons. We show that deficiency of the subtype-specific transcription factor *Cux1* in layer II-III neurons abolishes CC contralateral connectivity while *Cux2* influences the correct refinement of the circuit. We found that *Cux1* phenotype is due to low levels of K_v1 channels generating aberrant firing patterns with irregular inter-spike intervals and high initial frequencies. This correlates with aberrant axonal initial segment position. The modulation of firing modes is thus a developmental mechanism determining the specific connectivity of neuronal subtypes. These mechanisms have important implications for understanding axonal wiring, the diversity of neuronal projections, and the biology of cognitive disorders.

Altogether this thesis contributes to decipher the role of neuronal activity: the way it is generated in neurons, its properties and consequences on connectivity and gene expression.

La corteza cerebral es la estructura más desarrollada del cerebro, responsable de las funciones cognitivas más evolucionadas. Estas funciones son posibles gracias a la gran cantidad de redes intra- y extra- corticales que se forman de manera estereotipada, durante el desarrollo embrionario y en estadio post-natal temprano. El conjunto de factores de transcripción (FT) que expresan las diversas sub-poblaciones neuronales determina su identidad molecular, su conectividad e integración selectiva en redes neuronales. En esta tesis se ha investigado la forma en que mecanismos relacionados con la actividad dirigen la formación de los circuitos corticales en coordinación con FT específicos.

Se desconoce la forma en que la actividad influye en la modulación de los programas genéticos y su papel en la especificación de la identidad neuronal. Estudios anteriores demostraron que la región SARE (compuesta por los sitios de unión de los FT SRF, MEF2 y CREB) regula la transcripción del gen *Arc* en respuesta a actividad neuronal. Nosotros hemos extendido este estudio demostrando que la secuencia SARE forma parte de un mecanismo general de regulación de la expresión génica en respuesta a actividad. Los resultados presentados en esta tesis identifican una lista de genes con la secuencia SARE cuya expresión es regulada por actividad y, por lo tanto, posibles candidatos a participar en trastornos neurológicos humanos en que la plasticidad está afectada. Entre estos genes se encontraron FT que definen la identidad neuronal; tales como *Cux1* y *Cux2* en las capas II - III y IV de la corteza. Nuestros resultados describen un mecanismo de regulación de la expresión génica, en respuesta a actividad sináptica, que requiere la actividad coordinada de tres FT diferentes, añadiendo así un grado de complejidad a la forma en que las neuronas regulan sus programas transcripcionales.

La segunda parte de esta tesis enlaza FT específicos de subtipos neuronales con la adquisición de modos de disparo determinantes para la formación de circuitos durante el desarrollo post-natal; revelando un papel temprano de la codificación neuronal en la selección de la conectividad. Se sabe que las diferentes sub-poblaciones neuronales tienen propiedades eléctricas que determinan el procesamiento de la información y las redes funcionales en que estarán embebidas. Sin embargo, el papel de los patrones de disparo en la selección de la conectividad de las neuronas durante el desarrollo apenas ha sido investigado. El trabajo realizado durante esta tesis muestra que los FT *Cux1* y *Cux2* son esenciales y no redundantes para el correcto desarrollo y conectividad del cuerpo caloso (CC). El CC es el principal tracto axonal del cerebro y conecta los dos hemisferios. Está formado principalmente por los axones de neuronas de las láminas II-III. En esta tesis demostramos que la deficiencia del factor de transcripción *Cux1* impide la estabilización de las proyecciones en el hemisferio contralateral. Por otro lado *Cux2* influye en el correcto refinamiento del circuito en el hemisferio contralateral. El fenotipo ligado a la pérdida de *Cux1* se debe a los bajos niveles de los canales K_v1 que produce patrones de disparo anómalos con intervalos no periódicos entre potenciales de acción y frecuencias iniciales altas; correlacionando con una posición aberrante del segmento inicial del axón. En este trabajo se demuestra, por primera vez, que la modulación de los modos de disparo es un mecanismo que determina la conectividad de los subtipos neuronales durante el desarrollo. Estos mecanismos tienen implicaciones importantes para la comprensión de los circuitos axonales, la diversidad de las neuronas de proyección, y la biología de los trastornos cognitivos.

En resumen, esta tesis contribuye a descifrar el papel de la actividad neuronal: cómo se genera en las neuronas, sus propiedades y consecuencias sobre la conectividad y la expresión génica.

Introducción.

1. Conectividad en el sistema nervioso.

En el cerebro humano existe más de un billón de neuronas de diferentes tipos que se ensamblan en circuitos neuronales extremadamente complejos con más de 10^9 conexiones cada uno. Estos circuitos son fundamentales para el buen funcionamiento del sistema nervioso (SN) y, por ende, del organismo entero, y su establecimiento sigue patrones estereotipados. Algunos circuitos, determinantes de procesos más básicos, han sido conservados entre especies a lo largo de la evolución; mientras que otros han surgido nuevos en animales evolutivamente más desarrollados, permitiendo aumentar las funciones del organismo (Innocenti, 2011; Molnar, 2011).

1.1. Identidad neuronal.

En el SN, al igual que en el resto del organismo, existen diferentes poblaciones celulares que realizan funciones específicas para así, en conjunto, poder cumplir las competencias del sistema. Cada una de estas poblaciones poseen una identidad celular y molecular, determinada por el patrón genético que expresan (Figura 1A). Este patrón viene especificado en su mayor parte por el conjunto de factores de transcripción (FT) expresados, el cual varía a lo largo del desarrollo y ante las diferentes situaciones en que la célula se vaya a encontrar. El perfil de FT va a definir las características celulares así como las funciones que la célula va a realizar; en concreto en el SN es fundamental para precisar la conectividad de cada neurona y comportamiento de la misma; definido por la forma en que procesan las señales entrantes y generan una salida en forma de señal eléctrica. Es de remarcar que un mismo FT puede tener funciones diferentes en base al momento, tipo neural o situación en la que sea expresado. Un ejemplo de esto lo constituye *Lhx2*, el cual está presente en la zona ventricular (ZV) y zona subventricular (ZSV) durante la generación de las neuronas de las láminas superiores, y, posteriormente, lo encontramos en neuronas post-mitóticas de las láminas superiores. Se sabe que en un primer momento es esencial para el establecimiento de la identidad neocortical de los progenitores corticales (Bulchand, Grove, Porter, & Tole, 2001; Monuki, Porter, & Walsh, 2001), sin embargo, posteriormente en las láminas superiores, probablemente module otros aspectos específicos de neuronas post-mitóticas.

Dentro de los genes expresados por una población neuronal, algunos son compartidos con otras poblaciones y otros son totalmente diferentes, de forma que el patrón genético es más similar cuanto más cercanas (en función y tipo) son las poblaciones y, por el contrario, tiene menos genes en común cuanto más dispares sean las poblaciones (Molyneaux et al., 2009). Como ejemplo, es sabido que existen FT comunes a todas las neuronas de proyección (NP), lo cual explicaría el patrón inicial de desarrollo; mientras que un grupo diferente de FT y más pequeño define subtipos de NP (neuronas cortico-talámicas, callosas, talamo-corticales, etc) (Figura 1A). Otro ejemplo de esta expresión diferencial de FT muy representativo y al que volveremos más tarde en la introducción son aquellos que van a generar la corteza cerebral (Figura 1B), de manera que algunos genes son específicos para todas las neuronas corticales (NC), otros definirán la lámina en que dichas neuronas se van a localizar, y finalmente un pequeño grupo definirá poblaciones neuronales que se encargan de alguna de las funciones que tendrá esa lámina (Fame, MacDonald, & Macklis, 2011; Molyneaux, Arlotta, Menezes, & Macklis, 2007).

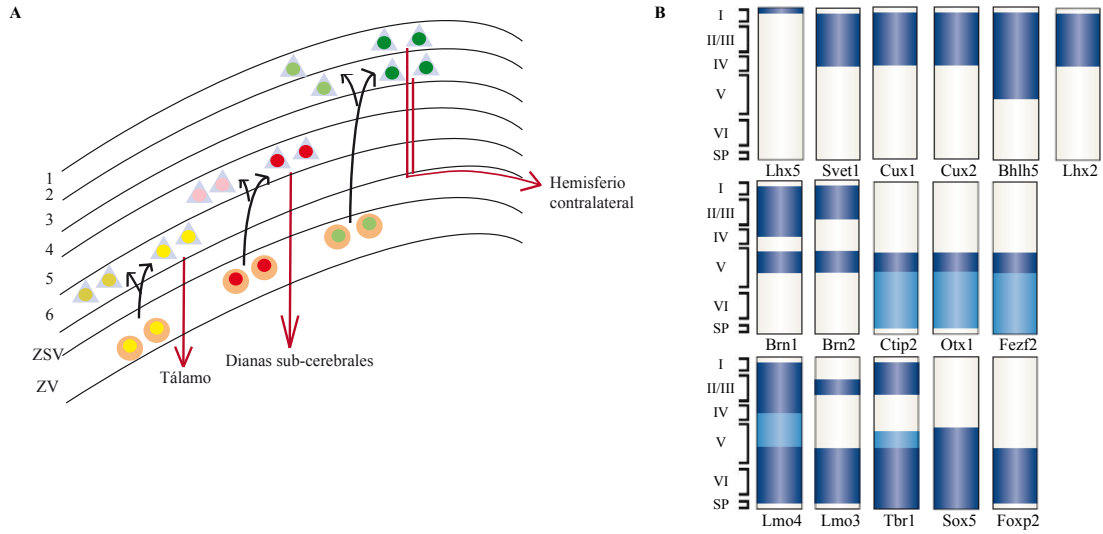


Figura 1: Definición de la identidad neuronal por FT. A) Definición de identidad neuronal a lo largo del desarrollo a través de la expresión de distintos conjuntos de FT. Los círculos anaranjados representan distintas poblaciones (en función del color de su círculo interno) de precursores; los triángulos representan distintas poblaciones neuronales (en función del color de su círculo interno) de las diferentes láminas. B) Representación esquemática de la expresión específica de lámina de los FT indicados. Azul oscuro y claro indican altos y bajos niveles de expresión respectivamente. Debido al patrón de expresión dinámico a lo largo del desarrollo, el estadio en que se analiza debe ser tenido en consideración. Adaptado de Macklis 2007.

1.2. Guía axonal.

El SN es el encargado de procesar todas las señales procedentes del exterior y generar una respuesta, por lo que es esencial que sus neuronas lleguen a todos y cada uno de los órganos, y que, de la misma forma, estén perfectamente conectadas entre ellas para así poder integrar correctamente las señales y generar la respuesta óptima. Esto es posible gracias a que las neuronas extienden sus axones y los ramifican conectándose, de una forma muy regulada, entre sí dentro de cada estructura, y con las neuronas de otras estructuras nerviosas, generando complejas redes neuronales.

Las ramificaciones axonales surgen de una serie de procesos celulares altamente regulados y que ocurren en cadena a lo largo del desarrollo; sin embargo, la morfología axonal final no siempre es indicativa de cómo se han formado; por tanto, el estudio de la ramificación y posterior refinamiento axonal es fundamental a la hora de entender la formación de los circuitos neurales (Figura 2). Un buen ejemplo de este hecho son las células ganglionares de la retina (CGR), las cuales generan ramificaciones terminales a partir de ramificaciones intersticiales, y no de la zona terminal como cabría esperar, que es retraída una vez se han formado las conexiones pertinentes (Simon & O'Leary, 1992).

Los axones, tanto primarios como subsiguientes, usan una gran heterogeneidad de mecanismos para crecer, encontrar y seguir el camino correcto y así poder llegar a inervar y conectar con sus

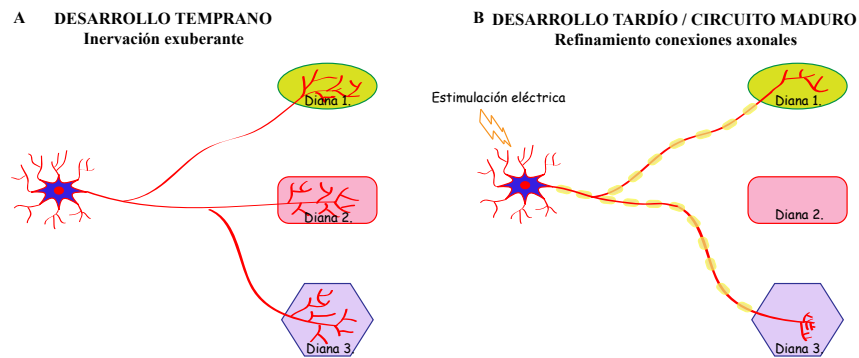


Figura 2: Desarrollo de la inervación axonal. A) Sobreproducción de ramificaciones axonales e inervación de dianas inicial. B) Refinamiento posterior de las conexiones mediado por estimulación externa.

dianas. Podemos destacar dos mecanismos por los cuales las neuronas pueden llegar a establecer las conexiones oportunas generando la gran diversidad de circuitos estereotipados existentes: moléculas guía que el cono axonal encuentra a lo largo de su camino y le permiten crecer por el itinerario adecuado; y la actividad neuronal de la que profundizaremos posteriormente en la introducción.

1.3. Axones pioneros.

Se ha demostrado que diversas poblaciones neuronales y sus axones proveen soporte estructural esencial para el crecimiento axonal de sucesivos grupos neuronales (denominados seguidores). Las neuronas pioneras son aquellas que pueden extender sus axones y que estos naveguen sin necesidad de otros axones pre-existentes. Los axones pioneros son esenciales en la formación de muchas estructuras. Son los primeros en crecer marcando caminos específicos gracias a su actividad eléctrica intrínseca (caracterizada principalmente por la expresión de los canales iónicos $K_{v3,4}$ y $Ca_v1,2$), a la influencia de moléculas guía expresadas en su ambiente y a la interacción entre ambos. Generan un andamiaje por el que posteriormente podrán seguir los axones seguidores y así encontrar sus dianas correctas. Gracias a esta estrategia, las neuronas que proyectan axones seguidores (aquellas que van a generar las estructuras neuronales finales) no necesitarán expresar la enorme cantidad de receptores requeridos para la guía inicial, ya que podrán meramente seguir a los pioneros, y, sin embargo, podrán expresar otros que les ayude a tomar decisiones de guía más finas, posteriormente en el desarrollo, permitiendo así una mayor especificidad a la hora de inervar sus dianas (Huang, Chu, Hwang, & Tsaur, 2012; Plachez & Richards, 2005; Richards, Plachez, & Ren, 2004).

1.4. Papel de la actividad neuronal.

Cada vez es más patente el papel de la actividad durante el desarrollo del SN; sin embargo, su función como reguladora del patrón final de conectividad axonal, pese a estar ampliamente aceptada, es todavía desconocida en su mayor parte. Los mecanismos que controlan la formación de los circuitos corticales durante el desarrollo consisten básicamente en aquellos relacionados con la selección de trayectorias axonales y la formación de estructuras dendríticas y sinapsis. Se han descrito numerosos ejemplos de FT, expresados por determinados subtipos neuronales, que regulan aspectos de la conectividad neuronal (Alcamo et al., 2008; Marcos-Mondejar et al., 2012; Shoemaker & Arlotta, 2010); también es conocido el papel de la actividad sobre la expresión génica (Weickert & Pfeiffer, 2006; West & Greenberg, 2011); sin embargo se desconoce la influencia que determinados

FT puedan tener sobre la actividad neuronal y la forma en que esto determina el establecimiento de los patrones finales de conectividad; lo cual implicaría una coordinación entre los programas moleculares intrínsecos que especifican la identidad neuronal, y aquellos regulando los circuitos neuronales.

Durante el desarrollo del SN, los axones generan multitud de ramificaciones conectando con un exceso de dianas. Esta exuberancia se verá modulada posteriormente, gracias a la actividad sináptica, para que tan solo aquellas conexiones que sean correctas se mantengan y así el circuito pueda funcionar precisamente (Figura 2) (Holtmaat, Randall, & Cane, 2013; Maor-Nof et al., 2013; Marik, Olsen, Tessier-Lavigne, & Gilbert, 2013).

En los últimos tiempos se ha aumentado mucho el conocimiento sobre la función elemental de la actividad en el desarrollo inicial de la conectividad neuronal. En el sistema visual de vertebrados, la actividad espontánea previa a la apertura del ojo define las conexiones iniciales, mientras que, posteriormente, la actividad inducida por la experiencia visual es esencial para el refinamiento y maduración de estas conexiones (Hensch, 2005; Katz & Shatz, 1996; Sur & Leamey, 2001). La actividad neuronal también se ha visto implicada en el crecimiento axonal de neuronas motoras espinales de embriones de gallina (Hanson & Landmesser, 2004; Li et al., 2005); así como en el establecimiento de los mapas sensoriales olfatorios en ratones (Yu et al., 2004). Es conocida la importancia de la actividad en el establecimiento del cuerpo caloso (CC), uno de los tractos axonales principales. Se ha visto que, su bloqueo en la corteza visual y SS durante el periodo neonatal, afecta el crecimiento y la arborización tanto en el hemisferio ipsilateral (Butler, Dantzker, Shah, & Callaway, 2001; Dantzker & Callaway, 1998) como en las proyecciones callosas de la corteza contralateral (Mizuno, Hirano, & Tagawa, 2007; Wang et al., 2007). Finalmente cabe resaltar el papel de la actividad espontánea en el desarrollo de la conectividad talamo-cortical. Mediante estudios en fetos de gatos en los que se les introducía el bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) en el momento en que los primeros axones procedentes del tálamo llegan a las neuronas del subplato, se observó que la inervación cortical estaba reducida y que existían proyecciones anormales hacia otras áreas corticales. Estos experimentos resaltan el papel que la actividad neuronal tiene en el desarrollo de eventos tempranos, como el correcto seguimiento de los caminos axonales (Catalano & Shatz, 1998). Por lo tanto, la visión clásica de que el establecimiento inicial de los circuitos está determinado por factores independientes de actividad, se está viendo modificada debido a la gran cantidad de estudios que se están realizando en los que se demuestra que patrones de actividad previos al establecimiento de los circuitos y a la recepción de estímulos externos son fundamentales para el desarrollo axonal y neuronal normal (Blankenship & Feller, 2010; Yamamoto & Lopez-Bendito, 2012).

2. Actividad neuronal.

La actividad neuronal consiste en cambios eléctricos que ocurren en las neuronas debido al movimiento de iones a través de su membrana plasmática. Esta dinámica iónica genera respuestas de gran índole en la neurona, esenciales para su comportamiento y comunicación con otras neuronas con las que está conectada. La transmisión del impulso eléctrico entre neuronas es la base del funcionamiento del SN. Pese a que el concepto en sí parece simple, la complejidad de los mecanismos que subyacen a la generación, transmisión y efectos de los impulsos eléctricos distan de ser comprendidos

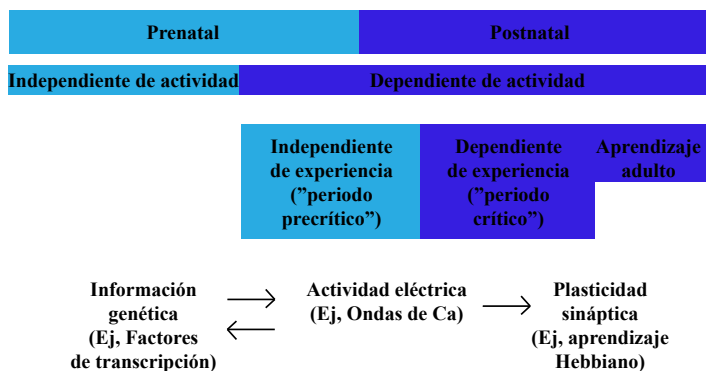


Figura 3: *La formación de los circuitos neuronales ocurre gracias a la información genética contenida en las neuronas y a la actividad eléctrica. Factores determinantes de la formación de los circuitos cerebrales a lo largo del desarrollo. Adaptado de Khazipov et al, 2006.*

en su totalidad; siendo patente que son esenciales para el correcto funcionamiento del SN.

2.1. Tipos de actividad.

Las neuronas experimentan básicamente dos tipos de actividad que contribuyen al desarrollo inicial y subsiguiente refinamiento de los circuitos cerebrales: la espontánea independiente de experiencia, aquella que ocurre previa al estímulo sensorial; y la dependiente de estímulos sensoriales, principal en los procesos de refinamiento de los circuitos neuronales y en el aprendizaje adulto (Figura 3). Mientras que la primera no es siempre mediada por sinapsis, la segunda si que se asocia mayoritariamente a la transmisión sináptica (Khazipov & Luhmann, 2006; Kirkby, Sack, Firl, & Feller, 2013; Spitzer, 2006).

Durante el desarrollo del SN tanto los determinantes genéticos como la actividad neuronal son esenciales para el correcto establecimiento de los circuitos cerebrales (Figura 3). La actividad espontánea controla diversos procesos durante el desarrollo temprano, incluyendo la diferenciación neuronal, migración, sinaptogénesis, plasticidad sináptica, etc (Feller & Scanziani, 2005; Khazipov & Luhmann, 2006; Moody & Bosma, 2005; Polleux, 2005). La actividad inducida por estímulos externos es ampliamente aceptada como determinante de la conectividad final en las redes neuronales, aunque la forma en que influye está todavía lejos de ser conocida (Degano, Park, Penati, Li, & Ronnett, 2014; Jiao et al., 2011). En esta sección me voy a limitar a describir algunos ejemplos del papel de la actividad durante el desarrollo para reflejar la gran diversidad y complejidad de mecanismos guiados por actividad neuronal que existen y condicionan la conectividad neuronal.

Cada vez existen más evidencias del papel que tiene la actividad debida a las ondas de Ca^{2+} en los conos de crecimiento para el crecimiento axonal y su guía durante el desarrollo (Mattson, Guthrie, & Kater, 1988). Gomez y Spitzer fueron pioneros en mostrar el efecto de variaciones de ondas de Ca^{2+} espontáneas en neuronas de la médula espinal de *Xenopus* (Gomez & Spitzer, 1999). Estas están moduladas por componentes de la matriz extracelular, como laminina, y son estimuladas por moléculas como netrina 1 (Gomez, Robles, Poo, & Spitzer, 2001; Hong, Nishiyama, Henley, Tessier-Lavigne, & Poo, 2000). Estos autores vieron que la frecuencia de la actividad de Ca^{2+} es fundamental para el crecimiento axonal de forma que, cuando esta es elevada, el axón crece más lentamente o se retrae, mientras que si disminuye, el axón crece más rápidamente. Posteriormente a

ellos, diversos estudios han confirmado y matizado estas conclusiones. Ahora se sabe que las ondas de Ca^{2+} , que se generan de forma espontánea en las neuronas durante el desarrollo, tienen distintos efectos sobre diversos procesos en general, y sobre el crecimiento axonal en particular, en función del tipo neuronal. De esta forma, mientras que en unas poblaciones las ondas de Ca^{2+} pueden correlacionar positivamente con el crecimiento axonal, en otras la correlación es negativa (Ming, Henley, Tessier-Lavigne, Song, & Poo, 2001; Tang, Dent, & Kalil, 2003). De principal trascendencia es también la demostración de que la actividad espontánea, a través de las ondas de Ca^{2+} , regula la expresión de grupos de genes importantes para el desarrollo; por lo que la regulación transcripcional dependiente de actividad podría representar un importante mecanismo en procesos tales como el crecimiento axonal (Goldberg et al., 2002; Mire et al., 2012).

Actualmente está aceptado el papel de los patrones de actividad endógenos en diversos mecanismos durante la formación de las redes neuronales. Las reglas que determinan esta formación no parecen ser comunes en todo el SN, señalando a que otros factores trabajan paralelamente a la actividad para la correcta formación de los circuitos (Kirkby et al., 2013). Existen diferentes patrones de actividad neuronal en la corteza cerebral durante el desarrollo axonal. Algunos de ellos son asíncronos, mientras que otros forman parte de una red en la que numerosas neuronas disparan sincronamente generando una “ola de actividad” (Adelsberger, Garaschuk, & Konnerth, 2005; Khazipov & Luhmann, 2006). Se han descrito diferentes olas de actividad oscilatorias durante el desarrollo cortical que se piensa que están implicadas en las distintas fases de desarrollo de la corteza, como las oscilaciones tempranas del circuito cortical, originadas por transmisiones glutamatérgicas de una gran cantidad de neuronas corticales, y los potenciales depolarizantes gigantes, debidos a transmisiones GABAérgicas de un grupo mucho menor de poblaciones neuronales (Allene et al., 2008; Garaschuk, Linn, Eilers, & Konnerth, 2000). De la misma manera se han identificado patrones de actividad circuital cruciales para la formación de algunos circuitos como los de la médula espinal (Kirkby et al., 2013). En la corteza de ratas neonatas se han descrito tres patrones de actividad circuital diferenciados por sus distintas frecuencias y capacidad de propagación (disparos cilíndricos, oscilaciones gamma y oscilaciones largas) (Yang, Hanganu-Opatz, Sun, & Luhmann, 2009). Los disparos cilíndricos, por ejemplo, se modulan por entradas colinérgicas y los microcircuitos entre neuronas corticales y del subplato tienen una gran influencia sobre la formación de este patrón (Hanganu, Staiger, Ben-Ari, & Khazipov, 2007). Tanto estos como las oscilaciones gamma se encuentran a menudo sincronizadas entre los dos hemisferios, incluyendo en estadios en que el CC todavía no está formado. Se ha demostrado que la transección quirúrgica del CC en ratas neonatales modula la generación de los disparos cilíndricos; por lo que la sincronización de la actividad neuronal entre ambos hemisferios cerebrales puede que tenga un papel importante en la formación y maduración de las conexiones callosas.

Las ramificaciones axonales se definen como resultado de un proceso dinámico de adición y retracción de las ramas nacientes. Esta dinámica axonal está influenciada por la actividad neuronal y contribuye a la morfología final de las ramificaciones. Una vez que los axones llegan hasta sus dianas la correcta invasión y posterior refinamiento está guiado por la actividad espontánea y por la actividad inducida. Existen mecanismos hebbianos y no-hebbianos guiando el refinamiento de las conexiones neuronales. En ciertos casos la activación simultánea de la neurona pre-sináptica y de la post-sináptica es necesaria para el fortalecimiento de la sinapsis y, por ende, de su estabilización (mecanismo hebbianos); mientras que en otros casos, tan solo es necesaria la actividad pre o post-

sináptica para la estabilización sináptica (mecanismos no-hebbianos) (Kirkby et al., 2013; Piochon, Kruskal, Maclean, & Hansel, 2012).

Otro mecanismo de inervación interesante es la competición guiada por actividad neuronal, donde las ramas de axones vecinos inervando un mismo territorio van a entrar en una competición para la inervación de las dianas. Este proceso está ampliamente descrito en retina. Se ha visto, por ejemplo, que al inhibir la actividad de las CGR se ve disminuido el crecimiento terminal del axón así como la formación de nuevos terminales axonales; sin embargo esta inhibición se revierte cuando la actividad de CGR vecinas también se suprime (Hua, Smear, Baier, & Smith, 2005). De la misma forma está demostrado que el bloqueo o aumento de la frecuencia de olas de actividad en un ojo resulta en la pérdida de territorio inervado por parte del ojo menos activo (Gibson & Ma, 2011; Gosse, Nevin, & Baier, 2008; Huberman, Feller, & Chapman, 2008; Torborg & Feller, 2005). Cabe resaltar que, existen estudios en otras estructuras, en que esta competición no parece tan determinante; lo cual pone de manifiesto la distinta importancia de la competición en los diferentes circuitos.

Finalmente, la actividad inducida por estímulos va a refinar los circuitos ya formados durante los periodos críticos y durante la etapa adulta del animal (Antonini & Stryker, 1993). Pese a que este concepto está ampliamente aceptado, se desconocen los mecanismos por los que esto ocurre. Numerosos estudios están en marcha para desvelar las bases de este tipo de refinamiento. Se sabe, por ejemplo, gracias al uso de sinaptofisina fluorescente que, en respuesta a la experiencia visual, las ramas con sinapsis maduras se estabilizaban, mientras que aquellas que no poseen sinapsis o estas son inmaduras, se retraen; de lo que se concluye que la maduración de sinapsis puede regular la ramificación axonal a través de la promoción de ramas nacientes y de la determinación de la estabilidad selectiva de las ramas existentes (Meyer & Smith, 2006; Ruthazer, Li, & Cline, 2006) (Gibson & Ma, 2011).

Mediante estos ejemplos se ha pretendido reflejar la importancia de la actividad neuronal, tanto espontánea como inducida, durante la formación y modulación de la estabilidad de los circuitos neuronales. La combinación de ambos tipos de actividad y los mecanismos subyacentes a ellos, actúa de diferente manera sobre las distintas poblaciones y estructuras neuronales y es determinante para el funcionamiento final del SN.

2.2. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembrana localizadas a lo largo de la membrana neuronal, responsables tanto del potencial de reposo como de los cambios de voltaje que una neurona va a sufrir. Existen multitud de canales activados por distintos mecanismos (voltaje, ligando, mecanosensibles, etc) y permeables selectivamente a determinados iones (Catterall, Raman, Robinson, Sejnowski, & Paulsen, 2012; Unwin, 1989). Indistintamente del modo, el resultado final de su activación va a ser la apertura del canal para que los iones fluyan, a favor de su gradiente electroquímico, hacia el interior o exterior de la membrana celular para llegar a su potencial de equilibrio. Esto genera unos cambios de concentración iónica y de voltaje en la neurona que tendrán distintas consecuencias; tanto a nivel transcripcional (activación de programas genéticos a través de cascadas de segundos mensajeros) (West & Greenberg, 2011), como eléctricas (disparo de trenes de potencia-

les de acción) (Catterall et al., 2012) y celulares (exocitosis de neurotransmisores en la hendidura sináptica, activación e inactivación de otros canales dependientes de voltaje, etc).

En las neuronas, los principales iones implicados en definir las características eléctricas son el Na^+ , el K^+ , el Ca^{2+} y el Cl^- . Los patrones de disparo de las neuronas se componen de potenciales de acción (PA), donde el Na^+ y el K^+ , gracias a su paso a través de los canales dependientes de voltaje de Na^+ (Na_v) y de K^+ (K_v) respectivamente, son los protagonistas. La dinámica de entrada de estos cationes en la neurona, así como de su salida viene definida por las propiedades de apertura y cierre de los canales por los que pasan; y estas dinámicas serán las principales determinantes de las características de los PA y de los trenes que estos forman. Prueba evidente de la importancia de los canales iónicos en la neurona es que cada vez se descubren más enfermedades mentales en que la conectividad está alterada y están causadas, o influidas, por el mal funcionamiento de canales iónicos (Brager & Johnston, 2014; Schmunk & Gargus, 2013).

Cole y Curtis comprobaron que la permeabilidad de la membrana axonal aumenta drásticamente durante el PA (Curtis, 1939), y posteriormente, se demostró que esto se debe a la rápida entrada de Na^+ en la célula (Hodgkin & Huxley, 1952; Hodgkin & Katz, 1949). Existen distintos canales que permiten la entrada de Na^+ en la neurona, pero los principales, en cuanto a lo que al disparo del PA se refiere, son los dependientes de voltaje (Na_v). Estos poseen una subunidad α principal, necesaria para la activación, inactivación y permeabilidad iónica, y una o dos subunidades β auxiliares, con importantes efectos en las propiedades de apertura y cierre así como en modular la corriente de entrada (Gurnett & Campbell, 1996; Isom, 2001; Noda et al., 1984). Existen 9 isoformas de la subunidad α generando 9 canales distintos con variaciones en tamaño, expresión a lo largo del desarrollo y dentro de la neurona, propiedades electrofisiológicas (umbral de apertura, permeabilidad a cationes, etc) y en su afinidad por agentes bloqueantes ($Na_v1,1$ - $Na_v1,9$); y cuatro isoformas de la subunidad β ($Na_v\beta 1$ - $Na_v\beta 4$) (Goldin et al., 2000; Krishnan, Lin, Park, & Kiernan, 2009). Cada tipo de canal tiene una localización definida relacionada con sus características y su función: El canal $Na_v1,1$ destaca por su localización en dendritas, mientras que $Na_v1,2$ se encuentra en los axones en desarrollo así como en aquellos sin mielina y $Na_v1,6$ se agrupa en los nodos de Ranvier de los axones mielinizados (en estos desplaza a $Na_v1,2$ en el momento en que se mielinizan) (Boiko et al., 2003; Tatiana Boiko, 2001).

Los canales de K^+ constituyen la familia de canales iónicos más grande y diversa; existen canales dependientes de voltaje, rectificadores hacia el interior, y activados por Ca^{2+} , Na^+ y ATP. Los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) consisten en cuatro subunidades α , con seis dominios transmembrana cada uno, que pueden estar asociadas con subunidades β auxiliares. Al igual que los Na_v , los distintos tipos de K_v se diferencia en base a la cinética de apertura y cierre que tienen, localización primaria y susceptibilidad ante agentes bloqueantes (Gutman et al., 2005; Krishnan et al., 2009). Estos canales son conocidos principalmente por su función durante la repolarización de la membrana plasmática tras un PA; sin embargo cada vez se sabe más sobre su papel esencial en la definición de distintas características de los PA así como de los patrones de disparo (Johnston, Forsythe, & Kopp-Scheinflug, 2010). Por ejemplo, está descrito el papel de los K_v1 sobre el control de la amplitud de los PA en el axón y la influencia que esto tiene para la eficacia sináptica a cortas *versus* largas distancias (Kole, Letzkus, & Stuart, 2007). También es conocida la función de los K_v en la regulación de la codificación y transmisión de los impulsos eléctricos a través de la modulación

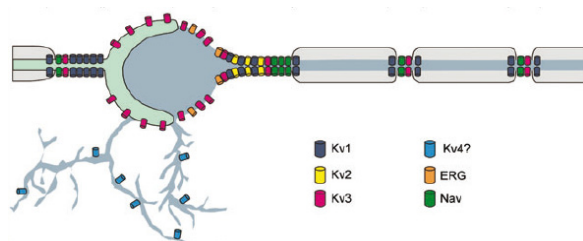


Figura 4: Localización sub-celular de los distintos K_v . K_v3 y ERG se localizan en el compartimento somático. El SIA se encuentra formado mayoritariamente por los K_v1 , K_v2 , y K_v3 (así como por otros canales). K_v4 se localiza en las dendritas. En los nodos de Ranvier se encuentran principalmente K_v3 , y K_v1 en las regiones yuxtaranodales. Adaptado de Johnston et al, 2010.

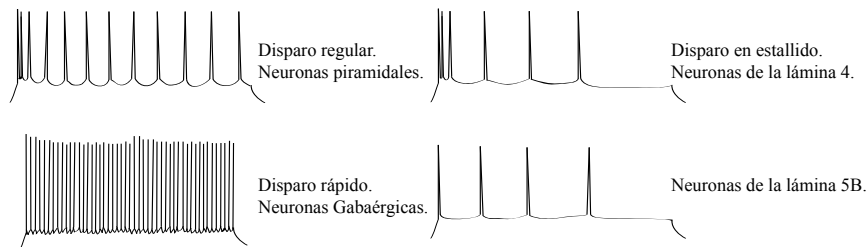
dinámica del umbral de disparo, regulación de las frecuencias, y determinación de la duración de los PA (Bekkers & Delaney, 2001; Goldberg et al., 2008; Shu, Yu, Yang, & McCormick, 2007). Existe una gran diversidad de canales K_v localizados diferencialmente en poblaciones neuronales y en compartimentos neuronales específicos (Figura 4) donde, gracias a sus características, determinan las corrientes de K^+ que los van a definir y diferenciar de otros compartimentos y poblaciones neuronales en cuanto a la forma en que la actividad les influye (Heusser & Schwappach, 2005; Jan & Jan, 2012; Robertson, 1997).

2.3. Patrones de disparo

Al igual que el resto de la dotación proteica de una célula, la expresión de canales iónicos es consecuencia del programa transcripcional desencadenado por los FT presentes en cada momento determinado en las neuronas. La combinación de canales que posee una neurona es clave para la respuesta que va a generar a los estímulos que le llegan (Bender & Trussell, 2012). Esta respuesta se transmite en forma de patrones de disparo con una frecuencia y patrón de PA así como de sus propiedades característica (Figura 5). Estos patrones de disparo comienzan a ser de especial relevancia, pues determinan un código neuronal esencial, no solo para el establecimiento y mantenimiento de los circuitos neuronales, sino para la integración y procesamiento de la información. Pese a ello, estamos lejos de conocer el lenguaje por el cual los PA transmiten la información. Sabemos que el número de PA que las neuronas disparan en un periodo de tiempo, codifica parte de la información del mensaje (Adrian, 1926a, b; Adrian & Zotterman, 1926a, b). También se están describiendo patrones de disparo característicos de las distintas poblaciones neuronales, así como su posible relevancia durante el desarrollo y mantenimiento de las conexiones nerviosas (De la Rossa et al., 2013; Doron, von Heimendahl, Schlattmann, Houweling, & Brecht, 2014; Maravall, Stern, & Svoboda, 2004; Otsuka & Kawaguchi, 2011; Stanley, 2013; Suter, Migliore, & Shepherd, 2013) (Figura 5).

Entre otros comportamientos, se sabe que las neuronas que muestran patrones de disparo regular tienen una alta capacidad de adaptación ante una estimulación mantenida, mientras que aquellas con patrones de disparo rápido casi no presentan adaptación. Estas diferencias en los patrones a menudo correlacionan con diferencias morfológicas: los patrones regulares de disparo suelen aparecer en neuronas piramidales, mientras que los patrones de disparo rápido caracterizan interneuronas inhibitorias GABA-érgicas (Connors & Gutnick, 1990). Empieza también a demostrarse el papel fundamental de los patrones en la definición de la conectividad de la neurona y, por ende, de los circuitos cerebrales. Las neuronas comisurales de la lámina V cuyo patrón de disparo de PA presenta un doblete (dos PA muy juntos en el tiempo) inicial se sabe que mandan colaterales al estriado ipsilateral y no a la corteza SS primaria ipsilateral ni a la corteza parietal posterior ipsilateral

Figura 5: *Patrones de disparo presentes en distintas poblaciones neuronales. Ejemplos de distintos tipos de patrones de disparo que se pueden encontrar en el SN.*



(Otsuka & Kawaguchi, 2011). Falta todavía mucho por conocer en cuanto a los parámetros que se deben mirar y que caracterizan los patrones de disparo, así como las consecuencias funcionales que los patrones tienen sobre el comportamiento de la neurona (Doron et al., 2014). Lo que es evidente es que las propiedades intrínsecas al disparo neuronal están probablemente condicionando muchas características neuronales, entre otras la conectividad de las neuronas, y esto es fundamental a la hora de comprender el funcionamiento del SN. Gracias a la aportación de aproximaciones sistémicas, en combinación con la enorme cantidad de experimentos biológicos, cada vez estamos más cerca de desvelar el código neuronal que permite la correcta conservación y transmisión de la información (Doron et al., 2014; Shinomoto, Miura, & Koyama, 2005a; Shinomoto, Miyazaki, Tamura, & Fujita, 2005b; Shinomoto, Shima, & Tanji, 2003).

2.4. Segmento Inicial del Axón (SIA)

Los PA son respuestas que puede llegar a generar la neurona ante la depolarización de la membrana celular producida por señales sinápticas recibidas en la región somato-dendrítica. La generación de un PA resulta en la consecuente liberación de neurotransmisores en el compartimento pre-sináptico del axón. Esto es el principal mecanismo de comunicación entre neuronas. A mediados de 1950, realizando registros del soma de moto-neuronas espinales de gato, se descubrió que los PA se inician en la zona más proximal del axón (Coombs, Curtis, & Eccles, 1957; Fuortes, Frank, & Becker, 1957). Posteriormente estos estudios se han ido corroborando en otros tipos celulares del SN. Ahora sabemos que, próximo al soma, existe una región denominada segmento inicial del axón (SIA) (Figura 6A) con elevada concentración de canales Na_v y K_v , anclados a través de la anquirinaG al citoesqueleto de actina y espectrina, gracias a lo cual es el lugar de iniciación del PA (Figura 6B) (Kole et al., 2007; Palmer & Stuart, 2006). Una de las ventajas de que el PA se inicie en el SIA, es la capacidad de que este invada el soma y se propague negativamente hasta el árbol dendrítico, informando de esta forma de la respuesta neuronal en las zonas post-sinápticas.

Desde el inicio del descubrimiento del SIA, ha habido un debate sobre las razones moleculares por las que era posible la iniciación del PA en él. Tanto estudios teóricos (Mainen, Joerges, Huguenard, & Sejnowski, 1995; Moore, Stockbridge, & Westerfield, 1983) como tinciones de los canales de Na^+ (Wollner & Catterall, 1986), indicaban que la concentración de estos en el SIA es mayor que en el soma y dendritas. Sin embargo, hasta recientemente no ha podido demostrarse electrofisiológicamente que hubiera una mayor corriente de Na^+ en el SIA que en otras áreas neuronales, debido a la desestructuración del citoesqueleto de actina y la consecuente difusión de los canales de Na^+ al pinchar directamente en el SIA con el electrodo para hacer las mediciones (Kole et al., 2008). Actualmente se ha comprobado, mediante registros electrofisiológicos del soma tras la aplicación de

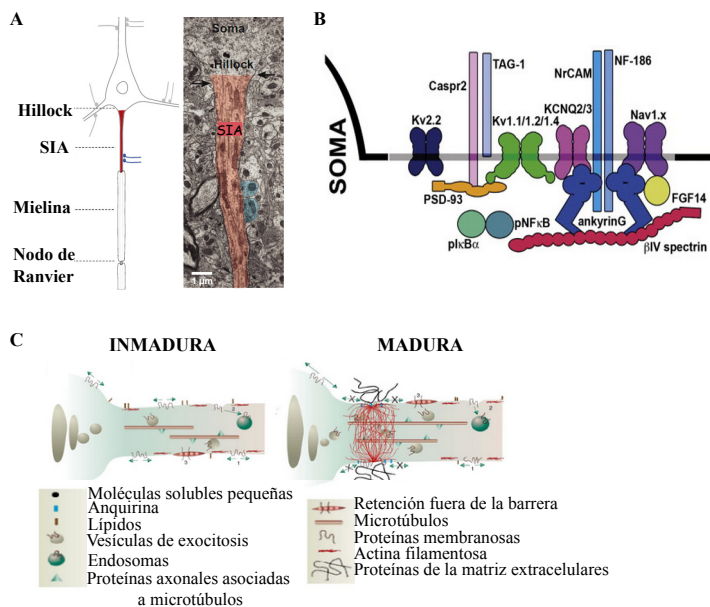


Figura 6: Segmento Inicial del Axón (SIA). A) Esquema representativo de una neurona y la localización de su SIA. Adaptado de Kole et al 2012. B) Esquema representativo de la composición del SIA. Adaptado de Ogawa et al 2008. C) Barrera física de la membrana del SIA y filtro citoplasmático que permiten el mantenimiento de la compartimentalización somato-dendrítica y axonal. Adaptado de Song et al 2009.

medio con Na^+ específicamente en las diferentes zonas de la neurona, así como estudios inmunocitoquímicos en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza, que el sitio de iniciación del PA se encuentra en la zona más distal del SIA, donde existe aproximadamente una densidad 50 veces mayor de canales de Na^+ que en el soma o dendritas. Sumado a esto, la cinética de activación de los canales de Na^+ presentes en el SIA (preferentemente $Na_v1,6$) favorece este hecho, pues el umbral al que estos canales se activan fomentando el comienzo del PA es en torno a 10-15 mV menor que el de otros canales de Na^+ (Ej, $Na_v1,2$) (Kole et al., 2008).

Una función elemental del axón es la computación de las entradas eléctricas de la neurona, y la generación de una respuesta en forma de patrón de PA y de sus propiedades que será transmitida a las neuronas con las que contacta. Es cada vez más evidente que esta computación la realiza el SIA, independientemente del soma, gracias a los canales K_v1 cuya densidad es diez veces mayor en la zona distal del SIA que en el soma (Inda, DeFelipe, & Munoz, 2006; Van Wart, Trimmer, & Matthews, 2007). Parece que los canales $K_v1,2$ y $K_v1,4$ serían los componentes dominantes de la conductancia axonal de K^+ en el SIA de las neuronas piramidales corticales. Estos canales dificultan que las señales que no son lo suficientemente depolarizantes lleguen al umbral del PA; se encargan de la repolarización del SIA tras un PA controlando de esta manera la forma del PA pre-sináptico; y controlan la anchura del PA, lo cual es fundamental para la determinación de los terminales sinápticos donde la liberación de neurotransmisores será facilitada (proximales *versus* distales). Es sabido que la inactivación de K_v1 , por ejemplo tras depolarizaciones que no llegan al umbral, produce un ensanchamiento del PA dependiente de distancia que genera un fortalecimiento en los terminales axonales proximales en detrimento de los más distales (Kole et al., 2007).

El SIA no es una estructura uniforme, sino que su composición molecular y, por lo tanto su función, varía entre sus distintos compartimentos (distales y proximales) (Dufflocq, Le Bras, Bullier, Couraud, & Davenne, 2008; Grubb & Burrone, 2010b; Hu et al., 2009). Además, la composición del SIA es diferente en función del tipo celular; permitiendo a las poblaciones neuronales una mayor

especificidad en cuanto a la forma en que inician, propagan y modelan los PA (Lorincz & Nusser, 2008; Nusser, 2009; Van Wart et al., 2007).

La importancia del SIA no se limita a todo lo anteriormente referido. Los compartimentos somato-dendrítico y el axonal de una neurona madura contienen distintos componentes de membrana y citoplásmicos fundamentales para la realización de las funciones atribuidas a cada zona. Esta segregación molecular se consigue gracias a distintos mecanismos tales como el movimiento e inserción selectivo en la membrana de nuevos componentes, retención de otras moléculas y transci-tosis proteica de la dendrita al axón. El mantenimiento de esta compartimentalización es necesario durante la vida de la neurona. De esto va a encargarse el SIA, gracias a una barrera física para la difusión lateral de proteínas de membrana y lípidos localizada en la membrana plasmática, así como de un filtro citoplasmático (Figura 6C). Estas estructuras de contención son generadas por la actinaF y la anquirinaG, proteína adaptadora que une las proteínas de membrana al citoesqueleto de actina y espectrina, al imponer una restricción tanto en el tamaño de las vesículas y moléculas que van a transportarse hacia el axón, como en el mecanismo de transporte (Nakata & Hirokawa, 2003; Nishimura, Akiyama, Komada, & Kamiguchi, 2007; Song et al., 2009; Winckler, Forscher, & Mellman, 1999). Hedstrom et al comprobaron que al eliminar la anquirinaG en neuronas hipocampales cultivadas, no solo se desmantelaba totalmente el SIA, sino que los procesos neuronales más largos (que normalmente corresponden con el axón) presentaban numerosas características dendríticas (Hedstrom, Ogawa, & Rasband, 2008). Igualmente se pudo observar que en las células de Purkinje de ratones KO de anquirinaG en el cerebelo, los supuestos axones desarrollaban protrusiones parecidas a espinas dendríticas que recibían contactos sinápticos (Sobotzik et al., 2009). Estos experimentos demuestran la importancia del SIA para el establecimiento de la polaridad neuronal y la identidad axonal.

Finalmente cabe destacar la plasticidad inherente al SIA recientemente demostrada en cultivos *in-vitro*, y que es fundamental para la adaptación de las neuronas a los niveles de actividad a los que se encuentran sometidas. Sobre esto se habla en el siguiente apartado de plasticidad.

2.5. Plasticidad neuronal.

La plasticidad neuronal es una consecuencia de la capacidad que tienen las neuronas de comunicarse entre sí. Consiste en su aptitud para modificar su comportamiento, tanto a largo como a corto plazo, en función de los estímulos que estén recibiendo. Esta característica va a permitir al sistema adaptarse a las diferentes situaciones generando distintos tipos de respuesta o manteniendo la homeostasis del sistema.

Se han descrito diversos niveles a los cuales las neuronas responden de forma plástica. Uno de ellos es la plasticidad sináptica en respuesta al aprendizaje y memoria (Mangina & Sokolov, 2006). Este tipo de plasticidad supone un aumento o reducción de la eficiencia sináptica ante procesos de aprendizaje reflejados en cambios en la actividad sináptica. Existen distintos mecanismos moleculares pre-sinápticos y post-sinápticos de plasticidad sináptica que implican cambios a distintos niveles (Fanara et al., 2010; Mangina & Sokolov, 2006). Un nivel fundamental para que puedan ocurrir procesos de aprendizaje y memoria en respuesta a las señales de entrada, es el transcripcional. Según la hipótesis de “etiquetado y captura sináptica”, la formación de memoria implica plasticidad en las si-

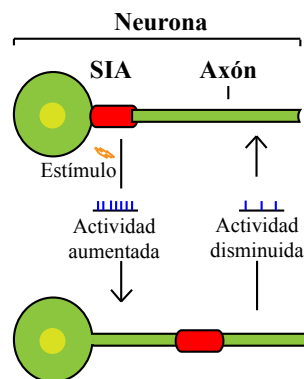


Figura 7: Plasticidad del SIA. Plasticidad del SIA como respuesta homeostática al nivel de actividad neuronal. Cuando el SIA se encuentra cercano al soma la neurona responde hiperactivamente ante las señales, y como respuesta homeostática separa el SIA del soma disminuyendo de esta forma su actividad.

napsis estimuladas y la inducción de la expresión de grupos específicos de genes en el núcleo (Morris, 2006). La subsiguiente traducción y transporte de los genes transcritos a la sinapsis “etiquetada” parece ser un mecanismo plausible para explicar que unas sinapsis se establezcan (las etiquetadas que consiguen capturar los productos generados) y sean plásticas y otras no (Morris, 2006). Para que esto pueda ocurrir, paralelamente a la plasticidad sináptica, debe ocurrir una activación de FT que desencadenen la respuesta transcripcional correcta. Se sabe que la activación post-sináptica genera una cadena de segundos mensajeros que producen este tipo de respuestas transcripcionales (Cortes-Mendoza, Diaz de Leon-Guerrero, Pedraza-Alva, & Perez-Martinez, 2013; Chen, Bambah-Mukku, Pollonini, & Alberini, 2012). Gracias a diversos estudios, es conocida la función de numerosos FT en la regulación de determinados genes; sin embargo, existen otros muchos genes de los que se desconoce sus mecanismos de expresión. Recientemente se demostró que *Arc*, un reconocido marcador de actividad y de formación de memoria, posee una región de aproximadamente 100 pares de bases, denominada SARE (Synaptic Activity-Responsive Element) capaz de, por sí sola, producir elevada inducción de expresión génica en respuesta a actividad sináptica. Se encuentra 5kb por encima del sitio de inicio de la transcripción de *Arc*, está conservada en mamíferos y posee medio sitio de unión de CREB junto a un sitio MEF2 y uno para SRF; siendo la unión de los tres FT fundamental para la correcta inducción de expresión en respuesta a actividad (Kawashima et al., 2009; Masatoshi Inoue, 2010). Esto indica que, no solo los FT *per se*, sino que la combinación entre estos puede ser un código esencial para la determinación del patrón de expresión de una célula y, por ende, de su identidad y comportamiento.

Siguiendo este discurso, cabe deducir que una modificación plástica a nivel post-sináptico generará también un cambio a nivel pre-sináptico y, como ya hemos comentado anteriormente, es en el SIA donde ocurre la computación de las señales entrantes y la formación de la respuesta saliente; por lo que cabría esperar que también sufriera algún tipo de plasticidad. Confirmando esta lógica, se ha comprobado que la posición del SIA respecto del soma varía en respuesta al nivel de actividad de la neurona; de forma que, una depolarización continua de la membrana celular genera una localización más distal del SIA, y un silenciamiento de la neurona produce una relocalización más proximal de esta estructura (Figura 7). Más allá, se ha comprobado que la posición del SIA también correlaciona con cambios en el umbral para lanzar PA de una neurona; de forma que cuando este se encuentra más distal la neurona es menos excitable, ocurriendo lo contrario con posiciones más proximales del SIA (Figura 7). Este mecanismo plástico permitiría a las neuronas modular su excitabilidad, y, por

lo tanto, su respuesta en función de los niveles de actividad existentes en los circuitos en que se encuentre embebida (Grubb & Burrone, 2010a).

3. Corteza cerebral.

La corteza cerebral es la responsable de las funciones cognitivas superiores, la integración de la percepción sensorial y la consciencia y, como tal, es la estructura del cerebro que mayor expansión ha sufrido durante la evolución (ME, 1990). Gracias a su elevada conectividad tanto dentro de ella misma como con regiones extra-corticales, la corteza cerebral se encarga de procesar las señales que el organismo recibe del exterior y de generar una respuesta a las mismas. La neocorteza de los mamíferos consiste en las áreas más evolucionadas de la corteza cerebral. Es una estructura compleja y altamente organizada que posee cientos de tipos neuronales diferentes y varios tipos de células gliales (Guillemot, 2007; Molyneaux et al., 2007). Posee dos niveles de organización característicos que son esenciales para el funcionamiento normal. En primer lugar, la neocorteza cerebral es una estructura compuesta por láminas, y cada lámina, contiene neuronas con similar morfología, patrones de conectividad (ME, 1990) e identidad molecular (Molyneaux et al., 2007); y en segundo lugar, se divide a nivel tangencial en áreas anatómicamente diferentes y especializadas funcionalmente (Alfano & Studer, 2013).

3.1. Formación de las láminas corticales.

La neocorteza está compuesta por numerosos tipos neuronales y gliales diferentes organizados en seis láminas. En la corteza cerebral podemos encontrar dos tipos principales de neuronas: interneuronas, las cuales tienen conexiones locales y liberan neurotransmisores inhibitorios; y NP, neuronas glutamatérgicas y piramidales que extienden sus axones a regiones intracorticales, subcorticales y subcerebrales. Durante el desarrollo del SN ocurre una gran expansión del neuroepitelio que forma la pared dorsolateral del tubo neural rostral para generar las NP neocorticales. Por el contrario, las interneuronas proceden de precursores del telencéfalo ventral y deben desplazarse largas distancias para llegar a su localización final en la neocorteza (Wonders & Anderson, 2006).

Tanto las funciones como la morfología, procedencia y los patrones de conectividad de las neuronas dentro de cada lámina es similar; sin embargo, ahora se sabe que existen sub-poblaciones dentro de cada lámina cumpliendo diferentes funciones (Figura 1A, 8A). La identidad molecular, definida por el patrón de expresión de FT, de los distintos tipos de NP y las señales que controlan su neurogénesis comienzan a ser definidas (Arlotta et al., 2005; Gray et al., 2004; Lein et al., 2007; Molyneaux et al., 2009; Molyneaux et al., 2007); sin embargo todavía queda mucho por descubrir, especialmente respecto a la expresión diferencial de FT por las sub-poblaciones dentro de cada lámina.

La lámina adyacente al ventrículo se denomina ZV y contiene los precursores neurales. Durante la corticogénesis tardía, los precursores de la ZV van a dar lugar a progenitores intermedios que forman una lámina proliferativa por encima de la ZV denominada ZSV. Las células precursoras de estas dos zonas van a producir las NP de las diferentes láminas corticales a lo largo del tiempo desde E11.5 hasta E17.5 (Figura 8B). Se especula que los cambios moleculares que ocurren durante

el desarrollo en las células progenitoras determinan en parte la disminución de su potencial celular. Conforme proliferan, las sucesivas generaciones de precursores restringen su potencial de forma que aquellos presentes en la ZV pueden generar tanto las neuronas de las láminas inferiores como, a través de intermediarios, las de las láminas superiores. Por el contrario, los progenitores de la ZSV tan solo podrán dar lugar a las neuronas de las láminas superiores (Casanova & Trippe, 2006).

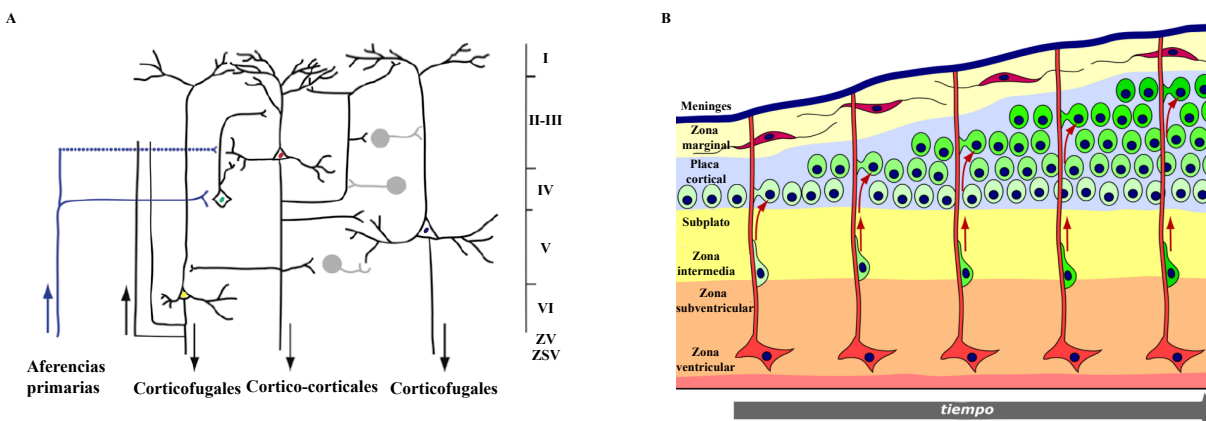


Figura 8: Formación y composición de la corteza cerebral. A) Composición y conectividad de una columna de la corteza somato-sensorial. Las neuronas de las distintas láminas están conectadas entre sí y con neuronas de otras columnas y áreas corticales para así poder recibir, procesar la información y generar una respuesta adecuada. Las células circulares grises representan interneuronas inhibitorias; las triangulares distintas poblaciones de neuronas excitatorias. B) Diagrama esquemático de la formación de la corteza cerebral. Las neuronas (verdes) son generadas en la ZV y ZSV y migran radialmente, gracias a la glía radial (naranja), a la capa que le corresponde a lo largo del desarrollo. Adaptado de Bielas et al., 2004.

La corteza cerebral se desarrolla secuencialmente en una forma que se describe como “desde el interior hacia el exterior” (Figura 8B) de forma que las neuronas que dan lugar a las capas más internas de la corteza serán las primeras en aparecer y migrar a sus posiciones, mientras que aquellas que generen las láminas más externas irán apareciendo posteriormente, y atravesarán las capas ya formadas para llegar a su posición final. Las neuronas de las láminas más profundas (V y VI) proceden de divisiones asimétricas de células neuroepiteliales que se producen en torno a E11.5-E13.5 en la ZV en ratón (Malatesta, Hartfuss, & Gotz, 2000; Noctor, Flint, Weissman, Dammerman, & Kriegstein, 2001); mientras que las neuronas de las láminas superficiales proceden de divisiones simétricas de los precursores neuronales intermedios de la ZSV entre E13.5 y E17.5 (Haubensak, Attardo, Denk, & Huttner, 2004; Miyata et al., 2004; Nieto et al., 2004; Noctor, Martinez-Cerdeno, Ivic, & Kriegstein, 2004; Rash & Grove, 2006). Las neuronas post-mitóticas se posicionarán en el neocortex siguiendo caminos de migración radial y tangencial definidos por la glía radial. El grosor de las láminas aumenta en las especies a lo largo de la evolución, lo que contribuye a incrementar la complejidad de los circuitos, así como las funciones de la corteza. Se piensa que el desarrollo neuronal en dos fases (a partir de la ZV y de la ZSV) puede haber supuesto una ventaja evolutiva, permitiendo la expansión de las láminas corticales a la vez que la aparición de nuevos tipos neuronales (Hill & Walsh, 2005; Kriegstein, Noctor, & Martinez-Cerdeno, 2006).

Aunque se ha visto que existe algún factor extrínseco, como BDNF, importante para la determinación del destino laminar, varios estudios indican que la coordinación del tiempo y la progresión para generar un subtipo de neurona específico es, al menos parcialmente, intrínseco a los progenitores (Guillemot, 2007; Shen et al., 2006). Desde la neurogénesis temprana estos expresan FT que van a determinar el tipo neuronal que van a generar, así como la posición que adoptarán dentro de la corteza. El primer grupo de FT determinando la identidad de los progenitores corticales está constituido por *Lhx2*, *Foxg1*, *Emx2* y *Pax 6*, todos ellos encargados de la represión de la expresión de FT determinantes de otros destinos distintos al cortical (Mallamaci & Stoykova, 2006; Muzio & Mallamaci, 2003; Quinn et al., 2007). Posteriormente comenzará a darse la expresión de combinaciones de FT específica de cada tipo neuronal (de las distintas láminas y áreas corticales, así como de las sub-poblaciones en ellas existentes). En ocasiones algunos de estos FT podrán ser detectados desde el estadio progenitor hasta la madurez neuronal, como por ejemplo *Svet1* y *Cux1* presentes en los precursores de la ZSV y en neuronas post-mitóticas de las láminas superiores; y, en otras ocasiones, tan solo se expresarán en uno u otro momento del desarrollo; sin embargo, en todo caso serán fundamentales para la definición de la identidad de cada una de las neuronas (McConnell, 1990; Merot, Retaux, & Heng, 2009). *Cux2* se expresa en los progenitores de la ZSV y de la ZV basal en torno a E11.5, sugiriendo que los progenitores de las neuronas de las capas superiores están presentes desde la corticogénesis temprana (Nieto et al., 2004; Tarabykin, Stoykova, Usman, & Gruss, 2001; Zimmer, Tiveron, Bodmer, & Cremer, 2004).

Como ejemplo de otros muchos FT específicos de lámina, *Cux1*, *Cux2* y *Lhx2* son marcadores de las láminas II-III y IV (Bulchand, Subramanian, & Tole, 2003; Nieto et al., 2004); *Brn1*, *Brn2* marcan las láminas II-III y V (Magdaleno et al., 2006; Sugitani et al., 2002); *Rorb* la lámina IV (Schaeren-Wiemers, Andre, Kapfhammer, & Becker-Andre, 1997); *Foxp2* la lámina VI (Ferland, Cherry, Preware, Morrissey, & Walsh, 2003); *Ctip2* y *Fezf2* las láminas V y VI (Arlotta et al., 2005; Inoue, Terashima, Nishikawa, & Takumi, 2004; Leid et al., 2004; Molyneaux, Arlotta, Hirata, Hibi, & Macklis, 2005); y *Sox5*, *Ctip2* y *Tbr1* marcan, en base a sus proporciones relativas de expresión, los distintos subtipos de poblaciones corticofugales (Arlotta et al., 2005) (Figura 1B). Algunos de estos FT están expresados a lo largo de toda una lámina, y otros en sub-poblaciones específicas dentro de las láminas; algunos se expresan tanto durante el desarrollo temprano como en la etapa madura y otros tan solo en una de las dos fases (Molyneaux et al., 2007). En esta tesis doctoral cobran especial relevancia los FT *Cux1* y *Cux2*. Estos FT son homólogos del gen *Cut* de *Drosophila*. Son un grupo de homeo-proteínas conservado entre los eucariotas superiores, con la capacidad de actuar como activadores y represores de la expresión génica y con varios dominios de unión al ADN: un homeo-dominio, y uno, dos o tres repeticiones *Cut*. Mientras que de *Cux1* se conocen distintas isoformas procedentes de splicing alternativo y se expresa en diversos tejidos de ratón, tanto en embriones como en adultos (Sansregret & Nepveu, 2008); de *Cux2* tan solo se conoce una isoforma de ARN, y su expresión se restringe mayoritariamente al SN (Gingras, Cases, Krasilnikova, Berube, & Nepveu, 2005; Nieto et al., 2004). La expresión de ambos FT en la corteza de ratones adultos se limita casi totalmente a las láminas II-III y IV, y, sin embargo, sus patrones de expresión no son totalmente solapantes ya que, mientras *Cux2* se expresa homogéneamente por toda la corteza cerebral, *Cux1* presenta una mayor expresión en la corteza SS y esta disminuye tanto en la cingulada como en la visual y motora (Nieto et al., 2004). Se han reportado funciones específicas a solo uno de los dos FT (*Cux1* o *Cux2*) y otras en las que son aditivos. Por ejemplo, se sabe que *Cux2* (y no *Cux1*) regula negativamente la proliferación de los precursores neuronales intermedios de la ZSV, por lo que parece un buen candidato en lo referente a la expansión de la corteza cerebral que ocurre

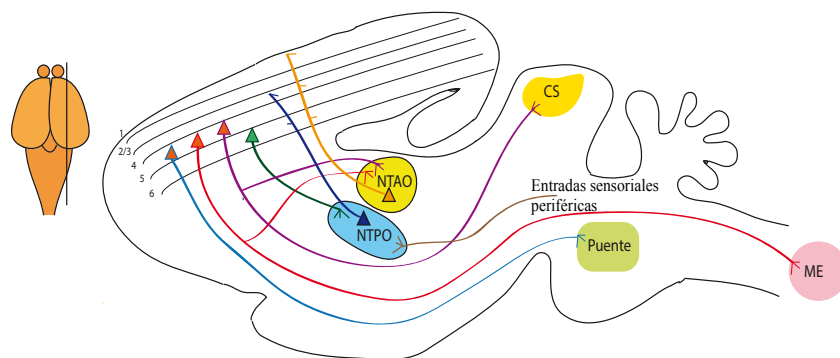


Figura 9: Conectividad intra/extracortical. Esquema de los circuitos extra-corticales. La información llega desde el tálamo a las neuronas de la lámina IV y VI; se transmite a neuronas de otras láminas, columnas y áreas para finalmente generar una respuesta que las neuronas de las láminas V y VI envían a dianas extra-corticales. NTAO, núcleos talámicos de alto orden; NTPO, núcleos talámicos de primer orden; CS, colículo superior; ME, médula espinal.

durante la evolución (Cubelos et al., 2008a). A nivel post-mitótico, ambas proteínas regulan, de forma complementaria, las ramificaciones dendríticas, morfología de las espinas y sinaptogénesis en las neuronas corticales de las láminas en que se expresan (Cubelos et al., 2010). Todavía queda mucho por conocer sobre el papel de estos FT; en esta tesis se ha abordado su función en procesos de conectividad tales como la elongación, ramificación y refinamiento axonal.

3.2. Conectividad.

La información sensorial llega a la corteza cerebral desde tálamo gracias a las inervaciones talamo-corticales, y se transmite a dianas extracorticales a través de proyecciones corticofugales (Figura 9A). De forma resumida, las neuronas talámicas transmiten la información procedente del exterior, a través de sus axones, a la lámina IV principalmente, y a la VI en menor grado; posteriormente la información progresa a lo largo de unidades de procesamiento verticales o columnas corticales, así como entre distintas columnas del mismo área y de diferentes áreas (ipsilaterales y contralaterales): de la lámina IV irán a las II/III, de la III a la V y de la V a la VI; finalmente las láminas V y VI enviarán la respuesta cortical a dianas extra-corticales (Gilbert, 1993; Porter, Johnson, & Agmon, 2001) (Figura 9). A pesar de esto, hay que resaltar que las NP corticales establecen la mayoría de sus conexiones con neuronas de otras regiones corticales (intracortical), de forma que la mayor parte de la integración y procesamiento complejo de la información se da en la corteza (Conel, 1953).

El circuito intracortical más básico es el que determina las columnas corticales, definido por la conectividad entre las neuronas de las diferentes láminas. Este circuito fue descrito por primera vez en la corteza sensorial, donde se vio que todas las neuronas de una misma columna responden con similar actividad a un estímulo determinado; así como que la distribución de las señales de entrada talámicas ocurre verticalmente en las columnas, en vez de horizontalmente a lo largo de las láminas (Feldmeyer, 2012; Feldmeyer et al., 2013; Mountcastle, Davies, & Berman, 1957). Estos

estudios fueron posteriormente extendidos por Hubel y Wiesel al probar que la invasión de la corteza visual por ambos ojos también se organiza en columnas (dominancia ocular) y descubrir la existencia de columnas de orientación (Hubel & Wiesel, 1962, 1963).

Las NP de las láminas II-III y V proyectan sus axones permitiendo la conexión tangencial entre columnas de forma que contribuyen a generar las diferentes áreas especializadas de la corteza. En adultos, las especializaciones funcionales de cada área están definidas por diferencias en citoarquitectura, patrones de expresión genética, proyecciones de entrada, y por la forma específica en que las neuronas dentro de la columna se conectan.

Las distintas áreas se conectan entre sí facilitando la integración de la información y de esta manera procesamientos complejos. Los axones corticales que no cruzan la línea media sino que se alargan a través del eje antero-posterior, conectan las distintas áreas de cada hemisferio. Por el contrario, aquellos que cruzan la línea media (pertenecientes principalmente al CC y a la comisura anterior) conectan ambos hemisferios cerebrales de forma que puedan intercambiar información. De esta manera, la corteza cerebral es capaz de procesar a nivel global la información que llega desde el exterior, y generar una respuesta óptima.

4. Formación del CC.

El CC es uno de los mayores tractos nerviosos, así como la mayor comisura existente en el cerebro de mamíferos. Conecta los dos hemisferios cerebrales y se encarga de la integración de la información de ambos lados corticales para poder realizar funciones cognitivas, comportamentales y motoras normales. Es un tracto crítico para el establecimiento de los circuitos neuronales que controlan la integración correcta de la información percibida por el organismo y la respuesta que se generará como resultado (Leyva-Díaz & López-Bendito, 2013).

El CC se forma a lo largo de un eje rostro-caudal durante el desarrollo humano. Los axones de las neuronas piramidales de las láminas II-III (en el ratón un 80 %) y V (20 % en el ratón), así como una minoría de la lámina VI serán los responsables de la formación del tracto caloso (Kier & Truwit, 1996; Richards et al., 2004). Las neuronas calosas proyectan sus axones hacia la línea media y, posteriormente, hasta sus dianas finales gracias a la actividad neuronal y a factores intrínsecos y extrínsecos (moléculas guía). Como principales determinantes de la correcta trayectoria de los axones calosos se encuentran el andamiaje que previamente las neuronas pioneras forman y las estructuras presentes en la línea media formadas por poblaciones gliales y moléculas solubles que señalizan la trayectoria que deben seguir (Figura 10A, B) (Koester & O'Leary, 1994; Lindwall, Fothergill, & Richards, 2007; Nishikimi, Oishi, & Nakajima, 2013; Richards et al., 2004). No todas las neuronas pertenecientes a las láminas II-III y V van a proyectar sus axones formando el CC, sino que tan solo una subpoblación presente en estas láminas y caracterizada por un patrón de expresión de FT específico será la encargada de la formación de este tracto; además, algunas de ellas también mandan colaterales axonales a la corteza ipsilateral y contralateral para conectar las diferentes áreas corticales (Fame et al., 2011; Mitchell & Macklis, 2005). *Satb2* es uno de los pocos FT conocidos que determina a las NP del CC. Su pérdida produce, por la falta de represión de *Ctip2*, una agénesis callosa y una reorientación de los axones hacia dianas subcorticales a través de la cápsula interna

(Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008).

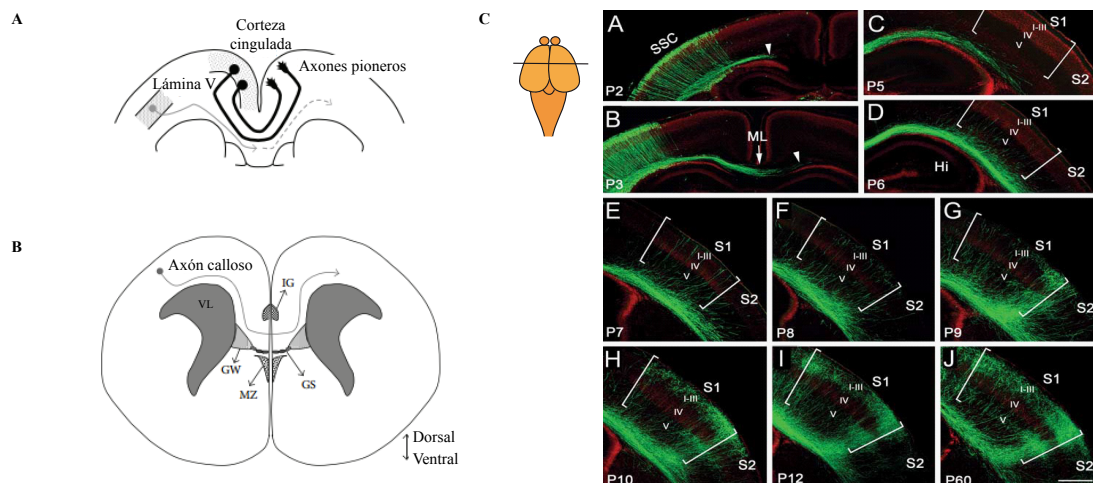


Figura 10: Formación de la corteza cerebral. A) Las neuronas pioneras de la corteza cingulada extienden sus axones a E17 para guiar a los primeros axones callosos en desarrollo en su recorrido. B) Distintas poblaciones gliales en torno a la línea media esenciales para la guía de los axones callosos. Adaptado de Mitsuaki Nishikimi et al, 2013. C) Desarrollo axonal del CC en el área somato-sensorial. El cruce de la línea media ocurre en torno al día P2-3; a P6 comienza la invasión exuberante de la PC contralateral y a P12-14 ocurre un refinamiento de la conectividad formándose el circuito maduro. Tomado de Chun-Lei Wang et al, 2007.

Las estructuras de la línea media son básicas para la guía inicial de los axones callosos a través de la misma. Está compuesta de poblaciones gliales y algunas neuronales. En ratones, estas estructuras ya están presentes a E15. Las estructuras gliales son cuatro: la cuña glial (GW), la circunvolución supracallosa (IG), la glia en cremallera de la línea media (MZ) y el cabestrillo glial (GS) (Silver, Lorenz, Wahlsten, & Coughlin, 1982). La MZ es fundamental para la fusión de los dos hemisferios, lo cual facilitará que los axones puedan cruzar la línea media. El resto de estructuras promueven el cruce de la línea media de, al menos, los axones callosos y facilitan que encuentren la trayectoria gracias a la secreción y/o expresión de moléculas guía (Nishikimi et al., 2013; Shu & Richards, 2001; Silver, Edwards, & Levitt, 1993). Además de estas, se han descrito otras poblaciones implicadas en la guía axonal, como las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas que existen transitoriamente en la línea media, capaces de atraer a los axones callosos, y las meninges que prevendrían la formación prematura del CC (Choe, Siegenthaler, & Pleasure, 2012; Niquille et al., 2009).

Las neuronas pioneras poseen un papel principal en la génesis del CC. Son neuronas con morfología piramidal situadas en las láminas más profundas de la corteza cingulada (Koester & O'Leary, 1994). Sus axones, a E15.5 en ratones, cruzan la línea media gracias a la interacción con diversas moléculas y estructuras, incluida la línea media, y entran en la corteza contralateral. Piper et al, describieron el mecanismo molecular por el que los axones pioneros se guían durante el desarrollo. Demostraron que la *Npn1* se expresa en las neuronas pioneras del cingulado y juega un papel esencial para el cruce de la línea media a través de interacciones con distintas Sema de clase 3 expresadas a lo largo de la trayectoria del CC (Nishikimi et al., 2013; Piper et al., 2009). Las neuronas pioneras

forman el camino para que posteriormente, a partir de E16.5, los axones de las primeras NP callosas procedentes de la lámina V y los subsiguientes de las NP de las láminas II-III, los sigan y así puedan encontrar su trayectoria. Una hipótesis aceptada es que los axones “seguidores” utilizan interacciones directas con los pioneros para encontrar el camino correcto, aunque no se conoce todavía el mecanismo de tal interacción (deAzevedo, Hedin-Pereira, & Lent, 1997; Koester & O’Leary, 1994; Rash & Richards, 2001).

Gracias a experimentos de electroporación *in-utero* se conoce la dinámica de formación del CC en la zona SS de ratón, la cual varía ligeramente a lo largo del eje antero-posterior (Figura 10C) (Wang et al., 2007). Aproximadamente a P2 es posible identificar el tracto axonal cruzando la línea media. A P5 encontramos los axones callosos por debajo de la materia gris de la corteza SS contralateral. Posteriormente comienza la invasión de la PC contralateral (P6) y se genera una exuberante inervación de la misma en la zona homotípica (P8-P9). Finalmente, gracias a procesos de selección guiados principalmente por la actividad neuronal, se refinarán estas conexiones de forma que solo se mantengan aquellas necesarias para el circuito neuronal. Aproximadamente a P12 se puede observar el patrón de conectividad maduro que se mantendrá a lo largo de la vida del individuo (Figura 10C) (Wang et al., 2007).

Todo este proceso de crecimiento es posible entre otros factores, como ya hemos comentado, gracias a las moléculas solubles que los axones van encontrando en el medio. A continuación revisamos los más conocidos.

Las neuronas callosas van a proyectar sus axones ventralmente hacia la zona intermedia del prosencefalo posiblemente bajo la influencia de Sema3A que repele a los axones de la zona marginal; y luego lateralmente hacia la línea media donde se encuentra con la GW y el IG, siendo aquí donde los axones callosos se diferencian de los que proyectarán subcorticalmente. *Sema3C* se expresa en neuronas glutamatérgicas presentes en la línea media cortical; y ensayos de explantes del prosencefalo han demostrado que estos tejidos (línea media cortical) pueden atraer a los axones del CC. Ensayos *in-vitro* también se han usado para demostrar que los axones del CC son atraídos por una fuente ectópica de Sema3C, y que este efecto es mediado por su receptor, Npn1 (Niquille et al., 2009). La familia de *Slits* también ha sido implicada en la guía de axones callosos a través de la línea media. Mediante ensayos *in-vitro* se ha demostrado que Slit2 repele axones procedentes de explantes corticales (Bagri et al., 2002). Análisis de ratones mutantes para estas moléculas han revelado o una reducción severa o completa del CC con grandes haces de fibras nerviosas ectópicas similares a los haces de Probst acumulándose en ambos lados de la línea media (Lopez-Bendito et al., 2007). Otro par de moléculas relevantes, aunque con un mecanismo menos conocido, son Netrin1 y Dcc. Tanto los ratones mutantes para *Netrin1* y *Dcc* son acallosos (Fazeli et al., 1997; Serafini et al., 1996). Tras cruzar la línea media, los axones giran dorsalmente y migran hacia su diana en el hemisferio contralateral. Una vez que los axones deciden donde van a inervar, probablemente gracias al reconocimiento de moléculas específicas, usarán fibras de la glia radial para crecer dorsalmente hacia la PC donde ocurrirá su inervación final gracias a mecanismos dependientes de actividad.

5. Relevancia clínica de la conectividad inter-hemisférica.

La agénesis del CC es un defecto de nacimiento que ocurre en más de 50 síndromes congénitos humanos. Las malformaciones del CC se pueden manifestar como agénesis parcial o total, e hipoplasia. Algunos individuos con agénesis del CC tienen coeficientes intelectuales normales; no obstante, muchos de estos individuos son susceptibles a problemas comportamentales y neuropsiquiátricos y, por lo tanto, a dificultades de aprendizaje, desórdenes del sueño, de comunicación y déficits de atención visual-espacial (Ebert & Greenberg, 2013; Paul et al., 2007; Pescosolido, Yang, Sabbagh, & Morrow, 2012; Richards et al., 2004; Rubenstein, 2010).

Como he intentado reflejar en esta introducción, existen múltiples componentes involucrados en la formación del CC y que, en consecuencia, su disfunción es potencial diana para la malformación de este tracto y, por ende, de la conectividad entre los dos hemisferios, con las implicaciones que esto conlleva. Muchos de ellos ya han sido descritos: desde diversos factores solubles y receptores, como Slit, Robo, Netrin y Dcc; pasando por FT, Satb2 (Alcamo et al., 2008; Baranek et al., 2012; Lopez-Bendito et al., 2007; Ren, Zhang, Plachez, Mori, & Richards, 2007; Serafini et al., 1996; Shu, Sundaresan, McCarthy, & Richards, 2003). Sin embargo, debido a las lagunas todavía existentes sobre la formación de este tracto y el establecimiento y refinamiento de las conexiones axonales, ignoramos la participación que muchos otros mecanismos y sus efectores, tales como los canales iónicos y la actividad, puedan tener en enfermedades en que la conectividad entre los dos hemisferios está afectada. No obstante se está realizando un gran esfuerzo en este sentido.

La disgénesis del CC es una de las pocas características patológicas que correlacionan con desórdenes de espectro autista (DEA) (Fame et al., 2011; Vidal et al., 2006). Estos pacientes tienen un defecto en conectividad a larga distancia, mientras que los circuitos locales no parecen estar afectados. Modelos de ratón del síndrome de frágil X (SFX) han demostrado que los circuitos neuronales en estos animales están hiper-excitados en ciertos estados cerebrales durante el periodo de desarrollo crítico para la plasticidad dependiente de experiencia, así como que poseen una dinámica de estabilización de espinas dendríticas retrasada (Cruz-Martin, Crespo, & Portera-Cailliau, 2010; Goncalves, Anstey, Golshani, & Portera-Cailliau, 2013).

La mutación de canales iónicos, así como la alteración de su expresión se han visto relacionados con numerosos desórdenes neurológicos, incluyendo algunas formas de epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, DEA y otras neuropatías (Escayg et al., 2000; Fujiwara et al., 2003; Splawski et al., 2004; Vucic & Kiernan, 2006; Vucic, Krishnan, & Kiernan, 2007). De la misma forma, y relacionado con lo anterior, el SIA se ha visto alterado en modelos del síndrome de Angelman (Kaphzan, Buffington, Jung, Rasband, & Klann, 2011).

Existen múltiples evidencias de distintos factores relacionados con la malformación y disfunción del CC, y de enfermedades en que la conectividad a través del CC se ve afectada. El gran reto que tenemos consiste en entender como estos factores se relacionan entre si y condicionan los distintos procesos.

Objetivos.

Previo a mi incorporación al laboratorio de la Doctora Marta Nieto, este se encontraba liderando el conocimiento del papel de los FT Cux1 y Cux2 en la corteza cerebral. Estudios previos describieron la localización de dichos FT dentro de la corteza cerebral, otorgando a las neuronas de las láminas II-III y IV identidad de lámina (Nieto et al., 2004), y posteriormente, la relevancia de Cux1 y Cux2 en la ramificación dendrítica, morfología de las espinas dendríticas y sinapsis de las neuronas en que se expresaban (Cubelos et al., 2010); así como otras funciones en precursores e interneuronas corticales (Cubelos et al., 2008a; Cubelos et al., 2008b). Los estudios referentes a la modulación dendrítica y de la espina evidenciaban un posible papel de Cux1 y Cux2 en la regulación de la plasticidad intrínseca y/o la excitabilidad neuronal. Entre las múltiples funciones relacionados con estos aspectos, y dado que los axones de las neuronas que expresan *Cux1* y *Cux2* forman la mayor parte del CC, nos intrigaba el papel que pudieran estar teniendo (si alguno) en el desarrollo axonal y el establecimiento de la conectividad entre los dos hemisferios. Por estas razones se plantearon los siguientes objetivos para el desarrollo de mi tesis doctoral:

1. Estudiar la posible inter-relación de *Cux1* y *Cux2* con procesos de actividad neuronal: tanto la forma en que la actividad regula su expresión, como la influencia de su expresión en la actividad neuronal.
2. Estudiar los mecanismos transcripcionales de respuesta a la actividad neuronal.
3. Investigar si Cux1 y Cux2 regulan la plasticidad intrínseca, las propiedades eléctricas y el disparo de las neuronas de la lámina II-III.
4. Estudiar el papel de los factores de transcripción Cux1 y Cux2 en el desarrollo axonal y establecimiento del cuerpo caloso, así como la dependencia de este proceso en la actividad intrínseca.
5. Establecer los mecanismos moleculares que subyacen al control de la excitabilidad y la regulación axonal mediados por Cux1 y Cux2.

Materiales y métodos.

1. Mantenimiento de las distintas cepas de ratones.

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de los animales del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid, España) conforme a la legislación Nacional y Europea.

El modelo animal empleado en esta tesis fue el ratón. Concretamente empleamos ratones silvestres (WT) de la cepa C57BL6 procedentes de Harlan Laboratories, Inc. (Indianápolis, US) y ratones modificados genéticamente que no expresan los genes *Cux1* (Luong et al., 2002) o *Cux2* (Cubelos et al., 2008a), ambos casos en un fondo genético C57BL6.

Las colonias de ratones se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid, España) en un ambiente de temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y con suministro constante de agua y comida.

2. Genotipado de ratones. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el correcto establecimiento del genotipo de los animales usados en los diferentes experimentos, así como para el mantenimiento de la colonia, usamos la técnica de PCR con sus ADN genómicos.

El ADN genómico se obtiene a partir de un trozo de cola del animal digerido con proteinasa K (Roche, Indianápolis, IN) por el método estándar de precipitación con isopropanol (Laird et al., 1991). Cada reacción de PCR se desarrolla en las siguientes condiciones: *MgCl₂* 0,8 mM, 0,1 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTP) (Roche, Indianápolis, IN), cebadores 0,15 μ M, betaina 0,5 M (Sigma-Aldrich; St Louis, Missouri, EEUU) y 1 unidad de taq polimerasa (Biotools B&M, S.A., Madrid, España). Para la determinación del genotipo se usaron los siguientes cebadores (Sigma-Aldrich; St Louis, Missouri):

1. *Cux1*:

a) Alelo KO.

- Left 5'-CAGGGTTTTATTTGGGGGCTTT-3'
- Right 5'-GCATCGCCTTCTATCCGCCTTC-3'

b) Alelo WT.

- Left 5'-CAGGGTTTTATTTGGGGGCTTT-3'
- Right 5'-AAGTTCCTCGATGGTTTTT-3'

2. *Cux2*:

a) Alelo KO

- Left 5'- CCTACTTTCTGCCTGCCTTG -3'

- Right 5'- GATGCCCTCTTCTGGTGTGT -3'
- b) Alelo WT
 - Left 5'-ACCTAAAGACGCCCCCTAGA-3'
 - Right 5'-CAGTGGCCAGGTAGCCTTTA-3'

Los programas de amplificación para cada gen fueron los siguientes:

1. *Cux1* (alelo KO):

- a) 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min.
- b) 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, anillamiento a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min.
- c) 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

2. *Cux1* (alelo WT):

- a) 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min.
- b) 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 seg, anillamiento a 58°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min.
- c) 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

3. *Cux2* (alelo KO):

- a) 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min.
- b) 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, anillamiento a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1min.
- c) 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

4. *Cux2* (alelo WT):

- a) 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min.
- b) 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, anillamiento a 60°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1min.
- c) 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

Los resultados se visualizan en un gel analítico al 1% de agarosa (Euroclone S.p.A., Siziano, PV, Italia) empleando SYBR Safe (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA).

3. Cultivos primarios, transfecciones, ensayos y medios de cultivo.

3.1. Cultivo primario de neuronas corticales.

Las ratonas de 17,5 días de gestación son sacrificadas por dislocación cervical. Los embriones se extraen y se disecciona la corteza cerebral en tampón fosfato salino (conocido por sus siglas en inglés PBS: 137 mM $NaCl$, 10 mM fosfato, 2.7 mM KCl y un pH de 7.4). Una vez las cortezas de todos los embriones han sido diseccionadas se trocean lo más pequeño posible y se las diluye en EBSS (conocido por sus siglas en inglés Earle's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) 0,8% $MgSO_4$ 3,8% (v/v), 0,25 $\mu g/ml$ tripsina (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO). Tras una incubación durante 15 min a 37°C y posterior disgregación mecánica por pipeteo suave, se para la reacción añadiéndole al medio inhibidor de tripsina y las células se centrifugan durante 10 min a 950 revoluciones por minuto (rpm). El precipitado se re-suspende en 2 ml de medio de disgregación (EBSS, 0,08 mg/ml DNAsa, 0,26 mg/l inhibidor de tripsina (SBTI, Sigma-Aldrich, ST Louis, MO), 0,01% (v/v) $MgSO_4$ 3,8%) y se somete a varias rondas de disgregación mecánica con pipetas Pasteur de distinto diámetro (grueso, medio, fino). Se transfiere el tejido disgregado a un tubo con 40 ml de buffer EBSS, 0,8% $MgSO_4$ 3,8% (v/v) para lavarlo y se centrifuga 10 min a 950 rpm. Se elimina el sobrenadante y se re-suspende el precipitado en 2 ml de medio de cultivo: neurobasal con rojo fenol (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con glutamax (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomicina 100 u/ml / 100 $\mu g/ml$ (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), y complemento B27 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se someten a un último paso de disgregación mecánica con pipetas Pasteur finas y, tras contarlas, se siembran en medio de cultivo, en cubreobjetos redondos de cristal tratados previamente con poli-D-lisina 10 μM (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO) en placas de 24 pocillos a una densidad de 800.000 células por cubre. Los cultivos se mantenían a 37°C y 5% CO_2 y se les añadía medio de cultivo cada 3 días.

En el caso de los cultivos primarios de neuronas *Cux1*^{-/-}, debido a la letalidad embrionaria de los animales KO, era necesario hacer el cruce de parentales heterocigotos. Por esta razón, el cultivo primario no podía hacerse de la totalidad de los embriones sino de cada uno de ellos por separado para así, tras el posterior genotipado de cada embrión, saber el genotipo de cada cultivo individualizado. Para la realización de cultivos individualizados de embrión, la metodología era idéntica, con la única excepción de que las cantidades estaban adecuadas. De esta forma, para cada embrión, el volumen de tripsinización era de 1,5 ml; el de disgregación era en 1 ml; y el de lavado de 5 ml.

3.2. Transfección de cultivos primarios neuronales.

En el día *in-vitro* de interés (al menos 24 horas tras el cultivo primario para darle tiempo a las neuronas a pegarse) se procedió a hacer la transfección con los plásmidos correspondientes. Por cada pocillo a transfectar se prepara: una dilución de 50 μl de medio optiMEM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) con 1-2 μg del ADN a transfectar; y una dilución de 50 μl de medio optiMEM con 10 μl de lipofectamina 2000 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) (la cual se ha mantenido a 37°C previo a la dilución). Tras una corta incubación por separado a T° ambiente de 5 min, se añade

el medio con la lipofectamina sobre el que contiene el ADN, se agita suavemente y se deja incubar 20-30 min a T° ambiente (medio de transfección). Se lavan los pocillos con neuronas a transfectar con medio neurobasal sin ningún complemento ni antibiótico y se dejan con 100 μ l de medio sobre los que añadiremos homogéneamente un volumen de 100 μ l de medio de transfección. Se mantienen las placas con esta última mezcla durante 4-5 horas en el incubador a 37°C, 5% CO_2 para luego añadirles 1 ml de medio de cultivo. Al día siguiente se cambia el medio de cultivo por medio fresco y se mantienen en el incubador hasta el estadio necesario.

3.3. Ensayos de luciferasa.

Los ensayos de luciferasa nos permiten medir la capacidad de inducción de la transcripción de una determinada secuencia génica al clonarla por encima del promotor de la proteína luciferasa y medir la señal que esta genera en las distintas condiciones a analizar. Neuronas de 8 DIV procedentes de cultivos corticales primarios de ratón eran co-transfectadas con el correspondiente constructo reportero de luciferasa y con un control interno de luciferasa bajo el promotor de renilla en una proporción 4:1. Tras la inducción de actividad neuronal con Bic 4AP, se medía la actividad de luciferasa y renilla con el sistema dual de ensayos reporteros de luciferasa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La expresión relativa de cada constructo reportero fue determinada a 10DIV normalizando la actividad reportera a aquella presente en neuronas tratadas con TTX.

3.4. Inducción de despolarización de neuronas corticales en cultivos primarios.

A 11 DIV se cambia el medio de cultivo de las neuronas por medio de cultivo con 2 μ M TTX (tetradotoxina) de forma que se inhiban los canales de Na^+ y, por lo tanto el disparo neuronal. Se mantiene en este medio 12 horas y a continuación se lavan los pocillos con las neuronas con medio de cultivo para, posteriormente, añadirles 200 μ l de medio de despolarización (100 μ M 4-amino-piridina; 1 μ M estrignina; 100 μ M glicina; 30 μ M bicuculina) e incubarlas en este medio durante 5 horas induciendo de esta forma una fuerte despolarización neuronal. Tras este último paso se procede al experimento que se desee realizar.

4. CONSTRUCCIONES DE ADN.

A continuación cito los plásmidos empleados en esta tesis y los insertos clonados en ellos:

4.1. SARE*Cux1* /SARE*Cux2*Luc.

Se clonaron (Promega) en el vector de luciferasa pGL4.23 las secuencias correspondientes a las regiones SARE de los genes:

1. *Cux1*:

CTGGCCGAATCTGGCTGCCTGGCGTCCTGTGAGTTAATTATA
GCTCTGTAAACAGAGCAGGGAACAGGGAACACTTGCAGTGAC

GGAGAT

2. *Cux2*:

TTAAATAAAGCTGTCACGACTCTTCCATCAGGAGGGATGGGC
 TCCAAACATGAGAGTTTCCAGAGCCGTGACTATAACAGGAGT
 GGAAATTTATCCCTTCTAATTATGTAATTGCATAATTTTAGG
 TAGCATTGGAAATTATGTAA

El objetivo de estos plásmidos era el estudio de la capacidad de inducción de transcripción en respuesta a actividad que dichas secuencias tienen sobre un promotor control de luciferasa.

4.2. SARE*ArcLuc*.

Plásmido pGL4.11-SARE-*ArcMin-luc* cedido por el laboratorio del Doctor Haruhijo Bito (Tokyo University, Japan) (Kawashima et al., 2009). Contiene el gen de la luciferasa clonada bajo el promotor del gen *Arc* con la correspondiente región SARE.

4.3. Plásmido pCAG GS.

El promotor de este plásmido se caracteriza por su alta expresión en las células neuronales. En él se clonaron los insertos *GFP*, *Cux1*, *Cux2* y *Kir2.1*. El plásmido *CAGKir2.1* fue cedido por el Doctor Y. Tagwa (Kyoto University, Japan) (Mizuno, Hirano, & Tagawa, 2010).

4.4. Vector lentiviral ARN de horquillado corto (ARNhc).

Este tipo de construcciones se emplean para silenciar genes y son un método muy eficaz. Se unen a los ARNm de los genes diana y, o bien lo destruyen, o reprimen su traducción; además, el efecto se mantiene durante largo tiempo en la célula ya que su tasa de degradación y reemplazo es muy lenta. En nuestro caso, todas las construcciones fueron encargadas a una casa comercial (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO). Los genes silenciados con estas construcciones fueron *Cux1* y *Cux2*. Las secuencias de la horquilla correspondiente fueron:

1. *Cux1*:

CCGGGCAGCTCAAGCACAAACATCTCGAGATGTTGTGCTTGAT
 GAGCTGCTTTTTG;
 CCGGGCCCTCAGCATCCAAGAATTACTCGAGTAATTCTTGGA
 TGCTGAGGGCTTTTTG;
 CCGGGCCAAGAATAGCACACTCAAACCTCGAGAACTTTCCTGT
 AGAAGCCAGGTTTTTG

2. *Cux2*:

CCGGCCGTTTACGTTTATTGTACTCGAGTACAACAATAAACG
TAAACGGTTTTTTG;
CCGGGCTGACTATGAAGAGATTAAACTCGAGTTTAATCTCTTC
ATAGTCAGCTTTTTG;
CCGGCAATCCAGACTGTCCTTCATTCTCGAGAATGAAGGACAG
TCTGGATTGTTTTTTG;
CCGGCCGTTTACGTTTATTGTTGTACTCGAGTACAACAATAAA
CGTAAACGGTTTTTTG

4.5. Plásmido pEYFP K_v 1,2HA.

Plásmido cedido por el laboratorio de la Doctora Chen Gu (The Ohio State University, USA) (Gu & Gu, 2011). Contiene el canal K_v 1,2 clonado en el interior del plásmido pEYFP-C1.

4.6. Plásmido pEGFP K_v 1,3.

Plásmido cedido por el laboratorio de la Doctora M.T. Pérez-García (Universidad de Valladolid, España) (Cidad et al., 2012). Contiene el canal K_v 1,3 clonado en el plásmido pAcGFP1-N3.

4.7. Plásmido ChR2-YFP- Na_v II – III.

Cola citoplasmática de los canales Na_v II – III fusionada a la proteína EYFP del vector pLenti-Synapsin-HChR2(H134R)-EYFP-WPRE. Esta proteína localiza en el SIA compitiendo con canales Na_v endógenos. Fue adquirida de addgene, donde está depositada por el Doctor J. Burrone (Grubb & Burrone, 2010c).

5. Amplificación y purificación de los plásmidos.

Para la amplificación de las construcciones de ADN se crecieron bacterias DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA), previamente transformadas, en medio de *Luria Broth* (LB) líquido a 37°C durante 12 horas. La extracción del ADN de las bacterias para su posterior uso se realizó mediante el sistema de purificación de plásmidos *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad del plásmido se comprobaba posteriormente mediante digestión del plásmido con las enzimas de restricción correspondientes y análisis del patrón de bandas en un gel analítico al 1% agarosa.

6. Técnicas de inmunofluorescencia e histología.

6.1. Tinción de células.

Los cultivos neuronales primarios son cultivados en placas de 24 pocillos en los que previamente se han depositado cubreobjetos circulares estériles tratados con poli-D-lisina (poli-D-Lys). Una vez que las células se tratan como corresponde a cada experimento se fijan con paraformaldehído al 4% (PAF, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) en 3% sucrosa, 60 mM PIPES (piperacina-N,N'-bis ácido 2-etanosulfónico), 25 mM HEPES (4-(2-hidroxiethyl)-ácido 1-piperacineetanosulfónico), 5 mM EGTA (ácido aminopolicarboxílico), 1 mM $MgCl_2$; pH 7,4 en agua durante 20 min a T° ambiente. A continuación se lavan durante tres ciclos de 10 minutos con PBS.

Las neuronas se permeabilizan con PBS-Triton X-100 0,25% durante 5 min a T° ambiente, a continuación se bloquean con FBS (suero fetal bovino) 3% y finalmente se incuban durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU) al 0,1% en PBS (PBST). Se realizan tres lavados con PBS y se incuban las células con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora. Se lavan de nuevo las células tres veces en PBS y se tiñen los núcleos con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR) a una concentración 0,1 mg/ml. Los cubreobjetos con las neuronas teñidas se montan en *Aqua Poly/Mount* (Polysciences, Inc. Warrington, PA) para finalmente analizarlos y fotografiarlos en un microscopio confocal TCS-SP5; Leica DMI 6000B.

6.2. Tinción de tejido.

Los ratones a los estadios de desarrollo oportunos son perfundidos intra-pericardialmente con PAF 4% en PBS, post-fijados en la misma solución durante 24 horas y crio-protegidos en sacarosa al 30% en PBS. Con el criostato se realizan secciones sagitales o coronales de 50 μm , y coronales de 10 μm en portas 76x26 mm (Menzel Gläser, Braunschweig) y *Superflost plus microscope slides* (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) respectivamente. Las inmuno-fluorescencias para la visualización de GFP se realizan de la siguiente forma: las secciones flotantes se incuban toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en PBST 0,5% FBS 5%; tras 3 lavados en PBS se añade el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBST 0,5% FBS 3%; finalmente se realiza una tinción nuclear con TO-PRO y se montan las muestras con medio de montaje *Aqua-polymount* previo lavado con PBS. Para la visualización de anquirinaG usamos cortes adherentes a los cuales les sometemos a una etapa, previa a la tinción, de hervido en citrato pH6,10 mM durante 1 min a 110°C en una olla a presión (Biocare Medical, Pike Lane Concord, USA); posteriormente se permeabilizan las muestras con PBST 0,1% durante 3 lavados de 10 min, se bloquean 1 hora con PBST 0,1%, 5% FBS a T° ambiente e incubaban O/N a 4°C con el anticuerpo primario oportuno; finalmente se lavan 3 ciclos de 10 minutos en PBS, incuban 1 hora en anticuerpo secundario, otros lavados con PBS, tinción de núcleos con DAPI y montaje en *Aqua Poly/Mount* para analizarlas y realizar fotografías en el microscopio confocal.

Las fotografías para la visualización de la inervación axonal consistían en un tilescan (fotografía en mosaico) realizando 9 fotografías del plano z de la sección de interés de las que posteriormente

se realizaba la proyección máxima. Para el SIA se realizaban fotografías cada μm de la región de interés analizándose en cada caso la fotografía o el conjunto de ellas apropiado. En ambos casos se usó un radiante TCS-SP5 (Leica) con un sistema de escaneado laser en un microscopio Zeiss Axiovert 200 y el software Lasaf v1.8 de Leica. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo empleando el software “*Laser Pix*” (Bio-Rad, Richmond, CA).

7. Anticuerpos.

1. Primarios:

- a) Anti-GFP. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra GFP. Molecular Probes (Eugene, OR). Dilución 1:500.
- b) Anti-AnquirinaG. Monoclonal de ratón dirigido contra la anquirinaG. NeuroMab (University of California). Dilución 1:3000 en tejido; 1:500 en cultivos.
- c) Anti-Caspasa 3. Policlonal de conejo dirigido contra la caspasa 3. Cell Signaling Tech Inc. (Danvers, MA). Dilución 1:500.

2. Secundarios:

- a) Anti-conejo Alexa 488. Anticuerpo policlonal de burro. Molecular probes (Eugene, OR). Dilución 1:1000.
- b) Anti-conejo Alexa 594. Anticuerpo policlonal de burro. Molecular probes (Eugene, OR). Dilución 1:1000.
- c) Anti-ratón Alexa 594. Anticuerpo policlonal de burro. Molecular probes (Eugene, OR). Dilución 1:1000.

8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

La extracción y purificación del ARN se realizó usando el kit RNeasy® Mini (Qiagen, Izasa SA, España) según el protocolo del fabricante. El ARN se obtuvo a partir de cultivos neuronales primarios de 10 DIV previamente tratados según el correspondiente protocolo. La concentración y la pureza del ARN obtenido se cuantifica empleando un espectrofotómetro modelo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, E.E.U.U).

Se retro-transcribió 1 μg de ARN de cada muestra para obtener ADNc de cadena simple. La mezcla de reacción de la retro-transcripción incluye tampón comercial (Roche, Indianápolis, IN) con una concentración de MgCl_2 5mM, una concentración de 1 mM cada dNTPs (Roche, Indianápolis, IN), RNAsin (Promega, Madison, WI, EEUU), cebadores aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 5 Unidades de transcriptasa inversa del virus de la leucemia del ratón (M-Mulv del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*) (Roche, Indianápolis, IN).

Una vez obtenido el ADNc se usa el reactivo comercial SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.E.U.U) para detectar los niveles de expresión de los genes de interés (Tabla

1). El *SYBR Green*, de forma similar al bromuro de etidio, se une específicamente al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, el reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN dándonos una medida cuantitativa de dicha concentración. La reacción de 20 μl de volumen total contenía: 5 μl de ADNc diluido en función de su cantidad en la muestra, 10 μl de la mezcla de PCR *SYBR Green*, 250 nM de cada par de oligos (Tabla 1) y 4 μl de agua destilada. Los niveles de expresión de los genes analizados se normalizan con la amplificación paralela del gen constitutivo *GAPDH* (*gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa*) y β -actina. El protocolo de amplificación consiste en un paso de 10 minutos a 95°C (activación de la Taq polimerasa) seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C (desnaturalización y anillamiento-extensión). La señal fluorescente se adquiere durante la fase de anillamiento por el sistema de detección del modelo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.E.U.U). En el caso de *Kcna2* y *Kcna3*, debido a su baja expresión en las muestras, se usaron cebadores TACMAN (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo experimental de ensayos de expresión genética de TaqMan.

Gen	Secuencia "sentido"	Secuencia "anti-sentido"
Robo 1	GACCTGATCGTCTCCAAAGGA	TTGTCGGTCTCCACTCTTTC
Robo 2	TGATGGATCTCGTCTTCGTCA	GTCGGCCCTCTGCTTACAG
Cux 1	GGGGCTTTTTATCTGCCATC	CCCCCTCCTGGTTAAGAAG
Cux 2	CTGTCCTTCATTGCACAACC	TTCGGAGGTGGACTTGA AAC
Atf3	TCCTGGGTCACTGGTATTTG	ATGGCGAATCTCAGCTCTTC
Impdh 2	CTCCAAAGATGCCAAGAAGC	TGGGAAGAGTCCAAAACCAC
Npas 4	ACCTGAGCAAGGATTTGGTG	TTGGTGCAGCTGTTCTTGG
Klf6	CACCCACGACCAAATTTACC	TGGAAATGACGGAGGA ACTC
Homer 1-S	GAAAGCTTTACCACAGGCCTAC	TCAATGCTAACAGGCTCGTG
Arc	TGTTGACCGAAGTGCCAAG	AAAGACAGGCCTTGATGGAC
Lmo 4	ACATTGGCACGTCCTGTTAC	TCACTTG CAGGAATCGACTG
Plxn A4	TGAGGACAACCCCAAGTGTTA	ACGCGATCAGCCTGTTTTCT
β -actina	GGCTGTATCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Kcna 1	AGGCTCAGTTGCTCCATGTT	TCAGCTGTGGTGCAGTTACC
Scn 8a	CACCATCCTGACCAACTGTG	TAACCAAGTTCCACGGGTCTC
Cacna 1c	ACATCTTCGTGGGTTTCGTC	TGTTGAGCAGGATGAGAACG
Gadph	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTT	TGACGTGCCGCTGGAGAAA

Tabla 1: *Secuencias de las parejas de oligonucleótidos empleados para la amplificación del ADNc del gen indicado.*

9. Electroporación *in-utero* de precursores de neuronas corticales.

La electroporación *in-utero* que se realizó consiste en la introducción de ADN en la ZV de los embriones para posteriormente someterlos a un pulso eléctrico y que el ADN sea incorporado por los precursores existentes en ese momento en el telencéfalo. La electroporación es posible gracias a la carga negativa del ADN, que posibilita que el plásmido inyectado se mueva hacia el ánodo cuando se expone a un campo eléctrico. Los distintos plásmidos se electroporaron *in utero* a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ junto con una solución del pigmento *Fast Green* 0,1 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; EEUU). Este pigmento permite visualizar la correcta introducción de la solución

con el plásmido dentro del ventrículo cerebral a través de la pared uterina. Se anestesiaron hembras gestantes de 15,5 días con isofluorano vaporizado; se prepararon para la cirugía mediante rasurado y desinfección de la zona abdominal con yodo y posteriormente se realizó una incisión del tejido epitelial y muscular a lo largo de la línea media del abdomen. A continuación se extrajeron los cuernos uterinos, se colocaron sobre gasas a ambos lados de la apertura abdominal empapadas en medio HBSS suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; EEUU) atemperado previamente a 60°C. Este mismo medio se utilizó para la hidratación continua de los cuernos uterinos. Se inyectó la solución de ADN junto con *Fast Green* 0,1% empleando presión respiratoria con una micropipeta de vidrio en un hemisferio cerebral de cada embrión y se electroporaron aplicando 5 pulsos de 50 ms y 35V con un electroporador ECM 830 (BTX, Holliston, Massachusetts, EEUU). Se suturó la pared abdominal, se grapó la piel y se reanimó a la hembra gestante por aplicación de calor. Dependiendo del experimento se perfundieron embriones a distintos estadios post-natales. En todos los casos se empleó PFA 4% preparado en PBS para la perfusión, se post-fijaron durante 12 horas y se estabilizaron en sacarosa 30%. Los cerebros se procesaron para preservarlos por congelación y posteriormente se realizaron secciones coronales o sagitales de 50 μm con un criostato CM1900 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Finalmente se realizaron distintas inmuno-fluorescencias con estas secciones.

10. Electrofisiología.

La electrofisiología es una técnica que nos permite medir las corrientes iónicas que ocurren dentro de la neurona o en campos neuronales más amplios. Nosotros realizamos registros introduciendo el electrodo dentro del soma neuronal e inyectando distintas cantidades de corriente para así registrar el cambio de voltaje generado por la neurona en respuesta a las inyecciones. Se usaron tanto neuronas cultivadas de DIV 2-21, como neuronas de las láminas II-III de rodajas agudas procedentes de animales a P8 y P16 previamente electroporados *in-utero* con distintos plásmidos de interés, las cuales eran identificadas por la expresión de *GFP*. La solución introducida en la pipeta con la que se pincharon las neuronas (4-7 $\text{M}\Omega$) contenía 115 mM *K - gluconato*, 20 mM *KCl*, 2 mM *MgCl₂*, 10 mM HEPES, 4 mM *Na₂ATP* y 0,3 mM *Na₃GTP*, pH 7,2, 290 mOsm. Durante los registros, los cultivos y rodajas eran perfundidos con fluido cerebroespinal artificial (ACSF), el cual está compuesto de 119 mM *NaCl*, 2,5 mM *KCl*, 1 mM *NaH₂PO₄*, 11 mM glucosa, 26 mM *NaHCO₃*, 1,25 mM *MgCl₂*, y 2,5 mM *CaCl₂*. Los registros se obtuvieron con un amplificador Multiclamp 700 A (Axon Instruments) y los distintos parámetros analizados se obtuvieron con el software pCLAMP Clampfit 10.3 (Molecular Devices). La excitabilidad se mide como el número de PA lanzados por una neurona en respuesta a inyecciones de corriente crecientes (0-400pA, 150/500 μs).

11. Estudios *in-silico* – Análisis genómicos.

La lista con los genes que contienen regiones SARE en su secuencia génica fue obtenida con SynoR (National Center for Biotechnology Information, NCBI, DCODE.org), una herramienta bioinformática que permite la búsqueda de grupos de sitios de unión de FT y su conservación entre distintos organismos (Ovcharenko & Nobrega, 2005). La búsqueda se realizó en el genoma humano (hg18; julio 2007, NCBI 36.1) y se comparó con el genoma de ratón (mm9; julio 2007, NCBI 37). El buscador ECR genera alineamientos del genoma completo usando la información de la

secuencia de los sitios de unión de FT según la base de datos TRANSFAC Professional (Transcription Factor Binding Sites, Biobase). Los sitios de unión de los FT CREB, MEF2 y SRF que se usaron para la búsqueda fueron los siguientes: CREB_01, CREBP1_01, CREBP1CJUN_01, CREB_02, CREB_Q2, CREB_Q4, CREBP1_Q2, CREB_Q3, CREB_Q2_01, CREB_Q4_01, CREBATF_Q6, MEF2_01, MEF2_02, MEF2_03, MEF2_04, MEF2_Q6_01, SRF_01, SRF_Q6, SRF_C, SRF_Q4, SRF_Q5_01, SRF_Q5_02. La máxima distancia permitida entre dos FT contiguos fue de 125 pares de bases, y no se impuso restricción alguna sobre el orden en que debían encontrarse los FT. Para probar la especificidad de los resultados, se realizaron análisis, usando las mismas condiciones, de diversas combinaciones de FT: ZIC2, BRCA y PAX1 tan solo se encontraba identificado en una región genética; ACAAT, Bach1, Lpb1 fue localizado en 50 regiones genéticas diferentes; y el conjunto de sitios de unión de los FT relacionados con el SN EGR1, MEF2, NF-kB resultó encontrarse en 244 regiones. La sustitución de uno de los FT presente en el SARE por otro cualquiera, genera una combinación (MEF2, SRF, ZIC2) presente en 142 regiones genéticas.

La lista de genes con secuencias SARE fue actualizada con la herramienta Toppfun de Toppgene (Centro Médico Hospital de niños de Cincinnati) y manualmente. Un pequeño número de genes no estaban clasificados en el NCBI, pero si en otras bases de datos. Los análisis de categorías OG (Ontología genética) se realizaron con Toppfun.

Las listas genómicas usadas para la comparación con la lista de genes SARE se obtuvieron (Benito, Valor, Jimenez-Minchan, Huber, & Barco, 2011; Bottai et al., 2002) cómo listas procesadas. La lista no procesada de (Liu et al., 2012) se analizó usando Geor2 (NCBI). Las tres listas genéticas se actualizaron usando Toppfun.

12. Análisis estadístico.

Para las comparaciones entre las distintas listas génicas, así como para su manejo se usó el software Microsoft Office Excell 2007.

La probabilidad de coincidencia entre la lista de proteínas dianas de FMRP y la de genes SARE se calculó con una función binomial, considerando el tamaño del genoma humano de 27000 genes, y del transcriptoma del SN de ratón de 12000 transcritos. En primer lugar se calculó la función de densidad que describe la probabilidad de que exista un grupo de genes de determinado tamaño con transcritos en el transcriptoma con la binomial $X=B(n_1 = 827, p=12/27)$. A continuación se obtuvo la función de densidad Y que describe la probabilidad de coincidencia entre ambas listas con una nueva binomial $Y=\sum_{i=0}^{n_1} B(n_2 = 842, p=i/12000) \times X(i)$ (n =número total de dianas de FMRP). Esta distribución de probabilidad generó un valor estadístico p de $4,3909 \times 10^{-13}$ para $Y(70)$ (70 coincidencias). El mismo análisis se usó para calcular la significancia del solapamiento entre las restantes listas genéticas con la de genes con región SARE.

Para la cuantificación de la invasión generada por las neuronas electroporadas se usó el software Fiji (ImageG). Se redondeó la lámina V ipsilateral invadida, así como el área contralateral invadido; se impuso un límite a la señal, considerada inmediatamente superior al ruido, y se midió la cantidad de señal en cada una de las zonas (ipsilateral/contralateral). Se normalizó esta señal con

la procedente de la región electroporada en cada cerebro y posteriormente se compararon considerando los animales control como 100 % de inervación. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media).

La medición de la variación local de intervalos entre PA y de la regularidad de estos dentro del patrón de disparos se hizo usando la variación local descrita por Shinomoto (L_v) (Shinomoto et al., 2003). Se calculó el L_v de entre 9 y 20 neuronas individuales, en cada condición, con igual número de PA. Usamos el parámetro L_v en vez de otras medidas de variabilidad más comunes, como C_v , porque en nuestros experimentos los trenes de PA no eran estacionarios (necesario para calcular el C_v) y tienen el primer ITP menor que los últimos. En este caso, el parámetro L_v compensa la naturaleza no estacionaria del tren de PA.

Se empleó el test t de Student de dos colas para comparar los datos procedentes de los resultados de q-PCR, análisis de la distancia del SIA al soma en cultivos *in-vitro*, la frecuencia del primer ISI y propiedades activas y pasivas de la membrana. Todos estos resultados se representan como la media \pm EEM. La excitabilidad (en términos del número de PA medio lanzado por las neuronas en respuesta a una entrada determinada) fue medida como la pendiente de la recta de regresión ajustada a la relación entre la intensidad de corriente inyectada y el número de PA lanzados por la neurona con cada corriente; y posteriormente comparada con un test F. El porcentaje de neuronas con SIA distal *versus* proximal en cortes de tejido se cuantificó con el software Fiji (ImageG) y posteriormente se analizó en una tabla de contingencia con un test exacto de Fisher. Un nivel de significancia (α) de 0,05 era considerado como significativo. Previo a los análisis paramétricos descritos, se probaba la normalidad de los datos con un test D'Agostino-Pearson. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 5 (GraphPad software).

Resultados.

1. La secuencia SARE forma parte de un mecanismo global de respuesta neuronal a la actividad sináptica.

1.1. Obtención de una lista de genes potencialmente regulados por la región SARE mediante herramientas bio-informáticas.

El gen *Arc* es un marcador de actividad sináptica ampliamente utilizado; no obstante el mecanismo de activación de este gen en respuesta a actividad era desconocido hasta hace poco. La secuencia SARE consiste en aproximadamente 100 pares de bases localizadas 5kb por encima del sitio de inicio de la transcripción del gen *Arc*, con los sitios de unión de los FT SRF, MEF2 y medio sitio de CREB (Kawashima et al., 2009). Ahora se sabe que esta región es suficiente para la inducción de la expresión del gen *Arc* en respuesta a actividad (Kawashima et al., 2009), pero nunca se ha estudiado la implicación que esta secuencia puede tener en la regulación de otros genes y a un nivel general en el SN.

Actualmente gracias a la bio-informática, existen numerosas herramientas en internet que nos facilitan hacer estudios que de otra forma serían demasiado complejos, y aproximaciones sistémicas a problemas biológicos. Nosotros hicimos uso de varios de estos programas para estudiar una posible implicación del SARE en mecanismos de plasticidad, y analizar la relación entre la región reguladora SARE y genes de expresión en el SN. SynoR es un programa informático gratuitamente disponible en el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), que permite la búsqueda de combinaciones de sitios de unión de FT en el genoma (humano, de ratón o de rata) y el análisis de la conservación de esas regiones en otros organismos (Ovcharenko & Nobrega, 2005). De cara a nuestro análisis realizamos la búsqueda, en el genoma humano, de secuencias que contuvieran grupos de las secuencias consenso de unión de los FT CREB, MEF2 y SRF (materiales y métodos) en cualquier orden y nunca más separadas de 125 pb entre dos de ellas (Figura 11A). La lista generada se comparó posteriormente con las correspondientes secuencias en el genoma de ratón para seleccionar exclusivamente las que están conservadas (información depositada en SynoR con el ID: s1219104005847). Identificamos 887 regiones genéticas que potencialmente tienen la secuencia SARE y están conservadas (Tabla suplementaria 1). Estas secuencias se asignaron al gen del que forman parte o al que están más cercano. Se clasificaron en función de su posición en el gen como: intergénicas, intrónicas, utr (regiones no traducidas), cds (cuando estaban dentro de secuencias codificantes) o promotoras (Figura 11B). Con el objetivo de validar esta lista y la capacidad analítica de SynoR, comprobamos manualmente con la herramienta Match de TRANSFAC la presencia de la secuencia SARE en más de diez de los genes identificados por SynoR (no mostrado). Cabe destacar que, debido a las limitaciones de este tipo de análisis el cual descarta la posible evolución que haya podido sufrir la región SARE sin tener un cambio de función, probablemente falten genes con dicha secuencia en la lista genética obtenida; así como que, seguramente algunos de los genes identificados sean falsos positivos.

La clasificación de los genes que poseen la región SARE en base a su posición relativa al gen, muestra que estas secuencias son más abundantes en regiones intergénicas e intrónicas, sitios potenciales para el control de la expresión génica (Figura 11B).

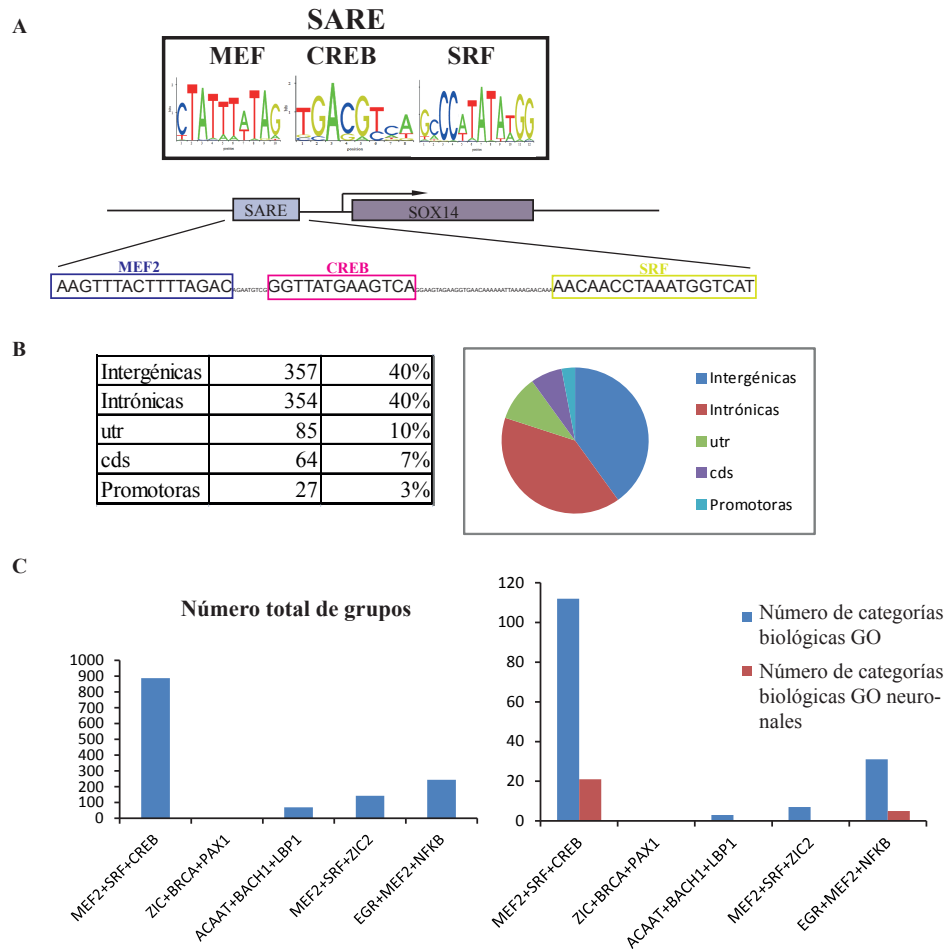


Figura 11: Las secuencias SARE se encuentran en regiones inter-génicas e intrónicas. A) Esquema que muestra la secuencia consenso SARE con los sitios de unión para los FT CREB, MEF2 y SRF y la secuencia SARE encontrada en el promotor del gen SOX14 B) Número total y porcentajes de secuencias SARE clasificadas según su posición dentro del gen (inter-génica, intrónica, utr, cds o promotora). Junto a la tabla, diagrama representativo de la distribución de cada categoría. C) A la izquierda, gráfica indicativa del número de genes con secuencias de unión para el conjunto de FT citados. La combinación al azar de sitios de unión de tres FT aparece en un número significativamente inferior de genes que aquella correspondiente al SARE. A la derecha, gráfica indicativa de las categorías biológicas OG y aquellas relacionadas con procesos neuronales enriquecidas en las listas de genes que presentan las distintas combinaciones de tres sitios de unión de FT al azar indicadas. El enriquecimiento en categorías biológicas en general, y en aquellas relacionadas con procesos neuronales en particular es considerablemente menor en las listas de genes con secuencias de FT al azar que en la lista de genes con SARE.

Un análisis más exhaustivo de nuestra lista genética nos permitió darnos cuenta de la heterogeneidad de mecanismos neuronales que podrían estar regulados en respuesta a actividad a través de la región SARE (Tabla 2). Encontramos distintos genes con conocidas funciones en el SN: algunos

de ellos esenciales en la sinapsis, como *Grin2a*; con funciones en la guía axonal, como *Robo2* y *PlxnA4*; otros previamente descritos como participantes en mecanismos de plasticidad y sinaptogénesis, tales como *Homer1* y *Arc*; en funciones que conciernen a la dinámica celular y compartimentalización como las *anquirinas*; y, quizá más importante que todos los anteriores, otros genes que nunca antes habían sido relacionados con la respuesta a actividad neuronal, mecanismos de plasticidad o mantenimiento estructural de las sinapsis, donde destacan *Cux1* y *Cux2*. Esto era indicativo de la potencialidad de esta lista para la identificación de nuevas dianas en mecanismos relativos al desarrollo y funcionamiento normal en respuesta a actividad neuronal, así como en enfermedades relacionadas con el fallo en plasticidad. La regulación de la expresión de *Cux1* en respuesta a actividad ha sido posteriormente corroborada *in-vivo* por otros autores (Li et al., 2013).

El proyecto “Ontología Génica” (OG) es una iniciativa bio-informática con el objetivo de estandarizar la representación de los genes y sus productos entre especies y bases de datos. Describe los genes y sus proteínas asociadas en cualquier organismo y los clasifica en base a su función molecular, su rol en procesos biológicos y su localización en componentes celulares (www.geneontology.org). El siguiente paso en nuestra investigación consistió en clasificar los genes de nuestra lista en categorías OG gracias a la aplicación Toppfun (de Toppgene, Centro Médico del Hospital de niños de Cincinnati). Comprobamos que la totalidad de genes identificados pueden sub-dividirse en 112 categorías en función de los procesos biológicos OG en que forman parte (Tabla suplementaria 2). 21 de estos 112 procesos biológicos OG enriquecidos (18,75 %) están relacionados directamente con funciones neuronales implicadas en el desarrollo y mantenimiento del SN, mostrando muchas de estas categorías de los mayores enriquecimientos presentes en la lista total (Tabla 3). Otras categorías encontradas se podrían relacionar indirectamente con el SN (por ejemplo, el proceso biológico OG correspondiente a desarrollo celular). Estos datos confirman la relevancia de la regulación a través de la secuencia SARE en el SN.

Con el objetivo de completar el estudio y acotar el tipo de regulación que podría estar ejerciendo la región SARE, dividimos los genes en función de que su potencial regulación por el SARE fuera distal (aquellos con el SARE en regiones intergénicas) o proximal (intragénicas, cds, promotoras y utr) y comprobamos las categorías de procesos biológicos OG que les corresponde a cada uno de los grupos (regulación distal o proximal) (Tabla suplementaria 3). La clasificación en categorías OG de tan solo los genes con regulación distal o regulación proximal muestra un enriquecimiento similar en funciones neuronales, descartando que un tipo de regulación sea más relevante que el otro en el SN y para los mecanismos de plasticidad neuronal.

Finalmente, como control de la relevancia de esta combinación de FT, y de que es indicativa de una función biológica, hicimos búsquedas de regiones resultado de la combinación de los sitios de unión de otros FT al azar, obteniendo un número mucho menor de genes y sin enriquecimiento en funciones biológicas neuronales (Figura 11C). Concluimos por lo tanto que, la región SARE tiene potencialidad de ser un elemento regulador de la transcripción génica en respuesta a actividad relevante a nivel general, y que el análisis de la lista de genes con secuencias SARE nos podría ser de gran utilidad en la búsqueda de nuevos mecanismos implicados en plasticidad neuronal en respuesta a la actividad así como en la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Símbolo genético	Nombre	ID gen humano	Tipo
Sinaptogénesis-plasticidad			
SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	10492	utr
HDAC5	histone deacetylase 5	10014	utr
HOMER1	homer homolog 1 (Drosophila)	9456	promotor
KALRN	kalirin, RhoGEF kinase	8997	utr
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	4684	intrón
NRG1	neuregulin 1	3084	intrón
NRXN1	neurexin 1	9378	intrón
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	6328	utr
SEPT7	septin 7	989	utr
Proteínas del citoesqueleto y sinápticas			
ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	288	utr
CAMK1D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	57118	intrón
MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	5607	intrón
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	3164	intrón
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	9910	intrón
RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	9693	intrón
RAPGEF6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	51735	intrón
RASSF8	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 8	11228	utr
RASGEF1C	RasGEF domain family, member 1C	255426	intrón
RHOQ	ras homolog gene family, member Q	23433	utr
Guía axonal y mantenimiento			
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	51232	intrón
DCC	deleted in colorectal carcinoma	1630	intrón
EPHB1	EPH receptor B1	2047	promotor
NRG1	neuregulin 1	3084	intrón
PLCXD3	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	345557	intrón
PLXNC1	plexin C1	10154	intrón
PLXNA4	plexin A4	91584	intrón
RGMA	RGM domain family, member A	56963	intergénico
ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)	6091	intergénico
SEMA6A	sema domain, TM and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	57556	promotor
Factores de transcripción			
CUX1	cut-like homeobox 1	1523	intrón
CUX2	cut-like homeobox 2	23316	intrón
FOXP1	forkhead box P1	27086	intrón
FOXP2	forkhead box P2	93986	intrón
PAX6	paired box 6	5080	intrón
PHOX2B	paired-like homeobox 2b	8929	utr
RUNX2	runt-related transcription factor 2	860	utr
SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6	55553	intrón
ZIC2	Zic family member 2	7546	utr
ZNF292	zinc finger protein 292	23036	utr

Tabla 2: *La regulación por la región SARE afecta genes de distintos aspectos y funciones neuronales. Ejemplos de genes involucrados en diferentes procesos neuronales, potencialmente regulados por la región SARE en respuesta a actividad.*

OG: Proceso Biológico			
Rango	ID	Nombre	p-valor
2	OG:0030182	Diferenciación neuronal	1,76E-11
4	OG:0048699	Generación neuronal	1,52E-10
5	OG:0022008	Neurogénesis	2,28E-10
9	OG:0048812	Morfogénesis de proyecciones neuronales	2,87E-09
10	OG:0007409	Axogénesis	3,40E-09
13	OG:0048666	Desarrollo neuronal	6,43E-09
16	OG:0031175	Desarrollo de proyecciones neuronales	2,28E-08
28	OG:0007411	Guía axonal	2,75E-07
31	OG:0007417	Desarrollo del sistema nervioso central	3,49E-07
45	OG:0035295	Desarrollo del tubo neural	9,04E-06
58	OG:0045664	Regulación de la diferenciación neuronal	1,27E-04
73	OG:0030900	Desarrollo del lóbulo frontal	1,74E-03
74	OG:0007420	Desarrollo cerebral	1,75E-03
83	OG:0021772	Desarrollo del bulbo olfatorio	5,05E-03
84	OG:0031290	Guía axonal de las RGCs	5,46E-03
87	OG:0021889	Diferenciación interneuronas del bulbo olfatorio	6,39E-03
91	OG:0021988	Desarrollo del lóbulo olfatorio	7,48E-03
96	OG:0007423	Desarrollo de órganos sensoriales	1,29E-02
97	OG:0021537	Desarrollo del telencéfalo	1,30E-02
111	OG:0001654	Desarrollo del ojo	4,50E-02
112	OG:0021891	Desarrollo interneuronas del bulbo olfatorio	4,54E-02

Tabla 3: *Lista de categorías biológicas OG relacionadas con funciones neuronales enriquecidas en nuestra lista de genes SARE. El análisis generó 112 procesos biológicos OG enriquecidos. En la tabla se muestran las 21 categorías relacionadas con el desarrollo del SN y su mantenimiento, enriquecidas en nuestra lista de genes SARE. El rango indica la posición dentro de la lista de las 112 categorías OG tras ordenarlas de mayor a menor enriquecimiento. Encontramos funciones neuronales entre las categorías de mayor enriquecimiento.*

1.2. Validación de la lista de genes regulados por la región SARE con fuentes externas.

Dado que los algoritmos usados en los distintos programas bio-informáticos no siempre se adecúan a la totalidad de los posibles problemas a analizar, quisimos confirmar la capacidad predictiva de nuestra lista para identificar genes regulados positivamente en respuesta a la actividad neuronal. Para ello hicimos uso de varias listas de genes publicadas previamente en que se analiza la expresión génica diferencial en respuesta a la inducción de actividad: una de ellas consiste en los genes cuya expresión era modificada tras la infusión del inhibidor de las neurona inhibitorias gabaérgicas bicuculina en el bulbo olfatorio accesorio *in-vivo* (Upadhyya, Smith, Brennan, Mychalekyj, & Hegde, 2011); en otra se analizaban los genes con expresión modificada en células corticales *in-vitro* tras un tratamiento con bicuculina (Liu et al., 2012); y la última era un estudio similar al anterior pero

realizado en neuronas de hipocampo (Benito et al., 2011). De esta forma pudimos contrastar nuestra lista de genes potencialmente regulados por actividad en todo el SN, con otras listas publicadas fruto de resultados experimentales en varios tipos neuronales específicos. Analizamos los genes solapantes entre las listas de los genes regulados positiva y negativamente en respuesta a actividad de los estudios previamente publicados, y nuestra lista de genes regulados por la secuencia SARE. En los tres casos pudimos observar un elevado enriquecimiento, en nuestra lista genética, de aquellos que eran regulados positivamente tras el tratamiento de inducción de actividad; mientras que no vimos enriquecimiento cuando la comparamos con los genes que eran regulados negativamente tras el tratamiento de inducción de actividad (Tabla 4). Varios de los genes con secuencias SARE, como son *Homer*, *Atf3*, *Klf6* y *Bdnf* eran comunes en dos o 3 de estas listas, mientras que otros solo los encontramos en una de las tres listas. Esto puede estar reflejando el hecho de que algunos genes (los primeros) representan una respuesta que ocurre a nivel global en el SN, mientras que otros (los últimos) podrían corresponder a respuestas específicas de tejido. Estos datos nos permiten validar la capacidad predictiva de nuestro análisis y la calidad de nuestra lista de genes.

Análisis comparativo con estudios previamente publicados			
	SARE-Bic AOP	SARE-Bic Hip	SARE-Bic Ctx
# genes regulados +	(211 genes)	(90 genes)	(229 genes)
Genes regulados +	ATF3	ATF3	ARC
	BDNF	BDNF	ATF3
	CELF2	EDIL3	BDNF
	CLIC4	ERC2	C10orf140
	EIF1	INHBA	FBXO33
	EPB41L1	ISM1	HOMER1
	HDAC5	NKAIN2	IMPDH2
	HDAC9	ODZ1	KCNJ2
	HOMER1	PAX1	KLF6
	INHBA	PPFIA2	MEX3B
	KLF6		NEFL
	LINGO1		NHLH2
	LMO4		NPAS4
	NEMF		NR4A1
	PCDH17		RASGEF1B
	PPM1B		
	RCAN2		
	SMG7		
TSC22D2			
p-valor	4,87E-05	0.00066422	0.003991
# genes regulados -	(36 genes)	(44 genes)	(23 genes)
Genes regulados -	BAHCC1	DOCK5	
	RANBP2	FAM5B	
		SLIT3	
		TRPC7	
p-valor	0.20867	0.042004	0.46753

Tabla 4: *Los genes con secuencia SARE se encuentran enriquecidos en listas de genes regulados positivamente tras la inducción de actividad. Comparación de nuestra lista de genes SARE con otras, previamente publicadas, de genes regulados positiva y negativamente tras la inducción de actividad en el bulbo olfatorio (Bic AOP) (Upadhya et al., 2011), en el hipocampo (Bic Hip) (Benito et al., 2011) o en la corteza cerebral (Bic Ctx) (Liu et al., 2012). Existe un enriquecimiento de genes SARE dentro del grupo de genes regulados positivamente en cualquiera de las listas previamente publicadas, mientras que no en el de regulados negativamente.*

1.3. Validación biológica de la lista de genes regulados por la región SARE.

Realizamos una segunda prueba de la capacidad predictiva de nuestra lista de genes mediante una aproximación inversa. En este caso, elegimos algunos genes de nuestra lista y comprobamos su nivel de expresión tras la activación neuronal (Figura 12A). Para ello hicimos cultivos neuronales de células corticales procedentes de ratones de estadio E17.5. A 16 DIV inducimos actividad neuronal mediante el pre-tratamiento de las neuronas con TTX, que silencia el disparo, y posterior lavado e inducción de actividad mediada por el tratamiento con bicuculina durante 4 horas y media. A continuación extrajimos el ARN de las neuronas en cultivo, generamos su ADNc y analizamos la expresión de doce genes (incluyendo el gen *Arc*) identificados en nuestro análisis, con la región SARE, mediante la técnica de Q-PCR. El aumento en el nivel de expresión del gen *Arc* tras la inducción nos demostró la eficiencia en cuanto a la técnica usada para la activación neuronal; lo cual fue corroborado con los niveles de la isoforma S de *Homer1* (conocida proteína implicada en plasticidad sináptica), que también aumentaron. Comprobamos que otros seis genes de los analizados incrementaban su expresión tras la inducción de actividad. Algunos de ellos (*Atf3*, *Impdh2* y *Npas4*) apoyan los datos obtenidos en chips de expresión de otros investigadores, y otros (*Cux1*, *Cux2* y *PlxnA4*) cuya expresión no había sido previamente relacionada con la actividad neuronal. Cuatro de los genes analizados (*Lmo4*, *Robo1*, *Robo2* y *Klf6*) no mostraron cambios significativos en su expresión tras la inducción de actividad, lo cual podría explicarse por la más que segura existencia de falsos positivos en nuestra lista; pero también cabe la posibilidad de que sea debido a que los cebadores utilizados sean específicos para una de las distintas isoformas que pueden presentar las proteínas en la célula, y que esta no estuviera relacionada con la respuesta a actividad neuronal (mientras que otras isoformas sí que puedan estarlo); o a que determinados genes pueden responder de diferente manera en función del estímulo que genere la respuesta neuronal (unas cascadas de mensajeros pueden llegar a activarlos mientras que otras no) (Figura 12A).

Todo apunta a la validez de nuestra lista de genes; no obstante, para obtener una prueba experimental directa de la relevancia de la secuencia específica SARE, proseguimos con la clonación de la secuencia SARE correspondiente a dos de los genes identificados (*Cux1* y *Cux2*) por encima de un promotor mínimo en un vector con un gen reportero de luciferasa para comprobar su capacidad de activar la expresión de luciferasa en respuesta a actividad neuronal (Figura 12B). Transfectamos cultivos celulares de 8 DIV de neuronas corticales procedentes de ratones de estadio E17.5 con los constructos reporteros. A 10 DIV inducimos actividad neuronal en el cultivo usando bicuculina y medimos la actividad luciferasa de dichas neuronas en comparación con la actividad presente en neuronas control. Los resultados (Figura 12B) reflejan la capacidad de las recién identificadas secuencias SARE de inducir la expresión génica en respuesta a actividad neuronal. Como control positivo transfectamos un reportero de luciferasa con la región SARE del gen *Arc* por encima de su promotor mínimo, y comprobamos que las regiones SARE de *Cux1* y *Cux2* replican la actividad promotora de la secuencia SARE del gen *Arc*; aumentando, en ambos casos, significativamente la transcripción en respuesta a la depolarización neuronal con respecto a las neuronas control (Figura 12B). En conclusión, la lista de genes con regiones SARE nos permite identificar genes y, por extensión, rutas biológicas que están participando en mecanismos regulados por actividad.

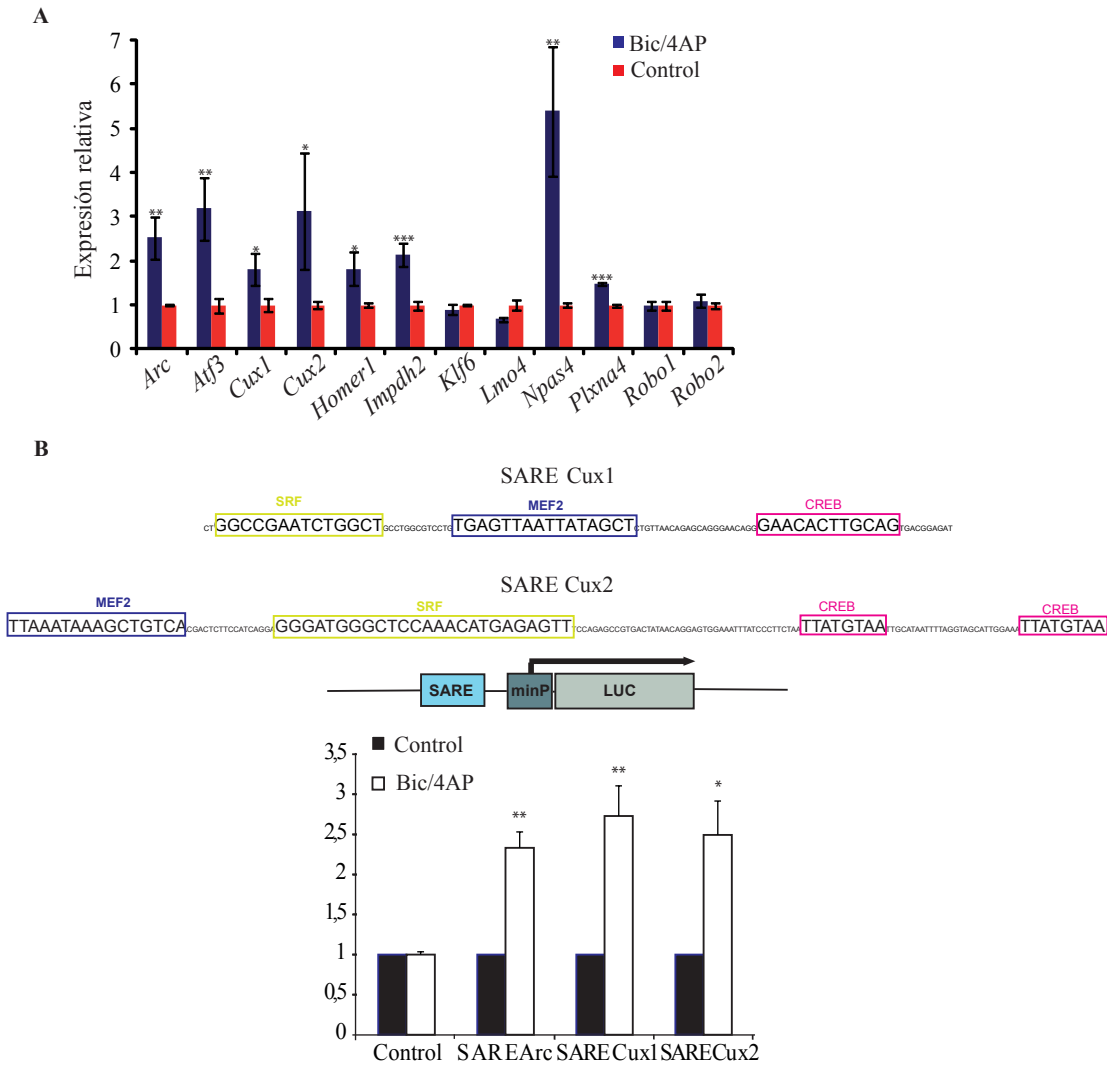


Figura 12: Regulación positiva de los ARNm de los genes que contienen la secuencia SARE y activación de la transcripción por dicha secuencia en respuesta a actividad neuronal. A) Expresión de genes con la región SARE identificados por nuestro análisis in-silico tras la inducción de actividad neuronal en cultivos neuronales primarios. Tras la inducción de actividad neuronal con Bic 4AP en cultivos neuronales de 16DIV se extrajo el ARN y se analizó por q-PCR el nivel de transcripción de los genes indicados en condición control o tras la inducción de actividad. El aumento en la expresión del gen Arc demuestra la eficiente inducción de activación neuronal. La expresión de cada gen está normalizada al valor de expresión de ese gen en las neuronas control. P-valor del test de Student * <0.5; ** <0.1; *** <0.05. B) Las secuencias SARE de dos de los genes identificados en nuestro análisis activan la transcripción en respuesta a actividad neuronal. Las secuencias SARE identificadas en los genes Cux1 y Cux2 fueron clonadas en un vector de luciferasa pGL4.23 (promega). Este constructo fue transfectado en cultivos neuronales para a continuación, tras la inducción de actividad neuronal con Bic 4AP, medir el nivel de transcripción de los genes reporteros. Los datos se representan como media ± EEM de tres experimentos diferentes. P-valor del test de Student * <0.01; ** <0.001.

1.4. Validación de nuestra lista como fuente de potenciales dianas a estudiar en enfermedades neurológicas.

Nuestro análisis por lo tanto, señala mecanismos que pueden participar en procesos dependientes de actividad y, por extensión, sugiere la identificación de genes potencialmente ligados a enfermedades mentales causadas por defectos de plasticidad. Este es el caso de algunos de los genes con secuencias SARE listados, los cuales han sido previamente reportados como candidatos a generar autismo. Entre estos encontramos *NRXN1* y 2 (Feng et al., 2006); *FOXP1* (O’Roak et al., 2011), *FOXP2* (MacDermot et al., 2005; O’Roak et al., 2011), *GRID2* (Schaaf et al., 2011), *KCNMA1* (Laumonnier et al., 2006), y otros (Basu, Kollu, & Banerjee-Basu, 2009).

Para evaluar la capacidad de nuestra lista genética como reportera de genes candidatos a ser causantes de patologías, evaluamos el enriquecimiento de nuestra lista en genes relacionados con disfunción cognitiva. SFX es una forma de autismo bien caracterizada, causada por la pérdida de función de la proteína de retraso mental X Frágil (FMRP), la cual regula la traducción local y plasticidad en los sitios pre y post sinápticos (Kelleher & Bear, 2008). Basándonos en una lista reciente de genes diana de FMRP de la que los autores extrajeron un grupo de 842 genes como potenciales candidatos a causar SFX (Darnell et al., 2011), y en la hipótesis de que nuestra lista debería estar enriquecida en dianas de FMRP, procedimos a comparar estadísticamente ambas listas. Encontramos 70 genes solapantes entre las dos listas (Tabla suplementaria 4). La probabilidad de que un grupo de 70 genes de la lista de genes con SARE (827 genes procedentes del genoma humano de 27000 genes) y la lista de transcritos diana de FMRP (842 de un transcriptoma de ratón de 12000 transcritos) solapen aleatoriamente es muy baja ($p = 4,3909 \times 10^{-13}$) y por tanto estadísticamente muy relevante. La elevada relación entre los genes que poseen SARE y las dianas de FMRP soporta fuertemente la regulación dependiente de actividad debida a la región SARE; y que mutaciones en esta región o en los genes que la poseen puede contribuir al padecimiento de retraso mental, desórdenes de espectro autista y otras enfermedades psiquiátricas.

2. Función de *Cux1* y *Cux2* en el cruce de la línea media y en el desarrollo axonal de las neuronas de proyección del cuerpo calloso.

Esta tesis doctoral está principalmente centrada en los mecanismos moleculares regulados por los FT *Cux1* y *Cux2* en las neuronas de proyección de las láminas II-III, las cuales generan la mayor parte del CC. Por los estudios previamente descritos sobre la secuencia SARE, sabíamos que ambos FT poseen dicha secuencia en sus genes, por lo que probablemente estuvieran involucrados en procesos de respuesta a actividad neuronal. Uno de los procesos de vital importancia para el correcto establecimiento de los circuitos neuronales, regulado por actividad, es el desarrollo de las conexiones axonales (Gomez & Spitzer, 1999; Yamamoto & Lopez-Bendito, 2012). Es por ello que comenzamos el estudio del desarrollo axonal de las neuronas callosas.

Con este objetivo en mente, y teniendo en cuenta que los ratones *Cux1*^{-/-} mueren al primer día de su nacimiento por causas en principio ajenas al SN, optamos por el uso de la técnica de electroporación *in-utero*, la cual nos permitía una eficiente regulación de la expresión génica mediante

la introducción, en precursores del ventrículo a día E15.5, de ARNhc y/o plásmidos de expresión. Tras la inyección del ADN de interés en el ventrículo, se aplica un pulso de corriente con unas palas que están colocadas de manera que, serán los precursores que generan la corteza SS los que queden electroporados. Los precursores presentes en el ventrículo en este estadio embrionario, son los que darán lugar a las neuronas de las láminas II-III, por lo que podíamos estudiar el desarrollo de las neuronas en las que la expresión de *Cux1* y *Cux2* está disminuida y analizar el desarrollo de sus axones. Siempre co-electroporamos *CAGGFP* con los constructos de interés para poder visualizar el desarrollo axonal, tras la realización de inmuno-fluorescencias con el anticuerpo contra GFP.

2.1. La migración neuronal y laminación cortical es correcta en animales electroporados con ARNhc-*Cux1*.

Sabíamos, por estudios previos en ratones KO, que la falta de *Cux1* y/o *Cux2* no afecta a la laminación de la corteza (Cubelos et al., 2008b). Nos interesaba conocer si, fruto de la técnica de electroporación, o de la distinta expresión génica de una población neuronal en otro entorno genético, la laminación se veía alterada, lo cual podía afectar al patrón de inervación de las neuronas. Para ello electroporamos ARNhc-*Cux1* en animales WT y *Cux2*^{-/-} y, posteriormente, realizamos inmuno-fluorescencias de secciones coronales de cerebros de animales P8 con anticuerpos contra GFP. Tras la adquisición de imágenes de la zona en que se encontraban los somas de las neuronas electroporadas, procedimos a analizar las láminas que ocupaban preferencialmente. Dividimos el área total (desde la piamadre hasta la parte inferior de la lámina VI) en diez regiones de idénticas dimensiones y, cuantificamos el número de neuronas verdes (indicativo de que habían sido transfectadas con *GFP* y el constructo correspondiente) en cada una de las regiones (Figura 13). Comprobamos que, la mayoría de las neuronas electroporadas, se encontraban en las regiones pertinentes a las láminas II-III de la corteza cerebral, equivalente a lo que ocurre en situación normal. Estos resultados nos permitieron concluir que, la laminación cortical no se ve afectada por la técnica de electroporación *in-utero*, ni por la falta de *Cux1* en una población neuronal minoritaria; y que esto no es debido a que *Cux2* pueda tener una función redundante a *Cux1*.

2.2. La dinámica de inervación axonal por el cuerpo calloso a estadios tempranos está modificada en neuronas deficientes en *Cux1* o *Cux2*, sin embargo la trayectoria no se encuentra alterada.

Para que los axones puedan llegar a sus dianas específicas es fundamental que sigan el trayecto adecuado (Leyva-Diaz & Lopez-Bendito, 2013). El cruce de la línea media es uno de los primeros pasos determinantes en la formación del CC, y muchas veces se produce un bloqueo en esta frontera. Cuando los axones del CC cruzan la línea media, siguen dos trayectorias preferentes: la dorsal y la ventral. La elección de estas vías correlaciona con el área contralateral que los axones van a inervar. Comenzamos analizando la trayectoria que siguen los axones callosos al cruzar la línea media, para esclarecer si alguno de los mecanismos de guía axonal previamente nombrados pudiera estar fallando como consecuencia de la disminución de la expresión de los FT *Cux1* y *Cux2*. Electroporamos ARNhc-*Cux1* en los precursores de ratones *Cux2*^{-/-} para, posteriormente a estadio P2, analizar el camino que siguen los axones durante el cruce de la línea media y compararlo con el de animales control. Realizamos cortes coronales de cerebros de ratones a estadio P2 e hicimos inmuno-fluorescencias con anticuerpos contra GFP. Tras adquirir imágenes del tracto axonal de la

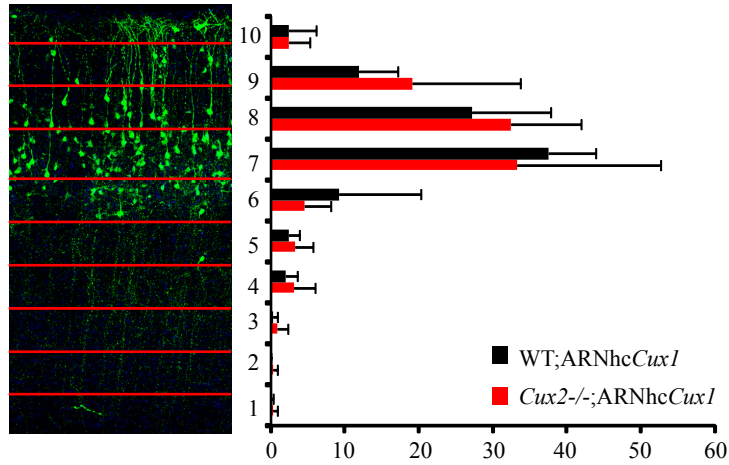


Figura 13: *La migración neuronal es correcta en animales electroporados con ARNhcCux1.* Corte coronal de un cerebro P8 electroporado con los constructos correspondientes. Dividimos las imágenes en 10 secciones de igual tamaño para cuantificar las neuronas correspondientes a cada sección. En la gráfica representamos el porcentaje medio de neuronas en cada sección respecto al total de neuronas electroporadas. Comprobamos que la laminación no se ve alterada por la aproximación de electroporación in-utero, ya que encontramos las neuronas electroporadas en la zona correspondiente a las láminas II-III (secciones 7, 8 y 9).

zona correspondiente a la línea media, la dividimos en tres secciones (superior, intermedia e inferior) y cuantificamos la intensidad proporcional de señal procedente de GFP en cada una de las secciones, de forma que cada imagen estuviera normalizada internamente (Figura 14A). La medida se realizó en distintos ejemplares. Pudimos comprobar que, en este estadio, el tracto axonal acaba de cruzar la línea media. Tanto los cerebros *Cux2*^{-/-}; ARNhc-*Cux1* como los controles WT poseían la mayor parte de la señal en la sección intermedia, una mínima parte en la inferior y el resto en la superior. Descartamos, por lo tanto, la posibilidad de que los axones estén siguiendo rutas aberrantes o que tengan una incorrecta fasciculación durante el cruce de la línea media, así como que los FT Cux estén involucrados en los mecanismos relativos a la trayectoria seguida para el cruce de la línea media.

La siguiente aproximación para el estudio del efecto de *Cux1* y *Cux2* en la guía axonal de las neuronas callosas consistió en, siguiendo el mismo protocolo experimental que anteriormente, estudiar la dinámica de invasión contralateral temprana. Para ello analizamos, en cortes coronales teñidos con el anticuerpo contra GFP, la distancia recorrida por el tracto axonal a estadio P2, así como la invasión de la corteza contralateral a estadio P8. Como puede observarse en la figura 14, y tal como había sido previamente descrito (Wang et al., 2007), a P2 los axones acaban de cruzar la línea media y se dirigen hacia la zona homotípica en el hemisferio contralateral. Curiosamente, la disminución de la expresión de *Cux1* (ARNhc-*Cux1*) en las neuronas de las láminas II-III produjo un efecto en sus axones de mayor elongación con respecto a la situación control. Este efecto fue aún más evidente en animales *Cux2*^{-/-} y en los animales *Cux2*^{-/-}; ARNhc-*Cux1* (Figura 14B). Este fenotipo indicaba una mayor tasa de crecimiento. Podía ser debido a diversos mecanismos tales como un retraso en la diferenciación, puesto que en estadios tempranos el axón crece a mayor velocidad; a un déficit en la expresión de alguna molécula soluble que restrinja el crecimiento axonal; o a un defecto en la actividad espontánea que genere patrones de ondas de Ca^{2+} aberrantes alterando el desarrollo axonal normal. En cualquier caso, pudimos concluir que la dinámica axonal estaba

afectada por los FT Cux en el estadio P2.

Continuamos viendo lo que ocurría con la invasión axonal a estadio P8 (Figura 14C). En condiciones normales, los axones han comenzado la invasión contralateral de la PC en la zona homotípica a P8. En la figura 14C (panel superior izquierdo) podemos ver que los axones ascienden a lo largo de la PC, existiendo una zona, a nivel homotípico y en la corteza SS primaria, de invasión preferente. Los axones alcanzan la lámina IV en su mayoría, aunque algunos se ven por encima de este punto y otros por debajo. Cuando disminuimos la expresión de *Cux1* con la técnica de electroporación *in-utero* en animales control, lo que observamos es que la densidad de axones que invadían la PC disminuía drásticamente, y la zona de invasión mayoritaria ya no era tan preponderante, sino que, más bien, la invasión ocurría de forma tímida, dispersa por toda la corteza contralateral; en este caso, la totalidad de los pocos axones invadiendo la corteza ya habían llegado e incluso sobrepasado las láminas II-III (Figura 14C, panel superior derecho). Sorprendentemente este proceso es radicalmente opuesto en animales *Cux2*^{-/-}: En sus cerebros pudimos apreciar un efecto contrario en cuanto a la densidad de axones invadiendo la placa contralateral, la cual aumentó significativamente (Figura 14C, panel inferior izquierdo). Al igual que ocurría en los cerebros de animales en que se había electroporado ARNhc *Cux1*, no se definía una zona principal por la que ocurría la invasión, sino que más bien, esta se daba homogéneamente por toda la PC; sin embargo, similar a lo que ocurría en condiciones normales, los axones invocaban con éxito la PC y la trayectoria axonal en este estadio acababa cerca de la lámina IV. Finalmente, hay que destacar que, al disminuir la expresión de *Cux1* en animales *Cux2*^{-/-}, el fenotipo que prevaleció es el de *Cux1* (Figura 14C, panel inferior derecho). Cabe apuntar que los fenotipos observados debidos a *Cux1* se consideran autónomos celulares, ya que el entorno de las neuronas deficitarias en *Cux1* es WT; sin embargo, los debidos a *Cux2* podrían no ser autónomo celulares sino dependientes del entorno, ya que estamos analizando animales *Cux2*^{-/-}. De estos resultados pudimos concluir que, tanto *Cux1* como *Cux2* son FT fundamentales para la correcta invasión de la PC. Debido a que sus fenotipos no son semejantes; no parecía que estuvieran cumpliendo funciones redundantes en este proceso, aunque tampoco podía descartarse debido a la distinta aproximación de estudio.

2.3. Papel de los factores de transcripción *Cux1* y *Cux2* en el establecimiento y mantenimiento del patrón de invasión contralateral final.

En un primer momento en el desarrollo del CC existe una sobreproducción de ramificaciones y de conexiones. Posteriormente (a partir de P12 aproximadamente) esto se refinará; se eliminarán todas aquellas ramificaciones sobrantes manteniéndose solo las necesarias para dar lugar al patrón de invasión final (Wang et al., 2007). La correcta conectividad entre los dos hemisferios cerebrales no se reduce a la existencia del CC, sino que las neuronas de un hemisferio deben conectar con las dianas contralaterales adecuadas. Los resultados obtenidos de los análisis a P2 y P8 nos hacían pensar que pudiéramos encontrar defectos en el patrón final de conectividad cuando disminuimos o anulamos la expresión de *Cux1* o *Cux2*. Por esta razón nos decidimos a analizar el patrón de invasión existente a P16 cuando se alteran los niveles de expresión de los FT *Cux*. En este estadio la conectividad entre los dos hemisferios ya está establecida y en el control es similar a la que existirá a lo largo de la vida adulta del animal (Figura 15A). En condición control pudimos observar que en el lado contralateral se formaban dos columnas principales, una de ellas mucho más inervada que la segunda, y algo de invasión más lateralmente. La mayor ramificación axonal se observaba en las

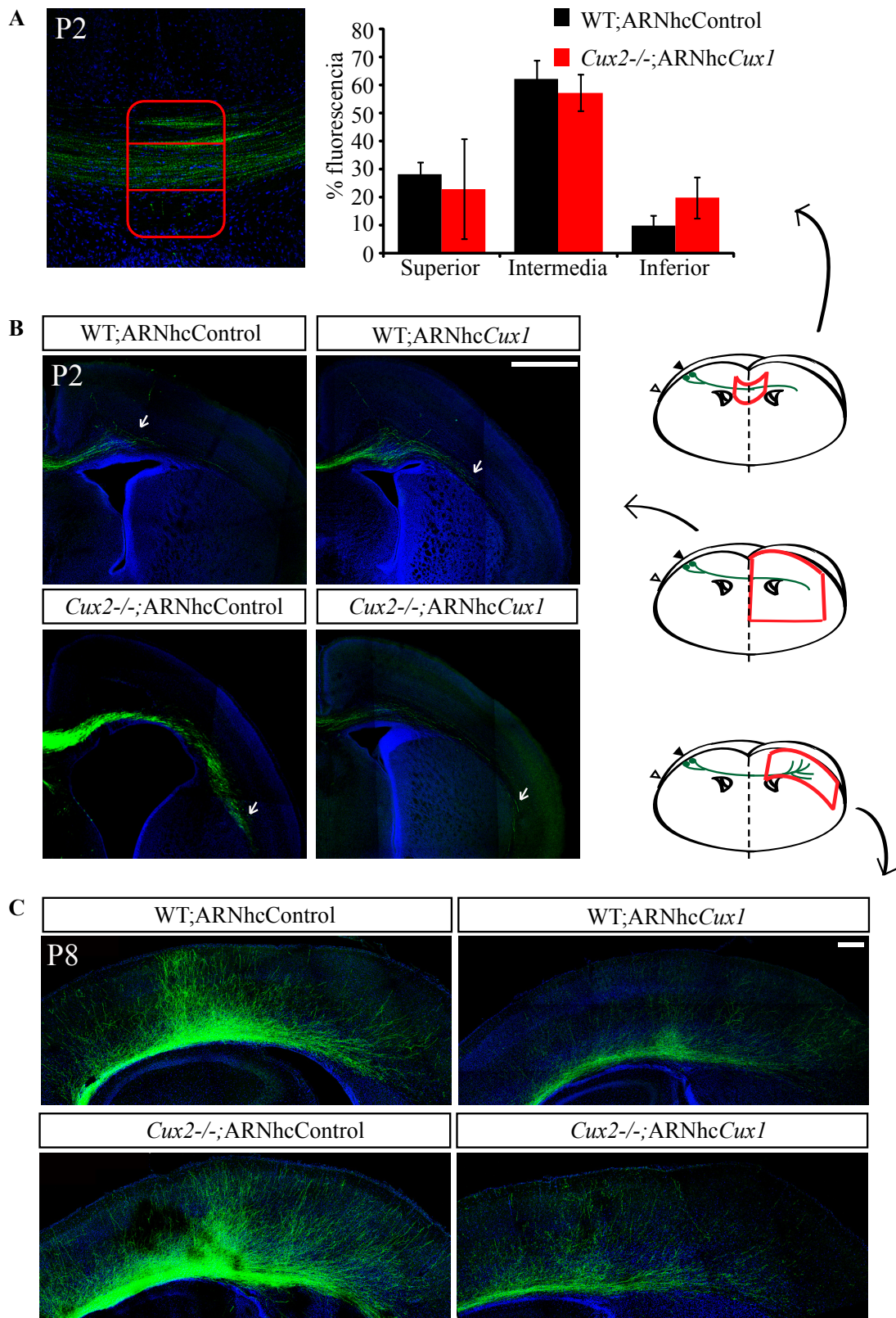


Figura 14: Cinética de invasión del CC durante el desarrollo temprano. A) Estudio de la trayectoria axonal seguida durante el cruce de la línea media. Imágenes de la zona correspondiente a la línea media del CC se dividen en tres regiones de igual tamaño (superior, intermedia e inferior) para cuantificar el porcentaje de señal que existe en cada región, indicativo del porcentaje de axones que cruzan por cada una de estas regiones la línea media. La ausencia de *Cux1* y *Cux2* no altera el cruce normal de la línea media de los axones callosos. B) Fotografía del hemisferio contralateral de animales P2 previamente electroporados con los constructos indicados. A estadio P2 los axones callosos acaban de cruzar la línea media. Al disminuir la expresión de *Cux1*, *Cux2* o ambos a la vez los axones llegan a territorios más distales en comparación con los animales control. Barra 0-250 μm . C) Invasión de la corteza contralateral a día P8. Fotografía del hemisferio contralateral de animales P8 previamente electroporados con los constructos indicados. En la situación control existe una invasión exuberante de la PC. En los animales *Cux2*^{-/-} esta invasión aumenta tanto en densidad como en el área invadida. La depleción de *Cux1* tanto en los animales WT como *Cux2*^{-/-} produce una disminución drástica de la densidad axonal invadiendo la PC. Barra 0-250 μm . Señalando a cada uno de los apartados se representa un esquema del área que aparece en el correspondiente apartado indicado por un área delimitado por líneas rojas.

láminas II-III, y en la columna principal existía otro punto importante de ramificación en la lámina V (que es mínimo en la columna secundaria); en las láminas IV y VI no apreciamos señal GFP o era despreciable (Figura 15A, B contralateral). No distinguimos que las invaciones en la zona más lateral ramificaran preferencialmente en ninguna lámina. En la corteza ipsilateral apreciamos abundantes ramificaciones en las láminas II-III y en la V. Tras electroporar el ARNhc*Cux1* en los precursores de las neuronas de las láminas II-III de animales WT, y analizar sus cerebros a P16, observamos un efecto drástico en la invasión contralateral (Figura 15B contralateral, C). En estos animales la ramificación axonal en la PC era prácticamente inexistente, viéndose apenas algunos axones fortuitos. En la corteza ipsilateral, el patrón de invasión no estaba afectado: existían ramificaciones abundantes en las láminas II-III y V, mientras que las láminas IV y VI carecían de invasión alguna (Figura 15B ipsilateral, C). Esto nos sugería que las neuronas deficientes en *Cux1* podían estabilizar las proyecciones axonales a distancias cortas, pero no a largas distancias.

Para descartar la posibilidad de que este efecto fuera debido a que el constructo está afectando a la expresión de otros genes distintos de *Cux1*, co-electroporamos en animales WT el constructo ARNhc*Cux1* junto con una forma mutada de *Cux1* resistente al ARNhc (aquí denominada CAG-*Cux1*). Si el fenotipo observado se debiera exclusivamente a la disminución de *Cux1*, al restaurar esta expresión deberíamos de recuperar, al menos parcialmente, el fenotipo WT. Al analizar estos animales pudimos observar que recuperábamos la invasión en la PC (Figura 15B contralateral, C), aunque el patrón de invasión no replicaba exactamente el que se daba en condiciones normales, y la invasión más lateral era casi inexistente. No obstante, la recuperación parcial del fenotipo WT al co-electroporar el ARNhc*Cux1* junto a su forma resistente, nos permitía asociar el fenotipo de no invasión a la falta del FT *Cux1*. Las alteraciones del patrón de invasión en cerebros con neuronas donde se rescata la expresión de *Cux1* nos indicaba que probablemente la invasión contralateral es muy sensible a la alteración de los niveles de *Cux1*.

A continuación procedimos a analizar el efecto que la ausencia de *Cux2* producía en el patrón

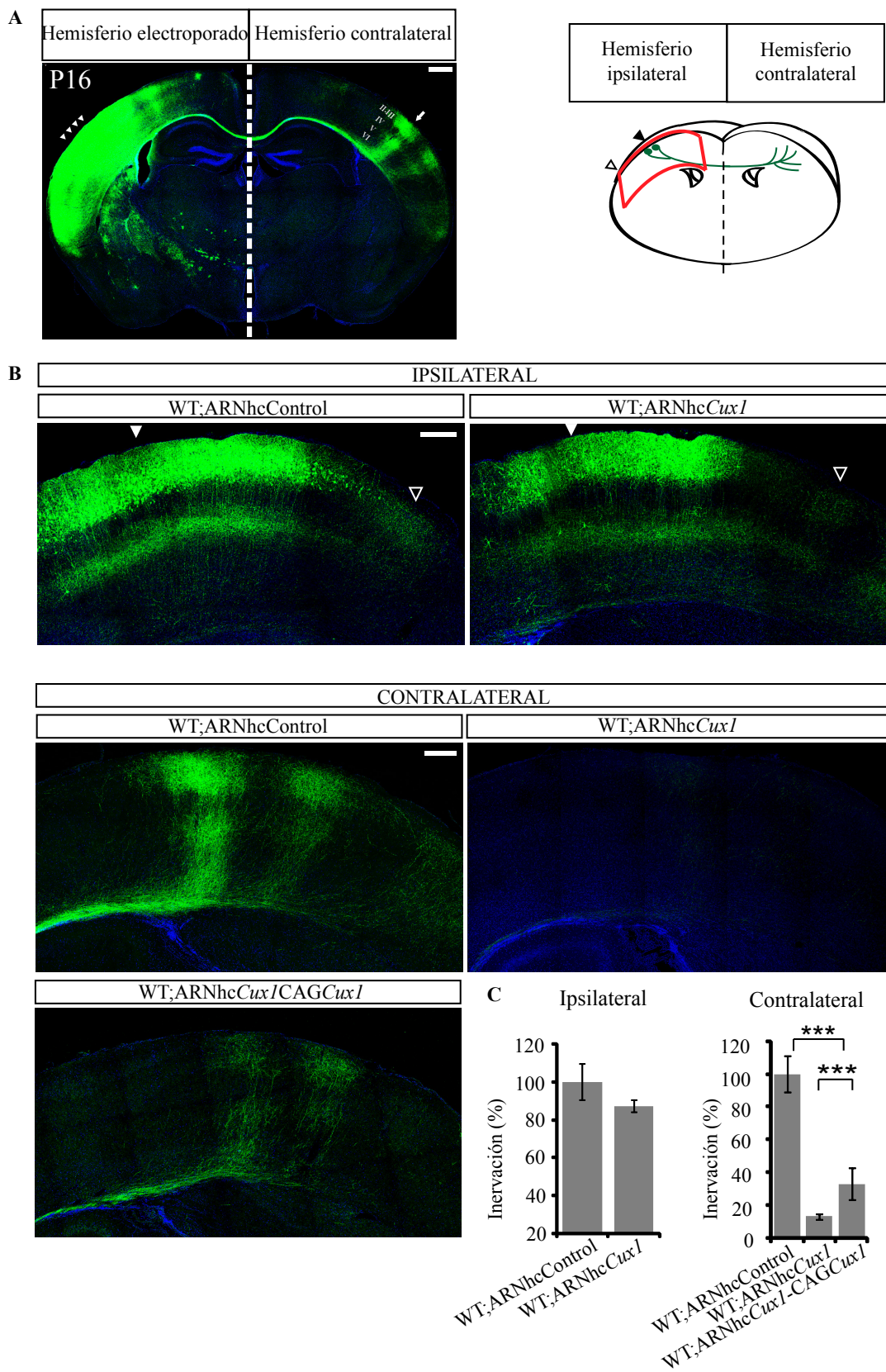


Figura 15: *El FT Cux1 es esencial para la inervación contralateral del CC, pero no para la ipsilateral.* A) Fotografía en mosaico de una sección coronal representativa de un cerebro P16 electroporado a E15.5 con CAGGFP. La señal ipsilateral está saturada para poder diferenciar los axones en el hemisferio contralateral, lo cual impide la diferenciación entre los somas y los axones en el hemisferio ipsilateral. Las flechas indican la columna principal, mientras que las cabezas de flecha señalan el área electroporada. Barra = 500 μm . Al lado de dicha fotografía se representa un esquema de lo presentado anteriormente. B) Fotografía en mosaico en que podemos apreciar la señal GFP del hemisferio ipsilateral donde se realiza la electroporación de las neuronas y del contralateral, donde las neuronas electroporadas proyectan sus axones. A la izquierda se representa la parte más medial del cerebro. En el hemisferio ipsilateral, las cabezas de flecha rellenas indican las áreas que contienen neuronas electroporadas; mientras que las vacías muestran las áreas inervadas en que no hay somas electroporados. Barra = 250 μm . La deficiencia de Cux1 no afecta las proyecciones ipsilaterales, sin embargo las contralaterales se ven drásticamente eliminadas de la PC. Estas proyecciones contralaterales son parcialmente rescatadas al co-electroporar el ARNhcCux1 junto con su forma resistente (CAGCux1). C) Cuantificación de la inervación contralateral y de la lámina V ipsilateral normalizada con el ARNhcControl. Valor p del test de Student *** $\leq 0,01$

de inervación final. Analizamos el desarrollo axonal del CC en animales *Cux2*^{-/-} a P16 gracias a la previa introducción de CAGGFP en los precursores de la lámina II-III mediante la técnica de electroporación *in-utero*. A falta de las cuantificaciones relacionadas con los fenotipos debidos a alteraciones del FT *Cux2*, los cortes coronales de cerebros nos permitieron observar, de nuevo, un efecto contrario al obtenido al disminuir la expresión de *Cux1*. Observando la imágenes tomadas, pudimos concluir que la inervación de ambas columnas aumenta, pero donde observamos la mayor diferencia es en el área contralateral inervada, la cual estaba muy ampliada, tanto lateral como medialmente, así como la densidad de inervación en estas zonas (Figura 16, panel intermedio). Una vez más, homólogo a lo que ocurría a estadio P8, la disminución de expresión de *Cux1* en neuronas *Cux2*^{-/-}, producía una casi total pérdida de inervación contralateral, efecto similar la pérdida simple de *Cux1* (Figura 16, panel inferior). Estos resultados ponían de manifiesto el papel de los FT Cux en el correcto establecimiento y mantenimiento de los patrones de conectividad entre ambos hemisferios cerebrales.

2.4. Posible influencia bi-direccional de Cux1 sobre la conectividad entre los hemisferios.

Por los resultados expuestos anteriormente sabíamos que *Cux1* tiene un importante papel en la formación y mantenimiento de las conexiones que conectan los dos hemisferios. Para comprender un poco más la influencia que *Cux1* tiene sobre la conectividad y para intentar entender la recuperación parcial del fenotipo del ARNhc*Cux1* al co-electroporarlo con la forma resistente de *Cux1*, estudiamos el efecto de la sobre-expresión de este FT en los axones de neuronas callosas de las láminas II-III de la corteza cerebral. La electroporación *in-utero* del plásmido CAG-*Cux1* a E15.5, y posterior análisis de los cerebros a P16, reveló un efecto negativo de la sobre-expresión de *Cux1* sobre el patrón de inervación contralateral (Figura 17A). Como se puede observar en la figura 17A (panel inferior), el aumento de la expresión de *Cux1* produce un descenso de la densidad axonal en la PC contralateral, aunque nunca tan drástico como el efecto que tiene la depleción de *Cux1*. Seguíamos

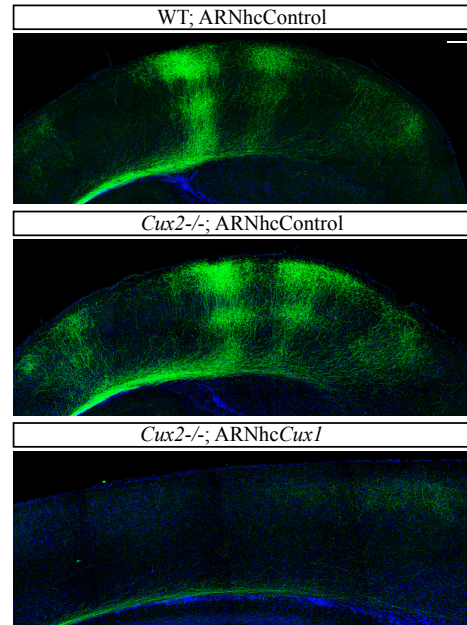


Figura 16: *El FT Cux2 modula el patrón de inervación contralateral del CC. Fotografía en mosaico de una sección coronal representativa de un cerebro WT o Cux2^{-/-} P16 electroporados a E15.5 con ARNhcControl o con ARNhcCux1. Barra = 250 μ m. Podemos apreciar la señal GFP del hemisferio contralateral, donde las neuronas electroporadas proyectan sus axones. A la izquierda se representa la parte más medial del cerebro. La deficiencia de Cux2 afecta al área de inervación de la PC contralateral el cual aumenta con respecto a los animales control. La deficiencia de Cux1 en animales Cux2^{-/-} produce un efecto muy similar al observado en los animales WT;ARNhcCux1, la inervación disminuye drásticamente.*

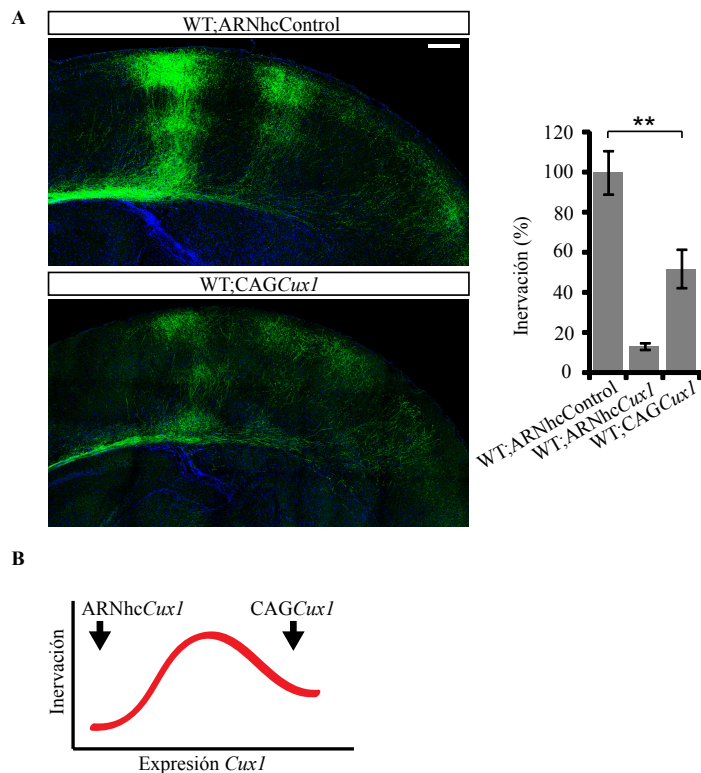
observando una columna principal con una inervación preferencial de las láminas II-III y V, no obstante la columna secundaria quedó reducida a inervación residual semejante a la existente más lateralmente. Este hecho nos explicaría la no total recuperación del fenotipo normal en los animales WT; ARNhcCux1; CAGCux1. Esto indicaba que niveles intermedios de expresión de Cux1 son necesarios para la correcta inervación contralateral, y que cambios en la expresión de este FT (tanto positivos como negativos) pueden afectar a la conectividad entre los dos hemisferios, lo que sugería una dependencia bi-direccional del patrón de conectividad en los niveles de expresión de Cux1 (Figura 17B). Ya se han descrito varios ejemplos de proteínas que modulan procesos biológicos de forma bi-direccional, es decir, que sólo concentraciones intermedias son óptimas para el normal desarrollo neuronal, a menudo son elementos implicados en la plasticidad sináptica; y, tanto un exceso como un defecto, tiene efectos negativos sobre la célula (Joju George, 2012) y, por nuestros resultados, parecía que Cux1 pudiera sumarse a esta lista.

Una vez que habíamos comprobado la existencia de un efecto sobre el desarrollo axonal y la conectividad de los FT Cux1 y Cux2, nos decidimos a ahondar en el papel de cada uno de estos FT en las neuronas callosas de las láminas II-III y en su función sobre la conectividad entre los dos hemisferios a través del CC.

Figura 17: La sobre-expresión de *Cux1* afecta negativamente la invasión contralateral.

A) Fotografía en mosaico mostrando la invasión contralateral de neuronas a P16 electroporadas a E15.5 con los constructos indicados. A la izquierda es medial, a la derecha lateral. Barra = 250 μ m. La sobre-expresión de *Cux1* reduce la densidad axonal en la PC contralateral sin llegar a eliminarla, y altera el patrón normal de invasión. En el gráfico se muestra la cuantificación del porcentaje de invasión normalizado a individuos control. P valor del test de Student $** \leq 0,03$; $*** \leq 0,01$.

B) Representación esquemática del efecto dosis-dependiente que se propone que la expresión del FT *Cux1* tiene sobre la conectividad a larga distancia del CC.



3. *Cux1* posibilita la conectividad de los dos hemisferios a través del cuerpo calloso modulando el patrón de disparo de potenciales de acción de las neuronas de las láminas II-III de la corteza cerebral.

3.1. Los defectos en la invasión a larga distancia de las neuronas deficientes en *Cux1* son debidos a actividad neuronal aberrante.

La actividad neuronal tiene un papel central en la regulación del desarrollo axonal y en el refinamiento de las conexiones en el SN central. La sobre-expresión del canal de K^+ rectificador hacia el interior *Kir2.1*, induce la hiper-polarización neuronal y aumenta el umbral de la señal de entrada necesario para que las neuronas puedan lanzar PA; en consecuencia, la expresión de *Kir2.1* reduce la excitabilidad neuronal y disminuye el número de disparos en respuesta a las señales entrantes (Mizuno et al., 2010). Está descrito que la sobre-expresión de *Kir2.1* altera el patrón normal de invasión contralateral específico de lámina del CC, indicando un papel de la actividad neuronal en la conectividad axonal del CC, sin llegar a eliminar las invaciones axonales contralaterales (Mizuno et al., 2010; Wang et al., 2007) (Figura 18 panel superior). Quisimos estudiar la dependencia del fenotipo axonal producido por la disminución de *Cux1* en la actividad intrínseca neuronal. Para ello co-electroporamos *CAGKir2.1* junto con *ARNhcCux1* y analizamos el fenotipo axonal a P16. La sobre-expresión de *Kir2.1* fue capaz de rescatar parcialmente la falta de invasión contralateral

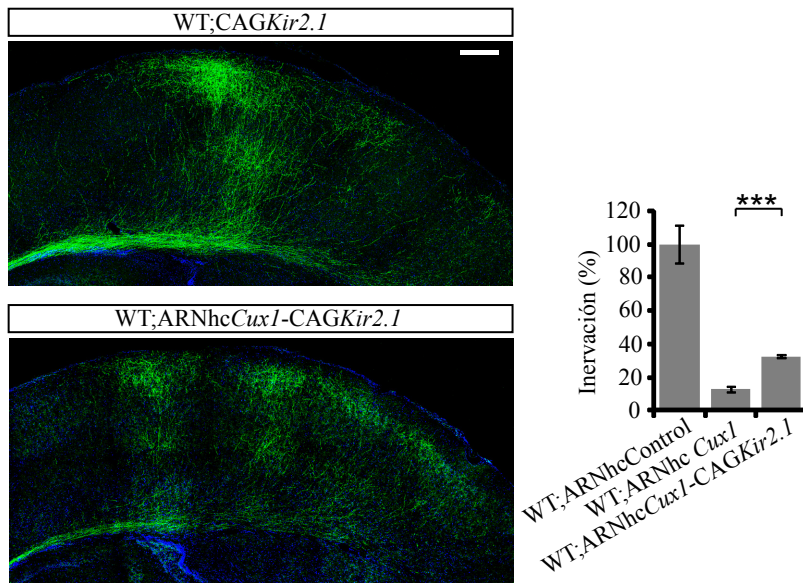


Figura 18: *La regulación de la conectividad contralateral callosa por Cux1 depende de la actividad eléctrica. La disminución de la excitabilidad neuronal al sobre-expresar Kir2.1 altera el patrón normal de conectividad en animales WT (panel superior) y rescata parcialmente el fenotipo generado por el ARNhcCux1 (panel inferior). El gráfico muestra la cuantificación de la inervación total contralateral normalizada con animales control. Barra = 250 μ m. P valor del test t de Student *** $\leq 0,01$.*

mediada por el ARNhc*Cux1* (Figura 18 panel inferior). Esto indicaba que el efecto que *Cux1* tiene sobre la conectividad contralateral es dependiente de las propiedades eléctricas de las NP callosas.

3.2. *Cux1* determina la excitabilidad y patrones de disparo de las neuronas callosas de las láminas II-III.

El rescate del fenotipo axonal producido por la deficiencia de expresión de *Cux1*, gracias a la disminución de la excitabilidad generada al sobre-expresar *Kir2.1*, apuntaba a una anormal respuesta eléctrica como causante de los defectos de inervación. Por esta razón procedimos a analizar la propiedades electrofisiológicas de neuronas sin *Cux1* (*Cux1*^{-/-}), y con su expresión disminuida por la técnica de electroporación *in-utero*.

En primer lugar estudiamos neuronas corticales *in-vitro* procedentes de embriones WT y *Cux1*^{-/-} de estadio E17.5. Usamos la técnica de fijación de membranas (en inglés, patch clamp) para registrar los cambios de voltaje producidos en el soma neuronal ante diferentes condiciones de estimulación (“whole-cell current-clamp”). Con estos registros pudimos analizar las propiedades pasivas de la membrana celular (potencial de membrana en reposo, resistencia de entrada y capacitancia); las propiedades activas de la membrana (aquellas que definen los PA, como son el umbral del PA y la amplitud); y la excitabilidad somática, medida como el número de PA en respuesta a un estímulo de entrada concreto y el patrón de disparo de las neuronas. Para buscar posibles defectos de la maduración eléctrica neuronal durante el desarrollo, generamos y analizamos gráficas del número medio de PA lanzados en respuesta a estímulos crecientes en sucesivos DIV; y comparamos la curva de excitabilidad en base a la entrada y salida neuronal en los distintos tipos neuronales. A excepción de un pequeño aumento en la amplitud del PA y en la mitad del tiempo de bajada del PA, no

encontramos diferencias en las propiedades activas y pasivas de la membrana en neuronas *Cux1*^{-/-} cultivadas *in-vitro* (Figura 19A). Sin embargo, al analizar la respuesta de las neuronas (en términos de número de PA) a señales entrantes medianas (200pA) (Figura 19B) y altas (400pA) (Figura 19C), las neuronas *Cux1*^{-/-} mostraron una disminución relevante en la excitabilidad, especialmente durante el periodo 10-14 DIV, apuntando a una incorrecta maduración eléctrica debido a la deficiencia de *Cux1*. Un análisis más detallado de la respuesta neuronal ante aumentos consecutivos de corriente (0-400pA) inyectada en el soma durante el periodo 10-14 DIV (Figura 19D), confirmaron las diferencias entre la curva de excitabilidad de las neuronas *Cux1*^{-/-} y las WT, indicativas de que la depleción de *Cux1* produce una menor excitabilidad en términos de menor número de PA lanzados en respuesta a un estímulo determinado. Estos resultados destacan el papel de *Cux1* en la maduración y diferenciación eléctrica de las neuronas piramidales de las láminas II-III.

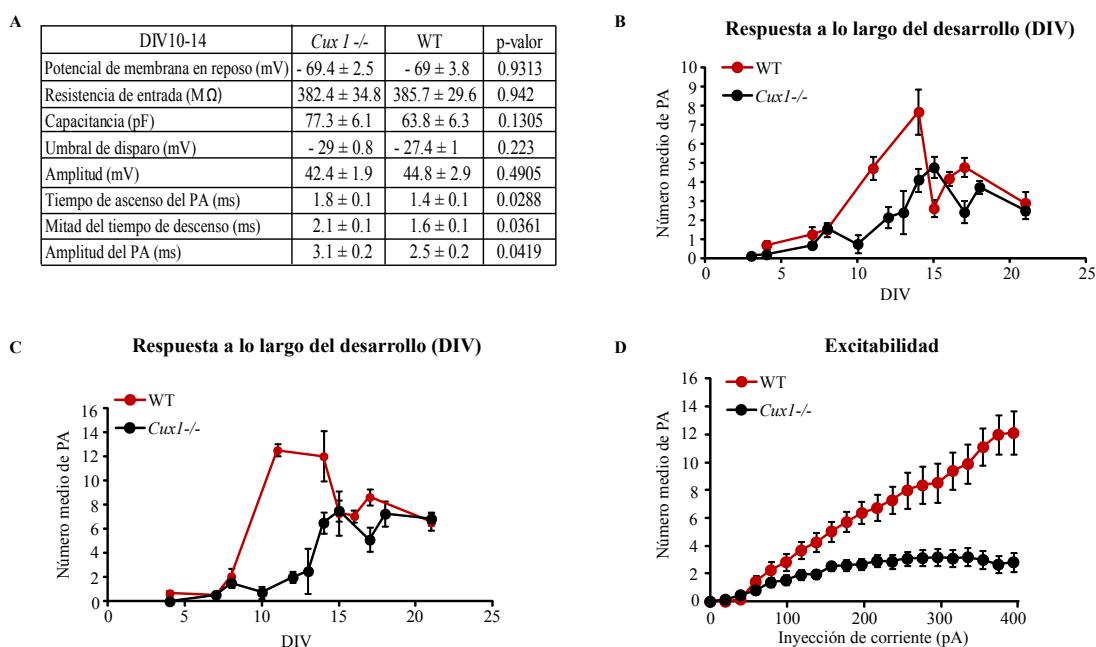


Figura 19: Propiedades electrofisiológicas de neuronas *Cux1*^{-/-} *in-vitro* en comparación con neuronas WT. A) Propiedades activas y pasivas de membrana. El P-valor del test *t* de Student mostrado en la columna derecha deja en evidencia la similitud en la mayoría de las propiedades analizadas entre las neuronas WT y las *Cux1*^{-/-}. B) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a una inyección de corriente de 200 pA en distintos DIV. C) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a una inyección de corriente de 400 pA en distintos DIV. Las neuronas *Cux1*^{-/-} disparan un menor número de PA, especialmente en un estadio del desarrollo intermedio (10-14 DIV) tanto en respuesta a una inyección de 200 (B) como de 400 pA (C). D) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA) de neuronas de 10-14 DIV. La excitabilidad de neuronas *Cux1*^{-/-} está disminuida en comparación con las WT. WT, *n* = 19; *Cux1*^{-/-}, *n* = 32; $F(2,836) = 275.5$; $p < 0.0001$

Para descartar que estos resultados fueran consecuencia de una aproximación *in-vitro*, a continuación realizamos registros, en respuesta a estímulos de corrientes crecientes, de somas neuronales

de la lámina II-III en rodajas agudas de animales de estadio P8 y P16. Las neuronas registradas habían sido transfectadas, en el estadio E15.5, con los constructos de interés junto con *GFP* por la técnica de electroporación *in-utero* (gracias a lo cual pudimos identificar una población muy homogénea de neuronas de las láminas II-III). Esta técnica nos permitía evaluar las consecuencias *in-vivo* de la modulación de la expresión de *Cux1*, así como los defectos autónomos celulares, ya que las neuronas electroporadas suponen una población pequeña y muy homogénea que se diferencia en un contexto WT. Las propiedades activas y pasivas no se vieron modificadas a P8 (no mostrado); sin embargo, pudimos observar diferencias relevantes a P16 (Figura 20A), incluyendo una disminución en el potencial de reposo de la membrana (-71mV en controles, frente a -79mV en neuronas con ARNhc*Cux1*) y en la resistencia de entrada (522 MΩ en controles, *versus* 299 MΩ en neuronas con ARNhc*Cux1*). Acorde con los resultados obtenidos *in-vitro*, los experimentos reflejaron una reducción significativa del número de PA disparados por las neuronas en respuesta a un estímulo creciente al disminuir la expresión de *Cux1*, tanto a P8 (Figura 20B) como a P16 (Figura 20C), indicando que el defecto de excitabilidad debido a *Cux1* es autónomo celular. La coincidencia de los datos obtenidos *in-vitro* e *in-vivo* valida ambas estrategias para el estudio de neuronas deficientes en *Cux1*. Estos datos nos permitieron descartar la posibilidad de que el defecto de inervación contralateral producido por las neuronas deficientes en *Cux1*, se deba a un mayor número de disparos de PAs, como se habría pensado ante los resultados de recuperación con *Kir2.1*.

La excitabilidad neuronal viene determinada, aparte de por el número de PA que una neurona dispara en respuesta a un estímulo, por los patrones temporales de disparo de PA. Comienza a desvelarse la relevancia que estos patrones tienen sobre la determinación de características neuronales básicas, tales como la conectividad (Connors & Gutnick, 1990; Otsuka & Kawaguchi, 2011). La correcta computación de las señales entrantes y formación de una respuesta en forma de secuencia de PA es esencial para la correcta transmisión de información neuronal (Stanley, 2013). La diferenciación de las neuronas de las láminas II-III de la corteza SS *in-vivo* supone la adquisición de patrones de disparo específicos que se piensa que contribuyen a la formación de los circuitos cerebrales (Maravall et al., 2004). Para estudiar la posibilidad de que *Cux1* pudiera estar teniendo un efecto sobre la adquisición y correcto disparo de patrones de PA procedimos a analizar los modos de disparo de neuronas en rodajas agudas de ratones a día P16 que habían sido electroporadas en el telencéfalo, a E15.5, con los constructos de interés. En un primer análisis de la respuesta de neuronas control de la lámina II-III confirmamos experimentos previamente descritos (Maravall et al., 2004) en que se muestra que estas neuronas tienen un patrón regular de disparo en respuesta a señales entrantes con intervalos entre PA crecientes entre PA consecutivos (Figura 20D). Cuando procedimos a estudiar el comportamiento de disparo de las neuronas deficientes en *Cux1* descubrimos dos hechos interesantes: en primer lugar pudimos comprobar que los dos primeros PA se encontraban anormalmente juntos; y en segundo lugar vimos que aparecían numerosas irregularidades a lo largo de su patrón de disparo, en el sentido de que los tiempos entre PA consecutivos no seguían un patrón regular, sino que, aleatoriamente durante la consecución de los disparos, aparecían tiempos entre PA considerablemente ampliados (Figura 20). Concluimos que el FT *Cux1* tiene un efecto sobre la modulación de la respuesta neuronal y la computación de las señales entrantes. En su ausencia el patrón de disparo se ve modificado y aparecen irregularidades; por lo tanto, la correcta transmisión de la información por el CC está alterada.

Para explorar esta idea con mayor profundidad nuestro siguiente paso consistió en un análisis más

A

	ARNhc <i>Cux1</i>	ARNhcControl	ARNhc <i>Cux1</i> /CAG <i>Kir2.1</i>	ARNhc <i>Cux1</i> /CAG <i>KV1.3</i>	CAG <i>Kir2.1</i>	p-valor
Potencial de membrana en reposo (mV)	-78.6 ± 1.5	-70.7 ± 1.8	-74.9 ± 1.3	-77.5 ± 0.9	-90.8 ± 2.1	0.0013
Resistencia de entrada (MΩ)	298.7 ± 16.9	521.9 ± 36.7	227.4 ± 28.4	205.4 ± 20.8	209.9 ± 19.3	5.61*10 ⁻⁶
Capacitancia (pF)	87.4 ± 5.1	100.8 ± 6.2	84.2 ± 6.4	92.52 ± 10.4	90.9 ± 9.3	0.0998
Umbral de disparo (mV)	-32.5 ± 1.2	-31.1 ± 0.8	-34.8 ± 2.1	-35.6 ± 1.6	-34 ± 1.9	0.2917
Amplitud (mV)	58.7 ± 2.2	68.1 ± 3.3	61.5 ± 3.1	67 ± 3.6	54.9 ± 3.8	0.0364
Tiempo de ascenso del PA (ms)	1.4 ± 0.04	1.4 ± 0.07	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.13	0.8546
Mitad del tiempo de descenso (ms)	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.3	0.4418
Anchura del PA (ms)	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.2	3.3 ± 0.4	2.9 ± 0.2	3.8 ± 0.4	0.6228

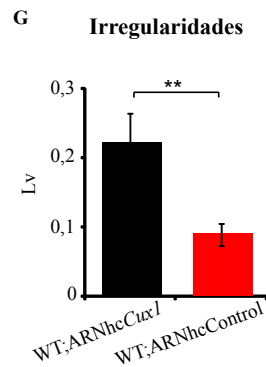
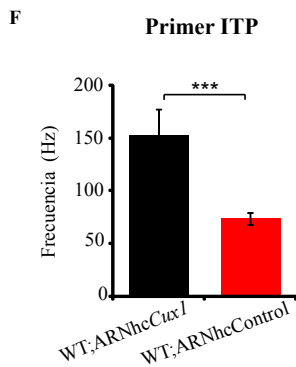
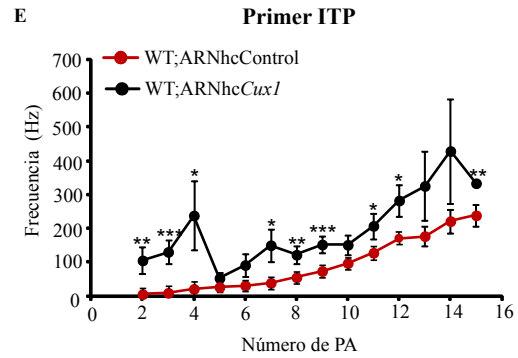
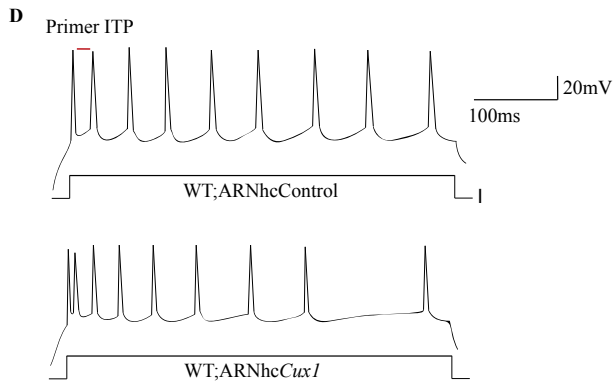
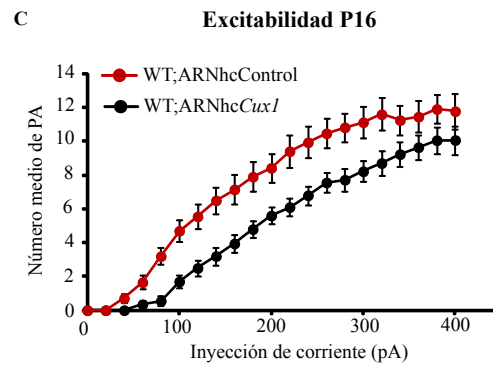
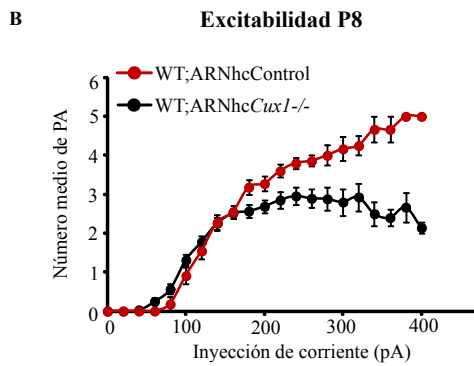


Figura 20: Las neuronas deficientes en *Cux1* presentan alteraciones en sus propiedades eléctricas. A) Propiedades activas y pasivas de membrana de neuronas en rodajas agudas a P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. P-valor del test *t* de Student comparando neuronas WT;ARNhcControl con WT;ARNhc*Cux1*. B) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA) de neuronas en rodajas agudas P8 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. WT;ARNhc*Cux1*, $n=32$; WT;ARNhcControl, $n=11$; $F(2,691) = 27.8$; $p < 0,0001$. C) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corrientes crecientes (0-400 pA), de neuronas de rodajas agudas a P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. WT; ARNhc*Cux1*, $n=20$ versus WT;ARNhcControl $n=20$; $F(2,753) = 74.03$; $p < 0,0001$. En ambos estadios (P8 y P16) las neuronas deficientes en *Cux1* muestran una excitabilidad disminuida en comparación con las neuronas control. D) Representación de un tren de disparos típico de neuronas de cerebros P16 con los constructos indicados electroporados a E15.5. Las neuronas deficientes en *Cux1* poseen los dos primeros PA más juntos que las neuronas control y presentan irregularidades en sus trenes de disparo E) Gráfica representativa de la frecuencia del primer ITP (intervalo temporal entre los dos primeros PA) presente en trenes de disparo del número de PA indicado en el eje x. Las neuronas deficientes en *Cux1* poseen una mayor frecuencia de disparo inicial en trenes de cualquier número de PA. Los datos muestran la media \pm EEM. P-valor del test *t* de Student comparando ambos tipos neuronales * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.03 , *** ≤ 0.01 F) Gráfica representativa de la frecuencia del primer ITP presente en trenes de disparo de 9 PA. Las neuronas deficientes en *Cux1* poseen una mayor frecuencia de disparo inicial. Los datos muestran la media \pm EEM. ARNhc*Cux1*, $n=27$ versus ARNhcControl $n=25$. P-valor del test *t* de Student *** ≤ 0.01 . G) Gráfica representativa del L_v presentes en los trenes de 8 PA. Las neuronas deficientes en *Cux1* poseen un patrón de disparo más aleatorio e irregular y, por lo tanto con mayor L_v , en comparación con las neuronas control. Los datos muestran la media \pm EEM. ARNhc*Cux1*, $n=15$ versus ARNhcControl, $n=20$. P-valor del test *t* de Student ** ≤ 0.03 .

exhaustivo del intervalo temporal entre PA (ITP). Comprobamos que al disminuir la expresión de *Cux1* en neuronas de la lámina II-III la frecuencia del primer ITP aumentaba muy significativamente en disparos de distinto número de PA (Figura 20E, F). Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos que describen que altas frecuencias de disparo implican un mayor borrado de conexiones en la corteza cerebral (Fuhrmann, Segev, Markram, & Tsodyks, 2002; Zucker & Regehr, 2002). También apoyarían artículos en que se propone que los patrones de disparo neuronales son esenciales para la determinación del patrón de conectividad. Como ejemplo, un reciente artículo describe cómo la aparición de un doblete inicial en neuronas de la lámina V es característico de las neuronas que proyectan contralateralmente y tienen colaterales axonales invadiendo el estriado ipsilateral, pero no la corteza pre-frontal o SS ipsilateral (Otsuka & Kawaguchi, 2011). Finalmente cuantificamos las irregularidades que encontrábamos en los disparos. Para ello contabilizamos la variación local de los intervalos entre disparos (L_v), un parámetro que refleja las características intrínsecas del disparo neuronal y difiere entre distintas poblaciones neuronales. Este parámetro evidencia diferencias en el grado de irregularidad de los patrones de disparo intrínsecos a las neuronas (Shinomoto et al., 2005a; Shinomoto et al., 2003) de forma que cuanto mayor es el valor de este parámetro, es indicativo de la presencia de más irregularidades en el patrón de disparo, mientras que valores próximos a 0 son indicativos de un disparo periódico. Pudimos corroborar que las neuronas deficientes en *Cux1* poseen un patrón de disparo muy irregular con un L_v significativamente aumentado en comparación con las neuronas control (Figura 20G). Esto nos indicaba que *Cux1* es esencial para la generación de un patrón de disparos de salida regular en las neuronas de las láminas II-III de la corteza cerebral.

En resumen, nuestros resultados evidencian el papel de *Cux1* en varios aspectos de la respuesta eléctrica de las neuronas callosas de la lámina II-III. El conjunto de estos datos nos permite afirmar que *Cux1* tiene un papel esencial en la maduración eléctrica de las neuronas de la lámina II-III y en la computación de la señal entrante que permite la correcta formación de patrones de disparo regulares, lo cual podría estar afectando directamente a la estabilización sináptica. La falta de invasión contralateral por el CC debido a la disminución de expresión de *Cux1* podría ser debido a la disminución en el número de PA lanzados en respuesta a estímulos, a patrones de disparo anormales o a la combinación de ambas causas.

3.3. Los defectos en conectividad originados por *Cux1* son debidos a la disminuida expresión de K_v1 y a la aparición patrones de disparo irregulares en las neuronas callosas de las láminas II-III.

Las neuronas callosas de las láminas II-III expresan normalmente gran diversidad de canales de K^+ y Na^+ (Guan et al., 2006; Storm, 2000) esenciales para el establecimiento de las características eléctricas de las neuronas. Nuestros resultados sugerían que *Cux1* posiblemente modulara la expresión de uno o varios de estos canales iónicos. La alta frecuencia de los primeros PA sugería la probable existencia de defectos en corrientes de K^+ , lo cual también era coherente con defectos en los intervalos entre disparos. Los canales K_v1 contribuyen a la regulación de las frecuencias de disparo en neuronas (Kole et al., 2007; Kole & Stuart, 2012; Shu et al., 2007), y el bloqueo de los canales K_v1 y K_v7 se ha demostrado que produce disparos irregulares similares a los que nosotros observamos al disminuir la expresión de *Cux1* (Kalluri, Xue, & Eatock, 2010) Estudios previos han relacionado una variante alélica del gen humano *KCNA3/K_v1,3* al padecimiento de diabetes y

muestran mutaciones en un sitio de unión de la proteína Cux1 (Tschrutter et al., 2006). Pudimos confirmar la conservación de este sitio de unión del FT Cux1 en el gen murino *Kcna3/Kv1,3* (Figura 21A). No encontramos sitios semejantes en otros canales K_v1 en el genoma de ratón, sin embargo, debido a la posición en tándem de estos genes y a los efectos de regulación génica a larga distancia descritos para Cux1, cabía la posibilidad de que su regulación esté ocurriendo de esta manera. Todo esto apuntaba a los canales de K^+ K_v1 como potenciales candidatos a analizar en las neuronas deficientes de Cux1. En primer lugar analizamos los niveles de expresión de *Kcna/Kv1*, así como de algunos otros canales, en neuronas corticales deficientes en Cux1. Para ello extrajimos el ARN de cultivos neuronales a 10 DIV procedentes de cortezas de ratones E17.5 con genotipos *Cux1*^{-/-} y WT. Tras la obtención del ADNc correspondiente analizamos la expresión genética por q-PCR. Los resultados de estos análisis mostraron una reducción de la expresión de *Kcna1/Kv1,1* y *Kcna3/Kv1,3* en las células *Cux1*^{-/-}, mientras que otros canales como *Kcna2/Kv1,2*, *Scn8a/Nav1,6* y *Cacna1c/Calv1,2* no mostraron cambios en su expresión (Figura 21B).

Dado que los niveles de expresión de varios canales K_v1 estaba alterado, el siguiente objetivo consistió en estudiar la posibilidad de que la reducción en las corrientes de K^+ , y la consecuente incorrecta computación de las señales neuronales entrantes, fueran responsables de los defectos de inervación de las neuronas callosas deficientes en Cux1. Para ello, analizamos los fenotipos axonales en cortes coronales de ratones P16 que habían sido previamente electroporados a E15.5 con el ARNhc*Cux1* junto con CAG*Kv1,3* o CAG*Kv1,2*. La sobre-expresión de K_v1 (tanto $K_v1,3$ como $K_v1,2$) rescató, en gran medida, los defectos de inervación causados por la disminución de la expresión de *Cux1* (Figura 21C paneles inferiores y D). Concluimos por lo tanto, que la modulación de la expresión de los canales K_v1 por parte del FT Cux1 es un mecanismo biológico de control de las proyecciones del CC.

Todos los resultados apuntaban a que Cux1, mediante el control de la expresión de los canales K_v1 , es determinante para la correcta computación de las señales entrantes, y esto a su vez para la conectividad entre los dos hemisferios cerebrales en el CC. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, procedimos a registrar electrofisiológicamente neuronas control y con Cux1 disminuido que sobre-expresaban $K_v1,3$ o *Kir2.1*, las proteínas cuya sobre-expresión rescataba total o parcialmente los fenotipos originados por la disminución de Cux1. Obtuvimos registros de las respuestas de neuronas de las láminas II-III de rodajas agudas de animales P16 que habían sido previamente electroporadas con los correspondientes plásmidos (ARNhcControl o ARNhc*Cux1* junto con CAG*Kir2.1* o CAG*Kv1,3*). Como puede comprobarse en la figura 22A, las recuperaciones funcionales obtenidas, previamente descritas, no se debían a una recuperación del número de PA lanzados por estas neuronas, es decir, no existía un rebote homeostático debido a una excesivamente disminuida excitabilidad que estuviera recuperando el número de PA en respuesta a estímulos entrantes. No solo esto, sino que las neuronas capaces de recuperar los fenotipos contralaterales inducidos por la disminución de Cux1 lanzaban un número de PA aún menor que las neuronas deficientes en Cux1. Este hecho junto con la observación de que la sobre-expresión de $K_v1,3$ en neuronas WT produce una curva de excitabilidad intermedia entre la de las neuronas control y aquellas con Cux1 disminuido (Figura 22B), mientras que su inervación contralateral no se ve afectada (Figura 22C), nos permitió concluir que el número de PA lanzado por las neuronas, pese a tener un efecto en el patrón de conectividad en la PC contralateral, no es fundamental para la estabilización de sinapsis entre neuronas de las láminas II-III de ambos hemisferios a través del CC.

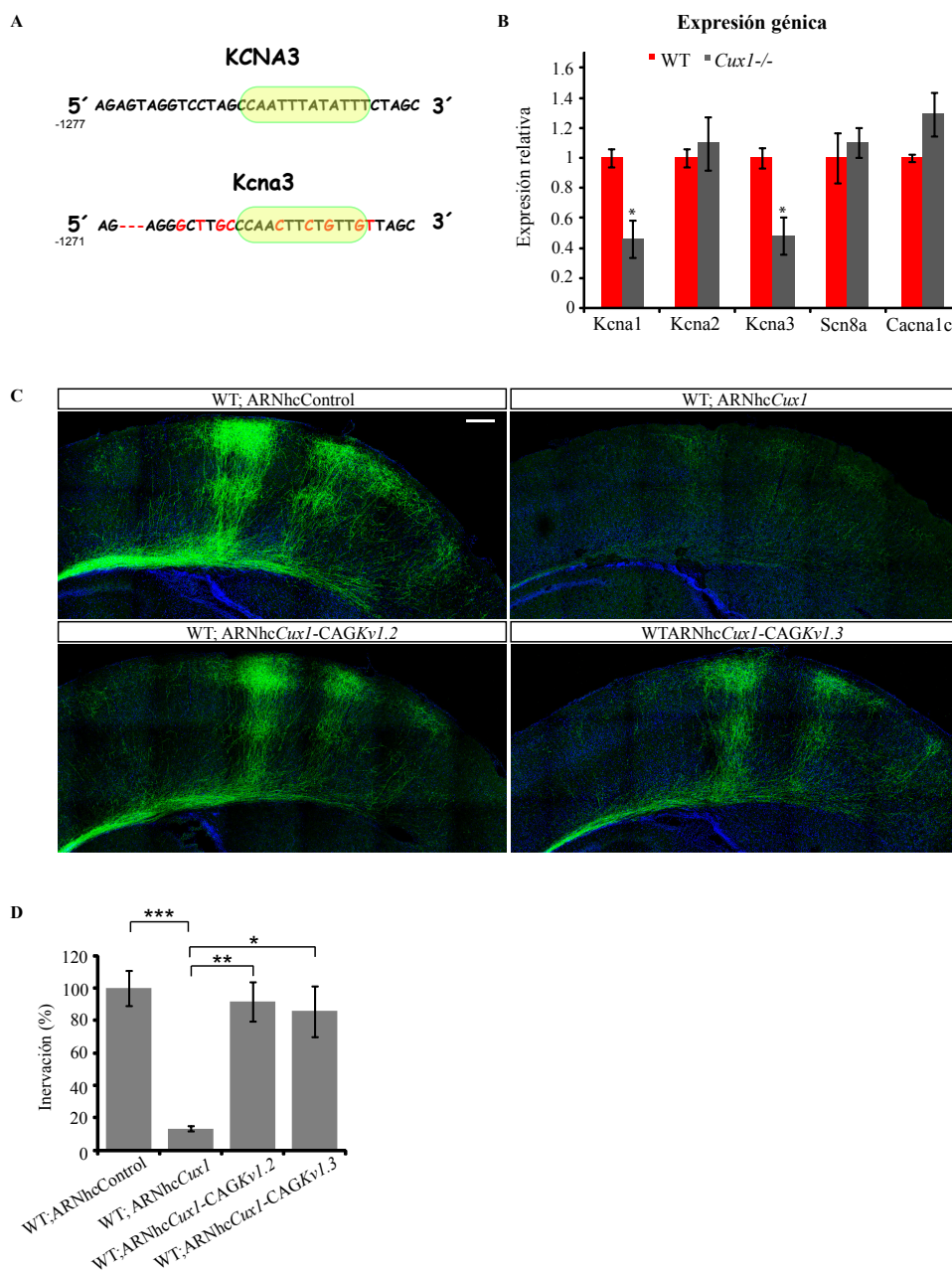


Figura 21: Los defectos en conectividad callosa asociados a *Cux1* son debidos a una expresión disminuida de los canales iónicos $K_v1,1$ y $K_v1,3$. A) Sitios de unión de *Cux1* en el gen $K_v1,3$ de humanos (superior) y murino (inferior). B) Análisis por q-PCR de distinto transcritos en neuronas WT y *Cux1*^{-/-}. El ADNc fue obtenido de cultivos a 10 DIV. Los resultados están normalizados con los datos del WT. P valor del test de Student * $\leq 0,05$. C) Fotografías en mosaico mostrando la invasión contralateral de cerebros P16 ectoporadas a E15.5 con los constructos indicados. Tanto la sobre-expresión de los canales $K_v1,2$ como $K_v1,3$ rescatan la invasión del CC en animales con neuronas deficientes en *Cux1*. Barra=250 μ m. D) Cuantificación de la invasión contralateral en relación al tamaño del área electroporada y normalizada a los cerebros WT;ARNhcControl. P valor del test de Student * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,03$; *** $\leq 0,01$.

Existen pequeños cambios en las propiedades activas y pasivas entre las neuronas control y las deficientes en *Cux1* (Figura 20A), pero ninguno de ellos es responsable del defecto de inervación contralateral, ya que la recuperación de las inervaciones contralaterales gracias a la sobre-expresión de *Kir2.1* o de $K_v1,3$ no correlaciona con recuperación de ninguno de los parámetros alterados en las neuronas con *Cux1* disminuido (Figura 20A). Basándonos en estas evidencias, concluimos que el fallo en las inervaciones del hemisferio contralateral por parte de neuronas deficientes en *Cux1* es independiente de la reducida excitabilidad que estas neuronas tienen. La causa de la reducción de excitabilidad es todavía desconocida para nosotros y habrá que investigarla de forma independiente. Probablemente se deba a la más que probable regulación de otros canales iónicos por parte del FT *Cux1*, o al efecto que este FT tiene sobre el compartimento dendrítico.

Todo apuntaba a que el defecto en conectividad era debido a los patrones de disparo irregulares que aparecían al disminuir la expresión de *Cux1*. Confirmando nuestra hipótesis, cuando analizamos los patrones de disparo de las neuronas deficientes en *Cux1* que sobre-expresaban *Kir2.1* o $K_v1,3$ comprobamos que el patrón se veía regularizado (Figura 22D); siendo el de las neuronas WT; ARNhc*Cux1*CAG $K_v1,3$ muy similar al de neuronas control. La normalización de estos patrones de disparo correlacionaba con la recuperación de la inervación de la PC contralateral, poniendo de manifiesto la relevancia de la computación neuronal de las señales entrantes para la generación de una respuesta axonal que eficientemente establezca el patrón de conectividad de las neuronas de la lámina II-III a larga distancia; sin embargo no parece ser tan esencial para la conectividad ipsilateral, apuntando a que distintos mecanismos puedan estar afectando a cada tipo de conectividad (corta *versus* larga distancia) concepto que ya ha sido sugerido en anteriores estudios en otras estructuras del SN (Kirkby et al., 2013). Pudimos observar que, tanto la sobre-expresión de *Kir2.1* como de $K_v1,3$ en neuronas deficientes de *Cux1* recuperaba la frecuencia del primer ITP (Figura 22E), lo que implica que el FT *Cux1* podría estar definiendo la identidad callosa de las neuronas corticales de la lámina II-III a través de la definición de un patrón inicial de PA concreto. De la misma forma, cuando analizamos el L_v de estas neuronas comprobamos que tanto $K_v1,3$ como *Kir2.1* recuperaban los valores de L_v disminuyéndolos hasta los de las neuronas control (Figura 22F), es decir, regularizando el patrón de disparo. Es importante resaltar que, pese a la similitud de primer ITP y L_v entre las neuronas WT;ARNhc*Cux1*CAG $K_v1,3$ y las WT;ARNhc*Cux1*CAG*Kir2.1*; estos parámetros no describen todos los aspectos del patrón de disparo: mientras que las primeras disparan continuamente durante todo el tiempo en el que se inyecta corriente, las segundas concentran los disparos en un periodo temporal y al final de la inyección de corriente parece que están exhaustas y ya no disparan más PA (Figura 22D). Esta diferencia podría ser determinante para los diferentes niveles a los que cada constructo es capaz de rescatar el fenotipo de inervación contralateral.

Concluimos por lo tanto que, el patrón de disparo de PA es básico para el establecimiento de las conexiones en el CC, siendo un patrón regular necesario para que estas se establezcan. Nuestros resultados apuntan a que los patrones de disparo neuronales están determinando un nivel más de identidad neuronal clave en la conectividad entre las neuronas. *Cux1* controla la formación de estos patrones regulares en las neuronas callosas de las láminas II-III a través de la modulación de la expresión de los canales K_v1 .

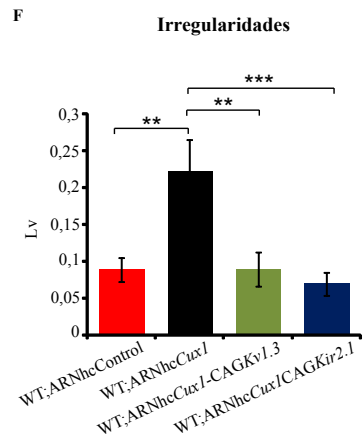
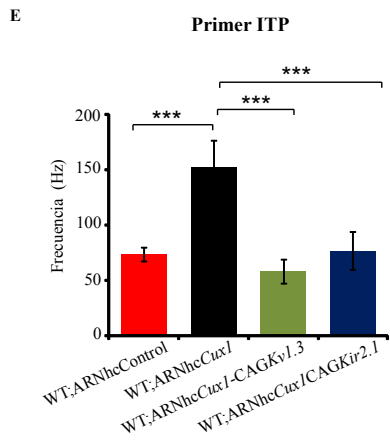
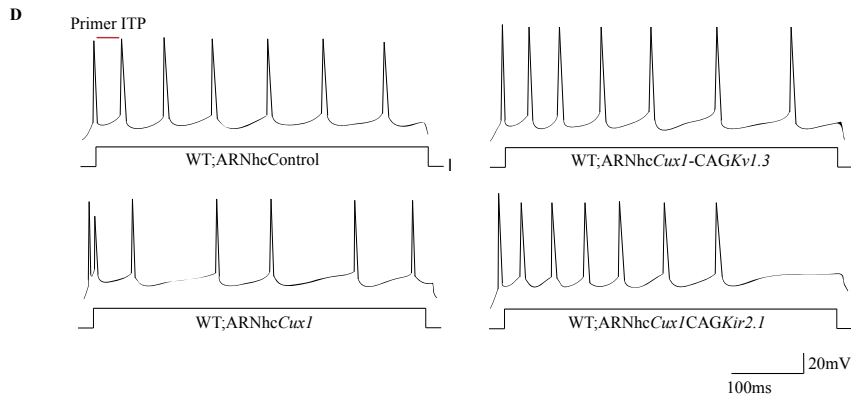
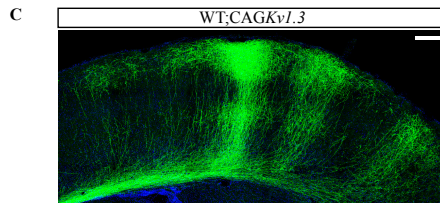
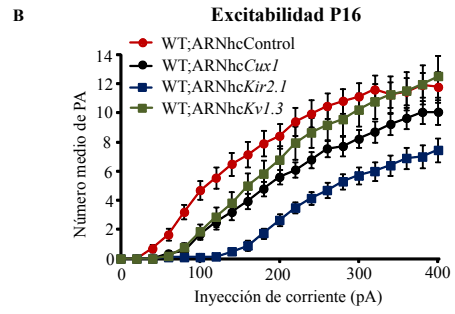
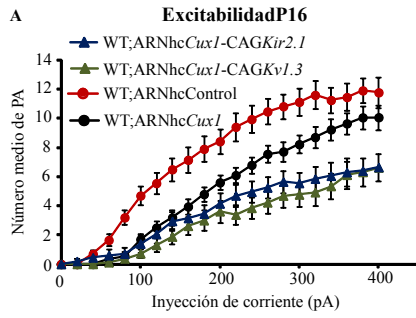


Figura 22: Los fallos de inervación por las neuronas deficientes en *Cux1* son debidos a patrones irregulares y elevadas frecuencias iniciales. A) Respuesta neuronal, en término de número de PA, en respuesta a inyecciones de corrientes crecientes (0-400 pA) de neuronas de rodajas agudas a día P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. WT;ARNhc*Cux1*, n=20 versus WT;ARNhcControl, n= 20; $F(2,753) = 74.03$; $p < 0.0001$. WT; ARNhc*Cux1*, n= 20 versus WT;ARNhc*Cux1*CAG $K_v1,3$, n=26; $F(2,938) = 77.81$; $p < 0.0001$. WT;ARNhc*Cux1* versus WT;ARNhc*Cux1*CAG*Kir2.1*, n=20; $F(2,812) = 51.27$; $p < 0.0001$. B) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA) de neuronas de rodajas agudas a P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. Por los resultados mostrados en A y B podemos concluir que el menor número de PA en respuesta a inyecciones de corriente determinadas no justifica el fallo en la inervación contralateral, ni la recuperación es debida a la normalización de esta frecuencia. C) Fotografía en mosaico del hemisferio contralateral de un cerebro P16 electroporado a E15.5 con los constructos indicados. La sobre-expresión de $K_v1,3$ altera la inervación contralateral aumentando la densidad de inervación. Barra = 250 μm . D) Representación de un tren de disparos típico de neuronas de cerebros P16 con los constructos indicados electroporados a E15.5. Las irregularidades y frecuencia del primer ITP presentes en neuronas deficientes en *Cux1* parecen normalizarse al sobre-expresar $K_v1,3$ o *Kir2.1*. E) Gráfica representativa de la frecuencia del primer ITP presente en trenes de disparo de 9 PA. Tanto la sobre-expresión de $K_v1,3$ como de *Kir2.1* en neuronas deficientes en *Cux1* disminuyen la frecuencia del primer ITP hasta los niveles de las neuronas control. Los datos se muestran como la media \pm EEM. WT;ARNhc*Cux1*, n=27; WT;ARNhControl, n=25; WT;ARNhc*Cux1*CAG $K_v1,3$, n=15; WT;ARNhc*Cux1*CAG*Kir2.1*, n=14. P-valor del test t de Student* * * ≤ 0.01 . F) Gráfica representativa del L_v presente en los trenes de 8 PA. La sobre-expresión de $K_v1,3$ y de *Kir2.1* en neuronas deficientes en *Cux1* regulariza el patrón de disparo. Los datos muestran la media \pm EEM. ARNhc*Cux1*, n=15; ARNhcControl, n=20; WT;ARNhc*Cux1*CAG $K_v1,3$, n=9; WT;ARNhc*Cux1*CAG*Kir2.1*, n=14. P-valor del test t de Student ** ≤ 0.03 ; * * * ≤ 0.01

3.4. La modulación de las corrientes iónicas y de los patrones de disparo en el segmento inicial del axón regula las conexiones a larga distancia del cuerpo calloso.

Nuestros datos demostraban que los canales K_v1 son determinantes para la conectividad del CC, e indicaban que la regulación de los patrones de disparo por los canales K_v1 tiene un papel esencial en la estabilización axonal contralateral, aunque no podíamos descartar la contribución de otros efectos mediados por los K_v1 . Para estudiar la relevancia de los patrones de disparo en la estabilización contralateral de los axones del CC decidimos alterarlos directamente en las neuronas de las láminas II-III. El SIA es el lugar físico donde se generan los PA. En él existen agrupaciones de Na_v , K_v y de otros canales en alta densidad. Su composición es específica de tipo neuronal y depende del estado de diferenciación (Bender & Trussell, 2012; Kole & Stuart, 2012). Estudios recientes indican que la composición de canales iónicos en el SIA regula diversos aspectos de los PA y los modos de disparo (Bender & Trussell, 2012). Los frutos acumulados parecían indicar que la computación en el SIA, mediado por los canales K_v1 , es un mecanismo de desarrollo que permite el establecimiento de las conexiones axonales a larga distancia en el CC. No obstante, debido a que los canales de K^+ K_v1 no solo se localizan en el SIA, sino también en otras estructuras neuronales, el siguiente paso fue abordar la influencia del SIA, de su excitabilidad y computación, en el desarrollo y refinamiento axonal contralateral. Para ello disminuimos la excitabilidad directamente de dicha estructura y analizamos las consecuencias. La sobre-expresión del dominio de unión a anquirinaG de la cola intracelular de los canales Na_v , compite con las proteínas Na_v endógenas por la localización en el SIA. Este hecho provoca una alteración en la combinación de canales que compone el SIA, una disminución en el número de canales Na_v disponibles y, resultado de esto, una excitabilidad en el SIA disminuida. Usamos una construcción quimérica previamente descrita del canal rodopsina-2 (ChR2-YFP- $Na_vII - III$). La sobre-expresión ectópica de esta proteína bajo el promotor de sinapsina está altamente restringida al SIA, y resulta en la disminución de la excitabilidad sin llegar a impedir el disparo o afectar la viabilidad celular. El control optogenético del disparo de PA con ChR2-YFP- $Na_vII - III$ es inútil debido a la baja magnitud de respuesta lumínica evocada por ChR2 (Grubb & Burrone, 2010c).

La sobre-expresión de la cola citoplasmática de Na_v en las neuronas de las láminas II-III perturbó el patrón normal de inervación de los axones del CC en el hemisferio contralateral (Figura 23 A), sin producir este efecto en las inervaciones ipsilaterales. Produjo una gran disminución de la densidad axonal inervando la PC contralateral, pero también afectó en gran medida el patrón de inervación en esta (Figura 23A). Observamos una disminución de las frecuencias de disparo de forma similar a como ocurría en las neuronas deficientes en $Cux1$ (Figura 23B); y de igual manera el análisis de los patrones de disparo de neuronas WT electroporadas con $SynNa_vII - III$ reveló la existencia de irregularidades en el patrón de PA similares a las encontradas en las neuronas deficientes en $Cux1$ (Figura 23C) con la aparición de un doblete de PA inicial de alta frecuencia (Figura 23C, D) y de numerosas irregularidades en el patrón de PA (Figura 23C, E). Esto pone de manifiesto la relevancia de la computación de las señales entrantes en el SIA y de los modos de disparo en las neuronas callosas para la estabilización de sinapsis en la corteza contralateral.

La co-electroporación de este constructo junto con ARNhc $Cux1$ rescata parcialmente el defecto de inervación del CC en el lado contralateral (Figura 23A) así como su patrón de disparo (Figura

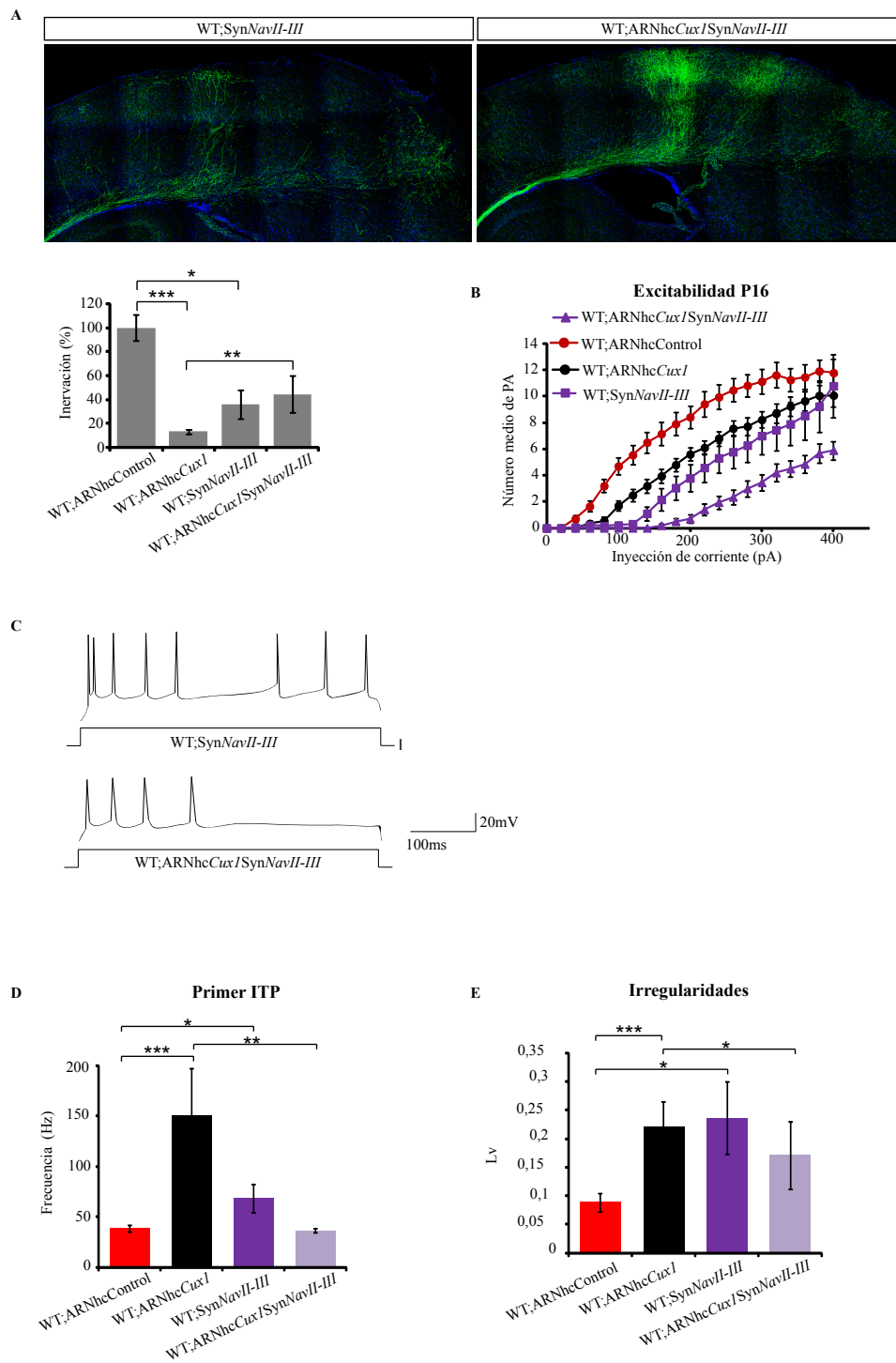


Figura 23: La modulación de los patrones de disparo por *Cux1* es un mecanismo de desarrollo regulatorio de las proyecciones del CC de las neuronas de la lámina II-III.

A) Fotografía en mosaico mostrando el hemisferio contralateral de animales a P16 electroporados a E15.5 con los constructos indicados. *SynNa_vII – III* localiza en el SIA donde compite con las proteínas *Na_v* endógenas por su localización, disminuyendo el número de canales disponibles. La sobre-expresión de *SynNa_vII – III* en neuronas WT disminuye la inervación contralateral y rescata las inervaciones del CC en neuronas deficientes de *Cux1*. Barra=250 μ m. La gráfica junto a las fotografías muestra la cuantificación de las inervaciones contralaterales en relación al área electroporada y normalizada a los cerebros control. P-valor del test t de Student: * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.03 ; *** ≤ 0.01 B) Respuesta neuronal, en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corrientes crecientes (0-400 pA), de neuronas de rodajas agudas a P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. WT;ARNhc*Cux1*, n= 20 versus WT;ARNhc*Cux1 SynNa_vII – III*, n=20; $F(2,812) = 282.8$; $p < 0.0001$. La sobre-expresión de *SynNa_vII – III* disminuye las frecuencias de disparo en neuronas WT y en aún mayor medida en neuronas deficientes en *Cux1*. C) Representación de un tren de disparos típico de neuronas de cerebros P16 con los constructos indicados electroporados a E15.5. La sobre-expresión de *SynNa_vII – III*, y consecuente alteración del SIA, genera patrones de características similares a las observadas en las neuronas deficientes en *Cux1*; sin embargo, al co-electroporar este constructo junto con el ARNhc*Cux1* dichas irregularidades se rescatan parcialmente. D) Gráfica representativa de la frecuencia del primer ITP presente en trenes de disparo de 9 PA. La sobre-expresión de *SynNa_vII – III* genera una elevada frecuencia inicial de PA similar a la observada en las neuronas deficientes en *Cux1*; esta es recuperada en las neuronas deficientes en *Cux1* que sobre-expresan *SynNa_vII – III*. ARNhc*Cux1*, n=21; ARNhcControl, n=22; *SynNa_vII – III*, n=23; ARNhc*Cux1 SynNa_vII – III*, n=10. Los datos se muestran como la media \pm EEM. P-valor del test-t de Student * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.03 ; *** ≤ 0.01 . E) Gráfica representativa del L_v presentes en los trenes de 8 PA. ARNhc*Cux1*, n=15; ARNhcControl, n=20; *SynNa_vII – III*, n=9; ARNhc*Cux1 SynNa_vII – III*, n=5. Los datos se muestran como la media \pm EEM. P-valor del test t de Student * ≤ 0.05 ; *** ≤ 0.01 .

23C): se da una total recuperación en la frecuencia del primer ITP (Figura 23D) y el valor de L_v disminuye a niveles intermedios entre las neuronas control y las deficientes en Cux1 (Figura 23E), probablemente debido a una normalización de las proporciones de canales (Na_v y K_v principalmente) o a la aparición de una combinación de canales iónicos que permita la aparición de patrones efectivos para la inervación contralateral. Al igual que lo que sucedía con anteriores recuperaciones, la sobre-expresión de la cola citoplasmática de Na_v en neuronas deficientes de Cux1 disminuía en aún mayor medida el número de PA disparados ante estímulos entrantes (Figura 23B). Estos resultados indican que, independientemente de otras posibles funciones de los K_v1 , las neuronas deficientes en Cux1 computan aberrantemente las señales entrantes probablemente debido a una alteración de canales iónicos en su SIA. Generan patrones de disparo anormalmente irregulares que no son capaces de estabilizar las conexiones callosas en el hemisferio contralateral. Esto es debido a una disminución en la expresión de los canales de K^+ K_v1 y es responsable de la pérdida de las conexiones a larga distancia. Podemos concluir que la correcta combinación y cantidad de canales iónicos agrupados en el SIA es esencial para determinar su forma de computar las señales entrantes y generar respuestas que se transmitan eficazmente a neuronas post-sinápticas y, por lo tanto, para definir su patrón de conectividad.

En resumen, estos datos demuestran que las salidas axonales, en forma de patrones de disparo, son críticas para determinar las conexiones del CC, incluso cuando el disparo está disminuido como ocurre al sobre-expresar el canal de K^+ rectificador hacia el interior *Kir2.1*. Indican que, en neuronas de las láminas II-III, la computación en el SIA gracias a su dotación de canales iónicos durante el procesamiento de las señales entrantes y la generación de patrones regulares de disparo, son unos mecanismos regulatorios de la eficiente promoción de sinapsis a larga distancia en el CC. Cux1 influye en este mecanismo a través de la modulación de los niveles de expresión de K_v1 en la neurona.

3.5. El factor de transcripción Cux1 controla la localización neuronal del segmento inicial del axón y esta correlaciona con la correcta inervación contralateral de las neuronas callosas.

Los canales K_v1 se agrupan, entre otros sitios, densamente en el SIA, donde regulan la computación de las señales de entrada y definen la frecuencia y características del PA de salida (Bekkers & Delaney, 2001; Goldberg et al., 2008; Kole et al., 2007; Shu et al., 2007). Los axones de las neuronas deficientes en Cux1 son capaces de mantener las sinapsis ipsilaterales pero no las contralaterales, lo cual correlaciona con estudios previos mostrando que el bloqueo farmacológico de las corrientes de los canales K_v1 en el SIA aumenta la anchura de los PA y promueve la facilitación sináptica tan solo a distancias axonales cortas (Kole et al., 2007; Kole & Stuart, 2012). La posición del SIA define la excitabilidad de una neurona y muestra una plasticidad en respuesta al grado de actividad neuronal (Grubb & Burrone, 2010a). Las neuronas con una historia reciente de actividad mueven su SIA distalmente reduciendo de esta forma su excitabilidad, mientras que cuando el SIA está cerca del soma la facilidad para disparar de las neuronas, y por lo tanto su excitabilidad, es mayor (Grubb & Burrone, 2010a). Debido a que los niveles de canales K_v1 estaban disminuidos en las neuronas *Cux1*^{-/-} y su excitabilidad alterada, cabía esperar que el SIA de estas neuronas pudiera estar afectado. Para comprobar este hecho evaluamos la posición del SIA y su plasticidad *in-vitro* mediante la tinción de la proteína estructural anquirinaG.

Las células *Cux1*^{-/-} en cultivo presentaban un SIA más cercano al soma que las neuronas WT, sin ningún cambio en su longitud (Figura 24A, B). Esta posición del SIA en los cultivos neuronales *Cux1*^{-/-} corresponde con la posición que tendría en neuronas hiper-excitable. La inhibición del disparo neuronal, inducido por el tratamiento con TTX, producía una relocalización proximal del SIA en neuronas WT, como podía preverse de la respuesta plástica ante una disminución de la señal entrante (Grubb & Burrone, 2010a). No existían diferencias en la posición que el SIA tenía en neuronas *Cux1*^{-/-} sin tratar, o tratadas con TTX ni en neuronas WT tratadas con TTX, lo cual apuntaba a que la disminución de *Cux1* pudiera estar generando una disfunción del SIA o de su plasticidad (Figura 24A, B). Forzamos una condición de elevada excitabilidad neuronal mediante 4 horas y media de tratamiento, a cultivos de 12 DIV, con Bic 4-AP, tras el tratamiento previo con TTX durante 12 horas. Esta situación promovió un movimiento distal del SIA, para adaptarse a su nueva condición de excitabilidad, tanto en las neuronas WT como en las *Cux1*^{-/-} (Figura 24A, B). Esta relocalización demuestra que la aberrante posición del SIA no es debida a un bloqueo del citoesqueleto y que este es capaz de adaptar su posición en neuronas *Cux1*^{-/-} ante cambios de excitabilidad. Estos resultados manifiestan que la plasticidad del SIA en neuronas *Cux1*^{-/-} en cultivo no está afectada pese a que su posicionamiento si lo está. Esto podría explicarse bien porque las neuronas *Cux1*^{-/-} se encuentran en un cultivo en el que la excitabilidad está disminuida, lo que produciría que las neuronas tuvieran una respuesta adaptativa y acercaran el SIA al soma; o porque el anormal procesamiento de las señales entrantes en las neuronas *Cux1*^{-/-} no desencadenara una respuesta adaptativa en su SIA y relocalización distal en condiciones normales. En conjunto, estos experimentos junto con los resultados que revelan el rescate del fenotipo axonal inducido por la restauración de los patrones de disparo y la implicación del SIA para la generación de dichos patrones, apuntaban a que *Cux1* pudiera tener una función relevante en la definición de la posición y dinámica del SIA y, acorde con los resultados electrofisiológicos, apoyaban la importancia de este FT en la definición de la excitabilidad neuronal y la modulación de los patrones de disparo.

Si, tal como parece, la alteración de corrientes iónicas es responsable de los defectos de proyección axonal en neuronas deficientes en *Cux1* y es causa o consecuencia de una aberrante posición del SIA; la restauración de las corrientes de K^+ debería de ser suficiente para el rescate de la posición distal del SIA *in-vivo*. Para evaluar este hecho, analizamos la posición del SIA en neuronas de cortes coronales de animales P16 electroporados a E15.5. Mediante reconstrucciones de secciones realizadas con microscopía confocal pudimos comprobar que, en los cerebros control, el SIA adopta una posición proximal en la mayoría de las neuronas analizadas (distancia al soma menor de 3 μm en el 86,6 % de las neuronas) (Figura 24C, D). Esta situación es indicativa de su elevada excitabilidad y del estado “listo para responder” en que se encuentran la mayoría de las neuronas corticales, reflejo de la homeostasis existente en los circuitos corticales. Una pequeña, pero significativa, fracción de estas neuronas (13.4%), probablemente activas en el circuito o habiendo experimentado una historia reciente de disparos en el momento de la perfusión del animal, mostraba una posición distal del SIA (distancia al soma mayor de 3 μm) (Figura 24C, D). Estos porcentajes diferían en las secciones procedentes de animales electroporados con *CAGKir2.1*; 73,8 % de las neuronas poseían un SIA proximal, mientras que en un 26,2 % de estas la posición era distal (Figura 24D), lo cual nos indica que la probabilidad de ocurrencia de neuronas con SIA distal puede ser indicativo de alguna propiedad eléctrica de dichas neuronas. Según estos resultados, la excitabilidad de una población neuronal *in-vivo* no parecería asociarse con una posición concreta del SIA; sino que, una menor excitabilidad (como la que le corresponde a las neuronas electroporadas con *Kir2.1*) correlacionaría con una proporción mayor de neuronas con SIA distal en comparación con la existente en condi-

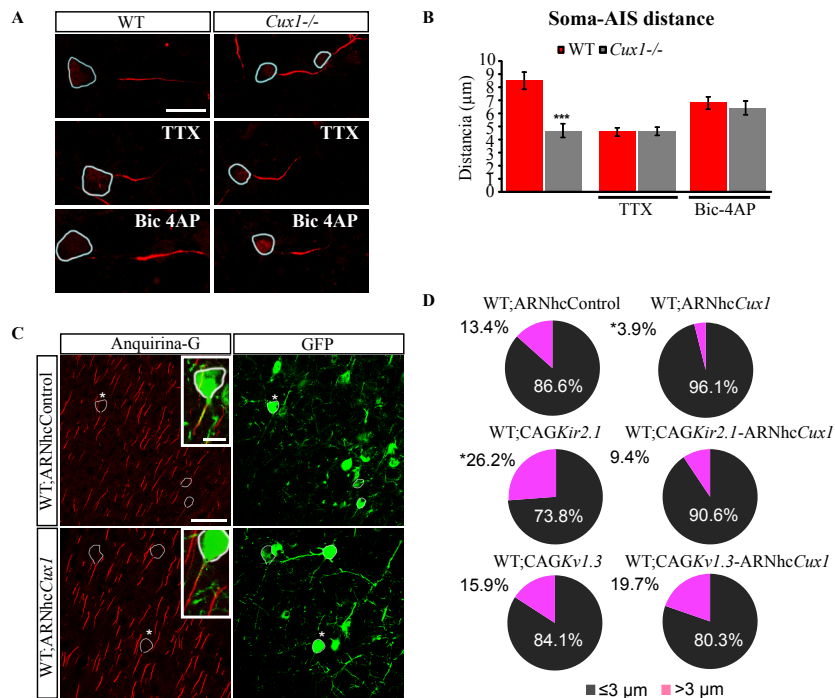


Figura 24: La posición del SIA está alterada en neuronas *Cux1*^{-/-} *textitin-vitro* y en neuronas diana del *ARNhcCux1* *in-vivo*.

A) Imágenes confocales de neuronas WT y *Cux1*^{-/-} en que se ha teñido la anquirinaG. Las neuronas pertenecen a cultivos neuronales sin tratar o tratados como viene indicado. Los somas se encuentran delineados. Barra 12.5 µm.

B) Distancia media desde el soma al SIA. TTX: tratamiento 12 horas con tetradotoxina; Bic4AP: depolarización durante 4 horas con Bic 4-AP, tras el tratamiento con TTX. A y B: *Cux1*^{-/-}, n=33; WT, n=60; WT-TTX, n=34; *Cux1*^{-/-} -TTX, n=48; WT-Bic4AP, n=38; *Cux1*^{-/-} -Bic4AP, n=41. P valor del test t de Student *** ≤0,01 comparado con el WT.

C) Imágenes confocales de neuronas a estadio P16 previamente electroporadas a E15.5 con *ARNhcControl* o *ARNhcCux1*. Barra 50 µm. AnquirinaG en rojo; GFP en verde; somas delimitados por una línea blanca. Las inserciones muestran la magnificación de las neuronas marcadas con un asterisco. Barra 12 µm.

D) Porcentaje de neuronas de cerebros P16 con SIA proximal y distal tras haber sido electroporadas con los constructos indicados. P valor del test de Fisher * ≤0,05.

ciones control; es decir, existiría una correlación poblacional entre la excitabilidad y la posición del SIA, pero no se podría predecir la posición del SIA en neuronas individuales. Consideramos que la población neuronal con SIA distal representa una fracción dinámica de neuronas que, en el momento de la perfusión, habían experimentado recientemente el movimiento homeostático del SIA en respuesta a una elevada actividad neuronal para adecuarlo a su situación y disminuir su respuesta. Por lo tanto, la frecuencia y cinética del movimiento del SIA podría correlacionar con la excitabilidad de las neuronas y con la capacidad de estas de mantenerlo en posiciones distales y proximales, y esto a su vez, podría ser reflejo del procesamiento de las señales entrantes que la neurona realiza en el SIA y que desencadena un movimiento plástico. Estos resultados apoyan descubrimientos previos *in-vitro* y sugieren que, en la corteza cerebral, existen movimientos transitorios del SIA cuya cinética correlaciona con la excitabilidad neuronal (Grubb & Burrone, 2010a). Tras la reducción de la expresión de *Cux1*, ocurría un cambio significativo en las proporciones de neuronas con SIA proximal *versus* distal: el 96,1% de las neuronas mostraron una posición proximal del SIA *versus* un 3,9% que lo tenían en posición distal (Figura 24D). Este hecho, en combinación con los experimentos *in-vitro*, descarta la posibilidad de que la posición del SIA en neuronas deficientes de *Cux1* sea debido a una disminución de la señal entrante, y apunta a que en ellas está ocurriendo una incorrecta respuesta adaptativa y re-localización del SIA. Esta localización anormal fue rescatada por la co-electroporación de *Kir2.1* (9,4% de las neuronas mostraban SIA distal) y por la co-electroporación de *K_v1,3* (19.7% poseían un SIA distal). La restauración de las corrientes de K^+ *in-vivo* en neuronas deficientes en *Cux1* normaliza la proporción de neuronas con localización distal del SIA (Figura 24D). Estos resultados correlacionan con los rescates funcionales de la inervación contralateral en neuronas deficientes en *Cux1* y recalcan el papel esencial de las corrientes de K^+ y de el FT *Cux1*, en las funciones del SIA.

4. *Cux2* tiene un efecto autónomo celular sobre la conectividad a través del cuerpo calloso y regula la excitabilidad neuronal en las láminas II-III.

4.1. *Cux2* afecta el patrón de inervación contralateral a través del CC.

Nuestro siguiente objetivo consistió en la caracterización del papel del FT *Cux2* en la conectividad entre los dos hemisferios cerebrales. Como ya habíamos podido observar en cortes coronales de cerebros procedentes de animales *Cux2*^{-/-}, este FT parecía afectar el patrón de conectividad contralateral; sin embargo nos cabía la duda de si esto pudiera ser un efecto autónomo celular y si usando una aproximación semejante a la de *Cux1* pudiéramos obtener un fenotipo más similar al resultante de la pérdida de función de *Cux1* en neuronas individuales. Distintos efectos de la pérdida de función de *Cux2* en todo el cerebro o en neuronas discretas serían compatibles si nos encontráramos ante fenómenos de competición axonal por la inervación de dianas, y nos darían información relevante sobre los mecanismos dirigiendo la conectividad inter-hemisférica. Para abordar esta cuestión analizamos el fenotipo de animales WT electroporados a E15.5 con ARNhc *Cux2* para compararlo con el presente en los animales *Cux2*^{-/-}. Pudimos comprobar que al eliminar este FT en las neuronas piramidales de las láminas II-III el fenotipo que obteníamos era intermedio entre aquel que obtuvimos en los *Cux2*^{-/-} (Figura 25, panel intermedio izquierdo) y los animales WT. Pese a que todavía se debe cuantificar este fenotipo, parecía haber una mayor inervación de la PC así como

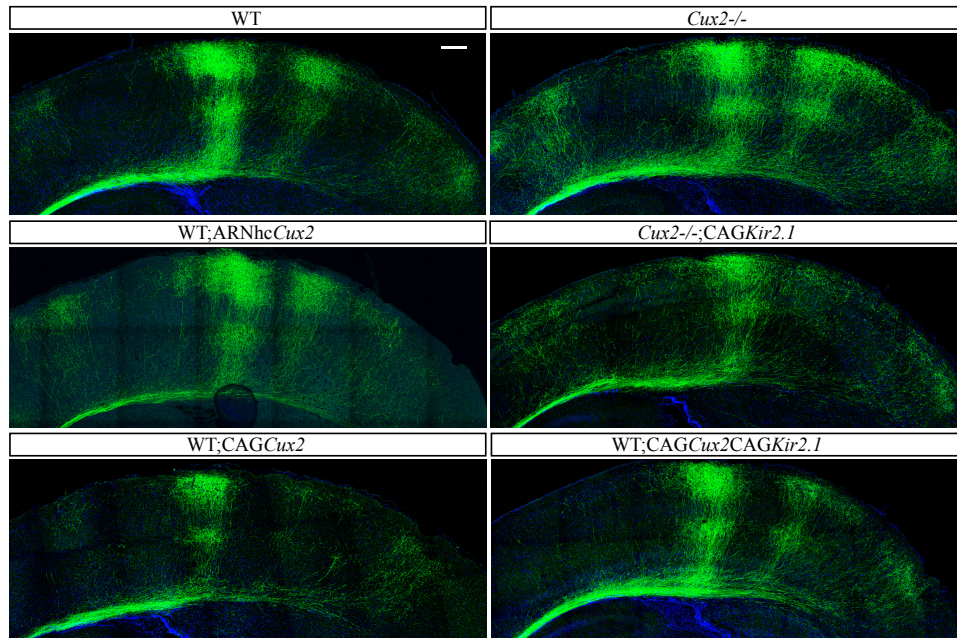


Figura 25: El FT *Cux2* afecta al patrón de invasión contralateral generando un fenotipo dependiente de actividad. Fotografía en mosaico mostrando la invasión contralateral de neuronas de cerebros P16 electroporadas a E15.5 con los constructos indicados. A la izquierda es medial, a la derecha lateral. Barra = 250 μ m. Tanto la sobre-expresión de *Cux2* como su eliminación afecta la invasión contralateral. La densidad axonal y área invadida en la PC contralateral aumenta al disminuir la expresión de este FT, mientras que disminuye al aumentar la expresión. El fenotipo de sobre-expresión de *Cux2* es recuperado al sobre-expresar *Kir2.1* y, por lo tanto, disminuir la excitabilidad neuronal.

el área invadida parecía ligeramente incrementada en comparación con los cerebros control. Este efecto intermedio podría achacarse a la no total eliminación de *Cux2* en las neuronas, o a un posible efecto no autónomo celular en los cerebros *Cux2*^{-/-}. En cualquier caso parecía que el fenotipo estaba lejos de parecerse al generado al eliminar *Cux1*, por lo que podíamos descartar un papel de *Cux2* en la competición por la invasión de dianas. Por el contrario, al inducir la sobre-expresión de *Cux2*, se producía un refinamiento muy grande de las columnas (Figura 25, panel inferior izquierdo), de forma que la segunda prácticamente desaparecía y la primera se veía reducida en tamaño y en densidad de invasión, señalando a que este FT tiene una función autónoma celular sobre la invasión de la PC contralateral, ya que el entorno de las neuronas en que este estaba expresado era WT. En contra de lo que ocurría con *Cux1*, el efecto que *Cux2* tiene sobre la invasión contralateral es opuesto en el caso de que se sobre-exprese o disminuyan sus niveles.

A continuación quisimos resolver si la función de *Cux2* en la conectividad a través del CC pudiera tener relación con la actividad eléctrica de estas neuronas; y para ello co-electroporamos *CAGKir2.1* junto con *CAGCux2* en animales WT así como *CAGKir2.1* en animales *Cux2*^{-/-}. Pudimos observar que, los animales WT; *CAGCux2* recuperaban un patrón de conectividad normal al introducirles el canal rectificador *Kir2.1* (Figura 25, panel inferior derecho); apuntando a que el efecto que *Cux2*

tiene sobre la conectividad a través del CC también es a través de la modulación de las características eléctricas de las neuronas. Al analizar los animales *Cux2*^{-/-} que sobre-expresaban *Kir2.1* el resultado que obtuvimos fue que la inespecificidad y el área de inervación en la PC contralateral parecía muy similar a los animales *Cux2*^{-/-}; sin embargo la densidad de inervación estaba algo disminuida (Figura 25, panel intermedio derecho), aunque todavía queda por cuantificar esta observación. Concluimos, por lo tanto, que *Cux2* define el correcto patrón de conexiones entre ambos hemisferios cerebrales mediante mecanismos que implican la actividad y excitabilidad de las neuronas de las láminas II-III.

4.2. Las neuronas *Cux2*^{-/-} tienen su excitabilidad alterada.

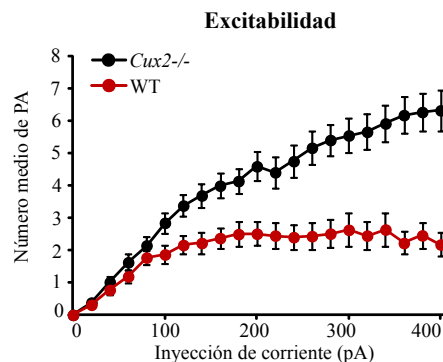
Con el fin de comprobar si efectivamente el FT *Cux2* estaba determinando la excitabilidad de las neuronas corticales de proyección callosa procedimos a analizar las características eléctricas por la técnica de patch-clamp. Al igual que hicimos con *Cux1*, en primer lugar estudiamos neuronas corticales *in-vitro* procedentes de embriones WT y *Cux2*^{-/-} de estadio E17.5 y posteriormente corroboramos los resultados en neuronas de rodajas agudas de animales P8 y P16 previamente electroporados a E15.5 con *GFP*. Con estos registros pudimos analizar las propiedades pasivas y activas de la membrana celular; y la excitabilidad somática. Realizamos registros de neuronas *in-vitro* desde el DIV 2 hasta el DIV 21 para observar el efecto de este FT durante el desarrollo. Pudimos comprobar que, basado en la similitud de los resultados de los distintos parámetros analizados, podíamos dividir los distintos DIV en que tomamos registros en tres estadios del desarrollo: temprano (DIV 2-7); intermedio (DIV 8-11) y tardío (DIV 12-17). Centramos nuestra atención en el estadio intermedio debido a que es el momento en que el cultivo se encuentra en mejores condiciones (óptima conectividad sin que todavía haya llegado a senescer). Comprobamos que las neuronas *Cux2*^{-/-} poseen alterados prácticamente todos los parámetros analizados, tanto los referentes a las propiedades activas de la membrana como a las pasivas (Figura 26A). A continuación comparamos la curva de excitabilidad obtenida ante inyecciones somáticas de corriente crecientes (0-400pA) en el estadio intermedio y observamos que las neuronas *Cux2*^{-/-} tienen una excitabilidad (en cuanto al número de PA disparados en respuesta a estímulos específicos) significativamente aumentada comparada con las neuronas WT ante inyecciones de cualquier magnitud (Figura 26B). Estos resultados destacan el papel de *Cux2* en la maduración y diferenciación eléctrica de las neuronas callosas de las láminas II-III y ponen en relieve una función semejante, aunque con consecuencias aparentemente contrarias, de *Cux1* y *Cux2* en dichas neuronas.

Al analizar estos parámetros en neuronas procedentes de rodajas agudas, para nuestra sorpresa, vimos que mientras que algunos de los parámetros analizados seguían siendo distintos entre las neuronas *Cux2*^{-/-} y las WT, otros no parecían alterados (Figura 26C). Esto ocurría tanto a P8, donde pudimos observar que el potencial de membrana en reposo, resistencia de entrada y límite del PA era mayor; como a P16, donde son menores el tiempo de ascenso del PA, la mitad del tiempo de descenso del PA, la anchura del PA y la resistencia de entrada. Al analizar la curva de excitabilidad, volvimos a encontrar algunas anomalías: mientras que a P8 vimos muy aumentada la excitabilidad neuronal a inyecciones de corriente bajas (0-100 pA) y muy disminuida después (120-400 pA) (Figura 26D); a P16 encontramos una respuesta ante cualquier inyección de corriente siempre significativamente menor a la conseguida por las neuronas WT (Figura 26E). Es interesante el hecho de haber obtenido resultados aparentemente contrarios en los cultivos *in-vitro* frente a los registros en rodajas agudas. Podría deberse al simple hecho de que *in-vitro* falten numerosas señales que *in-vivo* le llegan a las

A

DIV8-11	<i>Cux2</i> ^{-/-}	WT	p-valor
Potencial de membrana en reposo (mV)	-66.7 ± 1.7	-55.3 ± 1.3	8.5*10 ⁻⁷
Resistencia de entrada (MΩ)	590.4 ± 43.7	557.8 ± 34.1	0.8
Capacitancia (pF)	77.6 ± 6.2	65 ± 4.5	0.1
Umbral de disparo (mV)	-30 ± 0.5	-24.1 ± 1.1	1.1*10 ⁻⁵
Amplitud (mV)	48.3 ± 1.7	35.4 ± 1.6	2.3*10 ⁻⁷
Tiempo de ascenso del PA (ms)	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1	0.04
Mitad del tiempo de descenso (ms)	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1*10 ⁻³
Anchura del PA (ms)	2.6 ± 0.3	3.6 ± 0.2	4.8*10 ⁻³

B

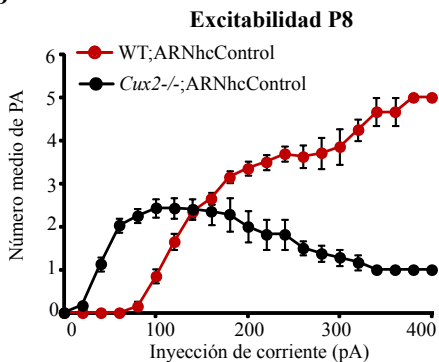


C

P8	<i>Cux2</i> ^{-/-} ; ARNhcControl	WT; ARNhcControl	p-valor
Potencial de membrana en reposo (mV)	-60.5±1.5	-105.1±2.7	2.2*10 ⁻¹¹
Resistencia de entrada (MΩ)	749.6±36.5	561.2±47.3	3.1*10 ⁻³
Capacitancia (pF)	62.2±4.2	68.9±5.4	0.34
Umbral de disparo (mV)	-25.7±0.7	-33.2±1	3.37*10 ⁻⁷
Amplitud (mV)	49.8±1.8	49.2±3	0.86
Tiempo de ascenso del PA (ms)	2.1±0.2	2±0.1	0.68
Mitad del tiempo de descenso (ms)	3±0.2	3.1±0.2	0.68
Amplitud del PA (ms)	4.2±0.3	4.4±0.3	0.69

P16	<i>Cux2</i> ^{-/-} ; ARNhcControl	WT; ARNhcControl	p-valor
Potencial de membrana en reposo (mV)	-69.9±1.1	-70.7±1.8	0.7
Resistencia de entrada (MΩ)	277.4±28.5	521.9±36.7	5.1*10 ⁻⁶
Capacitancia (pF)	116±9.3	100.8±6.2	0.2
Umbral de disparo (mV)	-30.7±0.8	-31.1±0.8	0.8
Amplitud (mV)	67.3±1.9	68.1±3.3	0.9
Tiempo de ascenso del PA (ms)	1.1±0.04	1.4±0.07	6.1*10 ⁻⁴
Mitad del tiempo de descenso (ms)	1.6±0.05	1.9±0.1	2.3*10 ⁻²
Anchura del PA (ms)	2.2±0.07	2.7±0.2	1*10 ⁻²

D



E

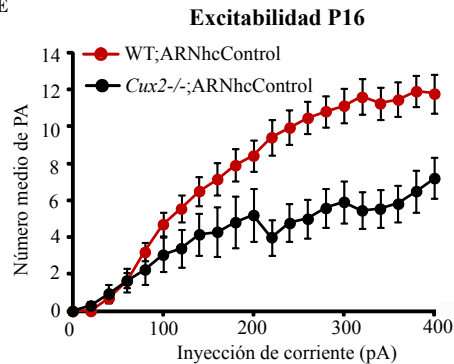


Figura 26: A) *Propiedades activas y pasivas de membrana de neuronas WT y Cux2^{-/-} cultivadas in-vitro entre 8 y 11 días. P-valor del test t de Student comparando neuronas WT y Cux2^{-/-}. Salvo la resistencia de entrada y la capacitancia todas las propiedades analizadas se encuentran alteradas en las neuronas Cux2^{-/-}. B) Respuesta neuronal en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA), de neuronas de 8-11 DIV. La excitabilidad de neuronas Cux2^{-/-} está aumentada en comparación con las WT. C) Propiedades activas y pasivas de membrana de neuronas en rodajas agudas a P8 y P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. P-valor del test t de student comparando neuronas WT;ARNhcControl con Cux2^{-/-};ARNhcControl. D) Respuesta neuronal en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA) de neuronas de rodajas agudas a P8 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. Se puede observar que a inyecciones bajas de corrientes las neuronas Cux2^{-/-} son más excitables, pero a inyecciones altas este comportamiento se invierte. E) Respuesta neuronal en término de número medio de PA, en respuesta a inyecciones de corriente creciente (0-400 pA), de neuronas de rodajas agudas a P16 electroporadas con los constructos indicados a E15.5. En este estadio las neuronas Cux2^{-/-} presentan una frecuencia de disparo de PA menor en comparación con las neuronas control ante cualquier inyección de corriente.*

neuronas y condicionan su respuesta; pero también podría ser debido a que el estadio registrado *in-vitro* no se corresponda con el registrado en rodajas agudas. En estas últimas parece que la excitabilidad de las neuronas *Cux2^{-/-}* con respecto a las control varía a lo largo del desarrollo, por lo que cabría preguntarse si antes de P8 podríamos llegar a encontrar un momento en que las neuronas *Cux2^{-/-}* tuvieran mayor excitabilidad que las control. Se requiere por lo tanto todavía un estudio más detallado sobre el efecto de este FT sobre la excitabilidad neuronal. El conjunto de estos resultados nos hace concluir que, probablemente, el FT *Cux2* esté modulando la respuesta eléctrica neuronal a través del control de diferentes factores expresados distintamente a lo largo del desarrollo neuronal o bien regula elementos cuya influencia sobre la excitabilidad neuronal fluctúa durante el desarrollo. Esta alteración en el número de PA lanzados por las neuronas en respuesta a las señales entrantes es crucial para el establecimiento del patrón de inervación contralateral correcto. De los resultados obtenidos con *Cux1* y de lo que se conoce con *Kir2.1* suponemos que es la mayor excitabilidad temprana la que permite una inespecificidad a la hora de invadir la corteza contralateral. Esta invasión exhuberante, por alguna razón todavía desconocida por nosotros aunque probablemente también relacionada con las características eléctricas y los disparos de las neuronas deficientes en *Cux2*, no es refinada suficientemente posteriormente en el desarrollo, resultando en un patrón final de inervación ampliado en área y cantidad.

Discusión.

1. Coordinación entre factores de transcripción: Un nivel más de complejidad en la regulación de la transcripción génica.

La expresión diferencial de grupos de genes define las funciones que va a cumplir un tipo celular, así como su forma de responder a los estímulos del medio. Gracias a esta capacidad de especialización celular es factible la existencia de los seres vivos como organismos complejos con capacidades muy diversas. El SN aparece durante la evolución con el objetivo de habilitar a los individuos a interactuar con el medio que les rodea, aumentando así sus posibilidades de supervivencia. Este permite la identificación de estímulos externos y su procesamiento para generar una respuesta óptima. A lo largo de la evolución, la complejidad del SN, en términos de la composición celular en él existente, ha ido aumentando permitiendo a los seres la interpretación de un mayor número de estímulos externos, así como un mayor número de comportamientos y complejidad de estos. La capacidad cognitiva es la máxima representación de esta complejidad funcional, culminando en los seres humanos. Estas conductas con tal alto grado de complejidad y especialización son únicamente viables gracias a la coordinación de un incontable número de tipos neuronales diferentes. Pero, para poder llegar a comprender como todos estos comportamientos complejos pueden darse, una estrategia fundamental es volver al origen, es decir, a cómo ocurre la expresión diferencial de los grupos de genes que posibilitan la existencia de tal diversidad de tipos celulares.

Actualmente se sabe que los FT son proteínas con la capacidad de regular, tanto positiva como negativamente, la expresión de genes individuales a través de mecanismos muy diversos (Maston, Evans, & Green, 2006). Pueden actuar sobre distintos genes de diferente manera, pero más interesante es el hecho de que pueden regular el mismo gen de distinta forma en función del momento espacio-temporal en que sea activado (Bansal, Kumar, & Yella, 2014; de Thonel, Le Mouel, & Mezger, 2012; Ishihama, 2012; Vaquerizas, Kummerfeld, Teichmann, & Luscombe, 2009; Wilczynski, Liu, Yeo, & Furlong, 2012). De todo esto cabe deducir la elevada complejidad en la definición de la identidad celular, por otro lado evidente dado los limitados recursos que existen en la célula y la gran diversidad de estas en un organismo. La comprensión de las causas que determinan la expresión de FT y de la forma en que estos actúan regulando la expresión génica está todavía incompleta, y es fundamental para llegar a conocer la diversidad celular y, por ende, los mecanismos que gobiernan las capacidades de los organismos. A lo largo de esta tesis hemos pretendido contribuir en el avance sobre el conocimiento de estos FT, en concreto *Cux1* y *Cux2*, y cómo estos se regulan y a su vez regulan otros procesos.

Cada vez más grupos de investigación ponen su esfuerzo en la identificación de la combinación de FT que determinan las distintas poblaciones celulares. Se sabe que cuanto más cercanas sean dos poblaciones, mayor es la dotación de FT que comparten (Arlotta et al., 2005; Molyneaux et al., 2005; Shoemaker & Arlotta, 2010), lo cual resulta especialmente evidente en el SN, donde co-existen una infinidad de poblaciones y sub-poblaciones neuronales, coordinadas entre sí para poder cumplir las múltiples funciones. De esta manera, cada población neuronal se caracteriza por la expresión de un conjunto de FT; aquellas pertenecientes a la corteza cerebral compartirán un grupo de FT concreto; dentro de una misma lámina, otro grupo adicional de FT determinará su localización y así sucesivamente se irá definiendo la identidad de cada neurona (Dino P Leone, 2008; Greig, Woodworth, Galazo, Padmanabhan, & Macklis, 2013; McConnell, 1990; Srinivasan et al., 2012).

Recientemente fue identificada la forma en que el gen *Arc* modula su expresión en respuesta a actividad. Se vió que los FT CREB, MEF2 y SRF actúan conjuntamente en respuesta a la activación neuronal para inducir la expresión de dicho gen. Se unen a una región de, aproximadamente, 100 pb, 5kb por encima del sitio de iniciación de la transcripción al que denominaron SARE (Kawashima et al., 2009; Masatoshi Inoue, 2010). Debido a la complejidad de tal mecanismo de regulación y a su novedad y posibles implicaciones, nos pareció relevante estudiar si esto sería un caso aislado o más bien un grado más de complejidad en cuanto a la definición de identidad neuronal. En este último caso, de ahora en adelante no solo tendríamos que fijarnos en la asociación de la expresión de un gen y un FT, sino que deberíamos ir un paso más allá y mirar las posibles combinaciones de FT asociados a la expresión de un gen específico en condiciones determinadas, así como para la iniciación de respuestas transcripcionales apropiadas a situaciones biológicas determinadas. Si pudiéramos descifrar estos códigos, podríamos encontrar reglas más sencillas en cuanto a la definición de identidad en base a las circunstancias espacio-temporales de las neuronas y las consecuencias del fallo de los componentes de la cadena. Gracias al uso de diversas herramientas bio-informáticas, así como de estudios biológicos pudimos concluir que, efectivamente, tal grado de complejidad existe. La región SARE es, al menos, una de las responsables de la activación del programa transcripcional en respuesta a la actividad neuronal. Esto es de gran importancia, pues nos permite revelar la identidad de numerosos genes implicados en plasticidad y memoria, previamente desconocidos. Nos abre puertas, no solo para la identificación de mecanismos de respuesta a actividad desconocidos anteriormente, sino para la identificación de candidatos que puedan estar fallando en enfermedades neurológicas debidas a fallos en la plasticidad y en la actividad neuronal.

2. Importancia del uso de herramientas bio-informáticas de forma complementaria a la aproximación científica clásica.

La informática es una ciencia joven y, sin embargo, la revolución que ha supuesto en el desarrollo de la sociedad habría sido inimaginable de otra manera. En 1957, Karl Steinbuch añadió, por primera vez en la historia, dicha palabra en su escrito “Informatik: Automatische Informationsverarbeitung” (Informática: procesamiento automático de información). El diccionario de la Real Academia Española define el término como “el conjunto de conocimientos científicos y técnicas que hacen posible el tratamiento automático de la información por medio de ordenadores”. En biología, Margaret Dayhoff es una de las pioneras de la bio-informática, cuya obra será el origen de las matrices de sustitución PAM y de las actuales bases de datos de proteínas.

Es indudable, y a veces imperceptible, el papel de la bio-informática en el desarrollo científico y su facilitación. Sin ir más lejos, es la base que permite el funcionamiento de PubMed (del NCBI), de programas para el diseño de cebadores como Primer3Plus, o del análisis rápido e indoloro de secuencias genéticas. Cada vez son más aceptadas y apreciadas las herramientas bio-informáticas para el estudio de problemas científicos *per-se*, lo cual está permitiendo, en la comunidad científica, un rápido avance y facilitando la investigación sustancialmente. Debido al enorme progreso que se está haciendo en todos los campos biológicos, se está produciendo una cantidad de información difícilmente manejable por nosotros. Por esta incapacidad, estamos pasando inadvertidos, en numerosas ocasiones, muchas relaciones y conclusiones de otra forma evidentes. Aquí es donde entran en juego las herramientas bio-informáticas. Programas generados, en base a datos experimentales, específicamente para la resolución de los problemas básicos de laboratorio, pero con una aplicación

de forma masiva que nos permite sacar conclusiones a nivel global. Nos facilitan la estandarización de la información y posterior análisis, generando resultados sorprendentes y abriendo caminos que habrían sido impredecibles.

Con este apartado pretendo llamar la atención sobre las ventajas, y necesidad, de tener la mente abierta a nuevas aproximaciones científicas. Actualmente la rama bio-informática es cada vez más potente. Generan modelos biológicos y proponen hipótesis controvertidas que, en muchos casos, terminan dando un vuelco al rumbo de la ciencia (Markram, 2006, 2008). Sin embargo, no es necesario ser bio-informáticos para aprovecharse de las ventajas que esta tiene; existen cada vez más programas y herramientas asequibles a todo el mundo, sea cual sea su bagaje, que pueden facilitar nuestro trabajo enormemente, pero, sobre todo, que nos pueden ayudar a hacer avanzar la ciencia de forma significativa.

3. Relevancia de los factores de transcripción *Cux1* y *Cux2* en la formación del cuerpo calloso.

El CC constituye el mayor tracto axonal conectando los dos hemisferios cerebrales y permite el desarrollo de las funciones cognitivas más elevadas (Leyva-Diaz & Lopez-Bendito, 2013). Su incorrecta formación se ha asociado, en humanos, con multitud de síndromes del desarrollo que afectan al cerebro (Belmonte et al., 2004; Booth, Wallace, & Happe, 2011; Paul et al., 2007). Como cabe esperar, un tracto con tal importancia tiene numerosos mecanismos de control de su desarrollo a distintos niveles (Alcamo et al., 2008; Baranek et al., 2012; Choe et al., 2012; Mizuno et al., 2010; Rash & Richards, 2001; Ren et al., 2007; Richards et al., 2004). En esta tesis doctoral cobra especial importancia el papel de la actividad neuronal.

Describimos una función de *Cux1* y *Cux2* en la regulación de las conexiones del CC. Ya en estadios post-natales tempranos podemos ver una elongación anormal de los axones pertenecientes a neuronas que no expresan *Cux1* o *Cux2*. Este hecho podría ocurrir por numerosos factores. Durante esta tesis hemos podido comprobar que ni la identidad neuronal se ve afectada ni la trayectoria que los axones siguen. Esto refleja la probable relación de estos FT con la actividad intrínseca de las neuronas, ya que es conocido el papel que la actividad espontánea independiente de estímulo juega sobre la elongación axonal (Yamamoto & Lopez-Bendito, 2012); aunque no podemos descartar que otros mecanismos celulares pudieran estar implicados en nuestros fenotipos. La actividad espontánea se ha visto relacionada directamente con los patrones de ondas de Ca^{2+} que experimentan las neuronas. Estos son fundamentales para distintos procesos del desarrollo neuronal, como la elongación axonal, incluso antes de que las neuronas reciban estímulos externos; ejerciendo un efecto diferente en función del tipo neuronal en que se originen (Gomez & Spitzer, 1999; Ming et al., 2001; Mire et al., 2012). Nuestros fenotipos axonales indicarían que la actividad intrínseca, puede que directa o indirectamente a través de las ondas de Ca^{2+} durante el desarrollo temprano, está alterada en las neuronas de la lámina II-III en ausencia de *Cux1* y *Cux2*. De la misma forma cabe preguntarse si los disparos cilíndricos y las oscilaciones gamma (ambos patrones sincronizados entre ambos hemisferios antes de que el CC se haya formado) o cualquier otro patrón de actividad eléctrica existente en la corteza cerebral durante el desarrollo temprano, pudieran estar de-sincronizados debido a una expresión disminuida de *Cux* (Blankenship & Feller, 2010; Khazipov & Luhmann,

2006; Kirkby et al., 2013; Siegel, Heimel, Peters, & Lohmann, 2012). Este hecho apuntaría a que la actividad intrínseca neuronal y las oscilaciones de actividad presentes durante el desarrollo del SN pudieran venir definidas, en parte, por el conjunto de FT que las neuronas expresan. Por desgracia, a lo largo de este trabajo no ha sido posible el abordaje de este tema; no obstante, sería novedoso y de gran relevancia encontrar un enlace entre el papel de la actividad en el desarrollo de circuitos neuronales y la expresión de FT. En el caso de que los FT modularan, a través de la expresión de distintas proteínas como canales iónicos, la actividad intrínseca neuronal, sería interesante abordar la posibilidad de que se generaran progresivamente señales de actividad circuital que guíen a las neuronas en desarrollo a su destino final, de la misma forma que existen gradientes de factores (solubles, de transcripción, etc) que determinan características básicas en cuanto a guía axonal y regionalización.

En estadios de desarrollo intermedio del CC sin embargo, empezamos a ver evidentes diferencias en cuanto al efecto que la eliminación de *Cux1* y *Cux2* producen en el desarrollo del CC. Mientras que *Cux1* parece tener una función básica para la invasión de la corteza contralateral, pues su eliminación tiene efectos drásticos sobre la invasión axonal; el rol de *Cux2* está más encaminado a la cantidad de axones y ramificaciones de estos en la PC, puede que debido a una inespecificidad en cuanto a la región de invasión o a un sobre-crecimiento/ramificación axonal. Parece que empezamos a vislumbrar funciones no redundantes sobre el mismo proceso de estos FT, situación no descrita con anterioridad en la corteza cerebral.

Donde encontramos mayores diferencias en cuanto a la función de cada uno de estos FT referido al desarrollo axonal, y que ha supuesto el tema central de esta tesis doctoral, es en estadios post-natales, cuando el patrón final de conectividad ya está definido. En este estadio podemos comprobar que, claramente, *Cux1* es esencial para el establecimiento de sinapsis y mantenimiento de dichas conexiones en la PC contralateral. *Cux2* sin embargo, parece tener una función más relacionada con el refinamiento de las conexiones entre los hemisferios cerebrales. Cabe destacar que, pese a la similitud de técnicas empleadas, el abordaje experimental ha sido distinto en cada caso. En el caso de *Cux1*, debido a la letalidad embrionaria de los ratones KO, solo ha sido posible estudiar efectos autónomos celulares de dicho FT, por lo que desconocemos el efecto que la depleción de *Cux1* pueda estar teniendo sobre neuronas y células vecinas y, más allá, sobre la conectividad que se generaría con la ausencia total de dicho FT. Queda por responder la posibilidad de que los efectos de este FT en estadios adultos puedan estar relacionados con mecanismos de competición axonal para la invasión de las dianas, hecho descrito previamente en el sistema visual y de gran interés (Gibson & Ma, 2011). En lo que se refiere al estudio de las funciones de *Cux2*, hemos podido comprobar que su efecto es autónomo celular, ya que la sobre-expresión de este FT tiene un efecto sobre la invasión contralateral, y el fenotipo encontrado en los animales *Cux2*^{-/-} y en aquellos WT en que eliminamos *Cux2* de una población concreta mediante el uso de ARNhc, es similar.

En cualquier caso, la única conclusión evidente es que ambos FT tienen un papel fundamental para la formación y mantenimiento de las conexiones entre los dos hemisferios cerebrales. La disgénesis del CC es de las pocas características patológicas que correlaciona con los DEA. El autismo se considera el extremo de un espectro de anormalidades en que los afectados presentan síndromes de diferente magnitud. Entre otros, es típico el déficit en la interacción social, comunicativa y de comportamiento; en el procesamiento de la información, empatía, en la capacidad asociativa y cohe-

rencia; etc (Baron-Cohen, 2002; Baron-Cohen, Leslie, & Frith, 1985; Minshew, Goldstein, & Siegel, 1997). Nuestros resultados indican que *Cux1* y *Cux2* podrían estar implicados en el desarrollo de este tipo de síndromes, pues la falta de uno o del otro provoca una conectividad aberrante entre los dos hemisferios. En concreto, la disminución de los niveles de expresión de *Cux1* en poblaciones neuronales callosas de las láminas II-III provoca una malformación del tracto axonal, una incapacidad de las neuronas de proyectar sus axones correctamente dentro de la PC contralateral y de inervar específicamente con sus dianas; sin embargo, los circuitos locales no parecen estar alterados. Algunos autores proponen que algo similar ocurre en individuos con síndrome autista: muestran alterada la conectividad a larga distancia, mientras que los circuitos locales se encuentran menos afectados (Belmonte et al., 2004; Just, Cherkassky, Keller, & Minshew, 2004; Khan et al., 2013; Minshew & Williams, 2007).

Estudios neuropatológicos de la corteza cerebral de individuos autistas revelan anomalías en la estructura columnar y sináptica, así como en la migración neuronal (Bailey et al., 1998; Casanova, Buxhoeveden, Switala, & Roy, 2002; Williams, Hauser, Purpura, DeLong, & Swisher, 1980). Pese a que en adultos no existen diferencias cerebrales aparentes en cuanto al tamaño entre pacientes con DEA y aquellos sanos, durante la infancia poseen una cinética de crecimiento cerebral alterada coincidente con el periodo de sinaptogénesis exuberante, arborización dendrítica, refinamiento y mielinización de los axones, que implica una disminución del periodo durante el cual el cerebro se ve expuesto a un modelaje de sus conexiones guiado por experiencia (Courchesne, Carper, & Akshoomoff, 2003). Esta exuberancia axonal y disminución del refinamiento que aparece en los pacientes con DEA parece mantenerse posteriormente en la adultez, lo cual ha hecho pensar que dicha patología podría deberse a la alteración del proceso normal de desarrollo sináptico dependiente de la experiencia, resultando en un balance entre la excitación y la inhibición del cerebro en desarrollo alterado. Esto se asemejaría a lo que ocurre en los ratones *Cux2*^{-/-}, quienes durante la invasión cortical contralateral sufren una aceleración del proceso de crecimiento y sobre-producción de ramificaciones axonales que invaden inespecíficamente una gran parte de la PC y generan un circuito maduro hiper-conectado que, suponemos, no ha llegado a refinarse correctamente.

Los DEA son muy complejos debido a la heterogeneidad de genes involucrados en su desarrollo así como la importancia de factores externos. Diversas regiones génicas (ej, 16p11.2) han sido asociadas con un mayor riesgo de padecimiento de estos síndromes. Es interesante apuntar que, estas mismas regiones, aunque con otro tipo de cambio genético, han sido asociadas al padecimiento de otros déficits cognitivos como esquizofrenia, retraso mental, hiperactividad, depresión, etc (Horev et al., 2011; Spooren, Lindemann, Ghosh, & Santarelli, 2012). Multitud de genes se han visto relacionados con el padecimiento de DEA; sin embargo, estos no parecen tener nada que ver entre sí. Cubren un amplio espectro de funciones celulares como adhesión celular, regulación de la actividad neuronal, tráfico vesicular, etc; probablemente debido a que muchas afecciones tengan un mecanismo biológico afectado común, a través de diferentes caminos. Es por ello que la posibilidad de que los FT *Cux1* y *Cux2* pudieran estar relacionados con estos síndromes es de especial relevancia, pues desvelaría todo un programa transcripcional implicado en el incorrecto establecimiento y funcionamiento de un circuito cerebral de gran importancia cuya alteración conlleva el padecimiento de diferentes patologías.

4. **Cux1 modula los patrones de disparo y las funciones del segmento inicial del axón en las neuronas de las láminas II-III.**

Diversos síndromes autistas (SFX, síndrome Rett, etc) son ejemplos de señalización sináptica alterada, por lo que la actividad neuronal podría también estarlo. En consecuencia la expresión de proteínas sinápticas desencadenada por actividad también se vería afectada. Por ejemplo, se sabe que *PCDH10* es un gen ligado a autismo y que su función está regulada por la actividad neuronal (Morrow et al., 2008; Williams et al., 2011). De la misma forma, se ha comprobado que Cux1 regula un haplotipo funcional de *ENGRAILED2* asociado al padecimiento de autismo, y que se ha visto implicado en la regulación de la conectividad cerebral y en el balance de los circuitos excitatorios/inhibitorios (Choi, Ababon, Matteson, & Millonig, 2012).

Cada vez es más evidente que la morfología de las espinas dendríticas, su densidad e incluso su dinámica de maduración está íntimamente ligada a desordenes psiquiátricos y neurológicos como DEA, etc. La cadena de señalización que permite el correcto desarrollo y función de las sinapsis está compuesta por numerosas proteínas cuya expresión o función se ve regulada por la actividad neuronal, sugiriendo que esta pueda ser una de las causas del DEA. Sin embargo, no se ha hecho quizás tanto hincapié en que la actividad neuronal procede en parte de las señales pre-sinápticas que reciben las neuronas, por lo que el desarrollo axonal, así como el correcto establecimiento de las sinapsis, procesamiento y transmisión de señales debe, por la misma razón, ser esencial en el desarrollo de estos déficits. En los cerebros autistas, la señalización excitatoria parece predominar sobre la inhibitoria, resultando en una hiper-excitabilidad que altera la formación de los circuitos corticales neuronales y genera un incorrecto procesamiento de la información (Rubenstein & Merzenich, 2003).

A lo largo de estos años, hemos investigado un mecanismo de desarrollo determinante en la conectividad axonal entre los dos hemisferios cerebrales a través del CC dependiente de Cux1. Consiste en la modulación de las propiedades del SIA y de los patrones de disparo generados en las neuronas en respuesta a las señales entrantes. Se conoce poco sobre la manera en que las neuronas codifican la información, y cómo esos códigos influyen en el desarrollo de los circuitos cerebrales. Está ampliamente aceptado que el número de PA que una neurona dispara en una ventana temporal específica conlleva información importante para la transmisión del mensaje. Sin embargo, no es tan clara la contribución de los patrones de disparo en la codificación de la información intercambiada entre las neuronas del SN (Petersen, Panzeri, & Maravall, 2009; Shinomoto et al., 2005a; Shinomoto et al., 2003; Stanley, 2013). En esta tesis hemos descrito que, para el correcto establecimiento de los axones del CC en el hemisferio contralateral, los patrones de disparo irregulares son contraproducentes. Esto implica que parte de la información que transmite la neurona pre-sináptica y que le permite estabilizar las conexiones en la corteza contralateral está contenida en el patrón temporal de los PA. En consecuencia, se desvela un nuevo mecanismo molecular potencial punto de disfunción en patologías del desarrollo en que el CC se encuentra afectado, como puede ser los DEA, en otros desórdenes que afectan a la plasticidad y en enfermedades en que el mantenimiento axonal se encuentra comprometido, o en aquellas en las que se produce pérdida de transferencia de información en el axón.

Los mecanismos mediados por actividad que dirigen el refinamiento axonal durante el desarrollo son fundamentales para la conectividad final de los circuitos del SN; sin embargo no están bien descritos. La mayoría del conocimiento actual proviene de estudios en retina, mapas sensoriales y visuales, y frecuentemente se refieren a actividad intrínseca espontánea anterior a la aparición de estímulos sensoriales. La remodelación dependiente de experiencia se piensa que está guiada por mecanismos semejantes a los que ocurren en el cerebro adulto implicados en la plasticidad sináptica, como aquellos que median la depresión a largo plazo y la potenciación sináptica, aunque muy poco al respecto ha sido demostrado (Foeller & Feldman, 2004; Huberman, 2007; Kirkby et al., 2013; Sanes & Yamagata, 2009). Nosotros hemos podido comprobar que los canales K_v1 influyen en las funciones del SIA y determinan la codificación de las entradas eléctricas en patrones temporales que permiten eficientemente la invasión de dianas contralaterales a través del CC. Esto está de acuerdo con las funciones de K_v1 previamente descritas, relacionadas con la regulación de la generación de PA y de sus frecuencias (Kole et al., 2007; Kole & Stuart, 2012; Shu et al., 2007). Las neuronas de la lámina II-III deficitarias en *Cux1* muestran frecuencias de disparo reducidas, así como expresión de K_v1 disminuida, patrones de disparo aberrantes y una localización proximal anormal del SIA. Estas neuronas no pueden mantener sus invaciones contralaterales, pero sin embargo si mantienen las sinapsis ipsilaterales, lo cual indica que probablemente los mecanismos por los que estas neuronas refinan sus conexiones ipsilaterales son distintos a los que están actuando en las contralaterales; como por ejemplo ocurre en el sistema visual, donde el refinamiento de las proyecciones contralaterales depende de la transmisión sináptica, mientras que el de las proyecciones ipsilaterales se regula por mecanismos independientes de actividad sináptica (Kirkby et al., 2013; Koch et al., 2011). En este trabajo no abordamos el origen de la reducción en la frecuencia de disparos de las neuronas deficientes en *Cux1*, que probablemente vendrá ocasionado por la alteración de otros canales iónicos, pero mostramos que esta no es la causa de los fallos de invasión producidos por estas neuronas. Sin embargo, hemos demostrado que patrones de disparo irregulares con altas frecuencias iniciales de PA implican una incapacidad para el mantenimiento de las sinapsis a larga distancia en el CC, y se traduce en una eliminación axonal excesiva. Esto indica que los patrones de disparo regulares son necesarios para la estabilización de las invaciones axonales a larga distancia en el CC y soporta estudios anteriores que muestran que la diferenciación eléctrica de las neuronas de la lámina II-III produce la regularización de los patrones de disparo (Maravall et al., 2004). Los efectos de los trenes de PA en la homeostasis de la remodelación sináptica se sabe que son específicos del tipo neuronal y que generan efectos diferentes en las distintas regiones cerebrales (Lu, Li, Zhao, Poo, & Zhang, 2007; Matveev & Wang, 2000), existiendo múltiples mecanismos de plasticidad que pueden estar traduciendo códigos incorrectos en eliminación axonal, incluyendo aquellos independientes de transmisión sináptica (Kirkby et al., 2013): Está descrito, por ejemplo, que periodos de elevada actividad pueden generar una disminución de la fuerza sináptica, inclusive en las sinapsis piramidales de las láminas II-III (Fuhrmann et al., 2002; Zucker & Regehr, 2002); otros modelos sugieren que la detección de los disparos es óptima cuando el PA coincide con la liberación de vesículas (Matveev & Wang, 2000). Nuestras observaciones apuntarían también al primer ITP como esencial para la correcta interpretación de los subsiguientes PA y definición de los patrones de conectividad de las neuronas. Esto concordaría con sugerencias previas de que la información puede perderse cuando los PA están muy cercanos en el tiempo; lo cual podría contribuir a la eliminación axonal (Fuhrmann et al., 2002). Otros mecanismos de plasticidad, como la remodelación independiente de PA (Kirkby et al., 2013; Lu et al., 2007; Matveev & Wang, 2000), no pueden ser descartados; no obstante, lo que si podemos afirmar es que la correcta maduración de los patrones de disparo son necesarios para la estabilización de las conexiones contralaterales del CC.

Nuestros experimentos enmarcan la función de K_v1 referente al control de la invasión contralateral del CC en la definición de las funciones del SIA y en la generación de patrones de disparo regulares. Estudios recientes indican que la composición de canales iónicos del SIA determina las propiedades y excitabilidad de dicha estructura y es específica para cada tipo neuronal (Grubb et al., 2011; Kole et al., 2008; Kole et al., 2007; Kole & Stuart, 2012). De acuerdo con estos estudios nosotros demostramos que, en las neuronas corticales, la frecuencia de neuronas con SIA distal es un reflejo o consecuencia de la expresión de los canales K_v1 , los cuales se sabe que limitan la excitabilidad (Kole & Stuart, 2012). La invasión contralateral, en todos los casos, correlaciona con unas proporciones de neuronas con SIA distal por encima de un límite. De la misma forma, hemos comprobado que la disminución de la excitabilidad en este tipo neuronal mediante la sobreexpresión de $Kir2.1$, contrariamente al efecto de $Cux1$, aumenta la probabilidad de que una neurona posicione distalmente su SIA. De estos resultados cabe formularse diversas cuestiones que ayudarían sustancialmente a avanzar en el conocimiento sobre esta compleja estructura. En primer lugar cabe preguntarse si la excitabilidad neuronal (o algunas de sus características) puede verse reflejada, *in-vivo*, por la relación entre neuronas con SIA distal y SIA proximal en contra de lo que ocurre *in-vitro*, donde una posición determinada, que la población neuronal adopta homogéneamente, correlaciona con cada nivel de excitabilidad (Grubb & Burrone, 2010a). Sería interesante también resolver cual es el papel que juegan los canales K_v1 (así como otros que puedan estar influyendo en la posición del SIA) en la localización de dicha estructura, es decir, se plantea la duda de si contribuyen activamente en la posición del SIA, por ejemplo reteniendo dicha estructura en cada posición en respuesta a los estímulos externos, o pasivamente por la simple influencia en las características eléctricas de la neurona. Finalmente nos cabe otra duda en cuanto a la cinética de movimiento: podría ser muy rápida de forma que incluso las corrientes por debajo del límite para lanzar PA se vieran reflejadas en cambios transitorios de su posición; o más bien una cinética lenta en que la posición del SIA reflejara un estado excitable neuronal a medio plazo. Sería importante en un futuro próximo, el estudio en tiempo real de la cinética del SIA, así como un análisis a nivel individual de neuronas, en contra de los que se han venido realizando hasta ahora que son análisis poblacionales. Cabe resaltar la posible independencia que tendría la función de los K_v1 sobre la posición del SIA con su papel en la determinación de los patrones de disparo, pues la simple alteración de las proporciones entre Na_v y K_v en el SIA mediante la sobreexpresión de $SynNa_vII - III$ (lo cual altera los patrones en el mismo sentido que la depleción de $Cux1$) no es suficiente para cambiar la relación entre neuronas con SIA distal y proximal (no mostrado).

En el hipotético caso de que las proporciones de neuronas con SIA distal *versus* proximal esté relacionado con la excitabilidad de la neurona, y según la literatura existente (Grubb & Burrone, 2010a), cabría pensar que las neuronas deficientes en $Cux1$ son hiper-excitable. Esto contrasta con la disminución del número de PA lanzados en el soma como respuesta a una corriente determinada, pero sin embargo sería apoyado por las distintas aproximaciones funcionales que recuperan el defecto de invasión producido por la depleción de $Cux1$ así como por su mayor frecuencia de ITP inicial. Una posibilidad para explicar estos resultados sería que la eliminación de $Cux1$ bien por la formación de patrones de disparo aberrantes o por alguna otra razón no detectada por nosotros, como pudieran ser fenómenos de propagación en reverso, estuviera imposibilitando la correcta lectura (por parte de la propia neurona) de la salida axonal para la relocalización homeostática del SIA. Esto supondría un comportamiento computacional contrario al que su situación requeriría que podría ser el origen de los aberrantes patrones lanzados por las neuronas deficientes en $Cux1$. Debido al desconocimiento sobre las razones moleculares que permiten la relocalización plástica del SIA, este hecho queda sin

concluir, aunque apuntaría a algún tipo de desacoplamiento entre lo que ocurre en el axón y en el soma que produce que las neuronas generen señales no adecuadas a su situación biológica. Estas señales serían semejantes a aquellas que ocurren en una situación de hiper-excitabilidad, lo cual encajaría con lo que ocurre en el SFX. En el modelo murino del SFX en que FMRP no se expresa (*Fmr1*^{-/-}), se ha visto que la dinámica de espinas dendríticas no disminuye durante las dos primeras semanas post-natales, como ocurre en animales WT, sino que se retrasa, al igual que la transición de subtipos de espinas inmaduras a maduras (Cruz-Martin et al., 2010). En el mismo modelo se ha demostrado que, los circuitos corticales asociados al SFX son hiper-excitables en una forma dependiente del estado cerebral y durante un periodo crítico para la formación de la plasticidad dependiente de experiencia (Goncalves et al., 2013).

La excitabilidad neuronal, al igual que la correcta función sináptica, requiere el correcto mantenimiento del balance iónico; por lo que cabe esperar que la des-regulación de la dotación de canales iónicos de una neurona conlleve a una alteración de las propiedades eléctricas neuronales. De esta manera, se ha comprobado que, el intercambiador $9 Na^+ - K^+ / H^+$ está implicado en desórdenes neuro-psiquiátricos, retraso mental y autismo (Morrow et al., 2008; Spooren et al., 2012). La sobre-expresión de *SynNa_vII - III* produce en las neuronas de las láminas II-III una alteración en los niveles totales y en las proporciones de canales de *Na_v* y *K_v1*. Pudimos comprobar que estas neuronas poseen patrones de disparo similares a los que encontramos en las neuronas deficientes en *Cux1*, por lo que lo usamos como una herramienta para manipular los modos de disparo y ver las consecuencias que tienen. La modificación de la composición de canales iónicos del SIA afecta negativamente a la inervación contralateral del CC en neuronas WT. También observamos que la reducción de las corrientes de *Na_v* en el SIA de neuronas deficientes en *Cux1* re-establece patrones de disparo regulares, así como la inervación en el hemisferio contralateral, por lo que concluimos que la proporción relativa de los diferentes canales iónicos del SIA es determinante para la decodificación de las señales entrantes y la generación de patrones de salida óptimos para la función neuronal y claves para el patrón de conectividad; y, sin ninguna duda, demuestra el papel fundamental del SIA y su composición en la formación del CC.

La alteración de la vía de *Cux1* o de los mecanismos de regulación del SIA por debajo de ella podrían estar implicados en alteraciones del cerebro cuyo origen se da durante el desarrollo (Spooren et al., 2012; Zoghbi & Bear, 2012). *Cux1* ha sido indirectamente asociado a DEA (Choi et al., 2012); así como la disfunción del SIA ha sido directa e indirectamente asociado con estas patologías (Kaphzan et al., 2011; Kole et al., 2008; Royeck et al., 2008; Splawski et al., 2004) y con otras con origen durante el desarrollo, como la epilepsia (Grubb & Burrone, 2010a; Vacher & Trimmer, 2012). Por lo tanto, a través de la regulación de las corrientes de los canales *K_v1* y la función del SIA, los niveles de expresión de *Cux1* en las neuronas de proyección de las láminas II-III son esenciales para la conectividad del circuito, balanceando la integración entre circuitos ipsilaterales y contralaterales.

Nuestros datos demuestran que en las neuronas de las láminas II-III, la regulación de las salidas en forma de PA es un mecanismo de desarrollo que determina la inervación contralateral de las proyecciones del CC. *Cux1* tiene a este mecanismo como diana a través de la modulación de los niveles de expresión de *K_v1* y de la computación en el SIA. Este y otros mecanismos de desarrollo que similarmente afecten a la computación neuronal o a la correcta transferencia de la información

a través de los PA en el axón podrían estar directamente relacionados con la incorrecta conectividad en los circuitos en enfermedades mentales.

5. Cux2 es esencial para el establecimiento del patrón de conectividad final en el hemisferio contralateral.

Con respecto al FT Cux2, los estudios no han llegado tan lejos como con Cux1. No obstante hemos sido capaces de demostrar que este FT es esencial para el establecimiento del correcto patrón de inervación inter-hemisférico en la corteza SS, de forma que la ausencia de dicho FT genera una inervación inespecífica y aumentada probablemente debida a una disminución en la excitabilidad de estas neuronas.

Es interesante remarcar la probable función diferencial de Cux2 durante el desarrollo de las conexiones axonales. Mientras que en estadios post-natales adultos la ausencia de este FT conlleva una disminución de la excitabilidad, en estadios post-natales más tempranos esta disminución se da solo ante inyecciones de corrientes elevadas. Curiosamente los resultados de la excitabilidad de las neuronas *Cux2*^{-/-} *in-vitro*, donde observamos una excitabilidad aumentada en una etapa intermedia del desarrollo del cultivo, contrastan con los obtenidos *in-vivo*. Podría explicarse por el distinto tipo de aproximación y/o por la falta de diversos factores en los cultivos celulares; pero nos queda la duda de si pudiera ser debido al reflejo de un estadio anterior al analizado en rodajas agudas. Si esto fuera así, indicaría una función de Cux2 sobre la maduración de las características eléctricas neuronales. Podría estar ocurriendo, por ejemplo, un desarrollo acelerado que implicara el aumento de excitabilidad inicial y posterior acomodación al entorno en que se encuentran las neuronas, disminuyendo de esta forma su excitabilidad; o la necesidad de alguna etapa eléctrica concreta para la correcta maduración eléctrica neuronal que no esté ocurriendo en ausencia de Cux2. Nuestros resultados por lo tanto, indican el probable control transcripcional de factores determinantes en la maduración eléctrica de las neuronas así como de otras proteínas directamente involucradas en el establecimiento de las propiedades eléctricas de las neuronas corticales maduras y cuya expresión fluctúa a lo largo del desarrollo. Planteamos que probablemente, al igual que Cux1, Cux2 esté regulando la transcripción de canales iónicos, aunque todavía faltan resultados para poder realizar tal afirmación.

Cabe resaltar la diferente función que los FT Cux1 y Cux2 están teniendo sobre el desarrollo axonal de las neuronas corticales de las láminas II-III, contrariamente a su función dendrítica en estas mismas neuronas. Mientras que Cux1 estaría regulando el establecimiento de las sinapsis, la función de Cux2 se vería más relacionada con mecanismos de refinamiento axonal; aunque ambos procesos podrían ser dependientes de mecanismos biológicos semejantes.

Conclusiones.

1. Los factores de transcripción SRF, MEF2 y CREB actúan conjuntamente uniéndose a la región SARE como parte de un mecanismo transcripcional general de respuesta a actividad neuronal en el sistema nervioso. De forma coordinada activan la expresión de aquellos genes que poseen la región SARE en respuesta a actividad neuronal.
2. La presencia de la secuencia SARE en un gen es indicativa de su posible implicación en procesos de plasticidad sináptica y relación con enfermedades mentales.
3. Cux1 y Cux2 regulan distintos aspectos de la excitabilidad de las neuronas de proyección callosa de las láminas II-III. Esta regulación ocurre a través de mecanismos moleculares diferentes.
4. El factor de transcripción Cux1 es esencial para el establecimiento de la conectividad inter-hemisférica a través del cuerpo caloso. Regula la conectividad de manera autónoma celular y a través de la modulación de la actividad neuronal.
5. El factor de transcripción Cux2 regula el correcto refinamiento de las conexiones inter-hemisféricas del cuerpo caloso. Determina la conectividad de manera autónoma celular y a través de la modulación de la actividad neuronal.
6. *Cux1* modula el modo de disparo de potenciales de acción de las neuronas de las láminas II-III de la corteza cerebral. Su expresión determina un modo de disparo regular esencial para el establecimiento de conexiones contralaterales.
7. Los patrones de disparo regulares, generados en el segmento inicial del axón, son fundamentales para el mantenimiento de las conexiones del cuerpo caloso en el hemisferio contralateral; sin embargo estas conexiones no muestran tal dependencia del número total de potenciales acción.
8. Cux1 determina la correcta posición y/o cinética del segmento inicial del axón en las neuronas de proyección callosa de las láminas II-III. Esta correlaciona con el óptimo establecimiento del patrón de conectividad a través del CC.
9. La deficiencia de Cux1 genera una disminución en el nivel de expresión de los ARNm de $K_v1,1$ y $K_v1,3$ indicando una probable regulación transcripcional.
10. Los FT que controlan la identidad molecular neuronal son fundamentales para la definición de las características eléctricas y la respuesta ante las señales entrantes de las neuronas. Este mecanismo determina su patrón de conectividad específico y el establecimiento de los circuitos corticales durante el desarrollo.

Bibliografia.

Adelsberger, H., Garaschuk, O., & Konnerth, A. 2005. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci*, 8(8): 988-990.

Adrian, E. D. 1926a. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part 4. Impulses from Pain Receptors. *J Physiol*, 62(1): 33-51.

Adrian, E. D. 1926b. The impulses produced by sensory nerve endings: Part I. *J Physiol*, 61(1): 49-72.

Adrian, E. D., & Zotterman, Y. 1926a. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ. *J Physiol*, 61(2): 151-171.

Adrian, E. D., & Zotterman, Y. 1926b. The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *J Physiol*, 61(4): 465-483.

Alcamo, E. A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Farinas, I., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. 2008. *Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 57(3): 364-377.

Alfano, C., & Studer, M. 2013. Neocortical arealization: evolution, mechanisms, and open questions. *Dev Neurobiol*, 73(6): 411-447.

Allene, C., Cattani, A., Ackman, J. B., Bonifazi, P., Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y., & Cossart, R. 2008. Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci*, 28(48): 12851-12863.

Antonini, A., & Stryker, M. P. 1993. Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*, 260(5115): 1819-1821.

Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45(2): 207-221.

Armentano, M., Filosa, A., Andolfi, G., & Studer, M. 2006. COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. *Development*, 133(21): 4151-4162.

Bagri, A., Marin, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L., & 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): 233-248.

Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., & Lantos, P. 1998. A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121 (Pt 5): 889-905.

Bansal, M., Kumar, A., & Yella, V. R. 2014. Role of DNA sequence based structural features of promoters in transcription initiation and gene expression. *Curr Opin Struct Biol*, 25C: 77-85.

Baranek, C., Dittrich, M., Parthasarathy, S., Bonnon, C. G., Britanova, O., Lanshakov, D., Boukhtouche, F., Sommer, J. E., Colmenares, C., Tarabykin, V., & Atanasoski, S. 2012. Protooncogene Ski cooperates with the chromatin-remodeling factor Satb2 in specifying callosal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(9): 3546-3551.

Baron-Cohen, S. 2002. The extreme male brain theory of autism. *Trends Cogn Sci*, 6(6): 248-254.

Baron-Cohen, S., Leslie, A. M., & Frith, U. 1985. Does the autistic child have a "theory of mind"? *Cognition*, 21(1): 37-46.

Basu, S. N., Kollu, R., & Banerjee-Basu, S. 2009. AutDB: a gene reference resource for autism research. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue): D832-836.

Bekkers, J. M., & Delaney, A. J. 2001. Modulation of excitability by alpha-dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci*, 21(17): 6553-6560.

Belmonte, M. K., Allen, G., Beckel-Mitchener, A., Boulanger, L. M., Carper, R. A., & Webb, S. J. 2004. Autism and abnormal development of brain connectivity. *J Neurosci*, 24(42): 9228-9231.

Bender, K. J., & Trussell, L. O. 2012. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci*, 35: 249-265.

Benito, E., Valor, L. M., Jimenez-Minchan, M., Huber, W., & Barco, A. 2011. cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J Neurosci*, 31(50): 18237-18250.

Bishop, K. M., Goudreau, G., & O'Leary, D. D. 2000. Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science*, 288(5464): 344-349.

Blankenship, A. G., & Feller, M. B. 2010. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci*, 11(1): 18-29.

Boiko, T., Van Wart, A., Caldwell, J. H., Levinson, S. R., Trimmer, J. S., & Matthews, G. 2003. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci*, 23(6): 2306-2313.

Booth, R., Wallace, G. L., & Happe, F. 2011. Connectivity and the corpus callosum in autism spectrum conditions: insights from comparison of autism and callosal agenesis. *Prog Brain Res*, 189: 303-317.

Bottai, D., Guzowski, J. F., Schwarz, M. K., Kang, S. H., Xiao, B., Lanahan, A., Worley, P. F., & Seeburg, P. H. 2002. Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in Homer 1 immediate early gene expression. *J Neurosci*, 22(1): 167-175.

Brager, D. H., & Johnston, D. 2014. Channelopathies and dendritic dysfunction in fragile X syndrome. *Brain Res Bull*.

Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., Sestan, N., Molnar, Z., & Tarabykin, V. 2008. *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron*, 57(3): 378-392.

Bulchand, S., Grove, E. A., Porter, F. D., & Tole, S. 2001. LIM-homeodomain gene *Lhx2* regulates the formation of the cortical hem. *Mech Dev*, 100(2): 165-175.

Bulchand, S., Subramanian, L., & Tole, S. 2003. Dynamic spatiotemporal expression of LIM genes and cofactors in the embryonic and postnatal cerebral cortex. *Dev Dyn*, 226(3): 460-469.

Butler, A. K., Dantzker, J. L., Shah, R. B., & Callaway, E. M. 2001. Development of visual cortical axons: layer-specific effects of extrinsic influences and activity blockade. *J Comp Neurol*, 430(3): 321-331.

Casanova, M. F., Buxhoeveden, D. P., Switala, A. E., & Roy, E. 2002. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology*, 58(3): 428-432.

Casanova, M. F., & Trippe, J., 2nd. 2006. Regulatory mechanisms of cortical laminar development. *Brain Res Rev*, 51(1): 72-84.

Catalano, S. M., & Shatz, C. J. 1998. Activity-dependent cortical target selection by thalamic axons. *Science*, 281(5376): 559-562.

Catterall, W. A., Raman, I. M., Robinson, H. P., Sejnowski, T. J., & Paulsen, O. 2012. The Hodgkin-Huxley heritage: from channels to circuits. *J Neurosci*, 32(41): 14064-14073.

Cidad, P., Jimenez-Perez, L., Garcia-Arribas, D., Miguel-Velado, E., Tajada, S., Ruiz-McDavitt, C., Lopez-Lopez, J. R., & Perez-Garcia, M. T. 2012. *Kv1.3* channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(5): 1299-1307.

Conel, J. L. 1953. Contribution of S. Ramon y Cajal to the knowledge of the anatomy of the cerebral cortex. *N Engl J Med*, 248(13): 541-543.

Connors, B. W., & Gutnick, M. J. 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons.

Trends Neurosci, 13(3): 99-104.

Coombs, J. S., Curtis, D. R., & Eccles, J. C. 1957. The generation of impulses in motoneurons. *J Physiol*, 139(2): 232-249.

Cortes-Mendoza, J., Diaz de Leon-Guerrero, S., Pedraza-Alva, G., & Perez-Martinez, L. 2013. Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *Int J Dev Neurosci*, 31(6): 359-369.

Courchesne, E., Carper, R., & Akshoomoff, N. 2003. Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA*, 290(3): 337-344.

Cruz-Martin, A., Crespo, M., & Portera-Cailliau, C. 2010. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci*, 30(23): 7793-7803.

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

Cubelos, B., Sebastian-Serrano, A., Kim, S., Moreno-Ortiz, C., Redondo, J. M., Walsh, C. A., & Nieto, M. 2008a. *Cux-2* controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb Cortex*, 18(8): 1758-1770.

Cubelos, B., Sebastian-Serrano, A., Kim, S., Redondo, J. M., Walsh, C., & Nieto, M. 2008b. *Cux-1* and *Cux-2* control the development of Reelin expressing cortical interneurons. *Dev Neurobiol*, 68(7): 917-925.

Curtis, K. S. C. a. H. J. 1939. Electric impedance of the squid giant axon during activity. *The Journal of General Physiology*.

Chen, D. Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., & Alberini, C. M. 2012. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKIIalpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci*, 15(12): 1707-1714.

Choe, Y., Siegenthaler, J. A., & Pleasure, S. J. 2012. A cascade of morphogenic signaling initiated by the meninges controls corpus callosum formation. *Neuron*, 73(4): 698-712.

Choi, J., Ababon, M. R., Matteson, P. G., & Millonig, J. H. 2012. Cut-like homeobox 1 and nuclear factor I/B mediate ENGRAILED2 autism spectrum disorder-associated haplotype function. *Hum Mol Genet*, 21(7): 1566-1580.

Dantzker, J. L., & Callaway, E. M. 1998. The development of local, layer-specific visual cortical

axons in the absence of extrinsic influences and intrinsic activity. *J Neurosci*, 18(11): 4145-4154.

Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W., Licatalosi, D. D., Richter, J. D., & Darnell, R. B. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146(2): 247-261.

De la Rossa, A., Bellone, C., Golding, B., Vitali, I., Moss, J., Toni, N., Luscher, C., & Jabaudon, D. 2013. In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci*, 16(2): 193-200.

de Thonel, A., Le Mouel, A., & Mezger, V. 2012. Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(10): 1593-1612.

deAzevedo, L. C., Hedin-Pereira, C., & Lent, R. 1997. Callosal neurons in the cingulate cortical plate and subplate of human fetuses. *J Comp Neurol*, 386(1): 60-70.

Degano, A. L., Park, M. J., Penati, J., Li, Q., & Ronnett, G. V. 2014. MeCP2 is required for activity-dependent refinement of olfactory circuits. *Mol Cell Neurosci*.

Dino P Leone, K. S., Bin Chen, Elizabeth Alcamo and Susan K McConnell. 2008. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 18: 8.

Doron, G., von Heimendahl, M., Schlattmann, P., Houweling, A. R., & Brecht, M. 2014. Spiking irregularity and frequency modulate the behavioral report of single-neuron stimulation. *Neuron*, 81(3): 653-663.

Dufflocq, A., Le Bras, B., Bullier, E., Couraud, F., & Davenne, M. 2008. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol Cell Neurosci*, 39(2): 180-192.

Ebert, D. H., & Greenberg, M. E. 2013. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature*, 493(7432): 327-337.

Escayg, A., MacDonald, B. T., Meisler, M. H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., LeGuern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C., & Malafosse, A. 2000. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet*, 24(4): 343-345.

Faedo, A., Tomassy, G. S., Ruan, Y., Teichmann, H., Krauss, S., Pleasure, S. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Studer, M., & Rubenstein, J. L. 2008. COUP-TFI coordinates cortical patterning, neurogenesis, and laminar fate and modulates MAPK/ERK, AKT, and beta-catenin signaling. *Cereb Cortex*, 18(9): 2117-2131.

Fame, R. M., MacDonald, J. L., & Macklis, J. D. 2011. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci*, 34(1): 41-50.

Fanara, P., Husted, K. H., Selle, K., Wong, P. Y., Banerjee, J., Brandt, R., & Hellerstein, M. K. 2010. Changes in microtubule turnover accompany synaptic plasticity and memory formation in response to contextual fear conditioning in mice. *Neuroscience*, 168(1): 167-178.

Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M., & Weinberg, R. A. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, 386(6627): 796-804.

Feldmeyer, D. 2012. Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat*, 6: 24.

Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C. C., Poulet, J. F., Staiger, J. F., Luhmann, H. J., & Schwarz, C. 2013. Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*, 103: 3-27.

Feller, M. B., & Scanziani, M. 2005. A precritical period for plasticity in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1): 94-100.

Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E. H., Jr., Skinner, C., Schwartz, C. E., & Sommer, S. S. 2006. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*, 409(1): 10-13.

Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrisey, E. E., & Walsh, C. A. 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol*, 460(2): 266-279.

Foeller, E., & Feldman, D. E. 2004. Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 14(1): 89-95.

Fuhrmann, G., Segev, I., Markram, H., & Tsodyks, M. 2002. Coding of temporal information by activity-dependent synapses. *J Neurophysiol*, 87(1): 140-148.

Fujiwara, T., Sugawara, T., Mazaki-Miyazaki, E., Takahashi, Y., Fukushima, K., Watanabe, M., Hara, K., Morikawa, T., Yagi, K., Yamakawa, K., & Inoue, Y. 2003. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*, 126(Pt 3): 531-546.

Fukuchi-Shimogori, T., & Grove, E. A. 2001. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science*, 294(5544): 1071-1074.

Fuortes, M. G., Frank, K., & Becker, M. C. 1957. Steps in the production of motoneuron spikes. *J Gen Physiol*, 40(5): 735-752.

Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J., & Konnerth, A. 2000. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci*, 3(5): 452-459.

Garel, S., Huffman, K. J., & Rubenstein, J. L. 2003. Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in *Fgf8* hypomorphic mutants. *Development*, 130(9): 1903-1914.

Gibson, D. A., & Ma, L. 2011. Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development*, 138(2): 183-195.

Gilbert, C. D. 1993. Circuitry, architecture, and functional dynamics of visual cortex. *Cereb Cortex*, 3(5): 373-386.

Gingras, H., Cases, O., Krasilnikova, M., Berube, G., & Nepveu, A. 2005. Biochemical characterization of the mammalian *Cux2* protein. *Gene*, 344: 273-285.

Goldberg, E. M., Clark, B. D., Zagha, E., Nahmani, M., Erisir, A., & Rudy, B. 2008. K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*, 58(3): 387-400.

Goldberg, J. L., Espinosa, J. S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G. T., & Barres, B. A. 2002. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 33(5): 689-702.

Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N., & Catterall, W. A. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2): 365-368.

Gomez, T. M., Robles, E., Poo, M., & Spitzer, N. C. 2001. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science*, 291(5510): 1983-1987.

Gomez, T. M., & Spitzer, N. C. 1999. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*, 397(6717): 350-355.

Goncalves, J. T., Anstey, J. E., Golshani, P., & Portera-Cailliau, C. 2013. Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. *Nat Neurosci*, 16(7): 903-909.

Gosse, N. J., Nevin, L. M., & Baier, H. 2008. Retinotopic order in the absence of axon competition. *Nature*, 452(7189): 892-895.

Gray, P. A., Fu, H., Luo, P., Zhao, Q., Yu, J., Ferrari, A., Tenzen, T., Yuk, D. I., Tsung, E. F., Cai, Z., Alberta, J. A., Cheng, L. P., Liu, Y., Stenman, J. M., Valerius, M. T., Billings, N., Kim, H. A., Greenberg, M. E., McMahon, A. P., Rowitch, D. H., Stiles, C. D., & Ma, Q. 2004. Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science*, 306(5705): 2255-2257.

Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*, 14(11): 755-769.

Grubb, M. S., & Burrone, J. 2010a. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, 465(7301): 1070-1074.

Grubb, M. S., & Burrone, J. 2010b. Building and maintaining the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol*, 20(4): 481-488.

Grubb, M. S., & Burrone, J. 2010c. Channelrhodopsin-2 localised to the axon initial segment. *PLoS One*, 5(10): e13761.

Grubb, M. S., Shu, Y., Kuba, H., Rasband, M. N., Wimmer, V. C., & Bender, K. J. 2011. Short- and long-term plasticity at the axon initial segment. *J Neurosci*, 31(45): 16049-16055.

Gu, C., & Gu, Y. 2011. Clustering and activity tuning of Kv1 channels in myelinated hippocampal axons. *J Biol Chem*, 286(29): 25835-25847.

Guan, D., Lee, J. C., Tkatch, T., Surmeier, D. J., Armstrong, W. E., & Foehring, R. C. 2006. Expression and biophysical properties of Kv1 channels in supragranular neocortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 571(Pt 2): 371-389.

Guillemot, F. 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol*, 83(1): 37-52.

Gurnett, C. A., & Campbell, K. P. 1996. Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *J Biol Chem*, 271(45): 27975-27978.

Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuhmer, W., & Wang, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4): 473-508.

Hanganu, I. L., Staiger, J. F., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. 2007. Cholinergic modulation of spindle bursts in the neonatal rat visual cortex in vivo. *J Neurosci*, 27(21): 5694-5705.

Hanson, M. G., & Landmesser, L. T. 2004. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*, 43(5): 687-701.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., & Huttner, W. B. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9): 3196-3201.

Hedstrom, K. L., Ogawa, Y., & Rasband, M. N. 2008. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol*, 183(4): 635-640.

Hensch, T. K. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6(11): 877-888.

Heusser, K., & Schwappach, B. 2005. Trafficking of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, 15(3): 364-369.

Hill, R. S., & Walsh, C. A. 2005. Molecular insights into human brain evolution. *Nature*, 437(7055): 64-67.

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4): 500-544.

Hodgkin, A. L., & Katz, B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, 108(1): 37-77.

Holtmaat, A., Randall, J., & Cane, M. 2013. Optical imaging of structural and functional synaptic plasticity in vivo. *Eur J Pharmacol*.

Hong, K., Nishiyama, M., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., & Poo, M. 2000. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*, 403(6765): 93-98.

Horev, G., Ellegood, J., Lerch, J. P., Son, Y. E., Muthuswamy, L., Vogel, H., Krieger, A. M., Buja, A., Henkelman, R. M., Wigler, M., & Mills, A. A. 2011. Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(41): 17076-17081.

Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., & Shu, Y. 2009. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci*, 12(8): 996-1002.

Hua, J. Y., Smear, M. C., Baier, H., & Smith, S. J. 2005. Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature*, 434(7036): 1022-1026.

Huang, C. Y., Chu, D., Hwang, W. C., & Tsaur, M. L. 2012. Coexpression of high-voltage-

activated ion channels Kv3.4 and Cav1.2 in pioneer axons during pathfinding in the developing rat forebrain. *J Comp Neurol*, 520(16): 3650-3672.

Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*, 160: 106-154.

Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. 1963. Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J Physiol*, 165: 559-568.

Huberman, A. D. 2007. Mechanisms of eye-specific visual circuit development. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1): 73-80.

Huberman, A. D., Feller, M. B., & Chapman, B. 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci*, 31: 479-509.

Huffman, K. J., Garel, S., & Rubenstein, J. L. 2004. Fgf8 regulates the development of intraneocortical projections. *J Neurosci*, 24(41): 8917-8923.

Inda, M. C., DeFelipe, J., & Munoz, A. 2006. Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8): 2920-2925.

Innocenti, G. M. 2011. Development and evolution: two determinants of cortical connectivity. *Prog Brain Res*, 189: 65-75.

Inoue, K., Terashima, T., Nishikawa, T., & Takumi, T. 2004. Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci*, 20(11): 2909-2916.

Ishihama, A. 2012. Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 88(9): 485-508.

Isom, L. L. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, 7(1): 42-54.

Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 2012. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J Physiol*, 590(Pt 11): 2591-2599.

Jiao, Y., Zhang, Z., Zhang, C., Wang, X., Sakata, K., Lu, B., & Sun, Q. Q. 2011. A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(29): 12131-12136.

Johnston, J., Forsythe, I. D., & Kopp-Scheinflug, C. 2010. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol*, 588(Pt 17): 3187-3200.

Joju George, D. G. B., William H. Gerwick, and Thomas F. Murray. 2012. Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *PNAS*, 109(48): 6.

Just, M. A., Cherkassky, V. L., Keller, T. A., & Minshew, N. J. 2004. Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain*, 127(Pt 8): 1811-1821.

Kalluri, R., Xue, J., & Eatock, R. A. 2010. Ion channels set spike timing regularity of mammalian vestibular afferent neurons. *J Neurophysiol*, 104(4): 2034-2051.

Kaphzan, H., Buffington, S. A., Jung, J. I., Rasband, M. N., & Klann, E. 2011. Alterations in intrinsic membrane properties and the axon initial segment in a mouse model of Angelman syndrome. *J Neurosci*, 31(48): 17637-17648.

Katz, L. C., & Shatz, C. J. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290): 1133-1138.

Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., Takemoto-Kimura, S., Worley, P. F., & Bito, H. 2009. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(1): 316-321.

Kelleher, R. J., 3rd, & Bear, M. F. 2008. The autistic neuron: troubled translation? *Cell*, 135(3): 401-406.

Khan, S., Gramfort, A., Shetty, N. R., Kitzbichler, M. G., Ganesan, S., Moran, J. M., Lee, S. M., Gabrieli, J. D., Tager-Flusberg, H. B., Joseph, R. M., Herbert, M. R., Hamalainen, M. S., & Kenet, T. 2013. Local and long-range functional connectivity is reduced in concert in autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8): 3107-3112.

Khazipov, R., & Luhmann, H. J. 2006. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci*, 29(7): 414-418.

Kier, E. L., & Truwit, C. L. 1996. The normal and abnormal genu of the corpus callosum: an evolutionary, embryologic, anatomic, and MR analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 17(9): 1631-1641.

Kirkby, L. A., Sack, G. S., Firl, A., & Feller, M. B. 2013. A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron*, 80(5): 1129-1144.

Koch, S. M., Dela Cruz, C. G., Hnasko, T. S., Edwards, R. H., Huberman, A. D., & Ullian, E. M. 2011. Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. *Neuron*, 71(2): 235-242.

Koester, S. E., & O'Leary, D. D. 1994. Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J Neurosci*, 14(11 Pt 1): 6608-6620.

Kole, M. H., Ilshner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., & Stuart, G. J. 2008. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci*, 11(2): 178-186.

Kole, M. H., Letzkus, J. J., & Stuart, G. J. 2007. Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron*, 55(4): 633-647.

Kole, M. H., & Stuart, G. J. 2012. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron*, 73(2): 235-247.

Kriegstein, A., Noctor, S., & Martinez-Cerdeno, V. 2006. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci*, 7(11): 883-890.

Krishnan, A. V., Lin, C. S., Park, S. B., & Kiernan, M. C. 2009. Axonal ion channels from bench to bedside: a translational neuroscience perspective. *Prog Neurobiol*, 89(3): 288-313.

Laird, P. W., Zijderfeld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., & Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19(15): 4293.

Laumonier, F., Roger, S., Guerin, P., Molinari, F., M'Rad, R., Cahard, D., Belhadj, A., Hala-yem, M., Persico, A. M., Elia, M., Romano, V., Holbert, S., Andres, C., Chaabouni, H., Colleaux, L., Constant, J., Le Guennec, J. Y., & Briault, S. 2006. Association of a functional deficit of the BKCa channel, a synaptic regulator of neuronal excitability, with autism and mental retardation. *Am J Psychiatry*, 163(9): 1622-1629.

Leid, M., Ishmael, J. E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., & Dolle, P. 2004. CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 4(6): 733-739.

Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliiss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramée, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.

D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., & Jones, A. R. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124): 168-176.

Leyva-Diaz, E., & Lopez-Bendito, G. 2013. In and Out from the Cortex: Development of Major Forebrain Connections. *Neuroscience*.

Li, H., Fertuzinhos, S., Mohns, E., Hnasko, T. S., Verhage, M., Edwards, R., Sestan, N., & Crair, M. C. 2013. Laminar and columnar development of barrel cortex relies on thalamocortical neurotransmission. *Neuron*, 79(5): 970-986.

Li, X., Gutierrez, D. V., Hanson, M. G., Han, J., Mark, M. D., Chiel, H., Hegemann, P., Landmesser, L. T., & Herlitze, S. 2005. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49): 17816-17821.

Lindwall, C., Fothergill, T., & Richards, L. J. 2007. Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1): 3-14.

Liu, X., Somel, M., Tang, L., Yan, Z., Jiang, X., Guo, S., Yuan, Y., He, L., Oleksiak, A., Zhang, Y., Li, N., Hu, Y., Chen, W., Qiu, Z., Paabo, S., & Khaitovich, P. 2012. Extension of cortical synaptic development distinguishes humans from chimpanzees and macaques. *Genome Res*, 22(4): 611-622.

Lopez-Bendito, G., Flames, N., Ma, L., Fouquet, C., Di Meglio, T., Chedotal, A., Tessier-Lavigne, M., & Marin, O. 2007. Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci*, 27(13): 3395-3407.

Lorincz, A., & Nusser, Z. 2008. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci*, 28(53): 14329-14340.

Lu, J. T., Li, C. Y., Zhao, J. P., Poo, M. M., & Zhang, X. H. 2007. Spike-timing-dependent plasticity of neocortical excitatory synapses on inhibitory interneurons depends on target cell type. *J Neurosci*, 27(36): 9711-9720.

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., & van Wijnen, A. J. 2002. Genetic ablation of the CDP/Cux protein C terminus results in hair cycle defects and reduced male fertility. *Mol Cell Biol*, 22(5): 1424-1437.

MacDermot, K. D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A. M., Lai, C. S., Vernes, S. C., Vargha-Khadem, F., McKenzie, F., Smith, R. L., Monaco, A. P., & Fisher, S. E. 2005. Identification of

FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am J Hum Genet*, 76(6): 1074-1080.

Magdaleno, S., Jensen, P., Brumwell, C. L., Seal, A., Lehman, K., Asbury, A., Cheung, T., Cornelius, T., Batten, D. M., Eden, C., Norland, S. M., Rice, D. S., Dosooye, N., Shakya, S., Mehta, P., & Curran, T. 2006. BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system. *PLoS Biol*, 4(4): e86.

Mainen, Z. F., Joerges, J., Huguenard, J. R., & Sejnowski, T. J. 1995. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 15(6): 1427-1439.

Malatesta, P., Hartfuss, E., & Gotz, M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 127(24): 5253-5263.

Mallamaci, A., Muzio, L., Chan, C. H., Parnavelas, J., & Boncinelli, E. 2000. Area identity shifts in the early cerebral cortex of *Emx2*^{-/-} mutant mice. *Nat Neurosci*, 3(7): 679-686.

Mallamaci, A., & Stoykova, A. 2006. Gene networks controlling early cerebral cortex arealization. *Eur J Neurosci*, 23(4): 847-856.

Mangina, C. A., & Sokolov, E. N. 2006. Neuronal plasticity in memory and learning abilities: theoretical position and selective review. *Int J Psychophysiol*, 60(3): 203-214.

Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N., & Yaron, A. 2013. Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. *Cell Rep*, 3(4): 971-977.

Maravall, M., Stern, E. A., & Svoboda, K. 2004. Development of intrinsic properties and excitability of layer 2/3 pyramidal neurons during a critical period for sensory maps in rat barrel cortex. *J Neurophysiol*, 92(1): 144-156.

Marcos-Mondejar, P., Peregrin, S., Li, J. Y., Carlsson, L., Tole, S., & Lopez-Bendito, G. 2012. The *lhx2* transcription factor controls thalamocortical axonal guidance by specific regulation of *robo1* and *robo2* receptors. *J Neurosci*, 32(13): 4372-4385.

Marik, S. A., Olsen, O., Tessier-Lavigne, M., & Gilbert, C. D. 2013. Death receptor 6 regulates adult experience-dependent cortical plasticity. *J Neurosci*, 33(38): 14998-15003.

Markram, H. 2006. The blue brain project. *Nat Rev Neurosci*, 7(2): 153-160.

Markram, H. 2008. Fixing the location and dimensions of functional neocortical columns. *HFSP J*, 2(3): 132-135.

Masatoshi Inoue, N. Y.-K., Mio Nonaka, Takashi Kawashima, Hiroyuki Okuno and Haruhiko Bito. 2010. Synaptic activity responsive element (SARE). *Communicative & Integrative Biology*.

Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7: 29-59.

Mattson, M. P., Guthrie, P. B., & Kater, S. B. 1988. Components of neurite outgrowth that determine neuronal cytoarchitecture: influence of calcium and the growth substrate. *J Neurosci Res*, 20(3): 331-345.

Matveev, V., & Wang, X. J. 2000. Differential short-term synaptic plasticity and transmission of complex spike trains: to depress or to facilitate? *Cereb Cortex*, 10(11): 1143-1153.

McConnell, S. K. 1990. The specification of neuronal identity in the mammalian cerebral cortex. *Experientia*, 46(9): 922-929.

ME, S. 1990. Cajal on the cerebral cortex-an annotated translation of the complete writings, by Javier DeFelipe and Edward G. Jones New York, Oxford University Press, 1988 654 pp, illustrated. *Annals of Neurology*, 27(4).

Merot, Y., Retaux, S., & Heng, J. I. 2009. Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Semin Cell Dev Biol*, 20(6): 726-734.

Meyer, M. P., & Smith, S. J. 2006. Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *J Neurosci*, 26(13): 3604-3614.

Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H., & Poo, M. 2001. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron*, 29(2): 441-452.

Minshew, N. J., Goldstein, G., & Siegel, D. J. 1997. Neuropsychologic functioning in autism: profile of a complex information processing disorder. *J Int Neuropsychol Soc*, 3(4): 303-316.

Minshew, N. J., & Williams, D. L. 2007. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol*, 64(7): 945-950.

Mire, E., Mezzera, C., Leyva-Diaz, E., Paternain, A. V., Squarzoni, P., Bluy, L., Castillo-Paterna, M., Lopez, M. J., Peregrin, S., Tessier-Lavigne, M., Garel, S., Galceran, J., Lerma, J., & Lopez-Bendito, G. 2012. Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth. *Nat Neurosci*, 15(8): 1134-1143.

Mitchell, B. D., & 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): 17-32.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., & Ogawa, M. 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*, 131(13): 3133-3145.

Mizuno, H., Hirano, T., & Tagawa, Y. 2007. Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. *J Neurosci*, 27(25): 6760-6770.

Mizuno, H., Hirano, T., & Tagawa, Y. 2010. Pre-synaptic and post-synaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different post-natal periods in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci*, 31(3): 410-424.

Molnar, Z. 2011. Evolution of cerebral cortical development. *Brain Behav Evol*, 78(1): 94-107.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Fame, R. M., MacDonald, J. L., MacQuarrie, K. L., & Macklis, J. D. 2009. Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J Neurosci*, 29(39): 12343-12354.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., & Macklis, J. D. 2005. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*, 47(6): 817-831.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., & Macklis, J. D. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8(6): 427-437.

Monuki, E. S., Porter, F. D., & Walsh, C. A. 2001. Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron*, 32(4): 591-604.

Moody, W. J., & Bosma, M. M. 2005. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev*, 85(3): 883-941.

Moore, J. W., Stockbridge, N., & Westerfield, M. 1983. On the site of impulse initiation in a neurone. *J Physiol*, 336: 301-311.

Morris, R. G. 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*, 23(11): 2829-2846.

Morrow, E. M., Yoo, S. Y., Flavell, S. W., Kim, T. K., Lin, Y., Hill, R. S., Mukaddes, N. M., Balkhy, S., Gascon, G., Hashmi, A., Al-Saad, S., Ware, J., Joseph, R. M., Greenblatt, R., Gleason, D., Ertelt, J. A., Apse, K. A., Bodell, A., Partlow, J. N., Barry, B., Yao, H., Markianos, K., Ferland, R. J., Greenberg, M. E., & Walsh, C. A. 2008. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*, 321(5886): 218-223.

Mountcastle, V. B., Davies, P. W., & Berman, A. L. 1957. Response properties of neurons of

cat's somatic sensory cortex to peripheral stimuli. *J Neurophysiol*, 20(4): 374-407.

Muzio, L., & Mallamaci, A. 2003. *Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. Cereb Cortex*, 13(6): 641-647.

Nakata, T., & Hirokawa, N. 2003. Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol*, 162(6): 1045-1055.

Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M., & Walsh, C. A. 2004. Expression of *Cux-1* and *Cux-2* in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 479(2): 168-180.

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

Nishikimi, M., Oishi, K., & Nakajima, K. 2013. Axon guidance mechanisms for establishment of callosal connections. *Neural Plast*, 2013: 149060.

Nishimura, K., Akiyama, H., Komada, M., & Kamiguchi, H. 2007. betaIV-spectrin forms a diffusion barrier against L1CAM at the axon initial segment. *Mol Cell Neurosci*, 34(3): 422-430.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., & Kriegstein, A. R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821): 714-720.

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7(2): 136-144.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., & et al. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312(5990): 121-127.

Nusser, Z. 2009. Variability in the subcellular distribution of ion channels increases neuronal diversity. *Trends Neurosci*, 32(5): 267-274.

O'Leary, D. D., & Sahara, S. 2008. Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1): 90-100.

O'Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., Karakoc, E., Mackenzie, A. P., Ng, S. B., Baker, C., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Fisher, S. E., Shendure, J., & Eichler, E. E. 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders

identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*, 43(6): 585-589.

O'Leary, D. D. M. 1989. *do cortical areas emerge from a protocortex*. Elsevier Science Publishers.

Otsuka, T., & Kawaguchi, Y. 2011. Cell diversity and connection specificity between callosal projection neurons in the frontal cortex. *J Neurosci*, 31(10): 3862-3870.

Ovcharenko, I., & Nobrega, M. A. 2005. Identifying synonymous regulatory elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue): W403-407.

Palmer, L. M., & Stuart, G. J. 2006. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 26(6): 1854-1863.

Paul, L. K., Brown, W. S., Adolphs, R., Tyszka, J. M., Richards, L. J., Mukherjee, P., & Sherr, E. H. 2007. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci*, 8(4): 287-299.

Pescosolido, M. F., Yang, U., Sabbagh, M., & Morrow, E. M. 2012. Lighting a path: genetic studies pinpoint neurodevelopmental mechanisms in autism and related disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 14(3): 239-252.

Petersen, R. S., Panzeri, S., & Maravall, M. 2009. Neural coding and contextual influences in the whisker system. *Biol Cybern*, 100(6): 427-446.

Piochon, C., Kruskal, P., Maclean, J., & Hansel, C. 2012. Non-Hebbian spike-timing-dependent plasticity in cerebellar circuits. *Front Neural Circuits*, 6: 124.

Piper, M., Plachez, C., Zalucki, O., Fothergill, T., Goudreau, G., Erzurumlu, R., Gu, C., & 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: i11-21.

Plachez, C., & Richards, L. J. 2005. Mechanisms of Axon Guidance in the Developing Nervous System. 69: 267-346.

Polleux, F. 2005. Genetic mechanisms specifying cortical connectivity: let's make some projections together. *Neuron*, 46(3): 395-400.

Porter, J. T., Johnson, C. K., & Agmon, A. 2001. Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, 21(8): 2699-2710.

Quinn, J. C., Molinek, M., Martynoga, B. S., Zaki, P. A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R. F., West, J. D., & 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. *Dev Biol*, 302(1):

50-65.

Rakic, P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862): 170-176.

Rash, B. G., & Grove, E. A. 2006. Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 16(1): 25-34.

Rash, B. G., & Richards, L. J. 2001. A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol*, 434(2): 147-157.

Ren, T., Zhang, J., Plachez, C., Mori, S., & Richards, L. J. 2007. Diffusion tensor magnetic resonance imaging and tract-tracing analysis of Probst bundle structure in *Netrin1*- and *DCC*-deficient mice. *J Neurosci*, 27(39): 10345-10349.

Richards, L. J., Plachez, C., & Ren, T. 2004. Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet*, 66(4): 276-289.

Robertson, B. 1997. The real life of voltage-gated K⁺ channels: more than model behaviour. *Trends Pharmacol Sci*, 18(12): 474-483.

Royeck, M., Horstmann, M. T., Remy, S., Reitze, M., Yaari, Y., & Beck, H. 2008. Role of axonal *NaV1.6* sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 100(4): 2361-2380.

Rubenstein, J. L. 2010. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Curr Opin Neurol*, 23(2): 118-123.

Rubenstein, J. L., & Merzenich, M. M. 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*, 2(5): 255-267.

Ruthazer, E. S., Li, J., & Cline, H. T. 2006. Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J Neurosci*, 26(13): 3594-3603.

Sahara, S., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J. C., & O'Leary, D. D. 2007. *Sp8* exhibits reciprocal induction with *Fgf8* but has an opposing effect on anterior-posterior cortical area patterning. *Neural Dev*, 2: 10.

Sanes, J. R., & Yamagata, M. 2009. Many paths to synaptic specificity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25: 161-195.

Sansregret, L., & Nepveu, A. 2008. The multiple roles of *CUX1*: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene*, 412(1-2): 84-94.

Schaaf, C. P., Sabo, A., Sakai, Y., Crosby, J., Muzny, D., Hawes, A., Lewis, L., Akbar, H., Varghese, R., Boerwinkle, E., Gibbs, R. A., & Zoghbi, H. Y. 2011. Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet*, 20(17): 3366-3375.

Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Kapfhammer, J. P., & Becker-Andre, 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. *Eur J Neurosci*, 9(12): 2687-2701.

Schmunk, G., & Gargus, J. J. 2013. Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front Genet*, 4: 222.

Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., & Tessier-Lavigne, M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, 87(6): 1001-1014.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrisey, E. E., & Temple, S. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci*, 9(6): 743-751.

Shimogori, T., & Grove, E. A. 2005. Fibroblast growth factor 8 regulates neocortical guidance of area-specific thalamic innervation. *J Neurosci*, 25(28): 6550-6560.

Shinomoto, S., Miura, K., & Koyama, S. 2005a. A measure of local variation of inter-spike intervals. *Biosystems*, 79(1-3): 67-72.

Shinomoto, S., Miyazaki, Y., Tamura, H., & Fujita, I. 2005b. Regional and laminar differences in in vivo firing patterns of primate cortical neurons. *J Neurophysiol*, 94(1): 567-575.

Shinomoto, S., Shima, K., & Tanji, J. 2003. Differences in spiking patterns among cortical neurons. *Neural Comput*, 15(12): 2823-2842.

Shoemaker, L. D., & Arlotta, P. 2010. Untangling the cortex: Advances in understanding specification and differentiation of corticospinal motor neurons. *Bioessays*, 32(3): 197-206.

Shu, T., & Richards, L. J. 2001. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci*, 21(8): 2749-2758.

Shu, T., Sundaresan, V., McCarthy, M. M., & Richards, L. J. 2003. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci*, 23(22): 8176-8184.

Shu, Y., Yu, Y., Yang, J., & McCormick, D. A. 2007. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(27): 11453-11458.

Siegel, F., Heimel, J. A., Peters, J., & Lohmann, C. 2012. Peripheral and central inputs shape network dynamics in the developing visual cortex in vivo. *Curr Biol*, 22(3): 253-258.

Silver, J., Edwards, M. A., & 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): 415-436.

Silver, J., Lorenz, S. E., Wahlsten, D., & Coughlin, J. 1982. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol*, 210(1): 10-29.

Simon, D. K., & O'Leary, D. D. 1992. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci*, 12(4): 1212-1232.

Sobotzik, J. M., Sie, J. M., Politi, C., Del Turco, D., Bennett, V., Deller, T., & Schultz, C. 2009. AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(41): 17564-17569.

Song, A. H., Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S., & Poo, M. M. 2009. A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell*, 136(6): 1148-1160.

Spitzer, N. C. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120): 707-712.

Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119(1): 19-31.

Spooren, W., Lindemann, L., Ghosh, A., & Santarelli, L. 2012. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 33(12): 669-684.

Srinivasan, K., Leone, D. P., Bateson, R. K., Dobрева, G., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. 2012. A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47): 19071-19078.

Stanley, G. B. 2013. Reading and writing the neural code. *Nat Neurosci*, 16(3): 259-263.

Storm, J. F. 2000. K(+) channels and their distribution in large cortical pyramidal neurones. *J Physiol*, 525 Pt 3: 565-566.

Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M.,

& Noda, T. 2002. Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev*, 16(14): 1760-1765.

Sur, M., & Leamey, C. A. 2001. Development and plasticity of cortical areas and networks. *Nat Rev Neurosci*, 2(4): 251-262.

Suter, B. A., Migliore, M., & Shepherd, G. M. 2013. Intrinsic electrophysiology of mouse corticospinal neurons: a class-specific triad of spike-related properties. *Cereb Cortex*, 23(8): 1965-1977.

Tang, F., Dent, E. W., & Kalil, K. 2003. Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci*, 23(3): 927-936.

Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., & Gruss, P. 2001. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Development*, 128(11): 1983-1993.

Tatiana Boiko, M. N. R., S. rock Levinson, John H. Caldwell, Gail Mandel, James S. Trimmer, and Gary Matthews. 2001. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron*, 30: 91-104.

Torborg, C. L., & Feller, M. B. 2005. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol*, 76(4): 213-235.

Tschritter, O., Machicao, F., Stefan, N., Schafer, S., Weigert, C., Staiger, H., Spieth, C., Haring, H. U., & Fritsche, A. 2006. A new variant in the human *Kv1.3* gene is associated with low insulin sensitivity and impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(2): 654-658.

Unwin, N. 1989. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron*, 3(6): 665-676.

Upadhyaya, S. C., Smith, T. K., Brennan, P. A., Mychaleckyj, J. C., & Hegde, A. N. 2011. Expression profiling reveals differential gene induction underlying specific and non-specific memory for pheromones in mice. *Neurochem Int*, 59(6): 787-803.

Vacher, H., & Trimmer, J. S. 2012. Trafficking mechanisms underlying neuronal voltage-gated ion channel localization at the axon initial segment. *Epilepsia*, 53 Suppl 9: 21-31.

Van Wart, A., Trimmer, J. S., & Matthews, G. 2007. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol*, 500(2): 339-352.

Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., & Luscombe, N. M. 2009. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*, 10(4): 252-263.

Vidal, C. N., Nicolson, R., DeVito, T. J., Hayashi, K. M., Geaga, J. A., Drost, D. J., Williamson, P. C., Rajakumar, N., Sui, Y., Dutton, R. A., Toga, A. W., & Thompson, P. M. 2006. Mapping corpus callosum deficits in autism: an index of aberrant cortical connectivity. *Biol Psychiatry*, 60(3): 218-225.

Vucic, S., & Kiernan, M. C. 2006. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol*, 117(7): 1458-1466.

Vucic, S., Krishnan, A. V., & Kiernan, M. C. 2007. Fatigue and activity dependent changes in axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(11): 1202-1208.

Wang, C. L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X. J., Duan, S. M., Xiong, Z. Q., & Ding, Y. Q. 2007. Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J Neurosci*, 27(42): 11334-11342.

Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. 2006. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*, 49(8): 1732-1741.

West, A. E., & Greenberg, M. E. 2011. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6).

Wilczynski, B., Liu, Y. H., Yeo, Z. X., & Furlong, E. E. 2012. Predicting spatial and temporal gene expression using an integrative model of transcription factor occupancy and chromatin state. *PLoS Comput Biol*, 8(12): e1002798.

Williams, E. O., Sickles, H. M., Dooley, A. L., Palumbos, S., Bisogni, A. J., & Lin, D. M. 2011. Delta Protocadherin 10 is Regulated by Activity in the Mouse Main Olfactory System. *Front Neural Circuits*, 5: 9.

Williams, R. S., Hauser, S. L., Purpura, D. P., DeLong, G. R., & Swisher, C. N. 1980. Autism and mental retardation: neuropathologic studies performed in four retarded persons with autistic behavior. *Arch Neurol*, 37(12): 749-753.

Winckler, B., Forscher, P., & Mellman, I. 1999. A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature*, 397(6721): 698-701.

Wollner, D. A., & Catterall, W. A. 1986. Localization of sodium channels in axon hillocks and initial segments of retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(21): 8424-8428.

Wonders, C. P., & Anderson, S. A. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 7(9): 687-696.

Yamamoto, N., & Lopez-Bendito, G. 2012. Shaping brain connections through spontaneous neural activity. *Eur J Neurosci*, 35(10): 1595-1604.

Yang, J. W., Hanganu-Opatz, I. L., Sun, J. J., & Luhmann, H. J. 2009. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci*, 29(28): 9011-9025.

Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'Donnell, S., Brown, H. E., Osborne, J., Axel, R., & Gogos, J. A. 2004. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 42(4): 553-566.

Zimmer, C., Tiveron, M. C., Bodmer, R., & Cremer, H. 2004. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex*, 14(12): 1408-1420.

Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. 2012. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(3).

Zucker, R. S., & Regehr, W. G. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64: 355-405.

Material Suplementario.

Regiones genéticas con SARE

grupo	Visualización por el buscador ECR	longitud	# SUFT	tipo	gen(s)
1	chr6:88029130-88029206 (na)	77 bps	4	utr	ZNF292
2	chr13:99436756-99436913 (na)	158 bps	3	utr	ZIC2
3	chr2:144862264-144862430 (na)	167 bps	10	utr	ZEB2
4	chr8:64285179-64285291 (na)	113 bps	8	utr	YTHDF3
5	chr2:17700141-17700283 (na)	143 bps	6	utr	VSNL1
6	chr3:51410661-51410774 (na)	114 bps	4	utr	VPRBP
7	chr6:43861977-43862132 (na)	156 bps	6	utr	VEGFA
8	chr20:56453931-56454112 (na)	182 bps	5	utr	VAPB
9	chr4:103936927-103937113 (na)	187 bps	3	utr	UBE2D3
10	chr4:103937587-103937812 (na)	226 bps	5	utr	UBE2D3
11	chr19:36457730-36457899 (na)	170 bps	9	utr	TSHZ3
12	chr3:151638673-151638768 (na)	96 bps	5	utr	TSC22D2
13	chr16:48821232-48821309 (na)	78 bps	4	utr	PAPD5
14	chr3:24135570-24135741 (na)	172 bps	4	utr	THRB
15	chr16:66435441-66435604 (na)	164 bps	3	utr	THAP11
16	chr15:55365995-55366181 (na)	187 bps	5	utr	TCF12
17	chr1:11006795-11006984 (na)	190 bps	4	utr	TARDBP
18	chr6:86380723-86380764 (na)	42 bps	4	utr	SYNCRIP
19	chr20:41523477-41523677 (na)	201 bps	5	utr	SRSF6
20	chr3:187117518-187117659 (na)	142 bps	5	utr	SRSF2
21	chr7:35911302-35911444 (na)	143 bps	6	utr	SEPT7
22	chr2:165653940-165653996 (na)	57 bps	3	utr	SCN3A
23	chr6:45623974-45624216 (na)	243 bps	3	utr	RUNX2
24	chr2:46649653-46649782 (na)	130 bps	5	utr	RHOQ
25	chr12:26114126-26114262 (na)	137 bps	4	utr	RASSF8
26	chr7:44887756-44887953 (na)	198 bps	14	utr	PURB
27	chr2:20313401-20313556 (na)	156 bps	6	utr	PUM2
28	chr10:118295321-118295454 (na)	134 bps	6	utr	PNLIP
29	chr6:89930868-89931061 (na)	194 bps	4	utr	PM20D2
30	chr4:41441065-41441205 (na)	141 bps	3	utr	PHOX2B
31	chr8:133894401-133894575 (na)	175 bps	3	utr	PHF20L1
32	chr12:52159577-52159926 (na)	350 bps	5	utr	PCBP2
33	chr18:53302455-53302536 (na)	82 bps	8	utr	ONECUT2
34	chr4:174698257-174698363 (na)	107 bps	4	utr	Nbla00301
35	chr11:65944906-65945068 (na)	163 bps	23	utr	NPAS4
36	chr14:25986519-25986617 (na)	99 bps	4	utr	NOVA1
37	chr17:23546487-23546645 (na)	159 bps	6	utr	NLK
38	chr5:37101435-37101716 (na)	282 bps	9	utr	NIPBL
39	chr4:120276376-120276409 (na)	34 bps	14	utr	MYOZ2
40	chr1:67223721-67223806 (na)	86 bps	13	utr	MIER1
41	chr15:80121419-80121592 (na)	174 bps	9	utr	MEX3B
42	chr9:122403055-122403191 (na)	137 bps	3	utr	MEGF9

43	chr15:98071239-98071485 (na)	247 bps	4	utr	MEF2A
44	chr6:114289203-114289329 (na)	127 bps	4	utr	MARCKS
45	chr17:59126067-59126318 (na)	252 bps	5	utr	MAP3K3
46	chr1:233890961-233891230 (na)	270 bps	6	utr	LYST
47	chr12:57552310-57552507 (na)	198 bps	5	utr	LRIG3
48	chr13:24042825-24043032 (na)	208 bps	4	utr	LOC374491
49	chr11:36041375-36041490 (na)	116 bps	13	utr	LDLRAD3
50	chr10:88483147-88483225 (na)	79 bps	10	utr	LDB3
51	chr3:125876717-125876931 (na)	215 bps	12	utr	KALRN
52	chr15:88428230-88428311 (na)	82 bps	10	utr	IDH2
53	chr11:33331913-33332001 (na)	89 bps	3	utr	HIPK3
54	chr17:39556538-39556713 (na)	176 bps	17	utr	HDAC5
55	chr1:1707132-1707352 (na)	221 bps	6	utr	GNB1
56	chr17:78154151-78154210 (na)	60 bps	5	utr	FO XK2
57	chr5:137869923-137869974 (na)	52 bps	5	utr	ETF1
58	chr8:128562481-128562614 (na)	134 bps	3	utr	LOC727677
59	chr22:48553478-48553517 (na)	40 bps	5	utr	BRD1
60	chr2:50001695-50001797 (na)	103 bps	8	utr	NRXN1
61	chr7:101679826-101680048 (na)	223 bps	9	utr	CUX1
62	chr10:11412933-11413053 (na)	121 bps	8	utr	CELF2
63	chr6:86374822-86374903 (na)	82 bps	6	utr	ANKMY2
64	chr2:189547308-189547360 (na)	53 bps	3	utr	COL3A1
65	chr6:75851884-75851982 (na)	99 bps	3	utr	COL12A1
66	chr4:54570934-54571084 (na)	151 bps	4	utr	CHIC2
67	chr20:3724885-3724940 (na)	56 bps	6	utr	CDC25B
68	chr2:228390197-228390370 (na)	174 bps	5	utr	CCL20
69	chr2:55369083-55369211 (na)	129 bps	6	utr	CCDC88A
70	chr2:160837989-160838225 (na)	237 bps	7	utr	RBMS1
71	chr21:34131323-34131507 (na)	185 bps	3	utr	DONSON
72	chr18:28771599-28771765 (na)	167 bps	6	utr	C18orf34
73	chr10:21847179-21847356 (na)	178 bps	7	utr	C10orf140
74	chr2:32696519-32696691 (na)	173 bps	11	utr	BIRC6
75	chr3:84798095-84798282 (na)	188 bps	7	utr	LOC440970
76	chr20:11195268-11195475 (na)	208 bps	9	utr	LOC339593
77	chr3:8518145-8518337 (na)	193 bps	21	utr	BC020876
78	chr1:210848431-210848640 (na)	210 bps	18	utr	ATF3
79	chr10:104423648-104423836 (na)	189 bps	9	utr	ARL3
80	chr10:61458993-61459205 (na)	213 bps	8	utr	ANK3
81	chr3:106776276-106776324 (na)	49 bps	9	utr	ALCAM
82	chr11:126442031-126442135 (na)	105 bps	19	utr	AK095187
83	chr15:93842084-93842227 (na)	144 bps	3	utr	LOC145820
84	chr9:35901438-35901568 (na)	131 bps	3	utr	LOC158376
85	chr2:148401626-148401777 (na)	152 bps	8	utr	ACVR2A
86	chr10:76827669-76827873 (na)	205 bps	19	promotor	ZNF503 (0.0kb)
87	chr3:138967664-138967755 (na)	92 bps	3	promotor	SOX14 (0.6kb)

88	chr5:115806730-115806859 (na)	130 bps	11	promotor	SEMA6A (0.3kb)
89	chr16:52190311-52190498 (na)	188 bps	6	promotor	RPGRIP1L (0.8kb)
90	chr16:52190659-52190793 (na)	135 bps	3	promotor	RPGRIP1L (0.5kb)
91	chr14:88091151-88091291 (na)	141 bps	13	promotor	PTPN21 (0.3kb)
92	chr16:2812752-2812942 (na)	191 bps	4	promotor	PRSS21 (1kb)
93	chr11:85458500-85458686 (na)	187 bps	14	promotor	PICALM (0.7kb)
94	chr14:22947490-22947648 (na)	159 bps	7	promotor	MYH6 (0.2kb)
95	chr1:168404324-168404472 (na)	149 bps	8	promotor	METTL11B (0.8kb)
96	chr7:123082954-123083080 (na)	127 bps	15	promotor	LMOD2 (0.0kb)
97	chr10:3817613-3817731 (na)	119 bps	12	promotor	KLF6 (0.2kb)
98	chr5:78846127-78846248 (na)	122 bps	36	promotor	HOMER1 (0.7kb)
99	chr7:114119643-114119884 (na)	242 bps	8	promotor	FOXP2 (1.3kb)
100	chr3:135996641-135996849 (na)	209 bps	6	promotor	EphB1 (0.1kb)
101	chr9:77998378-77998496 (na)	119 bps	6	promotor	PCSK5 (0.2kb)
102	chr1:85816867-85817032 (na)	166 bps	18	promotor	DDAH1 (0.3kb)
103	chr1:201197168-201197230 (na)	63 bps	10	promotor	CYB5R1 (0.4kb)
104	chr6:53991565-53991622 (na)	58 bps	5	promotor	MLIP (0.1kb)
105	chr10:17296174-17296369 (na)	196 bps	13	promotor	VIM (0.8kb)
106	chr8:136371203-136371357 (na)	155 bps	6	promotor	LOC286094 (1.2kb)
107	chr2:200424740-200424965 (na)	226 bps	11	promotor	FONG (0.6kb)
108	chr11:43920639-43920744 (na)	106 bps	14	promotor	AX748080 (1.2kb)
109	chr20:36467562-36467595 (na)	34 bps	4	promotor	AX746690 (0.5kb)
110	chr1:232926260-232926405 (na)	146 bps	4	promotor	LOC100506810 (1.4kb)
111	chr4:182318211-182318352 (na)	142 bps	4	promotor	LINC00290 (0.9kb)
112	chr17:40190654-40190717 (na)	64 bps	7	promotor	ADAM11 (1.4kb)
113	chr3:103632814-103632942 (na)	129 bps	4	intrón	ZPLD1
114	chr22:27629424-27629629 (na)	206 bps	13	intrón	ZNRF3
115	chr18:20946781-20946869 (na)	89 bps	9	intrón	ZNF521
116	chr18:72334477-72334616 (na)	140 bps	18	intrón	ZNF516
117	chr9:108670273-108670430 (na)	158 bps	3	intrón	ZNF462
118	chr9:108680986-108681151 (na)	166 bps	10	intrón	ZNF462
119	chr2:180060039-180060115 (na)	77 bps	7	intrón	ZNF385B
120	chr10:63811297-63811363 (na)	67 bps	11	intrón	ZNF365
121	chr8:123865072-123865248 (na)	177 bps	10	intrón	ZHX2
122	chr8:106418469-106418559 (na)	91 bps	4	intrón	ZFPM2
123	chr8:77852154-77852357 (na)	204 bps	6	intrón	ZFHX4
124	chr8:77875193-77875357 (na)	165 bps	7	intrón	ZFHX4
125	chr2:144980530-144980578 (na)	49 bps	4	intrón	ZEB2
126	chr8:144617334-144617413 (na)	80 bps	4	intrón	ZC3H3
127	chr18:44180202-44180345 (na)	144 bps	3	intrón	ZBTB7C
128	chr3:115916090-115916327 (na)	238 bps	6	intrón	ZBTB20
129	chr3:116004115-116004213 (na)	99 bps	18	intrón	ZBTB20
130	chr3:116174853-116174960 (na)	108 bps	5	intrón	ZBTB20
131	chr3:116299318-116299538 (na)	221 bps	5	intrón	ZBTB20
132	chr3:116302294-116302369 (na)	76 bps	4	intrón	ZBTB20

133	chr11:113446483-113446722 (na)	240 bps	25	intrón	ZBTB16
134	chr2:173822916-173823109 (na)	194 bps	5	intrón	ZAK
135	chr16:77256178-77256403 (na)	226 bps	9	intrón	WVOX
136	chr16:77265082-77265214 (na)	133 bps	6	intrón	WVOX
137	chr16:77783356-77783508 (na)	153 bps	5	intrón	WVOX
138	chr10:49850582-49850664 (na)	83 bps	6	intrón	WDFY4
139	chr10:114358362-114358544 (na)	183 bps	8	intrón	VTI1A
140	chr2:58135730-58135951 (na)	222 bps	3	intrón	VRK2
141	chr1:12450435-12450530 (na)	96 bps	5	intrón	VPS13D
142	chr16:69283494-69283535 (na)	42 bps	4	intrón	VAC14
143	chr1:214474989-214475186 (na)	198 bps	6	intrón	USH2A
144	chr4:96678461-96678575 (na)	115 bps	3	intrón	UNC5C
145	chr13:39822525-39822771 (na)	247 bps	10	intrón	TTL/ETV6 fusion
146	chr4:147974995-147975242 (na)	248 bps	5	intrón	TTC29
147	chr19:36488594-36488694 (na)	101 bps	3	intrón	TSHZ3
148	chr8:116532975-116533018 (na)	44 bps	3	intrón	TRPS1
149	chr5:135646026-135646132 (na)	107 bps	3	intrón	TRPC7
150	chr5:14239375-14239513 (na)	139 bps	3	intrón	TRIO
151	chr8:60191913-60191964 (na)	52 bps	7	intrón	TOX
152	chr1:173650933-173651114 (na)	182 bps	7	intrón	TNR
153	chr9:116843419-116843450 (na)	32 bps	8	intrón	TNC
154	chr16:67546629-67546694 (na)	66 bps	4	intrón	TMCO7
155	chr9:81456446-81456538 (na)	93 bps	4	intrón	TLE4
156	chr1:216642441-216642559 (na)	119 bps	5	intrón	TGFB2
157	chr18:51400576-51400622 (na)	47 bps	3	intrón	TCF4
158	chr6:45193719-45193958 (na)	240 bps	3	intrón	SUPT3H
159	chr2:168531541-168531791 (na)	251 bps	6	intrón	STK39
160	chr2:152708994-152709055 (na)	62 bps	4	intrón	STAM2
161	chr8:53301818-53301864 (na)	47 bps	6	intrón	ST18
162	chr8:53370117-53370255 (na)	139 bps	6	intrón	ST18
163	chr1:32040780-32040816 (na)	37 bps	5	intrón	SPOCD1
164	chr1:118480687-118480738 (na)	52 bps	4	intrón	SPAG17
165	chr11:16096620-16096727 (na)	108 bps	3	intrón	SOX6
166	chr11:16217330-16217503 (na)	174 bps	8	intrón	SOX6
167	chr11:16335249-16335409 (na)	161 bps	15	intrón	SOX6
168	chr11:110981606-110981794 (na)	189 bps	5	intrón	SIK2
169	chr5:121768213-121768319 (na)	107 bps	5	intrón	SNCAIP
170	chr1:181763297-181763452 (na)	156 bps	5	intrón	SMG7
171	chr3:57851744-57851912 (na)	169 bps	17	intrón	SLMAP
172	chr4:186301819-186301883 (na)	65 bps	10	intrón	SLC25A4
173	chr9:129874834-129874910 (na)	77 bps	9	intrón	SLC25A25
174	chr6:101011444-101011577 (na)	134 bps	12	intrón	SIM1
175	chr10:105604636-105604745 (na)	110 bps	16	intrón	SH3PXD2A
176	chr2:73028798-73029155 (na)	358 bps	9	intrón	SFXN5
177	chr5:132139630-132139682 (na)	53 bps	4	intrón	SEPT8

178	chr14:54209688-54209858 (na)	171 bps	9	intrón	SAMD4A
179	chr13:22850148-22850243 (na)	96 bps	12	intrón	SACS
180	chr3:159659654-159659856 (na)	203 bps	6	intrón	RSRC1
181	chr6:117718452-117718630 (na)	179 bps	15	intrón	ROS1
182	chr9:76339552-76339652 (na)	101 bps	4	intrón	RORB
183	chr15:59220317-59220530 (na)	214 bps	7	intrón	RORA
184	chr8:33531974-33532161 (na)	188 bps	12	intrón	RNF122
185	chr8:33535452-33535505 (na)	54 bps	4	intrón	RNF122
186	chr12:105796625-105796791 (na)	167 bps	7	intrón	RIC8B
187	chr9:115367539-115367663 (na)	125 bps	10	intrón	RGS3
188	chr8:54980737-54980935 (na)	199 bps	6	intrón	RGS20
189	chrX:109572490-109572682 (na)	193 bps	3	intrón	RGAG1
190	chr6:46309940-46310117 (na)	178 bps	18	intrón	RCAN2
191	chr6:46513476-46513616 (na)	141 bps	12	intrón	RCAN2
192	chr5:179533767-179533909 (na)	143 bps	9	intrón	RASGEF1C
193	chr5:130900244-130900304 (na)	61 bps	12	intrón	RAPGEF6
194	chr4:160423080-160423156 (na)	77 bps	15	intrón	RAPGEF2
195	chr14:67911249-67911486 (na)	238 bps	6	intrón	RAD51L1
196	chr14:68174819-68175024 (na)	206 bps	4	intrón	RAD51L1
197	chr1:172818674-172818803 (na)	130 bps	8	intrón	RABGAP1L
198	chr3:61745509-61745771 (na)	263 bps	5	intrón	PTPRG
199	chr1:196921733-196921904 (na)	172 bps	6	intrón	PTPRC
200	chr1:117330447-117330643 (na)	197 bps	7	intrón	PTGFRN
201	chr9:78606831-78606942 (na)	112 bps	9	intrón	PRUNE2
202	chr5:146000364-146000511 (na)	148 bps	3	intrón	PPP2R2B
203	chr12:61472662-61472799 (na)	138 bps	5	intrón	PPM1H
204	chrX:24827585-24827738 (na)	154 bps	6	intrón	POLA1
205	chrX:24856301-24856546 (na)	246 bps	3	intrón	POLA1
206	chrX:24909485-24909596 (na)	112 bps	4	intrón	POLA1
207	chr12:93222810-93222906 (na)	97 bps	6	intrón	PLXNC1
208	chr7:131687291-131687353 (na)	63 bps	6	intrón	PLXNA4
209	chr5:41413347-41413462 (na)	116 bps	5	intrón	PLCXD3
210	chr6:51624108-51624183 (na)	76 bps	4	intrón	PKHD1
211	chr17:6392797-6392951 (na)	155 bps	10	intrón	PITPNM3
212	chr6:12842294-12842463 (na)	170 bps	11	intrón	PHACTR1
213	chr5:139654583-139654770 (na)	188 bps	6	intrón	PFDN1
214	chr3:73523151-73523231 (na)	81 bps	3	intrón	PDZRN3
215	chr4:54263793-54263846 (na)	54 bps	3	intrón	PDGFRA
216	chr8:66867308-66867405 (na)	98 bps	4	intrón	PDE7A
217	chr12:20489998-20490082 (na)	85 bps	8	intrón	PDE3A
218	chr2:178445922-178446010 (na)	89 bps	5	intrón	PDE11A
219	chrX:24517307-24517486 (na)	180 bps	9	intrón	PCYT1B
220	chr13:65901735-65901931 (na)	197 bps	9	intrón	PCDH9
221	chr13:66430779-66430886 (na)	108 bps	6	intrón	PCDH9
222	chr12:52144474-52144612 (na)	139 bps	10	intrón	PCBP2

223	<u>chr9:127712305-127712525 (na)</u>	221 bps	16	intrón	PBX3
224	<u>chr14:36203844-36203990 (na)</u>	147 bps	8	intrón	PAX9
225	<u>chr11:31782197-31782293 (na)</u>	97 bps	7	intrón	PAX6
226	<u>chr5:50014228-50014283 (na)</u>	56 bps	3	intrón	PARP8
227	<u>chr10:50730333-50730505 (na)</u>	173 bps	3	intrón	PARG
228	<u>chr10:50952073-50952245 (na)</u>	173 bps	3	intrón	PARG
229	<u>chr1:174868836-174869008 (na)</u>	173 bps	6	intrón	PAPPA2
230	<u>chr5:76965616-76965937 (na)</u>	322 bps	10	intrón	OTP
231	<u>chr5:166763401-166763509 (na)</u>	109 bps	3	intrón	ODZ2
232	<u>chr5:166845008-166845071 (na)</u>	64 bps	3	intrón	ODZ2
233	<u>chr5:167088978-167089091 (na)</u>	114 bps	9	intrón	ODZ2
234	<u>chrX:123389707-123389868 (na)</u>	162 bps	3	intrón	ODZ1
235	<u>chr15:86393829-86393965 (na)</u>	137 bps	10	intrón	NTRK3
236	<u>chr11:64239850-64239972 (na)</u>	123 bps	9	intrón	NRXN2
237	<u>chr2:50921710-50921769 (na)</u>	60 bps	3	intrón	NRXN1
238	<u>chr8:32334514-32334648 (na)</u>	135 bps	5	intrón	NRG1
239	<u>chr8:32530425-32530597 (na)</u>	173 bps	13	intrón	NRG1
240	<u>chr12:50731190-50731407 (na)</u>	218 bps	18	intrón	NR4A1
241	<u>chr14:32747834-32747917 (na)</u>	84 bps	6	intrón	NPAS3
242	<u>chr14:32995199-32995270 (na)</u>	72 bps	4	intrón	NPAS3
243	<u>chr14:33032794-33032987 (na)</u>	194 bps	6	intrón	NPAS3
244	<u>chr14:33191768-33191826 (na)</u>	59 bps	9	intrón	NPAS3
245	<u>chr2:100905773-100905882 (na)</u>	110 bps	3	intrón	NPAS2
246	<u>chr19:13008555-13008786 (na)</u>	232 bps	21	intrón	NFIX
247	<u>chr9:14232894-14233088 (na)</u>	195 bps	3	intrón	NFIB
248	<u>chr9:14287734-14287828 (na)</u>	95 bps	5	intrón	NFIB
249	<u>chr11:21101800-21101979 (na)</u>	180 bps	5	intrón	NELL1
250	<u>chr11:112555280-112555407 (na)</u>	128 bps	6	intrón	NCAM1
251	<u>chr3:176308509-176308682 (na)</u>	174 bps	5	intrón	NAALADL2
252	<u>chr17:12510722-12510866 (na)</u>	145 bps	11	intrón	MYOCD
253	<u>chr2:210876630-210876809 (na)</u>	180 bps	11	intrón	MYL1
254	<u>chr17:53028715-53028767 (na)</u>	53 bps	3	intrón	MSI2
255	<u>chr2:47601025-47601110 (na)</u>	86 bps	4	intrón	MSH2
256	<u>chr2:47648899-47649120 (na)</u>	222 bps	11	intrón	MSH2
257	<u>chr11:10634140-10634306 (na)</u>	167 bps	8	intrón	MRVII
258	<u>chrX:10411263-10411318 (na)</u>	56 bps	9	intrón	MID1
259	<u>chr4:91268895-91268951 (na)</u>	57 bps	4	intrón	FAM190A
260	<u>chr8:8768017-8768128 (na)</u>	112 bps	7	intrón	MFHAS1
261	<u>chr4:171181605-171181668 (na)</u>	64 bps	4	intrón	MFAP3L
262	<u>chr5:168191131-168191360 (na)</u>	230 bps	13	intrón	SLIT3
263	<u>chr15:64091919-64092071 (na)</u>	153 bps	6	intrón	MEGF11
264	<u>chr5:126698460-126698597 (na)</u>	138 bps	3	intrón	MEGF10
265	<u>chr5:94199479-94199703 (na)</u>	225 bps	3	intrón	MCTP1
266	<u>chr15:65719712-65719880 (na)</u>	169 bps	5	intrón	MAP2K5
267	<u>chr2:172647307-172647388 (na)</u>	82 bps	3	intrón	METAP1D

268	<u>chr20:14850235-14850490 (na)</u>	256 bps	5	intrón	MACROD2
269	<u>chr2:238217609-238217799 (na)</u>	191 bps	6	intrón	LRRFIP1
270	<u>chr1:70123227-70123448 (na)</u>	222 bps	3	intrón	LRRC7
271	<u>chr1:70145872-70146093 (na)</u>	222 bps	3	intrón	LRRC7
272	<u>chr11:41005613-41005764 (na)</u>	152 bps	3	intrón	LRRC4C
273	<u>chr2:140743259-140743481 (na)</u>	223 bps	8	intrón	LRP1B
274	<u>chr5:21609624-21609666 (na)</u>	43 bps	4	intrón	LOC728411
275	<u>chr1:200162244-200162304 (na)</u>	61 bps	8	intrón	LMOD1
276	<u>chr13:75291325-75291398 (na)</u>	74 bps	5	intrón	LMO7
277	<u>chr1:87576402-87576511 (na)</u>	110 bps	3	intrón	LMO4
278	<u>chr1:87579264-87579442 (na)</u>	179 bps	4	intrón	LMO4
279	<u>chr2:207739154-207739335 (na)</u>	182 bps	18	intrón	KLF7
280	<u>chr15:29433019-29433134 (na)</u>	116 bps	10	intrón	KLF13
281	<u>chr4:92015609-92015760 (na)</u>	152 bps	7	intrón	FAM190A
282	<u>chr9:125456453-125456597 (na)</u>	145 bps	14	intrón	DENND1A
283	<u>chr18:32998262-32998421 (na)</u>	160 bps	6	intrón	KIAA1328
284	<u>chr18:33010086-33010156 (na)</u>	71 bps	7	intrón	KIAA1328
285	<u>chr5:167191741-167191913 (na)</u>	173 bps	6	intrón	ODZ2
286	<u>chr14:78141637-78141785 (na)</u>	149 bps	5	intrón	NRXN3
287	<u>chr13:41120358-41120536 (na)</u>	179 bps	5	intrón	KIAA0564
288	<u>chr3:55527731-55527847 (na)</u>	117 bps	5	intrón	ERC2
289	<u>chr3:55711169-55711323 (na)</u>	155 bps	6	intrón	ERC2
290	<u>chr3:55764788-55764920 (na)</u>	133 bps	8	intrón	ERC2
291	<u>chr10:78669897-78670031 (na)</u>	135 bps	9	intrón	KCNMA1
292	<u>chr7:119931586-119931839 (na)</u>	254 bps	7	intrón	KCND2
293	<u>chr3:157618462-157618568 (na)</u>	107 bps	9	intrón	KCNAB1
294	<u>chr20:42243037-42243082 (na)</u>	46 bps	17	intrón	JPH2
295	<u>chr7:28033130-28033262 (na)</u>	133 bps	7	intrón	JAZF1
296	<u>chr3:37598759-37598912 (na)</u>	154 bps	19	intrón	ITGA9
297	<u>chr15:65547726-65548036 (na)</u>	311 bps	8	intrón	IQCH
298	<u>chr3:49038365-49038628 (na)</u>	264 bps	4	intrón	IMPDH2
299	<u>chr10:119923308-119923377 (na)</u>	70 bps	5	intrón	CYP81F2
300	<u>chr7:8212438-8212603 (na)</u>	166 bps	4	intrón	ICA1
301	<u>chr13:95585649-95585708 (na)</u>	60 bps	9	intrón	HS6ST3
302	<u>chr12:52712962-52713039 (na)</u>	78 bps	11	intrón	HOXC5
303	<u>chr17:43986489-43986678 (na)</u>	190 bps	6	intrón	HOXB3
304	<u>chr7:139095129-139095233 (na)</u>	105 bps	6	intrón	HIPK2
305	<u>chr10:93160966-93161025 (na)</u>	60 bps	8	intrón	HECTD2
306	<u>chr7:18714356-18714586 (na)</u>	231 bps	11	intrón	HDAC9
307	<u>chr7:18776732-18776923 (na)</u>	192 bps	10	intrón	HDAC9
308	<u>chr5:45658302-45658446 (na)</u>	145 bps	6	intrón	HCN1
309	<u>chr7:126196073-126196312 (na)</u>	240 bps	8	intrón	GRM8
310	<u>chr1:37076923-37077039 (na)</u>	117 bps	8	intrón	GRIK3
311	<u>chr4:94723258-94723496 (na)</u>	239 bps	8	intrón	GRID2
312	<u>chr1:238760090-238760135 (na)</u>	46 bps	3	intrón	GREM2

313	<u>chr22:38635106-38635228 (na)</u>	123 bps	6	intrón	GRAP2
314	<u>chr6:1723118-1723174 (na)</u>	57 bps	3	intrón	GMDS
315	<u>chr7:42238761-42238834 (na)</u>	74 bps	12	intrón	GLI3
316	<u>chr5:161056699-161056832 (na)</u>	134 bps	3	intrón	GABRA6
317	<u>chr6:29688458-29688502 (na)</u>	45 bps	4	intrón	GABBR1
318	<u>chr15:42161214-42161429 (na)</u>	216 bps	10	intrón	FRMD5
319	<u>chr10:13972721-13972875 (na)</u>	155 bps	9	intrón	FRMD4A
320	<u>chr7:114089033-114089231 (na)</u>	199 bps	12	intrón	FOXP2
321	<u>chr3:71180125-71180218 (na)</u>	94 bps	4	intrón	FOXP1
322	<u>chr3:71186927-71187075 (na)</u>	149 bps	4	intrón	FOXP1
323	<u>chr3:71278021-71278168 (na)</u>	148 bps	14	intrón	FOXP1
324	<u>chr1:238510540-238510732 (na)</u>	193 bps	12	intrón	FMN2
325	<u>chr5:92837869-92838097 (na)</u>	229 bps	7	intrón	FLJ42709
326	<u>chr7:96464843-96465017 (na)</u>	175 bps	4	intrón	DLX6-AS1
327	<u>chr2:66151497-66151647 (na)</u>	151 bps	9	intrón	FLJ16124
328	<u>chr11:60952043-60952184 (na)</u>	142 bps	6	intrón	CPSF7
329	<u>chr2:24131013-24131123 (na)</u>	111 bps	9	intrón	FKBP1B
330	<u>chrX:135106625-135106829 (na)</u>	205 bps	5	intrón	FHL1
331	<u>chr3:59758463-59758616 (na)</u>	154 bps	3	intrón	FHIT
332	<u>chr3:60606722-60606874 (na)</u>	153 bps	11	intrón	FHIT
333	<u>chr3:60721693-60721888 (na)</u>	196 bps	4	intrón	FHIT
334	<u>chr3:122797461-122797553 (na)</u>	93 bps	7	intrón	FBXO40
335	<u>chr5:15641143-15641223 (na)</u>	81 bps	8	intrón	FBXL7
336	<u>chr5:107488254-107488478 (na)</u>	225 bps	4	intrón	FBXL17
337	<u>chr10:81262308-81262432 (na)</u>	125 bps	3	intrón	FAM22A
338	<u>chr5:93041362-93041570 (na)</u>	209 bps	4	intrón	FAM172A
339	<u>chr13:106848180-106848310 (na)</u>	131 bps	10	intrón	FAM155A
340	<u>chr9:128210388-128210458 (na)</u>	71 bps	4	intrón	FAM125B
341	<u>chr3:170742761-170742875 (na)</u>	115 bps	4	intrón	MECOM
342	<u>chr1:214757981-214758169 (na)</u>	189 bps	8	intrón	ESRRG
343	<u>chr1:214854291-214854394 (na)</u>	104 bps	4	intrón	ESRRG
344	<u>chr1:22931537-22931597 (na)</u>	61 bps	7	intrón	EPHB2
345	<u>chr20:34172712-34172878 (na)</u>	167 bps	3	intrón	EPB41L1
346	<u>chr1:50347026-50347165 (na)</u>	140 bps	11	intrón	ELAVL4
347	<u>chr1:50430520-50430584 (na)</u>	65 bps	5	intrón	ELAVL4
348	<u>chr15:39994055-39994163 (na)</u>	109 bps	13	intrón	EHD4
349	<u>chr5:106841528-106841703 (na)</u>	176 bps	6	intrón	EFNA5
350	<u>chr11:27673606-27673790 (na)</u>	185 bps	3	intrón	BDNF
351	<u>chr13:77384042-77384198 (na)</u>	157 bps	10	intrón	EDNRB
352	<u>chr10:131570819-131570935 (na)</u>	117 bps	6	intrón	EBF3
353	<u>chr10:131584099-131584270 (na)</u>	172 bps	6	intrón	EBF3
354	<u>chr5:158096030-158096207 (na)</u>	178 bps	9	intrón	EBF1
355	<u>chr2:71712285-71712384 (na)</u>	100 bps	6	intrón	DYSF
356	<u>chr9:101170532-101170686 (na)</u>	155 bps	15	intrón	DQ673940
357	<u>chr5:146767016-146767178 (na)</u>	163 bps	8	intrón	DPYSL3

358	chr1:97818048-97818153 (na)	106 bps	3	intrón	DPYD
359	chrX:117516803-117516870 (na)	68 bps	3	intrón	DOCK11
360	chrX:31285193-31285317 (na)	125 bps	4	intrón	DMD
361	chr20:33786285-33786397 (na)	113 bps	4	intrón	RBM39
362	chr2:186374830-186374941 (na)	112 bps	5	intrón	FSIP2
363	chr9:124851049-124851211 (na)	163 bps	20	intrón	RABGAP1
364	chr5:37603141-37603275 (na)	135 bps	3	intrón	WDR70
365	chr11:16578362-16578496 (na)	135 bps	11	intrón	SOX6
366	chr15:28423026-28423247 (na)	222 bps	3	intrón	DKFZp434L187
367	chr18:48134205-48134314 (na)	110 bps	6	intrón	DCC
368	chr18:48478271-48478390 (na)	120 bps	4	intrón	DCC
369	chr13:70987625-70987931 (na)	307 bps	10	intrón	DACH1
370	chr13:71110800-71111098 (na)	299 bps	5	intrón	DACH1
371	chr13:71271556-71271680 (na)	125 bps	4	intrón	DACH1
372	chr12:110138077-110138222 (na)	146 bps	4	intrón	CUX2
373	chr7:101378023-101378110 (na)	88 bps	6	intrón	CUX1
374	chr5:11741578-11741764 (na)	187 bps	14	intrón	CTNND2
375	chr2:36566449-36566611 (na)	163 bps	14	intrón	CRIM1
376	chr7:28556856-28556942 (na)	87 bps	5	intrón	CREB5
377	chr4:175103059-175103166 (na)	108 bps	9	intrón	CR600749
378	chr5:173283420-173283576 (na)	157 bps	6	intrón	CPEB4
379	chr7:147306357-147306466 (na)	110 bps	12	intrón	CNTNAP2
380	chr12:68952014-68952165 (na)	152 bps	7	intrón	CNOT2
381	chr11:71758710-71758949 (na)	240 bps	4	intrón	CLPB
382	chr1:24969451-24969507 (na)	57 bps	9	intrón	CLIC4
383	chr2:26673564-26673664 (na)	101 bps	9	intrón	CIB4
384	chr7:132343981-132344091 (na)	111 bps	5	intrón	CHCHD3
385	chr2:182188625-182188787 (na)	163 bps	4	intrón	CERKL
386	chr6:21038321-21038466 (na)	146 bps	3	intrón	CDKAL1
387	chr16:60606141-60606259 (na)	119 bps	9	intrón	CDH8
388	chr7:40091835-40091997 (na)	163 bps	10	intrón	CDK13
389	chr7:128229452-128229618 (na)	167 bps	13	intrón	CCDC136
390	chr1:10655439-10655584 (na)	146 bps	3	intrón	CASZ1
391	chr10:12624290-12624498 (na)	209 bps	3	intrón	CAMK1D
392	chr3:62487098-62487310 (na)	213 bps	7	intrón	CADPS
393	chr3:85340516-85340714 (na)	199 bps	15	intrón	CADM2
394	chr19:59110832-59110897 (na)	66 bps	8	intrón	CACNG7
395	chr10:18581217-18581331 (na)	115 bps	5	intrón	CACNB2
396	chr9:96858040-96858305 (na)	266 bps	9	intrón	C9orf3
397	chr1:57127384-57127526 (na)	143 bps	13	intrón	C8A
398	chr3:101034495-101034586 (na)	92 bps	10	intrón	C3orf26
399	chr3:101162476-101162637 (na)	162 bps	20	intrón	C3orf26
400	chr2:44574757-44574942 (na)	186 bps	3	intrón	CAMKMT
401	chr2:44835189-44835471 (na)	283 bps	9	intrón	CAMKMT
402	chr21:16448680-16448754 (na)	75 bps	3	intrón	LINC00478

403	chr20:13192443-13192655 (na)	213 bps	6	intrón	ISM1
404	chr15:34810897-34810948 (na)	52 bps	3	intrón	C15orf41
405	chr15:34834773-34834927 (na)	155 bps	7	intrón	C15orf41
406	chr14:75531619-75531906 (na)	288 bps	15	intrón	IFT43
407	chr12:102412289-102412395 (na)	107 bps	3	intrón	C12orf42
408	chr10:77353745-77353867 (na)	123 bps	6	intrón	C10orf11
409	chr10:77358191-77358298 (na)	108 bps	10	intrón	C10orf11
410	chr10:77660374-77660577 (na)	204 bps	5	intrón	C10orf11
411	chr13:78032342-78032428 (na)	87 bps	11	intrón	POU4F1-AS1
412	chr2:28174523-28174666 (na)	144 bps	4	intrón	BRE
413	chr9:16713905-16714096 (na)	192 bps	5	intrón	BNC2
414	chr4:95992970-95993077 (na)	108 bps	5	intrón	BMPR1B
415	chr7:34065093-34065314 (na)	222 bps	8	intrón	BMPER
416	chr20:17471517-17471628 (na)	112 bps	7	intrón	BFSP1
417	chrX:39831503-39831566 (na)	64 bps	3	intrón	BCOR
418	chr1:147858773-147858828 (na)	56 bps	3	intrón	LOC728855
419	chr19:33703236-33703386 (na)	151 bps	4	intrón	BC068609
420	chr1:242267461-242267605 (na)	145 bps	4	intrón	LOC339529
421	chr2:145178107-145178304 (na)	198 bps	5	intrón	DKFZp686O1327
422	chr7:30547126-30547267 (na)	142 bps	4	intrón	LOC401320
423	chr8:69402074-69402203 (na)	130 bps	6	intrón	LOC286189
424	chr2:145559826-145559915 (na)	90 bps	11	intrón	BC040861
425	chr18:43269854-43270039 (na)	186 bps	13	intrón	LOC440493
426	chr4:80127906-80128018 (na)	113 bps	3	intrón	LOC100505875
427	chr3:18099112-18099329 (na)	218 bps	5	intrón	LOC339862
428	chr17:77006021-77006144 (na)	124 bps	5	intrón	BAHCC1
429	chr6:90985031-90985162 (na)	132 bps	5	intrón	BACH2
430	chr7:81091976-81092067 (na)	92 bps	8	intrón	LOC100128317
431	chr6:16488866-16488910 (na)	45 bps	7	intrón	ATXN1
432	chr6:16738977-16739093 (na)	117 bps	4	intrón	ATXN1
433	chr12:88550589-88550652 (na)	64 bps	5	intrón	ATP2B1
434	chr12:109205353-109205495 (na)	143 bps	10	intrón	ATP2A2
435	chr12:6905299-6905519 (na)	221 bps	4	intrón	ATN1
436	chr5:53404743-53404947 (na)	205 bps	4	intrón	ARL15
437	chr10:63369407-63369465 (na)	59 bps	7	intrón	ARID5B
438	chr2:144052762-144052968 (na)	207 bps	6	intrón	ARHGAP15
439	chr12:98230139-98230367 (na)	229 bps	5	intrón	ANKS1B
440	chr12:98251369-98251441 (na)	73 bps	3	intrón	ANKS1B
441	chr17:51802825-51803115 (na)	291 bps	18	intrón	ANKFN1
442	chr11:111190628-111190728 (na)	101 bps	18	intrón	ALG9
443	chr15:94636626-94636799 (na)	174 bps	5	intrón	LOC644192
444	chr5:148776919-148777063 (na)	145 bps	12	intrón	MIR143HG
445	chr3:125286235-125286406 (na)	172 bps	4	intrón	KALRN
446	chr7:96478870-96479055 (na)	186 bps	12	intrón	DLX6-AS1
447	chr4:178689756-178689990 (na)	235 bps	3	intrón	LOC285500

448	chr2:47355535-47355636 (na)	102 bps	9	intrón	AK094343
449	chr4:68267846-68267976 (na)	131 bps	6	intrón	GNRHR
450	chr8:64486841-64487018 (na)	178 bps	6	intrón	AK093370
451	chr7:121732340-121732429 (na)	90 bps	14	intrón	LOC154860
452	chr2:58711685-58711822 (na)	138 bps	4	intrón	LOC151446
453	chr2:58850615-58850871 (na)	257 bps	13	intrón	LOC151446
454	chr2:58986966-58987075 (na)	110 bps	3	intrón	LOC151446
455	chr2:218040077-218040186 (na)	110 bps	4	intrón	DIRC3
456	chr2:12509791-12509956 (na)	166 bps	12	intrón	AK001558
457	chr1:48893176-48893219 (na)	44 bps	5	intrón	AGBL4
458	chr16:65437332-65437484 (na)	153 bps	10	intrón	AF086125
459	chr1:111878697-111878854 (na)	158 bps	6	intrón	ADORA3
460	chr10:76019213-76019373 (na)	161 bps	8	intrón	ADK
461	chr10:1348106-1348247 (na)	142 bps	12	intrón	ADARB2
462	chr9:18607032-18607128 (na)	97 bps	13	intrón	ADAMTSL1
463	chr2:158439203-158439416 (na)	214 bps	16	intrón	ACVR1
464	chr16:6194940-6195046 (na)	107 bps	3	intrón	RBFOX1
465	chr16:6215433-6215556 (na)	124 bps	7	intrón	RBFOX1
466	chr16:6716773-6716900 (na)	128 bps	3	intrón	RBFOX1
467	chr4:108545692-108545829 (na)	138 bps	5	intergénica	dickkopf-2(121.4kb)<->PAPSS1(208.4kb)
468	chr4:147233180-147233308 (na)	129 bps	7	intergénica	ZNF827(154.1kb)<->BC033400(16.8kb)
469	chr3:76497389-76497490 (na)	102 bps	3	intergénica	ZNF717(580.0kb)<->ROBO2(674.5kb)
470	chr1:90343607-90343797 (na)	191 bps	3	intergénica	ZNF326(76.9kb)<->BARHL2(606.4kb)
471	chr1:90677995-90678217 (na)	223 bps	4	intergénica	ZNF326(411.3kb)<->BARHL2(271.9kb)
472	chr17:16460336-16460536 (na)	201 bps	5	intergénica	ZNF287(47.1kb)<->ZNF624(4.2kb)
473	chr1:198705213-198705298 (na)	86 bps	7	intergénica	ZNF281(59.4kb)<->KIF14(82.6kb)
474	chr5:37823803-37823918 (na)	116 bps	5	intergénica	WDR70(35.3kb)<->GDNF(27.6kb)
475	chr1:240063559-240063713 (na)	155 bps	11	intergénica	WDR64(32.0kb)<->EXO1(14.4kb)
476	chr14:96807764-96807821 (na)	58 bps	4	intergénica	VRK1(390.1kb)<->BC038465(187.1kb)
477	chr4:178251108-178251264 (na)	157 bps	6	intergénica	VEGFC(300.2kb)<->NEIL3(216.7kb)
478	chr6:145770485-145770726 (na)	242 bps	4	intergénica	UTRN(554.6kb)<->EPM2A(217.4kb)
479	chr12:94572048-94572265 (na)	218 bps	17	intergénica	USP44(102.7kb)<->NTN4(3.4kb)
480	chr7:1395519-1395564 (na)	46 bps	6	intergénica	UNCX(152.4kb)<->FLJ00139(45.0kb)
481	chr1:83680972-83681121 (na)	150 bps	3	intergénica	U80773(456.5kb)<->BC043544(3.2kb)
482	chrX:149286050-149286282 (na)	233 bps	12	intergénica	U66047(142.6kb)<->MAMLD1(78.1kb)
483	chr4:148224170-148224223 (na)	54 bps	6	intergénica	TTC29(137.7kb)<->EDNRA(397.1kb)
484	chr22:27071489-27071609 (na)	121 bps	11	intergénica	TTC28(182.0kb)<->Chk2(342.1kb)
485	chrX:106950977-106951134 (na)	158 bps	3	intergénica	TSC22D3(45.1kb)<->MID2(5.0kb)
486	chr6:124146805-124146978 (na)	174 bps	3	intergénica	TRDN(147.2kb)<->TCBA1(19.8kb)
487	chr2:238994607-238994729 (na)	123 bps	8	intergénica	TRAF3IP1(22.1kb)<->ASB1(5.6kb)
488	chr12:82236450-82236597 (na)	148 bps	3	intergénica	TMTC2(184.3kb)<->DQ572409(151.5kb)
489	chr9:107779154-107779321 (na)	168 bps	4	intergénica	TMEM38B(201.9kb)<->BC039487(130.8kb)
490	chr2:103428132-103428224 (na)	93 bps	6	intergénica	TMEM182(627.6kb)<->CR609970(608.2kb)
491	chr6:11789999-11790117 (na)	119 bps	6	intergénica	TMEM170B(98.3kb)<->C6orf105(31.8kb)
492	chr6:11723140-11723252 (na)	113 bps	4	intergénica	TMEM170B(31.4kb)<->C6orf105(98.6kb)

493	chr1:216769642-216769812 (na)	171 bps	5	intergénica	TGFB2(88.0kb)<->BC086863(551.1kb)
494	chr7:115470198-115470376 (na)	179 bps	3	intergénica	TFEC(12.2kb)<->BC040208(166.1kb)
495	chr16:74751080-74751254 (na)	175 bps	5	intergénica	TERF2IP(502.3kb)<->CNTNAP4(117.4kb)
496	chr17:56993717-56993801 (na)	85 bps	7	intergénica	TBX4(76.5kb)<->NACA2(28.8kb)
497	chr2:31843081-31843184 (na)	104 bps	3	intergénica	SRD5A2(183.5kb)<->MEMO1(103.2kb)
498	chr15:36457385-36457454 (na)	70 bps	12	intergénica	SPRED1(20.6kb)<->FAM98B(76.2kb)
499	chr15:95239025-95239062 (na)	38 bps	3	intergénica	SPATA8(109.2kb)<->BC024169(642.1kb)
500	chr7:127533511-127533707 (na)	197 bps	11	intergénica	SND1(13.6kb)<->LEP(134.9kb)
501	chr13:89412188-89412270 (na)	83 bps	4	intergénica	SLITRK5(2282.3kb)<->BC038529(531.3kb)
502	chrX:142585472-142585619 (na)	148 bps	5	intergénica	SLITRK4(34.2kb)<->SPANXN2(37.1kb)
503	chr7:95931771-95931846 (na)	76 bps	4	intergénica	SLC25A13(142.4kb)<->AK124274(17.0kb)
504	chr2:113183096-113183156 (na)	61 bps	4	intergénica	SLC20A1(45.2kb)<->NT5DC4(12.4kb)
505	chr12:58838927-58839010 (na)	84 bps	3	intergénica	SLC16A7(377.3kb)<-> >DKFZp761E1217(1549.3kb)
506	chr13:104426942-104427115 (na)	174 bps	8	intergénica	SLC10A2(1909.7kb)<->G72(489.1kb)
507	chr9:18418818-18418957 (na)	140 bps	7	intergénica	SH3GL2(631.7kb)<->ADAMTSL1(45.1kb)
508	chr17:24370770-24370861 (na)	92 bps	4	intergénica	SEZ6(13.2kb)<->PIPOX(23.2kb)
509	chr2:192461452-192461557 (na)	106 bps	6	intergénica	SDPR(41.2kb)<->TMEFF2(61.4kb)
510	chr3:19016756-19016890 (na)	135 bps	4	intergénica	SATB1(561.5kb)<->KCNH8(148.1kb)
511	chr14:54328238-54328330 (na)	93 bps	5	intergénica	SAMD4A(2.6kb)<->GCH1(50.1kb)
512	chr1:211861347-211861453 (na)	107 bps	4	intergénica	RPS6KC1(347.9kb)<->AK092251(198.1kb)
513	chrX:20233672-20233783 (na)	112 bps	5	intergénica	RPS6KA3(39.0kb)<->CNKSR2(1069.1kb)
514	chr8:74227005-74227099 (na)	95 bps	10	intergénica	RPESP(58.9kb)<->BC127738(89.1kb)
515	chr15:59383784-59383933 (na)	150 bps	5	intergénica	RORA(75.0kb)<->BC033962(294.1kb)
516	chr5:10717255-10717439 (na)	185 bps	4	intergénica	ROPN1L(199.1kb)<->DAP(14.9kb)
517	chr3:77849315-77849424 (na)	110 bps	4	intergénica	ROBO2(70.0kb)<->ROBO1(879.7kb)
518	chr3:77781817-77781866 (na)	50 bps	4	intergénica	ROBO2(2.5kb)<->ROBO1(947.2kb)
519	chr4:142345616-142345677 (na)	62 bps	3	intergénica	RNF150(71.5kb)<->ZNF330(15.8kb)
520	chr10:62454298-62454375 (na)	78 bps	8	intergénica	RHOBTB1(23.1kb)<->TMEM26(382.0kb)
521	chr15:91621992-91622209 (na)	218 bps	5	intergénica	RGMA(188.6kb)<->AK094352(34.6kb)
522	chr10:65143163-65143293 (na)	131 bps	3	intergénica	REEP3(91.2kb)<->CR622643(160.1kb)
523	chr11:119372248-119372310 (na)	63 bps	11	intergénica	PVRL1(267.6kb)<->TRIM29(114.9kb)
524	chr9:97535844-97536003 (na)	160 bps	3	intergénica	PTCH1(216.8kb)<->NR_023390(72.2kb)
525	chr9:80347204-80347426 (na)	223 bps	3	intergénica	PSAT1(212.4kb)<->CHCHD9(848.6kb)
526	chrX:150623857-150623953 (na)	97 bps	3	intergénica	PRRG3(3.2kb)<->FATE1(11.2kb)
527	chr1:212311603-212311675 (na)	73 bps	10	intergénica	PROX1(35.2kb)<->HSKM-B(209.5kb)
528	chr4:82403568-82403713 (na)	146 bps	7	intergénica	PRKG2(58.3kb)<->RASGEF1B(163.5kb)
529	chr3:64214221-64214390 (na)	170 bps	12	intergénica	PRICKLE2(28.1kb)<->ADAMTS9(262.0kb)
530	chr12:80868263-80868448 (na)	186 bps	5	intergénica	PPFIA2(191.0kb)<->CCDC59(401.8kb)
531	chr4:23560109-23560271 (na)	163 bps	4	intergénica	PPARGC1A(59.3kb)<->DHX15(577.9kb)
532	chr4:23820887-23821088 (na)	202 bps	8	intergénica	PPARGC1A(320.1kb)<->DHX15(317.1kb)
533	chr1:38609245-38609584 (na)	340 bps	17	intergénica	POU3F1(324.2kb)<->RRAGC(468.0kb)
534	chr3:148514037-148514263 (na)	227 bps	8	intergénica	PLSCR5(707.3kb)<->ZIC4(72.3kb)
535	chr3:148373949-148374122 (na)	174 bps	7	intergénica	PLSCR5(567.3kb)<->ZIC4(212.4kb)
536	chr4:112393637-112393762 (na)	126 bps	5	intergénica	PITX2(611.1kb)<->C4orf32(892.2kb)

537	chr17:44856587-44856754 (na)	168 bps	8	intergénica	PHB(9.3kb)<->AK097622(33.5kb)
538	chr1:63936609-63936860 (na)	252 bps	16	intergénica	PGM1(38.1kb)<->ROR1(75.4kb)
539	chr12:40395312-40395445 (na)	134 bps	5	intergénica	PDZRN4(140.7kb)<->GLT8D3(366.5kb)
540	chr7:95136106-95136236 (na)	131 bps	4	intergénica	PDK4(72.2kb)<->DYNC1I1(103.6kb)
541	chr17:51274928-51275063 (na)	136 bps	6	intergénica	PCTP(65.2kb)<->ANKFN1(310.8kb)
542	chr13:67167019-67167171 (na)	153 bps	3	intergénica	PCDH9(464.6kb)<->BC042673(1166.2kb)
543	chr13:66735091-66735167 (na)	77 bps	3	intergénica	PCDH9(32.6kb)<->BC042673(1598.3kb)
544	chr13:66705715-66705867 (na)	153 bps	5	intergénica	PCDH9(3.3kb)<->BC042673(1627.6kb)
545	chr4:30921331-30921521 (na)	191 bps	3	intergénica	PCDH7(163.8kb)<->AK093205(2648.4kb)
546	chr4:31831924-31832031 (na)	108 bps	4	intergénica	PCDH7(1074.4kb)<->AK093205(1737.9kb)
547	chr13:58487567-58487673 (na)	107 bps	6	intergénica	PCDH17(1286.5kb)<->diap3(650.0kb)
548	chr9:127917528-127917685 (na)	158 bps	3	intergénica	PBX3(148.1kb)<->BC031239(154.5kb)
549	chr9:127917062-127917300 (na)	239 bps	5	intergénica	PBX3(147.6kb)<->BC031239(154.9kb)
550	chr20:22094635-22094697 (na)	63 bps	7	intergénica	PAX1(450.0kb)<->CR627206(108.3kb)
551	chr6:137938574-137938721 (na)	148 bps	3	intergénica	OLIG3(81.3kb)<->AK124173(247.8kb)
552	chr2:174914300-174914507 (na)	208 bps	6	intergénica	OLA1(92.7kb)<->CIR(6.6kb)
553	chr10:126132789-126132884 (na)	96 bps	7	intergénica	OAT(35.3kb)<->LHPP(7.5kb)
554	chr5:103023295-103023405 (na)	111 bps	10	intergénica	NUDT12(96.9kb)<->CR610784(1257.7kb)
555	chr6:58725538-58725752 (na)	215 bps	4	intergénica	NR_003660(329.9kb)<->KHDRBS2(3722.1kb)
556	chr18:37491210-37491427 (na)	218 bps	7	intergénica	NR_002838(136.7kb)<->PIK3C3(297.8kb)
557	chr5:106517820-106517954 (na)	135 bps	5	intergénica	NR_000039(2054.1kb)<->EFNA5(226.3kb)
558	chr1:11870013-11870236 (na)	224 bps	7	intergénica	NPPB(28.4kb)<->KIAA2013(32.5kb)
559	chr6:156299504-156299666 (na)	163 bps	7	intergénica	NOX3(480.8kb)<->ARID1B(841.1kb)
560	chr7:35980686-35980829 (na)	144 bps	5	intergénica	NM_001128060(2.0kb)<->BC043264(120.6kb)
561	chr17:5519814-5520014 (na)	201 bps	3	intergénica	NLRP1(91.3kb)<->BC043508(96.3kb)
562	chr5:172605265-172605410 (na)	146 bps	4	intergénica	NKX2-5(10.4kb)<->STC2(68.9kb)
563	chr9:14374251-14374401 (na)	151 bps	6	intergénica	NFIB(70.3kb)<->ZDHHC21(171.1kb)
564	chr8:24978534-24978740 (na)	207 bps	4	intergénica	NEFL(108.5kb)<->DOCK5(119.5kb)
565	chr6:41491934-41492086 (na)	153 bps	3	intergénica	NCR2(65.3kb)<->RP11-328M4.3-002(86.1kb)
566	chr4:164389760-164389930 (na)	171 bps	10	intergénica	NAF1(82.2kb)<->NPY1R(74.6kb)
567	chr16:47839916-47840054 (na)	139 bps	4	intergénica	N4BP1(638.3kb)<->CBLN1(30.1kb)
568	chr16:47613890-47613955 (na)	66 bps	4	intergénica	N4BP1(412.3kb)<->CBLN1(256.2kb)
569	chr2:2771408-2771544 (na)	137 bps	3	intergénica	MYT1L(457.4kb)<->AK095310(106.3kb)
570	chr8:17709659-17709779 (na)	121 bps	3	intergénica	MTUS1(7.0kb)<->FGL1(56.4kb)
571	chr7:49718554-49718609 (na)	56 bps	8	intergénica	MGC26484(781.0kb)<->VWC2(65.2kb)
572	chr3:160050396-160050434 (na)	39 bps	4	intergénica	MFSD1(20.2kb)<->IQCJ(219.4kb)
573	chr11:28581587-28581784 (na)	198 bps	15	intergénica	METT5D1(270.0kb)<->CR618717(1376.5kb)
574	chr9:36822188-36822328 (na)	141 bps	5	intergénica	MELKv3(154.5kb)<->PAX5(6.2kb)
575	chr15:92916016-92916037 (na)	22 bps	3	intergénica	MCTP2(92.7kb)<->BC040875(707.5kb)
576	chr15:92905624-92905726 (na)	103 bps	4	intergénica	MCTP2(82.4kb)<->BC040875(717.8kb)
577	chr15:93130175-93130261 (na)	87 bps	3	intergénica	MCTP2(306.9kb)<->BC040875(493.3kb)
578	chr6:100928977-100929153 (na)	177 bps	3	intergénica	MCHR2(380.1kb)<->SIM1(14.3kb)
579	chr6:100727339-100727565 (na)	227 bps	5	intergénica	MCHR2(178.5kb)<->SIM1(215.9kb)
580	chr5:163397405-163397546 (na)	142 bps	5	intergénica	MAT2B(518.5kb)<->BC011998(316.2kb)
581	chr17:58258715-58258951 (na)	237 bps	4	intergénica	MARCH10(19.3kb)<->TANC2(181.7kb)

582	chr6:91872064-91872126 (na)	63 bps	6	intergénica	MAP3K7(518.4kb)<->BC037927(523.4kb)
583	chr17:12200231-12200360 (na)	130 bps	9	intergénica	MAP2K4(212.5kb)<->AX747308(193.7kb)
584	chr4:141396230-141396344 (na)	115 bps	9	intergénica	MAML3(101.5kb)<->SCOC(1.5kb)
585	chr16:78479527-78479709 (na)	183 bps	5	intergénica	MAF(287.4kb)<->DYNLRB2(652.6kb)
586	chr2:44211214-44211382 (na)	169 bps	4	intergénica	LRPPRC(134.6kb)<->PPM1B(38.1kb)
587	chr8:106171583-106171773 (na)	191 bps	4	intergénica	LRP12(501.2kb)<->ZFPM2(228.5kb)
588	chr14:43494304-43494389 (na)	86 bps	5	intergénica	LRFN5(2050.8kb)<->FSCB(548.9kb)
589	chr2:147731463-147731658 (na)	196 bps	10	intergénica	LOC728773(667.3kb)<->ACVR2A(587.0kb)
590	chr2:147672678-147672774 (na)	97 bps	4	intergénica	LOC728773(608.6kb)<->ACVR2A(645.9kb)
591	chr2:148192260-148192320 (na)	61 bps	5	intergénica	LOC728773(1128.1kb)<->ACVR2A(126.3kb)
592	chr4:109673889-109673958 (na)	70 bps	4	intergénica	LOC641518(356.9kb)<->AK094992(4.8kb)
593	chr9:21595661-21595867 (na)	207 bps	6	intergénica	LOC554202(45.8kb)<->MTAP(196.8kb)
594	chr7:76934910-76935004 (na)	95 bps	3	intergénica	LOC54103(51.3kb)<->PTPN12(69.8kb)
595	chr12:130672666-130672900 (na)	235 bps	10	intergénica	LOC338797(254.6kb)<->SFRS8(88.7kb)
596	chr7:26663571-26663798 (na)	228 bps	3	intergénica	LOC285941(10.2kb)<->SKAP2(9.4kb)
597	chr4:181438914-181439123 (na)	210 bps	6	intergénica	LOC285501(2290.3kb)<->LINC00290(783.1kb)
598	chr4:180759289-180759381 (na)	93 bps	6	intergénica	LOC285501(1610.6kb)<->LINC00290(1462.9kb)
599	chr15:75803261-75803458 (na)	198 bps	4	intergénica	LINGO1(27.7kb)<->AK308609(190.2kb)
600	chr4:19178483-19178657 (na)	175 bps	4	intergénica	LCORL(1546.0kb)<->SLIT2(685.7kb)
601	chr18:28702553-28702764 (na)	212 bps	12	intergénica	KLHL14(95.6kb)<->C18orf34(68.6kb)
602	chr1:176322831-176322909 (na)	79 bps	3	intergénica	KIAA1928(49.1kb)<->AK124464(4.4kb)
603	chr7:26557646-26557731 (na)	86 bps	5	intergénica	KIAA0087(12.7kb)<->LOC285941(86.3kb)
604	chr4:55742630-55742854 (na)	225 bps	7	intergénica	KDR(56.1kb)<->SRD5A3(164.3kb)
605	chr2:156404305-156404478 (na)	174 bps	4	intergénica	KCNJ3(983.0kb)<->BC032407(180.8kb)
606	chr2:156367619-156367756 (na)	138 bps	3	intergénica	KCNJ3(946.4kb)<->BC032407(217.5kb)
607	chr17:66477350-66477397 (na)	48 bps	8	intergénica	KCNJ2(789.6kb)<->BC039327(128.1kb)
608	chr2:164130574-164130716 (na)	143 bps	7	intergénica	KCNH7(727.1kb)<->FIGN(41.6kb)
609	chr8:75414185-75414320 (na)	136 bps	7	intergénica	JPH1(18.1kb)<->GDAP1(10.9kb)
610	chr20:10941936-10942045 (na)	110 bps	7	intergénica	JAG1(339.2kb)<->LOC339593(253.3kb)
611	chr5:51342111-51342207 (na)	97 bps	3	intergénica	ISL1(615.8kb)<->PELO(777.3kb)
612	chr5:50853327-50853379 (na)	53 bps	4	intergénica	ISL1(127.0kb)<->PELO(1266.2kb)
613	chr15:87092564-87092668 (na)	105 bps	13	intergénica	ISG20(92.7kb)<->ACAN(55.0kb)
614	chr1:79044817-79044880 (na)	64 bps	3	intergénica	IFI44(142.5kb)<->ELTD1(83.2kb)
615	chr2:204895165-204895408 (na)	244 bps	16	intergénica	ICOS(360.6kb)<->PARD3B(223.4kb)
616	chr2:204748950-204749133 (na)	184 bps	10	intergénica	ICOS(214.4kb)<->PARD3B(369.6kb)
617	chr21:32413685-32413825 (na)	141 bps	11	intergénica	HUNK(115.4kb)<->C21orf45(148.6kb)
618	chr16:26134026-26134083 (na)	58 bps	7	intergénica	HS3ST4(77.5kb)<->C16orf82(851.4kb)
619	chr5:174020111-174020229 (na)	119 bps	4	intergénica	HMP19(551.3kb)<->MSX2(64.0kb)
620	chr12:64743845-64744075 (na)	231 bps	7	intergénica	HMGA2(97.5kb)<->C12orf31(59.0kb)
621	chr20:41833199-41833519 (na)	321 bps	12	intergénica	GTSFIL(44.1kb)<->TOX2(143.4kb)
622	chr6:104593274-104593422 (na)	149 bps	8	intergénica	GRIK2(1968.6kb)<->HACE1(689.2kb)
623	chrX:135347145-135347192 (na)	48 bps	6	intergénica	GPR112(20.4kb)<->BRS3(50.6kb)
624	chr16:57883862-57884029 (na)	168 bps	3	intergénica	GOT2(558.1kb)<->CDH8(2360.7kb)
625	chr16:57624052-57624106 (na)	55 bps	6	intergénica	GOT2(298.3kb)<->CDH8(2620.6kb)
626	chr16:59343923-59344111 (na)	189 bps	5	intergénica	GOT2(2018.2kb)<->CDH8(900.6kb)

627	chr6:122479002-122479091 (na)	90 bps	5	intergénica	GJA1(666.4kb)<->HSF2(283.4kb)
628	chr4:22568865-22569019 (na)	155 bps	6	intergénica	GBA3(138.6kb)<->CR607430(39.3kb)
629	chr18:73597016-73597135 (na)	120 bps	5	intergénica	GALR1(485.9kb)<->SALL3(1244.1kb)
630	chr18:73581913-73582107 (na)	195 bps	4	intergénica	GALR1(470.8kb)<->SALL3(1259.2kb)
631	chr17:14671737-14671855 (na)	119 bps	3	intergénica	FLJ45831(47.5kb)<->PMP22(402.0kb)
632	chr8:143259843-143259973 (na)	131 bps	10	intergénica	FLJ43860(673.3kb)<->TSNARE1(31.4kb)
633	chr1:19121432-19121547 (na)	116 bps	14	intergénica	FLJ00074(5.3kb)<->AX747516(149.6kb)
634	chr2:164307887-164308010 (na)	124 bps	3	intergénica	FIGN(7.1kb)<->GRB14(749.6kb)
635	chr5:171084581-171084719 (na)	139 bps	15	intergénica	FGF18(267.8kb)<->FBXW11(136.4kb)
636	chr14:52491169-52491278 (na)	110 bps	11	intergénica	FERMT2(3.7kb)<->DDHD1(91.2kb)
637	chr2:47990685-47990820 (na)	136 bps	6	intergénica	FBXO11(4.4kb)<->FOXN2(404.5kb)
638	chr6:99537500-99537623 (na)	124 bps	6	intergénica	FBXL4(34.9kb)<->C6orf168(289.9kb)
639	chr11:13800635-13800778 (na)	144 bps	3	intergénica	FAR1(90.2kb)<->SPON1(139.7kb)
640	chr1:175821303-175821360 (na)	58 bps	5	intergénica	FAM5B(303.1kb)<->SEC16B(342.8kb)
641	chr1:198474219-198474382 (na)	164 bps	9	intergénica	FAM58B(24.0kb)<->BC040731(103.9kb)
642	chr11:114504067-114504211 (na)	145 bps	5	intergénica	FAM55B(419.8kb)<->CADM1(41.0kb)
643	chr2:67973090-67973207 (na)	118 bps	4	intergénica	ETAA1(482.1kb)<->C1D(149.6kb)
644	chr14:76211334-76211536 (na)	203 bps	6	intergénica	ESRRB(174.4kb)<->VASH1(86.5kb)
645	chr1:223916570-223916753 (na)	184 bps	6	intergénica	ENAH(9.1kb)<->AK124056(38.2kb)
646	chr12:13378632-13378732 (na)	101 bps	3	intergénica	EMP1(117.7kb)<->C12orf36(36.6kb)
647	chr1:81428337-81428502 (na)	166 bps	10	intergénica	ELTD1(2183.3kb)<->KIAA0786(115.9kb)
648	chr14:33514683-33514818 (na)	136 bps	5	intergénica	EGLN3(24.6kb)<->C14orf147(457.1kb)
649	chr5:85505222-85505314 (na)	93 bps	4	intergénica	EDIL3(1788.9kb)<->NBPF22P(108.7kb)
650	chr19:11507914-11508005 (na)	92 bps	24	intergénica	ECSIT(7.0kb)<->CNN1(2.6kb)
651	chr3:57423485-57423594 (na)	110 bps	4	intergénica	Dnahc3(7.9kb)<->DNAH12L(35.2kb)
652	chr3:32613423-32613486 (na)	64 bps	5	intergénica	DYNC1L1(26.1kb)<->CNOT10(88.2kb)
653	chr9:101384892-101385173 (na)	282 bps	10	intergénica	DQ673922(207.6kb)<->AK057451(2.7kb)
654	chr4:15970184-15970349 (na)	166 bps	9	intergénica	DQ585121(130.8kb)<->LDB2(141.9kb)
655	chr14:35964316-35964517 (na)	202 bps	4	intergénica	DPPA3(53.0kb)<->SFTPH(47.7kb)
656	chr9:1733496-1733541 (na)	46 bps	12	intergénica	DMRT2(685.9kb)<->SMARCA2(271.8kb)
657	chr2:172919722-172919853 (na)	132 bps	11	intergénica	DLX2(244.0kb)<->ITGA6(80.5kb)
658	chr16:70812611-70812731 (na)	121 bps	5	intergénica	DKFZp434G131(48.8kb)<->CR597739(62.0kb)
659	chr13:59856219-59856324 (na)	106 bps	8	intergénica	DIAPH3(220.1kb)<->TDRD3(12.8kb)
660	chr13:59827856-59827915 (na)	60 bps	5	intergénica	DIAPH3(191.7kb)<->TDRD3(41.2kb)
661	chr12:16168990-16169166 (na)	177 bps	4	intergénica	DERA(87.4kb)<->MGST1(222.2kb)
662	chr6:50289071-50289179 (na)	109 bps	5	intergénica	DEFB112(164.7kb)<->CR592675(248.5kb)
663	chr13:71900137-71900260 (na)	124 bps	10	intergénica	DACH1(560.8kb)<->C13orf37(280.2kb)
664	chr13:71883555-71883728 (na)	174 bps	6	intergénica	DACH1(544.2kb)<->C13orf37(296.8kb)
665	chr13:48425695-48425990 (na)	296 bps	6	intergénica	CYSLTR2(244.2kb)<->FNDC3A(22.1kb)
666	chr8:66484509-66484670 (na)	162 bps	10	intergénica	CYP7B1(610.6kb)<->AK094960(117.1kb)
667	chr8:66313796-66313968 (na)	173 bps	3	intergénica	CYP7B1(439.9kb)<->AK094960(287.8kb)
668	chr16:49406498-49406666 (na)	169 bps	13	intergénica	CYLD(13.2kb)<->SALL1(320.7kb)
669	chr11:57379592-57379699 (na)	108 bps	3	intergénica	CTNND1(36.4kb)<->OR9Q1(168.2kb)
670	chr10:45698608-45698780 (na)	173 bps	3	intergénica	CTGLF1(29.3kb)<->PTPN20A(271.3kb)
671	chr10:126941046-126941183 (na)	138 bps	3	intergénica	CTBP2(101.4kb)<->NR_023362(311.7kb)

672	chr10:99811203-99811262 (na)	60 bps	4	intergénica	CRTAC1(30.6kb)<->C10orf28(73.1kb)
673	chr2:177328728-177328906 (na)	179 bps	4	intergénica	CR598849(99.8kb)<->HNRNPA3(456.8kb)
674	chr2:59992688-59992818 (na)	131 bps	6	intergénica	CR593447(848.3kb)<->BCL11A(539.0kb)
675	chr2:59949425-59949592 (na)	168 bps	3	intergénica	CR593447(805.0kb)<->BCL11A(582.2kb)
676	chr2:59174396-59174483 (na)	88 bps	5	intergénica	CR593447(30.0kb)<->BCL11A(1357.3kb)
677	chr13:39525185-39525329 (na)	145 bps	13	intergénica	COG6(261.4kb)<->fusion(293.9kb)
678	chr5:157722882-157723087 (na)	206 bps	13	intergénica	CLINT1(504.1kb)<->EBF1(332.4kb)
679	chr5:157496937-157497163 (na)	227 bps	8	intergénica	CLINT1(278.2kb)<->EBF1(558.3kb)
680	chr22:37130076-37130118 (na)	43 bps	3	intergénica	CKIe(5.3kb)<->KCNJ4(22.2kb)
681	chr16:62444045-62444239 (na)	195 bps	3	intergénica	CDH8(1816.5kb)<->CDH11(1093.9kb)
682	chr2:174339631-174339769 (na)	139 bps	8	intergénica	CDCA7(397.7kb)<->SP3(141.7kb)
683	chr1:192931001-192931116 (na)	116 bps	3	intergénica	CDC73(1443.3kb)<->SLICK(1530.4kb)
684	chr5:87158920-87158997 (na)	78 bps	4	intergénica	CCNH(414.3kb)<->TMEM161B(367.8kb)
685	chr5:86767610-86767747 (na)	138 bps	4	intergénica	CCNH(23.0kb)<->TMEM161B(759.0kb)
686	chr5:86945410-86945516 (na)	107 bps	5	intergénica	CCNH(200.8kb)<->TMEM161B(581.3kb)
687	chr2:56529512-56529676 (na)	165 bps	5	intergénica	CCDC85A(62.7kb)<->VRK2(1458.6kb)
688	chr1:10838963-10839117 (na)	155 bps	8	intergénica	CASZ1(59.7kb)<->C1orf127(90.0kb)
689	chr1:116170764-116170888 (na)	125 bps	10	intergénica	CASQ2(57.8kb)<->NHLH2(9.6kb)
690	chr11:115048736-115048854 (na)	119 bps	13	intergénica	CADM1(168.3kb)<->AX746529(81.3kb)
691	chr3:55444663-55444855 (na)	193 bps	8	intergénica	CACNA2D3(361.0kb)<->WNT5A(29.9kb)
692	chr9:16093742-16093953 (na)	212 bps	7	intergénica	C9orf93(131.8kb)<->BX648501(112.9kb)
693	chr9:27695366-27695493 (na)	128 bps	3	intergénica	C9orf72(131.5kb)<->CR613587(123.8kb)
694	chr7:41343245-41343469 (na)	225 bps	13	intergénica	C7orf10(476.4kb)<->INHBA(351.7kb)
695	chr3:170115324-170115562 (na)	239 bps	3	intergénica	C3orf50(84.3kb)<->MECOM(168.4kb)
696	chr2:76155843-76156075 (na)	233 bps	3	intergénica	C2orf3(364.0kb)<->LRRMT4(673.1kb)
697	chr10:16651349-16651599 (na)	251 bps	6	intergénica	C1QL3(47.3kb)<->RSU1(21.0kb)
698	chr19:35534867-35534970 (na)	104 bps	8	intergénica	C19orf2(336.4kb)<->ZNF536(20.2kb)
699	chr19:35502323-35502482 (na)	160 bps	5	intergénica	C19orf2(303.9kb)<->ZNF536(52.7kb)
700	chr14:28930505-28930604 (na)	100 bps	3	intergénica	C14orf23(598.4kb)<->PRKD1(184.8kb)
701	chr11:109376237-109376411 (na)	175 bps	11	intergénica	C11orf87(574.7kb)<->ZC3H12C(92.9kb)
702	chr11:37690563-37690602 (na)	40 bps	3	intergénica	C11orf74(1037.6kb)<->LRRC4C(2401.7kb)
703	chr11:122342015-122342208 (na)	194 bps	5	intergénica	C11orf63(6.4kb)<->BSX(11.4kb)
704	chr11:31881334-31881561 (na)	228 bps	11	intergénica	BX648962(16.2kb)<->RCN1(187.7kb)
705	chr9:16268559-16268689 (na)	131 bps	7	intergénica	BX648501(59.3kb)<-> >DKFZp686A01127(130.8kb)
706	chr9:16267565-16267713 (na)	149 bps	7	intergénica	BX648501(58.3kb)<-> >DKFZp686A01127(131.8kb)
707	chr14:36094537-36094599 (na)	63 bps	3	intergénica	BX161496(33.1kb)<->NKX2-8(24.4kb)
708	chr20:12234434-12234514 (na)	81 bps	5	intergénica	BTBD3(379.2kb)<->SPTLC3(703.1kb)
709	chr18:34436350-34436460 (na)	111 bps	3	intergénica	BRUNOL4(1036.4kb)<->BC035184(604.4kb)
710	chr16:48982353-48982554 (na)	202 bps	8	intergénica	BRD7(22.0kb)<->NKD1(157.2kb)
711	chr15:58077771-58077947 (na)	177 bps	10	intergénica	BNIP2(308.8kb)<->FOXB1(5.8kb)
712	chr7:34178047-34178268 (na)	222 bps	3	intergénica	BMPER(16.0kb)<->AY312368(178.3kb)
713	chr8:11467469-11467666 (na)	198 bps	7	intergénica	BLK(8.0kb)<->GATA4(104.2kb)
714	chr11:27739394-27739477 (na)	84 bps	15	intergénica	BDNF(39.5kb)<->KIF18A(259.3kb)
715	chr3:189164624-189164713 (na)	90 bps	6	intergénica	BCL6(218.5kb)<->CR625520(1.5kb)

716	chr1:154901496-154901626 (na)	131 bps	21	intergénica	BCAN(5.6kb)<->NES(3.6kb)
717	chr14:101070190-101070373 (na)	184 bps	5	intergénica	BC148240(459.5kb)<->AF469203(17.9kb)
718	chr18:69468735-69468904 (na)	170 bps	5	intergénica	BC071801(300.6kb)<->FBXO15(422.7kb)
719	chr3:105793543-105793651 (na)	109 bps	8	intergénica	BC070396(580.3kb)<->ALCAM(774.8kb)
720	chr1:95858514-95858757 (na)	244 bps	4	intergénica	BC067883(104.9kb)<->PTBLP(1101.2kb)
721	chr6:148120910-148121039 (na)	130 bps	4	intergénica	BC047626(27.7kb)<->SASH1(584.4kb)
722	chr18:37205819-37205919 (na)	101 bps	14	intergénica	BC045816(1272.6kb)<->NR_002838(108.3kb)
723	chr12:77333883-77333962 (na)	80 bps	4	intergénica	BC045810(56.2kb)<->BC047615(73.8kb)
724	chr1:219116714-219116868 (na)	155 bps	14	intergénica	BC045735(44.3kb)<->HLX(2.5kb)
725	chr1:219083725-219083962 (na)	238 bps	6	intergénica	BC045735(11.3kb)<->HLX(35.4kb)
726	chr14:98029816-98029874 (na)	59 bps	5	intergénica	BC043585(515.6kb)<->C14orf177(217.8kb)
727	chr1:88212570-88212731 (na)	162 bps	6	intergénica	BC043534(602.6kb)<->CR616551(564.6kb)
728	chr1:88700707-88700812 (na)	106 bps	3	intergénica	BC043534(1090.8kb)<->CR616551(76.5kb)
729	chr16:72845922-72846026 (na)	105 bps	3	intergénica	BC043527(39.0kb)<->PSMD7(42.2kb)
730	chr5:91307969-91308088 (na)	120 bps	4	intergénica	BC043415(555.7kb)<->AK056485(223.0kb)
731	chr5:91073644-91073795 (na)	152 bps	4	intergénica	BC043415(321.4kb)<->AK056485(457.3kb)
732	chr1:106542058-106542158 (na)	101 bps	5	intergénica	BC043293(579.0kb)<->PRMT6(858.8kb)
733	chr20:7337603-7337836 (na)	234 bps	5	intergénica	BC043288(40.5kb)<->HAO1(473.8kb)
734	chr14:56715622-56715737 (na)	116 bps	4	intergénica	BC041486(249.0kb)<->EXOC5(23.2kb)
735	chr2:146405867-146406219 (na)	353 bps	11	intergénica	BC040861(779.3kb)<->LOC728773(655.3kb)
736	chr2:146094368-146094524 (na)	157 bps	7	intergénica	BC040861(467.8kb)<->LOC728773(967.0kb)
737	chr2:146663731-146663814 (na)	84 bps	4	intergénica	BC040861(1037.2kb)<->LOC728773(397.7kb)
738	chr6:9534017-9534045 (na)	29 bps	3	intergénica	BC040612(876.5kb)<->MRDS1(279.6kb)
739	chr6:9065094-9065267 (na)	174 bps	12	intergénica	BC040612(407.6kb)<->MRDS1(748.4kb)
740	chr3:118784641-118784884 (na)	244 bps	8	intergénica	BC040587(650.9kb)<->IGSF11(1317.3kb)
741	chr3:119993296-119993441 (na)	146 bps	5	intergénica	BC040587(1859.5kb)<->IGSF11(108.7kb)
742	chr5:61565142-61565270 (na)	129 bps	8	intergénica	BC039381(497.9kb)<->KIF2A(72.5kb)
743	chr17:67234140-67234167 (na)	28 bps	4	intergénica	BC039327(524.2kb)<->D43770(304.4kb)
744	chr17:66884292-66884343 (na)	52 bps	4	intergénica	BC039327(174.4kb)<->D43770(654.2kb)
745	chr3:139122116-139122290 (na)	175 bps	3	intergénica	BC038725(139.7kb)<->CLDN18(78.1kb)
746	chr13:90281164-90281233 (na)	70 bps	6	intergénica	BC038529(295.6kb)<->v_1(516.8kb)
747	chr13:90249149-90249274 (na)	126 bps	4	intergénica	BC038529(263.6kb)<->v_1(548.8kb)
748	chr14:97109437-97109562 (na)	126 bps	10	intergénica	BC038465(109.2kb)<->BX161483(59.2kb)
749	chr6:140999747-140999841 (na)	95 bps	18	intergénica	BC038188(543.2kb)<->AK097143(944.7kb)
750	chr18:72075265-72075376 (na)	112 bps	3	intergénica	BC037384(521.9kb)<->ZNF516(125.2kb)
751	chr16:72348272-72348362 (na)	91 bps	11	intergénica	BC036646(335.5kb)<->BC043527(435.4kb)
752	chr4:58489089-58489275 (na)	187 bps	6	intergénica	BC034799(462.2kb)<->LEC3(3260.3kb)
753	chr4:61040109-61040287 (na)	179 bps	3	intergénica	BC034799(3013.2kb)<->LEC3(709.3kb)
754	chr16:51521220-51521318 (na)	99 bps	4	intergénica	BC034767(322.9kb)<->CHD9(125.1kb)
755	chr15:59714195-59714394 (na)	200 bps	6	intergénica	BC033962(29.5kb)<->VPS13C(217.5kb)
756	chr10:10790940-10791112 (na)	173 bps	6	intergénica	BC032914(645.5kb)<->AY102069(75.3kb)
757	chr10:10673974-10674060 (na)	87 bps	3	intergénica	BC032914(528.5kb)<->AY102069(192.3kb)
758	chr3:82915031-82915225 (na)	195 bps	8	intergénica	BC031255(319.5kb)<->LOC440970(1855.0kb)
759	chr5:87991716-87991780 (na)	65 bps	3	intergénica	BC030122(223.5kb)<->BC036480(4.2kb)
760	chr10:77153599-77153689 (na)	91 bps	5	intergénica	BC029963(315.5kb)<->C10orf11(58.8kb)

761	chr10:76972940-76973123 (na)	184 bps	4	intergénica	BC029963(134.9kb)<->C10orf11(239.4kb)
762	chr15:34449431-34449567 (na)	137 bps	3	intergénica	BC025664(510.9kb)<->C15orf41(209.6kb)
763	chr2:227231693-227231866 (na)	174 bps	5	intergénica	BC017935(478.7kb)<->IRS1(72.4kb)
764	chr3:70954750-70954936 (na)	187 bps	4	intergénica	BC015590(807.6kb)<->FOXP1(132.5kb)
765	chr3:70207748-70208049 (na)	302 bps	12	intergénica	BC015590(60.6kb)<->FOXP1(879.4kb)
766	chr3:70197962-70198100 (na)	139 bps	7	intergénica	BC015590(50.8kb)<->FOXP1(889.3kb)
767	chr3:70555346-70555544 (na)	199 bps	8	intergénica	BC015590(408.2kb)<->FOXP1(531.9kb)
768	chr3:70328234-70328320 (na)	87 bps	4	intergénica	BC015590(181.1kb)<->FOXP1(759.1kb)
769	chr3:70321768-70321904 (na)	137 bps	8	intergénica	BC015590(174.6kb)<->FOXP1(765.5kb)
770	chr22:26026560-26026682 (na)	123 bps	4	intergénica	BC015159(73.8kb)<->CR936633(9.9kb)
771	chr8:129553378-129553487 (na)	110 bps	6	intergénica	BC009730(44.0kb)<->BC014119(87.1kb)
772	chr10:81997194-81997425 (na)	232 bps	4	intergénica	BC009626(27.8kb)<->MAT1A(24.1kb)
773	chr1:91052656-91052774 (na)	119 bps	7	intergénica	BARHL2(97.3kb)<->BC036441(14.9kb)
774	chr8:143628446-143628591 (na)	146 bps	14	intergénica	BAIL(5.1kb)<->ARC(60.8kb)
775	chr4:1565161-1565327 (na)	167 bps	11	intergénica	AX748388(17.1kb)<->FAM53A(46.3kb)
776	chr11:128065185-128065244 (na)	60 bps	7	intergénica	AX747861(3.2kb)<->BC039676(1.5kb)
777	chr12:109289434-109289544 (na)	111 bps	6	intergénica	ATP2A2(16.2kb)<->ANAPC7(6.8kb)
778	chr1:63167265-63167421 (na)	157 bps	6	intergénica	ATG4C(64.6kb)<->BC040309(229.9kb)
779	chr1:63237532-63237696 (na)	165 bps	3	intergénica	ATG4C(134.9kb)<->BC040309(159.6kb)
780	chr6:130281004-130281221 (na)	218 bps	3	intergénica	ARHGAP18(56.6kb)<->L3MBTL3(100.2kb)
781	chr2:144316187-144316306 (na)	120 bps	5	intergénica	ARHGAP15(73.8kb)<->GTDC1(103.7kb)
782	chr4:80526022-80526240 (na)	219 bps	11	intergénica	ARD1B(59.8kb)<->GK2(20.3kb)
783	chr21:26529372-26529498 (na)	127 bps	4	intergénica	APP(64.4kb)<->CYR1(230.9kb)
784	chr3:106783698-106783813 (na)	116 bps	4	intergénica	ALCAM(5.3kb)<->Nbla00127(76.0kb)
785	chr5:88913867-88913977 (na)	111 bps	6	intergénica	AL050132(615.0kb)<->CETN3(811.3kb)
786	chr17:52565634-52565777 (na)	144 bps	4	intergénica	AKAP1(11.9kb)<->MSI2(123.2kb)
787	chr18:51667983-51668171 (na)	189 bps	5	intergénica	AK127787(68.0kb)<->AK057336(233.4kb)
788	chr5:126557015-126557106 (na)	92 bps	4	intergénica	AK126569(119.9kb)<->MEGF10(97.2kb)
789	chr7:130554996-130555132 (na)	137 bps	7	intergénica	AK125651(109.8kb)<->AK054623(89.9kb)
790	chr9:14052246-14052282 (na)	37 bps	6	intergénica	AK123194(630.9kb)<->NFIB(19.6kb)
791	chr9:13831840-13832012 (na)	173 bps	8	intergénica	AK123194(410.5kb)<->NFIB(239.8kb)
792	chr5:30667432-30667603 (na)	172 bps	3	intergénica	AK098570(1459.2kb)<->CDH6(561.9kb)
793	chr10:87164841-87164916 (na)	76 bps	14	intergénica	AK097624(216.2kb)<->AK097655(162.6kb)
794	chr6:19774205-19774344 (na)	140 bps	3	intergénica	AK097585(485.5kb)<->AK092541(136.0kb)
795	chr19:37253335-37253486 (na)	152 bps	9	intergénica	AK097493(30.2kb)<->ZNF507(274.9kb)
796	chr19:37424734-37425067 (na)	334 bps	4	intergénica	AK097493(201.6kb)<->ZNF507(103.3kb)
797	chr2:199059290-199059428 (na)	139 bps	3	intergénica	AK096499(111.8kb)<->SATB2(783.0kb)
798	chr2:202706851-202707004 (na)	154 bps	6	intergénica	AK096380(24.2kb)<->KIAA2012(1.7kb)
799	chr4:85574787-85574958 (na)	172 bps	5	intergénica	AK095285(135.4kb)<->NKX6-1(58.5kb)
800	chr18:47913670-47913835 (na)	166 bps	4	intergénica	AK094936(664.9kb)<->DCC(206.7kb)
801	chr12:23532981-23533094 (na)	114 bps	3	intergénica	AK094733(314.7kb)<->SOX5(43.4kb)
802	chr12:23497549-23497831 (na)	283 bps	8	intergénica	AK094733(279.2kb)<->SOX5(78.7kb)
803	chrX:39592276-39592533 (na)	258 bps	4	intergénica	AK093678(520.7kb)<->AK123758(160.9kb)
804	chr9:108531259-108531381 (na)	123 bps	5	intergénica	AK093363(49.4kb)<->ZNF462(133.8kb)
805	chr9:108510767-108510862 (na)	96 bps	8	intergénica	AK093363(28.9kb)<->ZNF462(154.3kb)

806	chr6:98850813-98850993 (na)	181 bps	6	intergénica	AK091365(587.4kb)<->POU3F2(538.3kb)
807	chr6:98490089-98490169 (na)	81 bps	8	intergénica	AK091365(226.6kb)<->POU3F2(899.1kb)
808	chr15:94057187-94057264 (na)	78 bps	4	intergénica	LOC145820(205.1kb)<->LOC644192(555.7kb)
809	chr5:91830067-91830259 (na)	193 bps	6	intergénica	AK056485(62.0kb)<->FLJ42709(940.6kb)
810	chr14:48908123-48908282 (na)	160 bps	5	intergénica	AK056212(1574.2kb)<->SDCCAG1(194.5kb)
811	chr15:87757340-87757441 (na)	102 bps	5	intergénica	AK054931(14.6kb)<->RHCG(58.2kb)
812	chr6:72262771-72262866 (na)	96 bps	12	intergénica	AK023251(75.6kb)<->RIMS1(390.5kb)
813	chr5:157131408-157131545 (na)	138 bps	7	intergénica	AK023159(11.1kb)<->CLINT1(14.3kb)
814	chr2:12760264-12760364 (na)	101 bps	6	intergénica	AK001558(124.3kb)<->TRIB2(14.1kb)
815	chrX:148343500-148343641 (na)	142 bps	6	intergénica	AFF2(453.6kb)<->IDS(24.6kb)
816	chr3:23136583-23136758 (na)	176 bps	6	intergénica	AF401215(737.2kb)<->UBE2E2(82.9kb)
817	chr4:182707995-182708135 (na)	141 bps	4	intergénica	LINC00290(390.7kb)<->AK056196(425.2kb)
818	chr1:61876596-61876711 (na)	116 bps	5	intergénica	AF086381(177.0kb)<->TM2D1(42.6kb)
819	chr12:19928417-19928625 (na)	209 bps	19	intergénica	AEBP2(362.0kb)<->PDE3A(484.8kb)
820	chr10:76184309-76184364 (na)	56 bps	6	intergénica	ADK(45.2kb)<->MYST4(72.0kb)
821	chr11:130080620-130080687 (na)	68 bps	10	intergénica	ADAMTS15(231.7kb)<->BC031979(138.6kb)
822	chr1:178784622-178784740 (na)	119 bps	9	intergénica	ACBD6(46.5kb)<->LOC148756(10.0kb)
823	chr5:58233809-58233949 (na)	141 bps	6	intergénica	AB074188(42.8kb)<->PDE4D(66.7kb)
824	chr2:173831688-173831900 (na)	213 bps	4	cds	ZAK
825	chr2:63974063-63974133 (na)	71 bps	7	cds	VPS54
826	chr2:230376536-230376664 (na)	129 bps	5	cds	TRIP12
827	chr2:97842281-97842316 (na)	36 bps	3	cds	TMEM131
828	chr17:59591875-59591957 (na)	83 bps	4	cds	TEX2
829	chr7:139303942-139304090 (na)	149 bps	3	cds	TBXAS1
830	chr14:52305293-52305388 (na)	96 bps	11	cds	STYX
831	chr5:121826991-121827099 (na)	109 bps	4	cds	SNCAIP
832	chr16:18770926-18771052 (na)	127 bps	3	cds	SMG1
833	chr10:105748874-105749026 (na)	153 bps	4	cds	SLK
834	chr15:75259552-75259800 (na)	249 bps	11	cds	PEAK1
835	chr15:70219182-70219394 (na)	213 bps	11	cds	SENP8
836	chr5:158521035-158521186 (na)	152 bps	11	cds	RNF145
837	chr3:50129648-50129822 (na)	175 bps	8	cds	RBM5
838	chr2:108746517-108746667 (na)	151 bps	6	cds	RANBP2
839	chr12:55990320-55990476 (na)	157 bps	10	cds	R3HDM2
840	chr3:112335635-112335775 (na)	141 bps	4	cds	PVRL3
841	chr1:168899987-168900138 (na)	152 bps	4	cds	PRRX1
842	chr10:95881906-95882117 (na)	212 bps	8	cds	PLCE1
843	chr13:66699461-66699670 (na)	210 bps	13	cds	PCDH9
844	chr4:30334739-30334958 (na)	220 bps	12	cds	PCDH7
845	chrX:110274647-110274776 (na)	130 bps	5	cds	PAK3
846	chr3:194815300-194815417 (na)	118 bps	7	cds	OPA1
847	chr7:44653678-44653864 (na)	187 bps	7	cds	OGDH
848	chr17:23473735-23473876 (na)	142 bps	3	cds	NLK
849	chr13:31999466-31999577 (na)	112 bps	4	cds	N4BP2L2
850	chr20:33028960-33029113 (na)	154 bps	6	cds	MYH7B

851	chr8:89122888-89123093 (na)	206 bps	5	cds	MMP16
852	chr18:17633845-17633956 (na)	112 bps	8	cds	MIB1
853	chr1:11975251-11975332 (na)	82 bps	7	cds	MFN2
854	chr7:116197063-116197161 (na)	99 bps	10	cds	MET
855	chr6:84020115-84020287 (na)	173 bps	8	cds	ME1
856	chr14:103001680-103001874 (na)	195 bps	4	cds	MARK3
857	chr1:25970791-25970836 (na)	46 bps	4	cds	MAN1C1
858	chr7:78094457-78094561 (na)	105 bps	10	cds	MAGI2
859	chr1:114082764-114082916 (na)	153 bps	5	cds	PHTF1
860	chr14:41430163-41430304 (na)	142 bps	11	cds	LRFN5
861	chr15:61220537-61220635 (na)	99 bps	3	cds	LACTB
862	chr20:16440070-16440187 (na)	118 bps	6	cds	KIF16B
863	chr6:71302722-71302761 (na)	40 bps	3	cds	FAM135A
864	chr7:86359108-86359203 (na)	96 bps	4	cds	KIAA1324L
865	chr5:93833174-93833406 (na)	233 bps	6	cds	KIAA0825
866	chr2:170082931-170083121 (na)	191 bps	8	cds	KBTBD10
867	chr7:27153794-27153890 (na)	97 bps	3	cds	HOXA6
868	chr7:139063117-139063301 (na)	185 bps	4	cds	HIPK2
869	chr16:11884365-11884417 (na)	53 bps	7	cds	GSPT1
870	chr18:31543581-31543828 (na)	248 bps	12	cds	GALNT1
871	chr8:28440694-28440883 (na)	190 bps	10	cds	FZD3
872	chr15:31234226-31234315 (na)	90 bps	5	cds	FMN1
873	chr14:38938460-38938675 (na)	216 bps	5	cds	FBXO33
874	chr15:74374861-74375070 (na)	210 bps	3	cds	ETF1A
875	chr10:80942406-80942530 (na)	125 bps	3	cds	EIF5AL1
876	chr17:37099564-37099700 (na)	137 bps	10	cds	EIF1
877	chr3:123045975-123046087 (na)	113 bps	7	cds	EAF2
878	chr12:49305915-49306035 (na)	121 bps	3	cds	DIP2B
879	chr15:63744553-63744787 (na)	235 bps	8	cds	DENND4A
880	chr4:169577024-169577077 (na)	54 bps	5	cds	DDX60L
881	chr12:67938168-67938321 (na)	154 bps	9	cds	CPSF6
882	chrX:21489481-21489676 (na)	196 bps	4	cds	CNKSR2
883	chrX:85097837-85098003 (na)	167 bps	12	cds	CHM
884	chr3:15244203-15244351 (na)	149 bps	4	cds	CAPN7
885	chr17:39628689-39628937 (na)	249 bps	6	cds	ATXN7L3
886	chr4:47222316-47222401 (na)	86 bps	9	cds	ATP10D
887	chr5:64783187-64783300 (na)	114 bps	8	cds	ADAMTS6

Tabla suplementaria 1. Lista de genes con regiones SARE conservados en humanos y ratones. Lista de genes SARE obtenida por SynoR clasificada en función de la posición de la región SARE dentro del gen (utr, promotor, intrón, intergénica, cds). Se muestra la localización de la región, así como la longitud, el número de sitios de unión de FT (# SUFT) y el gen al que pertenece (por proximidad en caso de ser intergénica).

Procesos Biológicos OG

	ID	Nombre	p-valor
1	OG:0048468	cell development	9,09E-15
2	OG:0030182	neuron differentiation	1,76E-11
3	OG:0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3,00E-11
4	OG:0048699	generation of neurons	1,52E-10
5	OG:0022008	neurogenesis	2,28E-10
6	OG:0048858	cell projection morphogenesis	7,17E-10
7	OG:0006366	transcription from RNA polymerase II promoter	7,31E-10
8	OG:0032990	cell part morphogenesis	1,16E-09
9	OG:0048812	neuron projection morphogenesis	2,87E-09
10	OG:0007409	axonogenesis	3,40E-09
11	OG:0032989	cellular component morphogenesis	3,93E-09
12	OG:0000902	cell morphogenesis	5,85E-09
13	OG:0048666	neuron development	6,43E-09
14	OG:0010629	negative regulation of gene expression	9,71E-09
15	OG:0016481	negative regulation of transcription	1,58E-08
16	OG:0031175	neuron projection development	2,28E-08
17	OG:0045934	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	2,53E-08
18	OG:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	4,74E-08
19	OG:0050793	regulation of developmental process	5,46E-08
20	OG:2000026	regulation of multicellular organismal development	6,50E-08
21	OG:0009888	tissue development	7,57E-08
22	OG:0045941	positive regulation of transcription	9,35E-08
23	OG:0048667	cell morphogenesis involved in neuron differentiation	1,06E-07
24	OG:0051239	regulation of multicellular organismal process	1,08E-07
25	OG:0010557	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	1,48E-07
26	OG:0045935	positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	2,27E-07
27	OG:0010628	positive regulation of gene expression	2,54E-07
28	OG:0007411	axon guidance	2,75E-07
29	OG:0030030	cell projection organization	2,88E-07
30	OG:0045595	regulation of cell differentiation	3,31E-07
31	OG:0007417	central nervous system development	3,49E-07
32	OG:0031327	negative regulation of cellular biosynthetic process	3,53E-07
33	OG:0051173	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	3,92E-07
34	OG:0010558	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	6,25E-07
35	OG:0009890	negative regulation of biosynthetic process	7,75E-07
36	OG:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	1,09E-06
37	OG:0009887	organ morphogenesis	1,16E-06
38	OG:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	1,19E-06
39	OG:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	2,12E-06
40	OG:0045892	negative regulation of transcription, DNA-dependent	2,39E-06
41	OG:0010605	negative regulation of macromolecule metabolic process	3,35E-06
42	OG:0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process	3,44E-06
43	OG:0051253	negative regulation of RNA metabolic process	3,85E-06

44	OG:0009891	positive regulation of biosynthetic process	3,97E-06
45	OG:0035295	tube development	9,04E-06
46	OG:0009892	negative regulation of metabolic process	1,30E-05
47	OG:0031324	negative regulation of cellular metabolic process	1,35E-05
48	OG:0060284	regulation of cell development	1,64E-05
49	OG:0043009	chordate embryonic development	2,20E-05
50	OG:0009792	embryo development ending in birth or egg hatching	3,72E-05
51	OG:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4,31E-05
52	OG:0009893	positive regulation of metabolic process	4,93E-05
53	OG:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	5,34E-05
54	OG:0045893	positive regulation of transcription, DNA-dependent	5,81E-05
55	OG:0050767	regulation of neurogenesis	8,08E-05
56	OG:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	8,44E-05
57	OG:0007507	heart development	9,75E-05
58	OG:0045664	regulation of neuron differentiation	1,27E-04
59	OG:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2,48E-04
60	OG:0060537	muscle tissue development	2,93E-04
61	OG:0001501	skeletal system development	3,59E-04
62	OG:0014706	striated muscle tissue development	3,72E-04
63	OG:0007517	muscle organ development	4,27E-04
64	OG:0051960	regulation of nervous system development	4,84E-04
65	OG:0006935	chemotaxis	5,21E-04
66	OG:0042330	taxis	5,21E-04
67	OG:0008283	cell proliferation	7,79E-04
68	OG:0009790	embryo development	8,31E-04
69	OG:0010646	regulation of cell communication	8,73E-04
70	OG:0040011	locomotion	9,19E-04
71	OG:0060429	epithelium development	1,00E-03
72	OG:0042127	regulation of cell proliferation	1,21E-03
73	OG:0030900	forebrain development	1,74E-03
74	OG:0007420	brain development	1,75E-03
75	OG:0045137	development of primary sexual characteristics	1,85E-03
76	OG:0048608	reproductive structure development	2,44E-03
77	OG:0008406	gonad development	2,54E-03
78	OG:0072359	circulatory system development	2,68E-03
79	OG:0072358	cardiovascular system development	2,68E-03
80	OG:0061061	muscle structure development	3,63E-03
81	OG:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	4,78E-03
82	OG:0048598	embryonic morphogenesis	4,86E-03
83	OG:0021772	olfactory bulb development	5,05E-03
84	OG:0031290	retinal ganglion cell axon guidance	5,46E-03
85	OG:0048732	gland development	5,49E-03
86	OG:0010551	regulation of gene-specific transcription from RNA polymerase II promoter	6,08E-03
87	OG:0021889	olfactory bulb interneuron differentiation	6,39E-03
88	OG:0032569	gene-specific transcription from RNA polymerase II promoter	6,49E-03
89	OG:0044057	regulation of system process	6,98E-03
90	OG:0051094	positive regulation of developmental process	7,02E-03

91	OG:0021988	olfactory lobe development	7,48E-03
92	OG:0010648	negative regulation of cell communication	8,28E-03
93	OG:0007389	pattern specification process	8,51E-03
94	OG:0045597	positive regulation of cell differentiation	9,08E-03
95	OG:0002009	morphogenesis of an epithelium	1,07E-02
96	OG:0007423	sensory organ development	1,29E-02
97	OG:0021537	telencephalon development	1,30E-02
98	OG:0007548	sex differentiation	1,36E-02
99	OG:0048729	tissue morphogenesis	1,46E-02
100	OG:0008584	male gonad development	1,51E-02
101	OG:0009968	negative regulation of signal transduction	1,64E-02
102	OG:0023057	negative regulation of signaling	1,83E-02
103	OG:0051093	negative regulation of developmental process	2,09E-02
104	OG:0045778	positive regulation of ossification	2,20E-02
105	OG:0009966	regulation of signal transduction	2,21E-02
106	OG:0023051	regulation of signaling	2,84E-02
107	OG:0010594	regulation of endothelial cell migration	2,95E-02
108	OG:0032583	regulation of gene-specific transcription	3,21E-02
109	OG:0042692	muscle cell differentiation	3,68E-02
110	OG:0046546	development of primary male sexual characteristics	3,70E-02
111	OG:0001654	eye development	4,50E-02
112	OG:0021891	olfactory bulb interneuron development	4,54E-02

Tabla suplementaria 2. Análisis de ontología genética de la lista de genes con secuencias SARE. Análisis de las categorías GO enriquecidas en nuestra lista genética realizado con la aplicación Topppfun. Se muestran las categorías enriquecidas ordenadas por orden de su valor de significancia (de mayor a menor). Las categorías de fondo amarillo son aquellas que corresponden con funciones directamente relacionadas con procesos neuronales.

Enriquecimiento de los procesos biológicos neuronales OG en los subgrupos de genes que contienen regiones SARE clasificados de acuerdo con la posición del SARE

Todos los grupos SARE			
orden	ID	nombre	valor-p
2	OG:0030182	Diferenciación neuronal	1,76E-11
4	OG:0048699	Generación de neuronas	1,52E-10
5	OG:0022008	Neurogénesis	2,28E-10
9	OG:0048812	Morfogénesis de proyecciones neuronales	2,87E-09
10	OG:0007409	Axonogénesis	3,40E-09
13	OG:0048666	Desarrollo neuronal	6,43E-09
16	OG:0031175	Desarrollo proyecciones neuronales	2,28E-11
28	OG:0007411	Guía axonal	2,75E-07
31	OG:0007417	Desarrollo del sistema nervioso central	3,49E-07
45	OG:0035295	Desarrollo del tubo neuronal	9,04E-06
58	OG:0045664	Regulación de la diferenciación neuronal	1,27E-04
73	OG:0030900	Desarrollo del lóbulo frontal	1,74E-03
74	OG:0007420	Desarrollo cerebral	1,75E-03
83	OG:0021772	Desarrollo del bulbo olfatorio	5,05E-03
84	OG:0031290	Guía axonal de RGCs	5,46E-03
87	OG:0021889	Diferenciación de interneuronas del bulbo olfatorio	6,39E-03
91	OG:0021988	Desarrollo del lóbulo olfatorio	7,48E-03
96	OG:0007423	Desarrollo de órganos sensoriales	1,29E-02
97	OG:0021537	Desarrollo del telencéfalo	1,30E-02
111	OG:0001654	Desarrollo del ojo	4,50E-02
112	OG:0021891	Desarrollo de interneuronas del bulbo olfatorio	4,54E-02
Intergénicas			
orden	ID	nombre	valor-p
1	OG:0035295	Desarrollo tubo neural	3,27E-05
12	OG:0030182	Diferenciación neuronal	7,95E-04
14	OG:0048699	Generación de neuronas	8,44E-04
16	OG:0007417	Desarrollo del sistema nervioso central	1,22E-03
20	OG:0022008	Neurogénesis	1,64E-03
21	OG:0048812	Morfogénesis de las proyecciones neuronales	1,69E-03
25	OG:0050767	Regulación de la neurogénesis	2,66E-03
32	OG:0007409	Axonogénesis	3,19E-03
35	OG:0051960	Regulación del desarrollo del sistema nervioso	4,89E-03
36	OG:0021889	Diferenciación de interneuronas del sistema nervioso	4,92E-03
42	OG:0045664	Regulación de la diferenciación neuronal	9,83E-03
45	OG:0021772	Desarrollo del bulbo olfatorio	1,36E-02

46	OG:0048667	Morfogénesis celular involucrada en diferenciación neuronal	1,65E-02
49	OG:0021988	Desarrollo del lóbulo olfatorio	1,81E-02
50	OG:0048666	Desarrollo neuronal	1,98E-02
51	OG:0031175	Desarrollo de las proyecciones neuronales	2,24E-02
58	OG:0030900	Desarrollo del lóbulo frontal	3,62E-02

Intrónicas+promotores+utr+cds			
orden	ID	nombre	valor-p
2	OG:0030182	Diferenciación neuronal	6,33E-08
3	OG:0007411	Guía axonal	4,11E-07
5	OG:0022008	Neurogénesis	7,89E-07
6	OG:0048699	Generación de neuronas	8,60E-07
7	OG:0048666	Desarrollo neuronal	1,17E-06
10	OG:0007409	Axonogénesis	4,24E-06
12	OG:0031175	Desarrollo de proyecciones neuronales	8,40E-06
13	OG:0048812	Morfogénesis de proyecciones neuronales	9,56E-06
18	OG:0048667	morfogénesis celular involucrada en diferenciación neuronal	3,68E-05
32	OG:0007417	Desarrollo del sistema nervioso central	9,05E-04
54	OG:0021602	Morfogénesis del nervio craneal	1,46E-02
56	OG:0007423	Desarrollo de órganos sensoriales	1,61E-02
62	OG:0001654	Desarrollo del ojo	3,49E-02

Tabla suplementaria 3. Análisis de las categorías GO neuronales enriquecidas en las listas de genes con regiones SARE proximales y distales. Procesos biológicos neuronales que se encuentran enriquecidos en la lista de genes SARE (todos los grupos SARE) en la de genes con SARE proximal (intrónicas, promotoras, utr y cds) y en la de genes con SARE distal (intergénicas). Las categorías subrayadas en azul son aquellas que no aparecen en la lista total de genes con secuencias SARE. Los genes con potencial regulación distal muestran un enriquecimiento en categorías neuronales muy similar a aquellos con regulación proximal, descartando que un tipo de regulación sea predominante para la regulación transcripcional por la región SARE.

Dianas de FMRP que contienen secuencia SARE

Símbolo génico	Símbolo mm9	ID génico	ID RefSeq	Descripción
ANK3	<i>Ank3</i>	11735	NM_146005.3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
APP	<i>App</i>	11820	NM_007471.2	amyloid beta (A4) precursor protein
ARID1B	<i>Arid1b</i>	239985	NM_001085355.1	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)
ATN1	<i>Atn1</i>	13498	NM_007881.4	atrophin 1
ATP2A2	<i>Atp2a2</i>	11938	NM_001110140.2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
ATXN1	<i>Atxn1</i>	20238	NM_009124.5	ataxin 1
BAI1	<i>Bai1</i>	107831	NM_174991.3	brain-specific angiogenesis inhibitor 1
BCAN	<i>Bcan</i>	12032	NM_007529.2	brevican
BIRC6	<i>Birc6</i>	12211	NM_007566.2	baculoviral IAP repeat-containing 6
CADPS	<i>Cadps</i>	27062	NM_012061.3	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator
CTNND2	<i>Ctnnd2</i>	18163	NM_008729.2	catenin (cadherin-associated protein), delta 2
CUX1	<i>Cux1</i>	13047	NM_009986.3	cut-like homeobox 1
CUX2	<i>Cux2</i>	13048	NM_007804.2	cut-like homeobox 2
DIP2B	<i>Dip2b</i>	239667	NM_172819.2	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila)
EPB41L1	<i>Epb4.1l1</i>	13821	NM_001003815.2	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1
FAM5B	6430517E21Rik	240843	NM_207583.1	family with sequence similarity 5, member B
FO XK2	<i>Foxk2</i>	68837	NM_001080932.1	forkhead box K2
GABBR1	<i>Gabbr1</i>	54393	NM_019439.3	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
GNB1	<i>Gnb1</i>	14688	NM_008142.3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
GRIK3	<i>Grik3</i>	14807	NM_001081097.2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3
HDAC5	<i>Hdac5</i>	15184	NM_001077696.1	histone deacetylase 5
HIPK2	<i>Hipk2</i>	15258	NM_001136065.1	homeodomain interacting protein kinase 2
HIPK3	<i>Hipk3</i>	15259	NM_010434.1	homeodomain interacting protein kinase 3
IDS	<i>Ids</i>	15931	NM_010498.2	iduronate 2-sulfatase
KALRN	<i>Kalrn</i>	545156	NM_001164268.1	kalirin, RhoGEF kinase
KCND2	<i>Kcnd2</i>	16508	NM_019697.3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2
KCNH7	<i>Kcnh7</i>	170738	NM_133207.2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 7
KCNMA1	<i>Kcnma1</i>	16531	NM_010610.2	potassium large conductance calcium-activated channel
LINGO1	<i>Lingo1</i>	235402	NM_181074.4	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
LRRC7	<i>Lrrc7</i>	242274	NM_001081358.1	leucine rich repeat containing 7
MAGI2	<i>Magi2</i>	50791	NM_015823.2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2
MFHAS1	<i>Mfhas1</i>	52065	NM_001081279.1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
MIB1	<i>Mib1</i>	225164	NM_144860.2	mindbomb homolog 1 (Drosophila)
MYT1L	<i>Myt1l</i>	17933	NM_001093775.1	myelin transcription factor 1-like
NCAM1	<i>Ncam1</i>	17967	NM_001081445.1	neural cell adhesion molecule 1
NFIX	<i>Nfix</i>	18032	NM_001081981.1	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)
NPAS2	<i>Npas2</i>	18143	NM_008719.2	neuronal PAS domain protein 2
NRXN1	<i>Nrxn1</i>	18189	NM_020252.2	neurexin 1
NRXN2	<i>Nrxn2</i>	18190	NM_020253.2	neurexin 2
NRXN3	<i>Nrxn3</i>	18191	NM_172544.3	neurexin 3
NTRK3	<i>Ntrk3</i>	18213	NM_182809.2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
ODZ2	<i>Odz2</i>	23964	NM_011856.3	odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)
OGDH	<i>Ogdh</i>	18293	NM_010956.3	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
PCDH7	<i>Pcdh7</i>	54216	NM_001122758.1	protocadherin 7
PCDH9	<i>Pcdh9</i>	211712	NM_001081377.1	protocadherin 9
PHACTR1	<i>Phactr1</i>	218194	NM_198419.3	phosphatase and actin regulator 1
PLXNA4	<i>Plxna4</i>	243743	NM_175750.3	plexin A4
PPARGC1A	<i>Ppargc1a</i>	19017	NM_008904.1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
PRICKLE2	<i>Prickle2</i>	243548	NM_001081146.1	prickle homolog 2 (Drosophila)
PTCH1	<i>Ptch1</i>	19206	NM_008957.2	patched homolog 1 (Drosophila)

PTPRG	<i>Ptprg</i>	19270	NM_008981.3	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
PUM2	<i>Pum2</i>	80913	NM_030723.1	pumilio homolog 2 (Drosophila)
R3HDM2	<i>R3hdm2</i>	71750	NM_027900.3	R3H domain containing 2
RAPGEF2	<i>Rapgef2</i>	76089	NM_001099624.2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
SASH1	<i>Sash1</i>	70097	NM_175155.4	SAM and SH3 domain containing 1
SLITRK5	<i>Slitrk5</i>	75409	NM_198865.1	SLIT and NTRK-like family, member 5
SMARCA2	<i>Smarca2</i>	67155	NM_011416.2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin
SMG1	<i>2610207I05Rik</i>	233789	NM_001031814.1	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)
SPRED1	<i>Spred1</i>	114715	NM_033524.2	sprouty-related, EVH1 domain containing 1
TANC2	<i>Tanc2</i>	77097	NM_181071.3	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
TCF4	<i>Tcf4</i>	21413	NM_013685.2	transcription factor 4
TRIO	<i>Trio</i>	223435	NM_001081302.1	triple functional domain (PTPRF interacting)
TRIP12	<i>Trip12</i>	14897	NM_133975.4	thyroid hormone receptor interactor 12
VPS13D	<i>Vps13d</i>	230895	NM_001128198.1	vacuolar protein sorting 13 homolog D (S. cerevisiae)
ZEB2	<i>Zeb2</i>	24136	NM_015753.3	zinc finger E-box binding homeobox 2
ZNF365	<i>Zfp365</i>	216049	NM_178679.2	zinc finger protein 365
ZNF462	<i>Zfp462</i>	242466	NM_172867.3	zinc finger protein 462
ZNF521	<i>Zfp521</i>	225207	NM_145492.3	zinc finger protein 521
ZNF536	<i>Zfp536</i>	243937	NM_172385.2	zinc finger protein 536
ZNF827	<i>Zfp827</i>	622675	NM_178267.3	zinc finger protein 827

*Tabla suplementaria 4. Dianas de FMRP que contienen la secuencia SARE. Nuestra lista de genes con la región SARE fue comparada con una lista publicada de 842 dianas de FMRP (Darnell et al., 2011). 70 genes eran coincidentes entre ambas lista, lo cual representa un elevado enriquecimiento de dianas de FMRP en nuestra lista de genes con secuencias SARE (p -valor= $4,39 * 10^{-13}$. Se muestra su símbolo genético en humanos y en ratón (*mm9*), su número identificativo génico, su secuencia de referencia (RefSeq) y su nombre completo (descripción).*