

Estudio de las diferencias de expresión de las neuronas corticales y sus progenitores en el cerebro en desarrollo, así como de las proteínas de adhesión celular en los mismos tipos celulares con datos de single-cell RNA-seq.

Marta Nadal Muñoz

Máster en Bioinformática y Bioestadística

Área 3 – Subárea Epigenómica y Cáncer

Consultor/a: Izaskun Mallona González

Profesor/a responsable de la asignatura: Laura Calvet Liñán

Junio de 2021

Marta Nadal Muñoz



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Estudio de las diferencias de expresión de las neuronas corticales y sus progenitores en el cerebro en desarrollo, así como de de las proteínas de adhesión celular en los mismos tipos celulares con datos de single-cell RNA-seq.</i>
Nombre del autor:	<i>Marta Nadal Muñoz</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Izaskun Mallona González</i>
Nombre del PRA:	<i>Laura Calvet Liñán</i>
Fecha de entrega:	06/2021
Titulación:	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Área 3 – Subárea Epigenómica y Cáncer</i>
Idioma del trabajo:	Castellano
Número de créditos:	15
Palabras clave	<i>Single-cell, RNA-seq, desarrollo cortical</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i>	
<p>Las proteínas de adhesión celular están fuertemente vinculadas a la correcta proliferación y migración de las neuronas durante el desarrollo cortical y, diversos estudios, han señalado a los genes <i>Cdh2</i> y <i>Afdn</i> como principales involucrados. El estudio de datos de RNA-seq a partir de single-cell nos permite conocer de una manera muy precisa qué genes se expresan en determinados tipos celulares y en este estudio, por tanto, se propone el análisis de datos de single-cell RNA-seq obtenidos de repositorios públicos con el fin de buscar diferencias de expresión en distintos tipos celulares de la corteza cerebral a lo largo del desarrollo, prestando especial interés a dichos genes.</p>	

La metodología utilizada ha sido el análisis del dataset de desarrollo del *Mouse Brain Atlas* con el lenguaje R haciendo uso de Seurat, un paquete ampliamente utilizado en la normalización y análisis de datos de single-cell.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido, por una parte, conocer de una manera detallada qué genes se encuentran diferencialmente expresados entre las neuronas, las células de glía radial y los progenitores intermedios, así como en cada tipo celular, la evolución de la expresión a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo. Y, por otra parte, aunque no se han encontrado diferencias significativas en los genes *Cdh2* y *Afdn*, el gen *Cdh13* sí ha mostrado una sobreexpresión significativa en el momento de la generación de las neuronas de proyección de capas altas.

Abstract (in English, 250 words or less):

Cell adhesion proteins are strongly linked to the correct proliferation and migration of neurons during cortical development. In fact, many studies have identified *Cdh2* and *Afdn* genes as the main involved. The study of single-cell RNA-seq data allows us to know which genes are expressed in specific cell types. Therefore, in this study we propose the analysis of this kind of data from public repositories to look for expression differences in different cell types of the cerebral cortex throughout development, paying special interest to these genes.

The methodology used was the analysis of the *Mouse Brain Atlas* development dataset with R language using Seurat, a package widely used in the normalization and analysis of single-cell data.

These results, on the one hand, show which genes are differentially expressed between neurons, radial glia cells and intermediate progenitors, as well as in each cell type, the evolution of expression throughout the different stages of development. And, on the other hand, although no significant differences were found in the *Cdh2* and *Afdn* genes, *Cdh13* showed significant overexpression at the time of generation of the upper layer projection neurons.

Índice

FICHA DEL TRABAJO FINAL	II
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VIII
1. Introducción	1
1.1. Contexto y justificación del Trabajo	1
1.1.1. Descripción general	1
1.1.2. Justificación del TFM	1
1.2. Objetivos del Trabajo	2
1.2.1. Objetivos generales	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
1.3. Enfoque y método seguido	2
1.4. Planificación con hitos y temporización:	3
1.4.1. Tareas	3
1.4.2. Calendario	3
1.4.3. Hitos	4
1.4.4. Análisis de riesgos	4
1.5. Resultados esperados	4
1.5.1. Plan de trabajo	4
1.5.2. Memoria	4
1.5.3. Presentación virtual	5
1.5.4. Autoevaluación del proyecto	5
1.6. Estructuración del proyecto	5
2. Estado del arte	6
2.1. La neocorteza y tipos neurales	6
2.2. Desarrollo de la neocorteza	7

2.3.	Implicación de las proteínas de adhesión en el desarrollo de la corteza cerebral	9
3.	Metodología	12
3.1.	Selección y descarga de datos	12
3.2.	Selección de los tipos celulares y normalización de datos	13
3.3.	Análisis descriptivo	14
3.4.	Evolución de la expresión de las neuronas, células de glía radial y progenitores intermedios a lo largo del desarrollo	14
3.5.	Evolución de la expresión de <i>Cdh2</i> y <i>Afdn</i> durante el desarrollo	14
4.	Resultados	15
4.1.	Análisis descriptivo	15
4.1.1.	Neuronas	15
4.1.2.	Células de Glía Radial	15
4.1.3.	Progenitores Intermedios	16
4.2.	Genes marcadores de cada tipo celular	16
4.3.	Evolución de la expresión a lo largo del desarrollo por tipo celular	18
4.3.1.	Neuronas	18
4.3.2.	Células de Glía Radial	20
4.3.3.	Progenitores Intermedios	22
4.4.	Evaluación de la expresión diferencial de los genes <i>Cdh2</i> y <i>Afdn</i>	23
4.4.1.	Cadherinas diferencialmente expresadas entre los distintos tipos celulares	24
4.4.2.	Cadherinas diferencialmente expresadas en el tiempo por tipo celular	24
4.4.3.	Cadherinas diferencialmente expresadas entre las edades E12.5. y E15.5	26
5.	Discusión	27
5.1.	Análisis descriptivo	27

5.2.	Genes marcadores de cada tipo celular	27
5.3.	Evolución de la expresión a lo largo del desarrollo por tipo celular	28
5.4.	Evaluación de la expresión diferencial de los genes <i>Cdh2</i> y <i>Afdn</i>	28
5.4.1.	Cadherinas diferencialmente expresadas entre los distintos tipos celulares	29
5.4.2.	Cadherinas diferencialmente expresadas en el tiempo por tipo celular	29
5.4.3.	Cadherinas diferencialmente expresadas entre las edades E12.5. y E15.5	30
6.	Conclusiones	32
7.	Glosario	33
8.	Bibliografía	34

Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de Gantt.....	3
Figura 2: Representación de los tipos de neuronas de proyección.....	6
Figura 3: Regiones proliferativas y tipos progenitores.....	8
Figura 4: Cortes coronales de un ratón control y un cKO para <i>Cdh2</i>	10
Figura 5: Esquema de la organización de un archivo loom.. ..	12
Figura 6: UMAP y diagramas de violín de 1000 neuronas.	15
Figura 7: UMAP y diagramas de violín de 1000 RG	15
Figura 8: UMAP y diagramas de violín de 1000 IP.....	16

Lista de tablas

Tabla 1: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas.	16
Tabla 2: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG.....	17
Tabla 3: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP.....	17
Tabla 4: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas en E11.0.	18
Tabla 5: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas en E12.5.	18
Tabla 6: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas en E15.5.	19
Tabla 7: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas en E18. ...	19
Tabla 8: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG en E11.0.	20
Tabla 9: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG en E12.5.	20
Tabla 10: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG en E15.5.	21
Tabla 11: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG en E18.0.	21
Tabla 12: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP en E11.0.	22
Tabla 13: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP en E12.5.	22
Tabla 14: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP en E15.5.	23
Tabla 15: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP en E18.0.	23
Tabla 16: Tipos celulares y edades en los que <i>Cdh2</i> está diferencialmente expresada	23
Tabla 17: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los distintos tipos celulares.....	24
Tabla 18: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en las neuronas a lo largo del desarrollo.....	24
Tabla 19: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en las RG a lo largo del desarrollo.....	25
Tabla 20: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los IP a lo largo del desarrollo.....	25
Tabla 21: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los distintos tipos celulares entre las edades 12.5 y 15.5	26

1. Introducción

1.1. Contexto y justificación del Trabajo

1.1.1. Descripción general

El siguiente Trabajo de Fin de Máster consiste en el análisis de sets de datos de single-cell RNA-seq obtenidos a partir de repositorios públicos con el fin de buscar, llevando a cabo el pipeline correspondiente, diferencias de expresión en células neuronales de la corteza cerebral a lo largo del desarrollo, prestando especial interés a las proteínas de adhesión celular como la cadherina-2 o la afadina (codificadas por los genes *Cdh2* y *Afdn* respectivamente).

1.1.2. Justificación del TFM

La neocorteza controla capacidades cognitivas como el procesado de la información o el lenguaje. A pesar de los grandes logros alcanzados sobre su desarrollo, se desconoce cómo los progenitores corticales generan toda la diversidad celular cortical. Diversos estudios muestran que la ausencia de proteínas de adhesión celular (CDH2 y AFDN) produce una megalencefalia, así como evita la correcta estructura en capas de la corteza (Gil-Sanz, Landeira, Ramos, Costa, & Muller, 2014). Además, la megalencefalia ha sido asociada a aumentos en la producción de neuronas de proyección de capas altas en la corteza de personas en el espectro autista (Fang, Chen, Fu, & Ip, 2014), por lo que es importante esclarecer la implicación de dichas proteínas en el desarrollo cortical.

El motivo por el cual se ha decidido estudiar dichas proteínas con datos de single-cell viene justificado por el hecho de que en los estudios previamente mencionados se generan ratones condicionales a los que se les perturban proteínas de interés para estudiar su implicación. Generar estos modelos es costoso en tiempo, requiere de muchos animales de experimentación y se estudia un único gen a la vez. El estudio de datos de RNA-seq a partir de single-cell nos permite conocer de una manera mucho más precisa qué genes se expresan en los diferentes tipos celulares del cerebro (Cuevas-Diaz Duran, Wei, & Qian Wu, 2017) y, teniendo datos de diferentes etapas del desarrollo, así como de cerebros adultos, podemos comparar los datos de expresión de un mismo tipo celular a lo largo del desarrollo o respecto al cerebro adulto.

1.2. Objetivos del Trabajo

1.2.1. Objetivos generales

- Aprender a manejar datos de sc-RNA-seq con el lenguaje de programación R.
- Identificar los genes diferencialmente expresados a lo largo de diferentes etapas del desarrollo.
- Determinar si existen cambios en los niveles de expresión de las proteínas de adhesión celular a lo largo de diferentes etapas del desarrollo cortical

1.2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar y descargar los sets datos a analizar.
- Elegir cuidadosamente el tipo celular a estudiar en cada una de las etapas (progenitores neurales en etapas tempranas, neuronas corticales en etapas tardías).
- Realizar un análisis exploratorio de los datos.
- Estudiar la expresión diferencial de los genes con el fin de elaborar un perfil de expresión a lo largo del desarrollo cortical, así como realizar un enriquecimiento funcional.
- Comprobar si existen diferencias de expresión en nuestros genes de interés *Cdh2* y *Afdn* a lo largo del desarrollo.

1.3. Enfoque y método seguido

El propósito de este Trabajo de Fin de Máster es comprender cómo varía la expresión génica a lo largo del desarrollo para intentar aportar luz sobre qué genes y/o funciones génicas juegan un papel clave en cada momento del desarrollo cortical. Aprovechando, además, para confirmar el papel clave de las proteínas de adhesión celular como ya se ha descrito en anteriores estudios.

La limitación en tiempo y recursos hace que el enfoque a seguir sea la utilización de datos ya obtenidos previamente y que están disponibles en repositorios públicos como el *Mouse Brain Atlas*. Dado que el trabajo se va a realizar con datos de single-cell, habrá que prestar especial atención en los datos de desarrollo, pues dado que aún no se ha generado la corteza, habrá que elegir cuidadosamente el tipo celular que dará lugar a las neuronas corticales, los progenitores neurales. Esto implica, por tanto, un trabajo de investigación y búsqueda bibliográfica inicial.

En cuanto al análisis de los datos, se realizará en el entorno R/Bioconductor, utilizando paquetes específicos para el análisis de sc-RNA-seq como **scater** (Single-Cell Analysis Toolkit for Gene Expression Data in R) y para la obtención de las imágenes paquetes como **ggplot** o **pheatmap** (Kiselev, Andrews, McCarthy, Büttner, & Hemberg, 2019).

1.4. Planificación con hitos y temporización:

1.4.1. Tareas

1. Selección y descarga de datos de sc-RNA-seq que contengan información del cerebro de ratón en diferentes etapas del desarrollo y postnatales.
2. Determinar los adecuados tipos celulares que se incluirán en el estudio (progenitores neurales y neuronas corticales).
3. Análisis exploratorio y procesamiento de los datos, así como su correcta normalización si fuera necesario y su integración en caso de utilizar datos de diferentes estudios.
4. Estudio de la expresión diferencial y enriquecimiento funcional para la realización de un perfil de expresión a lo largo del desarrollo cortical.
5. Análisis de la existencia de diferencias de expresión de los genes *Cdh2* y *Afdn* a lo largo del desarrollo de la corteza o respecto al cerebro adulto.

1.4.2. Calendario

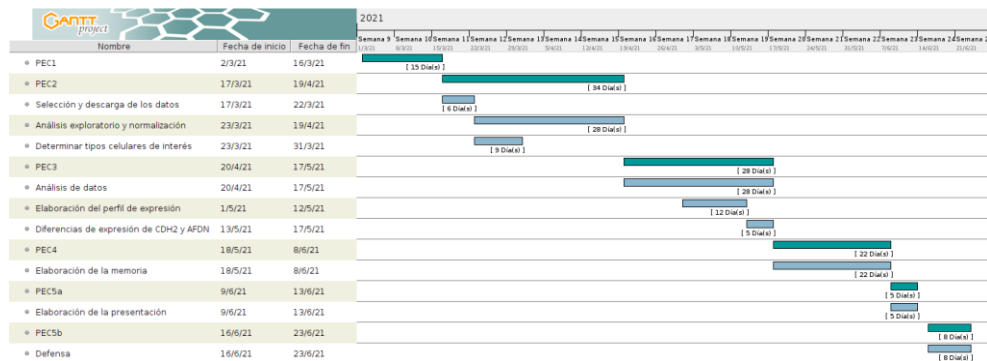


Figura 1: Diagrama de Gantt. Planificación de las tareas en el tiempo.

1.4.3. Hitos

Los hitos del trabajo son:

- La obtención de datos. Es primordial conseguir datos adecuados de sc-RNA-seq de cerebro de ratón de diferentes etapas del desarrollo, pues de esto depende el desarrollo del proyecto.
- El procesado de los datos. Es necesario un correcto manejo de los datos para obtener resultados fiables y reproducibles.
- La obtención, interpretación y correcta presentación de los resultados. Tanto si los resultados son los esperados, como si nuestra hipótesis inicial no es correcta, han de obtenerse unos resultados que muestren el desarrollo del trabajo.
- La finalización de la memoria. El desarrollo del trabajo y los resultados han de presentarse en una memoria detallada en el plazo requerido.

1.4.4. Análisis de riesgos

En cuanto a los riesgos del trabajo, es importante destacar que, aunque he trabajado con datos de RNA-seq, no he trabajado nunca con datos de sc-RNA-seq. Por tanto, es importante destacar que el proceso de aprendizaje podría retrasar las fechas establecidas en el diagrama de Gantt (**Figura 1**). Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, es importante escoger cuidadosamente el tipo celular que se va a analizar, pues queremos centrarnos en los progenitores neurales que darán lugar a las neuronas de proyección de capas altas.

1.5. Resultados esperados

1.5.1. Plan de trabajo

El plan de trabajo presentado en esta PEC espero que sirva como guía para desarrollar mi proyecto dentro de los tiempos establecidos y sin perder el foco de los objetivos definidos para poder desarrollar adecuadamente el trabajo y su consiguiente memoria.

1.5.2. Memoria

Con la memoria espero plasmar de la manera más clara y didáctica posible todo el trabajo desarrollado durante el proyecto y la correcta presentación de los resultados. Así como ser muy detallada con el código utilizado, ya sea mediante anexos

y/o enlazándolo en GitLab para garantizar la reproducibilidad de los resultados y los posibles análisis posteriores.

1.5.3. Presentación virtual

La presentación virtual pretende ser una oportunidad para explicar de forma clara, breve y visual el desarrollo del proyecto, así como los resultados obtenidos. Pudiendo ser una oportunidad para aclarar los detalles que no queden bien explicados en la memoria y para aceptar críticas que me ayuden a mejorar en mis proyectos futuros, incluida la tesis doctoral que he empezado recientemente.

1.5.4. Autoevaluación del proyecto

Aunque por el momento sólo he realizado la planificación del proyecto, estoy muy orgullosa, dado que es el primer trabajo final en el que me he encontrado con el suficiente conocimiento científico y capacidad analítica como para elegir el tema, plantear la pregunta y definir una hipótesis. Pues en mis trabajos anteriores siempre había sido impuesto por el tutor académico. En cuanto al plan definido en este documento, creo que me va a resultar muy útil para organizarme el tiempo y llevar a cabo el proyecto.

1.6. Estructuración del proyecto

1. **Resumen** El resumen permitirá dar una visión general del trabajo en menos de 250 palabras tanto en la lengua principal del trabajo como en inglés.
2. **Introducción** La introducción contará con un contexto y justificación del trabajo, los objetivos del trabajo, el enfoque y método seguido, la planificación del trabajo y una breve descripción de los otros capítulos de la memoria.
3. **Estado del arte** En este apartado se explicará detalladamente el conocimiento actual sobre el desarrollo de la corteza cerebral y los estudios previos que han llevado al planteamiento de la hipótesis del trabajo
4. **Metodología** Materiales y métodos utilizados para llevar a cabo el trabajo.
5. **Resultados** Derivados de los análisis realizados en el apartado anterior.
6. **Discusión** Explicación biológica de los resultados.
7. **Conclusiones** Aquellas que se extraen de la realización del trabajo.
8. **Glosario** Listado y definición de palabras técnicas utilizadas.
9. **Bibliografía** Publicaciones, páginas web o recursos utilizados.
10. **Anexos** Figuras o código adicional no incluidos en el cuerpo principal.

2. Estado del arte

2.1. La neocorteza y tipos neurales

La corteza cerebral es la capa más superficial del cerebro y se genera a partir de la parte dorsal del telencéfalo, ubicado en la parte más rostral del tubo neural. La corteza se subdivide en neocorteza, paleocorteza (corteza piriforme) y arquicorteza (hipocampo) (Marín & Rubenstein, 2003).

La neocorteza es la parte más reciente, evolutivamente hablando, del cerebro. Está formada por seis capas (I-VI) de materia gris y, como tal, sólo se encuentra en el cerebro de los mamíferos (Kolb, 2014). La neocorteza controla funciones cognitivas complejas como el procesado de la información o el lenguaje. Aunque su superficie es lisa en el cerebro de pequeños mamíferos, en primates presenta profundos surcos que aumentan su superficie, llegando a representar en humanos un 80% del cerebro (Molnár et al., 2014).

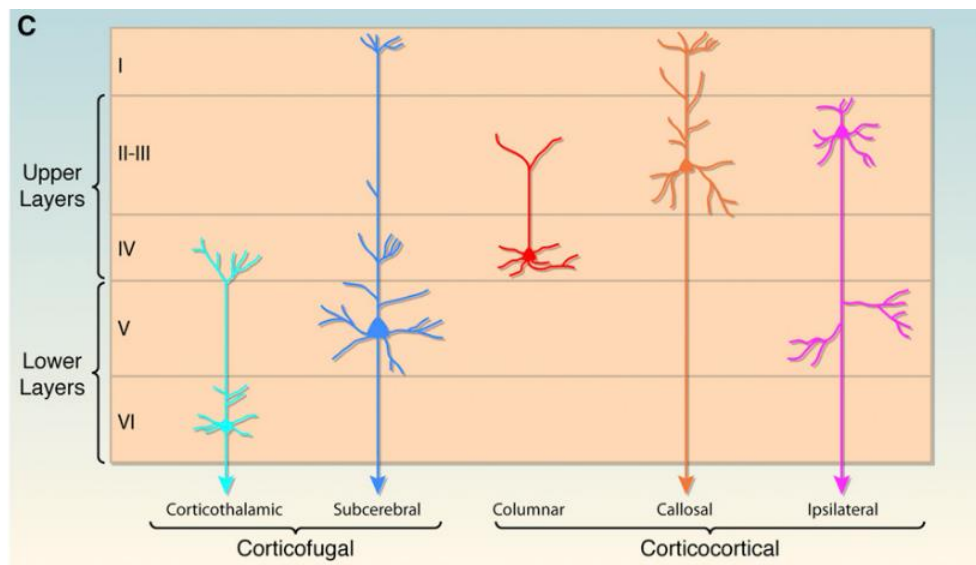


Figura 2: Representación de los tipos de neuronas de proyección situadas en las diferentes capas neocorticales. Tomada de Franco & Müller, 2013.

Los tipos celulares que forman la neocorteza pueden ser clasificados en dos grandes grupos: neuronas y células de glía. Las primeras, a su vez, pueden clasificarse en neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección (**Figura 2**) son neuronas excitatorias glutamatérgicas que pueden presentar largos axones capaces de extenderse a otras áreas corticales (neuronas corticocorticales) o a otras

áreas subcorticales o subcerebrales (neuronas corticofugales). Las neuronas corticocorticales se conocen como neuronas de proyección de capas altas (ULN por sus siglas en inglés *upper layer neurons*) debido a que se sitúan en las capas II-IV de la neocorteza, mientras que las neuronas corticofugales se sitúan en las capas V-VI, por lo que se las denomina neuronas de proyección de capas bajas (LLN por sus siglas *lower layer neurons*). Las neuronas de proyección de capas altas han experimentado una considerable expansión en la evolución de los mamíferos. Además, son importantes en funciones asociativas superiores y las mayoritariamente afectadas en desórdenes neurológicos como la esquizofrenia o el autismo (Franco & Müller, 2013).

2.2. Desarrollo de la neocorteza

La neocorteza se genera a partir de células neuroepiteliales que recubren el tubo neural en su parte más rostral. En estadios tempranos del desarrollo embrionario dichas células se dividen simétricamente aumentando así su número y, posteriormente, entre los días 9 y 10 (E9-E10) en ratón, comienzan a dividirse de manera asimétrica para generar las células progenitoras RG (células de glía radial). A partir de éstas se generan todas las neuronas de proyección y las células de glía cortical (Malatesta, Hartfuss, & Götz, 2000; Noctor, Flint, Weissman, Dammerman, & Kriegstein, 2001).

Las RG se localizan en la zona adyacente al ventrículo, conocida como zona ventricular (VZ) (**Figura 3**) (Evans, Kelly, Precious, & Rosser, 2012). Estas células también comienzan presentando una división simétrica y, a partir del día E10.5 (Haubensak, Attardo, Denk, Huttner, & Simons, 2004), una división asimétrica que da lugar a una célula de glía radial y otra célula. Esta última puede ser una neurona postmitótica u otro tipo de célula progenitora comprometida al linaje neuronal, conocido como progenitor intermedio (IP). Después de su generación, estos progenitores intermedios abandonan la zona ventricular para localizarse en posiciones más basales generando la zona subventricular (SVZ) (**Figura 3**). Algunos de estos se dividirán simétricamente un número limitado de veces para generar más IP antes de iniciar divisiones simétricas terminales para producir pares de neuronas postmitóticas (Miyata et al., 2004; Noctor, Martínez-Cerdeño, Ivic, & Kriegstein, 2004).

Las neuronas de proyección se generan a partir de los mencionados progenitores siguiendo una secuencia temporal. En primer lugar, se generan las neuronas que ocuparán las capas bajas de la corteza (E12-E13), seguidas de las neuronas de capas

altas (E14-E17) y finalmente la glía (astrocitos y oligodendrocitos) (Molyneaux, Arlotta, Menezes, & Macklis, 2007). Estas neuronas de proyección migran radialmente (perpendicular a la zona ventricular) y poblarán la corteza en desarrollo siguiendo lo que se conoce como *inside-out pattern* (patrón de dentro a fuera). De esta manera, las oleadas de neuronas que se generan más tarde pasarán a través de las capas generadas por las producidas anteriormente (Berry & Rogers, 1965). Los diferentes tipos de neuronas corticales presentan distintos patrones migratorios. Aquellas que se generan en momentos tempranos de la corticogénesis migran de manera independiente a los procesos de las células de glía radial por un mecanismo llamado translocación somática. Mientras que las neuronas que se generan más tarde migran a posiciones más superficiales siguiendo como sustrato los procesos de la glía radial por un mecanismo conocido como locomoción guiada (Caviness & Rakic, 1978; Nadarajah, Brunstrom, Grutzendler, Wong, & Pearlman, 2001). A través de estos movimientos se forma la estructura laminada en seis capas anteriormente descrita.

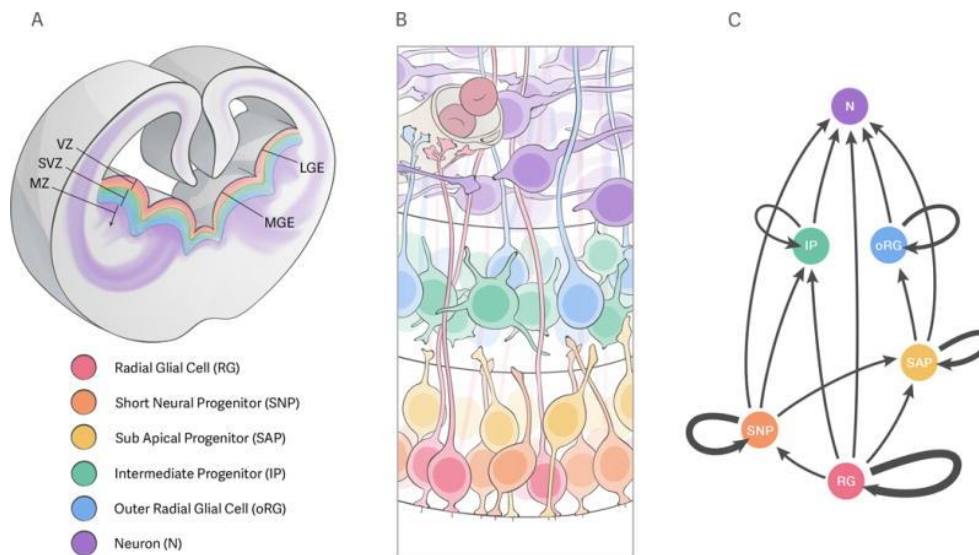


Figura 3: Regiones proliferativas y tipos progenitores en las eminencias ganglionares. **A:** sección coronal de un prosencéfalo de ratón que muestra las eminencias ganglionares lateral y medial (LGE y MGE, respectivamente): la zona ventricular (VZ, colores cálidos) y la zona subventricular (SVZ, colores fríos) son la fuente de neuronas (violetas) que se acumulan en la zona marginal (MZ) o migran lejos de ella, como lo representan las trazas violetas. **B:** Representación de los diferentes tipos de progenitores potencialmente presentes en las eminencias ganglionares. La superficie apical (ventricular) del tejido está hacia abajo y el lado basal hacia arriba. Los cuerpos celulares de la glía radial (RG, rojo), los precursores neurales cortos (SNP, naranja) y los progenitores subapicales (SAP, amarillo) residen en la zona ventricular. La glía radial externa (oRG, azul) y los progenitores intermedios (IP, verde) residen en la zona subventricular. Las neuronas (N, púrpura) nacidas de estos progenitores se mueven hacia la zona marginal, donde experimentarán una migración radial y/o tangencial para alcanzar sus posiciones finales dentro del cerebro. **C:** linaje de progenitores en las eminencias ganglionares. Las flechas representan los resultados potenciales de la división de cada tipo de progenitor; el grosor de las flechas en bucle representa la capacidad de autorrenovación de cada tipo de progenitor. Tomada de García & Harwell, 2017.

2.3. Implicación de las proteínas de adhesión en el desarrollo de la corteza cerebral

Durante muchos años, la mayoría de los avances en el campo de la corticogénesis se basaron en la identificación de vías de señalización intracelular implicadas en este proceso y ha sido recientemente cuando se ha comenzado a estudiar el papel de los receptores de superficie en la regulación de dichos procesos. Estos receptores incluyen proteínas de adhesión que regulan las interacciones entre los diferentes tipos celulares y con matriz extracelular.

Modelos de ratón defectivos para algunos tipos de integrina (proteínas de adhesión célula-matriz extracelular) como la integrina $\beta 1$ han demostrado el papel de estas proteínas de adhesión para la correcta supervivencia y especificación de las células de glía radial. Sin embargo, parece que son indispensables en la regulación de la migración radial de las neuronas de proyección (Belvindrah, Hankel, Walker, Patton, & Müller, 2007; Graus-Porta et al., 2001; Radakovits, Barros, Belvindrah, Patton, & Müller, 2009).

Otras proteínas de adhesión celular tipo célula-célula con implicación en corticogénesis son las cadherinas. Estudios recientes muestran el importante papel de CDH2 en la regulación de la migración de las neuronas de proyección (Franco, Martínez-Garay, Gil-Sanz, Harkins-Perry, & Müller, 2011; Jossin & Cooper, 2011; Martínez-Garay et al., 2016) y en la correcta organización de la corteza cerebral (Kadowaki et al., 2007). Otros estudios han mostrado el papel de dicha cadherina en el control de la proliferación de los progenitores neurales produciendo un fenotipo de megalencefalia y formación de doble corteza (Gil-Sanz et al., 2014). Se ha descrito también que para regular dichos procesos las cadherinas no actúan solas, sino que precisan de otras proteínas de adhesión en la familia de las nectinas para ser reclutadas a los sitios de contacto entre los diferentes tipos celulares corticales. Y que en dicha interacción juega un papel relevante la afadina, una proteína de andamiaje que conecta con el citoesqueleto de actina (Gil-Sanz et al., 2013, 2014).

La megalencefalia ha sido asociada a aumentos en la producción de neuronas de proyección en la corteza de personas en el espectro autista (Fang et al., 2014). Los pacientes que sufren megalencefalia presentan diferentes tipos de síntomas neurológicos incluyendo defectos cognitivos. Sin embargo, no se conocen hasta el momento los mecanismos específicos que causan esta alteración morfológica y sus síntomas neurológicos asociados. En los mutantes condicionales de *Cdh2* y *Afdn*, en los que se ha perturbado la función del gen en todas las células de la corteza, se ha observado megalencefalia por un aumento de la corteza cerebral debido a la

sobreproliferación, dando lugar a un fenotipo similar al de aquellos individuos que padecen el síndrome del doble córtex o heterotopía en banda (Gil-Sanz et al., 2014; Yamamoto et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que dichas proteínas se eliminaron de todos los progenitores desde estados tempranos del desarrollo, parece que no todos los tipos celulares corticales fueron afectados por igual.

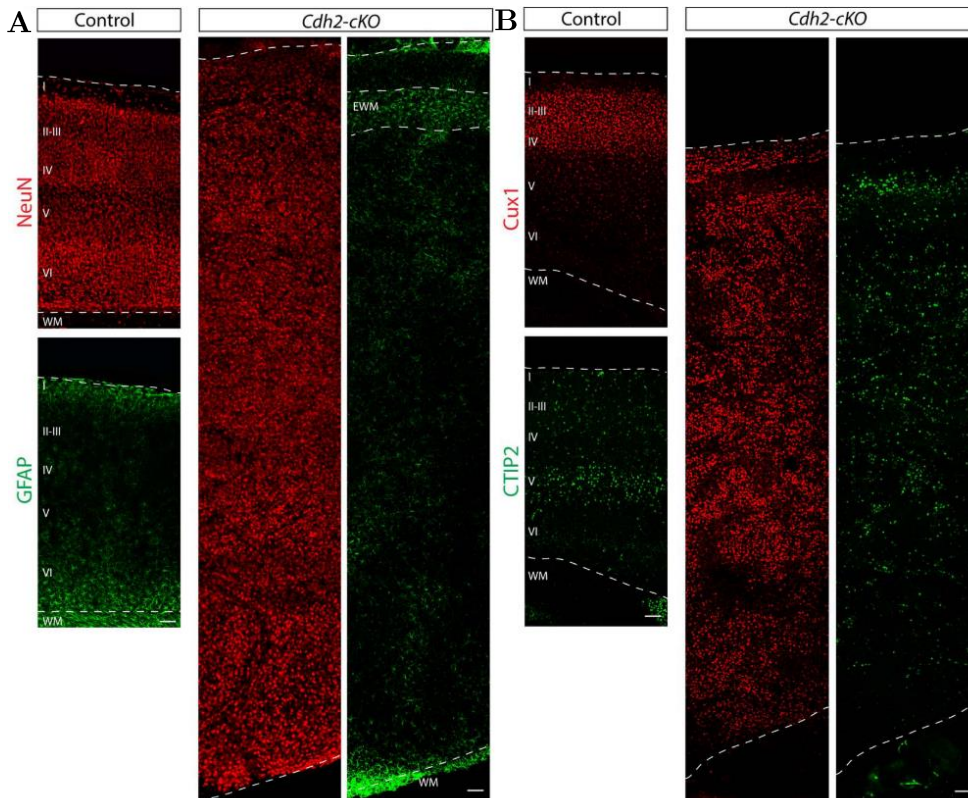


Figura 4: **A)** Cortes coronales de un ratón control y un cKO para *Cdh2* con un marcador de neuronas NeuN en rojo y un marcador de astrocitos GFAP en verde. **B)** Cortes coronales de un ratón control y un cKO para *Cdh2* con un marcador de neuronas de capas altas Cux1 en rojo y un marcador de neuronas de capas bajas CTIP2 en verde. Imagen tomada de Gil-Sanz et al., 2014.

En el trabajo de Gil-Sanz *et al.* de 2014 se utilizaron dos cepas de ratones *knockout* condicionales de corteza cerebral para (*Cdh2* y *Afdn*) mediante el uso del ratón Cre específico (que expresa la recombinasa Cre de manera específica) de palio (*Emx1-Cre*) en los que se analizó su fenotipo durante el desarrollo y en edades postnatales. Durante el desarrollo embrionario se observó desde edades tempranas un aumento en la proliferación de los progenitores neurales que se traducía en un aumento en la producción de neuronas (**Figura 4-A**) en estadios posteriores, suponiendo un incremento del tamaño de la corteza cerebral que producía un fenotipo de megalencefalia más notable en el caso del mutante de *Cdh2*. Un estudio más

detallado muestra cómo el aumento en el número de células es mucho más notable en el caso de las neuronas de proyección que expresan marcadores de neuronas de capas altas (**Figura 4-B**).

Estos resultados sugieren que la perturbación de estas proteínas de adhesión podría estar afectando únicamente al comportamiento proliferativo de los progenitores destinados a producir ULN por un mecanismo actualmente desconocido.

3. Metodología

Este proyecto de investigación se ha llevado a cabo utilizando el lenguaje de programación R en el entorno de desarrollo RStudio, ampliamente utilizado en el análisis de datos y la toma de decisiones en las ciencias de la vida y la salud (Jalal et al., 2017). Todo el código desarrollado ha sido depositado públicamente para garantizar la transparencia y reproducibilidad de los resultados en el siguiente enlace:

<https://gitlab.com/MartaNadal/tfm-scm>

3.1. Selección y descarga de datos

En este trabajo se pretende estudiar la expresión en determinados tipos celulares, por lo que se ha recurrido a datos de single-cell RNA-seq. Los datos scRNA-seq son de gran utilidad en el estudio del desarrollo y la consiguiente generación de atlas de expresión génica de órganos en desarrollo (Potter & Org, 2018).

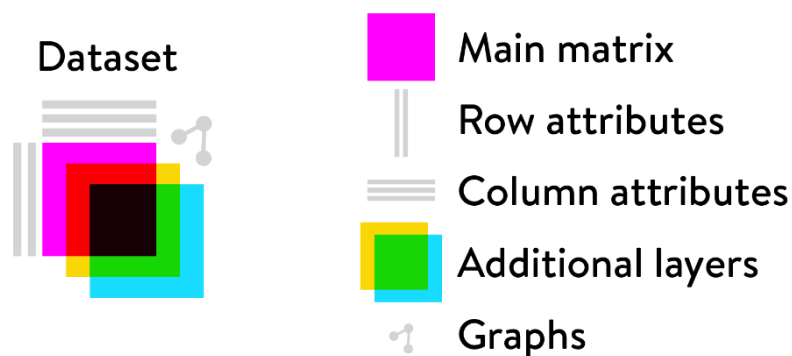


Figura 5: Esquema de la organización de un archivo *loom*. La matriz principal contiene los valores de expresión (célula por columna, gen por fila); Las anotaciones de fila y columna contienen metadatos para genes y células, como Nombre, Cromosoma, Posición (para genes) y Cepa, Sexo, Edad (para células). Los objetos de gráfico se utilizan para almacenar los gráficos del vecino más cercano que se utilizan para la agrupación en clústeres basada en gráficos. Tomada de Linnarsson, 2017.

Los datos utilizados en este trabajo se han obtenido del *Mouse Brain Atlas* (<http://mousebrain.org/>) desarrollado por el laboratorio de Linnarsson (La Manno et al., 2020). Dichos datos están en formato *loom*, un tipo de archivo desarrollado por el mismo laboratorio que permite almacenar conjuntos de datos muy grandes, como es el caso de los datos de scRNA-seq. Están creados en el formato de archivo

HDF5, que se caracterizan por admitir conjuntos de datos multidimensionales (Linnarsson, 2017).

3.2. Selección de los tipos celulares y normalización de datos

Una vez descargados los datos, se seleccionaron los tipos celulares de interés para el presente estudio. Accediendo a las anotaciones de las columnas, se decidió seleccionar los tipos celulares en base a su clase y escoger “Radial Glia” y “Neuron” y a su subclase y escoger “Neuronal intermediate progenitor”. Las células de glía radial, como se ha explicado anteriormente, son las responsables de generar los tipos celulares, entre ellos las neuronas y los progenitores intermedios que, a su vez, también generan neuronas (**Figura 3-C**) (García & Harwell, 2017). Según los estudios mencionados, la ausencia de las proteínas de adhesión en los progenitores neurales causa el fenotipo de megalencefalia. No obstante, el defecto de estas proteínas no sólo afecta a la proliferación neuronal, sino también a la correcta migración de las neuronas ya generadas (Kadowaki et al., 2007; László et al., 2020), por lo que las neuronas también son un tipo celular de interés en este estudio.

A continuación, se realizó una selección aleatoria de 1000 células de cada uno de nuestros tipos celulares de interés y con los tres tipos juntos que se llamaron *so_neuron*, *so_glia*, *so_neuroblast* y *so* respectivamente. Estos *subsets* se llevaron a cabo para trabajar con datos abordables y se transformaron en objetos Seurat (Satija, Farrell, Gennert, Schier, & Regev, 2015) que fueron guardados en archivos RDS. Además, estas 1000 células se seleccionaron sólo de entre unas edades concretas que representaran el momento en el que empiezan a generarse las RG, la edad a la que empiezan a generarse las LLN, las ULN y una edad posterior a dichos procesos (E11.0, E12.5, E15.5 y E18.0 respectivamente).

Estos datos se normalizaron con la función `SCTransform` del mismo paquete `seurat` para permitir los posteriores análisis de los datos. La realización de estos *subsets* y su normalización puede consultarse en el archivo `01_descriptive.R` ubicado en el repositorio:

<https://gitlab.com/MartaNadal/tfm-scm/-/tree/master/alternative>

3.3. Análisis descriptivo

Para el análisis descriptivo de los datos, se realizó un UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) y un diagrama de violín tal y como se muestra de ejemplo en el apartado *Interoperability between single-cell object formats* de <https://satijalab.org/>.

3.4. Evolución de la expresión de las neuronas, células de glía radial y progenitores intermedios a lo largo del desarrollo

La evaluación de los genes que están diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo en cada uno de los tipos celulares se realizó con la función `FindAllMarkers` del paquete `seurat` para cada uno de los tipos celulares (subsets `so_neuron`, `so_glia`, `so_neuroblast`) utilizando la edad como `ident`. De esta manera, se pueden identificar para cada uno de los tipos celulares, los genes diferencialmente expresados en cada una de las edades seleccionadas y así estudiar cómo evoluciona la expresión de cada tipo celular a lo largo del desarrollo.

Por otro lado, el estudio de los genes que están diferencialmente expresados entre los distintos tipos celulares se realizó con la misma función, pero del `subset so` y definiendo el tipo celular como `ident`.

El código de estos análisis puede consultarse en el archivo `diffExpression.R` del repositorio:

<https://gitlab.com/MartaNadal/tfm-scm/-/tree/master>

3.5. Evolución de la expresión de *Cdh2* y *Afdn* durante el desarrollo

El estudio de *Cdh2* y *Afdn* a lo largo del desarrollo en cada uno de los tipos celulares se realizó, por una parte, buscándolos en las tablas generadas en el apartado anterior y, por otra parte, utilizando la función `FindMarkers` del paquete `seurat` para estudiar si existen diferencias de expresión entre las edades E12.5 y E15.5 (`ident 1` e `ident 2` respectivamente) en el conjunto de los tres tipos celulares.

Además, de la misma manera que se estudiaron *Cdh2* y *Afdn* buscándolos en las tablas, se estudió la expresión del resto de cadherinas y protocadherinas.

4. Resultados

4.1. Análisis descriptivo

4.1.1. Neuronas

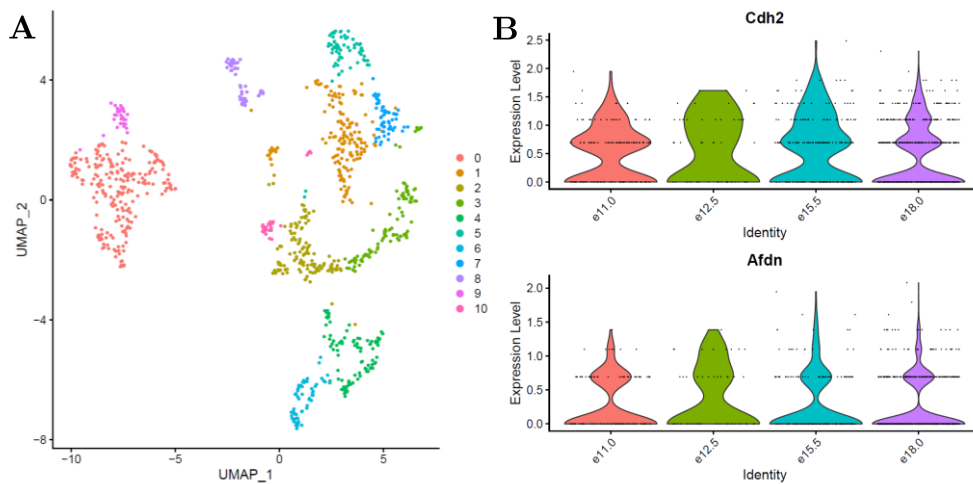


Figura 6: **A)** UMAP de selección aleatoria de 1000 neuronas tras una normalización con la función SCTransform del paquete Seurat. **B)** Diagramas de violín que representan los niveles de expresión de los genes *Cdh2* (arriba) y *Afdn* (abajo) en cada una de las edades escogidas.

4.1.2. Células de Glía Radial

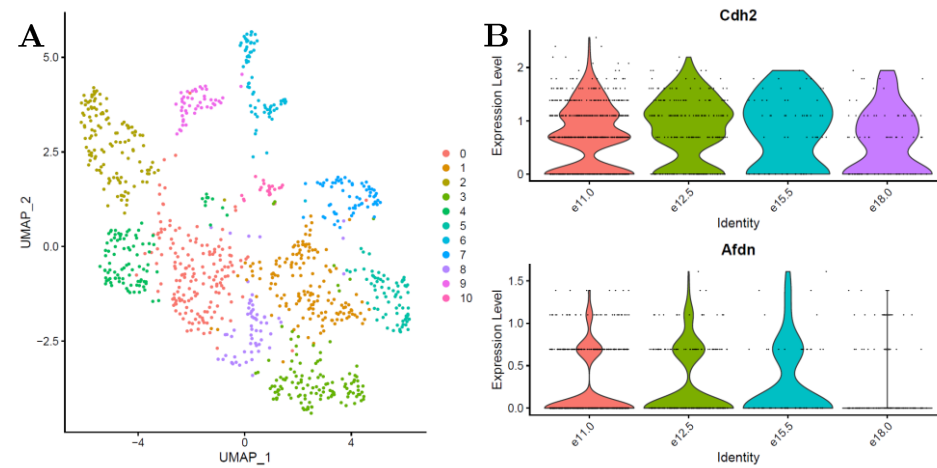


Figura 7: **A)** UMAP de selección aleatoria de 1000 células de Glía Radial tras una normalización con la función SCTransform del paquete Seurat. **B)** Diagramas de violín que representan los niveles de expresión de los genes *CDHN* (arriba) y *Afdn* (abajo) en cada una de las edades escogidas.

4.1.3. Progenitores Intermedios

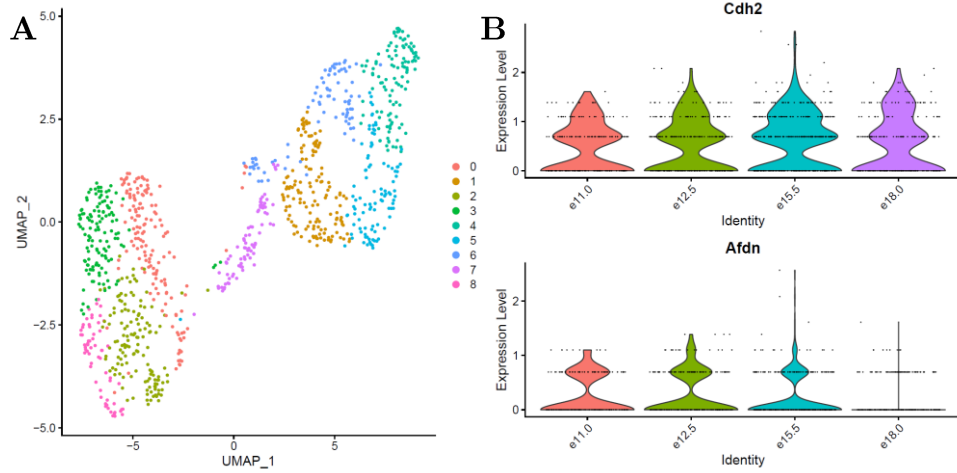


Figura 8: A) UMAP de selección aleatoria de 1000 células progenitores intermedias tras una normalización con la función SCTransform del paquete Seurat. B) Diagramas de violín que representan los niveles de expresión de los genes *Cdh2* (arriba) y *Afdn* (abajo) en cada una de las edades escogidas.

4.2. Genes marcadores de cada tipo celular

Tabla 1: Los 10 genes con p-valores más bajos de las neuronas resultantes del FindAllMarkers.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Tead2	1.67E-131	-1.3845076	2.36E-127
Hmgb2	3.40E-131	-2.8917137	4.81E-127
Pclaf	4.55E-127	-1.9189892	6.44E-123
Mdk	1.36E-126	-2.0984443	1.92E-122
Vim	4.37E-125	-2.6292162	6.18E-121
Rtn1	1.04E-120	2.8802541	1.48E-116
Fabp7	7.35E-118	-3.2221279	1.04E-113
Tubb3	1.74E-117	2.7571186	2.46E-113
Rrm2	2.74E-116	-1.945409	3.88E-112
Hes5	6.64E-116	-2.2522779	9.39E-112

Tabla 2: Los 10 genes con p-valores más bajos de las RG resultantes del FindAllMarkers.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Hes5	2.60E-137	2.4430304	3.67E-133
Vim	1.39E-129	2.677694	1.96E-125
Pclaf	3.42E-127	1.8390746	4.84E-123
Hmgb2	1.06E-121	2.5719281	1.51E-117
Tead2	4.65E-119	1.3617114	6.58E-115
Fabp7	5.11E-118	3.3535557	7.23E-114
Id3	8.32E-117	2.4787425	1.18E-112
Rrm2	2.40E-116	1.8524549	3.40E-112
Zfp3611	6.65E-115	1.0178281	9.40E-111
Cend1	7.65E-112	1.6255101	1.08E-107

Tabla 3: Los 10 genes con p-valores más bajos de los IP resultantes del FindAllMarkers.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Eomes	1.43E-86	1.827123	2.02E-82
Neurog2	1.75E-57	2.5916128	2.48E-53
Mfap4	3.16E-50	1.4890688	4.48E-46
Rhbdl3	1.50E-29	0.7454667	2.12E-25
Mfng	1.96E-28	1.1348176	2.77E-24
Rnd2	3.78E-28	1.0335578	5.35E-24
Ezr	6.58E-28	0.9506019	9.32E-24
Gm29260	4.21E-25	1.0346031	5.96E-21
Neurog1	9.73E-25	0.628943	1.38E-20
Dhrs4	8.00E-24	0.7550009	1.13E-19

4.3. Evolución de la expresión a lo largo del desarrollo por tipo celular

4.3.1. Neuronas

Tabla 4: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las neuronas en E11.0.

Gen	p-valor	avg_log2FC	p-valor adj
Crabp2	1.03E-118	1.9965324	1.41E-114
Hbb-y	1.84E-75	1.1068426	2.53E-71
Pkm	3.26E-49	1.1010464	4.48E-45
Lhx1	7.88E-46	1.0447175	1.08E-41
Ftl1	2.42E-45	0.6737367	3.33E-41
Lhx1os	2.77E-42	1.2526129	3.81E-38
Hba-x	7.33E-42	0.3685682	1.01E-37
Cdkn1c	4.83E-40	1.116825	6.63E-36
Tagln3	3.31E-39	0.9434654	4.55E-35
Lamp5	2.09E-38	0.9519028	2.87E-34

Tabla 5: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las neuronas en E12.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Uba52	7.67E-50	2.0198238	1.05E-45
Gnb2	2.50E-44	0.6840129	3.44E-40
AY036118	6.72E-36	0.870556	9.24E-32
Hbb-y	3.69E-31	0.8647795	5.07E-27
Malat1	2.05E-28	-1.3657503	2.82E-24
Stmn1	3.83E-28	1.8977465	5.26E-24
mt-Co1	3.93E-27	1.08895	5.40E-23
mt-Nd1	3.29E-24	1.2261123	4.52E-20
Dmrtb1	2.87E-20	1.2223099	3.94E-16
Gm10076	3.67E-17	0.724967	5.04E-13

Tabla 6: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las neuronas en E15.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Rpl26	1.27E-34	0.9618057	1.74E-30
Rps29	5.43E-31	0.7361825	7.47E-27
Rps28	5.48E-23	0.6884889	7.53E-19
Ubc	7.76E-23	-0.707384	1.07E-18
Rpl38	4.60E-18	0.6284327	6.33E-14
Fezf2	8.92E-18	0.5601847	1.23E-13
Rpl34	1.71E-17	0.5684098	2.35E-13
Rpl37a	1.04E-15	0.4656967	1.43E-11
Tmsb10	1.23E-15	0.4157864	1.69E-11
Dynlt1f	1.61E-14	0.344967	2.22E-10

Tabla 7: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las neuronas en E18.0.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Ftl1	5.63E-54	-0.5914922	7.73E-50
Hbb-y	2.18E-46	-0.7570033	3.00E-42
Crabp2	1.58E-44	-1.2049177	2.17E-40
H3f3a	2.97E-39	-0.5838046	4.08E-35
Hnrnpa2b1	4.18E-39	-0.6922908	5.74E-35
Hist3h2ba	4.41E-33	-0.7347243	6.06E-29
Tagln3	3.13E-32	-0.6739199	4.30E-28
Prdx2	6.11E-31	-0.4514768	8.39E-27
Cdkn1c	2.48E-30	-0.7607498	3.41E-26
Ptma	4.99E-30	-0.4630803	6.86E-26

4.3.2. Células de Glía Radial

Tabla 8: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las RG en E11.0.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Aldoc	5.34E-75	-1.6756463	7.54E-71
Rpl35a	4.03E-64	1.5511499	5.69E-60
Uba52	9.15E-63	-1.8369293	1.29E-58
Rpl6	1.27E-62	0.5727923	1.79E-58
Ndrg2	3.41E-60	-1.2802808	4.82E-56
Crabp2	5.97E-55	1.286039	8.42E-51
Nfix	1.92E-53	-1.0556059	2.71E-49
Pkm	2.79E-49	0.6930267	3.94E-45
Nfib	2.95E-45	-1.1103149	4.16E-41
Nasp	1.29E-43	0.741457	1.81E-39

Tabla 9: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las RG en E12.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Uba52	2.30E-106	2.3063113	3.24E-102
Malat1	3.53E-59	-1.4780181	4.99E-55
mt-Nd1	1.98E-58	1.070445	2.79E-54
AY036118	5.25E-51	0.758181	7.41E-47
Rpl6	1.21E-47	-0.6021753	1.71E-43
Gm10076	3.68E-46	1.0294608	5.20E-42
Rpl18a	1.22E-40	0.6790224	1.72E-36
Nme2	8.30E-40	0.418849	1.17E-35
Ywhae	1.24E-39	-0.5934014	1.74E-35
Rpl35a	2.43E-39	-1.4996916	3.43E-35

Tabla 10: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las RG en E15.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
2810459M11Rik	3.23E-27	0.5326537	4.55E-23
Scrg1	1.04E-25	0.6636324	1.46E-21
Mmd2	1.81E-21	0.8985158	2.56E-17
B3gat2	5.12E-20	0.5209695	7.23E-16
Rnf180	1.57E-18	0.961677	2.22E-14
Nfix	5.20E-18	1.2947115	7.34E-14
Gm29260	7.92E-18	1.6130749	1.12E-13
Ccdc80	1.28E-17	0.7230862	1.81E-13
Ndrg2	4.80E-17	1.082697	6.77E-13
Scml4	2.55E-16	0.5528922	3.60E-12

Tabla 11: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de las RG en E18.0.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Sparcl1	1.06E-95	3.2716606	1.49E-91
Tnc	1.13E-92	2.3664396	1.60E-88
Sema6d	4.94E-79	2.0808027	6.98E-75
Atp1a2	9.59E-74	1.5730714	1.35E-69
Gria1	2.88E-65	1.5259786	4.06E-61
Prelp	1.36E-60	0.8341009	1.92E-56
Hepacam	4.54E-60	0.8811677	6.42E-56
Mmd2	5.65E-60	1.3774961	7.98E-56
Slc1a3	3.59E-59	2.9622333	5.07E-55
Bcan	7.59E-57	0.9661789	1.07E-52

4.3.3. Progenitores Intermedios

Tabla 12: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de los IP en E11.0.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Crabp2	1.84E-75	1.3834942	2.36E-71
Ebf2	1.31E-57	1.3883103	1.68E-53
Uncx	1.61E-57	0.7822831	2.07E-53
Tcf4	1.05E-54	-1.637582	1.34E-50
Nfix	3.32E-53	-2.2660993	4.25E-49
Nhlh2	2.11E-48	1.1255738	2.70E-44
Hmga2	2.57E-48	0.6377088	3.30E-44
Rpl35a	5.37E-46	1.3277214	6.88E-42
Zbtb20	6.19E-46	-1.9750937	7.93E-42
Nrg1	1.62E-45	-2.2941483	2.08E-41

Tabla 13: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del `FindAllMarkers` de los IP en E12.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Hbb-y	8.48E-90	1.1718781	1.09E-85
Uba52	1.27E-86	1.1499882	1.63E-82
Rpl35	3.19E-86	-1.4582471	4.09E-82
Malat1	1.08E-79	-1.4019524	1.39E-75
AY036118	7.22E-66	0.7264178	9.26E-62
Rpl34	9.46E-65	-1.2248326	1.21E-60
Rpl10-ps3	2.17E-64	0.8964843	2.78E-60
Rps27	3.32E-62	-1.0730143	4.25E-58
Ftl1-ps1	3.03E-61	0.9006923	3.89E-57
Gm2000	4.29E-56	0.8997463	5.50E-52

Tabla 14: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del **FindAllMarkers** de los IP en E15.5.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Rps29	2.87E-107	1.1419818	3.68E-103
Rpl34	4.03E-88	1.0474424	5.16E-84
Rps28	4.37E-86	1.1101415	5.61E-82
Rps27	1.35E-83	0.9245002	1.73E-79
Rpl26	2.07E-73	1.1764557	2.65E-69
Rpl37a	8.24E-73	0.6717808	1.06E-68
Rpl37	3.04E-71	0.7207767	3.90E-67
Rpl35	8.85E-71	0.9233444	1.13E-66
Rpl36	2.15E-70	0.736152	2.76E-66
Hbb-y	3.85E-69	-1.2108719	4.94E-65

Tabla 15: Los 10 genes con p-valores más bajos resultantes del **FindAllMarkers** de los IP en E18.0.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Zbtb20	2.12E-66	1.452901	2.72E-62
Egr1	1.12E-46	0.9934757	1.44E-42
Ubb	8.48E-41	1.0235313	1.09E-36
mt-Nd1	1.89E-38	-0.8343492	2.43E-34
Apoe	5.52E-35	0.8872073	7.08E-31
Igfbpl1	2.11E-34	0.7864694	2.71E-30
Rpl27	1.39E-33	-0.5919272	1.78E-29
Hbb-y	2.10E-31	-1.0315701	2.69E-27
Hsp90ab1	6.96E-30	-0.5960254	8.92E-26
Slco1c1	1.45E-29	0.3988709	1.86E-25

4.4. Evaluación de la expresión diferencial de los genes *Cdh2* y *Afdn*

Tabla 16: Tipos celulares y edades en los que *Cdh2* está diferencialmente expresada resultantes del **FindAllMarkers**.

Tipo celular	p_val	avg_log2FC	p_val_adj	Edad
Radial glia	1.09E-03	0.2989088	1.00E+00	e12.5
Radial glia	6.74E-03	-0.296286	1.00E+00	e18.0

No se encontraron diferencias de expresión en el gen *Afdn* para ninguno de los tipos celulares ni entre diferentes edades.

4.4.1. Cadherinas diferencialmente expresadas entre los distintos tipos celulares

Tabla 17: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los distintos tipos celulares resultantes del **FindAllMarkers**.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj	Tipo celular
Pcdh9	3.68E-33	1.6222306	5.21E-29	Neuron
Pcdh9	6.49E-26	-1.5752929	9.18E-22	Radial glia
Pcdh15	1.29E-19	0.8582593	1.83E-15	Neuron
Pcdh15	6.53E-18	-0.874398	9.24E-14	Radial glia
Cdh13	2.03E-14	0.8183691	2.88E-10	Neuron
Pcdh7	7.64E-13	-0.7968341	1.08E-08	Radial glia
Pcdh7	4.45E-12	0.6737042	6.30E-08	Neuron
Cdh13	4.89E-11	-0.7560204	6.91E-07	Radial glia
Cdh12	1.58E-10	0.3240548	2.23E-06	Neuron
Cdh12	5.84E-09	-0.3184734	8.26E-05	Radial glia
Cdh6	8.54E-09	-0.2898551	1.21E-04	Neuron
Cdh6	3.09E-07	0.2747096	4.38E-03	Radial glia
Pcdh17	1.45E-06	0.3751451	2.05E-02	Neuron
Cdh18	2.21E-06	0.2999209	3.12E-02	Neuron

4.4.2. Cadherinas diferencialmente expresadas en el tiempo por tipo celular

Tabla 18: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en las neuronas a lo largo del desarrollo resultantes del **FindAllMarkers**.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj	Edad
Cdh13	4.58E-06	0.5812986	0.06289853	e15.5
Pcdh15	5.81E-06	0.4814173	0.07979486	e18.0

Tabla 19: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en las RG a lo largo del desarrollo resultantes del FindAllMarkers.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj	Tipo celular
Pcdh9	1.39E-16	1.0242077	1.96E-12	e18.0
Cdh18	6.04E-13	0.3784895	8.53E-09	e18.0
Cdh20	1.66E-09	0.5518046	2.35E-05	e18.0
Pcdh15	7.86E-09	0.2948129	1.11E-04	e18.0
Pcdh9	7.30E-08	-0.4593225	1.03E-03	e11.0
Pcdh19	8.44E-08	0.3762249	1.19E-03	e12.5

Tabla 20: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los IP a lo largo del desarrollo resultantes del FindAllMarkers.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj	Tipo celular
Cdh8	7.61E-31	0.9193682	9.76E-27	e15.5
Cdh8	1.43E-19	-1.0824195	1.83E-15	e11.0
Pcdh17	8.52E-19	0.5617793	1.09E-14	e11.0
Cdh10	2.20E-11	-0.6124156	2.82E-07	e11.0
Cdh4	6.33E-11	-0.495385	8.11E-07	e12.5
Pcdh7	3.02E-10	0.6094847	3.88E-06	e15.5
Pcdh15	1.68E-09	0.3158861	2.16E-05	e12.5
Cdh4	9.77E-09	0.4303967	1.25E-04	e18.0
Cdh8	3.16E-08	-0.672337	4.05E-04	e12.5
Cdh10	3.72E-08	-0.4982262	4.77E-04	e12.5
Cdh10	4.72E-08	0.4388576	6.05E-04	e15.5
Cdh10	1.15E-07	0.2739227	1.47E-03	e18.0
Pcdh17	3.46E-07	-0.2808989	4.44E-03	e18.0

4.4.3. Cadherinas diferencialmente expresadas entre las edades E12.5. y E15.5

Tabla 21: Cadherinas y protocadherinas diferencialmente expresadas en los distintos tipos celulares entre las edades 12.5 y 15.5 resultantes del **FindMarkers**.

Gen	p_val	avg_log2FC	p_val_adj
Cdh13	1.73E-06	-0.9048509	0.02445183
Pcdh9	1.85E-03	-0.4450947	1
Cdh8	8.80E-03	-0.2709922	1
Pcdh7	1.27E-02	-0.4400415	1

5. Discusión

5.1. Análisis descriptivo

El análisis descriptivo de las neuronas, células de glía radial y progenitores intermedios nos muestra, en los UMAP (**Figura 6**, **Figura 7** y **Figura 8**) una clusterización, en el caso de las neuronas con algunos bastante bien diferenciados. Esto puede deberse a que hemos seleccionado todas las neuronas sin hacer distinción, cuando existen varios tipos de neuronas con funciones muy diferenciadas, siendo los dos mayores grupos las gabaérgicas y glutamatérgicas. Además, los progenitores intermedios parecen generar únicamente neuronas glutamatérgicas (Molnár et al., 2014). Por otro lado, en el caso de las RG, hay que tener en cuenta que nos encontramos con un tipo celular generando una enorme diversidad celular durante el desarrollo, además de su propio mantenimiento mediante la división simétrica.

Este análisis descriptivo, por tanto, puede indicarnos que con más tiempo y un conocimiento más extenso sobre el desarrollo cortical para la cuidadosa selección de subtipos celulares más concretos, este estudio podría afinarse, así como los resultados obtenidos.

5.2. Genes marcadores de cada tipo celular

Los marcadores de neuronas que se obtuvieron (**Tabla 1**) muestran, la mayoría de ellos, niveles de expresión por debajo de los otros grupos de genes. Como por ejemplo, *Tead2* que es un factor de transcripción muy importante en el desarrollo cortical (Kaneko, Kohn, Liu, & Depamphilis, 2007). Lo cual, no es contradictorio, pues puede ser importante en otros tipos celulares, como las RG. Otros genes que se sabe que son importantes en el desarrollo pero encontramos infraexpresados en las neuronas son *Hmgb2* (Abraham et al., 2013) o *Hes5* (Bansod, Kageyama, & Ohtsuka, 2017), mientras que *Tubb3* se encuentra sobreexpresado (Singh & Tsai, 2010).

Cabe destacar, además, que al contrario que en las neuronas, *Hes5* se encuentra sobreexpresado en las RG (**Tabla 2**). Este gen está implicado en la ruta de señalización de Notch (Mizutani, Yoon, Dang, Tokunaga, & Gaiano, 2007) y se ha observado que en ratones que sobreexpresaban dicho gen, la transición de generar LLN a ULN se producía antes, así como el comienzo de la gliogénesis. De manera contraria, en ratones *knockout* para este gen ambos eventos estaban retrasados (Bansod et al., 2017). Por tanto, la expresión de *Hes5* podría servir como marcador del comienzo de la generación de ULN en las RG.

En los IP, por su parte, (**Tabla 3**) encontramos como el gen más significativo el *Eomes*, también conocido como *T-box brain protein 2 (Tbr2)*, y que resulta ser uno de los genes más característicos de los progenitores intermedios (Hevner, 2019).

5.3. Evolución de la expresión a lo largo del desarrollo por tipo celular

En el desarrollo temprano de las neuronas, a E11.0, podemos ver expresión de genes como *Lhx1* (**Tabla 4**) que está implicado en el desarrollo temprano y empieza a expresarse partir del día E6.5 (Costello et al., 2015).

Más adelante, en E15.5 (**Tabla 6**) resulta llamativo que la mayoría de los genes sobreexpresados sean proteínas ribosomales (*Rpl26*, *Rps29*, *Rps28*, *Rpl38*, *Rpl34* y *Rpl37*), lo que puede hacernos pensar que en esta edad se da una *explosión* proteica en las neuronas y en los IP (**Tabla 14**). Además, este evento parece producirse antes en las RG (**Tabla 9**) a E12.5, que es consecuente con que las RG se generan primero y dan lugar a ambos tipos celulares.

Por otra parte, en las RG destaca la elevada sobreexpresión de *Sparcl1* en E18.0 (**Tabla 11**). *Sparcl1*, junto a *Gfap*, es un marcador de astrocitos, que son el último tipo celular en generarse durante el desarrollo precisamente hacia E18. De manera parecida, a esta edad encontramos en los IP el marcador *Zbtb20* (**Tabla 15**), también conocido como marcador de la generación de astrocitos (Nagao, Ogata, Sawada, & Gotoh, 2016).

5.4. Evaluación de la expresión diferencial de los genes *Cdh2* y *Afdn*

Los resultados de la expresión de *Cdh2* en el tiempo representados en la **Tabla 16** podrían hacernos pensar que realmente existe diferencia de expresión de dicha proteína en las RG. De hecho, lo que se observa es una sobreexpresión a edades tempranas (E12.5) y una infraexpresión en edades tardías (E18.0). Esto concuerda con lo que se conoce del desarrollo cortical embrionario, en el que en edades tempranas las RG estarían generando todo el desarrollo cortical acompañadas de una sobreexpresión de *Cdh2*, como sabemos necesaria para el desarrollo. Mientras que en edades tardías, cuando las neuronas ya han sido generadas, ya no sería necesaria esta sobreexpresión por parte de las RG, pero sí seguirían necesitando las neuronas de una expresión de *Cdh2* para asegurar su correcta migración (Gil-Sanz et al., 2014;

Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2001, 2004; Yamamoto et al., 2015). Sin embargo, sólo observamos resultados significativos si nos fijamos en los p-valores no ajustados, por lo que, aunque estos resultados se ajustan a la hipótesis presentada en este trabajo y con el conocimiento establecido, no podemos asegurar que esas diferencias de expresión se den.

Por otro lado, no se encontraron diferencias de expresión significativas en lo que a la afadina respecta. Sin embargo, el estudio de Matsuda, Namura & Oinuma de 2019 revela que existen diferencias de expresión de la afadina entre las neuronas y los astrocitos. Es posible, por tanto, que si en este trabajo se hubiera seleccionado dicho tipo celular se hubiesen encontrado estas diferencias, ya que el no encontrarlas únicamente indica que no existen diferencias entre los tres tipos celulares de estudio. La razón de no seleccionar los astrocitos es que el objeto de este trabajo son los progenitores neurales y las neuronas, aunque un estudio futuro más detallado podría incluirlos junto con otros tipos celulares.

5.4.1. Cadherinas diferencialmente expresadas entre los distintos tipos celulares

Aunque los niveles de expresión de la proteína *Cdh2* parece ser constante entre los tres tipos celulares, se buscaron qué otras cadherinas podrían estar diferencialmente expresadas entre ellos. Así pues, en la **Tabla 17**, puede observarse cómo las cadherinas 12 y 13 se encuentran sobreexpresadas en las neuronas, mientras que la 6 lo está en las RG. Además de las protocadherinas 7, 9 y 15 sobreexpresadas en neuronas. La cadherina 13, en concreto, se ha descrito como una proteína con un importante papel en las neuronas, estando implicada en el crecimiento y direccionamiento axonal (Rivero et al., 2013).

5.4.2. Cadherinas diferencialmente expresadas en el tiempo por tipo celular

A lo largo del desarrollo de las neuronas se observó una sobreexpresión de la cadherina 13 (**Tabla 18**), en concordancia con lo comentado en el apartado anterior. Además, el momento del desarrollo en el que encontramos una sobreexpresión de esta proteína es en E15.5, momento en el cual las LLN ya se han generado y se están produciendo las ULN. Como se ya comentado, siguiendo el característico *inside-out pattern*, las ULN necesitan atravesar las LLN para alcanzar las capas altas (Berry &

Rogers, 1965). Este proceso podría explicar esta sobreexpresión del gen *Cdh13*, pues las cadherinas son necesarias para la correcta migración de las neuronas (Franco et al., 2011; Jossin & Cooper, 2011; Martinez-Garay et al., 2016)

Respecto a las RG, podemos observar (**Tabla 19**) una infraexpresión de la protocadherina 9 en edades tempranas (E11.0) que evoluciona a una sobreexpresión en edades tardías (E18.0). Así como una sobreexpresión, también en E18.0 de la protocadherina 15 y las cadherinas 18 y 20.

Finalmente, en los IP (**Tabla 20**), podemos ver también una evolución temporal de la expresión de los genes *Cdh8* y *Cdh10*. Ambos empiezan ingraexpresados en E11.0, aumenta su expresión (aunque todavía estando por debajo) en E12.5 y en E15.5 experimentan una sobreexpresión, coincidiendo con el momento de la generación de las ULN. En el gen *Cdh10*, además, podemos ver cómo en E18.0, aun estando sobreexpresado, ha disminuido su expresión con respecto a E15.5, pudiendo deberse a que ya se han generado las neuronas.

En cuando a las RG y los IP, sabemos que las protocadherinas 9 y 15, así como las cadherinas 8, 10, 18 y 20, son importantes en el desarrollo y en el cerebro (Moore et al., 2004; Wang et al., 2012; Yamagata et al., 2021), pero no hay estudios detallados sobre dichos genes en estos tipos celulares concretos, pues los estudios o bien se centran en las neuronas o en el cerebro en conjunto.

5.4.3. Cadherinas diferencialmente expresadas entre las edades E12.5. y E15.5

La última comparación se realizó con el conjunto de los tres tipos celulares comparando la edad E12.5 con E15.5, pues las LLN se generan en la primera y las ULN en la segunda. Los resultados obtenidos (**Tabla 21**) sugieren que en E15.5 están sobreexpresadas las cadherinas 13 y 8 y las protocadherinas 7 y 9, aunque sólo el gen *Cdh13* muestra un p-valor ajustado significativo. Esto significa que, aunque no hemos encontrado una sobreexpresión de *Cdh2* en E15.5 respecto de E12.5 tal y como habíamos hipotetizado, sí la hemos encontrado en *Cdh13*.

Estos resultados, por tanto, podrían indicar que la cadherina 13 es importante para la generación y migración de las ULN. Además, esta cadherina ha mostrado desempeñar un importante papel en la migración celular, la búsqueda de rutas de los axones y la sinaptogénesis. Asimismo, el trabajo de Forero et al., de 2017 muestra que la CDH13 juega un papel importante en el desarrollo del sistema serotoninérgico

en etapas embrionarias tempranas, así como que su deficiencia afecta a la densidad celular del rafe dorsal en desarrollo y la inervación posterior de la corteza prefrontal. Además, un trabajo posterior del mismo grupo (Forero et al., 2020) reveló que la ausencia de *Cdh13* provoca una adquisición retardada de varias tareas de aprendizaje, así como (sutilmente) un fenotipo de tipo impulsivo, una disminución de la sociabilidad y déficits en la memoria visoespacial.

6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo han servido para aportar luz sobre los genes que se encuentran diferencialmente expresados entre las neuronas, las RG y los IP. Así como, en cada uno de ellos, qué genes se expresan significativamente diferente en cada una de las etapas del desarrollo. Un análisis más detallado podría realizarse añadiendo tipos celulares como los astrocitos y estudiando etapas tempranas del desarrollo postnatal en las que aún no ha terminado de formarse el cerebro.

Por otra parte, no hemos encontrado diferencias significativas en los genes *Cdh2* y *Afdn*, lo cual no indica que no sean genes de vital importancia en el desarrollo, simplemente que su expresión parece mantenerse constante en el tiempo en estos tres tipos celulares, pudiendo existir diferencias si fueran comparados estos tipos celulares con otros como los astrocitos.

Por último, el gen que sí ha mostrado variar su expresión en el tiempo, coincidiendo su sobreexpresión en el momento de la generación de las ULN, ha sido el *Cdh13*, pudiendo significar, por tanto, que posee un papel importante en el desarrollo y migración de dicho tipo celular como ya han propuesto otros investigadores.

7. Glosario

<i>Concepto/Abreviatura</i>	<i>Definición</i>
<i>Cadherina</i>	Principal molécula de adhesión celular manteniendo las uniones célula-célula
<i>cKO (conditional knockout)</i>	Eliminación de un gen (<i>knockout</i>) en un tejido específico o en un determinado momento (condicional)
<i>E</i>	Día del desarrollo embrionario
<i>Integrina</i>	Proteína de adhesión célula-matriz extracelular
<i>IP (Progenitor intermedio)</i>	Célula generada por una RG que da lugar a neuronas
<i>LLN (Lower Layer Neurons)</i>	Neuronas ubicadas en las capas bajas (V-VI) de la corteza cerebral
<i>RG (célula de glía radial)</i>	A partir de las cuales se generan todas las neuronas de proyección y células de glía cortical
<i>scRNA-seq</i>	Estudio de la expresión de RNA en células individuales en una población
<i>ULN (Upper Layer Neurons)</i>	Neuronas ubicadas en las capas altas (II-IV) de la corteza cerebral

8. Bibliografía

- Abraham, A. B., Bronstein, R., Chen, E. I., Koller, A., Ronfani, L., Maletic-Savatic, M., & Tsirka, S. E. (2013). Members of the high mobility group B protein family are dynamically expressed in embryonic neural stem cells. *Proteome Science*, *11*(18), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-18>
- Bansod, S., Kageyama, R., & Ohtsuka, T. (2017). Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. *Development*, *144*, 3156–3167. <https://doi.org/10.1242/dev.147256>
- Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B. L., & Müller, U. (2007). $\beta 1$ Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. *The Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2704–2717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2991-06.2007>
- Berry, M., & Rogers, A. W. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, *99*(4), 691–709. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1270716/pdf/janat00421-0015.pdf>
- Caviness, V. S., & Rakic, P. (1978). Mechanisms of Cortical Development: A View From Mutations in Mice. *Annual Review of Neuroscience*, *1*(1), 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.01.030178.001501>
- Costello, I., Nowotschin, S., Sun, X., Mould, A. W., Hadjantonakis, A.-K., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2015). Lhx1 functions together with Otx2, Foxa2, and Ldb1 to govern anterior mesendoderm, node, and midline development. *Genes & Development*, *29*(20), 2108–2122. <https://doi.org/10.1101/gad.268979>
- Cuevas-Diaz Duran, R., Wei, H., & Qian Wu, J. (2017). Single-cell RNA-sequencing of the brain. *Clinical and Translational Medicine*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0150-9>
- Evans, A. E., Kelly, C. M., Precious, S. V., & Rosser, A. E. (2012). Molecular Regulation of Striatal Development: A Review. *Anatomy Research International*, *2012*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/106529>
- Fang, W.-Q., Chen, W.-W., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2014). Overproduction of Upper-Layer Neurons in the Neocortex Leads to Autism-like Features in Mice. *Cell Reports*, *9*, 1635–1643. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.003>
- Forero, A., Ku, H. P., Malpartida, A. B., Wäldchen, S., Alhama-Riba, J., Kulka, C., ... Lesch, K. P. (2020). Serotonin (5-HT) neuron-specific inactivation of Cadherin-13 impacts 5-HT system formation and cognitive function. *Neuropharmacology*, *168*, 108018. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108018>
- Forero, A., Rivero, O., Wäldchen, S., Ku, H.-P., Kiser, D. P., Gärtner, Y., ... Lesch, K. P. (2017). Cadherin-13 Deficiency Increases Dorsal Raphe 5-HT Neuron Density and Prefrontal Cortex Innervation in the Mouse Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 307. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307>
- Franco, S. J., Martínez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., & Müller, U. (2011). Reelin Regulates Cadherin Function via Dab1/Rap1 to Control Neuronal Migration and Lamination in the Neocortex. *Neuron*, *69*(3), 482–497. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.003>

- Franco, S. J., & Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron*, *77*(1), 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.022>
- García, M. T., & Harwell, C. (2017). Radial Glia in the Ventral Telencephalon. *FEBS Letters*, *591*(24), 3942–3959. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12829>
- Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martínez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S., & Müller, U. (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*, *79*(3), 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.040>
- Gil-Sanz, C., Landeira, B., Ramos, C., Costa, M. R., & Muller, U. (2014). Proliferative Defects and Formation of a Double Cortex in Mice Lacking *Mltt4* and *Cdh2* in the Dorsal Telencephalon. *Journal of Neuroscience*, *34*(32), 10475–10487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1793-14.2014>
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., ... Müller, U. (2001). β 1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron*, *31*, 367–379. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301003749>
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W. B., & Simons, K. (2004). *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis*. *PNAS* (Vol. 101). Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0308600100
- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and *Tbr2* in cortical development. *Journal of Anatomy*, *235*(3), 616–625. <https://doi.org/10.1111/joa.12939>
- Jalal, H., Pechlivanoglou, P., Krijkamp, E., Alarid-Escudero, F., Enns, E., & Myriam Humink, M. G. (2017). An Overview of R in Health Decision Sciences. *Medical Decision Making*, *37*(7), 735–746. <https://doi.org/10.1177/0272989X16686559>
- Jossin, Y., & Cooper, J. A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 697–703. <https://doi.org/10.1038/nn.2816>
- Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., & Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*, *304*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.014>
- Kaneko, K. J., Kohn, M. J., Liu, C., & Depamphilis, M. L. (2007). Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis*, *45*(9), 577–587. <https://doi.org/10.1002/dvg.20330>
- Kiselev, V., Andrews, T., McCarthy, D., Büttner, M., & Hemberg, M. (2019). Analysis of single cell RNA-seq data. Retrieved March 18, 2021, from <https://hemberg-lab.github.io/scRNA.seq.course/>
- Kolb, B. (2014). How Is the Brain Organized? In *Fundamentals of Human Neuropsychology* (pp. 36–75).
- La Manno, G., Siletti, K., Furlan, A., Gyllborg, D., Vinsland, E., Langseth, C. M., ... Linnarsson, S. (2020). Molecular architecture of the developing mouse brain. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.184051>

- László, Z. I., Bercsényi, K., Mayer, M., Lefkovich, K., Szabó, G., Katona, I., & Lele, Z. (2020). N-cadherin (Cdh2) maintains migration and postmitotic survival of cortical interneuron precursors in a cell-type-specific manner. *Cerebral Cortex*, *30*, 1318–1329. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz168>
- Linnarsson, S. (2017). Loompy documentation — loompy 3.0.6 documentation. Retrieved April 12, 2021, from <http://linnarssonlab.org/loompy/index.html>
- Malatesta, P., Hartfuss, E., & Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, *127*, 5253–5263. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/127/24/5253.full.pdf>
- Marín, O., & Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell Migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, *26*(1), 441–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058>
- Martínez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Espinosa, A., Molna, Z., & Mueller, U. (2016). Cadherin 2/4 signaling via PTP1B and catenins is crucial for nucleokinesis during radial neuronal migration in the neocortex. *Development*, *143*, 2121–2134. <https://doi.org/10.1242/dev.132456>
- Matsuda, T., Namura, A., & Oinuma, I. (2019). Dynamic spatiotemporal patterns of alternative splicing of an F-actin scaffold protein, afadin, during murine development. *Gene*, *689*, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.020>
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., & Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surfacedividing cortical progenitor cells. *Development*, *131*(13), 3133–3145. <https://doi.org/10.1242/dev.01173>
- Mizutani, K.-I., Yoon, K., Dang, L., Tokunaga, A., & Gaiano, N. (2007). Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature*, *449*(7160), 351–354. <https://doi.org/10.1038/nature06090>
- Molnár, Z., Kaas, J. H., De Carlos, J. A., Hevner, R. F., Lein, E., & Némec, P. (2014). Evolution and development of the mammalian cerebral cortex. *Brain, Behavior and Evolution*, *83*(2), 126–139. <https://doi.org/10.1159/000357753>
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(6), 427–437. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>
- Moore, R., Champeval, D., Denat, L., Tan, S.-S., Faure, F., Julien-Grille, S., & Larue, L. (2004). Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. *Oncogene*, *23*(40), 6726–6735. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207675>
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., & Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, *4*(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/83967>
- Nagao, M., Ogata, T., Sawada, Y., & Gotoh, Y. (2016). Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. *Nature Communications*, *7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11102>
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., & Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, *409*(6821), 714–720.

Retrieved from <https://www.nature.com/articles/35055553.pdf>

- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, 7(2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nm1172>
- Potter, S. S., & Org, S. P. (2018). Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 14(8), 479–492. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0021-7>
- Radakovits, R., Barros, C. S., Belvindrah, R., Patton, B., & Müller, U. (2009). Regulation of Radial Glial Survival by Signals from the Meninges. *Journal of Neuroscience*, 29(24), 7694–7705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5537-08.2009>
- Rivero, O., Sich, S., Popp, S., Schmitt, A., Franke, B., & Lesch, K. P. (2013). Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks. *European Neuropsychopharmacology*, 23(6), 492–507. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.06.009>
- Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F., & Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology*, 33(5), 495–502. <https://doi.org/10.1038/nbt.3192>
- Singh, K. K., & Tsai, L.-H. (2010). MicroTUB(B3)ules and Brain Development. *Cell*, 140(1), 30–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.038>
- Wang, C., Yu, G., Liu, J., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, X., ... Huang, Z. (2012). Downregulation of PCDH9 predicts prognosis for patients with glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(4), 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.04.047>
- Yamagata, M., Paulson, A., Brusés, J. L., Polanco, J., Reyes-Vigil, F., Weisberg, S. D., & Dhimitruka, I. (2021). Differential Spatiotemporal Expression of Type I and Type II Cadherins Associated With the Segmentation of the Central Nervous System and Formation of Brain Nuclei in the Developing Mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.633719>
- Yamamoto, H., Mandai, K., Konno, D., Maruo, T., Matsuzaki, F., & Takai, Y. (2015). Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. *Brain Research*, 1620, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.012>