



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Alteraciones en la diferenciación dopaminérgica en ratones
carentes del ligando de Notch Dll1**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

Presenta:

NIURKA TRUJILLO PAREDES

Director de Tesis:

Dr. Luis Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología

Miembros del comité tutor:

Dra. Magdalena Guerra Crespo (IFC UNAM)
Dr. Enrique Salas Vidal (IBT UNAM)
Dra. Leda Torres Maldonado (INP)
Dra. Denhi Schnabel Peraza (IBT UNAM)
Dra. Yvonne Rosenstein (IBT UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mí amado esposo

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. Así, en primer lugar, deseo manifestar enorme gratitud a mi grupo de laboratorio, con quienes compartí momentos de conocimiento, apoyo académico y personal. De manera especial a mi comité tutorial y de revisión de tesis.

Agradezco, profundamente, a mi madre, quien siempre me motivó a ser profesionalista, unido al resto de mi familia por contribuir a ser quien soy. Y a Dios, quien siempre me ha acompañado y cuidado en todo momento.

No he de olvidar a Eva Díaz quien, más que amiga, es mi cómplice; junto a Martín (su esposo) que es nuestro compañero de parrandas.

Pero, sin duda y de forma muy especial por su ánimo, apoyo, ayuda y comprensión en momentos tensos, a mi adorado esposo Enrique Arroyo, quien llegó a mi vida en el momento más oportuno.

Finalmente, agradezco a CONACyT por la beca otorgada y a los donativos CONACyt CB131031 y FOINS1723 por su colaboración en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	4
General	4
Figuras	6
Tablas	5
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN	12
a. Neurulación y compartimentalización del Sistema Nervioso Central	12
b. Generación de neuronas dopaminérgicas.....	14
i. Establecimiento del dominio de progenitores dopaminérgicos mesencefálicos	15
ii. La especificación molecular del linaje dopaminérgico mesencefálico	17
iii. Diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas maduras	19
iv. Migración.....	21
c. Organización celular del mesencéfalo.....	22
d. La vía de señalización de Notch	23
II. ANTECEDENTES.....	27
a. Notch y el mantenimiento del estado indiferenciado	29
b. Notch y la diferenciación de células troncales neurales	31
c. Notch y la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico	34
III. HIPÓTESIS.....	36
IV. OBJETIVO.....	36
a. Objetivos Generales.....	36
b. Objetivos Particulares	36

V. METODOLOGÍA.....	37
a. Mantenimiento de la línea transgénica de ratón <i>Dll1^{+/lacZ}</i>	37
b. Genotipificación de los embriones	37
c. Análisis de la expresión del gen reportero	37
d. Cultivo de explantes en colágena	38
e. Procedimiento para generar neuroesferas embrionarias primarias	38
f. Procedimiento para la diferenciación de las neuroesferas	39
g. Procesamiento del tejido e inmunofluorescencia	39
h. PCR en tiempo real cuantitativa	41
i. Análisis cuantitativos	41
VI. RESULTADOS.....	43
a. Dll1 y Hes5 son mediadores de la señal de Notch en el nicho dopaminérgico mesencefálico	43
b. La señal reducida de Notch, altera el número de precursores dopaminérgicos sin afectar su especificación.....	44
c. La pobre expansión de las CPNs dopaminérgicas que pierden la señal de Dll1, correlaciona con la detección prematura de marcadores neuronales	47
d. Cultivos de explantes mesencefálicos recapitulan los efectos de la deficiencia en la señal de Notch durante la diferenciación dopaminérgica.....	50
e. La ausencia de la señal de Notch modifica el flujo de diferenciación dopaminérgica.....	54
f. La expansión de las CPN nulas en Dll1, retienen su identidad y aumentan la diferenciación específica	59
g. La haploinsuficiencia de Dll1 causa una reducción en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en el cerebro adulto	61

VII. DISCUSIÓN	63
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	69
X. APÉNDICE 1.....	87

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Organización antero-posterior del tubo neural	12
Figura 2. Corte transversal del tubo neural en desarrollo.....	13
Figura 3. Determinantes moleculares del mesencéfalo.....	16
Figura 4. Desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	20
Figura 5. Neurogénesis embrionaria	21
Figura 6. Vía de señalización Notch.....	24
Figura 7. Modelo de las oscilaciones en la señal de Notch.....	32
Figura 8. Señalización Dll1-Notch en el nicho dopaminérgico mesencefálico.....	44
Figura 9. Fenotipo de embriones de ratón homocigotos para el alelo nulo en Dll1	45
Figura 10. Patrón de expresión de marcadores de especificación en ausencia de Dll1	46
Figura 11. Muerte celular y proliferación en mesencéfalos en desarrollo en la presencia o ausencia de Dll1	47
Figura 12. Diferenciación neuronal en mesencéfalos en desarrollo en presencia o ausencia de Dll1.....	48
Figura 13. Diferenciación dopaminérgica en mesencéfalos en desarrollo en presencia o ausencia de Dll1.....	50
Figura 14. Diferenciación dopaminérgica en cultivo de explantes.....	51
Figura 15. Número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto bajo niveles reducidos de Dll1	52

Figura 16. Efecto de la señal de Notch en la diferenciación neuronal dopaminérgica en cultivos de explantes de mesencéfalos en desarrollo	54
Figura 17. Flujo de diferenciación dopaminérgica en mesencéfalos a lo largo del desarrollo embrionario o en explantes con señal normal o reducida de Notch	56
Figura 18. Niveles de marcadores de diferenciación dopaminérgica Msx1 y Mash1 a diferentes dosis de Dll1	57
Figura 19. Potencial de diferenciación de neuroesferas <i>Dll1^{lacZ/lacZ}</i> comparado con el control.....	60
XI. Figura 20. Densidad de neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto a diferentes edades y niveles de Dll1.....	62

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Patrones de expresión de receptores y ligandos de la vía Notch en murinos	26
Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados	40
Tabla 3. Oligonucleótidos para RT-PCR* (Trujillo-Paredes et al., 2016).....	42

ABREVIATURAS

AAV2	Vector Viral Adenoasociado-2
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
A-P	Anterior-Posterior
AVT	Área Ventral Tegmental
CPNs	Células Precursoras Neurales
CRR	Campo Retrorrubral
CTNs	Células Troncales Neurales
DICN	Dominio Intracelular de Notch
Dll1	Del inglés “Delta-like1”
D-V	Dorso-Ventral
En	Del inglés “Engrailed”
ENT	Del inglés “Engineered Nervous Tissue”
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF	Del inglés “Fibroblast Growth Factor”
GAD	Del Inglés “Glutamic Acid Decarboxilase”
Glast/Slc1a	Del inglés “ Glial High Affinity Glutamate Transporter”
Jag	Jagged
hPSCs	Del inglés “human Pluripotent Stem Cells”
IstO	Organizador del Istmo
Maml	Del inglés “Mastermind like”
mDA	Del inglés “mesencefalic Dopaminergic”

MAP2	Del inglés "Microtubule Associated Protein 2"
Ngn	Neurogenina
Nz	Neurodazina
Nzl	Neurodazola
PBS	Del inglés "Phosphate Buffered Saline"
PCR	Del Inglés "Polimerase Chain Reaction"
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PP	Placa del Piso
PT	Placa del Techo
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SVZ	Zona Subventricular
Th	Tirosina hidroxilasa
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ZV	Zona Ventricular
ZI	Zona Intermedia
ZM	Zona Manto

RESUMEN

La señal de Notch es una vía reconocida por sus funciones en la neurogénesis. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del papel de la señalización de Notch en la diferenciación neural de tipos específicos. Utilizando un ratón nulo en Dll1, encontramos que la señal de Notch no tiene funciones en la especificación de células precursoras neurales dopaminérgicas del mesencéfalo, pero juega un papel muy importante en regular su expansión y diferenciación a neuronas. La diferenciación neuronal prematura fue observada en mesencéfalos de ratones nulos en Dll1 y en cultivos de explantes, después de un tratamiento con DAPT, un inhibidor de la señal de Notch. La sincronización entre la neurogénesis y la diferenciación dopaminérgica fue indicada por la coincidente emergencia de marcadores neuronales y dopaminérgicos. En la diferenciación temprana, disminuir la señal de Notch provocó una reducción en las CPNs y un incremento de neuronas dopaminérgicas en asociación con cambios dinámicos en la proporción de CPN dopaminérgicos, secuencialmente unidos (*Msx1/2+*, *Ngn2+*, *Nurr1+*). Esos efectos en la diferenciación provocaron una reducción significativa en el número de neuronas dopaminérgicas producidas. En los ratones adultos con la haploinsuficiencia de Dll1, comparados con sus compañeros control, se observó una reducción consistente en la densidad neuronal que fue particularmente evidente en la sustancia nigra pars compacta.

ABSTRACT

Notch signalling is a well-established pathway that regulates neurogenesis. However, little is known about the role of Notch signalling in specific neuronal differentiation. Using Dll1 null mice, we found that Notch signalling has no function in the specification of mesencephalic dopaminergic neural precursor cells (NPCs), but plays an important role in regulating their expansion and differentiation into neurons. Premature neuronal differentiation was observed in mesencephalons of Dll1-deficient mice or after treatment with a Notch signalling inhibitor. Coupling between neurogenesis and dopaminergic differentiation was indicated from the coincident emergence of neuronal and dopaminergic markers. Early inhibition caused a significant reduction in the number of dopaminergic neurons produced. Accordingly, Dll1 haploinsufficient adult mice, in comparison with their wild-type littermates, have a consistent reduction in neuronal density that was particularly evident in the substance nigra pars compacta.

I.- INTRODUCCIÓN

a.- Neurulación y compartimentalización del Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC) surge del epiblasto dorsal (capa externa de la blástula que forma el ectodermo después de la gastrulación) de la gástrula de vertebrados. La primera respuesta morfológica obvia del embrión frente a la inducción neural es la formación del ectodermo dorsal, que queda por encima del proceso notocordal en una placa alargada de células epiteliales engrosadas denominada placa neural (Smith y Schoenwolf, 1997; Cearns, M.D et al., 2016). Subsecuentemente, la placa neural se cierra y forma el tubo neural. Específicamente en ratón, el cierre del tubo neural ocurre en un proceso de varios pasos, creando tres neuroporos (regiones abiertas del tubo neural): los neuroporos anterior y posterior en la región craneal y el neuroporo posterior en la región baja de la columna vertebral (Nikolopoulou et al., 2017). Una serie de vesículas se desarrollan en el extremo de este tubo, indicando el establecimiento de un patrón neural a lo largo del eje antero-posterior (A-P) (Puelles, 2001; Wurst y Bally-Cuif, 2001; Kiecker y Lumsden, 2005): el prosencéfalo o cerebro anterior, compuesto por el telencéfalo y el diencefalo; el mesencéfalo o cerebro medio y el romboencéfalo o cerebro posterior, compuesto por el metencéfalo y romboencéfalo (Fig. 1).

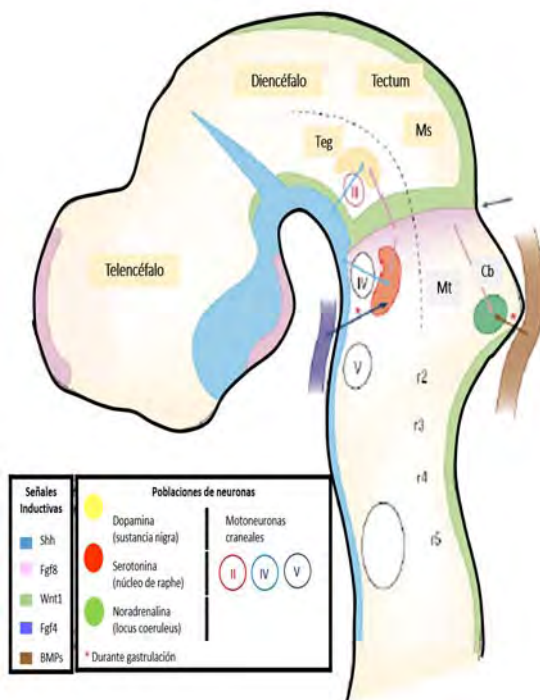


Figura 1. Organización antero-posterior del tubo neural.

Vista lateral del tubo neural donde se muestran las estructuras principales organizadas en 5 vesículas. De anterior a posterior se observa el Telencéfalo, el Diencefalo, el Mesencéfalo (Ms), el Metencéfalo (Mt) y el Romboencéfalo (compuesto por los rombómeros r2-r5). La constricción en la frontera del Mesencéfalo y el Metencéfalo se conoce también como Organizador del Istmo. La presencia de morfógenos como Shh, Fgf8 y Fgf4 determinan la posición de diversos núcleos neuronales especializados. En el Mesencéfalo ventral, las neuronas dopaminérgicas se inducen por la presencia de Shh y Fgf8. Estas mismas señales en combinación con Fgf4 inducen las neuronas serotoninérgicas (5-HT neuronas) en el Metencéfalo. Modificado de Wallen y Perlman, 2003.

Simultáneamente, el tubo neural es compartimentalizado a lo largo del eje dorso-ventral (D-V) bajo la influencia de tejido meso-endodermal subyacente, así como por el efecto de estructuras ectodermales no-neurales. El surco limitante dentro del conducto central divide la médula en una placa alar dorsal y una placa basal ventral a cada lado de dicho conducto (Fig. 2). Las placas alares derecha e izquierda poseen una conexión dorsal por encima del conducto central mediante una delgada Placa del Techo (PT), mientras que las dos placas basales están unidas a nivel ventral a través de la Placa del Piso (PP) (Puelles, 2001; Wurst y Bally-Cuif, 2005). Como resultado de esos eventos de establecimientos de patrones, la identidad posicional se asemeja a una red en tres dimensiones que se establece en el eje neural embrionario. En otras palabras, diversas neuronas de identidad específica podrían ser producidas dentro de esos diferentes territorios.

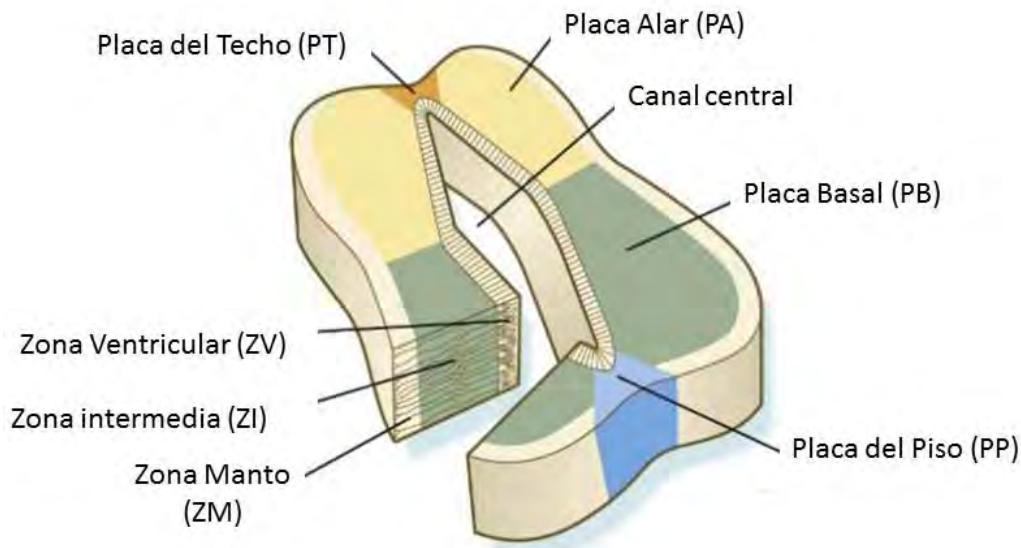


Figura 2. Corte transversal del tubo neural en desarrollo.

Principales regiones del tubo neural. Las capas de células más cercanas al lumen del tubo neural permanecen epiteliales y es llamada la zona ventricular, la cual contiene células mitóticas, las cuales conforme se van diferenciando, van alcanzando la zona manto. En la parte ventral se encuentra la PP, la cual actúa como un centro de señalización. En la parte dorsal se encuentra la PT, la cual conecta dorsalmente la placa alar izquierda y derecha. Modificado de Carlson, 2014.

Al empezar la diferenciación celular en el tubo neural, el neuroepitelio se engrosa y parece estratificado. La capa celular más próxima a la luz del tubo neural (conducto central) sigue siendo epitelial y se denomina zona ventricular (ZV). Esta capa, que todavía contiene células mitóticas, se acaba convirtiendo en el epéndimo, un epitelio cilíndrico que reviste el sistema ventricular y el conducto central del SNC. Más allá de la ZV se encuentra la zona intermedia (ZI) en la que se hallan los cuerpos celulares de los neuroblastos postmitóticos en diferenciación. Conforme estos elementos siguen generando prolongaciones axónicas y dendríticas, todas ellas forman una zona marginal periférica o zona manto (ZM) que contiene prolongaciones neuronales pero no somas celulares (Fig. 2).

b.- Generación de neuronas dopaminérgicas

En el cerebro en desarrollo, los progenitores dopaminérgicos mesencefálicos están localizados dentro del área del tubo neural que dará lugar al mesencéfalo y al diencéfalo.

El periodo de desarrollo de los progenitores dopaminérgicos mesencefálicos puede ser dividido en cuatro estados.

1. Se establece un dominio de los progenitores en la superficie ventral ventricular mesencefálica. Son células con propiedades de auto-renovación y con capacidad de formar múltiples tipos celulares, surgen en el día embrionario 7.5 (E7.5) post-implantación.
2. Estas células son especificadas a un destino celular de precursores neuronales dopaminérgicos; y muchos marcadores moleculares se asocian a esta población.
3. Los precursores dopaminérgicos salen del ciclo celular y comienzan a mostrar marcadores tempranos de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio.
4. Finalmente, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mDA) maduran funcionalmente, expresan marcadores de neuronas maduras mesencefálicas y establecen su apropiada conectividad.

i.- Establecimiento del dominio de progenitores dopaminérgicos mesencefálicos

Los primeros pasos claves en la generación de neuronas mDA depende de un apropiado patrón de expresión de genes a lo largo de los ejes A-P y D-V, los cuales son regulados por señales que surgen de dos estructuras claves en el embrión temprano: la PP (Placzek y Briscoe, 2005) y el organizador del Istmo (IstO) (Alexandre and Wassef, 2005; Nakamura y Watanabe, 2005; Dworkin y Jane, 2013).

El IstO es un único centro de señalización que separa el cerebro medio del cerebro posterior (Fig. 3) y es necesario para el desarrollo de esas dos regiones del cerebro (Nakamura y Watanabe, 2005). El correcto posicionamiento del IstO en el límite cerebro medio-posterior depende de la represión mutua de dos factores de transcripción homeodominios: *Otx2* y *Gbx2* (Fig. 3). *Otx2* se expresa en el cerebro anterior y cerebro medio del tubo neural anterior en desarrollo (Millet et al., 1999; Acampora et al., 2005), mientras que *Gbx2* se expresa más posteriormente en el cerebro posterior anterior (Millet et al., 1999). La expresión de *Gbx2* en el borde posterior limita la expresión de *Otx2*, el cual crea el límite entre el cerebro medio y el posterior (Millet et al., 1999). La falta de *Otx2* en el cerebro medio, disminuye el número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ventrales (Omodei et al., 2008) demostrando la importancia crítica del posicionamiento del IstO para la generación normal de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral. El factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), es un factor difusible secretado por el IstO a partir del E8 hasta E12.5 en el límite cerebro medio-posterior del ratón (Crossley y Martin, 1995). Aunque *Otx2* y *Gbx2* son críticos para la posición correcta del IstO, ellos no son requeridos para la expresión de FGF8, o para la inducción de otros genes implicados en el IstO; sin embargo son especiales para el correcto posicionamiento de los dominios de expresión de esos genes (Martínez et al., 1999).

Un segundo grupo de factores de transcripción también son expresados en el IstO, los cuales incluyen el gen *Pax2* (Urbanek et al., 1997), el factor homeodominio-lim *Lmx1b* (Smidt et al., 2000), la glicoproteína secretada *Wnt1* (Crossley y Martin, 1995; Adams et al., 2000) y *Engrailed-1* (Simon et al., 2004). De éstos, *Pax2* se

requiere para la inducción de la expresión de FGF8 por el Istmo, mientras que Wnt1 y En1 cooperan funcionalmente con Otx2 y Gbx2 para definir la posición del dominio de expresión de FGF8 en el Istmo (Ye et al., 2001).

Después de la inducción y posicionamiento de la expresión de FGF8, los genes Engrailed-2 (En2) y Pax5 comienzan a ser expresados en el límite del cerebro medio-posterior, estos genes son críticos en la especificación regional del mesencéfalo ventral. Los ratones nulos para Otx2 (Puelles et al., 2003; Omodei et al., 2008), Pax2 y Pax5 (Schwarz et al., 1997), En1 y En2 (Liu y Joyner, 2001; Simon et al., 2001) o Lmx1b (Smidt et al., 2000), muestran defectos en el mesencéfalo ventral, incluyendo la pérdida parcial o total de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ventrales.

Formación del mesencéfalo

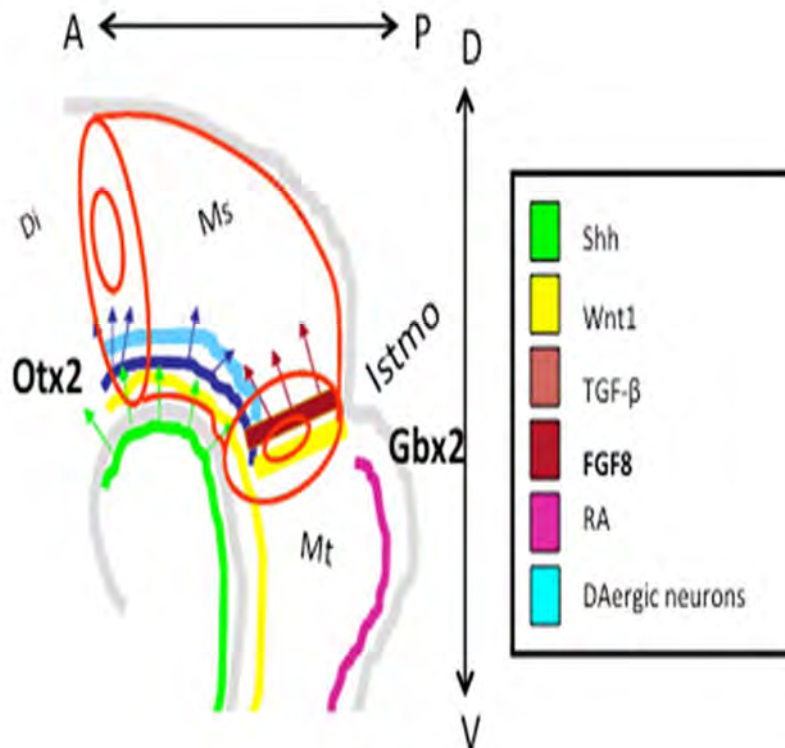


Figura 3. Determinantes moleculares del mesencéfalo.

Vista lateral del tubo neural. La frontera posterior del mesencéfalo (Ms) la establece el límite de expresión de Otx2.

La represión recíproca entre Otx2 y Gbx2 establece la posición del Istmo, el cual produce Fgf8. Shh es una molécula que se produce en la línea media ventral del mesencéfalo y actúa en la formación de la PP, junto con Nodal, miembro de la familia de los TGFβ. Shh especifica diversas poblaciones neuronales ventrales por ejemplo las DA (azul) dependiendo de su concentración local.

El otro centro de señalización es la PP en el tubo neural ventral, y es inducido por Shh. Shh es secretado primero por la notocorda (una estructura mesodermal la cual yace debajo de la placa neural) y después por la misma PP. La inducción del fenotipo mDA es dependiente de la interacción de Shh, secretada por la PP y FGF8, secretado por el IstO (Ye et al., 1998).

Recientemente se identificó la identidad precisa de los precursores neurales mDA, cuando un estudio mostró que las células de la PP en el mesencéfalo ventral murino son neurogénicas y, subsecuentemente, forman neuronas mDA (Ono et al., 2007; Bonilla et al., 2008; Nouri y Awatramani, 2017), a diferencia de la PP de regiones más caudales que no son neurogénicas. Experimentos de mapa de destino indican que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se originan de progenitores clasificados para el marcador de la placa del piso CORIN (Ono et al., 2007), o expresan marcadores de glía radial *Glast/Slc1a* (glial high affinity glutamate transporter) (Bonilla et al., 2008). Esto mostró que células tipo glía radial de la PP mesencefálica, a diferencia de otras regiones del cerebro, pueden sufrir neurogénesis y son progenitores dopaminérgicos mesencefálicos. Adicionalmente factores de transcripción involucrados en la generación de neuronas dopaminérgicas como *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Foxa2*, *Otx2*, están presentes en la PP del mesencéfalo.

Una vez que se ha establecido el patrón correcto de la región del mesencéfalo ventral, comienza la expresión de una serie de genes (Mesman et al., 2018) que establecen la identidad de los precursores neurales dopaminérgicos mesencefálicos ventrales, que finalmente genera neuronas mDA (Fig. 4).

ii.- La especificación molecular del linaje dopaminérgico mesencefálico

La neurogénesis dopaminérgica mesencefálica tiene lugar en la ZV de la PP mesencefálica cuando los progenitores dopaminérgicos se dividen para generar células postmitóticas, las cuales expresan el receptor nuclear *Nurr1*. Estas células migran a través de la ZI mientras se diferencian y comienzan a ser neuronas dopaminérgicas que expresan *Tirosina hidroxilasa* (Th) y alcanzan la ZM.

El primer signo del fenotipo mDA es la expresión de dos determinantes del linaje dopaminérgico: el factor homeodominio-lim Lmx1a y el factor de transcripción homeodominio Msx1 a E9 en el ratón (Alavian et al., 2008). Shh induce la expresión de Lmx1a, el cual después induce la expresión de su efector río abajo Msx1 (Andersson et al., 2006b). Msx1 contribuye a la neurogénesis mDA induciendo la expresión del gen proneural, neurogenina 2 (Ngn2), y así induce diferenciación neuronal. La expresión de Ngn2 en los precursores mesencefálicos parece estar bajo el control de la expresión de Otx2, ya que la mutante condicional de Otx2 en ratón muestra la pérdida de expresión de Ngn2 en los precursores mDA (Vernay et al., 2005). Otx2 controla el destino de los progenitores mesencefálicos mediante la represión de Nkx2.2 y el mantenimiento de la expresión de Nkx6.1 (Puelles et al., 2004), dos factores transcripcionales involucrados en delimitar el dominio mDA. Similar a Lmx1a, la proteína Lmx1b también ha mostrado promover neurogénesis mDA (Deng et al., 2011; Yan et al., 2011). Lmx1a y Lmx1b son co-expresados en precursores mDA y también han mostrado influir en los pasos iniciales de la especificación de precursores mDA (Andersson et al., 2006b). Shh derivado de la PP ha mostrado un papel clave en la inducción del fenotipo mDA modulando la expresión del regulador transcripcional FoxA2, un marcador de la PP. Esta inducción de FoxA2 por Shh se ha propuesto que funciona cooperativamente con Lmx1a y Lmx1b en la generación de neuronas mDA derivadas de precursores de la PP mesencefálicos (Nakatani et al., 2010).

Wnt1 es una molécula que se expresa en el Istmo y en el mesencéfalo en desarrollo, los ratones nulos en Wnt1 generan precursores mDA, pero no proliferan ni se diferencian apropiadamente; y generan pocas neuronas que mueren poco después de su génesis (Prakash et al., 2006). Se ha propuesto que la señal de Shh se requiere inicialmente para el establecimiento temprano del nicho de progenitores mDA, pero después inhibe la proliferación de los progenitores y la neurogénesis mDA (Joksimovic et al., 2009). Estos estudios apuntan a un papel crítico de las vías Wnt/beta-catenina y Shh para determinar el potencial neurogénico de la PP a lo largo del eje neural. En el mesencéfalo, Shh tiene un efecto bimodal, temprano en el desarrollo, Shh puede ser un pre requisito para el establecimiento y/o expansión

de los progenitores dopaminérgicos y más tarde, Shh impide la neurogénesis dopaminérgica. Sin embargo, la señal Wnt/beta-catenina suprime los niveles de Shh en la línea media, creando su propio medio para las tasas normales de proliferación y expresión de genes proneurales (Joksimovic et al., 2009). Nuevos datos han mostrado que Lmx1a y Lmx1b funcionan cooperativamente para controlar la proliferación de células precursoras neurales mDA mediante la regulación de la expresión de Wnt1 (Yan et al., 2011). De esta forma, las dos vías regulatorias: Shh-FoxA2 y Wnt1-Lmx1a, contribuyen al proceso de neurogénesis dopaminérgica mesencefálica en las células de la PP mediante la inducción de la expresión de diversos factores como FoxA2, Lmx1a/1b y Msx1 (Chung et al., 2009).

iii.- Diferenciación en neuronas dopaminérgicas maduras

La inducción de la expresión de Th, la enzima limitante para la síntesis de dopamina, ocurre después de la mitosis final de los precursores neurales mDA ventrales mientras que son activos y migran a sus posiciones finales (Fig. 4) (Puelles y Verney, 1998; Smidt y Burbach, 2007; Poulin et al., 2018). Este proceso de migración desde la zona ventricular de la PP hacia sus destinos, involucra dos pasos: primero las neuronas mDA migran ventralmente a lo largo de procesos gliales, los cuales proyectan a la superficie pial; segundo, una vez que alcanzan la parte basal del mesencéfalo ventral, migran lateralmente a lo largo y tangencialmente a las fibras para formar tres grupos en el mesencéfalo (Prakash y Wurst, 2006; Smidt y Burbach, 2007), los cuales representan cerca del 75% de todas las neuronas presentes en el cerebro. Estos tres grupos son: el grupo A9 que forma la sustancia nigra pars compacta (SNpc), cuyas neuronas proyectan al estriado dorsal formando la Vía Nigroestriada. Estas neuronas y sus proyecciones son requeridas para el control del movimiento voluntario y la pérdida de estas neuronas provoca la Enfermedad de Parkinson, la cual es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por el daño de la función motora (Abeliovich y Hammond, 2007). Los otros grupos de neuronas mDA, el A10 y A8 forman el área ventral tegmental (AVT) y el campo retrorubral (CRR), respectivamente, cuyas neuronas inervan el estriado ventral y el córtex prefrontal vía el sistema mesocorticolímbico, y están involucradas

en la regulación de sentimientos de emoción y recompensa. La neurotransmisión alterada o defectuosa del sistema mesocorticolímbico mDA ha sido asociada con el desarrollo de esquizofrenia, adicción a drogas y depresión (Abeliovich y Hammond, 2007). Entre los distintos grupos de neuronas mDA existen diferencias tanto anatómicas como de función durante su ontogenia. Sin embargo todavía se conoce poco de los mecanismos moleculares que regulan las diferencias fenotípicas y de función entre esas poblaciones neuronales. Dado el involucramiento de las neuronas mDA A9 en la enfermedad de Parkinson, la mayoría de los estudios se han enfocado a identificar las moléculas y mecanismos que regulan su desarrollo.

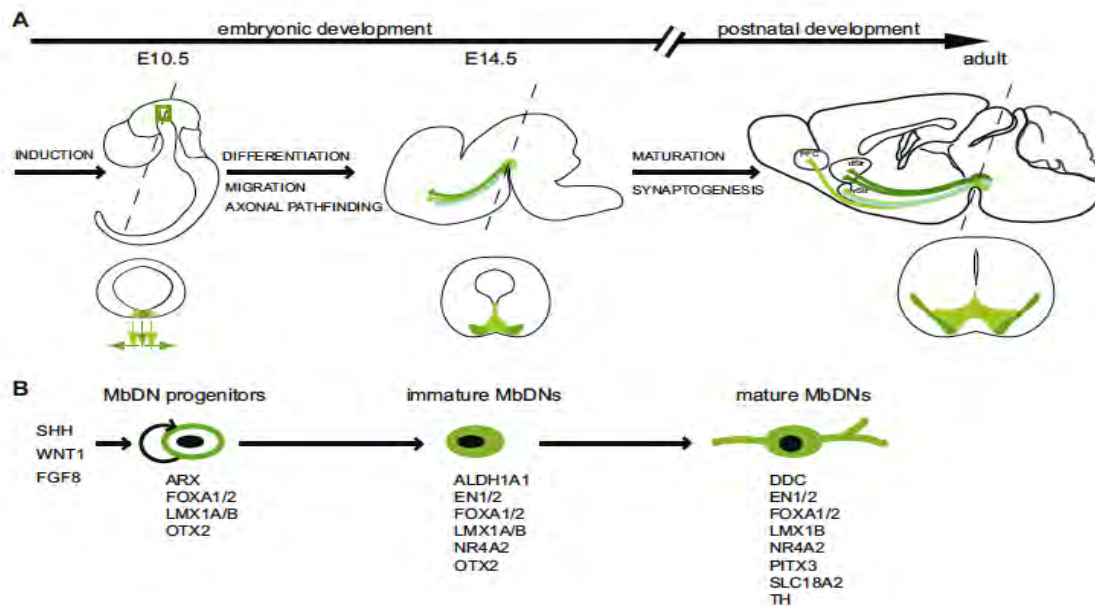


Figura 4. Desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

A) Línea de tiempo del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Los progenitores dopaminérgicos son inducidos en la línea media ventral del cerebro medio. Subsecuentemente, las neuronas diferencian, migran, forman proyecciones y establecen contactos sinápticos con neuronas en sus áreas blanco en el cerebro anterior. Neuronas de la SN: verde oscuro, neuronas del AVT: verde claro, neuronas del RRF: turquesa. Vistas coronales mostrando la localización de los progenitores y a las neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo. Note, que las neuronas de la SNpc son preferencialmente derivadas de los progenitores mediales, las neuronas del AVT de progenitores laterales.

B) moléculas de señalización clave y factores de transcripción involucrados en los diferentes pasos del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas desde progenitores a inmaduras y hasta neuronas maduras. Foto tomada de Bodea y Blaess, 2015).

Muchos factores de transcripción han sido identificados como esenciales para la diferenciación y supervivencia a largo término de neuronas mDA ventrales, entre los que se encuentran *Lmx1b*, *Nurr1*, *Pitx3*, *En1* y *En2* (Kouwenhoven et al., 2017). Cada uno de estos factores, de manera individual, no es capaz de inducir un fenotipo mDA completo, sugiriendo que funcionan como parte de una cascada de señalización (Fig. 4B).

iv.- Migración

Posterior a su generación, las neuronas mDA ventrales sufren maduración funcional, la cual involucra guía axonal y sinaptogénesis. Los axones de las neuronas mDA ventrales, las cuales surgen a E11.0 en ratón, inicialmente proyectan dorsalmente pero después se desvían ventro-rostralmente hacia el cerebro anterior (Fig.4A), en respuesta a pistas extrínsecas en el cerebro medio dorsal y pistas repulsivas en el tronco cerebral caudal (Poulin et al., 2018).

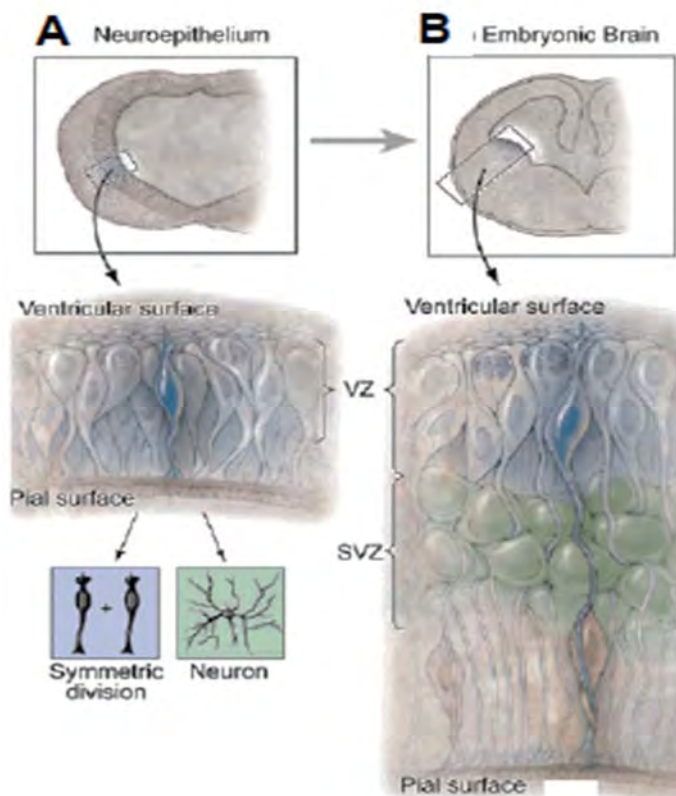


Figura 5. Neurogénesis embrionaria.

A) En etapas tempranas del desarrollo del tubo neural, las Células Precursoras Neurales (CPNs) en el neuroepitelio mantienen contacto con la superficie ventricular y pial (ejemplo en azul), mientras proliferan por divisiones simétricas o diferencian a neuronas.

B) al engrosarse el neuroepitelio a causa de la proliferación de las CPNs, se define la región ventricular (VZ) y la región subventricular (SVZ) a lo largo del eje radial del tubo neural. En esta etapa, las CPNs mantienen contacto con la superficie ventricular y pial al diferenciar a glía radial (ejemplo en azul), la cual mantiene el proceso de neurogénesis además de funcionar como andamiaje para la migración de células diferenciadas hacia la capa pial (en anaranjado). Modificado de Merkle y Alvarez-Buylla, 2006.

c. Organización celular del mesencéfalo

La organización del epitelio mesencefálico a lo largo del eje radial determina la ubicación de las células progenitoras y sus derivados neuronales durante el desarrollo. Previo al inicio de la neurogénesis en el mesencéfalo (E9.5 – E10), el neuroepitelio se encuentra formado esencialmente por Células Troncales Neurales (CTNs) y otras células progenitoras indiferenciadas. Todas las células indiferenciadas se conocen en su conjunto como Células Precursoras Neurales (CPNs). Durante la neurogénesis, las CPNs en la región ventricular (Fig. 5A) se mantienen indiferenciadas y proliferando, mientras que otras CPNs migran hacia la zona manto donde producen nuevas neuronas (Fig. 5B zona naranja). Este fenómeno define a la región ventricular del tubo neural como el nicho de las CPNs.

El tamaño y forma del sistema nervioso depende grandemente del número de veces que una CTN o su progenie re-entra al ciclo celular. El mantenimiento de este nicho y el crecimiento simultáneo del neuroepitelio es posible mediante el control del número de divisiones simétricas y asimétricas de las CPNs por moléculas como Notch y Numb (Andersson, 2001). En el tubo neural en desarrollo esas células residen en la ZV y, tanto en el embrión como en cultivo de CTN, esas células son activadas a producir nueva progenie mediante la integración de varias vías de señalización como Shh, BMP, Wnt/ β Catenina, Notch y FGF (Lee et al 2014). Tanto en el embrión como en CTN en cultivo, la habilidad de auto-renovación de esas células es regulada por numerosos factores de transcripción, incluyendo Hes, Soc, Bmi1, Tlx y proteínas Gli (Yang et al 2011; Lee et al 2014).

Conforme el epitelio del cerebro se va engrosando, las CPNs adquieren progresivamente la identidad de glía radial (Merkle y Alvarez-Buylla, 2006) y, posteriormente, se diferencian primero a neuronas inmaduras y luego a neuronas maduras. La evolutivamente conservada vía Notch media interacciones célula-célula que regulan el proceso de diferenciación de células vecinas, proveyendo un mecanismo para la consistente determinación del destino celular y el establecimiento de patrones en tiempo y espacio de tejidos altamente organizados (Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011; Borggreffe y Giaimo, 2018).

d. La vía de señalización Notch

La vía de señalización Notch se activa mediante interacciones célula-célula y permite a sus células vecinas adoptar diferentes destinos celulares, proporcionando un mecanismo para la determinación del destino celular, diferenciación y establecimiento de patrones de tejidos altamente organizados, mediante un mecanismo llamado Inhibición Lateral, ver revisiones (Yoon y Gaiano, 2005; Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006; Hurlbut et al., 2007; Cau y Blader, 2009; Pierfelice et al., 2011; Irvine, 2016). Esta vía está presente en organismos metazoarios, desde el erizo de mar hasta humanos (Chitnis y Balle-Cuif, 2016). En el sistema nervioso, la señal de Notch está involucrada en el mantenimiento de los precursores neurales inhibiendo diferenciación neuronal y también se ha visto que promueve diferenciación glial (Yoon y Gaiano, 2005; Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011). La vía Notch (Fig. 6) es regulada vía interacciones celulares; el receptor Notch (existen cuatro en mamíferos, Notch1-4) en una célula, es activado por el ligando Delta-like 1 (Dll1,3,4) y Jagged (Jag1,2), expresado en las células vecinas (Lai, 2004; Bray, 2006; D'Souza et al., 2008; Chitnis y Balle-Cuif, 2016).

Al nivel molecular, la activación del receptor Notch por la unión del ligando promueve dos rompimientos proteolíticos en el receptor (Fig. 6), el primer rompimiento es catalizado por la familia ADAM de las metaloproteasas, mientras que el segundo rompimiento es mediado por el complejo de la γ -secretasa, un complejo de enzimas que contiene presenilina, nicastrina, PEN2 y APH1. Este segundo rompimiento libera el Dominio Intracelular de Notch (DICN), el cual después se trasloca al núcleo y actúa como un coactivador transcripcional (Ver figura 6). El DICN no puede unirse directamente al ADN pero heterodimeriza con la proteína de unión al ADN, CBF1 (también llamada CSL, RBP-J, Su(H) (en *Drosophila*) y LAG-1 (en *Caenorhabditis elegans*) y las proteínas Mastermind-like (Maml) y activan la transcripción de genes que contienen sitios de unión CBF1. En ausencia de un ligando y, por lo tanto sin el DICN en el núcleo, CBF1 reprime a los genes blancos de Notch mediante el reclutamiento de complejos co-represores. La unión DICN con CBF1 es crucial para el cambio del estado reprimido al estado activado. El DICN desplaza primero

correpresores de CBF1, provocando la desrepresión de promotores que contengan sitios de unión a CBF1 y subsecuentemente recluta un complejo de coactivadores adicionales como la proteína p300 o la proteína de unión CREB para activar la transcripción de genes blancos de Notch (ver revisiones Lubman et al., 2007; Gordon et al, 2008; Fortini, 2009; Borggrefe y Oswald, 2009; Kopan y Llagan, 2009; Borggrefe y Gaiamo, 2018).

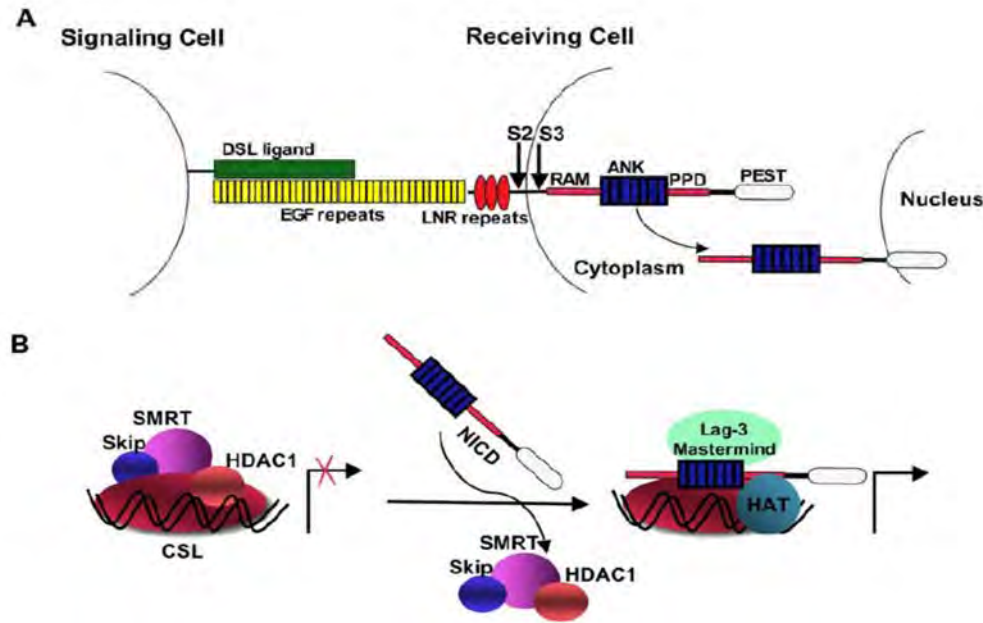


Figura 6. Vía de señalización Notch.

A) La activación del receptor es provocada por la unión del ligando DSL a las repeticiones EGF del receptor Notch, seguido por dos rompimientos proteolíticos (flechas S2 y S3) que liberan al DICN.

B) Representación del switch represor transcripcional. En ausencia del DICN, CSL se encuentra en un complejo con proteínas represoras transcripcionales. La unión del DICN a CSL o CBF1 permite el desplazamiento de los represores y el reclutamiento de activadores transcripcionales. Modificado de Lubman et al., 2007.

En el sistema nervioso, este complejo DICN-CSL es un activador transcripcional e induce la expresión de represores transcripcionales bHLH, como Hes1 y Hes5 (los más fuertemente caracterizados) y los genes Hey. Hes1 y Hes5 reprimen la expresión de genes proneurales y Dll1, de esta forma inhiben la diferenciación neuronal y el mantenimiento de las CTN (Ohtsuka et al., 1999; Hatakeyama et al., 2004; Kageyama et al., 2007).

En el mesencéfalo embrionario temprano de murinos, se expresan los miembros de la vía Notch (ver Tabla 1): receptores Notch1, 2, 3 y ligandos Dll1, Dll3, Dll4 y Jag1 (Lindsell et al., 1996; Kusumi et al., 2001). Se sabe que Notch1 y Notch2 son esenciales en roedores (Conlon et al., 1995; McCright et al., 2006) ya que producen letalidad temprana a los E10 y E10.5 respectivamente. Se ha observado la expresión de Notch1 en la PP del mesencéfalo, la pérdida de la expresión de Notch1 provocó el inicio prematuro de la neurogénesis a lo largo de la región cerebro medio-posterior del tubo neural (Lutolf et al., 2002). Notch2 también se expresa en el mesencéfalo excluyendo la PP, la pérdida de expresión de Notch2 está involucrado en el desarrollo de la PT del diencefalo y del mesencéfalo, provocando que éste centro organizador no se forme (Kadokawa y Marunouchi, 2002).

Los ligandos Dll1 y Dll3 son genes que se expresan desde el desarrollo temprano del ratón (Hrabe de Angelis et al., 1997; Benedito y Duarte, 2005); sin embargo solo Dll1 es esencial, ya que produce letalidad temprana a E12.5. Se expresa durante la gastrulación y organogénesis temprana, y durante el desarrollo del SNC en casi todo el tubo neural, incluyendo la PP mesencefálica (Bettenhausen et al., 1995). De manera interesante, a diferencia de otras regiones del cerebro, la PP del mesencéfalo que expresa Dll1 (Ono et al., 2007), se ha asociado con la peculiar actividad neurogénica de esta región (Hynes et al., 1995; Andersson et al., 2006a; Ono et al., 2007). Experimentos de mapa de destino han mostrado que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se originan de precursores dentro de la PP (Ono et al., 2007; Bonilla et al., 2008). Además, Dll1 podría jugar una función en el posicionamiento, mantenimiento y establecimiento de patrones de las neuronas dopaminérgicas.

La expresión de Dll3 en el SNC del ratón es temporal de E9 a E11 e incluye el mesencéfalo, pero no se expresa en la PP de esta región (Kusumi et al., 2001). Por otra parte los ligandos Jagged1 y Jagged2, no son esenciales para el desarrollo temprano del ratón y no se expresan en el SNC (Kiernan et al., 2006; Xu et al., 2010).

Dll4 está relacionado con el desarrollo vascular y arterial principalmente. Esta función ha sido relacionada con experimentos de pérdida y gane de función tanto

en humanos como en ratón y en pez cebra. Específicamente en ratón, experimentos de pérdida de función han mostrado que la haploinsuficiencia del ligando Dll4 es necesaria para el establecimiento de patrones de arterias durante el desarrollo (Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004; Krebs et al., 2004).

Miembro Vía Notch	Expresión en el mesencéfalo embrionario	PP	Fenotipo	Cita
N1	Si	Si	Letal E10. Alteraciones diversas en el embrión, hemorragias en el SNC	Conlon et al., 1995
N2	Si	No	Letal E10.5. Placa del techo alterada en diencefalo y mesencéfalo	Kadokawa y Marunouchi, 2001
N3	Si	No	Viable	Kitamoto et al., 2005
N4	No	No	Viable	Krebs et al., 2000
Dll1	Si	Si	Letal E12.5 Alteraciones diversas en el embrión, hemorragias en el SNC	Hrabe de Angelis et al., 1997; Ono et al., 2007
Dll3	Si	no	Viable	Kusumi et al., 2001
Dll4	No	no	Requerido para el desarrollo vascular	Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004; Krebs et al., 2004
J1	No	No	Viable. Desarrollo del oído	Kiernan et al., 2006
J2	No	No	Letal hasta el nacimiento. Malformidades en extremidades y craneofaciales	Xu et al., 2010

Tabla 1. Patrones de expresión de receptores y ligandos de la vía Notch en murinos

El bloqueo de esta vía a diferentes niveles provoca diferenciación prematura de las CPN ocasionando una reducción en el número y la gama de tipos celulares tardíos (Kageyama y Ohtsuka, 1999; Hatakeyama et al., 2004). De esta forma, la señal de Notch es un componente esencial de los mecanismos que permiten la producción de la diversidad de tipos celulares que forman las complejas estructuras del cerebro, aparentemente de células neurales equivalentes. A pesar de lo anterior, se sabe muy poco sobre el papel de la señalización de Notch en la generación de regiones específicas del cerebro y de tipos específicos de neuronas.

II.- ANTECEDENTES

Muchos desórdenes neurológicos son asociados con el mal funcionamiento o la degeneración de tipos particulares de neuronas. En la Enfermedad de Parkinson (EP), las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo son las afectadas (Vogt Weisenhorn et al., 2016). Ésta enfermedad neurodegenerativa es el segundo desorden más común, después de la Enfermedad de Alzheimer (Xu et al., 2017) y es en la cual nos enfocaremos en este trabajo.

La causa exacta que provoca la EP es desconocida hasta el momento (Aaseth et al., 2018; Surmeier, D.J., 2018), por esta razón las estrategias a seguir para el tratamiento de esta enfermedad son básicamente aliviar los síntomas y conferir neuroprotección mediante el uso de fármacos como levodopa, agonistas de la dopamina, anticolinérgicos (Sarkar et al., 2016; Rizek et al., 2016); terapias alternativas como la fisioterapia, terapia de lenguaje, ejercicio, terapia ocupacional (Sarkar et al., 2016; Rizek et al., 2016), tratamientos quirúrgicos como la estimulación profunda del cerebro (Gokbayrak et al., 2014), gel intestinal levodopa-carbidopa (Lopiano et al., 2016); terapias de reemplazo celular (Li et al., 2016; Stoker y Barker, 2018; Man et al., 2018); y más recientemente terapia génica (Valdés y Schneider, 2016; Stoker y Barker, 2018; Man et al., 2018).

El tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas por modulación química de células existentes no es satisfactoria, a veces, porque algunos tipos de neuronas se pierden. Por esta razón, el trasplante celular es una estrategia prometedora para

mejorar las funciones neurales. Uno de los retos en este campo es generar grandes cantidades de neuronas específicas *in vitro*. Sin embargo esos métodos no son lo suficientemente eficientes para generar tipos neuronales requeridos, porque los factores de crecimiento inducen la expresión de un gran grupo de genes de varias vías de señalización.

Se reportó el primer caso de un paciente, el cual recibió un trasplante unilateral de tejido mesencefálico ventral 24 años antes de su muerte. Los resultados post-mortem identificaron los 3 injertos en el putamen dorsal, sin embargo aproximadamente el 24% de neuronas que contenían gránulos de neuromelanina no tuvieron inmunoreactividad detectable de Th, sugiriendo la represión de la Th. El paciente mostró mejoría clínica por al menos una década después del trasplante. Después de un cuarto de siglo, la inervación seguía siendo evidente, inclusiones α -sinucleína-positivas (algunas con la aparición de cuerpos de Lewy típicos) estaban presentes en el 11-12% de las neuronas dopaminérgicas injertadas, lo que refleja la propagación de la patología desde el cerebro del huésped hasta el trasplante. Las mejoras clínicas se perdieron gradualmente a partir de 14 años tras el trasplante, lo que indica que incluso la reinervación dopaminérgica derivada de un injerto extenso pierde su eficacia en un cerebro gravemente degenerado (Li et al., 2016).

En cuanto a terapia génica, se realizó un estudio al azar, doble ciego, utilizando una combinación de genes para ácido glutámico descarboxilasa (GAD65 y GAD67), mediante la liberación de un vector viral adenoasociado-2 (AAV2) en el núcleo subtalámico bilateral. La meta terapéutica fue la transformación de la modulación glutamatérgica a GABAérgica que permitiera regular la actividad neuronal en el núcleo subtalámico y, de esta manera, mejorar las características motoras de la EP. Los pacientes fueron analizados por 12 meses mediante análisis de PET y mostraron mejoría según la escala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) comparados con el grupo control (Niethammer et al., 2017). Sin embargo, los resultados todavía no son concluyentes debido a que no se han podido evaluar en un tiempo prolongado.

Las investigaciones relacionadas con el reemplazo celular se enfocan en analizar los factores involucrados en la generación de tipos celulares específicos y en elucidar mecanismos moleculares que regulan la proliferación y diferenciación de las CTN. Su autorrenovación y su capacidad de diferenciar en muchos tipos celulares, las hacen herramientas invaluable para explotarlas como agentes terapéuticos en medicina regenerativa.

La vía Notch se ha estudiado en las CTN porque existe evidencia de que regula el mecanismo molecular del balance entre el mantenimiento y la diferenciación (Gaiano y Fishell, 2002; Yoon y Gaiano, 2005; Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006, Imayoshi et al., 2010; Zhang et al., 2018; Cheung et al., 2018). La habilidad de formar neuronas continuamente durante el desarrollo, depende del balance coordinado entre el mantenimiento de las CTN y la diferenciación. Por un lado, el mantenimiento incompleto y la diferenciación neuronal prematura pueden agotar el grupo de CTN y, consecuentemente, reducir el suministro de nuevas neuronas. Por otro lado, incrementar el mantenimiento de las CTN a expensas de la propia diferenciación, podría perjudicar la habilidad de las CTN para generar un número suficiente de nuevas neuronas.

a.- Notch y el mantenimiento del estado indiferenciado

La activación de la señal de Notch induce la expresión de genes represores de la transcripción como la familia Hes (Ohtsuka et al., 1999; Hirata et al., 2001; Hatakeyama et al., 2004; Kageyama et al., 2007, 2008; Kameda et al., 2011) y Hey (Leimeister et al., 1999), mediante la unión a secuencias blanco en el ADN (ejemplo: Mash1, Ngn2, Hes1) y reclutando co-represores para evitar la transcripción de genes proneurales y el mantenimiento de células troncales y progenitoras. Esta función es, tal vez, la mejor estudiada de la vía Notch. Se ha estudiado tanto en cerebros en desarrollo como en cerebros adultos y se ha encontrado que Notch es necesario para el mantenimiento de las CTN y para el propio control de la neurogénesis en ambas etapas (Imayoshi et al., 2010). La sobreexpresión de los genes Hes en embriones de ratón, inhiben la neurogénesis y mantiene a las CTN (Ishibashi et al., 1994; Ohtsuka et al., 2001). Por el contrario, en el ratón knock-out

de Hes1, la expresión de genes proneurales como Mash1 se activan y la neurogénesis se acelera (Ishibashi et al., 2015). Sin embargo, aunque la expresión de Hes5 se active, los defectos son relativamente leves en el ratón Hes1^{-/-}. En los dobles mutantes Hes1/Hes5, los defectos son más severos que en el mutante Hes1, aunque todavía permanecen muchas CTN en el sistema nervioso en desarrollo, sugiriendo que Hes3 compensa los defectos hasta cierto punto (Ohtsuka et al., 1999). En contraste, en los triples mutantes Hes1/Hes3/Hes5, a pesar de que se siguen formando las células neuroepiteliales hasta el día E8, no se logran mantener y diferencian prematuramente en neuronas de tipo temprano y las CTN se agotaron sin permitir la formación de tipos celulares tardíos. También se observó que genes proneurales como Mash1 y Ngn2 se sobreactivaron (Hatakeyama et al., 2004). En estos mutantes, todas las células comienzan a ser neuronas en la médula espinal en desarrollo a los E10, indicando que Hes1, Hes3 y Hes5 son responsables del mantenimiento de todas las CTN en esta región (Hatakeyama et al., 2004). De esta forma, los genes Hes son esenciales para la generación de toda la diversidad de tipos celulares mediante el mantenimiento de las CTN hasta estados tardíos.

Un mecanismo que se ha asociado con el mantenimiento de los progenitores en el SNC en desarrollo son las oscilaciones de genes proneurales. Se ha observado que los genes proneurales y Delta1 son expresados en un patrón de “sal y pimienta” antes del nacimiento de las neuronas (Kageyama et al., 2008; Kawaguchi et al., 2008; Kageyama et al., 2009; Barton y Fendrik., 2013). Después de la activación de la transcripción de Hes1 por la señal de Notch, la proteína Hes1 reprime su propia expresión mediante la unión directa a las secuencias de la caja-N de su propio promotor (Hirata et al., 2000). Los productos del gen Hes1, tanto el mRNA y la proteína, son muy inestables, con un tiempo de vida media de aproximadamente 20 min y después desaparecen rápidamente, indicando que su autorrepresión es corta y temporal. La desaparición de la proteína Hes1 permite la siguiente ronda de expresión.

En CTN, Hes1 reprime la expresión de genes proneurales, moléculas de la vía Notch y reguladores del ciclo celular (Kobayashi y Kageyama, 2014). Imágenes en

tiempo real han mostrado que tanto Ngn2 como Dll1 se expresan de manera oscilatoria en las CTN. Estas oscilaciones son específicas en CTN indiferenciadas y no se observan en neuronas diferenciadas. Ngn2 activa la expresión de Dll1, la cual activa Hes1 vía la señal de Notch en células vecinas para reprimir la expresión de Ngn2 y Dll1 y, de esta manera, mantener el estado indiferenciado. La expresión de Ngn2 comienza a ser sostenida cuando la expresión de Hes1 se reprime, de esta forma se promueve la diferenciación neuronal (Fig. 7).

Lo que estos resultados sugieren es que la oscilación de Hes1 regula las oscilaciones de Ngn2 y Dll1, lo cual provoca el mantenimiento de los progenitores por activación mutua de la señal de Notch (Shimojo et al., 2008; Kobayashi et al., 2009; Shimojo et al., 2011; Shimojo et al., 2016; Kageyama et al., 2018).

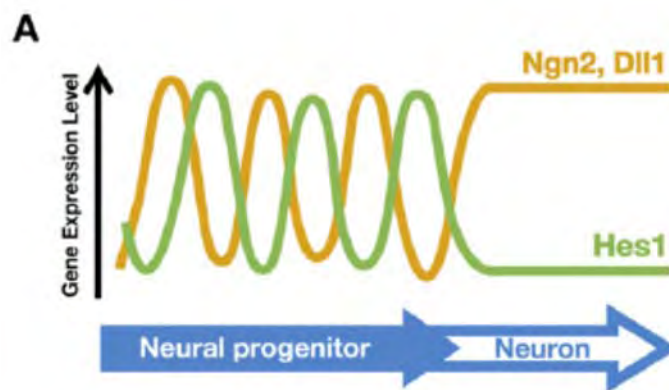


Figura 7. Modelo de las oscilaciones en la señal de Notch.

Los niveles tanto de Hes1, Ngn2 y Dll1 son oscilatorios en progenitores neurales. En neuronas postmitóticas inmaduras, Hes1 es reprimido, mientras que Ngn2 y Dll1 son activados de manera sostenida. Tomado de Shimojo et al., 2008.

b.- Notch y la diferenciación de células troncales neurales

Durante la fase de neurogénesis en el desarrollo del cerebro, solo una población de CPN diferencia a neuronas, porque otro grupo de células permanece en estado indiferenciado. La proporción de células que diferencian y las indiferenciadas es clave para determinar el tipo y número correcto de neuronas producidas en cada estado de desarrollo. Se ha acumulado evidencia que sugiere que no solo el

mantenimiento de la pluripotencia, sino también la diferenciación de progenitores hacia un linaje comprometido de CTPs, es regulado por la interacción de factores de transcripción llamados reguladores de la troncalidad, por ejemplo Oct4, Sox2, Nanog, Notch (Boyer et al., 2005; Halder et al., 2015).

Recientemente se identificó que la activación temprana de la vía Notch es una característica común en los inductores más potentes de diferenciación neural (Teratani-Ota et al., 2016). Se analizaron los cambios en el perfil de expresión de 185 genes que codifican para factores de transcripción involucrados en diferenciación neural. Para encontrar factores tempranos que controlen la diferenciación de CTE hacia destinos neurales, enriquecieron el cultivo con PSA-NCAM durante la fase de diferenciación. De entre más de los 500 genes analizados con la más alta covarianza, dos de cada tres categorías en la base de datos Gene Ontology estuvieron asociadas con la vía de señalización Notch. Los genes asociados con la vía Notch incluyeron: *Dll1*, *Dll3*, *Dll4*, *Hes5*, *Heyl*, *Dner*, *Ascl1*, *Neurod4*, *Nrarp*, *Bmp2*, *Trp63*, *Mnfg*, *Lfng* y *Aph1b/c*. Adicionalmente, se enfocaron en aquellos factores de transcripción que se activaron en tipos celulares específicos y se encontró que *Ascl1*, *Smad7*, *Nr2fl*, *Dlx2*, *Dlx3*, *Nr2f2*, *Barhl2* y *Lhx1* fueron factores de transcripción que promovieron la generación hacia el linaje GABAérgico. Así mismo, *Lmx1a* y *Nr4a2* fueron los inductores de neuronas dopaminérgicas y *Fezf1*, *Isl1* y *St18* fueron los inductores de neuronas colinérgicas (Teratani-Ota et al., 2016). Por lo anterior, se sugiere que la vía Notch podría ser un factor crucial temprano que facilita la diferenciación de CTEs hacia destinos neurales.

La vía de señalización Notch también ha sido implicada en la selección de progenitores neurales. Al analizar los perfiles de expresión génica global en telencéfalos embrionarios, se observó que los patrones de expresión de *Dll1*, el ligando de Notch y la forma activa de Notch1 fueron mutuamente excluyentes y segregados en distintas poblaciones de progenitores: los progenitores apicales mostraron una señal fuerte de *Dll1* que se desvaneció a medida que las células migraban de la ZV y ésta atenuación indujo inmediatamente la diferenciación de los progenitores apicales en progenitores basales (Kawaguchi et al., 2008).

Los patrones de expresión de Dll1 y Notch son mutuamente excluyentes y segregados en distintas poblaciones en la ZV del telencéfalo embrionario. En experimentos de sobreexpresión y delección condicional de Dll1, se encontró que diferentes niveles de expresión de Dll1 pueden determinar la proporción de células diferenciadas entre CPNs mediante interacciones célula-célula. En particular, la delección de Dll1 en una pequeña proporción de CPN fue un prerrequisito para la diferenciación neuronal, lo que estos resultados sugieren es que el mecanismo de inhibición lateral de Notch en el cerebro en desarrollo contribuye a la selección de la diferenciación celular entre CPN no comprometidas (Kawaguchi et al., 2008).

Esta función de Notch de seleccionar entre distintos tipos celulares también ha sido observada en el cerebro posterior y la médula espinal. A diferencia de escoger entre CPN no comprometidas, la vía de señalización de Notch también ha mostrado tener influencia entre células que están comprometidas hacia un linaje específico, por ejemplo entre interneuronas V2b y V2a. En un trabajo realizado por Brown y colaboradores, elaboraron un protocolo de diferenciación de interneuronas V2a de células troncales embrionarias de ratón. La señal de Notch, la cual influye en el compromiso de células progenitoras p2 a interneuronas V2a o V2b, fue inhibida con DAPT en cultivos celulares para incrementar el porcentaje de interneuronas V2a. La expresión de Gata3, un marcador de interneuronas V2b, fue significativamente reprimida mientras que la expresión de Chx10, un marcador de interneuronas V2a, fue activada después de la adición de 5 μ M de DAPT al medio de inducción. La citometría de flujo mostró que la adición de DAPT incrementó casi 8 veces las células Chx10+. Estos resultados confirman que la inhibición de la señal de Notch1 incrementa el compromiso de V2a sobre V2b (Brown et al., 2014); lo cual sugiere que la vía de señalización Notch juega un papel en la determinación de tipos celulares específicos.

En otro estudio se analizó la interacción de distintas vías involucradas en la neurogénesis (Wnt/ β -catenina, Notch y Shh), mediante el uso de pequeñas moléculas sintéticas inductoras de la neurogénesis en un cultivo celular al cual previamente se le inhibió la troncalidad. Cultivo de células P19 fueron transducidas

con la proteína Skp (un inhibidor de Sox2) e incubadas con Nz (neurodazina) o NzI (neurodazola), ambas moléculas inductoras de la neurogénesis. Las células P19 fueron selectivamente convertidas a neuronas que generaron depolarización inducida por sodio y potenciales de acción, lo cual indicó que las neuronas producidas fueron electrofisiológicamente activas. Los resultados de las inmunohistoquímicas, junto con el análisis del transcriptoma concluyeron que la combinación de Skp con inductores de la neurogénesis, aumentó la activación de las vías Wnt y Notch, mientras que no ocurrieron cambios significativos en genes de la vía Shh. Así, las vías de señalización Wnt y Notch están principalmente involucradas en promover diferenciación neuronal general a través de Nz o NzI en células P19 transducidas con Skp (Halder et al., 2015).

Otra estrategia de cultivo que se ha utilizado para analizar la función de Notch es el uso de neuroesferas, las cuales son agregados enriquecidos con CPN. Se examinó la función de la señalización de Notch en la generación de neuronas y glía mediante la elaboración de neuroesferas provenientes de telencéfalos de embriones mutantes *Dll1^{lacZ/lacZ}*. Con éste método se logró obtener más del 50% de células que expresaban MAP2 después de 48 horas de cultivo en poliornitina, lo que significa que las neuronas fueron el mayor tipo celular generado (Grandbarbe et al., 2003). Este incremento en neuronas tuvo lugar a expensas del linaje glial, como evidencia la disminución de células GFAP+ y PDGFR+ que marcan astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos respectivamente. Se concluyó que la señal de Notch juega un papel importante en la diferenciación de los linajes de las CTN, sin embargo en este trabajo tampoco se analizaron subtipos de neuronas específicas.

c.- Notch y la diferenciación hacia linaje dopaminérgico

Se examinó el efecto de diferentes inhibidores de la γ -secretasa en la vía de señalización Notch y, particularmente, se evaluó el impacto de dos moléculas pequeñas, el compuesto E ($C_{27}H_{24}F_2N_4O_3$) y DAPT ((2S)-N-[(3,5-Difluorofenil) acetil]-L-alanil-2-fenil] glicina 1,1-dimetiletil éster) en la diferenciación de neuroesferas y la maduración de tejido nervioso generado mediante ingeniería

(ENT: engineered nervous tissue). Con este protocolo generaron tejido nervioso de vida larga que contiene neuronas dopaminérgicas maduras de hPSCs (Células Troncales Pluripotentes Humanas) con características morfológicas A9 típicas. (Tieng et al., 2014). La estrategia de cultivo 3D después de 1 semana, generó ~80% de células que expresaron marcadores de la PP como FoxA2 y Lmx1a, y más del 60% de células fueron Th+ y la mayoría co-expresó Nurr1 y FoxA2. Sin embargo el número de células Th+ disminuyó del 60% al 30% después de una semana de cultivo, cuando se usaron para generar ENT. Los inhibidores de la γ -secretasa fueron agregados al cultivo en suspensión entre los días 10 y 21, durante la formación de ENT, encontrándose que el compuesto E fue más eficiente que el DAPT para generar neuronas dopaminérgicas.

Aun cuando las estrategias para aminorar los síntomas de la EP son muy variadas, todavía falta mucho conocimiento de los factores involucrados en las vías de señalización que interactúan en la generación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. En particular, se conoce muy poco acerca del papel de la señalización de Notch en el control de la neurogénesis dopaminérgica y el número de neuronas dopaminérgicas producidas.

Ya que tanto el ligando Dll1 y Notch1, los miembros de la vía canónica, se expresan en la PP mesencefálica; y ya que la PP de esta región es donde se generan los precursores mDA, es posible que la vía Notch influya de alguna manera en la especificación y/o el desarrollo de las neuronas DA mesencefálicas. Por lo tanto, proponemos estudiar si la ausencia de la vía de Notch, específicamente en un ratón nulo en Deltalike-1, repercute durante la generación del linaje dopaminérgico mesencefálico ventral.

Por lo anterior, proponemos la siguiente hipótesis y objetivos.

III.- HIPÓTESIS

“El ligando Deltalike-1 está involucrado en la especificación y/o diferenciación de las células precursoras neurales mesencefálicas de ratón”.

IV.- OBJETIVOS

a.- Objetivo general

Caracterizar a nivel celular la expresión de genes de especificación y diferenciación neuronal en el mesencéfalo de embriones nulos en *Dll1*.

b.- Objetivos particulares

- Analizar la expresión de proteínas y mRNA de precursores neurales generales (*Nestina*, *Msx1*, *Sox1/2*, *Mash1*, *Nurr1*, *Ngn2*), en cultivo de explantes y cortes de mesencéfalos embrionarios de ratones *Dll1*^{-/-}.
- Analizar la expresión de proteínas y mRNA de precursores dopaminérgicos (*Lmx1a*, *Nkx6.1*, *Foxa2*) en cultivo de explantes y cortes de mesencéfalos embrionarios de ratones nulos en *Dll1*.
- Analizar la expresión de proteínas y mRNA de diferenciación neuronal general (β III-tubulina, *NeuN*, *MAP2*, *GFAP*) en cultivo de explantes y cortes de mesencéfalos embrionarios de ratones nulos en *Dll1*.
- Analizar la expresión de proteínas y mRNA de diferenciación dopaminérgica mesencefálica (*Th*, *Pitx3*, *Dat*, *Vmat*) en cultivo de explantes y cortes de mesencéfalos embrionarios de ratones nulos en *Dll1*.
- Generar y analizar la capacidad neurogénica de neuroesferas provenientes de mesencéfalos embrionarios de ratones nulos en *Dll1*.

V.- METODOLOGÍA

La estrategia experimental consistió en el análisis de cortes de mesencéfalos embrionarios de ratón a distintas etapas de desarrollo, del cultivo de explantes y del cultivo de neuroesferas.

a.- Mantenimiento de la línea transgénica de ratón *Dll1^{+lacZ}*

La línea *Dll1^{+lacZ}* de ratón en el fondo genético CD1 fue donado por el Dr. Oliver Pourquie del Stowers Institute for Medical Research and Howard Hughes Medical Institute. La mutación resultó del reemplazamiento del exón1 por el gene lacZ en el marco de lectura, como describe Hrabé de Angelis y colaboradores (Hrabé de Angelis et al., 1997). El alelo mutado se mantiene en el estado heterocigoto, debido a que los ratones homocigotos *Dll1^{lacZ/lacZ}* mueren en el día embrionario (E) 12.5 aproximadamente, antes que la gliogénesis comience.

Los cebadores que se utilizaron para genotipificar son los siguientes: Dll80 GTTGCACCACAGATGAAACGC y Dll82 AAGCCAGACGAAGAGGAAACCG los cuales detectan un fragmento de 673 pares de bases indicativo del alelo mutado; Dll82 y WT2 TTGGGGATGGACAGCTGATCG los cuales detectan un fragmento de 373 pares de bases indicativo del alelo silvestre.

b.- Genotipificación de los embriones

Para determinar el genotipo de cada ratón se realizó la extracción del ADN a partir de un extremo de la cola en el caso de animales adultos, o bien, parte de la región posterior del cuerpo en el caso de los embriones. Después de obtener el ADN genómico de cada individuo, se determinó el genotipo de los animales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando las siguientes condiciones: 95°C/3', 95°C/30'', 57°C/30'', 72°C/1' por 40 ciclos, 72°C/10').

c.- Análisis de la expresión del gen reportero

El ratón nulo en Dll1 contiene una secuencia del gen lacZ que codifica para la enzima β-galactosidasa. X-gal es un compuesto que es hidrolizado por la β-galactosidasa a

galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol. Este último es oxidado a 5-5'-dibromo-4,4'-dicloro índigo, un compuesto azul insoluble. De esta forma X-gal se utilizó para visualizar la expresión indirecta de la proteína Dll1. Después de disectado el embrión se lavó con PBS frío y se fijó con formaldehído al 2% x 2 hr, posteriormente se enjuagó 3 veces con PBS 1x. Se tiñó el embrión con x-gal: 40 mg/ml disuelto en dimetilformamida por 15 min aproximadamente hasta que comenzó la tinción y se detuvo para evitar la saturación de la misma. Se enjuagó con PBS 3 veces por 10 min y se almacenó.

d.- Cultivo de explantes en colágena

Los explantes de cerebro medio se realizaron como describe Baizabal y Covarrubias (Baizabal y Covarrubias, 2009). Brevemente, los explantes de mesencéfalo se obtuvieron de ratones silvestre y *Dll1^{lacZ/lacZ}* de E10.5, se disectó la parte anterior del mesencéfalo hasta el labio rómbico, posteriormente se cortó la línea media dorsal del explante y el tejido se embebió en una matriz de colágena con la superficie ventricular expuesta hacia arriba. La mezcla de colágeno contuvo: colágeno de rata (100 μ l; donado por el Dr. Alfredo Varela-Echavarría), 1.5 M de NaCl (10 μ l), 7.5% de NaHCO₃ (10 μ l) y medio cultivo de explantes (300 μ l). El medio de cultivo de explantes estuvo compuesto de Optimem con Glutamax (7.2% v/v), DMEM-F12 (25% v/v) de GIBCO, glucosa 2M (2% v/v) de SIGMA, los explantes se incubaron a 37°C por 1 h para permitir la polimerización de la colágena. Posteriormente se añadió el medio de cultivo hasta cubrir los explantes. Los explantes se mantuvieron a 37°C en 5% de humedad, 95% de CO₂ por 7 días.

e.- Procedimiento para generar neuroesferas embrionarias primarias

Las neuroesferas fueron preparadas como describe Grandbarbe et al., 2003: mesencéfalos de embriones (E10.5) se disectaron y disociaron mecánicamente en un medio de cultivo de neuroesferas libre de suero fetal bovino (SFB), el cual estuvo formado por DMEM:F12 (1:1) suplementado con 25 μ g/ml de insulina, 100 μ g/ml de transferina, 20 nM de progesterona, 60 μ M de putrescina, 30 nM de selenita de

sodio, 2 μ M de heparina, glutamax y 20 ng/ml de EGF. Las células se disociaron y depositaron en cajas de 24 pozos, los cultivos se incubaron por 7 días para generar neuroesferas primarias. Para la subsecuente expansión, las neuroesferas se disociaron mecánicamente y químicamente con tripsina al 0.1%. Se generaron neuroesferas secundarias que se crecieron en medio fresco por 3 días.

f.- Procedimiento para la diferenciación de las neuroesferas

Las neuroesferas secundarias fueron transferidas a cajas de 20 pozos cubiertas con poli-D-lisina (4 μ g/ml) y laminina (5 μ g/ml) y cultivadas en medio de cultivo de neuroesferas sin factores de crecimiento con 2 ng/ml de EGF y con 10% de SFB. Para incrementar la supervivencia de las neuroesfera mutantes, la diferenciación de los cultivos no excedió los 3 días (Grandbarbe et al., 2003).

g.- Procesamiento del tejido e inmunofluorescencia

El cultivo de explantes y los cortes de tejido de mesencéfalo se procesaron como describe Baizabal y Covarrubias, 2009. Todas las secciones coronales analizadas fueron perpendiculares a la tangente cerca del punto medio a la flexura mesencefálica y a aquellas que mostraban el neuroepitelio ventral completo. Por lo tanto, el área externa anterior y mesencefálica posterior fueron excluidas. Las secciones de tejido fueron incubadas con la mezcla apropiada de anticuerpos (Tabla 2). Para determinar la proliferación celular activa, los ratones gestantes fueron inyectados con 50 μ l de BrdU (50 μ g/ μ l; Sigma-Aldrich) 1 h antes de sacrificar; la incorporación de BrdU fue detectada por inmunofluorescencia. Por otro lado, el ensayo de TUNEL (Roche) fue usado para detectar células apoptóticas en secciones de cerebro de embriones.

Las preparaciones fueron coteñidas con DAPI (1:10,000; Invitrogen) y analizadas para inmunofluorescencia usando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 y un microscopio Zeiss Apotome Axio Observer ZI.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Origen
Anti-Nestina	Ratón	1:500	Chemicon
Anti-NeuN	Ratón	1:100	Chemicon
Anti-Nkx6.1	Ratón	1:2	Developmental Studies Hybrydoma Bank
Anti-Nkx2.2	Ratón	1:2	Developmental Studies Hybrydoma Bank
Anti- β III tubulina	Conejo	1:1000	Covance
Anti-GFAP	Conejo	1:250	Dako
Anti-TH	Conejo	1:500	Chemicon
Anti-Lmx1a	Conejo	1:100	Donado por Dr. Michael German, UCSF E.U.
Anti-Foxa2	Conejo	1:8000	Donado por Dr. Ariel Ruiz I. Altaba, University of Geneve Medical School.
Anti-Otx2	Conejo	1:3000	Millipore
Anti-5-HT	Rata	1:200	Millipore
Anti-BrdU	Ratón	1:100	BD Biosciences
Anti-ratón IgGs acoplada a AlexaFluor 488	Cabra	1:1000	Molecular Probes
Anti-conejo IgGs acoplada a AlexaFluor 594	Cabra	1:1000	Molecular Probes
Anti-rata IgGs acoplada a AlexaFluor 647	Cabra	1:1000	Molecular Probes

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados

h. PCR en tiempo real cuantitativa

El ARN total fue extraído con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El cerebro medio ventral (definido como un cuarto del mesencéfalo alrededor de la línea media) de embriones fue disectado y agrupado para la extracción del ARN de, al menos, dos camadas en cada estado de desarrollo probado. No se usaron mesencéfalos individuales por los rápidos cambios que ocurren en la expresión de genes en esta ventana de tiempo y por el bajo rendimiento de ARN. Para los explantes, 3 explantes de mesencéfalo de cada condición y/o estado de cultivo fueron colectados por experimento; al menos dos experimentos se realizaron por condición y/o estado de cultivo. La primera cadena de cDNA fue sintetizada usando AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) y el cebador oligo-dT₁₆. La RT-PCR fue realizada usando la mezcla KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystem) en presencia de cebadores específicos (Tabla 3) y el termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). La expresión del gen fue evaluada usando el método $\Delta\Delta C_t$. El gen constitutivo Rplp0 se utilizó para normalizar los niveles de expresión.

i. Análisis cuantitativos

Los datos están basados en 3 experimentos independientes, en los cuales un promedio de 3 muestras con el mismo tratamiento se analizaron por experimento. Para la cuantificación de los explantes y de las secciones de tejidos se analizó un solo plano óptico independiente, dentro de los planos apilados. La cuantificación es el promedio del porcentaje de células positivas para un marcador dado, en al menos 3 tejidos diferentes. Los asteriscos identifican grupos experimentales que son significativamente diferentes del grupo control mediante una prueba-t. Se consideran significativas las diferencias si los valores de P son menores de 0.05. Los resultados se expresan en porcentaje del total de células teñidas con DAPI. Las gráficas se muestran como media \pm desviación estándar.

Gene	Sequence
<i>Dat</i>	Forward: CATTGCCACATCCTCCATGG Reverse: TAGGCCAGTTTCTCTCGGAA
<i>Dll1</i>	Forward: TCAGATAACCCTGACGGAGGC Reverse: AGGTAAGAGTTGCCGAGGTCC
<i>Dll3</i>	Forward: GATGCCTTTTACCTGGGCCTG Reverse: ATCGAAGCCCGTAGAATCCC
<i>Dll4</i>	Forward: CAGTTGCCCTTCAATTCACCT Reverse: AGCCTTGGATGATGATTTGGC
<i>Foxa2</i>	Forward: CTGGGAGCCGTGAAGATGGA Reverse: ATTCCAGCGCCCACATAGGA
<i>Hes1</i>	Forward: TGAAGGATTCAAAAATAAAATTCTCTGGG Reverse: CGCCTCTTCTCCATGATAGGCTTTGATGAC
<i>Hes5</i>	Forward: AGATGCTCAGTCCCAAGGAG Reverse: TAGCCCTCGCTGTAGTCCTG
<i>Lmx1a</i>	Forward: GGACCATAAGCGACCCAAAC Reverse: CTGAACCACACGGACACTC
<i>Map2</i>	Forward: TTCTTTTGCTTGCTCGGGATT Reverse: ATACAGGGCTTGGTTTATTTTCAGAGA
<i>Msx1</i>	Forward: GCCTCTCGGCCATTTCTCAG Reverse: CGGTTGGTCTTGTGCTTGCG
<i>Msx2</i>	Forward: CTCGGTCAAGTCGGAAAATTC Reverse: GTTGGTCTTGTGTTTCCTCAG
<i>Nestin</i>	Forward: TGAGAACTCTCGCTTGCAGACAC Reverse: GGTCTCTGGTATCCCAAGGAAATG
<i>NeuN</i>	Forward: CCTCTCGCGCCCCTTG Reverse: AGCACTAGGTTCTCACAGGC
<i>Ngn2</i>	Forward: GCTGTGGGAATTTACCTGT Reverse: AAATTTCCACGCTTGCATTC
<i>Notch1</i>	Forward: CCCTTGCTCTGCCTAACGC Reverse: GGAGTCCTGGCATCGTTGG
<i>Notch2</i>	Forward: GCAGGAGCAGGAGGTGATAG Reverse: GCGTTTCTTGGACTCTCCAG
<i>Nurr1</i>	Forward: TCAGAGCCCACGTCGATT Reverse: TAGTCAGGGTTTGCCTGGAA
<i>Pitx3</i>	Forward: GGAATCGCTACCCTGACATGAG Reverse: TGAAGGCGAACGGGAAGGTCT
<i>Rplp0</i>	Forward: CACTGGTCTAGGACCCGAGAA Reverse: AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT
<i>Sox1</i>	Forward: GGCCGAGTGGAAGGTCATGT Reverse: TCCGGGTGTTCCCTTCATGTG
<i>Sox2</i>	Forward: CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG Reverse: CCAACGATATCAACCTGCATGG
<i>Tau</i>	Forward: TTCTGTCCTCGCCTTCTGTC Reverse: CGGCTTTTAAGCCATGGTCC
<i>Th</i>	Forward: TGGGACACGTACCCATGTTG Reverse: ACCAGTACACCGTGGAGAGT
<i>Vmat2</i>	Forward: GCGAGCATCTTATCTCATTGG Reverse: AAATGCTGATCCCAACAACACTATCA
<i>β3-Tubulin</i>	Forward: ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG Reverse: ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG

* All primers were tested for specificity and efficiency before use

Tabla 3. Oligonucleótidos para RT-PCR* (Trujillo-Paredes et al., 2016)

VI.- RESULTADOS

a.- Dll1 y Hes5 son mediadores de la señal de Notch en el nicho dopaminérgico mesencefálico

La distribución del transcrito de Dll1 en el mesencéfalo en desarrollo ha sido determinado previamente por *hibridación in situ*; sin embargo, probablemente debido a las limitantes cuantitativas de esta técnica, el patrón de expresión no ha sido bien definido, mostrando una distribución dispersa con un aparente alto número de células positivas hacia el área subventricular (Kele et al., 2006; Deng et al., 2011). En este trabajo, estimamos la distribución del transcrito de Dll1 por determinación *in situ* de la actividad de *lacZ* en embriones de ratón *Dll1^{+/LacZ}*, particularmente al inicio de la diferenciación dopaminérgica. En el mesencéfalo de embriones E10.5 y E11.5, la expresión de Dll1 ocurrió principalmente en el área subventricular con los niveles más altos en la mitad ventral. Particularmente en el nicho dopaminérgico a los E10.5, la PP mostró una delgada capa de células teñidas con *lacZ* justo debajo del epitelio ventricular, el cual contrasta con el patrón del cerebro posterior (Fig. 8A). En mesencéfalos E11.5, un área subventricular más amplia de expresión de Dll1 se encontró alrededor de la línea media ventral, correspondiente a la localización de progenitores intermediarios (Fig. 8A).

También se analizó el mRNA de miembros de la vía de Notch. A los E11.5, el mesencéfalo ventral contuvo altos niveles de mRNA de Dll1 más que de Dll3 o Dll4, mientras que Notch1 y Notch2 fueron similares (Fig. 8B). Para determinar cómo Dll1 es responsable para la mayoría de la señalización de Notch que ocurre en la PP del mesencéfalo en asociación con la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, comparamos los niveles de expresión de dos genes efectores de Notch; Hes1 y Hes5, en el mesencéfalo ventral de ratones de E11.5 que pierden la señal de Dll1. Tanto Hes1 y Hes5 fueron expresados en muestras silvestres, pero Hes5 fue aparentemente 100 veces más abundante que Hes1 (Fig. 8B). La ausencia completa de los niveles de Dll1 causó una reducción de 30 veces la expresión de Hes5, mientras que la expresión de Hes1 solo fue parcialmente afectada (Fig. 8C). De acuerdo con esta conclusión, la represión del desarrollo de la expresión de Dll1

de E11.5 a E15.5 fue mejor correlacionada con los niveles de expresión de Hes5 (Fig. 8B). Por lo tanto, Dll1 y Hes5 son los mediadores río arriba de la señal de Notch en el mesencéfalo ventral en desarrollo.

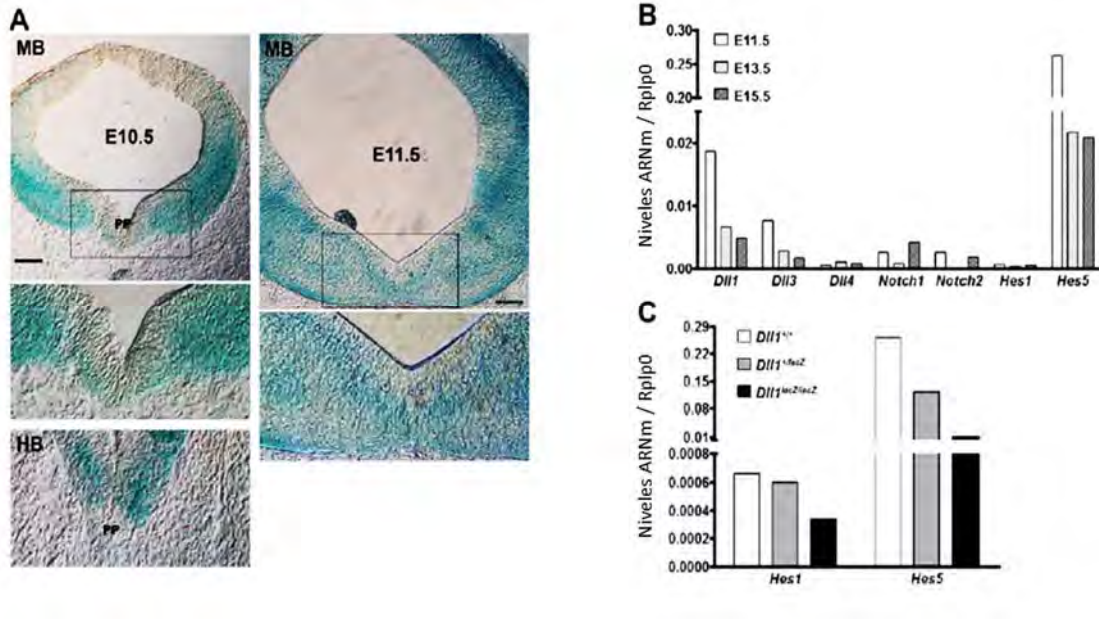


Figura 8. Señalización Dll1-Notch en el nicho dopaminérgico mesencefálico.

A) Cerebro medio (MB) o cerebro posterior (HB) de embriones de ratón *Dll1^{+/lacZ}* en el estadio indicado, que fueron teñidos para el reportero de *lacZ* y sus respectivos cortes. PP: placa del piso. Barra de escala 100 μ m.

B) ARN total extraído de embriones silvestres (agrupados de 10) a diferentes estadios (E11.5, E13.5 y E15.5) y los niveles de expresión de los genes indicados fueron determinados por RT-qPCR. Note que *Dll1* y *Dll3* mostraron un patrón de expresión similar que se relacionó cercanamente con el patrón de *Hes5*.

C) El patrón de expresión de *Hes1* y *Hes5* fue determinado en embriones E11.5 con el genotipo indicado. Note que *hes5* disminuyó marcadamente (cerca de 30 veces) en ausencia de *Dll1*.

b.- La señal reducida de Notch, altera el número de precursores dopaminérgicos sin afectar su especificación

Para determinar de qué forma la señal de Notch tiene algún papel en mantener la organización del dominio dopaminérgico en el mesencéfalo ventral, comparamos el patrón de expresión de los genes que codifican para *Lmx1a* y *Foxa2* en embriones

Dll1^{+/+} y *Dll1*^{lacZ/lacZ}. También determinamos el patrón de expresión de *Nkx6.1*; este gen codifica para un factor de transcripción que se expresa lateralmente al dominio de expresión de *Lmx1a* y es reprimido en las CPNs dopaminérgicas después de su propia especificación (Andersson et al., 2006b; Nakatani et al., 2010). La especificación de las CPNs dopaminérgicas ocurre entre E9-E10 y los marcadores de diferenciación neuronal comienzan a ser detectados desde el E11 con un pico entre E12 y E13 (Ang, 2006). Los embriones de ratón nulos en *Dll1* mueren por el día E12 (Hrabé de Angelis et al., 1997), por lo tanto, limitamos los estudios *in vivo* hasta E11.5, estado en el cual la mayoría de los embriones están vivos, aunque con anomalías evidentes (Fig. 9).

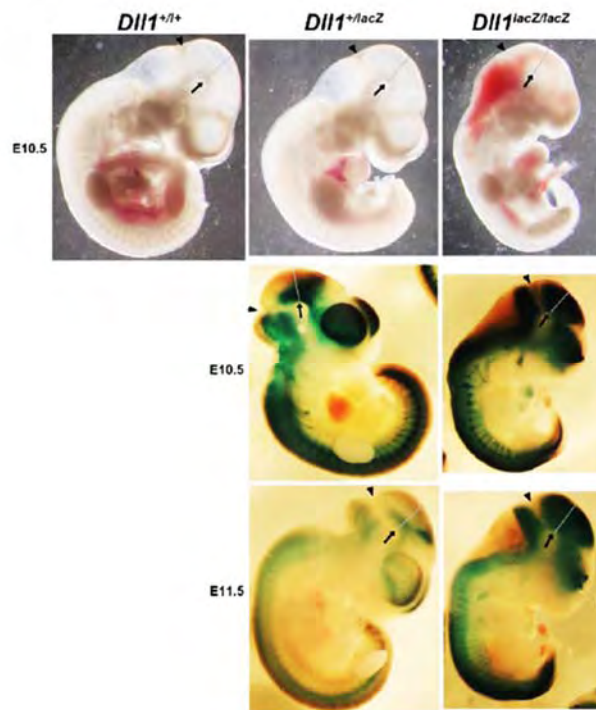


Figura 9. Fenotipo de embriones de ratón homocigos para el alelo nulo en *Dll1*. A pesar de las anomalías de embriones de ratón que pierden *Dll1* a E10.5, el área del mesencéfalo no se ve afectado en gran medida. Esto también es aparente a los E11.5 en embriones *Dll1*^{lacZ/lacZ}, pero durante la disección fue evidente que el tejido ya está más suave y frágil. La ruptura del cerebro a E12.5 está caracterizada por múltiples sitios hemorrágicos tal como previamente se había reportado (Hrabé de Angelis et al., 1997). No se detectaron mayores diferencias entre embriones *Dll1*^{+/lacZ} y embriones silvestre y las crías son del mismo peso y tamaño al nacer; se observaron cerebros con fenotipos moderados en embriones *Dll1*^{+/lacZ} pero con baja penetrancia. Siempre se detectó una señal más fuerte después de teñir para lacZ en *Dll1*^{lacZ/lacZ} que en embriones *Dll1*^{+/lacZ}. La línea que cruza el mesencéfalo al nivel de la flexura mesencefálica (raya), representa la posición aproximada del corte. Cabeza de flecha: istmo.

Como se observa en la Fig.10, el patrón de distribución de Lmx1a, Foxa2 y Nkx6.1 es similar en los mesencéfalos de embriones *DII1*^{+/+} y *DII1*^{lacZ/lacZ} a E10.5 y E11.5; Sin embargo, a E11.5, a pesar de que la distribución de cada proteína todavía fue observada, el tejido se observó desorganizado y frágil con pocas células Lmx1a+ y Foxa2+ en el mesencéfalo del mutante a diferencia de los mesencéfalos silvestres (Fig. 10B). Note, que dentro de cada dominio de expresión específico, una alta proporción de células contenían el marcador correspondiente (Fig. 10B), indicando que la disminución en el número de las células especificadas en el mesencéfalo del ratón que pierde DII1 no es debido al fallo en mantener el destino dopaminérgico mesencefálico. En concordancia con esas observaciones, los niveles del mRNA de Lmx1a y Foxa2 fueron similares en mesencéfalos de embriones *DII1*^{+/+} y *DII1*^{lacZ/lacZ} a E11.5 (Fig. 10C). Curiosamente se observó la activación de Lmx1a en embriones *DII1*^{+/lacZ} entre E13.5 y E15.5 (Fig. 10C). Los niveles de mRNA de Lmx1a incrementaron con la pérdida de la señal de DII1, este último efecto fue relacionado a la función de Lmx1a en la maduración neuronal. Aunque menos evidente, la expresión de Foxa2 a E13.5 mostró una correlación similar (Fig. 10C). Por lo tanto, alteraciones en la señal de Notch no parecen afectar la especificación del nicho dopaminérgico.

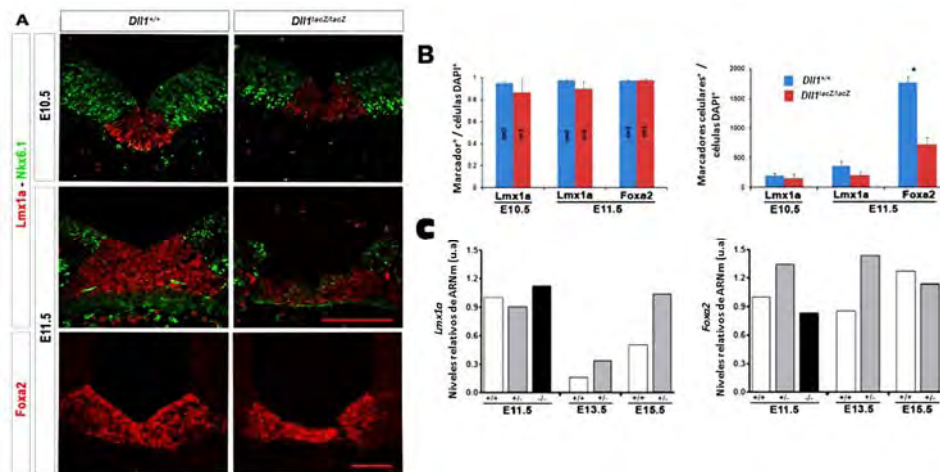


Figura 10. Patrón de expresión de marcadores de especificación en ausencia de DII1.

A) La presencia de Lmx1a, Foxa2 y Nkx6.1 fue determinada en secciones de mesencéfalo de E10.5 y E11.5 en embriones de ratón *DII1*^{+/+} y *DII1*^{lacZ/lacZ}. La barra de escala es 200 μ m.

B) La proporción de células dentro del dominio de expresión para cada gen específico no fue afectado por la ausencia de DII1, pero hubo una marcada reducción en el número de células Lmx1a+ y Foxa2+ en mesencéfalos del ratón nulo en DII1 a E11.5 (n=5); *P<0.05.

C) Los niveles de expresión de Lmx1a y Foxa2 fueron consistentes con las observaciones previas (por ejemplo, la misma proporción de células con el correspondiente marcador).

c.- La expansión pobre de las CPNs dopaminérgicas que pierden la señal de DII1, correlaciona con la detección prematura de marcadores neuronales

Se realizó un análisis de TUNEL y no hubo un evidente incremento en la muerte celular alrededor de la línea media en los embriones mutantes a E10.5 y E11.5 (Fig. 11A, panel izquierdo). En contraste, el delgado tubo neural de mesencéfalos *DII1^{lacZ/lacZ}* de E11.5, correlacionó con una marcada reducción en el número de células que incorporaron BrdU, en comparación con el número observado en mesencéfalos de embriones silvestres (Fig. 11A, panel derecho y Fig. 11B). Estos datos sugieren que, en ausencia de DII1, el grupo de CPNs ventrales que están adyacentes a la zona ventricular del mesencéfalo mostraron un decremento debido a la disminución en la capacidad de proliferar y/o a una diferenciación prematura.

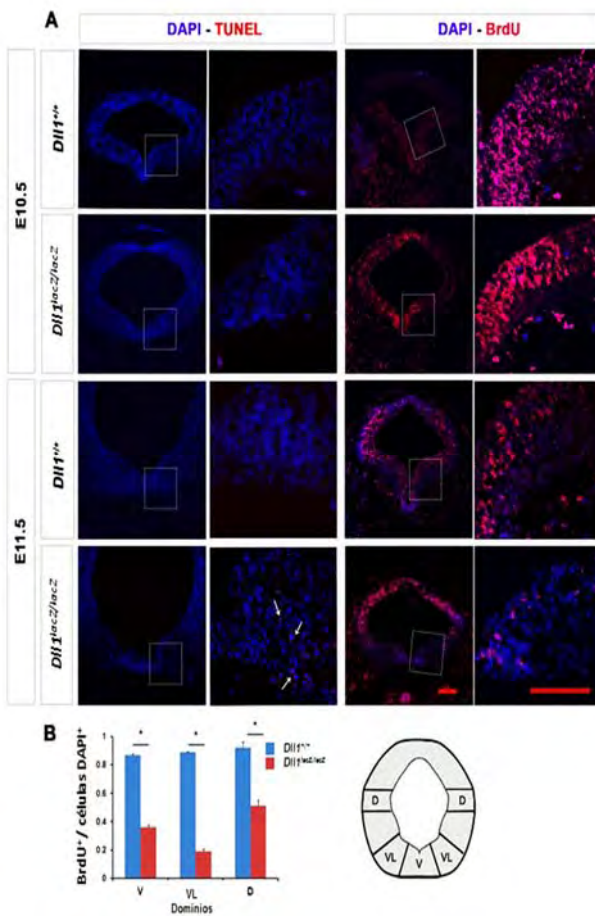


Figura 11. Muerte celular y proliferación en mesencéfalos en desarrollo en la presencia o ausencia de DII1.

A) La muerte celular fue determinado por TUNEL (A, panel izquierdo, núcleos rojos) y proliferación por la incorporación de BrdU (A, panel derecho, núcleo rojo). Con la excepción del área ventrolateral de los mesencéfalos de E11.5 en embriones *DII1^{lacZ/lacZ}* (panel izquierdo), muy pocas células teñidas fueron detectadas en embriones E10.5 o E11.5, independientemente de la presencia o ausencia de DII1. En contraste, una marcada reducción en células BrdU+ se encontró en mesencéfalos de embriones mutantes en comparación con embriones silvestres (A, paneles derecho)

B) Proporción de células que incorporaron BrdU a E11.5. Note, que esta observación, fue más prominente en el área ventral mesencefálica. La barra de escala es 100 μ m.

La distribución radial típica de CPNs (Células Nestina+) fue observada en los mesencéfalos deficientes en DII1 a E10.5, pero fue alterada a los E11.5 (Fig. 12A).

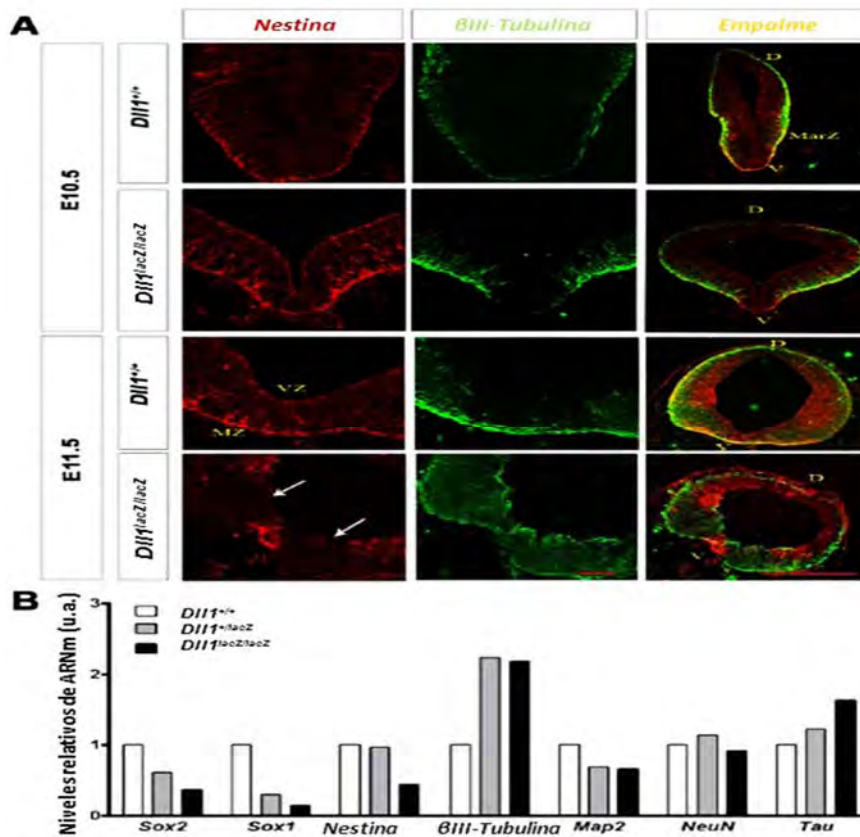


Figura 12. Diferenciación neuronal en mesencéfalos en desarrollo en presencia o ausencia de DII1.

A) A E10.5, Nestina (rojo) cubrió la mayoría del neuroepitelio del mesencéfalo y, una significativa cantidad de β III-tubulina comenzó a ser detectada (verde) en la zona marginal de las muestras de embriones mutantes, esto no fue evidente en el área más ventral (V) o dorsal (D); note que el lumen de los mesencéfalos embrionarios $DII1^{lacZ/lacZ}$, se expandieron más temprano que los mesencéfalos de embriones silvestre. A E11.5, con la reducción en células Nestina+, se detectó abundante β III-tubulina en el área ventral (V) de mesencéfalos embrionarios $DII1^{lacZ/lacZ}$, los cuales fueron distribuidos a través de todo el grosor del neuroepitelio: un número de células Nestina+ permanecieron en la línea media de la mayoría de los casos analizados. Las rayas indican el límite de la PP en una muestra mutante. MarZ, zona marginal; VZ, zona ventricular; MZ, zona manto. La barra de escala es 200 μ m.

B) Las observaciones siguientes fueron confirmadas determinando los niveles de expresión de precursores neurales (Sox1, Sox2, Nestina) y genes neuronales (β III-tubulina, Map2, NeuN, Tau) en cerebros medios ventrales con el genotipo indicado DII1. Note que no hubo una marcada alteración en la expresión de genes asociados con neuronas maduras (Map2, NeuN, Tau).

Curiosamente, la abundancia y distribución del marcador neuronal inmaduro β III-tubulina, sugiere que la neurogénesis es una etapa más avanzada en el mesencéfalo de embriones *Dll1^{lacZ/lacZ}* desde los E10.5 y se vuelve más evidente a los E11.5 en comparación con los mesencéfalos silvestres en un estado equivalente de desarrollo (Fig. 12A). Una marcada reducción en células Nestina⁺ y la extensión de células β III-tubulina⁺ a la zona ventricular, se observó a E11.5 en la región ventral de mesencéfalos nulos en *Dll1* (Fig. 12A). Se observó un conjunto de células Nestina⁺ que fueron comúnmente detectadas alrededor de la línea media en el ratón mutante; la identidad de esas células queda por determinar. Células positivas a NeuN, un marcador neuronal maduro, no fue detectado en el nicho dopaminérgico, aún bajo la diferenciación precoz observada en embriones que pierden *Dll1*. Un análisis de expresión de genes neurogénicos en el mesencéfalo ventral de embriones *Dll1^{+/+}*, *Dll1^{+ /lacZ}* y *Dll1^{lacZ/lacZ}* a E11.5, también apoya la diferenciación neuronal precoz con poco o sin una marcada alteración en la expresión de genes asociados con neuronas maduras (Fig. 12B). Destaca que, con excepción de la expresión de Nestina, los niveles de expresión de genes (β III-tubulina, Map2, NeuN, Tau) observados en el mesencéfalo ventral de embriones *Dll1^{lacZ/lacZ}* fueron similares a las muestras de los embriones *Dll1^{+ /lacZ}*.

Células positivas para Th, la enzima limitante en la síntesis de dopamina y uno de los marcadores más tempranos de neuronas dopaminérgicas, fue detectado aproximadamente al mismo tiempo en tejidos silvestres y mutantes E11.5, pero su distribución en las últimas muestras asemejó un estado de desarrollo más avanzado (por ejemplo E12.5) (Fig. 13A). Adicionalmente, la cuantificación celular reveló una diferencia significativa en la proporción de células Th⁺ entre el mutante y tejidos control a E11.5 (Fig. 13B). De acuerdo con la aparición prematura de Th en el ratón mutante, los niveles de mRNA de Th estuvieron elevados en el mesencéfalo ventral en los embriones *Dll1^{lacZ/lacZ}* (Fig. 13C), de manera muy similar con el incremento de β III-tubulina tanto en *Dll1^{+ /lacZ}* como en *Dll1^{lacZ/lacZ}*. Los niveles de mRNA de VMAT y DAT, marcadores de neuronas dopaminérgicas maduras, no mostraron un cambio muy marcado entre los diferentes genotipos a E11.5, probablemente debido a que el análisis se realizó en una etapa temprana de la diferenciación.

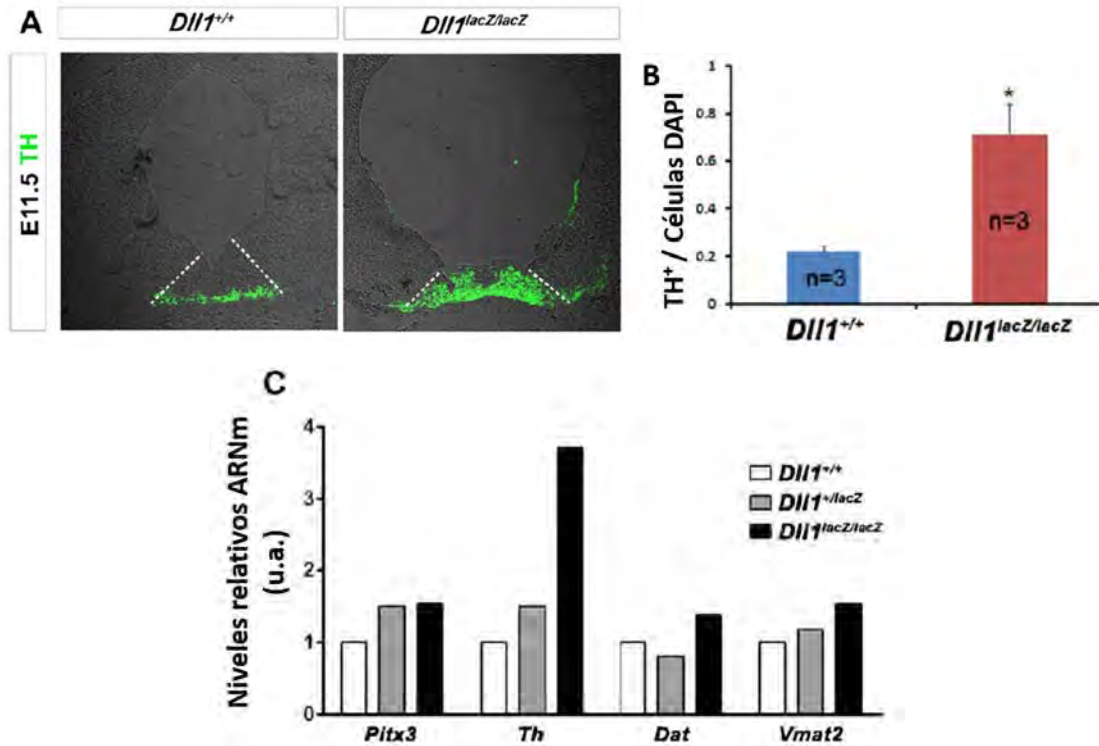


Figura 13. Diferenciación dopaminérgica en mesencéfalos en desarrollo en presencia o ausencia de *DII1*. A) La diferenciación dopaminérgica fue determinada por la detección de células que contienen tirosina hidroxilasa, o los niveles de expresión de este gen en mesencéfalos ventrales de embriones E11.5 con el genotipo indicado.

B) Un número significativo de neuronas dopaminérgicas fueron detectados en muestras de *DII1*^{lacZ/lacZ} en comparación con embriones silvestres.

C) Los cuales correlacionan positivamente con los niveles de expresión de *Th* pero no de genes que son expresados en neuronas dopaminérgicas maduras.

d.- Cultivos de explantes mesencefálicos recapitulan los efectos de la deficiencia en la señal de Notch durante la diferenciación dopaminérgica

Fue inesperado encontrar que la diferenciación neuronal prematura descrita arriba a los E11.5 no reflejara la expresión de los genes que codifican proteínas asociadas con neuronas maduras (por ejemplo NeuN). Ya que la diferenciación dopaminérgica mesencefálica no se completó antes de que los embriones *DII1*^{lacZ/lacZ} murieran, analizamos el potencial de diferenciación de CPNs mesencefálicas en cultivo. Cultivo de explantes embebidos en colágena permiten la diferenciación dopaminérgica a un estado que se parece a la distribución y número de neuronas

dopaminérgicas presentes en el mesencéfalo de embriones E14-E15 (Baizabal y Covarrubias, 2009). En concordancia con las observaciones de embriones E11.5, explantes mesencefálicos $DII1^{lacZ/lacZ}$, cultivados por 2 ó 4 días, mostraron una alta proporción de células Th⁺ en comparación con muestras equivalentes de embriones $DII1^{+/+}$. La mayoría de las células Th⁺ fueron NeuN⁺ a los 2 días de cultivo en explantes de embriones de cualquier genotipo, pero pocas células tuvieron este marcador neuronal a los 4 días de cultivo en explantes mesencefálicos $DII1^{lacZ/lacZ}$ comparado con el silvestre (Fig. 14).

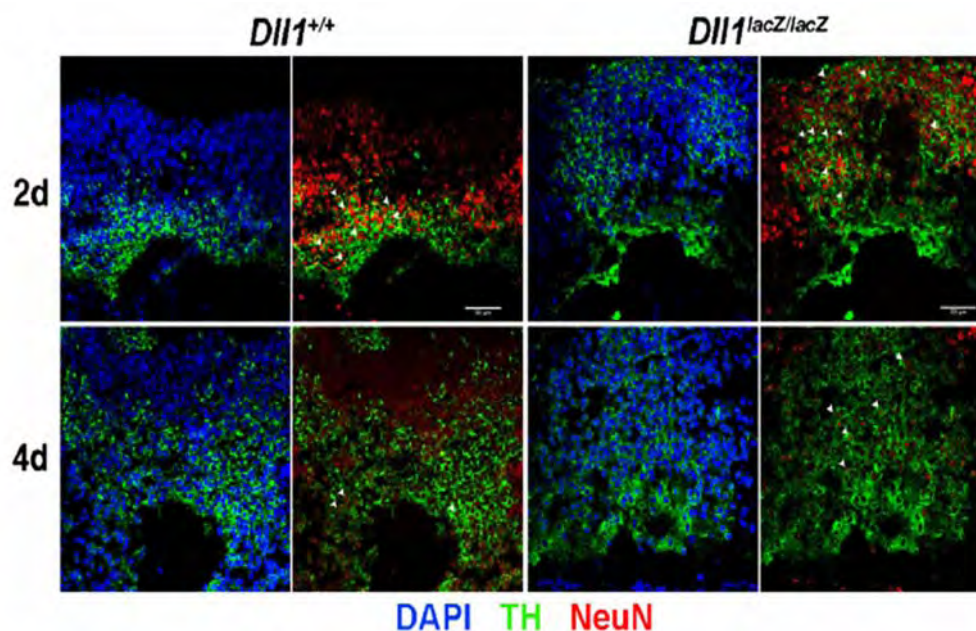


Figura 14. Diferenciación dopaminérgica en cultivo de explantes.

La diferenciación neuronal dopaminérgica fue determinada detectando el número de células que contienen el marcador neuronal maduro NeuN (a veces indicado con punta de flecha) y Th. A los 2d ambos genotipos mostraron células NeuN⁺, sin embargo a 4d pocas neuronas fueron NeuN⁺ en los explantes $DII1^{lacZ/lacZ}$.

Esto recapitula el proceso observado en las nuevas neuronas dopaminérgicas de embriones E13.5, las cuales son NeuN⁺ y pierden este marcador a E15.5 (Fig. 15). Por lo tanto, las últimas fases de la neurogénesis dopaminérgica en ausencia de DII1 pueden ser observadas en cultivo de explantes, los cuales muestran un estado más avanzado de diferenciación/maduración con respecto a lo que ocurre en explantes silvestres.

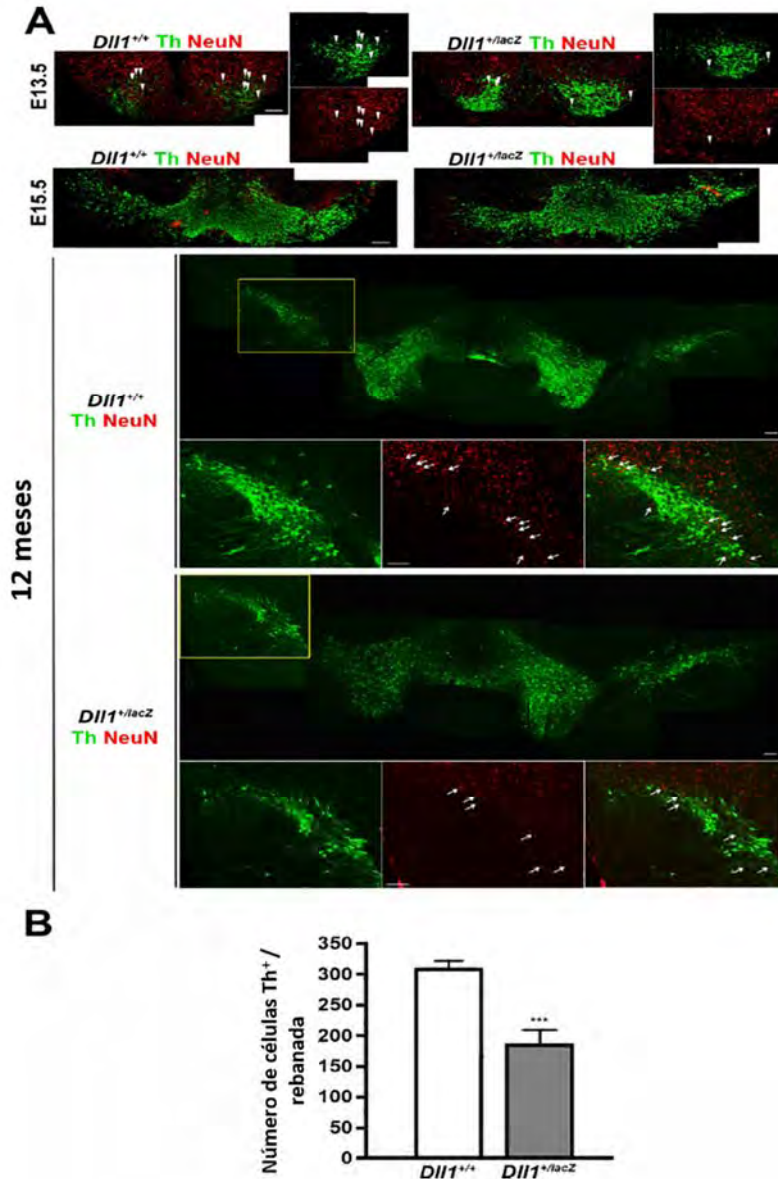


Figura 15. Número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto bajo niveles reducidos de *Dll1*.

A) Neuronas dopaminérgicas fueron detectadas por la presencia de Th (verde). No hay una diferencia aparente en la densidad de neuronas Th⁺ que fue detectado en muestras de embriones. Note que algunas neuronas Th⁺ en el mesencéfalo de embriones E13.5 (cabeza de flecha) no tenían el marcador nuclear NeuN (rojo), marcador encontrado frecuentemente en neuronas maduras. Una evidente baja densidad de neuronas Th⁺, las cuales todas perdieron el marcador nuclear NeuN, se observó en la SNpc de ratón *Dll1*^{+/lacZ} en comparación con la densidad de esta región del ratón silvestre. Barras de escala 100 μ m; las rayas indican las células Th⁺/NeuN⁺ dentro de la SNpc.

B) neuronas Th⁺ fueron contadas en las rebanadas de cerebros de ratones de 14 meses de edad. Datos representados como el promedio \pm s.d.

Con el objetivo de obtener más conocimientos directos sobre el papel de la señal de Notch en la diferenciación dopaminérgica, realizamos cultivos de explantes mesencefálicos en presencia o ausencia de DAPT, un potente inhibidor de la γ -secretasa, la cual disminuye la activación de Notch en un paso clave después de la unión al ligando (Crawford y Roelink, 2007).

Debido a la variación en número y distribución de células diferenciadas en cultivo de explantes, analizamos neurogénesis dopaminérgica en explantes estimando los niveles de mRNA de genes relevantes al proceso. Como se esperaba, el inhibidor de la señal de Notch abolió la expresión de Hes5 en cultivos mesencefálicos de embriones E9.5 o E10.5 después de 2 días en cultivo, mientras que la expresión de Hes1 solo fue parcialmente afectada (Fig. 16A), en cercana similitud con las observaciones en embriones mutantes. En general, el efecto de la inhibición de la señal de Notch con el inhibidor DAPT en los niveles de mRNA de genes neuronales y dopaminérgicos, estuvo de acuerdo con las observaciones de embriones deficientes en Dll1.

El efecto proneurogénico de la inhibición de Notch fue más pronunciado en muestras a E9.5 más que a E10.5 (por ejemplo 4 vs 8 veces ya sea a 2 días o 4 días de tratamiento). Interesantemente, no hubo una disminución proporcional en los niveles de mRNA de Nestina (Fig. 16B), sugiriendo que una fracción de CPNs se dividen aún bajo la inhibición de la señal de Notch reducida pero no afecta la tasa de incremento de mRNA de nestina en explantes E9.5, sugiriendo que la diferenciación de CPNs pero no la proliferación, es el blanco de la vía de señalización de Notch. Por lo tanto, la inhibición de la señal de Notch reproduce el efecto neurogénico de perder Dll1, confirmando que este ligando es el mayor mediador de las funciones de Notch.

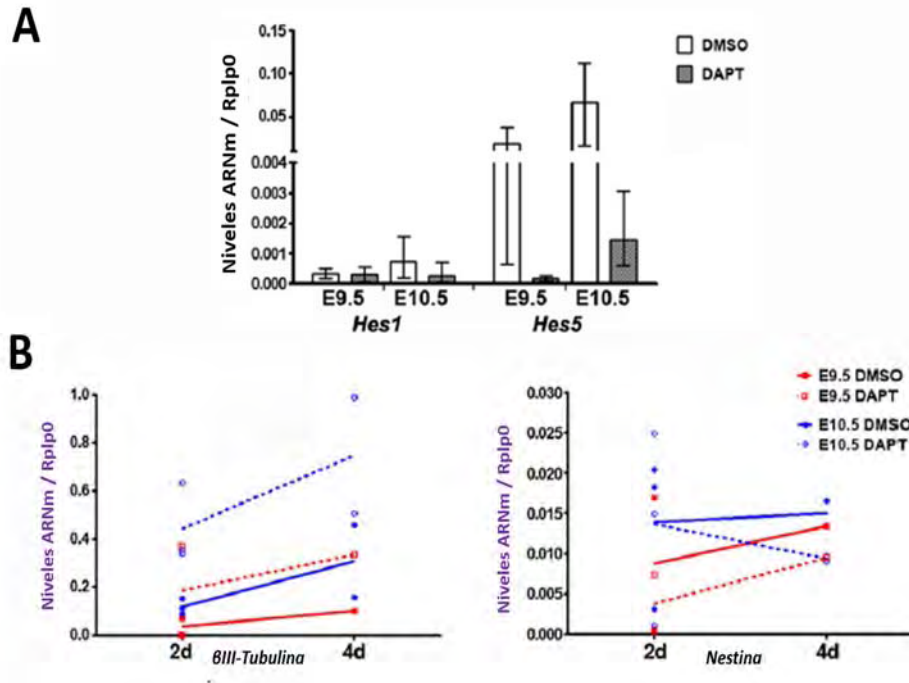


Figura 16. Efecto de la señal de Notch en la diferenciación neuronal dopaminérgica en cultivos de explantes de mesencéfalos en desarrollo.

A) Se realizó un cultivo de explante de 2d en embriones de E9.5 y E10.5 y se trataron con el inhibidor de Notch, redujeron marcadamente la expresión de Hes5 con un mínimo efecto en hes1, en concordancia con el efecto determinado en embriones que pierden Dll1.

B) Se determinaron los niveles de mRNA de precursores neurales (nestina) o marcador neural (β III-tubulina) en embriones tratados con el inhibidor de Notch DAPT por 2 días (2d) o 4 días (4d). El efecto retardado de DAPT (2d vs 4d) en la expresión de Nestina en cultivo de mesencéfalos de E10.5 podría estar relacionados a la población de CPN que no está comprometida a formar neuronas. Barra de escala 100 μ m. Los datos en A están representados como el promedio de los valores más altos/más bajos.

e.- La ausencia de la señal de Notch modifica el flujo de diferenciación dopaminérgica

Msx1 y Ngn2 son factores de transcripción cuyos genes son temporalmente expresados durante la diferenciación dopaminérgica; el primero está mayormente presente en las CPNs ventriculares y marca el inicio de diferenciación dopaminérgica (Andersson et al., 2006b), mientras que el último es un factor proneural muy importante para la diferenciación dopaminérgica que muestra altos

niveles en los progenitores intermediarios antes de la expresión de Nurr1, un factor de transcripción que controla la expresión de Th (Kele et al., 2006). Por lo tanto, para estimar las transiciones entre el linaje relacionado con los precursores dopaminérgicos en su curso de diferenciación, decidimos determinar los niveles de mARN que corresponden a esos 3 factores de transcripción en mesencéfalos de embriones de E9.5 a E15.5 (Fig. 17A). El más alto nivel de mARN de *Msx1/2* fue detectado a E11.5, el cual representó un incremento de 30 veces en comparación con el nivel encontrado a E9.5; este valor disminuyó rápidamente cercano al límite de detección a E12.5. Niveles significativos del mARN de *Ngn2* fueron detectados a E10.5, siendo más altos a E11.5, y disminuyeron marcadamente a los E15.5. En contraste, los niveles del mARN de *Nurr1* incrementaron gradualmente desde E10.5 hasta E12.5, estado en el cual aparentemente se volvieron estables. Ya que *Msx1/2*, *Ngn2* y *Nurr1* son expresados mayormente en CPN no sobrelapantes restringidos que son unidos a lo largo de la vía de diferenciación dopaminérgica, los niveles de mARN están en concordancia con un flujo de diferenciación comenzando con un número definido de CPN *Msx1+* que son convertidos a neuronas dopaminérgicas que pasan secuencialmente por CPN *Ngn2+* y *Nurr1+*. Note que el incremento en los niveles de mARN de Th, representan los neuroblastos dopaminérgicos jóvenes, que se quedan atrás de *Nurr1*.

El incremento en los niveles de mARN de Th y el número relativo de neuronas dopaminérgicas en ausencia de *Dll1*, sugieren que la señal de Notch regula la emergencia de características dopaminérgicas. Un marcado incremento en los niveles de mARN de *Ngn2*, *Nurr1* y Th en el mesencéfalo de embriones E10.5 nulos en *Dll1* (Fig. 17A) sugiere que la población celular que expresa *Ngn2*, *Nurr1* y Th están emergiendo prematuramente. De modo interesante, a E11.5 los niveles de mARN de *Msx2* y *Ngn2* en el mesencéfalo ventral de embriones *Dll1^{lacZ/lacZ}* fueron más bajos que en los embriones de tipo silvestre; *Msx1* y *Mash1* mostraron una regulación similar como *Msx2* y *Ngn2*, respectivamente (Fig. 18). De acuerdo con la correlación entre la proporción de CPNs y los niveles de mARN, la disminución en los niveles de mARN de *Ngn2* correlacionaron con una disminución en el número de CPNs *Ngn2+* (Fig. 17B, C).

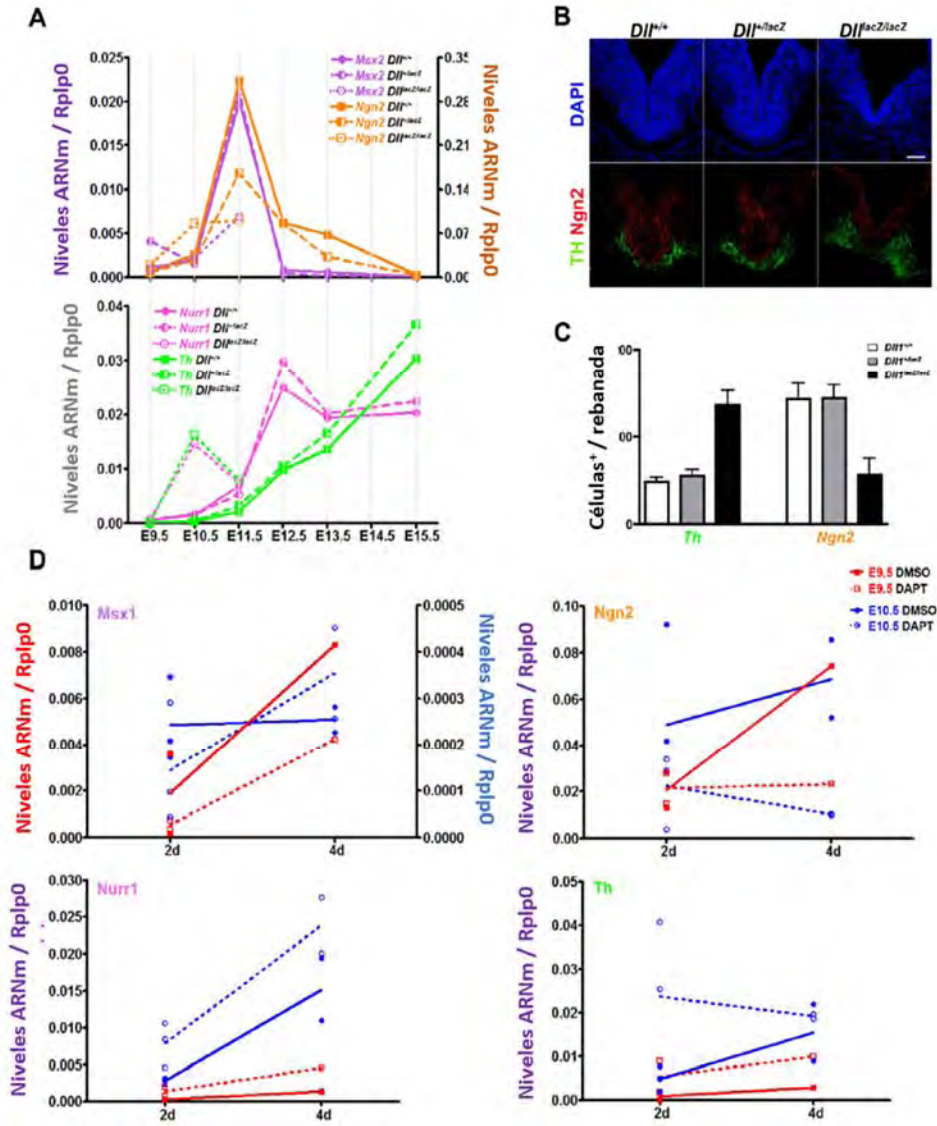


Figura 17. Flujo de diferenciación dopaminérgica en mesencéfalos a lo largo del desarrollo embrionario o en explantes con señal normal o reducida de Notch.

A) La progresión de la diferenciación dopaminérgica se analizó, detectando la expresión de genes cuyos productos están asociados principalmente con CPN dopaminérgicas ($Msx1/2^+$, $Ngn2^+$, $Nurr1^+$) o neuronas diferenciadas (Th). Para mesencéfalos en desarrollo el ARN total fue extraído de un grupo de regiones ventrales de embriones (al menos 6) de cada genotipo indicado..

B, C) Número de DPN $Ngn2^+$ o neuronas Th^+ en mesencéfalos de embriones E11.5 con el genotipo indicado, muestran una buena correlación con los niveles de $ngn2$. Datos en C representados como promedio \pm D.S.

D) Cultivo de explantes de mesencéfalos de embriones E9.5 o E10.5, sin tratamiento (DMSO) o tratados con DAPT, cada determinación fue de un grupo independiente de explantes cultivados (al menos 3). Barra de escala 100 μ m.

En contraste, *Nurr1* y *Ptx3*, dos genes río debajo de *Ngn2* cuya expresión permanece en las neuronas que emergen *Th+*, mostraron leves diferencias en sus niveles de mARN en la presencia o ausencia de *Dll1* a E11.5; solo los niveles de mARN de *Ptx3* estuvieron en línea con el incremento de la expresión de *Th* pero en mucho menor proporción (Fig. 13). De notar fue, que la reducción de *Dll1* (por ejemplo en la cantidad presente en embriones *Dll1^{+/-lacZ}*) provocó una marcada caída en los niveles del mARN de *Ngn2* solo en embriones a E11.5 pero produjeron niveles similares de mARN y patrones de expresión como el silvestre de todos los genes analizados (Fig. 17A). Además, la reducción en la dosis de *Dll1* promueve diferenciación dopaminérgica en asociación con un decremento en las CPN específicas tempranas (por ejemplo, *Msx2⁺* y *Ngn2⁺*).

Las siguientes observaciones sugieren que la función *Dll1*-*Notch1* es controlar el flujo de diferenciación una vez que las CPN dopaminérgicas son especificadas como tal, durante el proceso, el efecto es principalmente notado en la reducción de los progenitores temporales *Ngn2⁺* pero no fue evidente en la proporción de neuroblastos dopaminérgicos diferenciados. El flujo de diferenciación dopaminérgica puede ser observado en cultivo de explantes tratados con DAPT (Fig. 17).

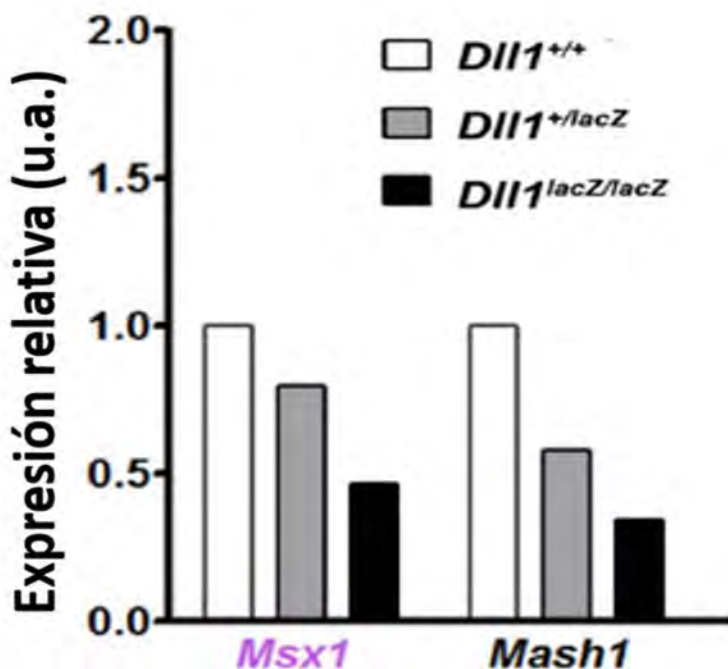


Figura 18. Niveles de marcadores de diferenciación dopaminérgica *Msx1* y *Mash1* a diferentes dosis de *Dll1*.

El ARN total se extrajo de un grupo de las regiones ventrales de mesencéfalos de E11.5 del genotipo indicado, y se determinaron los niveles de mARN por RT-PCR. Note que los niveles de mARN de *Msx1* y *Mash1* mostraron un patrón similar como los niveles de *Msx2* y *Ngn2* (ver figura 17) respectivamente, en dosis diferentes de *Dll1*.

Durante el cultivo de explantes mesencefálicos, la diferenciación activa se indicó por el aumento en los niveles de mARN de Msx1, Ngn2 y Nurr1. La diferenciación dinámica en explantes E9.5 y E10.5 fue similar pero el incremento de 2 días a 4 días de cultivo en los niveles de mARN de marcadores tempranos (Msx1/2, Ngn2) fue menos pronunciado, mientras que marcadores tardíos (Nurr1, Th) fue más pronunciado en un estado más avanzado de desarrollo, consistente con la tendencia que ocurre en la diferenciación. La inhibición de la señal de Notch mostró una disminución en los niveles de mARN de Msx1 en explantes E9.5 a pesar de su fase de incremento en este estado de desarrollo; esta observación concuerda con una función no relevante de Notch en la proliferación de CPN dopaminérgicas.

En contraste, la inhibición de Notch causó una disminución consistente en los niveles de mARN de Ngn2 en explantes de E10.5, mientras que su efecto se notó a E9.5 solo después de 4 días del tratamiento con DAPT; una aparente pérdida del efecto de los niveles de mARN de Ngn2 en explantes E9.5 tratados 2 días sostiene un papel temporal de las células Ngn2+ durante la diferenciación. Los niveles de mARN de Nurr1 mostraron niveles más bajos en explantes de E9.5 que E10.5, pero un incremento fue provocado por la inhibición de Notch. Un comportamiento similar se observó para el mARN de Th pero sus niveles no aumentaron en explantes de E10.5 después de 4 días del tratamiento con el inhibidor de Notch, posiblemente debido a la depleción de los progenitores.

Juntos, todos estos datos están de acuerdo con un modelo en el cual la proliferación y el tamaño del grupo de CPNs definen, como el flujo de diferenciación dopaminérgica se afecta por la inhibición de Notch, ya que la depleción de CPN y la generación de neuronas inducida por el inhibidor de Notch, se fortalecen y debilitan respectivamente, en fases tardías de diferenciación (posiblemente después de E11.5).

f.- La expansión de las CPN nulas en Dll1 retienen su identidad y aumentan la diferenciación específica

Para determinar si el efecto sobre la diferenciación dopaminérgica debido a la pérdida de Dll1 está directamente sobre las CPN, estudiamos la diferenciación neuronal de las CPN expandidas como neuroesferas. Se ha reportado en cuanto a la expansión de las CPN como neuroesferas, una disminución del potencial neuronal y la pérdida de identidad posicional.

Después del periodo de diferenciación, $56.14\% \pm 7.29$ de las neuroesferas silvestres expresaron GFAP, un marcador de astrocitos, mientras que $35.76\% \pm 10.76$ fueron inmunorreactivas para nestina. La co-expresión de GFAP/Nestina (Fig.19A, B) es una característica común de las neuroesferas silvestres, $35.76\% \pm 10.76$ de las neuroesferas expresaron estos 2 marcadores. Como se esperaba, solo $11.60\% \pm 3.01$ de las células en la neuroesfera fueron neuronas inmaduras (β III-tubulina) y ninguna expresó el marcador neuronal maduro NeuN (Fig.19A, B). Muy pocas células fueron Lmx1a+ ($0.83\% \pm 0.13$) ó Th ($1.04\% \pm 0.36$) (Fig.19C, D). En contraste, las neuroesferas *Dll1^{lacZ/lacZ}*, formaron un gran porcentaje de neuronas inmaduras ($56.97\% \pm 1.92$) y neuronas maduras ($32.51\% \pm 14.94$); la proporción que co-expresó estos dos marcadores fue $32.51\% \pm 14.94$ (Fig.19B). Muy pocas células fueron GFAP ($7.72\% \pm 3.78$) y Nestina ($1.55\% \pm 2.20$) (Fig.19A). Cuando analizamos el fenotipo dopaminérgico, encontramos que un alto porcentaje de células fueron Lmx1a ($19.33\% \pm 3.18$) y células Th+ ($12.39\% \pm 2.46$) (Fig.19D) comparado con el control, lo que sugiere que en ausencia de la señal de Dll1 la identidad neuronal de al menos algunas CPN se retiene y pueden diferenciar de forma sitio específica en cultivo. Esto es consistente con los resultados obtenidos por Grandbarbe y colaboradores, donde tanto la generación, como el mantenimiento de las CPN no son afectadas por la falta de Dll1 (Grandbarbe et al., 2003) y de igual manera nuestros resultados muestran una mayor cantidad de neuronas en las neuroesferas mutantes comparadas con el control.

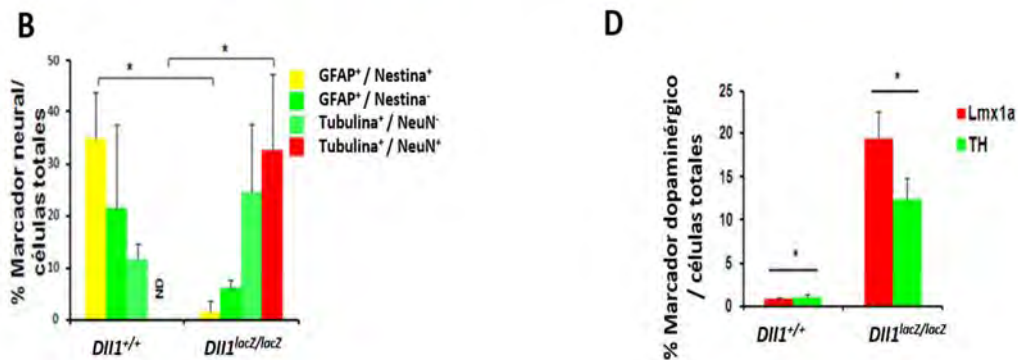
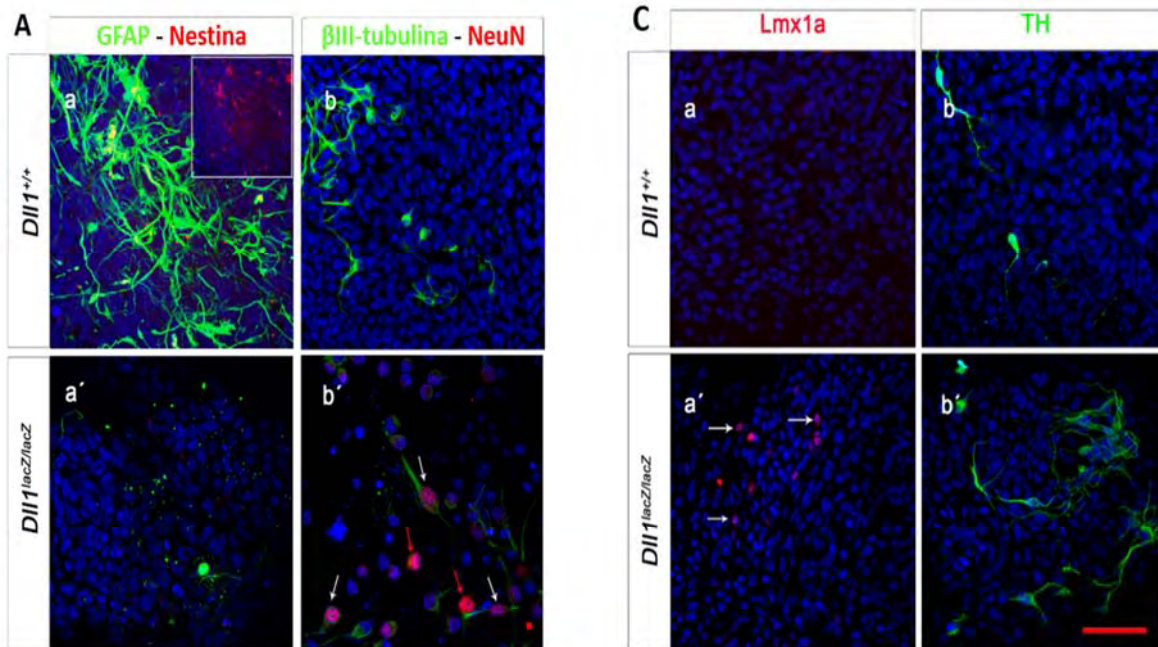


Figura 19. Potencial de diferenciación de neuroesferas $Dll1^{lacZ/lacZ}$ comparado con el control.

A,C) Análisis del potencial de diferenciación neuronal para neuroesferas $Dll1^{lacZ/lacZ}$ comparado con un control.

B) cuantificación de los diferentes marcadores que muestran una diferencia significativa en las células que co-expresaron $GFAP^+/Nestina^+$ y $Tubulina^+/NeuN^+$.

C) Los progenitores $Dll1^{lacZ/lacZ}$ pueden mantener su especificación en cultivo, lo cual fue observado por la presencia de progenitores dopaminérgicos $Lmx1a^+$ (flechas) y neuronas dopaminérgicas, comparados con el control.

D) Cuantificación de los progenitores dopaminérgicos y neuronas dopaminérgicas, que muestran una diferencia significativa en ambos marcadores. La barra de escala representa 50 μm .

g.- La haploinsuficiencia de Dll1 causa una reducción en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en el cerebro adulto

Las alteraciones en los niveles de mRNA de los genes involucrados en la diferenciación dopaminérgica así como el fenotipo observado en embriones *Dll1^{+/-lacZ}*, ambos consistentes con la leve diferenciación neuronal prematura, nos llevó a estudiar las consecuencias en el ratón adulto. A pesar de que no hubieron diferencias en los niveles de mRNA de marcadores de diferenciación neuronal o dopaminérgico detectados a los E13.5 o E15.5, se observó baja densidad de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral de mutantes comparados con los silvestres los cuales no fueron obvios a E13.5 pero si aparentes a E15.5 cuando están cercanos a establecer su localización final (Fig. 15A).

Como se mencionó arriba, la represión de NeuN correlacionó con la maduración de neuronas dopaminérgicas de tal manera que algunas Th⁺/NeuN⁺ fueron detectadas en embriones E13.5 *Dll1^{+/-lacZ}* pero casi ninguna en embriones E15.5 de cualquier genotipo. Esta reducción en neuronas dopaminérgicas se hizo más evidente en el ratón adulto, donde era fácilmente visible en la SNpc donde la mayoría de las neuronas Th⁺ permanecieron NeuN negativo (Fig. 15A). Esto no fue relacionado con un papel de Dll1 en la supervivencia neuronal ya que un fenotipo similar fue observado en ratones jóvenes y adultos (Fig. 20). No obstante, la baja densidad neuronal no se limitó a las neuronas dopaminérgicas ó al área mesencefálica, sino más bien se señaló a lo largo del cerebro.

Las consecuencias funcionales de esta reducción de la densidad neuronal serán publicadas aparte (manuscrito en preparación). Por lo tanto, una dosis baja de Dll1 disminuye la producción de algunos tipos neuronales, posiblemente interrumpiendo el flujo de diferenciación, similar a lo descrito para neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

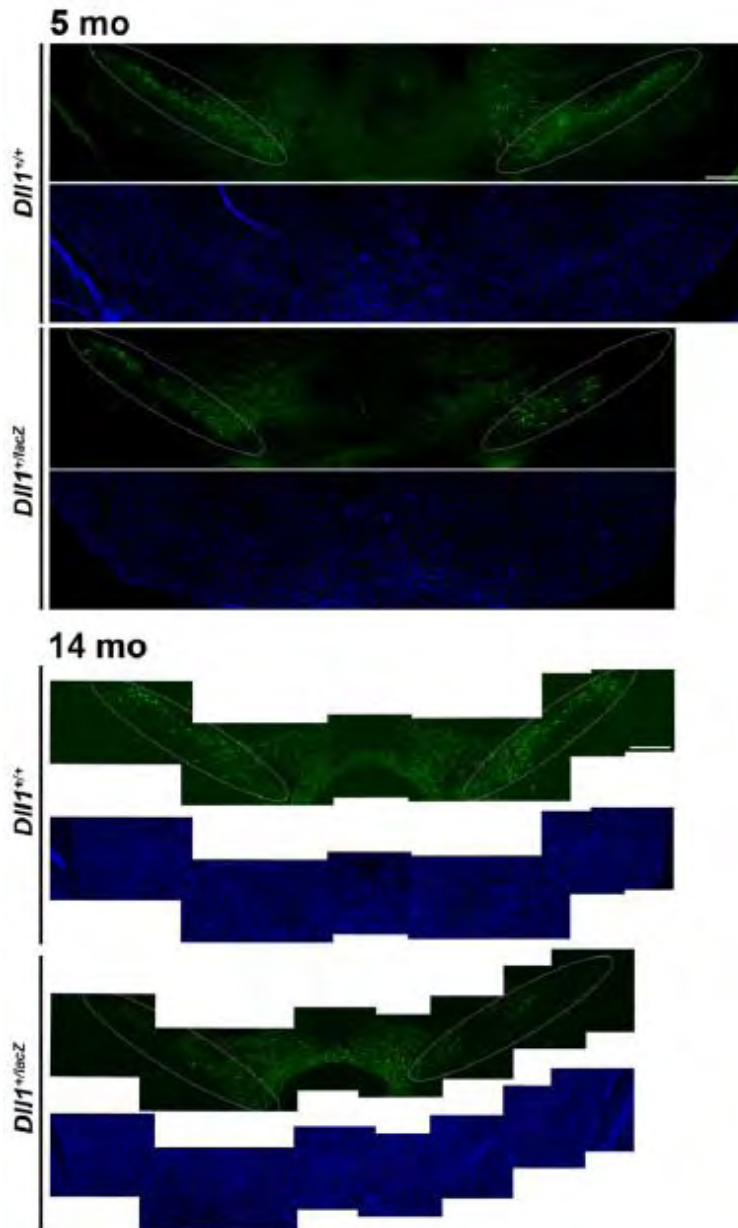


Figura 20. Densidad de neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto a diferentes edades y niveles de *DII1*.

Las neuronas dopaminérgicas fueron detectadas por la presencia de *Th* (verde) entre el número total de células (núcleos teñidos con DAPI; azul) en cortes de mesencéfalos adultos de ratón con el genotipo y edad indicado (barra de escala 100 μm). Cortes para comparar fueron seleccionados en base de similitud morfológica de distintas estructuras del cerebro incluyendo la sustancia nigra, el hipocampo, el acueducto y los ventrículos laterales. Se observó una baja densidad de neuronas *Th*⁺ en la sustancia nigra de ratón *DII1*^{+/lacZ} más que en la de los ratones *DII1*^{+/+} a lo largo de toda la estructura con poca diferencia entre las edades probadas.

VII. DISCUSIÓN

La vía de señalización Notch es ampliamente conservada entre organismos metazoarios. En ratón, la vía de señalización tiene funciones pleiotrópicas y regula múltiples procesos durante el desarrollo, desde el mantenimiento de CTN, proliferación celular, diferenciación y muerte celular (ver revisiones: Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011; Bizzotto y Walsh, 2018; Zhang et al., 2018). En el desarrollo del cerebro, la señal de Notch está involucrada en el mantenimiento del estado indiferenciado y multipotente, inhibición de la diferenciación neuronal y aún en la diferenciación terminal del linaje astrocítico (Bansod et al., 2018). Las funciones de esta vía de señalización están relacionadas con la interacción con otras vías de señalización. La desregulación de la señal de Notch está involucrada en muchas enfermedades neurodegenerativas y desórdenes en el cerebro.

Previamente se describió el fenotipo del ratón nulo en Dll1, los embriones muestran severos defectos en el establecimiento de patrones en el mesodermo paraxial y un SNC hiperplástico. Comienzan a mostrar severas hemorragias después del E10 y mueren alrededor del E12 en el desarrollo embrionario. En el SNC, la pérdida de Dll1 provoca una excesiva diferenciación neuronal (Hrabe de Angelis, et al., 1997). Nosotros observamos hemorragias severas en el SNC a los E10.5 en el ratón *Dll1^{lacZ/lacZ}*, similar a lo reportado por Hrabe de Angelis, et al., 1997 (Fig. 9), a los E11.5 la hiperplasia del embrión *Dll1^{lacZ/lacZ}* era tan evidente que fue difícil la manipulación por lo que se decidió utilizar solamente a los embriones heterocigos para los experimentos.

Analizamos los mensajeros de varios integrantes de la vía Notch, encontrando patrones semejantes a los reportados previamente (Tabla 1) (Hatakeyama et al, 2004; Bansod et al., 2017; Mesman et al., 2018). Analizamos Hes1 y Hes5, los efectores de la vía Notch, observamos que la expresión de Hes5 fue más abundante que la de Hes1 y por lo tanto es el mayormente afectado en la vía canónica (Hatakeyama et al. 2004; Basak and Taylor 2007). Los dobles mutantes de HES1/HES5 muestran un tubo neural desorganizado y la pérdida de la nestina en

la región ventrolateral, fenotipo similar al observado en nuestros experimentos (Fig. 12) (Hatakeyama et al., 2004) lo que sugiere es que las células de la glía radial se pierden prematuramente. La expresión alterada de Hes1 o Hes5 en el cerebro en desarrollo del ratón inhibe la diferenciación neuronal y mantiene la identidad de las células de la glía radial (Ohtsuka et al., 2001). En ausencia de Hes1 y Hes5, las células de la glía radial no se mantienen y diferencian prematuramente a neuronas.

Dll1 es un gen neurogénico, en este trabajo revisamos la distribución del transcrito de Dll1 por determinación *in situ* de la actividad de lacZ en embriones *Dll1^{+LacZ}* al inicio de la diferenciación dopaminérgica, encontrándose que la expresión de Dll1 se ubicó principalmente alrededor de la línea media ventral correspondiente a la localización de los progenitores intermediarios (Fig. 8A) en el mesencéfalo, pero no se encontró expresión de Dll1 en el cerebro posterior, similar a lo reportado previamente (Deng et al., 2011; Kele et al., 2005; Ono et al., 2007) sugiriendo una función de Dll1 junto con otros factores presentes en esta zona del cerebro medio en la especificación del linaje dopaminérgico.

Los progenitores dopaminérgicos en el cerebro medio ventral pueden ser subdivididos en dominios molecularmente distintos: medio y laterales. *Lmx1a* es más importante para la neurogénesis en el dominio dopaminérgico medio, mientras que *Lmx1b* es más importante para la generación de neuronas dopaminérgicas laterales (Deng et al., 2011). *Lmx1a* y *Lmx1b* cooperan con *Foxa2* para coordinar la especificación de las neuronas dopaminérgicas y controlar el proceso de diferenciación de las células de la PP en el mesencéfalo en desarrollo (Lin et al., 2009; Nakatani et al., 2010; Deng et al., 2011). Analizamos la especificación de los progenitores dopaminérgicos mediante inmunohistoquímicas para *Lmx1a*, *Foxa2* y *Nkx6.1* que delimita el dominio dopaminérgico a los E10.5 y E11.5, encontramos que el patrón de expresión de estos marcadores se mantuvo en los días analizados de modo semejante a lo observado en el control, de igual forma los niveles de mRNA de *Lmx1a* y *Foxa2* fueron similares en mesencéfalos de embriones silvestres y homócigos para *Dll1* a los E11.5. Sin embargo se observó una ligera activación de *Lmx1a* en embriones *Dll1^{+LacZ}* a E13.5 y E15.5 que pudiera estar relacionado con la

función de Lmx1a en la maduración neuronal, ya que la expresión sostenida de algunos factores de transcripción como Lmx1a y Lmx1b en neuronas dopaminérgicas postmitóticas y maduras, sugiere funciones que se extienden más allá del establecimiento de la identidad neuronal y pueden actuar en vías de mantenimiento neuronal en el cerebro adulto (Zou et al., 2009; Doucet-Beaupré et al., 2015). En este trabajo observamos que la especificación inicial de las CPN dopaminérgicos mesencefálicos ocurre en ausencia de la señal de Notch. Un fenómeno similar ocurre en la médula espinal donde las proteínas homeodominio definen el patrón espacial de Dll1 y la pérdida de Dll1 incrementa la diferenciación neuronal sin afectar los límites de los dominios de progenitores específicos (Marklund et al., 2010).

Esta reducción observada en el número de células Lmx1a⁺ y Foxa2⁺ en mesencéfalos de ratón nulos en Dll1 a E11.5 no fue debido a muerte celular. Esto es consistente con lo observado en los dobles mutantes Hes1/Hes5 (Ohtsuka et al., 1999; Hatakeyama et al., 2004), Hes1/Hes3 (Hirata et al., 2001); Ngn^{-/-} (Kele et al., 2005, Andersson et al., 2005); Lmx1a^{dr/dr} (ono et al., 2007); Nato3^{-/-} (Ono et al., 2010).

Encontramos una marcada reducción en el número de células que incorporaron BrdU en los mesencéfalos de embriones nulos en Dll1 a los E11.5 principalmente en los dominios ventrolaterales, a diferencia del control, por lo que existe una disminución en la capacidad de proliferar de los progenitores neurales, que se debió a una diferenciación precoz, según lo observado con β III-tubulina y Th en mesencéfalos de embriones nulos en Dll1 a los E10.5 y más evidente a los E11.5 que se asemeja a una etapa más avanzada de desarrollo (Fig. 12A) y resultados que se corroboraron en nuestros ensayos con neuroesferas (Fig. 19). Numerosos estudios describen que la falta de señalización de la vía Notch muestra diferenciación prematura (Conlon et al., 1995; Hrabe de Angelis et al., 1997; Ohtsuka et al., 1999; Hirata et al., 2001; Lutolf et al., 2002; Hatakeyama et al., 2004; Kameda et al., 2011). Como no se pudo evaluar etapas posteriores a los E11.5 debido a la letalidad del embrión nulo en Dll1, utilizamos la estrategia del cultivo de explantes que ha sido probada previamente en nuestro laboratorio (Baizabal y

Covarrubias, 2009) y observamos que los cultivos de explantes recapitulan las últimas fases de la neurogénesis dopaminérgica en ausencia de Dll1 y se puede observar un estado más avanzado de diferenciación/maduración con respecto a lo que ocurre en los explantes silvestres.

Para estimar las transiciones entre el linaje relacionado con los precursores dopaminérgicos en su curso de diferenciación, analizamos los mARNs de tres factores de transcripción: Msx1/2, Ngn2 y Nurr1, en mesencéfalos y en cultivo de explantes en donde la señal de Notch se inhibió con DAPT. Se observó que la expansión de los precursores dopaminérgicos que ocurre en la ZV está asociado con el nivel de expresión de Msx1/2 en el mesencéfalo ventral. En estados tempranos de diferenciación (E9.5-E11.5) los precursores dopaminérgicos pueden ser reconocidos por la presencia de Sox2, el número de células Sox2+/Msx1/2+ comenzó a disminuir después de E11.5. A E12.5. la diferenciación de los precursores dopaminérgicos está todavía en marcha mostrando una gran proporción de progenitores Neurog2+ alrededor del nicho de la línea media pero bajos niveles de Msx1/2, sugiriendo un decline significativo en los precursores dopaminérgicos.

El incremento de los niveles de mARN de Th y el número relativo de neuronas dopaminérgicas en ausencia de Dll1 sugiere que Notch regula la emergencia de características dopaminérgicas. Se observó un incremento en los niveles de mARN de Ngn2, Nurr1 y Th en mesencéfalos nulos en Dll1 que sugiere que las poblaciones dopaminérgicas están emergiendo prematuramente. Observamos que la reducción en la dosis de Dll1 promueve diferenciación dopaminérgica en asociación con un decremento de las CPN específicas tempranas (por ejemplo Msx1+ y Ngn2+). Nuestros resultados sugieren que la neurogénesis y la adquisición de características moleculares de un tipo en particular, están acopladas (Yun et al., 2002; Trujillo-Paredes et al., 2016).

VIII. CONCLUSIONES

La producción de neuronas específicas durante el desarrollo debe cumplir el número necesario para sus funciones en el cerebro adulto. Además, se espera que la diferenciación neuronal esté coordinada en tiempo con el proceso que controla la migración de neuroblastos o neuronas jóvenes al sitio definitivo de residencia, así como la conexión exitosa entre neuronas. Se piensa en general que más neuronas que las necesarias son producidas y que muchas mueren a medida que avanzan de la ruta de origen hacia su hogar y sus axones compiten para alcanzar sus células blanco. Sin embargo, solo en pocos casos ha sido demostrado el papel de la neurodegeneración natural en el establecimiento del número final de neuronas, por lo tanto, es relevante determinar la contribución de neuronas producidas. Aquí encontramos que el flujo de diferenciación regulado por Notch de precursores dopaminérgicos mesencefálicos hasta convertirse en neuronas dopaminérgicas es crítico para determinar el número de neuronas dopaminérgicas presentes en el cerebro adulto.

El uso de la terapia génica para la neuroprotección en la EP tiene que ser continuamente reevaluado a la luz de los recientes hallazgos sobre la etiología de la enfermedad. Mientras que los genes implicados en las formas familiares de la enfermedad representan los objetivos más racionales para la terapia génica, ha sido difícil establecer una prueba de concepto para los enfoques de rescate. La enfermedad parece perturbar las actividades lisosómicas y mitocondriales que son esenciales para el mantenimiento a largo plazo de la homeostasis neuronal. Los enfoques neuroprotectores para apoyar estas vías a menudo causan efectos inesperados, en particular cuando las modificaciones genéticas conducen a cambios duraderos en la expresión de factores clave. Además, ahora se considera que los depósitos erróneos y agregados de α -sinucleína que representan un sello distintivo de la patología de la EP, pueden propagarse a través de sistemas neuronales en el SNC periférico y mediante mecanismos que permanecen poco claros. La patología no parece más restringida al sistema nigroestriatal, y los síntomas motores asociados a la vulnerabilidad selectiva de las neuronas

dopaminérgicas, y que han sido el principal objetivo de la terapia génica hasta el momento, son probablemente la punta del iceberg. Por lo tanto, la EP debe considerarse como un síndrome complejo que probablemente requerirá tratamiento terapéutico combinado.

Tanto la falta de sistemas modelo humanizados satisfactorios, junto con el conocimiento incompleto de las causas multifactoriales en la mayoría de los trastornos neurodegenerativos, así como un conocimiento profundo de las alteraciones (epi) genéticas, ha impedido el progreso en la obtención de más conocimientos para realizar estudios traslacionales. En los últimos años, sin embargo, la tecnología de células troncales ha estado ofreciendo un enfoque alternativo para estudiar y tratar trastornos cerebrales humanos. Debido a esta tecnología, ahora podemos obtener una fuente teóricamente inagotable de células neurales humanas y precursores *in vitro* que ofrecen una plataforma para el modelado de enfermedades y establecer intervenciones terapéuticas. Además de la posibilidad de aumentar nuestro conocimiento general de cómo las alteraciones (epi) genéticas contribuyen a la patología de enfermedades neurodegenerativas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aaset, J., Dusek, P. and Roos, P.M. (2018) Prevention of progression in Parkinson's disease. *Biometals* <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0131-5>
- Abeliovich, A. and Hammond, R. (2007) Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev Biol* 304, 447-54.
- Acampora, D., Annino, A., Tuorto, F., Puelles, E., Lucchesi, W., Papalia, A. and Simeone A. (2005) Otx genes in the evolution of the vertebrate brain. *Brain Research Bulletin*. 66, 410-420.
- Adams, K.A., Maida, J.M., Golden, J.A., Riddle, R.D. (2000) The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmic organizer. *Development* 127, 1857–1867.
- Alavian, K.N., Scholz, C., Simon, H.H. (2008) Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: the full circle of life and death. *Mov. Disord.* 23, 319–328.
- Alexandre, P. And Wassef, M. (2005) Does the isthmic organizer influence D/V patterning of the midbrain? *Brain Research Reviews*. 6, p.127-133
- Anderson, D.J. (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual* *Neuron*. 30, 19-35.
- Andersson, E., Jensen, J.B., Parmar, M., guillemot, F. and Bjorklund, A. (2006a) Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development*. 133, 507-16.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and Ericson, J. (2006b). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*. 124, 393-405.

- Ang, S. L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133, 3499-506.
- Baizabal, J.-M., and Covarrubias, L., (2009) The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Developmental Biology*. 10, p. 49-59.
- Bansod, S., Kageyama, R. and Ohtsuka, T. (2017) Hes5 regulate the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. *Development* 144, 3156-3167.
- Barton, A. and Fendrik, A.J. (2013) Sustained vs. oscillating expressions of Ngn2, Dll1 and Hes1: A model of neural differentiation of embryonic telencephalon. *Journal of Theoretical Biology* 328:1-8.
- Benedito, R. And Duarte, A. (2005). Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expression Patterns*. 5, 750-755
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guénet, J-L. And Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development*. 121, 2407-2418.
- Bodea, G. O and Blaess, S. (2015). Establishing diversity in the dopaminergic system. *FEBS Letters*. 589. 3773-3785.
- Bonilla, S., Hall, A. C., Pinto, L., Attardo, A., Gotz, M., Huttner, W. and Arenas, E. (2008) Identification of midbrain floor plate radial glia cells as dopaminergic progenitors. *Glia* 56, 809-820
- Borggreffe, T. and Giaimo, D. (2018) Molecular mechanisms of Notch signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3

- Borggreffe, T. And Oswald, F. (2008). The notch signaling pathway: transcriptional regulation at notch target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2-16
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. And Young, R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 23; 122(6):947-956.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-89. □
- Brown, C.R., Butts, J.C., McCreedy, D.A. and Sakiyama-Elbert, S.E. (2014) Generation of V2a Interneurons from Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT.* 23(15) 1765-1776
- Carlson, B. M. 2014. *Human Embryology and Developmental Biology.* ELSEVIER SAUNDERS. Quinta Edición.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A. and Gottgens, B. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* 11, 831-844.
- Cau, E. And Blader, P. (2009). Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Dev.* 4:36.
- Cearns, M.D., Escuin, S., Alexandre, P., Greene, N. D.E. and Coop, A.J. (2016) Microtubules, polarity and vertebrate neural tube morphogenesis. *J. Anat.* 229, 63-74.
- Cheung, L., Le Tissier, P., Goldsmith, S. G.J., Treier, M., Lovell-Badge, R. and Rizzoti, K. (2018) NOTCH activity differentially affects alternative cell fate acquisition and maintenance. *eLife* 2018;7:e33318. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.33318>

- Chitnis, A. and Balle-Cuif, L. (2016) The notch meeting: an odyssey from structure to function. *Development* 143, 547-553.
- Chung, S., Leung, A., Han, B.S., Chang, M.Y., Moon, J.I., Kim, C.H., Hong, S., Pruzsak, J., Isacson, O., Kim, K.S. (2009) Wnt1-Imx1a forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the SHH– FoxA2 pathway. *Cell Stem Cell* 5, 646–658.
- Conlon, R.A., Reaume, A.G. and Rossant, J. (1995) Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*. 121, 1533-1545.
- Crawford, T. Q. and Roelink, H. (2007). The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev. Dyn.* **236**, 886-892.
- Crossley, P. H., and Martin, G. R. (1995) The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-451.
- Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J.H., Brunet, J.F., Ericson, J., Perlmann, T. (2011) Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development* 138, 3399–3408.
- D'Souza, B., Miyamoto, A., Weinmaster, G. (2008) The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27, 5148–5167.
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D. and Rossant, J. (2004) Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes and Development* 18:2474-2478.
- Dworkin, S. and Jane, S. (2013) Novel mechanisms that pattern and shape the midbrain-hindbrain boundary. *Cell. Mol. Life Sci.* 18:

- Ferri, A.L.M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J.A. and Ang, S.-L. (2007) Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761-2769.
- Gaiano, N. And Fishell, G. (2002) The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25:471-90.
- Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Adams, N. C., Lin, H. C., Holash, J., Thurston, G. and Yancopoulos, G. D. (2004) Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *PNAS* 9, 101 (45) 15949-15954.
- Gorbayrak, N.S., Piryatinsky, I., Gavett, R.A. and Ahmed, O.J. (2014). Mixed effects of deep brain stimulation on depressive symptomatology in Parkinson's disease: a review of randomized clinical trials. *Frontiers in neurology.* 5(154), 1- 6.
- Gordon, W. R., Arnett, K. L. And Blacklow, S. C. (2008). The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *Journal of Cell Science.* 121, 3109-3119
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabe de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S. and Mohier, E. (2003). Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development.* 130, 1391-1402.
- Ferri, A. L.M., Lin, W., Mavromatakis, Y.E., Wang, J.C., sasaki, H., Whitsett, J. A. and Ang, S-L. (2007) Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development.* 134, 2761-2769.

- Fortini, M. E. (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Developmental Cell*. 19, 633-647.
- Halder, D., Chang, G-E., De, D., Cheong, E., Kim, K-K. and Shin, I. (2015) Combining suppression of stemness with lineage-specific induction leads to conversion of pluripotent cells into functional neurons. *Chemistry & Biology* 22, 1512-1520.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539-5550.
- Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2000) Generation of structurally and functionally distinct factors from the basic helix-loop-helix gene Hes3 by alternative first exons*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 275;25(23):19083-19089.
- Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2001) Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. *The EMBO Journal*. 16:4454-4466.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J. And Gossier, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature*. 386, 717-21.
- Hurlbut, G. D., Kankel, M. W., Lake, R. J. And Artavanis-Tsakonas, S. (2007) Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Current Opinion in cell Biology*. 19:166-175.
- Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P. A. and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35-44.

- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and Kageyama, R. (2010) Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *The Journal of Neuroscience*. 30(9):3489-3498.
- Irvine, D. (2016) A receptor for all occasions. *Cell* 164, 599-600.
- Ishibashi, M., Ang, S-L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot, F. (2015). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *GENES & DEVELOPMENT* 9:3136-3148.
- Jessell, T. M. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*. 1:20-9
- Joksimovic, M., Anderegg, A., Roy, A., Campochiaro, L., Yun, B., Kittappa, R., McKay, R., Awatramani, R., (2009) Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19185–19190.
- Kadokawa, Y. And Marunouchi, T. (2002) Chimeric analysis of notch2 function: a role for notch2 in the development of the roof plate of the mouse brain. *Developmental Dynamics*. 225:126-134
- Kageyama, R. And Ohtsuka, T. (1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Research*. 9, 179-188
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T. (2007). The hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 134:1243-1251.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T. (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Develop. Growth Differ*. 50.S97-S103.

- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. And Imayoshi, I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature Neuroscience* 11, 1247-1251.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. and Imayoshi, I. (2009) Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 21:733-740.
- Kageyama, R., Shimojo, H. and Isomura, A. (2018) Oscillatory control of Notch signaling in development. *Molecular Mechanisms of Notch Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* 1066, 265-277.
- Kameda, Y., Saitoh, T. and Fujimura, T. (2011) Hes1 regulates the number and anterior-posterior patterning of mesencephalic dopaminergic neurons at the mid/hindbrain boundary (isthmus). *Developmental Biology* 358: 91-101
- Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H.R., Kurimoto, K., Saitou, M. and Matsuzaki, F. (2008) Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development* 135, 3113-3124.
- Kawaguchi, D., Yoshimatsu, T., Hozumi, K. and Gotoh, Y. (2008) Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development* 135, 3849-3858.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. and Ang, S.-L. (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495-505.
- Kiecker, C. And Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature Reviews Neuroscience*. 6, 533-564.
- Kiernan, A. E., Xu, J. and Gridley, T. (2006). The notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *Plos genetics*. 2, 0027-0038.

- Kitamoto, T., Takahashi, K., Takimoto, H., Tomizuka, K., Hayasaka, M., Tabira, T. and Hanaoka, K. (2005). Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: Analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 331. 1154-1162.
- Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2014) Expression dynamics and functions of Hes factors in development and diseases. *Current Topics in Developmental Biology*. 110:263-283.
- Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K. and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 15;23(16):1870-5.
- Kopan, R. and Llagan, M. (2009). The canonical notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.
- Kouwenhoven, W. M., Oerthel, L.v. and Smidt, M.P. (2017) Pitx3 and En1 determine the size and molecular programming of the dopaminergic neuronal pool. *PLoS ONE* 12(8):1-18
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajeski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L. and Gridley, T. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 14:1343-1352.
- Krebs, L.T., Shutter, J.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K.L. and Gridley, T. (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathways mutants. *Genes and Development*. 18:2469-2473.
- Kusumi, K., Dunwoodie, S.L. and Krumlauf, R. (2001). Dynamic expression patterns of the pudgy/spondylocostal dysostosis gene Dll3 in the developing nervous system. *Mechanisms of Development*. 100, 141-144.

- Lai, E.C. (2004). Notch signaling: Control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973
- Lee, H., Lee, H. And Moody, S. (2014) Neural transcription factors: from embryos to neural stem cells. *Mol. Cells.* 37(10):705-712.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B. and Gessler, M. (1999) Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* 85:173-177.
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., Van Western, D., Latt, J., Rehncrona, S., Brundin, P., Bjorklund, A., Lindvall, O., and Li, J-Y. (2016) Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *PNAS.* 113(23). 6544-6549.
- Lindsell, C.E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A. And Weinmaster, G. (1996) Expression patterns of jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-Receptor pairs that may function in neural development. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 8, 14-27
- Liu, A. and Joyner, A. L. (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* 128, 181-91.
- Lopiano, L., Modugno, N., Marano, P., Sensi, M., Meco, G., Cannas, A., Gusmaroli, G., Tamma, F., Mancini, F., Quatrone, R., Constanzo, A. M., Gualberti, G., Melzi, G., Papparatti, U.dL. and Antonini, A. (2016) Motor outcomes in patients with advanced Parkinson's disease treated with levodopa/carbidopa intestinal gel in Italy: an interim analysis from the GREENFIELD observational study. *Neurol Sci.* 37:1785-1792
- Louvi A and Artavanis-Tsakonas S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural. *Development.* 7, 93-102

- Lubman O Y, Liagan X G, Kopan R and Barrick D. (2007). Quantitative dissection of the notch:CSL interaction: Insights into the notch transcriptional switch. *J Mol Biol.* 19;365(3):577-589
- Lutolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U. And Taylor, V. (2002) Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development.* 129, 373-385
- Man, J.H.K., Groenink, L. and Gaiazzo, M. (2018) Cell reprogramming approaches in gene- and cell-based therapies for Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release* 286:114-124
- Marklund, U., Hansson, E. M., Sundstrom, E., Hrabe de Angelis, M., Przemeck, G. K.H., Lendahl, U., Muhr, J. And Ericson, J. (2010) Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression. *Development* 137, 437-445.
- Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L. and Martin, G. R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* 126, 1189-200.
- McCright, B., Lozier, J. and Gridley, T. (2006) Generation of new Notch2 mutant alleles. *Genesis* 44:29-33.
- Merkle, F. T. and Alvarez-Buylla, (2006). A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 18, 704-9.
- Mesman, S., Krüse, S. J. and Smidt, M. P. (2018) Expression analyzes of early factors in midbrain differentiation programs. *Gene Expression Patterns* 27:8-15.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E. and Joyner, A. L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401, 161-4.

- Mizutani, K., Yoon, K., Dang, L., Tokunaga, A and Gaiano, N. (2007) Differential notch signaling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 440, 351-355.
- Nakamura, H. and Watanabe, Y. (2005). Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol* 49, 231-5.
- Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y., Ono, Y. (2010). Lmx1a and Lmx1b cooperate with Foxa2 to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Dev. Biol.* 339, 101–113.
- Niethammer, M., Tang, C.C., LeWitt, P.A., Rezai, A.R., Leehey, M.A., Ojemann, S.G., Flaherty, A.W., Eskandar, E.N., Kostyk, S.K., Sarkar, A., Siddiqui, M.S., Tatter, S.B., Schwalb, J.M., Poston, K.L., Henderson, J.M., Kurlan, R.M., Richard, I.H., Sapan, C.V., Eidelberg, D., During, M.J., Japlitt, M.G. and Feigin, A. (2017). Long-term follow-up of a randomized AAV2-GAD gene therapy trial for Parkinson’s disease. *JCI Insight*. 6;2(7) 1-10.
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N.D. E. and Coop, A.J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 144, 552-566.
- Nouri, N. and Awatramani, R. (2017) A novel floor plate boundary defined by adjacent En1 and Dbx1 microdomains distinguishes midbrain dopamine and hypothalamic neurons. *Development* 144, 916-927.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO Journal*. 18, 2196-2207.

- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2001) Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 276, 32 (10): 30467-30474.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L. G., Wurst, W. and Simeone, A. (2008) Anterior-posterior graded response to *Otx2* controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135, 3459-70.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., Takahashi, J. and Imai, T. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213-3225.
- Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. (2011) Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840–909.
- Placzek, M. and Briscoe, J. (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6, 230-236. □
- Poulin, J-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C. S., Dombeck, D. A., Deisseroth, K. and Awatramani, R. (2018) Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci*. 13 August 2018; doi:10.1038/s41593-018-0203-4
- Prakash, N. And Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell. Mol. Life Sci*. 19, p. 187-206.
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puellas, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D. M. et al. (2006). A *Wnt1*-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89-98.

- Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S. L. et al. (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat Neurosci* 6, 453-460.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S. L., Wurst, W. and Simeone, A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 545, 203-748.
- Puelles, L., and Verney, C. (1998). Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase- immunoreactive neurons in human embryos. *J. Comp. Neurol.* 394, 283–308.
- Puelles L. (2001). Evolution of the Nervous System. *Brain Research Bulletin.* 55, 695-710
- Rizek, P., Kumar, N. and Jog, M. (2016) An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *CMAJ.* 188 (16). 1157-1165.
- Sarkar, S., Raymick, J. and Imamm, S. (2016) Neuroprotective and Therapeutic strategies against Parkinson’s disease: recent perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17. 904.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M., Gruss, P. (1997). Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14518–14523.
- Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Kori, H., Miyachi, H. and Kageyama, R. (2016) Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 1;30(1):102-16.

- Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58(10):52-64.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2011) Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Frontiers in neuroscience*. 5(78): 1-7.
- Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D. and O'Leary, D. D. (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J Neurosci* 21, 300-321
- Simon, H. H., Thuret, S. and Alberi, L. (2004). Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 318, 53- 61.
- Smidt, M. P. and Burbach, J. P. (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8, 21-32.
- Smidt, M. P., Asbreuk, C. H., Cox, J. J., Chen, H., Johnson, R. L. and Burbach, J. P. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci* 3, 337-340.
- Smith, J. L. and Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20, 510-7.
- Stoker, T. B. and Barker, R. A. (2018) Regenerative Therapies for Parkinson's Disease: An Update. *BioDrugs* 32:357-366
- Surmeier, D. J. (2018) Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *The FEBS Journal*. Doi:10.1111/febs.14607
- Teratani-Ota, Y., Yamamizu, K., Piao, Y., Sharova, L., Amano, M., Yu, H., Schlessinger, D. and Ko. M.S.H. (2016) Induction of specific neuron types by overexpression of single transcription factors. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*. 52:961-973.

- Tieng, V., Stoppini, L., Villy, S., Fathi, M., Dubois-Dauphin, M. and Krause, K-H. (2014) Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*. 23(13) 1535-1547
- Trujillo-Paredes, N., Valencia, C., Guerrero-Flores, G., Arzate, D.M., Baizabal, J.M., Guerra-Crespo, M., Fuentes-Hernández, A., Zea-Armenta, I. and Covarrubias, L. (2016) Regulation of differentiation flux by Notch signaling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain. *Biology Open*. 5, 336-347.
- Urbanek, P., Fetka, I., Meisler, M.H., Busslinger, M. (1997) Cooperation of Pax2 and Pax5 in midbrain and cerebellum development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5703–5708.
- Valdés, P. and Schneider, B.L. (2016) Gene therapy: A promising approach for neuroprotection in Parkinson's disease?. *Frontiers in neuroanatomy*. 10 (123), 1-8.
- Veenvliet, J.V. and Smidt, M. P. (2014) Molecular mechanisms of dopaminergic subset specification: fundamental aspects and clinical perspectives. *Cell. Mol. Life Sci*. 71:4703-4727.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R. and Ang, S. L. (2005) Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J Neurosci* 25, 4856-67.
- Vogt Weisenhorn, D.M., Giesert, F. And Wurst, W. (2016). Diversity matters – heterogeneity of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and its relation to Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry*. 139(suppl.1) 8-26.
- Xu, J., Krebs, L.T. and Gridley, T. (2010) Generation of mice with a conditional null allele of the Jagged2 gene. *Genesis*. 48:390-393.
- Xu, Z., Chu, X., Jiang, H., Schilling, H., Chen, S. and Feng, J. (2017) Induced

dopaminergic neurons: A new promise for Parkinson's disease. *Redox Biology* 11. 606-612.

- Yan, C.H., Levesque, M., Claxton, S., Johnson, R.L., Ang, S.L. (2011). Lmx1a and Lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J. Neurosci.* 31, 12413–12425.
- Yang, M., Hong, J., Kim, S., Lee, K., Park, K., Kwon, S., Kweon, D., Koh, Y., Gaiano, N and Yoon, K. (2011) Among γ -secretase substrates notch1 alone is sufficient to block neurogenesis but does not confer self-renewal properties to neural stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404, 133-138.
- Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M., Rosenthal, A. (2001). Distinct regulators control the expression of the mid–hindbrain organizer signal FGF8. *Nat. Neurosci.* 4, 1175–1181.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A. and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 13, 755-768.
- Yoon, K. and Gaiano, N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8, 709-15.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G. and Rubenstein, J. L. R. (2002) Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029-5040.
- Wallen, A. and Perlmann, T. (2003). Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991:48-60

- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: p. 99-108.
- Zhang, R., Engler, A. and Taylor, V. (2018) Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell Tissue Res* 371:73-89
- Zou, H., Su, C.J., Shi, M., Zhao, G.Y., Li, Z.Y., Guo, C. and Ding, Y.Q. (2009) Expression of the LIM-homeodomain gene *Lmx1a* in the postnatal mouse central nervous system. *Brain Res. Bull.* 87,306-312

RESEARCH ARTICLE

Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain

Niurka Trujillo-Paredes^{1,*}, Concepción Valencia^{1,*}, Gilda Guerrero-Flores^{1,*}, Dulce-María Arzate¹, José-Manuel Baizabal¹, Magdalena Guerra-Crespo², Ayari Fuentes-Hernández³, Iván Zea-Armenta³ and Luis Covarrubias^{1,†}

ABSTRACT

Notch signalling is a well-established pathway that regulates neurogenesis. However, little is known about the role of Notch signalling in specific neuronal differentiation. Using *Dll1* null mice, we found that Notch signalling has no function in the specification of mesencephalic dopaminergic neural precursor cells (NPCs), but plays an important role in regulating their expansion and differentiation into neurons. Premature neuronal differentiation was observed in mesencephalons of *Dll1*-deficient mice or after treatment with a Notch signalling inhibitor. Coupling between neurogenesis and dopaminergic differentiation was indicated from the coincident emergence of neuronal and dopaminergic markers. Early in differentiation, decreasing Notch signalling caused a reduction in NPCs and an increase in dopaminergic neurons in association with dynamic changes in the proportion of sequentially-linked dopaminergic NPCs (*Msx1/2+*, *Ngn2+*, *Nurr1+*). These effects in differentiation caused a significant reduction in the number of dopaminergic neurons produced. Accordingly, *Dll1* haploinsufficient adult mice, in comparison with their wild-type littermates, have a consistent reduction in neuronal density that was particularly evident in the substantia nigra pars compacta. Our results are in agreement with a mathematical model based on a *Dll1*-mediated regulatory feedback loop between early progenitors and their dividing precursors that controls the emergence and number of dopaminergic neurons.

KEY WORDS: Delta-like 1, Notch, Neurogenesis, Dopaminergic neurons

INTRODUCTION

At the cellular level, early embryogenesis involves stem and progenitor cell proliferation followed by their exit from the cell cycle and concurrent differentiation into specific cell types. In this context, the size and shape of the nervous system largely depend on the number of times that a neural stem cell (NSC) or its progeny re-enters the cell cycle. Importantly, timing of cell differentiation may also influence cell fate choice, given the fact that NSCs appear to change their potential over time throughout development (Bassett and

Wallace, 2012; Okano and Temple, 2009). In particular, it has been shown that specific cortical neurons arise at a different developmental time, suggesting that specification is associated with the time of birth (Okano and Temple, 2009; Shen et al., 2006). Nonetheless, it is still unclear how cell differentiation timing influences cell fate choice and the histogenesis of specific brain regions.

The evolutionarily conserved Notch signalling pathway mediates cell-cell interactions that regulate the process of differentiation of neighbouring cells, providing a mechanism for consistent cell fate determination and patterning in time and space of highly organized tissues (Louv and Artavanis-Tsakonas, 2006; Pierfelice et al., 2011). Notch is a family of transmembrane receptors that are activated by transmembrane ligands such as Delta-like (*Dll1*, *Dll3* and *Dll4*) and Jagged (*Jag1* and *Jag2*) in mammals. Upon activation, the Notch intracellular domain (NICD) is released and translocated to the nucleus, where forms a complex with the DNA-binding protein RBPj (Pierfelice et al., 2011). In the CNS of mammals, the NICD-RBPj complex induces the expression of *Hes1* and *Hes5*, genes encoding basic helix-loop-helix transcription factors that, in turn, can repress the expression of pro-neural genes (including Notch ligand genes), thereby inhibiting neuronal differentiation and maintaining the pool of neural precursor cells (NPC) (Ohtsuka et al., 1999). Blocking this pathway at different levels causes premature differentiation of NPC resulting in reduction in the number and spectrum of neuron types (Hatakeyama et al., 2004; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Ohtsuka et al., 1999). Thus, Notch signalling appears to be an essential component of the mechanisms that lead to the production of the neuronal diversity characteristic of the brain starting from apparently equivalent NSCs.

Despite the above, very little is known about the role of Notch signalling in the generation of specific brain regions and/or neuron types. In the developing midbrain, *Notch1*, *2*, *3*, *Dll1* and *Jag1* are expressed in the ventricular zone (Lindsell et al., 1996). *Notch1* and *Notch2* in rodents are essential genes (Conlon et al., 1995; Swiatek et al., 1994) but, while *Notch2* appears mainly involved in diencephalon and mesencephalon roof plate development (Kadokawa and Marunouchi, 2002), conditional *Notch1* deletion along the midbrain-hindbrain region results in the premature onset of neurogenesis (Littolf et al., 2002). *Dll1* and *Dll4* are also essential genes in early mouse development (Duarte et al., 2004; Hrabě de Angelis et al., 1997); *Dll1*, in addition to be transiently expressed during gastrulation and early organogenesis, during CNS development is expressed in most of the neural tube (Bettenhausen et al., 1995). Interestingly, in contrast with other brain regions, the mesencephalic floor plate (FP) expresses *Dll1* (Ono et al., 2007), which associates with the peculiar neurogenic activity of this region (Joksimovic et al., 2009; Ono et al., 2007). Gene expression patterns and NPC differentiation potential of cells in the mesencephalic ventral midline (Lin et al., 2009; Ono et al., 2007) as well as fate mapping

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos 62210, México. ²Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Coyoacán, Ciudad de México 04510, México. ³Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México. *These authors contributed equally to this work.

[†]Author for correspondence (covarrub@biolunam.mx)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 10 July 2015; Accepted 22 January 2016

experiments (Kittappu et al., 2007) indicate that mesencephalic dopaminergic neurons originate from precursors within the FP. Therefore, *Dll1* may play a role in the positioning, maintenance, and patterning of dopaminergic neurons and their NPCs.

Dopaminergic differentiation is characterized by the sequential expression of genes encoding certain transcription factors (e.g. *En2*, *Otx2*, *Foxa2*, *Lmx1a*, *Msx1*, *Ngn2*, *Nurr1*, *Pitx3*), which are downstream targets of extrinsic signals such as *Shh*, *Fgf8* and *Wnt1* (for a review see: Abeliovich and Hammond, 2007; Ang, 2006; Guerrero-Flores and Covarrubias, 2011; Hegarty et al., 2013). These transcription factors regulate the transition between different cell populations along the ventricular-alar axis of the developing ventral mesencephalon. Interestingly, *Ngn2* and *Mash1*, recognized as proneural transcription factors, control the expression of *Dll1* and, in consequence, also of some genes associated with Notch signalling, such as *Hes5* (Castro et al., 2006; Kele et al., 2006).

Regulation of expression of Notch signalling genes has been studied in association with mesencephalic dopaminergic differentiation (Castro et al., 2006; Deng et al., 2011; Kele et al., 2006; Ono et al., 2007); however, in contrast, little is known about how Notch signalling regulates dopaminergic differentiation. In this study, we investigated the function of Notch signalling in the control of dopaminergic neurogenesis and the number of dopaminergic neurons produced.

RESULTS AND DISCUSSION

Dll1 and *Hes5* are key mediators of Notch signalling in the mesencephalic dopaminergic niche

Dll1 transcript distribution in the developing mesencephalon has been previously determined by *in situ* hybridization; however, probably due to the quantitative limitations of this technique, the expression pattern has not been well defined showing scattered distribution with an apparent higher number of positive cells towards the subventricular area (Deng et al., 2011; Kele et al., 2006; Lahti et al., 2011). Here, we estimated *Dll1* transcript distribution by *in situ* determination of *lacZ* activity in *Dll1^{lacZ}* mouse embryos, particularly at the initiation of dopaminergic differentiation. In the mesencephalon of embryonic day (E)10.5 and E11.5 embryos, *Dll1* expression occurred mainly in the subventricular area with the highest levels found in the ventral half. Particularly in the dopaminergic niche at E10.5, the floor plate showed a thin layer of *lacZ*-stained cells just below the ventricular epithelium, which contrast with the pattern in the hindbrain (Fig. 1A). In E11.5 mesencephalons, a wider subventricular area of *Dll1* expression was found around the ventral midline, corresponding to the location of intermediate progenitors, (Fig. 1A). At this latter stage, the ventral mesencephalon contained higher mRNA levels of *Dll1* than of *Dll3* or *Dll4*, whereas those of *Notch1* and *Notch2* were similar (Fig. 1B). In order to determine whether *Dll1* is responsible for most Notch signalling occurring in the floor plate of mesencephalon in association with dopaminergic neuron differentiation, we compared the expression levels of two Notch effector genes, *Hes1* and *Hes5*, in the ventral mesencephalon of E11.5 embryos lacking *Dll1*. Both *Hes1* and *Hes5* were expressed in wild-type samples, but the latter was apparently more than 100-fold more abundant than the former (Fig. 1B). Interestingly, the complete absence of *Dll1* levels caused a corresponding near 30-fold reduction in *Hes5* expression, whereas *Hes1* expression was only partially (about half) affected (Fig. 1C). In agreement with this conclusion, developmental downregulation of *Dll1* expression from E11.5 to E15.5 was best correlated with the expression level of *Hes5* (Fig. 1B). Therefore, *Dll1* and *Hes5* are the major upstream and downstream mediators, respectively, of Notch signalling in the developing ventral mesencephalon.

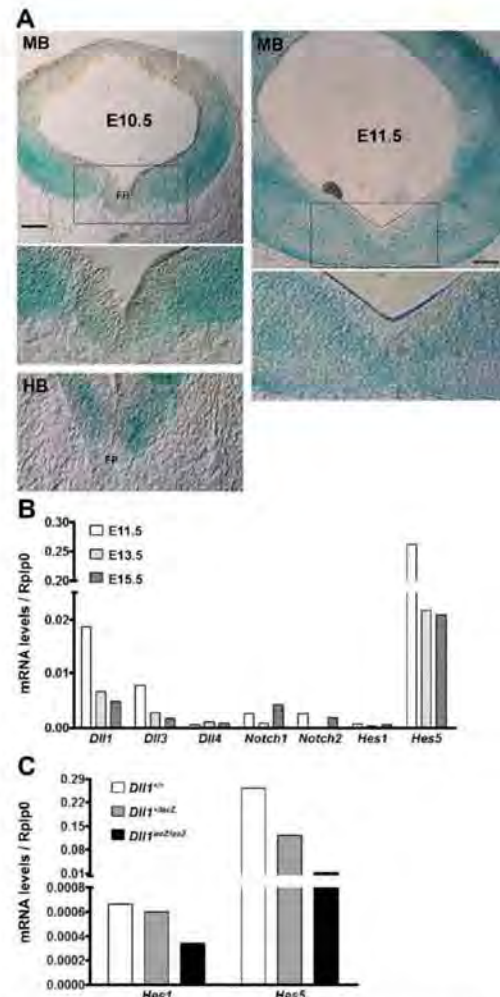


Fig. 1. *Dll1*-Notch signalling in the mesencephalic dopaminergic niche. (A) Midbrains (MB) or hindbrains (HB) from *Dll1^{lacZ}* mouse embryos at the stage indicated were stained for the *lacZ* reporter and slices from them are shown. FP, floor plate. Scale bar is 100 μ m. (B) Total RNA was extracted from wild-type mouse embryos (pool of 10) at different stages (E11.5, E13.5 and E15.5) and the expression level of the genes indicated determined by RT-qPCR. Note that *Dll1* and *Dll3* followed a similar expression pattern that closely correlated with the pattern of *Hes5*. (C) *Hes1* and *Hes5* expression pattern was determined in E11.5 embryos with the genotype indicated. Note that *Hes5* markedly decreased (near 30-fold) in the absence of *Dll1*.

Reduced Notch signalling alters the number of dopaminergic precursor cells without affecting their specification

In order to determine whether Notch signalling has any role in maintaining the organization of the dopaminergic domain in the ventral mesencephalon, we compared the distribution pattern of *Lmx1a* and *Foxa2* in *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos. We also

determined the distribution pattern of Nkx6.1; the gene encoding this transcription factor is expressed lateral to the *Lmx1a* expression domain and is repressed in dopaminergic NPCs after proper specification (Andersson et al., 2006b; Nakatani et al., 2010). Specification of dopaminergic NPC occurs between E9-E10 and neuronal differentiation markers start to be detected from E11 with a peak between E12 and E13 (Ang, 2006). *Dll1* null mouse embryos die by E12 (Hmbè de Angelis et al., 1997, and our own observations), therefore, we limited the *in vivo* studies up to E11.5, stage at which most embryos are still alive though abnormalities were evident (Fig. S1). As shown in Fig. 2, the distribution pattern of *Lmx1a*, *Foxa2* and *Nkx6.1* is similar in midbrains of *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E10.5 and E11.5; however, at E11.5, although restricted distribution of each protein was still observed, the tissue seemed disorganized and fragile with fewer cells *Lmx1a*⁺ and *Foxa2*⁺ in mesencephalons of mutant than in those of wild-type embryos (Fig. 2B). Note, that within each specific expression domain, a high proportion of cells contained the corresponding marker (Fig. 2B), indicating that the decrease in number of presumably specified cells in mesencephalons of mice lacking *Dll1* is not due to a failure in maintaining the mesencephalic dopaminergic fate. In agreement with these observations, *Lmx1a* and *Foxa2* mRNA levels were similar in ventral mesencephalons of *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E11.5 (Fig. 2C). Interestingly, consistent *Lmx1a* up-regulation was observed in *Dll1*^{+/lacZ} embryos between E13.5 and E15.5 (Fig. 2C). Since *Lmx1a* mRNA levels increased after the rapid decrease in association with specification and differentiation, this latter effect was likely related to a *Lmx1a* function in neuronal maturation. Although less conspicuous, *Foxa2* expression at E13.5 showed a similar correlation (Fig. 2C; see also observations after Notch signalling inhibition in Fig. S2). Therefore, alterations in Notch signalling do not appear to affect dopaminergic niche specification.

The poor expansion of dopaminergic NPCs lacking *Dll1* correlates with the premature detection of neuronal markers

There was no evident increase in cell death around the midline in mutant embryos at E10.5 and, at E11.5 (Fig. S3A, left panels). In contrast, the thinner neural tube of mesencephalons of E11.5 *Dll1* null embryos correlated with a marked reduction in the number of cells that incorporated BrdU in comparison with the number observed in mesencephalons of wild-type embryos (Fig. S3A, right panels and Fig. S3B). These data suggest that, in the absence *Dll1*, the pool of ventral NPCs lining the ventricular zone of mesencephalon decreased due to a diminished capacity to proliferate and/or to a premature differentiation.

The typical radial distribution of NPCs (Nestin⁺ cells) was observed in *Dll1* deficient midbrains at E10.5 but was altered by E11.5 (Fig. 3A). Interestingly, the abundance and distribution of the immature neuronal marker β III-tubulin suggest that neurogenesis is at a more advance stage in the mesencephalons of *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos since E10.5, and became more evident by E11.5 in comparison with wild-type mesencephalons at an equivalent developmental stage (Fig. 3A). Marked reduction in Nestin⁺ cells and the extension of those β III-tubulin⁺ to the ventricular zone was observed at E11.5 in the ventral region of mesencephalons lacking *Dll1* (Fig. 3A). Of note was a pool of Nestin⁺ cells that were commonly detected around the midline in mutant mice; the identity of these cells remains to be determined (see Concluding remarks). Positive cells for NeuN, a mature neuronal marker, were not detected in the dopaminergic niche, even under the precocious differentiation observed in embryos lacking *Dll1* (data not shown and see below). An expression analysis of neurogenic genes in the

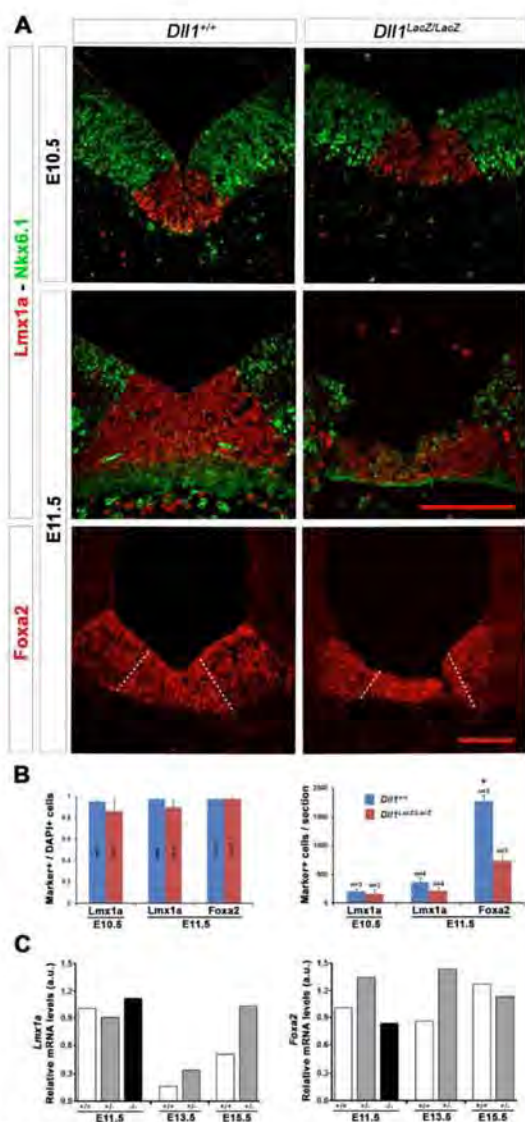


Fig. 2. Expression pattern of specification marker genes in the absence of *Dll1*. (A) The presence of *Lmx1a*, *Foxa2* and *Nkx6.1* was determined in sections of midbrain from E10.5 and E11.5 *Dll1*^{+/+} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} mouse embryos. Scale bars are 200 μ m. (B) The proportion of cells within the domain expressing each specific gene was not affected by the absence of *Dll1*, but there was a marked reduction in the number of *Lmx1a*⁺ and *Foxa2*⁺ cells in midbrains of *Dll1* null mice at E11.5. Data represented as percentage of the total cell number (DAPI⁺ cells) \pm s.d.; n=5; *P<0.05. (C) *Lmx1a* and *Foxa2* mRNA expression levels were consistent with the previous observations (i.e. same proportion of cells with the corresponding marker).

ventral mesencephalon of *Dll1*^{+/+}, *Dll1*^{+/lacZ} and *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos at E11.5 also supports premature neuronal differentiation with little or no marked alterations in the expression of genes associated with mature neurons (Fig. 3B). Of note was that, with the

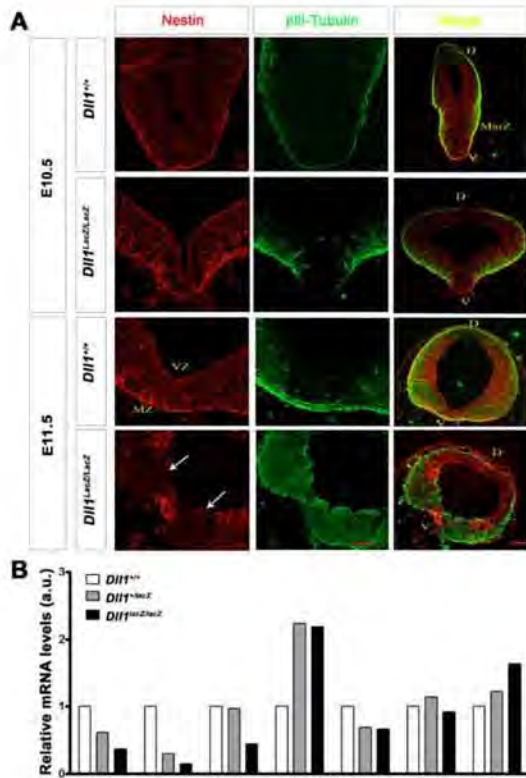


Fig. 3. Neuronal differentiation in developing midbrains in the presence or absence of DII1. (A) At E10.5, Nestin (red) cover most of the midbrain neuroepithelium and, although a significant amount of β III-tubulin started to be detected (green) in the marginal zone of samples from mutant embryos, this was not evident in the most ventral (V) or dorsal (D) area (upper panels); note that the lumen of midbrains from *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos expanded earlier than that of midbrains from wild-type embryos. At E11.5, along with a reduction in Nestin⁺ cells, abundant β III-tubulin was detected in the ventral (V) area of midbrains from *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos, which was distributed along the whole neuroepithelium thickness; a number of Nestin⁺ cells remained in the midline of most cases analysed. Arrows indicate the limits of the floor plate in a mutant sample. MarZ, marginal zone; VZ, ventricular zone; MZ, mantle zone. Scale bars are 200 μ m. (B) The observations in A were confirmed by determining the expression levels of neural precursor (*Sox1*, *Sox2*, *Nestin*) and neuronal (β III-tubulin, *Map2*, *NeuN*, *Tau*) genes in ventral midbrains of embryos with the DII1 genotype indicated. Note that there was a no marked alteration in the expression of genes associated with mature neurons (*Map2*, *NeuN*, *Tau*).

exception of *Nestin* expression, the gene expression levels observed in ventral mesencephalons from *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos were similar to those in samples from *DII1^{+/+;lacZ}* embryos.

Positive cells for Tyrosine hydroxylase (Th), a limiting enzyme in the synthesis of dopamine and one of the earliest markers of dopaminergic neurons, were detected at about the same time in wild-type and mutant tissues (E11.5), but their distribution in the latter samples resembled a more advanced developmental stage (i.e. E12.5) (Fig. 4A). In addition, cell quantification revealed a significant difference in the proportion of Th⁺ cells between mutant and control midbrain tissues at E11.5 (Fig. 4B). In agreement with the premature emergence of Th in mutant mice,

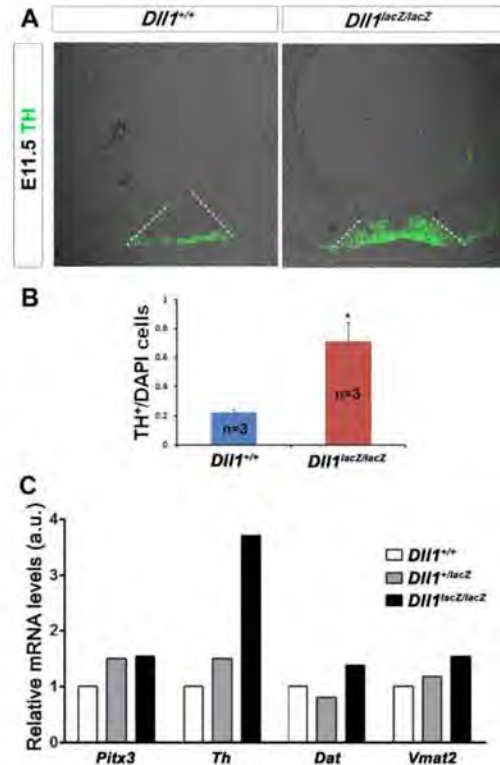


Fig. 4. Dopaminergic differentiation in developing midbrains in the presence or absence of DII1. Dopaminergic differentiation was determined by (A,B) detecting the cells containing tyrosine hydroxylase (Th), the limiting enzyme in dopamine synthesis, or the expression level of its gene (C) in ventral midbrains of E11.5 embryos with the genotype indicated. A significantly larger number of putative dopaminergic neurons were detected in samples from *DII1^{lacZ/lacZ}* in comparison with wild-type embryos (A,B), which positively correlated with the expression levels of *Th* but not of genes that are expressed in mature dopaminergic neurons (C). Scale bar is 100 μ m. White dotted lines indicate the limits of the dopaminergic domain (estimated by the area expressing *Lmx1a*). Data represented as percentage of the total cell number (DAPI⁺ cells) \pm s.d.; n=5; **P*<0.05.

Th mRNA levels were elevated in ventral mesencephalon of *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos (Fig. 4C), in close similarity with the increase in β III-tubulin; a marginal increase was detected in heterozygous embryos. The mRNA levels of *Vmat* and *Dat*, markers of mature dopaminergic neurons, did not markedly change between the different genotypes at E11.5, probably because the analysis was done at an early stage of differentiation.

Mesencephalic explant cultures recapitulate the effects of Notch signalling deficiency on dopaminergic neuronal differentiation

It was not unexpected to find that the premature neuronal differentiation described above at E11.5 was not reflected in the expression of genes encoding proteins associated with mature neurons (e.g. *NeuN*). Since mesencephalic dopaminergic differentiation was not completed before *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos die, we analysed the differentiation potential of mesencephalic NPCs in culture.

Explant cultures embedded in collagen allow dopaminergic differentiation to a stage resembling the distribution and number of dopaminergic neurons present in the mesencephalon of E14-E15 embryos (Baizabal and Covarrubias, 2009). In concordance with the observations in E11.5 embryos, *Dll1^{lacZ/lacZ}* mesencephalic explants cultured for 2 or 4 days showed a higher proportion of Th⁺ cells in comparison with equivalent samples from *Dll1^{+/+}* embryos. Most Th⁺ cells were NeuN⁺ in 2 days cultures of explants from embryos of either genotype, but fewer have this neuronal marker in

4 days cultures of *Dll1^{lacZ/lacZ}* explants than of wild type (Fig. 5A). This is reminiscent to the process observed in newly born dopaminergic neurons of embryos at E13.5, which are NeuN⁺ and lost this marker by E15.5 (see Fig. 7). Therefore, late phases of dopaminergic neurogenesis in the absence of Dll1 can be observed in explant cultures, which showed more advanced differentiation/maturation with respect to that occurring in wild-type explants.

In order to get more insights into the direct role of Notch signalling in dopaminergic differentiation, we cultured

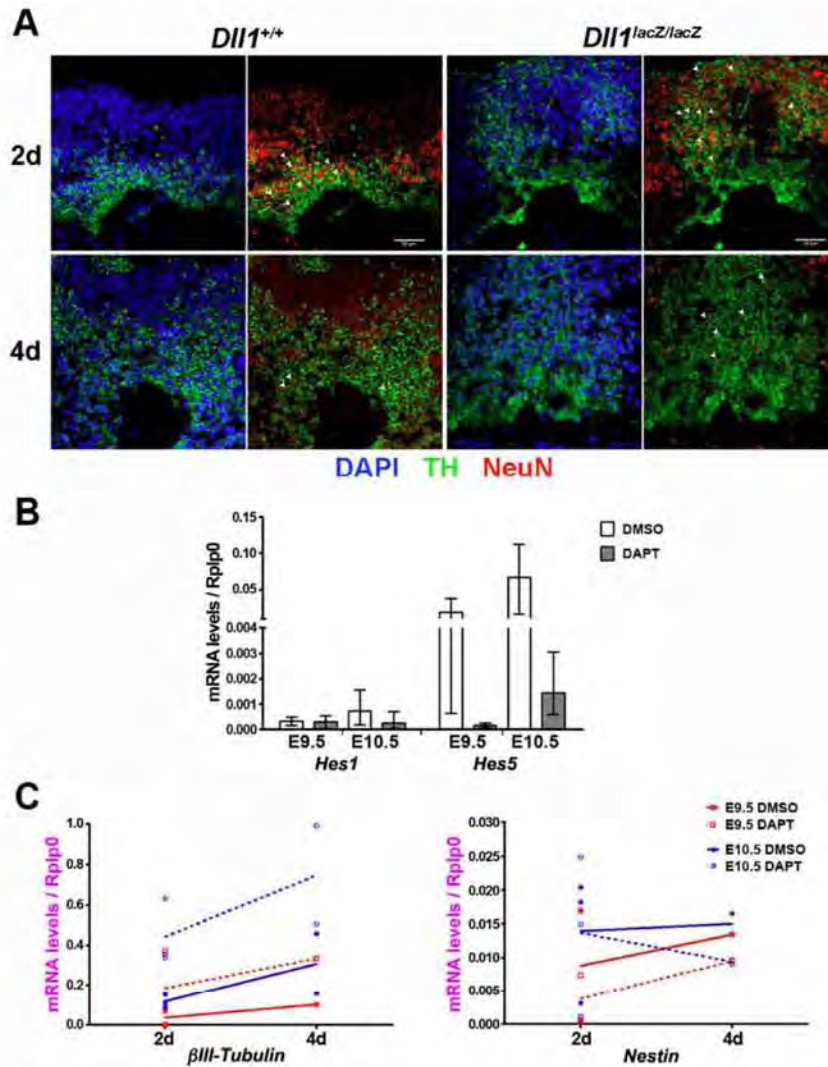


Fig. 5. Effect of Notch signalling on neuronal dopaminergic differentiation in explant cultures of developing mesencephalons. Neuronal dopaminergic differentiation was determined by detecting the number of cells containing the mature neuronal marker NeuN (some indicated with arrowheads) and Th (A) or the mRNA level of neural precursor (Nestin) or neuronal (β III-tubulin) markers (C). Mesencephalons with no or low Notch signalling were those derived from *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos (A) or treated with the DAPT Notch inhibitor for 2 days (2d) or 4 days (4d) (B,C). Note that the treatment (2d) of E9.5 and E10.5 explant cultures with the Notch inhibitor DAPT markedly reduced the expression of *Hes5* with a minimum effect on *Hes1* (B), in agreement with the effect determined in embryos lacking *Dll1*. Delayed DAPT effect (2 days vs 4 days) on *Nestin* expression in culture of E10.5 mesencephalons could be related to the ventricular NPC population that is not committed to become neurons. Scale bars are 100 μ m. Data in B represented as average \pm highest/lowest values.

mesencephalic explants in the presence or absence of DAPT, a potent γ -secretase inhibitor that blunts Notch activation at a key step after ligand binding (Crawford and Roelink, 2007). Due to the variations in number and distribution of differentiating cells in cultured explants, we analysed dopaminergic neurogenesis in explants by estimating mRNA levels of genes relevant to the process. As expected, the Notch inhibitor abolished *Hes5* expression in mesencephalic explants of E9.5 or E10.5 embryos after 2 days in culture, whereas *Hes1* expression was only partially affected (Fig. 5B), in close similarity with the observations in mutant embryos. In general, the effect of Notch signalling inhibition on mRNA levels of neuronal and dopaminergic genes was in agreement with the observations in *Dll1* deficient embryos (Fig. 5C). The proneurogenic effect of Notch inhibition was more pronounced in samples at E9.5 than at E10.5 (i.e. 4- vs 8-fold at either 2 days or 4 days treatment). Interestingly, there was no proportional decrease in the mRNA levels of *Nestin* (Fig. 5C), suggesting that a fraction of NPCs are dividing even under Notch signalling inhibition; nonetheless, note that Notch signalling inhibition reduced but did not affect the increasing rate of *Nestin* mRNA levels in E9.5 explants, suggesting that NPC differentiation but not proliferation is the target of the Notch signalling pathway. Therefore, Notch signalling inhibition reproduces the neurogenic effects of lacking *Dll1*, confirming that this ligand is the major mediator of Notch functions.

Absence of Notch signalling modifies the flux of dopaminergic differentiation

Msx1 and *Ngn2* are transcription factors whose corresponding genes are transiently expressed during dopaminergic differentiation; the former is mostly present in ventricular NPCs and marks the initiation of dopaminergic differentiation (Andersson et al., 2006b), whereas the latter is the proneural factor more important for dopaminergic differentiation that shows higher levels in the intermediate progenitors before *Nurr1* expression, a key transcription factor controlling *Th* expression (Kele et al., 2006). Because differentiating cells can spread to all directions from the site of birth, no direct relationship among the cells within a slice can be expected. Therefore, in order to estimate the transitions among the lineage-related dopaminergic precursors in the course of differentiation, we decided to determine the mRNA levels corresponding to those three transcription factors in ventral mesencephalons of embryos from E9.5 to E15.5 (Fig. 6A). The highest mRNA levels of *Msx1/2* were detected at E11.5, which represented a 30-fold increase in comparison with the level found at E9.5; this level value rapidly decreased to near the limit of detection since E12.5. Significant levels of *Ngn2* mRNA were detected at E10.5, became highest at E11.5, and markedly dropped by E15.5. In contrast, *Nurr1* mRNA levels increased gradually from E10.5 up to E12.5, stage at which apparently became stable. Since *Msx1/2*, *Ngn2* and *Nurr1* are expressed mostly in restricted non-overlapping NPCs that are linked along the dopaminergic differentiation pathway, the mRNA levels determined are in agreement with a differentiation flux starting with a definite number of *Msx1*⁺ NPCs that are converted into dopaminergic neurons passing sequentially through *Ngn2*⁺ and *Nurr1*⁺ NPCs. Note that the increase in *Th* mRNA levels, representing the young dopaminergic neuroblasts, lagged that of *Nurr1* (see below).

The increase in *Th* mRNA levels and relative number of dopaminergic neurons in the absence of *Dll1* suggest that Notch signalling regulates the emergence of dopaminergic features. A marked increase in *Ngn2*, *Nurr1* and *Th* mRNA levels in

mesencephalon of E10.5 embryos lacking *Dll1* (Fig. 6A) suggests that the cell populations expressing *Ngn2*, *Nurr1* and *Th* are prematurely emerging. Interestingly, at E11.5, *Msx2* and *Ngn2* mRNA levels in the ventral mesencephalon of *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos were lower than in the one of wild-type embryos; *Msx1* and *Mash1* showed similar regulation as *Msx2* and *Ngn2*, respectively (Fig. S4). In agreement with the correlation between the proportion of NPCs and mRNA levels, the decrease in *Ngn2* mRNA levels correlated with a decrease in the number of *Ngn2*⁺ NPCs (Fig. 6B,C). In contrast, *Nurr1* and *Pitx3*, two genes downstream *Ngn2* whose expression remains in the emerging *Th*⁺ neurons, showed slight differences in their mRNA levels in the presence or absence of *Dll1* at E11.5; only *Pitx3* mRNA levels were in line with the increase in *Th* expression but in much lower proportion (Fig. 4). Of note was that the reduction in *Dll1* (i.e. to the amount present in *Dll1*^{lacZ} embryos) caused a marked drop in *Ngn2* mRNA levels only in embryos at E11.5 but produced similar mRNA levels and expression patterns as wild-type of all other genes tested (Fig. 6A). Therefore, reduction in *Dll1* dose promotes dopaminergic differentiation in association with a decrement in the early specific NPCs (i.e. *Msx2*⁺ and *Ngn2*⁺).

The above observations suggest that *Dll1*-Notch signalling is controlling the differentiation flux once dopaminergic NPCs are specified such that, during the process, the effect is mainly noted in the reduction of *Ngn2*⁺ transient progenitors but not evident in the proportion of differentiated dopaminergic neuroblasts. The dopaminergic differentiation flux can be observed in explants cultures treated with DAPT (Fig. 6D). During culture of mesencephalic explants active differentiation was indicated by the rise in mRNA levels of *Msx1*, *Ngn2* and *Nurr1*. The differentiation dynamics in E9.5 and E10.5 explants was similar but the increase from 2 days to 4 days of culture in mRNA levels of early markers (i.e. *Msx1/2*, *Ngn2*) was less pronounced, whereas of late markers (i.e. *Nurr1*, *Th*) was more pronounced at the more advanced developmental stage, consistent with the differentiation trend occurring. Upon Notch signalling inhibition, consistent decrease in *Msx1* mRNA levels was observed in E9.5 explants despite their increasing phase at this developmental stage which was still observed; this observation is in agreement with a no relevant function of Notch in dopaminergic NPC proliferation. In contrast, Notch inhibition caused a consistent decrease in *Ngn2* mRNA levels in E10.5 explants, whereas this effect was noted in E9.5 only after 4 days DAPT inhibitor treatment; apparent lack of effect on *Ngn2* mRNA levels in 2 days-treated E9.5 explants supports a transitory role of *Ngn2*⁺ cells during differentiation. *Nurr1* mRNA levels showed lower levels in E9.5 than in E10.5 explants, but a higher increment was triggered by Notch inhibition. Similar behaviour was observed for the *Th* mRNA but its levels did not rise in E10.5 explants after 4 days Notch inhibitor treatment possibly due to the depletion of progenitor cells. Together, these data are in agreement with a model in which the proliferation and size of the pool of NPCs (i.e. E9.5>E10.5) defines how the dopaminergic differentiation flux is affected by Notch inhibition such that, NPC depletion and neuron generation induced by the Notch inhibitor strengthen and weaken, respectively, at late phases of differentiation (possibly after E11.5).

Dll1 haploinsufficiency causes a reduction in dopaminergic neurons of the adult brain substantia nigra

The alterations in mRNA levels of genes involved in neuronal dopaminergic differentiation as well as the mesencephalic phenotype observed in *Dll1*^{lacZ} embryos, both consistent with mild premature neuronal differentiation, prompted us to study the

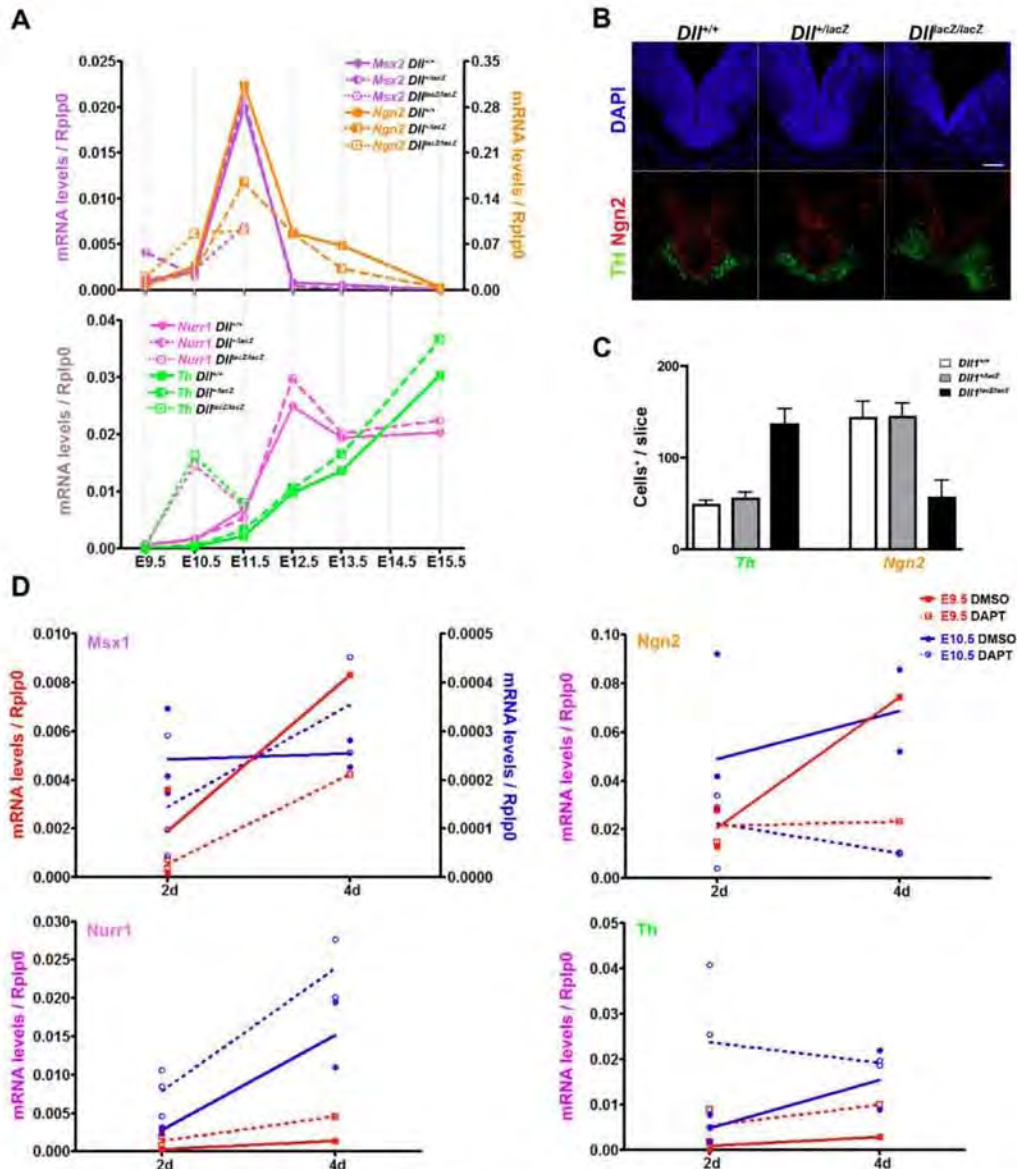


Fig. 6. Dopaminergic differentiation flux in mesencephalons along embryonic development or in explant cultures with normal or reduced Notch signalling. Progression of dopaminergic differentiation was followed by detecting the expression of genes whose products are mainly associated with distinct dopaminergic NPCs (*Msx1/2+*, *Ngn2+*, *Nurr1+*) or differentiated neurons (*Th*). For developing mesencephalons (A), total RNA was extracted from a pool of ventral regions from embryos (at least 6) of the genotype indicated. For explant cultures of mesencephalons (D) from E9.5 or E10.5 embryos, treated or not (DMSO) with DAPT, each determination was from an independent pool of cultured explants (at least 3). Number of *Ngn2*⁺ NPCs or *Th*⁺ neurons in mesencephalons from E11.5 embryos with the genotype indicated (B,C) shows a good correlation with *Ngn2* mRNA levels. Scale bar is 100 μ m. Data in C represented as averages \pm s.d.

consequences in adult mice. Although no differences in mRNA levels of neuronal or dopaminergic differentiation markers were detected at E13.5 or E15.5, lower density of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon of mutant in comparison with wild-type mice was not obvious at E13.5 but apparent at E15.5 when they

are nearly to establish their final allocation (Fig. 7A). As mentioned above, *NeuN* downregulation correlated with dopaminergic neuron maturation such that some *Th*⁺/*NeuN*⁺ were detected in *Dll1*^{+/lac2} E13.5 embryos but almost none in E15.5 embryos of either genotype. Interestingly, this reduction in dopaminergic neurons

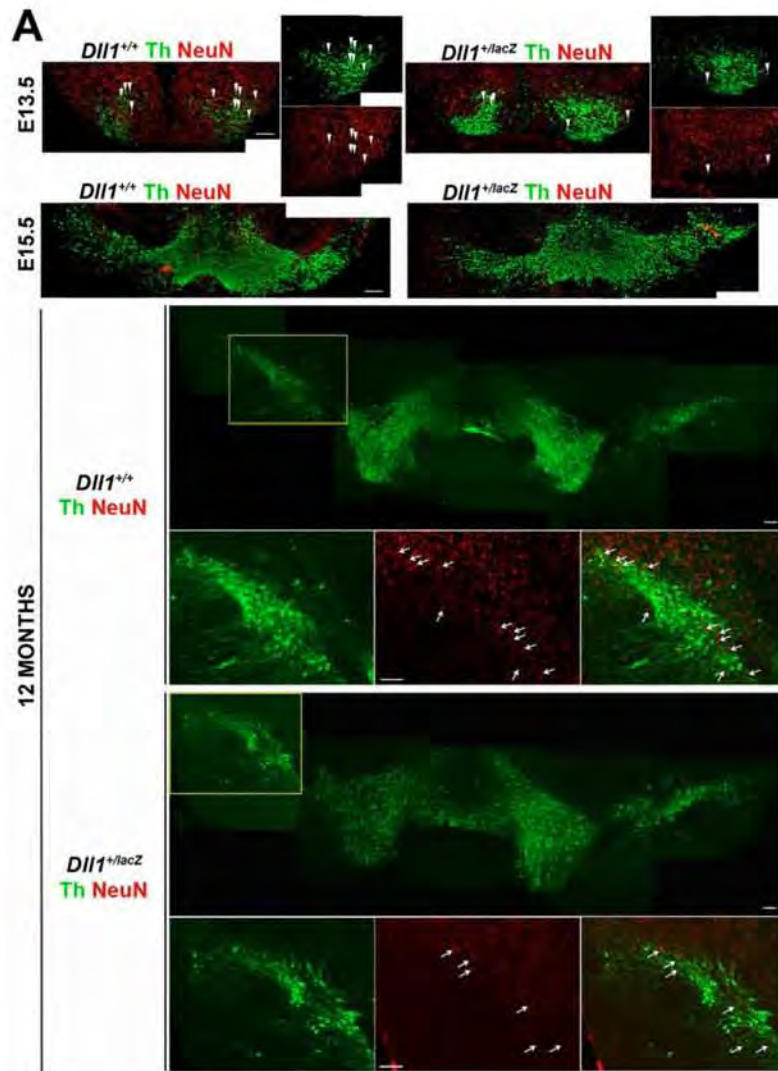
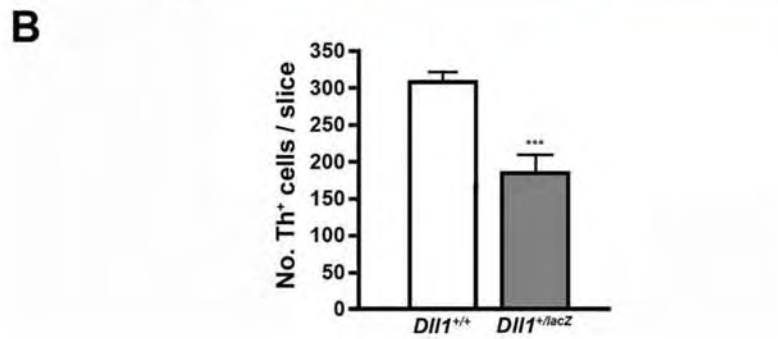


Fig. 7. Number of dopaminergic neurons in the adult brain under reduced *DII1* levels. (A) Dopaminergic neurons were detected by the presence of Th (green). No apparent difference in the density of Th⁺ neurons was detected in embryonic samples. Note that some Th⁺ neurons in the mesencephalon of E13.5 embryos (arrowheads) but not in that of E15.5 embryos contained nuclear NeuN (red), a marker frequently found in mature neurons. Evident lower density of Th⁺ neurons, all lacking nuclear NeuN, was observed in the SNpc of *DII1*^{+/*lacZ*} mice in comparison with the density in this region of wild-type mice. Scale bars are 100 μm; arrows indicate Th⁺/NeuN⁺ cells within the SNpc. (B) Th⁺ neurons were counted in slices from brains of 14 month-old mice. Data represented as average ± s.d.



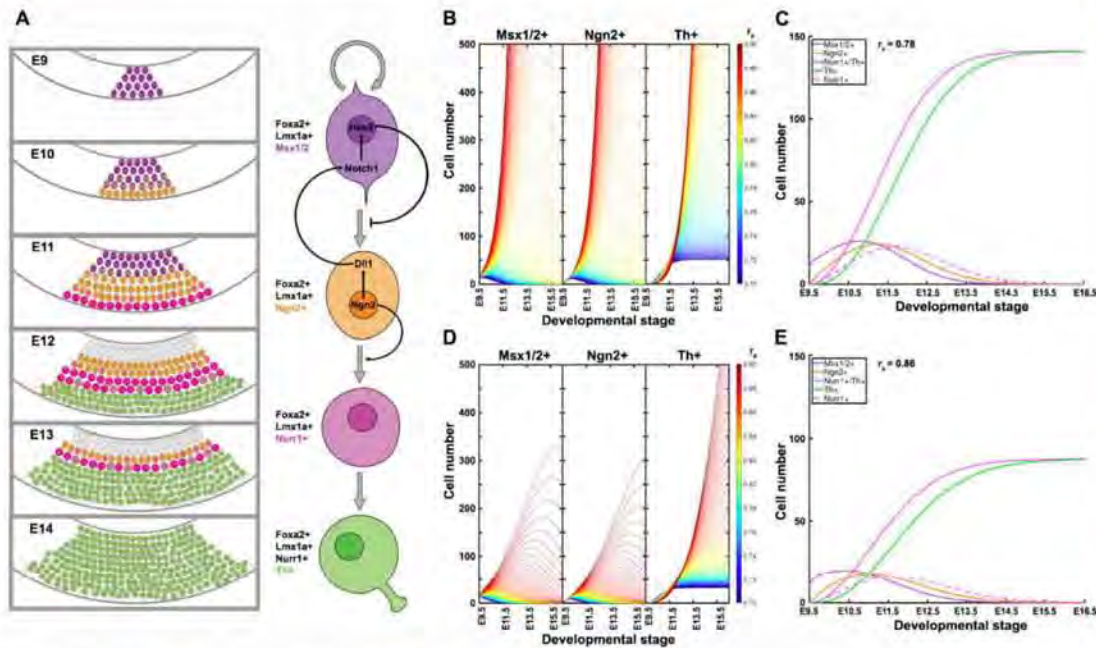


Fig. 8. A differentiation flux mathematical model for the derivation of mesencephalic dopaminergic neurons. (A) Representations of the distinct cell populations analysed during dopaminergic differentiation in the ventral mesencephalon and of the cell differentiation progress indicating the proposed role of Dll1 and Ngn2. (B, D) Dynamics of distinct cell populations (Msx1/2+, Ngn2+, Th+) emerging during dopaminergic differentiation at different r_p values in the presence of the complete (full dose of Dll1; B) or half (e.g. that present in *Dll1^{lacZ}*; D) active l_1 population. (C, E) The dynamic growth of the major NPC populations and immature dopaminergic neurons at a selected x and r_p values, those giving rise to patterns resembling the ones experimentally determined. For the dynamics shown, $P_0=10$.

became evident in adult mice, where it was readily visible in the substantia nigra pars compacta (SNpc) where most Th+ neurons remained NeuN negative (Fig. 7A,B). This is not related to a Dll1 role in neuron survival as similar phenotype was observed in young and old mice (see Fig. S5). Nonetheless, lower neuronal density was not restricted to dopaminergic neurons or the mesencephalic area but rather noted throughout the brain. The functional consequences of this reduction in neuronal density will be published elsewhere (manuscript in preparation). Therefore, a lower dose of Dll1 decreases the production of several neuronal types, possibly by disrupting a differentiation flux similar to the one described for mesencephalic dopaminergic neurons.

A mathematical model of dopaminergic differentiation flux

During neurogenesis, early ventricular neural precursors move to the subventricular zone as they differentiate (Fig. 8A). *Dll1* expression was detected in the subventricular area of most mesencephalon at E10-E11 (Fig. 1) (see also Kele et al., 2006; Lahti et al., 2011; Ono et al., 2007), whereas *Hes5*, the main mediator of Dll1-Notch signalling found, has been reported to be mostly located in the ventricular area (Kele et al., 2006; Vernay et al., 2005). From these observations we inferred that cells targeted by Dll1 are located in the ventricular zone (Fig. 8A), though we cannot discard a partial overlapping between *Dll1* and *Hes5* expression domains. Analysis of cell death and proliferation and emergence of neuronal markers at different amounts of Dll1 (i.e. those in *Dll1^{+/+}*, *Dll1^{+/-}*, *Dll1^{lacZ}*, *Dll1^{lacZ/lacZ}* mice) suggest that as Dll1

decreases, the differentiation rate increases, meaning that fewer NPCs divide and more exit the cell cycle to become neuroblasts. This phenomenon has been observed in other brain regions and interpreted as premature neuronal differentiation due to the lack of the inhibitory differentiation effect of Notch signalling (Hatakeyama et al., 2004; de la Pompa et al., 1997; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Premature differentiation during the expansion of dividing precursors could cause their rapid exhaustion and, consequently, a reduction in the number of neurons produced.

Increased rate of differentiation can also be observed following specifically the mesencephalic dopaminergic lineage (Fig. 8A). Our data show that initiation of neuronal differentiation, as detected by the emergence of β III-tubulin, is closely coupled with the acquisition of markers of early dopaminergic neuroblasts such as *Nurr1* and *Th*, and negatively regulated by Dll1. As expected, *Msx1/2*, a marker of early dividing dopaminergic precursors, concomitantly decreases. As inferred from mRNA levels, the number of *Ngn2*+ cells increases and decreases in coordination with that of *Msx1/2*+ cells, but under reduced Dll1 levels, early emergence of *Ngn2*+ cells occurs (Fig. 6A). Because the *Ngn2*+ NPCs population is a transient poorly dividing cell population (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006; Thompson et al., 2006), these observations support a mechanism in which there is no additional restriction on differentiation from *Ngn2*+ progenitors into *Nurr1*+ neuroblasts.

A simplified model to describe the transition from specified dopaminergic precursor (*Msx1/2*+; P), going through intermediate

progenitors (Ngn2+, Nurr1+, I) up to becoming a young dopaminergic neuron (Nurr1+/Th+; N) (Fig. 8A) is:



Given that Ngn2 controls *Dll1* expression, effects of *Dll1* on P are proportional to the amount of I adjacent to P (I_1 , I_2 refers to the I population moving away from P possibly Nurr1+), thus, this effect varies according with the equation

$$\partial = \frac{I_1}{P + I_1 + I_2 + N}.$$

Considering that there is no restriction on differentiation from I to N, as data suggested, the dynamic change in the number of P, I_1 , I_2 and N during differentiation can be modelled by the following set of differential equations,

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P}{1 + I_1 + I_2 + N} + Pr_p \partial - Pr_d \quad (1)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = Pr_d - I_1 r_d \quad (2)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = I_1 r_d - Nr_d \quad (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = Nr_d, \quad (4)$$

which develop over time from an initial population P_0 (P when $I_1 + I_2 + N = 0$) and where the term $P/(1 + I_1 + I_2 + N)$ represents the fraction of P with proliferation independent of *Dll1*-Notch signalling. r_p and r_d denote the probability that one P cell self-divides or differentiates, respectively. Thus,

$$r_p + r_d = 1.$$

To estimate the value of r_p and r_d , we consider our experimental observations showing that the population *Msx1/2+* (P) initially grows and extinguishes during the 6 days of differentiation (E9-E15) with a maximum around E11.5, and that the plateau of dopaminergic neurons (Th+; N) is reached between E13.5-E14.5. Using Eqns 1-4 and $P_0 = 10$ to describe the differentiation dynamics, it can be determined that P grows when the r_p value is above 0.70, and gets restricted to the short range of 0.75-0.80 when considering the time at which N reaches a plateau (Fig. 8B). The r_p/r_d value might correlate with a short window of the cell cycle at which the neurogenic process can initiate (Latasa et al., 2009).

Fig. 8C shows the dynamics of dopaminergic differentiation by comparing the growth pattern of the major distinct cell populations considered in this work ($P_0 = 10$, $r_p = 0.78$). Interestingly, the pattern shown resembles the one experimentally determined using the gene expression levels of the specific markers for P, I_1 , I_2 and N (Fig. 6). A major conclusion derived from this dynamic model is that, the initial P_0 population produces a 15-20-fold larger N population, which implies that P divides every ~20 h 4-5 times during differentiation. Also, it can be inferred that the Nurr1 gene expression pattern determined is associated with a transient Nurr1+/Th- population (possibly I_2 in the model) that emerges before becoming Nurr1+/Th+ neuroblasts (N).

In the simple mathematical model described above, $\partial = 0$ represents complete *Dll1* deficiency (no Notch signalling), and $\partial_x = I_1(x)/[P + I_1(x) + I_2 + N]$ when there is 'x' fraction of I_1 than in wild-type embryos, an estimation of the *Dll1* level triggering Notch signalling in P; for instance, x in *Dll1* heterozygous embryos might equal 1/2. Varying ∂ values in the above equations give rise to the dynamics such as the ones represented in Fig. 8D ($x = 0.5$; see also Fig. S6 for $x = 0$) showing that, as expected, earlier emergence and lower production of dopaminergic

neurons than wild-type occur as Notch signalling decreases. Note, however, that the production of dopaminergic neurons at the same r_p value used when $x = 1$ (i.e. full *Dll1* dose) appears much lower than the one experimentally determined in the SNpc of *Dll1*^{lacZ} (about 80% of wild type). Considering that the *Dll1* dose in heterozygous mice is actually half that of wild type, we propose that compensatory mechanisms controlling differentiation under low *Dll1* dose are reflected in small changes in the r_p value (Fig. 8E). Therefore, dopaminergic differentiation dynamics is markedly influenced by the regulatory mechanisms acting on P to precisely determine the level of proliferation and differentiation.

Concluding remarks

The initial specification of mesencephalic dopaminergic NPCs occurs in the absence of Notch signalling. This is not unexpected since *Dll1* expression in the floor plate depends on a functional *Ngn2*, a gene downstream *Foxa2* and *Lmx1a* (Andersson et al., 2006b; Ferri et al., 2007). A very similar phenomenon occurs in the spinal cord where homeodomain proteins define the *Dll1* spatial pattern and lack of *Dll1* increases neuronal differentiation without affecting the specific progenitor domain boundaries (Marklund et al., 2010). *Ngn2* marks a transient NPC population during dopaminergic differentiation, where positively regulates *Dll1* expression (Castro et al., 2006; Kele et al., 2006), while the data presented here show that *Dll1* does not appear to regulate the expression of *Ngn2* but rather determines the number of cells expressing it (Fig. 8A). Midbrains of *Ngn2*^{-/-} embryos show a marked reduction in *Ngn2* downstream dopaminergic markers such as Nurr1, Pitx3 and Th (Kele et al., 2006) that, after birth, results in a significant decrease in the number of dopaminergic neurons (Andersson et al., 2006a). Considering our observations, we propose that, in addition to the neurogenic role, *Ngn2* has an additional unique function in dopaminergic differentiation, the regulation of NPC expansion through *Dll1* (Fig. 8A). Nonetheless, additional mechanisms compensate the effect of reducing *Ngn2* (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006) or *Dll1* (this work) on the production of dopaminergic neurons. The dynamic model of differentiation we propose indicate that dopaminergic NPCs exhaust due to a higher rate of differentiation than proliferation, a process regulated by the interaction between *Dll1* and *Ngn2*. The remaining NPCs after E12.5 are likely the source of the glial cells emerging later in development.

The production of specific neurons during development should comply with the number needed for their functions in the adult brain. Moreover, it is expected that neuronal differentiation is coordinated in time with the processes that control migration of neuroblasts or young neurons to the definitive residence site, such that successful connections between neurons occur. It is generally thought that more neurons than needed are produced and that many die as they move through the path to their home and their axons compete for reaching the target cells. However, only in few instances have been demonstrated the role of natural neurodegeneration in the establishment of the final number of neurons, therefore, it is still relevant to determine the contribution of neurons produced. Here we found that the Notch-regulated differentiation flux from mesencephalic dopaminergic precursors up to becoming dopaminergic neurons is critical for determining the number of dopaminergic neurons present in the adult brain.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance of mutant mouse line *Dll1*^{lacZ/+}

The *Dll1*^{lacZ} mutant mouse line in the CD1 strain genetic background was kindly provided by Dr Olivier Pourquie at the Stowers Institute for Medical Research. Because CD1 is an outbred strain, phenotypes resulting from the *Dll1* mutation or its penetrance for certain phenotypes might vary among

homozygous embryos; nonetheless, the particular phenotype studied here was highly reproducible suggesting low influence of potential modifiers present in this strain. The mutation resulted from the in frame replacement of exon1 by the *lacZ* gene, as described by Hrabě de Angelis et al. (1997). The null allele was maintained in the heterozygous state, since homozygous *Dll1^{lacZ/lacZ}* embryos die at around embryonic day E12.5, similar as previously reported (Hrabě de Angelis et al., 1997). With little variation, the genotype determined by PCR (forward primer: 5'-GTTGCACCACAGATGAAACGC-3'; reverse primer: 5'-AAGCCAG-ACGAAGAGGAAACCG-3') was coincident with *lacZ* expression level and with E10-E12 embryo phenotype (e.g. head morphology, haemorrhagic spots). All animal manipulations required for the present work were in compliance with the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (National Research Council) and approved by our Bioethical Committee.

Collagen explant cultures

The midbrain explants were prepared as described by Baizabal and Covarrubias (2009). When explants (E9.5 or E10.5) were treated with the γ -secretase inhibitor *N*-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-L-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester (DAPT) (5 μ M, Tocris), control medium had same volume (0.5 μ l) of dimethylsulfoxide (DMSO); under these conditions, explants were not cultured for longer than 4 days.

Tissue processing and immunofluorescence

Embryonic brain tissue and midbrain explants sections were processed as described by Baizabal and Covarrubias (2009). All coronal sections analysed were perpendicular to the tangent near the midpoint of the mesencephalic flexure and those showing the complete ventral neuroepithelium (Fig. S1); thus, the extreme anterior and posterior mesencephalic areas were excluded. Tissue sections were incubated with the appropriate mixture of antibodies (Table S1). To determine active cell proliferation, pregnant mice were injected with 50 μ l of BrdU (50 μ g/ml; Sigma-Aldrich) 1 h before sacrifice; BrdU incorporation was determined by immunofluorescence. On the other hand, the TUNEL assay (Roche) was used to detect apoptotic cells in embryo brain cryosections. Preparations were counterstained with DAPI (1:10,000; Invitrogen), and analysed for immunofluorescence using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and Zeiss Apotome microscope Axio Observer Z1.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The ventral midbrain (defined by the one-fourth of midbrain around the midline) of embryos was dissected and pooled for RNA extraction from no less than two litters at each developmental stage tested (i.e. E9.5-E15.5 dpc). Single ventral midbrains were not used for this analysis because rapid changes in gene expression occur in this region within the relevant developmental window, and because the low RNA yield would prevent from using the same sample for comparing the expression pattern of all genes. For explants, 3 midbrain explants (E9.5 or E10.5) of each condition and/or culture stage were collected per experiment; at least two experiments were performed per condition and/or culture stage. First strand cDNA was synthesized using AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT₁₆ primer. Quantitative RT-PCR was performed using KAPA SYBR FAST mix (KAPA Biosystems) in the presence of the specific primers (Table S2) and the Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research). Gene expression was evaluated using a $\Delta\Delta C_t$ method. The housekeeping gene *Rplp0* was used to normalize gene expression levels.

Data analysis and mathematical modelling

For cell quantification in tissue sections of embryos and explants cultures, single optical planes were analysed independently within each confocal stack. Total number of cells positive for the specific marker was determined within the stack. Unless indicated, cells counted were within the marked area, usually corresponding to the *Lmx1a* expression domain (determined in a parallel section). For adult brains, mice of 5, 8, 12 and 14 months of age were used. Although difference between *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* in the number of Th+ neurons was similar at all ages, robust analysis was done for one-year old animals. We counted the number of Th+ cells in the SNpc of five different

slices along the antero-posterior axis for each *Dll1^{+/+}* and *Dll1^{lacZ/lacZ}* mouse ($n=4$). The proportion of positive cells for a given marker is expressed as a percentage of the total cell number (DAPI+ cells) \pm s.d. (standard deviation) calculated from at least 3 different tissue samples. Asterisks in graphs indicate that the experimental groups were significantly different from control groups ($P<0.05$ as determined by the *t*-test). Mathematical modelling was performed in Matlab software (MathWorks, Natick, Massachusetts).

Acknowledgements

We are grateful to Elizabeth Mata, Graciela Cabeza and Andrés Saralegui for their technical assistance; and, to all members of the Covarrubias' group for the inquisitive comments along the accomplishment of the work presented.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

N.T.-P., C.V., G.G.-F., D.-M.A., M.G.-C., A.F.-H., and I.Z.-A. performed the experiments and data analysis; J.-M.B. and L.C. conceived the approaches; L.C. developed the concepts; N.T.-P., G.G.-F. and L.C. wrote the manuscript.

Funding

N.T.-P., G.G.-F. and D.-M.A. were recipients of a CONACyT fellowship for graduate studies. This work was supported by grant [131031] from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and IMPULSA2-UNAM.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://bio.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/bio.013383/-/DC1>

References

- Abeliovich, A. and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* **304**, 447-454.
- Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F. and Björklund, A. (2006a). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* **133**, 507-516.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and Ericson, J. (2006b). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**, 393-405.
- Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* **133**, 3499-3506.
- Baizabal, J.-M. and Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev. Biol.* **325**, 49-59.
- Bassett, E. A. and Wallace, V. A. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* **35**, 565-573.
- Bettenhausen, B. and Gossler, A. (1995). Efficient isolation of novel mouse genes differentially expressed in early postimplantation embryos. *Genomics* **28**, 436-441.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A. and Göttgens, B. (2006). Proneural bHLH and Bm proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* **11**, 831-844.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545.
- Crawford, T. Q. and Roelink, H. (2007). The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev. Dyn.* **236**, 886-892.
- de la Pampa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.
- Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J. H., Brunet, J.-F., Ericson, J. and Perlmann, T. (2011). Specific and integrated roles of *Lmx1a*, *Lmx1b* and *Phox2a* in ventral midbrain development. *Development* **138**, 3399-3408.
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D. and Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse *Dll4* in artery development. *Genes Dev.* **18**, 2474-2478.
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A. and Ang, S.-L. (2007). *Foxa1* and *Foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* **134**, 2761-2769.
- Guerrero-Flores, G. and Covarrubias, L. (2011). Dopaminergic differentiation potential of neural precursor cells derived from embryonic stem cells. In *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis* (ed. C. Atwood), pp. 413-428. Rijeka, Croatia: InTech.

- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujjoka, M., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539-5550.
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M. and O'Keefe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* 379, 123-138.
- Hrabě de Angelis, M., McIntyre, J. and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717-721.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Andereg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. G. and Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 12, 125-131.
- Kadokawa, Y. and Marunouchi, T. (2002). Chimeric analysis of Notch2 function: a role for Notch2 in the development of the roof plate of the mouse brain. *Dev. Dyn.* 225, 126-134.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. and Ang, S.-L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495-505.
- Kittappa, R., Chang, W. W., Awatramani, R. B. and McKay, R. D. G. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* 5, e325.
- Lahti, L., Saarimäki-Vire, J., Rita, H. and Partanen, J. (2011). FGF signaling gradient maintains symmetrical proliferative divisions of midbrain neuronal progenitors. *Dev. Biol.* 349, 270-282.
- Latasa, M. J., Cisneros, E. and Frade, J. M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 895-908.
- Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y. E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J. A., Goulding, M., Kaestner, K. H. et al. (2009). *Foxa1* and *Foxa2* function both upstream of and cooperatively with *Lmx1a* and *Lmx1b* in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Dev. Biol.* 333, 386-396.
- Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A. and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 14-27.
- Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 93-102.
- Lütolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U. and Taylor, V. (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* 129, 373-385.
- Marklund, U., Hansson, E. M., Sundström, E., de Angelis, M. H., Przemec, G. K. H., Lendahl, U., Muhr, J. and Ericson, J. (2010). Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression. *Development* 137, 437-445.
- Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y. and Ono, Y. (2010). *Lmx1a* and *Lmx1b* cooperate with *Foxa2* to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Dev. Biol.* 339, 101-113.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 18, 2196-2207.
- Okano, H. and Temple, S. (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 112-119.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H. et al. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213-3225.
- Pierfelice, T., Alberi, L. and Galano, N. (2011). Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840-855.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasanio, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrissy, E. E. and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat. Neurosci.* 9, 743-751.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 8, 707-719.
- Thompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M. and Björklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 198, 183-198.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R. and Ang, S.-L. (2005). *Otx2* regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J. Neurosci.* 25, 4856-4867.

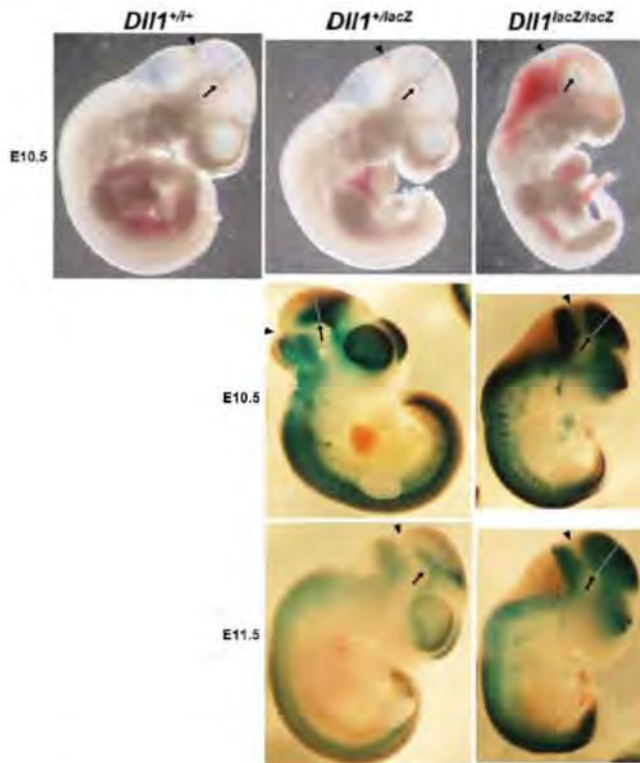


Fig. S1. Phenotype of mouse embryos homozygous for a *Dll1* null allele (*Dll1*^{lacZ/lacZ}). Despite the broad abnormalities of E10.5 mouse embryos lacking *Dll1*, the midbrain area is not largely affected. This is also apparent for E11.5 *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos, but during dissection it was evident that the tissue has become softer and fragile. Brain disruption at E12.5 is characterized by multiple haemorrhagic spots (data not shown) as previously reported (Hrabě de Angelis et al., 1997). No major growth difference was detected between *Dll1*^{+/lacZ} and wild type embryos and pups are of the same weight and size at birth; mild brain phenotypes were detected in *Dll1*^{+/lacZ} embryos but with low penetrance. Always a stronger signal was detected after staining for lacZ in *Dll1*^{lacZ/lacZ} than in *Dll1*^{+/lacZ} embryos (lower panels). The line crossing the midbrain at the mesencephalic flexure level (arrow) represents the approximate position of slices shown. Arrowhead: isthmus

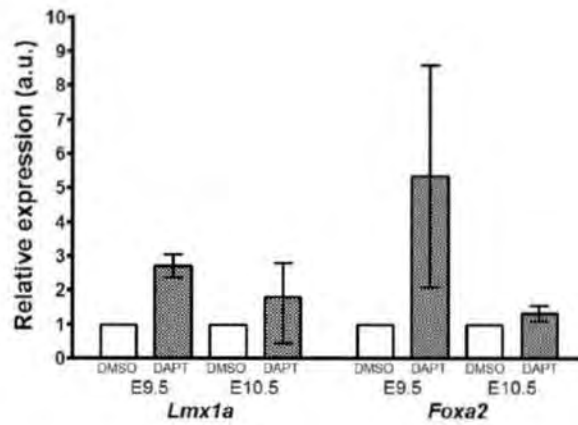


Fig. S2. Effect of Notch signalling inhibition on mRNA levels of dopaminergic specification markers. Mesencephalic explants from E9.5 and E10.5 were culture for 2 days in the presence or absence of DAPT Notch inhibitor (dissolved in DMSO). Levels of *Lmx1a* and *Foxa2* mRNA were determined by RT-qPCR.

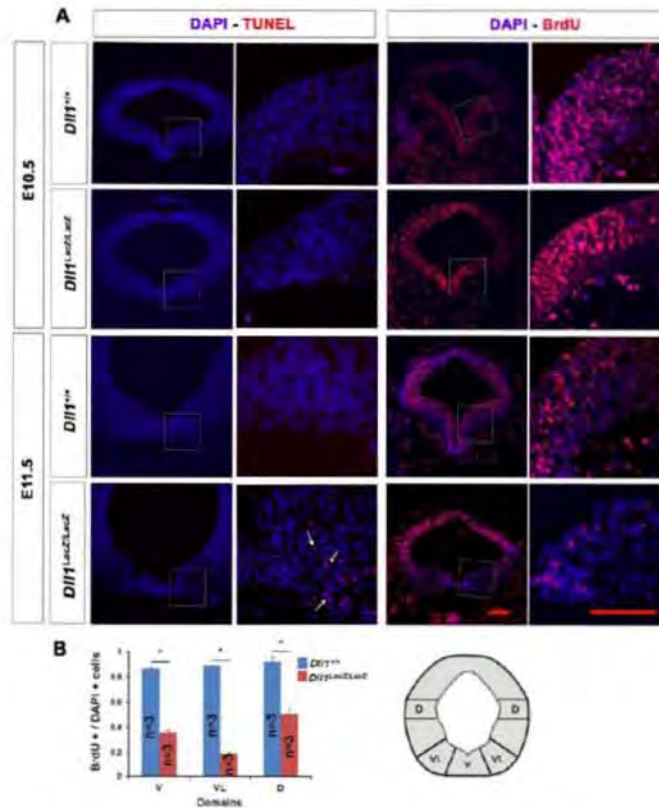


Fig. S3. Cell death and proliferation in developing midbrains in the presence or absence of DII1. Cell death was determined by TUNEL (A, left panels, red nuclei) and proliferation by incorporation of BrdU (A, right panels, red nuclei). With the exception of the ventrolateral area of midbrains from E11.5 *DII1^{lacZ/lacZ}* embryos (bottom, left panels), very few dying cells were detected in E10.5 or E11.5 embryos, independent of the presence or absence of DII1. In contrast, a marked reduction in BrdU+ cells was found in midbrains of E11.5 mutant in comparison with wild type embryos (A, bottom, right panels, and B), difference that can be detected since E10.5 (A, right, upper panels). Note, that this observation was more prominent in the ventral mesencephalic area of E11.5 embryos. The scale bar is 100 μ m.

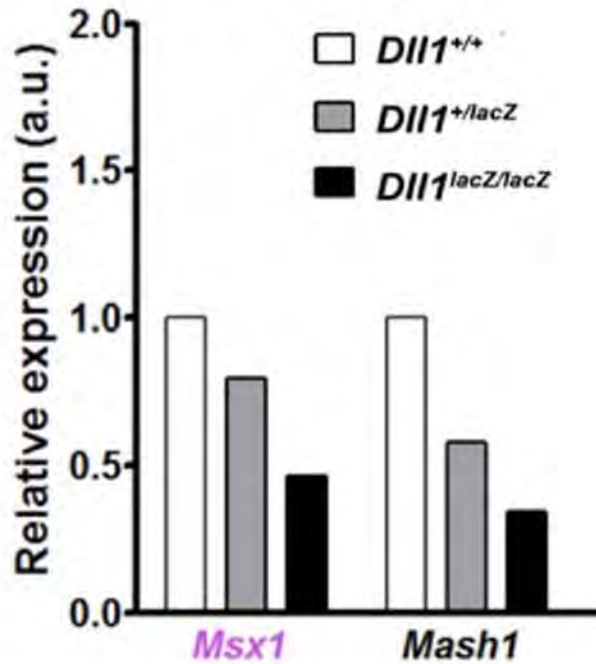


Fig. S4. Levels of *Msx1* and *Mash1* differentiation dopaminergic markers at different *Dll1* dose. Total RNA was extracted from a pool of ventral regions of mesencephalons from E11.5 embryos of the genotype indicated, and mRNA levels determined by RT-qPCR. Note that mRNA levels of *Msx1* and *Mash1* show a similar pattern as mRNA levels of *Msx2* and *Ngn2* (See Fig. 7), respectively, upon different *Dll1* dose.

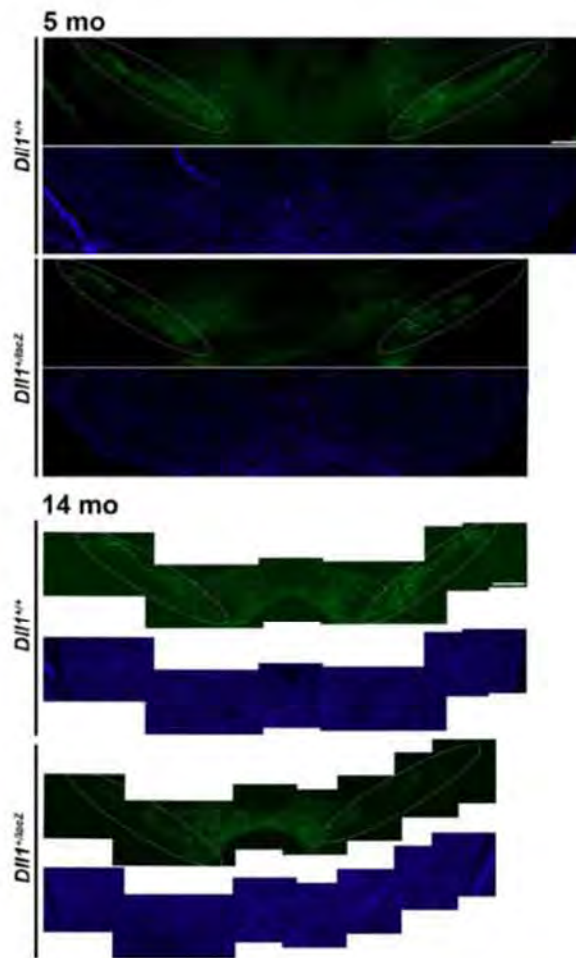


Fig. S5. Density of dopaminergic neurons in the adult brain at different *Dll1* levels and ages. Dopaminergic neurons were detected by the presence of Th (green) among the total number of cells (nucleus stained with DAPI; blue) in slices of adult mesencephalons from mice with the genotype and ages indicated (scale bars are 100 μ m). Slices for comparison were selected on the basis of similar morphology of distinct brain structures including the substantia nigra itself, the hippocampus, the aqueduct and the lateral ventricles. Lower density of Th+ neurons in substantia nigra of *Dll1^{lacZ}* mice than in that of *Dll1^{+/+}* mice was evident along the whole structure with little difference between the ages tested.

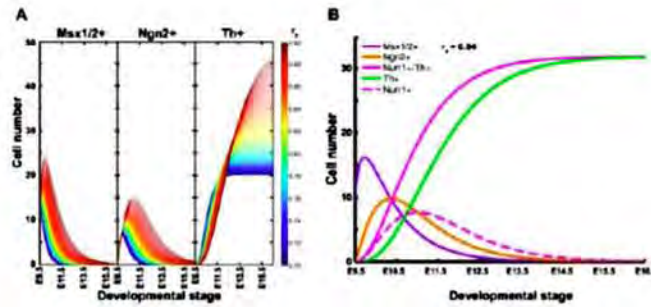


Fig. S6. Dynamics of Msx1/2+, Ngn2+ and Th+ cell populations during dopaminergic differentiation at different r_p values in the absence of an active I_1 population ($x=0$). Based in the equations described in the main text, the predicted dynamic growth of dopaminergic NPC populations and immature dopaminergic neurons in the complete absence of Dll1 and at different r_p values (A) or at a selected r_p value (0.84) are shown; $P_0=10$ was used. Note the prominent reduction in dopaminergic neurons under these conditions that hardly can be compensated by increasing the r_p value.

Table S1. Antibodies used for immunofluorescence procedures

Antibody	Species	Working Dilution	Source
Anti-Nestin	Mouse	1:500	Chemicon
Anti-GFAP	Rabbit	1:250	Dako
Anti- β 3-tubulin	Rabbit	1:1000	Covance
Anti-NeuN	Mouse	1:100	Chemicon
Anti-Lmx1a	Rabbit	1:100	Gift from Dr. M. German
Anti-Foxa2	Rabbit	1:8000	Gift from Dr. A. Ruiz I Altaba
Anti-Nkx2.2	Mouse	1:2	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Nkx6.1	Mouse	1:2	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Otx2	Rabbit	1:3000	Millipore
Anti-Ptx3	Rabbit	1:5000	Gift from Dr. M. Smidt
Anti-TH	Rabbit	1:500	Chemicon
Anti-5HT	Rat	1:200	Millipore
Anti-BrdU	Mouse	1:100	BD Biosciences
Anti-Mouse IgGs coupled to AlexaFluor 488	Goat	1:1000	Molecular Probes
Anti-Rabbit IgGs coupled to AlexaFluor 594	Goat	1:1000	Molecular Probes
Anti-Rat IgGs coupled to AlexaFluor 647	Goat	1:1000	Molecular Probes

Table S2. Oligonucleotides for RT-qPCR*

Gene	Sequence	References
<i>Dat</i>	Forward: CATTGCCACATCCTCCATGG Reverse: TAGGCCAGTTTCTCTCGGAA	1
<i>Dll1</i>	Forward: TCAGATAACCCTGACGGAGGC Reverse: AGGTAAGAGTTGCCGAGGTCC	2
<i>Dll3</i>	Forward: GATGCCTTTTACCTGGGCCTG Reverse: ATCGAAGCCCGTAGAATCCC	Primer blast
<i>Dll4</i>	Forward: CAGTTGCCCTTCAATTTACCT Reverse: AGCCTTGGATGATGATTTGGC	3
<i>Foxa2</i>	Forward: CTGGGAGCCGTGAAGATGGA Reverse: ATTCCAGCGCCACATAGGA	4
<i>Hes1</i>	Forward: TGAAGGATTCCAAAAATAAAATTCTCTGGG Reverse: GCCTCTTCTCCATGATAGGCTTTGATGAC	2
<i>Hes5</i>	Forward: AGATGCTCAGTCCCAAGGAG Reverse: TAGCCCTCGCTGTAGTCCTG	2
<i>Lmx1a</i>	Forward: GGACCATAAGCGACCCAAAC Reverse: CTGAACCACACGGACACTC	4
<i>Map2</i>	Forward: TTCTTTTGCTTGCTCGGGATT Reverse: ATACAGGGCTTGGTTTATTTGAGAGA	5
<i>Msx1</i>	Forward: GCCTCTCGGCCATTTCTCAG Reverse: CGGTTGGTCTTGTGCTTGCG	4
<i>Msx2</i>	Forward: CTCGGTCAAGTCGGAAAATTC Reverse: GTTGGTCTTGTGTTTCCTCAG	6
<i>Nestin</i>	Forward: TGAGAACTCTCGCTTGCAGACAC Reverse: GGTCCTCTGGTATCCCAAGGAAATG	4
<i>NeuN</i>	Forward: CCTCTCGCGCCCCTTG Reverse: AGCACTAGGTTCTCACAGGC	Primer Blast
<i>Ngn2</i>	Forward: GCTGTGGGAATTTACCTGT Reverse: AAATTTCCACGCTTGCATTC	4
<i>Notch1</i>	Forward: CCCTTGCTCTGCCTAACGC Reverse: GGAGTCCTGGCATCGTTGG	3
<i>Notch2</i>	Forward: GCAGGAGCAGGAGGTGATAG Reverse: GCGTTTCTTGGACTCTCCAG	7
<i>Nurr1</i>	Forward: TCAGAGCCCACGTGATT Reverse: TAGTCAGGGTTTGCCTGGAA	8
<i>Pitx3</i>	Forward: GGAATCGCTACCCTGACATGAG Reverse: TGAAGGCGAACGGGAAGGTCT	9
<i>Rplp0</i>	Forward: CACTGGTCTAGGACCCGAGAA Reverse: AGGGGGAGATGTTGAGCATGT	10
<i>Sox1</i>	Forward: GGCCGAGTGGAAAGGTGATGT Reverse: TCCGGGTGTTCTTTCATGTG	11
<i>Sox2</i>	Forward: CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG Reverse: CCAACGATATCAACCTGCATGG	2
<i>Tau</i>	Forward: TTCTGTCTCGCCTTCTGTC Reverse: CGGCTTTTAAGCCATGGTCC	Primer blast
<i>Th</i>	Forward: TGGGACACGTACCCATGTTG Reverse: ACCAGTACACCGTGGAGAGT	Primer blast
<i>Vmat2</i>	Forward: GCGAGCATCTCTTATCTCATTGG Reverse: AAATGCTGATCCCAACAACTATCA	12
β 3-Tubulin	Forward: ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG Reverse: ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG	4

* All primers were tested for specificity and efficiency before use

References

1. Hwang DY, Hong S, Jeong JW, Choi S, Kim H, Kim J, Kim KS. Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurochem.* 2009 111:1202-12.
2. Kobayashi T, Mizuno H, Imayoshi I, Furusawa C, Shirahige K, Kageyama R. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 2009 23:1870-5
3. Zhao X, D'Arca D, Lim WK, Brahmachary M, Carro MS, Ludwig T, Cardo CC, Guillemot F, Aldape K, Califano A, Iavarone A, Lasorella A. The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Dev Cell.* 2009 17:210-21
4. Jaeger I, Arber C, Risner-Janiczek JR, Kuechler J, Pritzsche D, Chen IC, Naveenan T, Ungless MA, Li M. Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells. *Development.* 2011 138:4363-74
5. Xu J, Wang H, Liang T, Cai X, Rao X, Huang Z, Sheng G. Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture. *Mol Biol Rep.* 2012 39:789-95
6. Singh N, Gupta M, Trivedi CM, Singh MK, Li L, Epstein JA. Murine craniofacial development requires Hdac3-mediated repression of Msx gene expression. *Dev Biol.* 2013 377:333-44
7. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol.* 2012 32:2300-11
8. Chao LC, Zhang Z, Pei L, Saito T, Tontonoz P, Pilch PF, Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol.* 2007 21:2152-63
9. Cajánek L, Ribeiro D, Liste I, Parish CL, Bryja V, Arenas E. Wnt/beta-catenin signaling blockade promotes neuronal induction and dopaminergic differentiation in embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009 27:2917-27
10. Wong, R. H. F., Chang, I., Hudak, C. S. S., Hyun, S., Kwan, H.-Y., & Sul, H. S. A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin. *Cell.* 2009 136:1056-1072
11. Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, Tapia N, Sabour D, Sternecker J, Tesar P, Schöler HR. Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010 6:215-26
12. Xu Z, Cawthon D, McCastlain KA, Slikker W Jr, Ali SF. Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP. *Synapse.* 2005 55:45-51