



The cephalic neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating Foxg1 activity through Bmp and Wnt modulators

Diego Pinheiro Aguiar

► To cite this version:

Diego Pinheiro Aguiar. The cephalic neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating Foxg1 activity through Bmp and Wnt modulators. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI; Universidade federal do Rio de Janeiro, 2012. English. NNT: 2012PA11T012 . tel-01059790

HAL Id: tel-01059790

<https://theses.hal.science/tel-01059790>

Submitted on 2 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Ciências
Morfológicas



Université Paris-Sud
Ecole Doctorale en Signalisation et
Réseaux Integratifs en Biologie

Tese de doutorado apresentada por:

Diego Pinheiro Aguiar

**Tese em co-tutela entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Université
Paris-Sud**

Controle do desenvolvimento do prosencéfalo e mesencéfalo pela crista neural cefálica: regulação de Foxg1 pelas vias de sinalização Bmp e Wnt

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós Graduação em Ciências
Morfológicas/UFRJ para obtenção do grau de doutor em ciências morfológicas.

Defesa de tese de doutorado, dia 23 de abril de 2012 frente a uma banca composta por:

Presidente da banca e avaliador: Professor Philippe Vernier

Revisor: Professor Salvador Martinez

Revisor: Professora Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Orientadores: Professora Nicole Le Douarin, Professor Vivaldo Moura Neto
e Dr Sophie Creuzet



Université Fédérale de Rio de Janeiro
Institut des Sciences Biomédicales
Programme d'Études Supérieures en
Sciences Morphologiques



Université de Paris-Sud
Ecole Doctorale en Signalisation et
Réseaux Intégratifs en Biologie

Thèse de doctorat présentée par:

Diego Pinheiro Aguiar

En co-tutelle internationale entre l'Université Fédérale de Rio de Janeiro et l'Université de Paris-Sud

**Contrôle du développement du prosencéphale et du
mésencéphale par la crête neurale cephalique: regulation
de l'expression de Foxg1 par les voies de signalisation
Wnt et Bmp**

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Paris-Sud
Spécialité: Biologie Cellulaire:
Mention: Signalisation et Regulations, Neurosciences

Soutenue le 23 avril 2012 devant le jury composé de:

Président et examinateur, Philippe Vernier
Rapporteur, Salvador Martinez
Rapporteur, Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua
Directeurs de la thèse, Nicole Le Douarin, Vivaldo Moura Neto et Sophie Creuzet

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Professor Vivaldo Moura Neto, Professora Nicole Le Douarin e a Dr Sophie Creuzet, que nesses 4 anos juntos na vida científica me ensinaram muito sobre ciência e me prepararam para os desafios da carreira científica. Guardarei com grande honra todos estes ensinamentos. Obrigado Professor Vivaldo por essa oportunidade! Gostaria de agradecer também aos companheiros de laboratório que de uma maneira ou outra foram importantes para minha formação. Obrigado, Dr José Garcia Ribeiro Abreu Jr, Dr Philippe Vernier, Dra Sylvie Büschlen e Dr Ricardo Garcez, pelos debates que enriqueceram a minha formação profissional e pessoal. Agradeço aos técnicos, Philippe Lucas (Msc) e Charline Torrecillios pela convivência sempre alegre no laboratório. Gostaria de agradecer a todos os membros do “Laboratoire de Neurobiologie et Développement (N&D) – INAF – CNRS (Gif-sur-Yvette)” pelos 4 anos de conselhos técnicos e experimentais.

Aproveito essa oportunidade para mostrar todo o meu profundo agradecimento e admiração pela minha amada esposa Juliana de Mattos Coelho-Aguiar. Obrigado Juju por sua paciência, apoio, carinho, dedicação, amizade e amor. Obrigado por me acompanhar nessa louca empreitada que foi ir à França sem falar o idioma para fazer o doutorado. MUITÍSSIMO obrigado e prepare-se por que tem mais!!!

Agradeço a agência de fomento de pesquisa brasileira CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CDFB (Colégio Doutoral Franco-Brasileiro) que viabilizaram financeiramente o doutorado em co-tutela entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Université de Paris-Sud. Gostaria de agradecer a “Fondation des Treilles” pelo financiamento de 12 meses concedido a mim no período de 2010-2011. Gostaria de agradecer também ao “Institut Necker de Paris” por ter financiado os meus estudos no período de 2011-2012. Gostaria de agradecer mais uma vez a “Subvention de la Region de Ile de France” pelo prêmio concedido a mim, que possibilitou o financiamento das passagens aeres Rio-Paris, Paris-Rio. Em particular agradeço ao M. Laurent Surdi secretário da pós-graduação em “Sinalisation et Reseaux Integratifs en Biologie” da Université Paris-Sud e ao bibliotecário M. Alain Perignon do INAF.

Gostaria de agradecer aos grandes amigos que tive a oportunidade de encontrar neste período de estágio de doutorado. Obrigado aos amigos, Dr Sabiniano de Araujo Rodrigues, Dr Marcel Cunha, Dra Gisele Amorin, Dra Letícia Lery e ao Dr Paulo Ricardo Batista. Vocês foram muito importantes neste período! Espero guardar esta amizade para sempre.

Por último o meu agradecimento especial à minha família querida que sempre incondicionalmente me apoiou, confiou em mim e sofreu junto em todos os momentos difíceis. MUITÍSSIMO obrigado meus pais, Lourenço Nunes de Aguiar e Vera Lúcia Pinheiro Aguiar, avós Maria Luiza Alves Pinheiro e José Nunes de Aguiar. Obrigado meus queridíssimos irmãos, Tiago Aguiar e Ramon Aguiar. Vocês são mais do que um exemplo de dignidade e perseverança, vocês são tudo o que tenho de mais valioso. MUITÍSSIMO obrigado sem vocês tudo isso não seria possível.

*Dedico esta tese de doutorado aos meus pais,
Lourenço e Vera Lúcia e aos
meus irmãos, Tiago e Ramon.*

Em memória de José Aguiar e Maria Luiza Pinheiro

Tous les jours à tous points de vue je vais de mieux en mieux...

Émile Coué

SUMÁRIO	Paginas
----------------	----------------

Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	viii
Lista de abreviações.....	ix-x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Résumé.....	xiii

1- INTRODUÇÃO	Paginas
----------------------	----------------

1.1 – Um breve histórico sobre a crista neural.....	1
1.2 – Marcadores moleculares na formação da crista neural.....	7
1.3 – A crista neural e o desenvolvimento cefálico.....	12
1.4 – Via de sinalização <i>Bmp</i> : O Papel de <i>Smad1</i> no desenvolvimento embrionário.....	15
1.5 – Via de sinalização <i>Bmp</i> e o desenvolvimento do cérebro.....	20
1.6 – Modulação das vias de sinalização <i>Fgf</i> e <i>Bmp</i> através do domínio <i>Cub</i>	22
1.7 – Antagonistas de <i>Wnt</i> controlam o desenvolvimento cefálico.....	24
1.8 – Marcadores do desenvolvimento do tubo neural anterior.....	25
1.9 – A Influência da crista neural cefálica sobre o desenvolvimento do tubo neural.....	32

2 – OBJETIVOS	Pagina
----------------------	---------------

2.1 - Objetivo Geral.....	36
2.2 - Objetivos Específicos.....	36

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Paginas

3.1 – Embriões de Galinha.....	37
3.2 – Síntese do RNA de interferência dupla fita (dsRNA).....	37
3.3 – Micro-manipulação.....	39-41
3.3.1 – Eletroporação <i>in Vivo</i>	39
3.3.2 – Ablação da borda neural anterior <i>in ovo</i>	40
3.3.3 – Adição de esferas de heparina acrílica embebidas em <i>Fgf8</i> recombinante <i>in ovo</i>	40
3.3.4 – Injeção <i>in ovo</i> da proteína <i>Cerberus</i> recombinante na zona de migração das células da crista neural cranial.....	41
3.4 – Imunocitoquímica e hibridização <i>in situ</i>	43
3.5 - RT-PCR e construção das sondas <i>Dkk1</i> , <i>Dkk2</i> e <i>Dkk3</i>	44
3.6 – Histologia.....	45
3.7 – Análise estatística.....	46

4 – RESULTADOS/RESULTS

Pagina

4.1 – Controle do desenvolvimento do prosencéfalo e mesencéfalo pela crista neural cefálica: regulação de <i>Foxg1</i> pelas vias de sinalização <i>Bmp</i> e <i>Wnt</i>	47-99
4.2 – Cubilin controla a sinalização <i>Fgf</i> induzindo a sobrevivência celular durante o desenvolvimento da cabeça dos vertebrados.....	100-148

5 – DISCUSSÃO

Pagina

5.1 - A expressão de <i>Smad1</i> nas células da CNC controla a morfogênese do cérebro.....	149
5.2 – Expressão de <i>Smad1</i> nas células da CNC controlam a expressão de marcadores do cérebro durante o desenvolvimento.....	150

5.3 – <i>Smad1</i> modula a sinalização <i>Fgf8</i> e o controle do desenvolvimento do telencéfalo.....	151
---	-----

5.4 – <i>Smad1</i> controla a intensidade da sinalização Wnt nas vesículas cefálicas através da CNC.....	156
--	-----

6 – CONCLUSÕES	159
-----------------------	------------

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE	160-176
---	----------------

Figura 1 – Desenvolvimento das células da crista neural cranial.....	5
Figura 2 – Representação esquemática da migração das células da crista neural cefálica e da crista neural cranial (CNC) no estágio de 5 e 27 somitos.....	6
Figura 3 – Perfil de migração das células da crista neural cranial.....	9-10
Figura 4 – Aparecimento da crista neural durante a evolução dos vertebrados.....	13-14
Figura 5 – Via canônica de <i>Bmp</i> simplificada.....	19
Figura 6 – Cartografia da placa neural do embrião de galinha no estágio de 3 somitos.....	27
Figura 7 – Desenvolvimento das vesículas cefálicas.....	28
Figura 8 – Representação esquemática da expressão de marcadores moleculares das vesículas cefálicas durante o desenvolvimento embrionário no estágio de 26 somitos.....	31
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% das diferentes etapas de preparação do RNA dupla fita para o bloqueio da expressão de <i>Smad1</i>	38
Figura 10 – Representação esquemática das micro-manipulações <i>in ovo</i>	42

ÍNDICE DE TABELAS

Pagina

Tabela 1 - “Primers” utilizados para amplificação com RT-PCR.....	45
Tabela 2 - Condição experimental por padrão de expressão de <i>Fgf8</i>, <i>Foxg1</i>, <i>Otx2</i> e <i>Foxa2</i>.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS

Actr – Receptor de Activina
ANR – “Anterior neural ridge”
Ap2 – Proteína ácida ligadora de gordura
Ar – Ácido retinóico
Bmp – Proteína morfogenética do osso
Bmpr – Receptor da proteína morfogenética do osso
BNA – Borda neural anterior
CN – Crista neural
CNC – Crista neural cranial
CNCar – Crista neural cardíaca
CNF – Crista neural facial
CNS – Crista neural sacral ou vagal
CNT – Crista neural truncal
CNV – Crista neural vagal
C-terminal – Carbox terminal
Dan – “Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma”
Di – Diencefalo
Dkk – Dickkopf
dsFoxg1 – “Foxg1 double-stranded RNA”
dsGremlin – “Gremlin double-stranded RNA”
dsNoggin – “Noggin double-stranded RNA”
dsRNA – RNA dupla fita
dsSfrp1 – “Sfrp1 double-stranded RNA”
dsSfrp2 – “Sfrp2 double-stranded RNA”
dsSmad1 – “Smad1 double-stranded RNA”
Dvl1 – Dishevelled 1
Egf – Fator de crescimento epidermal
EGFP – “Enhanced green fluorescent protein”
En1 – “Homeobox protein engrailed 1”
Ets-1 – Proteína C-ets-1
Fgf – Fator de crescimento fibroblástico
Foxa2 – “Forkhead box a2”
Foxd3 – “Forkhead box d3”
Foxg1 – “Forkhead box g1”
Frzb – Frizzled
Glu - Glutamato
Gsk3 – “Glycogen synthase kinase”
HH – “Hamburger and Hamilton”
Hh – Hedgehog
Hnk-1 – “Human natural killer-1”
hSamd1-GM - “Human Smad1” com mutação nula nos 4 aminoácidos fosforilados por Gsk3
hSmad1 – “human Smad1”
hSmad1 - “Human Smad1”

hSmad1-MM - “Human Smad1” com mutação nula nos 3 aminoácidos fosforilados pela via de MAPK
hSmad1-P – “Human Smad1 phosphorylated”
I-Smad – Smad inibitória
Mapk – Proteína quinase ativadora de mitose
Md – Mandíbula
Mes – Mesencéfalo
Mx – Maxila
N-terminal – Amino-terminal
Otx2 – “Orthodenticle homeobox 2”
Pax3 – “Paired box 3”
PCR – Reação em cadeia da polimerase
cDNA – DNA complementar
pH3 – Histona 3 fosforilada
r – Rombomero
RCAS – Construção retroviral
RT – Transcriptase reversa
Ser – Serina
Sfrp – “Secreted frizzled related protein”
Shh – Sonic Hedgehog
Slug – Fator de transcrição dedo de zinco
Smad – “mother against decapentaplegic homolog”
Snail – Fator de transcrição dedo de zinco tipo C2H2
SNP – Sistema nervoso periférico
ss – “Somite stage”
Tel – Telencéfalo
Tgfβ – Fator de crescimento transformante beta
TN – Tubo neural
Twist – Fator de transcrição helix-loop-helix
UV – Ultravioleta
Wnt – Wingless
Zic – Proteína dedo de zinco

Resumo

A crista neural cranial (CNC) é uma estrutura transiente em embriões de vertebrado, que possui um papel crucial no desenvolvimento da cabeça. A CNC é uma importante fonte de derivados mesenquimais. Recentes descobertas mostraram que as células da CNC possuem uma atividade trófica no desenvolvimento do tubo neural anterior, estimulando e organizando o desenvolvimento prosencefálico em oposição à sinalização Bmp presente nos tecidos adjacentes. Com o objetivo de entender como as células da CNC controlam a atividade de morfógenos durante o desenvolvimento do cérebro. Nós focamos nossos estudos no fator de transcrição *Smad1*, expresso pelas células da CNC, que controla a transcrição de *Noggin*. *Noggin* é um antagonista de Bmp que por sua vez controla a atividade de sua via de sinalização. Além disso, *Smad1* interage com outras vias de sinalização com *Fgf8* e *Wnt*. Para testar o papel de *Smad1* nas células da CNC, nós eletroporamos o RNA dupla fita de *Smad1* (*dsSmad1*) nas células da CNC em embriões de galinha no estágio de 4 somitos com a finalidade de bloquear sua tradução. Estes espécimes foram analisados em estágio mais avançados do desenvolvimento embrionário. A perda de função de *Smad1* compromete o desenvolvimento das vesículas cefálicas, nos estágios de 26 somitos, E4, E6 e E8. Em cortes histológicos em E8, observou-se o aumento do volume ventral do cérebro destes embriões. Com o objetivo de entender como *Smad1* controla o desenvolvimento das vesículas cefálicas, embriões no estágio de 26ss foram analisado por hibridização *in situ*. Nós observamos em embriões *dsSmad1* a diminuição da expressão de *Fgf8* na borda neural anterior e a completa ausência de expressão de *Foxg1* no neuroectoderma prosencefálico. A falta de *Smad1*, também gera a diminuição da expressão de *Otx2* nos limites ventrais e laterais do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Em contrapartida, nestes embriões observa-se o aumento da zona de expressão de *Foxa2* na porção ventral do diencéfalo e mesencéfalo. O bloqueio de *Smad1* também acarreta no aumento dos níveis de *Dkk1*, que é um importante inibidor da via de sinalização *Wnt*. Com o intuito de entender o mecanismo sobre o controle de *Smad1*, nós aumentamos os níveis de transcritos nas células da CNC de *Dkk1*. Como resultado deste aumento, observamos as mesmas modificações nos níveis dos transcritos de *Fgf8*, *Foxg1*, *Otx2* e *Foxa2*. Interessantemente os efeitos do excesso de *Dkk1* podem ser revertidos com a co-eletroporação do *Smad1* constitutivamente fosforilada. Nós também analisamos a expressão de *Foxg1* e *Otx2* em embriões privados de *Cubilin* nas células da CNC. Estes embriões apresentam o mesmo padrão de expressão encontrados nos embriões *dsSmad1*. Interessantemente os nocautes para *Cubilin* apresentam diminuição da fosforilação de *Smad1*. Nossos resultados mostram que a presença de *Smad1* nas células da CNC é extremamente importante para padronização e desenvolvimento do cérebro. *Smad1* nas células da CNC funciona como um regulador da via de *Bmp*, através do controle transcricional de *Noggin* impedindo que o excesso de *Bmp* chegue até o tubo neural. Sendo assim, *Smad1* controla o excesso de *Bmp* permitindo a indução e o desenvolvimento da região anterior por *Fgf8*.

Abstract

The cranial NC (CNC) is a transient structure of the vertebrate embryo, which is essential for brain ontogenesis and provides the developing brain with a skeletal and meningeal protection and functional vasculature. Early in development, CNC cells also control morphogenetic activities of brain organizers and stimulate the growth of prosencephalic alar plate. To understand how CNC conveys its trophic effect on the telencephalon, we have silenced the gene encoding for *Smad1*, a transcription factor expressed in the CNC cells, which transduces diverse morphogenetic pathways. *Smad1* silencing results in microcephaly and partial holoprosencephaly, which early coincide with the loss of *Fgf8* and *Foxg1* in the telencephalon. Rescue experiments show that CNC cells can positively regulate *Foxg1* expression independently of *Fgf8* activity in the prosencephalic organizer. Furthermore, the depletion of *Foxg1* activity in the telencephalon alters *Otx2* and *Foxa2* expression in the thalamus and tectum. We have identified the mediators produced by the CNC to control *Foxg1* activity and showed that Bmp and Wnt antagonists, *Noggin*, *Gremlin* and *Dkk1* initiate the specification of the telencephalon. Additionally, the molecular patterning of the telencephalic and di/mesencephalic compartments requires the activity of *Sfrp1* and *Sfrp2*, and *Cerberus*, respectively. Altogether, we show that CNC cells controls brain patterning by regulating *Foxg1* expression through a network of morphogen modulators controlled by *Smad1* activity.

Résumé

La crête neurale crâniale (CNC) est une structure transitoire et pluripotente de l'embryon des Vertébrés qui génère la totalité du squelette de la face et de la voûte crânienne et fournit les méninges et une vascularisation fonctionnelle au cerveau antérieur. Précocement, la CNC contrôle également la croissance du cerveau. Pour identifier les mécanismes par lesquels la CNC exerce son rôle trophique sur le cerveau, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène *Smad1*, qui transduit divers voies de signalisation, et est massivement exprimé par les cellules de la CNC juste avant leur migration. L'inactivation de *Smad1* par l'interférence ARN dans les CCN conduit à une microcéphalie sévère et une holoprosencéphalie partielle, qui résulte de la perte de l'expression de *Fgf8* et *Foxg1*. Les expériences de sauvetage montrent que les cellules de la CNC régulent positivement *Foxg1* indépendamment de *Fgf8*. De plus, nous montrons que la perte de fonction de *Foxg1* dans le télencéphale affecte le développement du thalamus et du toit optique en dérégulant l'expression de *Otx2* et de *Foxa2* à leur niveau. Nous avons identifié les molécules médiatrices produites par les cellules de la CNC nécessaire au contrôle de l'expression de *Foxg1*. Nous montrons que les antagonistes de Bmp and Wnt, *Noggin*, *Gremlin* et *Dkk1* sont indispensable pour initier la spécification du télencéphale. De plus, la régionalisation moléculaire des territoires télencéphalique et di/mésencéphalique, requiert l'activité conjointe de *Sfrp1* et *Sfrp2*, d'une part, et de *Cerberus*, d'autre part. L'ensemble des données acquises au cours de ces travaux documente les mécanismes moléculaires par lesquels la CNC participe de façon essentielle à la régionalisation moléculaire du cerveau des Vertébrés.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Um breve histórico sobre a crista neural

A crista neural (CN) há muito tempo tem fascinado os biólogos do desenvolvimento e evolucionistas. A CN é uma estrutura transitória e pluripotente encontrada em vertebrados. Foi descoberta por Wilhelm His em 1868 (His, 1868) utilizando embriões de galinha como modelo de estudo. Neste momento a CN foi descrita como uma “camada de um material laminar que aparece entre o tubo neural e a ectoderme superficial”. Na ocasião o Dr His descreveu a migração das células da CN, dizendo que elas deixavam o espaço entre a ectoderme superficial e o tubo neural e migravam pelas paredes do tubo neural na direção lateral do embrião (**Figura 1**), e que essas células se agregavam dando origem ao gânglio da raiz dorsal. O que chamamos hoje de “CN gangliônica”.

O termo “crista neural” como conhecemos hoje foi primeiramente usado em um trabalho que estudava o desenvolvimento do bulbo olfatório e do nervo cranial em embriões de galinha publicado em 1879 (Marshall, 1879). Usando embriões de “selachians” (elasmobrânquios) em 1888, experimentos mostraram que as células da CN poderiam dar origem algumas células mesenquimais da cabeça (cartilagem) (Katschenko, 1888), mais tarde esta noção estendeu-se a teleósteos e pássaros (Goronowitsch, 1892; 1893). Então, Julia Platt (Platt, 1893; 1897), propôs que as células derivadas da CN poderiam contribuir para a formação das cartilagens dos arcos viscerais e da dentina do dente. Ela foi a primeira a cunhar o termo “mesoectoderma” para distinguir as células da CN das outras células mesenquimais derivadas da

camada germinal mesodermal. Assim os termos “mesoectoderma” e/ou “ectomesênquima” tem sido usados até hoje para designar o mesênquima derivado das células da CN. 40 anos após as descobertas de Platt, estudos independentes feitos nas décadas de 20 e 30 do século passado, por Landacre (Landacre, 1921), Stone (Stone, 1922; 1929) e por Raven (Raven, 1931; 1936) demonstraram que a CN é a maior fonte de células mesenquimais, tecido conjuntivo e cartilagem durante o desenvolvimento da cabeça, sendo igualmente importante com contribuição na gangliogênese. Já na década de 40, os pesquisadores Horstadius e Sellman (Horstadius and Sellman, 1941; 1945) e De Beer (De Beer, 1947) utilizando embriões de *Ambystoma* (Salamandra), propuseram com mais experimentos que as células da CN originavam os dentes e a cartilagem da cabeça. Ainda na primeira metade do século XX diversos trabalhos investigaram o papel das células da CN durante o desenvolvimento embrionário. Usando embriões de anfíbio o destino migratório das células da CN foi mais bem descrito usando a marcação destas com timidina tritiada (TH³). Confirmando trabalhos anteriores (Hörstadius, 1950; Chibon, 1964), estes experimentos mostraram que as células da CN geram diversos tecidos faciais (Weston, 1963; Johnston, 1966).

A partir da segunda metade do século XX, o grupo liderado pela jovem pesquisadora Nicole Le Douarin dedicou-se extensivamente a entender o papel da CN na formação de diversas estruturas, tecidos e órgãos durante a embriogênese de vertebrados. Para isto Nicole Le Douarin desenvolveu uma técnica de transplante de tecidos embrionários de codorna (*C. coturnix*) em embriões de Galinha (*G.gallus*) nos mesmo estágio e assim criou uma técnica que possibilitava seguir o desenvolvimento do tecido transplantado nos embriões de galinha. Isto só foi possível porque as células

de codorna possuem a heterocromatina associada ao nucléolo, enquanto nas células de galinha a heterocromatina encontra-se dispersa no citoplasma durante a interfase (Le Douarin, 1969). Desta forma, Nicole Le Douarin demonstrou de maneira elegante a função das células da CN durante o desenvolvimento embrionário (Le Douarin, 1969; Le Douarin and Kalchem 1999). Os resultados obtidos possibilitaram demonstrar a propriedade migratória das células da CN, bem como a colonização e diferenciação destas em diversas partes do embrião dando origem a inúmeros tipos celulares, como: miofibroblastos, melanócitos, células endócrinas, neurônios, células gliais, cartilagem e osso (Le Douarin, 1982; Le Douarin e Kalcheim, 1999). A identificação de derivados da CN em vertebrados utilizando quimeras codorna-galinha foi fundamental para entender a ontogenia das células da CN em embriões de ave (Le Douarin, 1970). Experimentos feitos utilizando embriões de camundongo confirmam as conclusões obtidas com as quimeras (Chai et al., 2000; Jiang et al., 2000). Estes estudos possibilitaram mostrar que as células da CN cefálica contribuem para a formação de músculos (tendão e tecido conjuntivo), cartilagem, ossos faciais, glândula carótida, meninges prosencefálicas, bem como os pericítos e células de músculo liso de todos os vasos sanguíneos da face e do prosencéfalo (Le Lievre; 1978; Couly et al, 1993; Etchevers et al., 1999; 2001).

As células da CN ao longo do eixo ântero-posterior foram evidenciadas a partir da observação da expressão e do efeito dos genes Hox, demonstrando toda a plasticidade da CN (Couly et al., 1996; 1998; Creuzet et al., 2002; 2004). Assim conseguimos distinguir as células da CN cefálica, da CN cranial (CNC), que é observada entre a CN presente no limite anterior da borda do tubo neural diencefálico

até o limite posterior do rombômero 2 (r2) no estágio de 5-6 somitos, cuja expressão dos genes *Hox* é negativa. Estas observações são baseadas na competência esqueletogênica e capacidade de regeneração da estrutura craniofacial (Le Lievre et al., 1978; Couly et al 2002). No mesmo estágio de desenvolvimento, as células da crista neural facial (CNF) são encontradas entre a borda anterior do tubo neural diencefálico até o limite posterior do rombômero3 (r3). Neste caso as células da CN presentes no nível do r3 apresentam a expressão do gene *Hoxa2* (Creuzet et al., 2002) (**Figura 2**).

A plasticidade das células da CN é incrível, podendo originar desde neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico (SNP), bem como células de origem mesenquimal como músculo liso, tendão, tecido conjuntivo, cartilagem, ossos e células adiposas, dependendo do sítio de migração e da presença de fatores de transcrição e de crescimento (Le Douarin et al., 1975; Le Douarin et al, 1977; Le Lievre and Le Douarin et al, 1988; Betancur et al., 2010). O estudo da CN tem se baseado em diferentes tipos de marcadores moleculares. Hoje é aceito que ao longo do eixo rostrocaudal a CN pode ser dividida em diferentes domínios. A CN que contribui para o mesenquima da cabeça é dividida em Crista Neural Cefálica, e em Crista Neural Cranial (CNC). Cada tipo de CN citados participa de eventos específicos, como a diferenciação de células presentes em diferentes órgãos, bem como a manutenção da formação e desenvolvimento de tecidos e órgãos que não possuem células da CN (Le Douarin 1982; Le Douarin and Kalcheim, 1999; Le Douarin et al., 2004) (**Figura 2**). Por estas características, as células da CN são consideradas como um quarto folheto embrionário (Hall, 2009). Hoje, estas células ocupam uma posição central no estudo do

desenvolvimento e evolução de vertebrados como postularam Gans e Northcutt (Gans and Northcutt, 1983).

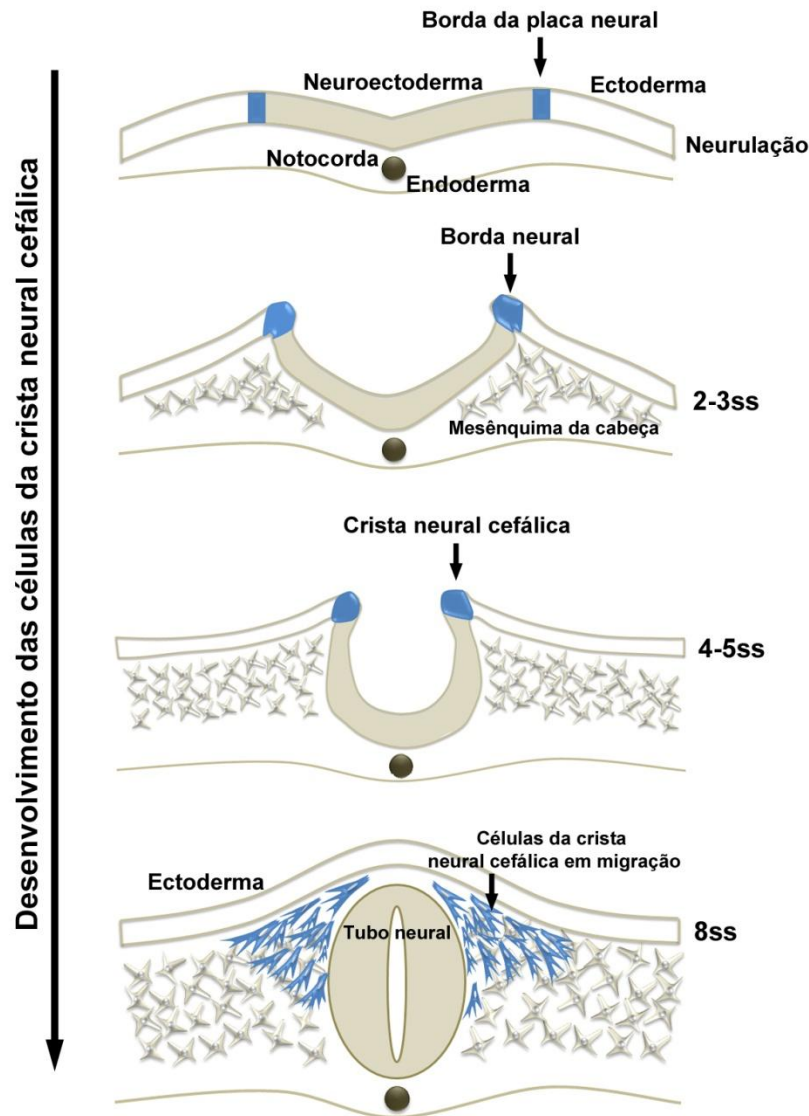


Figura 1 – Desenvolvimento das células da crista neural cranial. (A) Após a indução e formação das células da CN (azul), (B) o epiplasto se diferencia originando o neuroectoderma, a CN e o ectoderma. (C) No estágio de 4-5 somitos as células da CNC já induzidas preparam-se para a delaminação (azul). (D) Após a delaminação, as células da CN proliferam e migram ventralmente através do mesênquima da cabeça. (Adaptado de: Freeman and Bracegirdle, 3ª edição).

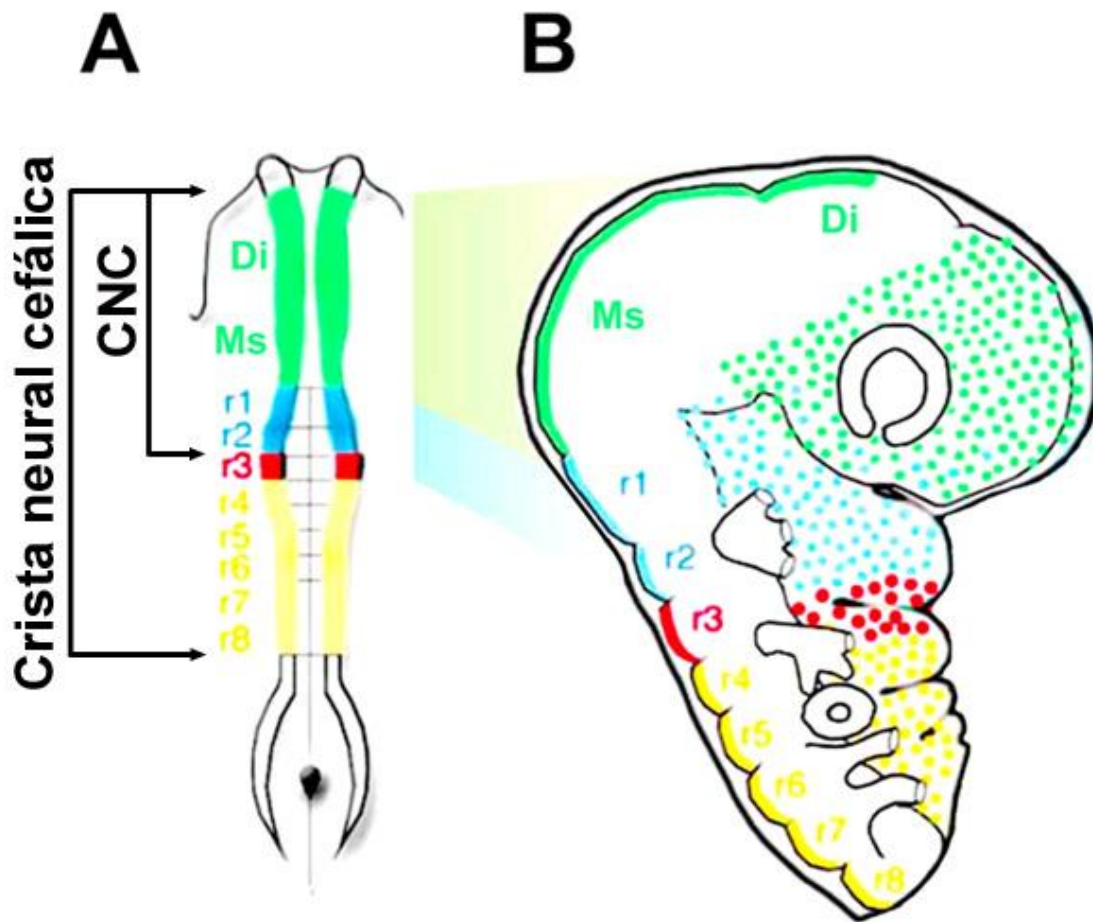


Figura 2 – Representação esquemática da migração das células da crista neural cefálica e da crista neural cranial (CNC) no estágio de 5 e 27 somitos. Embrião de galinha no estágio de 5 somitos. A CN é dividida em, CN diencefálica e mesencefálica (verde), CN rombomérica 1 e 2 (azul), CN rombomérica 3 (vermelho) e CN rombomérica 4, 5, 6, 7 e 8 (amarelo). (A) a CNC compreende os limites da CN diencefálica até a CN rombomérica 2, já a CN Cefálica compreende os limites da CN diencefálica até a CN rombomérica 8. (B) Note o sítio de migração das células da CNC (verde e azul) e da CN cefálica (verde, azul, vermelho e amarelo) em um embrião no estágio de 27 somitos. (Modificado a partir de: Le Douarin et al., 2007).

1.2 – Marcadores moleculares na formação da crista neural

Durante a neurulação o epiblasto se subdivide em ectoderme superficial e em placa neural que formará o sistema nervoso central. A região situada na borda entre estes tecidos torna-se a CN, bem definida e expressando uma combinação de marcadores específicos. Durante a indução o gradiente de *Bmp*, *Wnt* e *Fgf* é capaz de especificar a borda neural. Entre as moléculas conhecidas por esta especificação podemos citar *Zic*, *Pax3* e *Pax7*, *Msx1* e *Msx2*. Já no estágio embrionário onde as células da CN encontram-se bem definidas, uma sucessão de outras moléculas são descritas, entre elas encontramos os fatores de transcrição: *Slug* ou *Snail*, *AP-2*, *Foxd3*, *Pax3*, *Twist*, *Sox*, *Zic5*. Esta combinação molecular é conservada em diferentes espécies de vertebrados, mudando somente sua distribuição ao longo do eixo ântero-posterior (Aybar and Mayor, 2002; Aybar et al., 2003; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004; Betancur et al., 2010). Ao longo do eixo ântero-posterior os diferentes tipos de CN expressam o gene *Slug*, que é um dos primeiros fatores de transcrição a ser expresso nas células da borda neural. A presença de *Slug* confere a estas células o potencial de se tornarem tanto células do tubo neural dorsal, como células da CN (Collazo et al., 1993; Selleck and Bronner-Fraser, 1995). A atividade de *Slug* está diretamente ligada à indução das células da CN e a transição epitélio mesênquima (Nieto et al., 1994). A utilização de oligonucleotídeos anti-senso para bloquear a expressão de *Slug* nas células da CN, gerou problemas na especificação celular e na migração das células da CN. Já a superexpressão de *Slug*, aumenta a indução das células da borda do tubo neural em células da CN (Del Barrio and Nieto, 2002). A cascata hierárquica de expressão de outros fatores de transcrição como, *Zic5*, *Foxd3*,

Twist e *Ets1*, é correlacionada à presença de *Slug* nas células da CN (Aybar et al., 2003). Estes fatores de transcrição controlados por *Slug* são parte de um repertório genético responsável por coordenar a especificação das células da borda do tubo neural em células da CN. Diversos experimentos mostraram que a superexpressão de *Zic5* conduz a expansão de marcadores de CN e a sua perda de função reafirma o seu papel na indução da CN. Entretanto, a presença de *Zic5* nas células da CN não está correlacionada à indução de marcadores neurais anteriores como são observado em outros membros da família de genes *Zic* (Nakata et al., 2000).

Outra família de fatores de transcrição, chamada *Fox* (Forkhead box gene) apresenta um importante papel na especificação celular e na segregação de linhagens das células da CN (Kaufmann and Knochel, 1996). Um dos seus membros mais ilustres é o *Foxd3* que uma vez superexpresso nas células da borda do tubo neural, promove o aumento do número de células da CN que migram expressando *HNK-1* (Human Natural Killer-1) (**Figura 3**), isso sugere que *Foxd3* possui o papel de transformar as células neuroepiteliais em células da CN (Dottori et al., 2001). Um pouco mais tarde no desenvolvimento embrionário, após a migração das células da CN o fator de transcrição *Foxd3* apresenta um papel no balanço entre a diferenciação de células neuronais, gliais e melanócitos (Kos et al., 2001). A ausência de outro fator de transcrição expresso pelas células da CN chamado *Sox9* foi relacionada com malformação craniofacial. Em embriões de *Xenopus leavis* o RNAm de *Sox9* é encontrado já no óvulo, e após a gástrula acumula-se nas bordas laterais da placa neural, ou seja, na região de formação da CN (Spokony et al., 2002). Mais tarde transcritos de *Sox9* são encontrados nas células da CN que migram povoando a região

craniofacial e os arcos branquiais, dando origem aos ossos (Spokony et al., 2002; Cheung and Briscoe, 2003; Sahar et al., 2005). Além de *Sox9*, foi descrito em embriões de anfíbio a importância de outro fator de transcrição chamado *Ap2α*, presente nas células da CN, que é correlacionado com o desenvolvimento craniofacial e cerebral (Luo et al., 2003). Exatamente como *Sox9* e *Slug*, *Ap2α* está sob o controle das vias de sinalização *Bmp* (Proteína morfogenética do osso) e *Wnt* (Wingless) durante a indução das células da CN na borda neural nos estágios iniciais da nêurula (Luo et al., 2003).

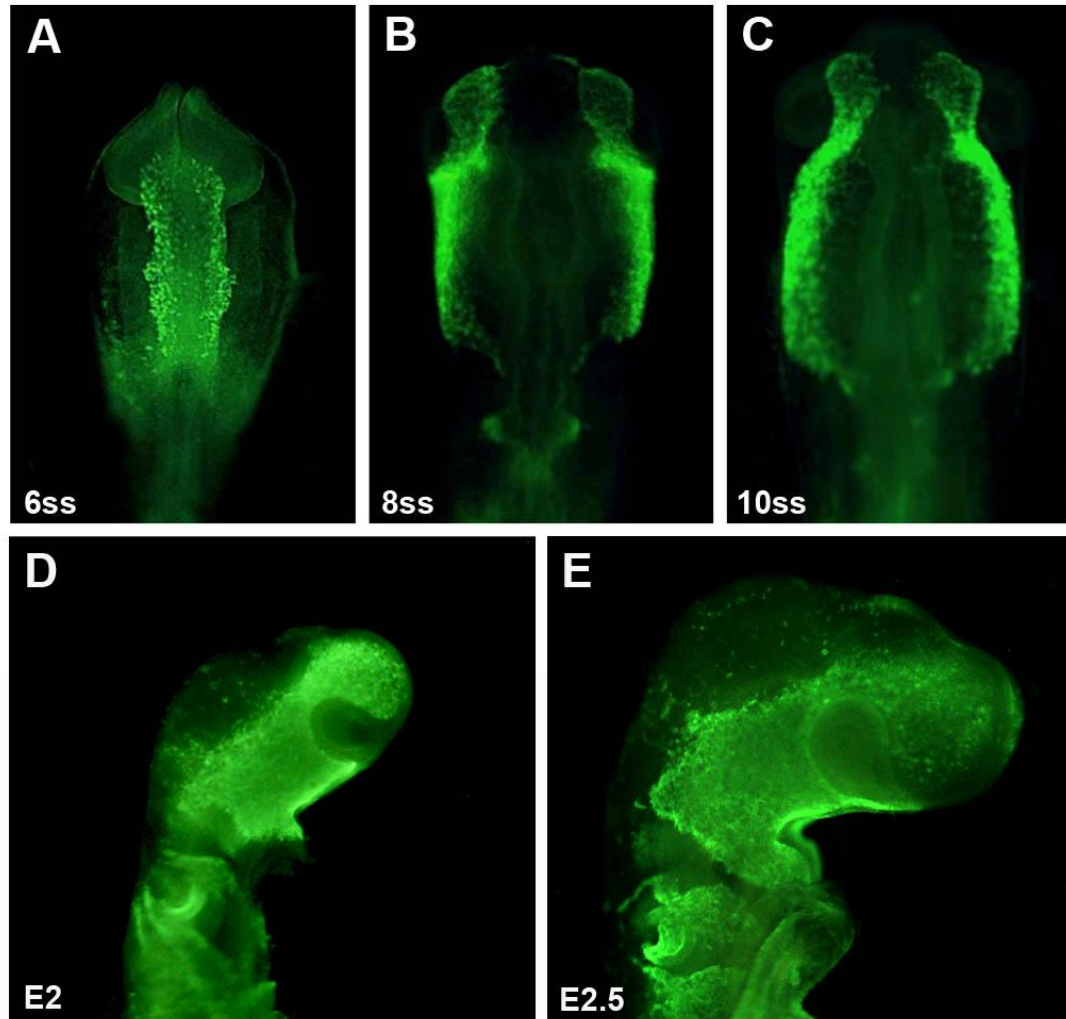


Figura 3 – Perfil de migração das células da crista neural cefálica e cranial. Visualização das células da CN em migração através de imunodeteção utilizando o anticorpo contra glicoproteína *HNK-1*. (A-E) Em verde visualizamos as células da crista neural cefálica que se desprendem da borda do tubo neural e migram em direção ventral pelo mesênquima cefálico em embrião de galinha no estágio embrionário de 6ss (A), 8ss (B) e 10ss (C). No estágio de 2 dias de desenvolvimento as células da CNC em migração, colonizam o mesênquima craniofacial (D). Em 2,5 (26 somitos) dias do desenvolvimento é possível visualizar as células da CNC colonizando o primeiro arco branquial (E). (Resultados não publicados, Aguiar e Creuzet)

Concomitantemente, utilizando embriões de *Xenopus*, de peixe zebra e galinha foi demonstrado que o padrão de indução das células da CN é baseado nos papéis de *Bmps*, *Wnts*, *Tgf β* (Fator de crescimento transformante beta) e *Fgf* (Fator de crescimento do fibroblasto), que por sua vez atuam já no estágio de gástrula (Liem, *et al.*, 1995; Aybar *et al.*, 2002; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004). Estas conclusões são provenientes de experimentos de sobreposição *in vitro* de tecidos embrionários, como a ectoderme neural e a ectoderme não-neural. Desta forma foi possível mimetizar a formação das células da CN em domínios distantes de sua posição embrionária original (Selleck and Bronner-Fraser, 1995). Inicialmente, observamos nestes experimentos *Bmps* e *Wnts* delimitando a ectoderme não-neural e assim induzindo a especificação da CN a partir da placa neural prospectiva ainda no estágio de gástrula (Garcia-Castro, *et al.*, 2002; Basch, *et al.*, 2006). *In vivo* tem sido descrito que gradientes de moléculas secretáveis formados por *Noggin*, *Chordin*, *Follistatin*, *Cerberus*, *Frizzled-related protein (FrzB)* e *Dickkopf 1 (Dkk1)*, provenientes do centro organizador que são necessários para a padronização e especificação da placa neural e da epiderme (Morgan and Sargent, 1997; LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; Nguyen *et al.*, 1998; Marchant *et al.*, 1998). Estas moléculas servem como moduladoras

das vias de sinalização *Bmp*, *Wnt* e *Fgf* gerando um gradiente, que por sua vez limitam os domínios necessários para a indução e diferenciação da CN (revisado por Aybar and Mayor, 2002). Importante ressaltar que as mesmas moléculas que no estágio de gástrula são importantes para a padronização neural, epidermal e indução da CN, estão presentes também em outras etapas durante o desenvolvimento embrionário como na organogênese.

Após a indução e formação, as células da CN realizam o processo de delaminação. Estas células desprendem-se do neuroepitélio de origem migrando isoladamente. Nesse momento, é iniciada uma extensiva migração dessas células por diversas partes do embrião (**Figura 3**), onde passarão a formar uma grande quantidade de tipos celulares em diversos órgãos e estruturas do corpo, entre eles, neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico (SNP), células pigmentares e grande parte do esqueleto craniofacial. Importante ressaltar que a formação da CN acompanha o processo de neurulação. A dinâmica de migração das células da CN ocorre em sinergia com o fechamento do tubo neural, que começa na porção cefálica nos estágio entre 3-6 somitos, indo em direção a porção mais caudal (estágio de 25 a 30 somitos) (Osorio et al., 2009). A migração também é influenciada pelas sinalizações, *Notch*, *Wnt* e gradientes de ácido retinóico (Teillet et al., 1987; Schmidt et al., 2008; Gale et al., 1996; Vilhais-Neto and Pourquié et al., 2008). Mais tarde no desenvolvimento a migração das células da CNT ocorre exclusivamente na metade anterior de cada somito, sendo a porção anterior permissiva, e a porção posterior repulsiva a migração. Isso acontece devido à expressão de *Efrinas* na porção posterior dos somitos, que por sua vez, limitam a migração das células da CNT (Bronner and Cohen, 1979).

Estas evidências sugerem que a cascata hierárquica de sinalização atuante na indução e formação da CN, ocorre antes, durante e após a migração da CN. Neste circuito de sinalizações podemos destacar quatro vias de sinalização celular, começando pela via de sinalização *Bmp* bem como seus inibidores *Noggin* e *Gremlin*, a via de sinalização canônica de *Wnt* e seus inibidores *Sfrp1*, *Sfrp2* e *Dkk1*, bem como as vias de *Fgf* e Ácido retinóico (Kalcheim, 2000; Wu et al., 2004, Knecht and Bronner-Fraser, 2003). Assim, podemos imaginar que o aumento ou diminuição dos membros destas vias de sinalização e seus respectivos inibidores, pode acarretar em um desenvolvimento embrionário incorreto ou até na morte ainda nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

1.3 - A crista neural e o desenvolvimento cefálico

Uma das maiores conquistas dos vertebrados durante a evolução foi a especialização das estruturas craniofaciais e cerebrais. Esta especialização tem sido correlacionada com a presença da CN e dos placóides epidermais (Gans and Northcutt, 1983). Segundo os autores Gans e Northcutt, a CN existiria em indivíduos primitivos como um plexo nervoso epidermal ou um nervo controlando os movimentos ciliares, seja para a movimentação, seja para a filtração nos proto-cordados. Esta estrutura primitiva poderia às vezes dar origem a neurônios ou células pigmentadas, como observamos em ascídias. Com o aumento da especialização do músculo, alguns animais desenvolveram um controle mais complexo sobre a contração muscular proveniente deste plexo nervoso epidermal. Estas modificações continuaram e houve o aumento do número de células do plexo nervoso epidermal até as especializações com

a diferenciação destas células em outros tipos celulares. A presença de CN foi um passo importante na especialização das estruturas craniofaciais, pois, a presença de uma mandíbula articulada, bem como a presença de músculos foi condição singular para o início da predação e assim abranger a possibilidade de captura de alimento. No cladograma abaixo observamos evolutivamente a presença da CN em função da especialização craniofacial (Hall, 2009) (**Figura 4**). Podemos constatar que na medida em que os organismos evoluem a especialização da região anterior trona-se mais complexa. Esta característica só foi possível devido à presença das células da CN. Desta forma, é possível imaginar que a regulação morfogénética, tanto da indução, quanto da diferenciação das células da CN, é a responsável por controlar esta especialização. Logo, estudos aprofundados sobre a influência das sinalizações celulares atuantes neste processo, como por exemplo, a sinalização *Bmp* é de extrema importância para a compreensão do papel das células da CNC durante o desenvolvimento do tubo neural.

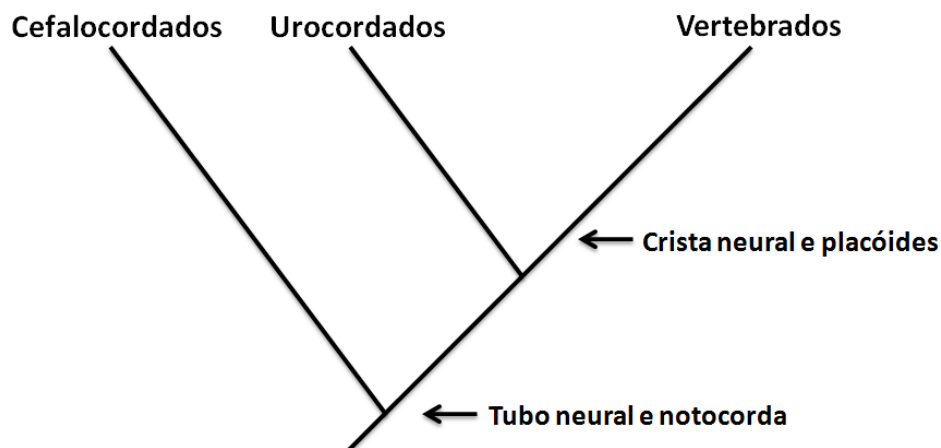


Figura 4 – Aparecimento da CN durante a evolução dos cordados e vertebrados. Árvore filogenética mostrando que a evolução da CN e dos placóides, acompanhada pela evolução da notocorda e do tubo neural. (Modificado: Hall, 2009).

A técnica de transplante codorna-galinha mostrou que a CNC é uma importante formadora do esqueleto cefálico e da cápsula nasal em embriões de galinha (Le Lievre, 1978; Couly et al., 1993). A CNC é a responsável por abundante tecido mesenquimal, promovendo um senso estrutural na formação de tecidos neurais (Teillet et al., 1998). Evolutivamente observamos a presença da CN em animais gnatostomados (possuidores do complexo maxilo-mandíbula), mas não a encontramos em ágnatos (sem o complexo maxilo-mandíbula), ou seja, as células da CN apresentam-se evolutivamente como condição fundamental para a formação da cabeça. Uma função básica das células da CN é a multipotencialidade e a possibilidade de gerar diferentes tipos celulares (Le Douarin, 1982). Esta capacidade é o fator limitante para o desenvolvimento de estruturas craniofaciais mais complexas nos vertebrados. A chamada cabeça primitiva, que não possui a expressão de genes *Hox* (Le Douarin et al., 2004), permite que estruturas especializadas como mandíbula, olhos e cérebro sejam formados, sendo este fenômeno evolutivo chamado de “Efeito Hox negativo” (Creuzet et al, 2002). A ausência dos genes *Hox* permite que um centro organizador conhecido como borda neural anterior (BNA), fonte de expressão de *Fgf8*, possa orquestrar a formação do prosencéfalo anterior e conseqüentemente estruturas faciais (Couly et al., 2002; Creuzet et al., 2004; Le Douarin et al., 2004; Le Douarin et al., 2007; Garcez et al., submetido). A ausência das células da CNC (CN presente entre a BNA até o rombômero2) gera embriões com severo grau de malformação craniofacial.

Entretanto, o suplemento do *Fgf8* através de esferas de heparina impregnadas com esta molécula é capaz de recuperar o desenvolvimento craniofacial normal, através da indução da migração das células da CN presentes na região do rombômero3 em direção a fonte de *Fgf8* situada na BNA, além de diminuir a expressão de *Bmp4* presente na ectoderma (Creuzet et al., 2004).

1.4 - Via de sinalização *Bmp*: O papel de *Smad1* no desenvolvimento embrionário

Bmps são membros da família *Tgf- β* de ligantes extracelulares, que é subdividido em duas outras subfamílias α e β , incluindo os *Bmps* e *Activina*. Estas proteínas são essenciais para o desenvolvimento do embrião em diferentes estágios e em diferentes eventos embrionários, e atua desde o óvulo e espermatozóide, até a formação do coração, pulmão, rim, formação de membros inferiores e posteriores, bem como, o perfeito desenvolvimento de estruturas craniofaciais e cerebrais (Kitisin et al., 2007). A via de sinalização da grande família *Tgf- β* controla uma gama de processos, incluindo diferenciação e especialização celular, padronização e formação correta de tecidos, proliferação e morte celular (Mehlen et al., 2005). Dentro da subfamília *Tgf- β* os receptores formam um complexo homomérico ou heteromérico de dois tipos de receptores serina-treonina-quinases transmembranares, o tipo I (*Alk2*, *Alk3/BmpRIA* e *Alk6/BmpRIB*) e o tipo II (*BmpRII*, *ActRIIA* e *ActRIIB*) (Ripamonti et al., 2005). Os diferentes membros da família *Tgf- β* respondem através diferentes receptores tipo I e tipo II. O fator *Bmp4* quando livre no espaço extracelular liga-se aos dois receptores *BmpRIA* e *BmpRIB* (Receptores tipo I), em seguida esta ligação é reforçada através da ligação do *Bmp4* com os outros dois receptores do tipo II, chamado *BmpRII* e *BmpRIIB*.

Este complexo extracelular ativa mensageiros secundários e fatores de transcrição da família de proteínas *Smads* (Kitisin et al., 2007) (**Figura 5**). *Smad4* é um mensageiro secundário universal para receptores ativadores de *Smads* (Kitisin et al., 2007). Além de *Smad4* existem outros membros da família *Smad* ou co-*Smad* que respondem especificamente ao ligante *Bmp4* (Mehlen et al., 2005) (**Figura 5**). Após os receptores serem ativados por seus ligantes esta resposta é traduzida para o interior do núcleo por conta de um complexo formado por *Smads* e co-*Smads*, que vão ao núcleo e regulam positivamente e/ou negativamente a expressão gênica (Liang et al., 2009). A via de *Bmp* pode também ser modulada por antagonistas no espaço extracelular. Os fatores reguladores são: *Noggin*, *Chordin*, *Gremlin* e *Dan*, que atuam na antagonização (bloqueio) da ligação do fator *Bmp* ao seu receptor (Merino et al., 1999). A sinalização *Bmp* pode ser modulada também por antagonistas intracelulares, conhecidos como *Smads* inibitórias (I-*Smad*). São eles as *Smad6*, *Smad7* e *Smurf*, que ubiquitinam as *Smads* e os receptores de *Bmp* conduzindo-os a degradação por proteossomas (Hurtado et al., 2007).

A intensidade da sinalização *Bmp* é determinada por receptores na superfície celular que fosforilam *Smad1/5/8* na região C-terminal (Fuentealba et al., 2007; Shi and Massague, 2003) (**Figura 5**). Recentes trabalhos demonstraram que dentro da molécula *Smad1* existem outros sítios de fosforilação. Além da via canônica que é proveniente da ativação via *Bmp*, existem outros 2 sítios alvos para MAPK (Mitogen-activated protein kinases) e para *Gsk-3* (Glycogen synthase kinase-3), que podem regular negativamente a ação da molécula *Smad1*, que ao ser poliubiquitinada é então conduzida a degradação proteossomal (Eivers et al., 2008). Em embriões de *Xenopus* a

sinalização *Wnt*, que através de *Gsk-3* conduz a diferenciação ectodermal e possibilita posteriormente as células a adotar características epidérmicas. Esta diferenciação ocorre através da sinalização *Bmp* via a fosforilação de *Smad1/5/8* (Eivers et al., 2008; Fuentealba et al., 2007).

Os fatores de transcrição *Smad* são muito similares uns aos outros. Estas proteínas possuem uma estrutura que inclui um domínio N-terminal *MH1* conservado em todas as R-*Smads* e *Smad4*, mas não nas I-*Smads*. A maior função do domínio *MH1* é mediar ligações das proteínas *Smads* ao DNA. O domínio *MH1* é alvo de regulação por outras proteínas intracelulares através da fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (Eivers et al., 2008; Fuentealba et al., 2007). O domínio *MH2* está presente em todas as *Smads*, sendo responsável por receber a fosforilação no motivo Ser-X-Ser após a ativação do receptor pelo ligante (Wu et al., 2001). O domínio *MH2* também é responsável pela interação das proteínas *Smads* a outras proteínas intracelulares e a ativação transcricional dos seus alvos gênicos (Massague et al., 2005). Importante notar que a molécula *Bmp* é um importante morfógeno, que quando expressa em um tecido específico pode difundir-se pelo embrião e promover a ativação da sua via de sinalização em tecidos distantes. Majoritariamente, receptores presentes em células alvo da via de sinalização *Bmp*, receptores *ALKs* 1, 2, 3 e 6 ativam as *Smads* 1, 5 e 8, e assim traduzem o sinal (Wu et al., 2001). Descobertas recentes feitas a partir de embriões de camundongo demonstraram que a via canônica de *Bmp* através de *Smads* 1 e 5 possuem papel primordial na placa de crescimento ósseo através da ação sinérgica com *Fgf*. Além disso, o promotor de Indian Hedgehog (*Ihh*) também é alvo de *Smad1*, pois as mutações dos sítios de fosforilação de *Smad1* *in vitro* diminuíram o

antagonismo de *Ihh* feito por *Fgf* (Retting et al., 2009). O mesmo trabalho mostrou que a deleção de *Smad1* e *Smad5* provoca uma grave condroplasia (redução do tamanho corporal), ou seja, mesmo na presença de *Bmp*, a ausência de *Smad1* e *Smad5* faz com que as células mesenquimais não respondam a sinalização *Bmp*, logo não conseguem realizar a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos (Retting et al., 2009).

A via de sinalização *Bmp* interage com a via de sinalização *Wnt* durante a especificação do mesoderma ventral em embriões de *Xenopus leavis* (Hoppler and Moon, 1998). Foi mostrado que as sinalizações *Bmp4* e *Wnt8* possuem uma sobreposição na zona marginal dorsal no estágio de gástrula, sendo assim responsáveis pela morfogênese do mesoderma ventral. Ensaios de imunoprecipitação utilizando linhagens celulares como modelo, demonstraram que *Smad1* se liga a *Dishevelled-1* (Dvl-1) e que esta interação é responsável por diminuir a acumulação da molécula beta-catenina no núcleo, diminuindo assim a sinalização *Wnt* canônica (Liu et al., 2006). Em contra partida, *Smad1* pode ser fosforilada por *Gsk-3* e conduzida à degradação (Fuentealba et al., 2007). Desta forma, a via de *Bmp*, através de *Smad1* diminui a atividade da via de sinalização *Wnt*. Em contrapartida, a via de *Wnt* pode também controlar a atividade de *Smad1* através de sua fosforilação por *Gsk-3* que conduz *Smad1* a ubiquitinação e degradação. Logo, é razoável pensar que ao inativarmos uma destas moléculas é possível observar problemas na morfogênese decorrente da modulação de ambas as vias de sinalização *Bmp* e *Wnt*. Estes dados sugerem que a relação entre a via de *Bmp* e outras vias de sinalização é muito mais complexa que pensamos. Os processos reguladores não se baseiam simplesmente em

um controle transcricional direto, mas também em intervenções antagônicas, seja no espaço extracelular, seja no citoplasma. Sendo assim, o papel de uma via de sinalização como a de *Bmp* durante o desenvolvimento carece de compreensão, sendo um foco importante para novos estudos.

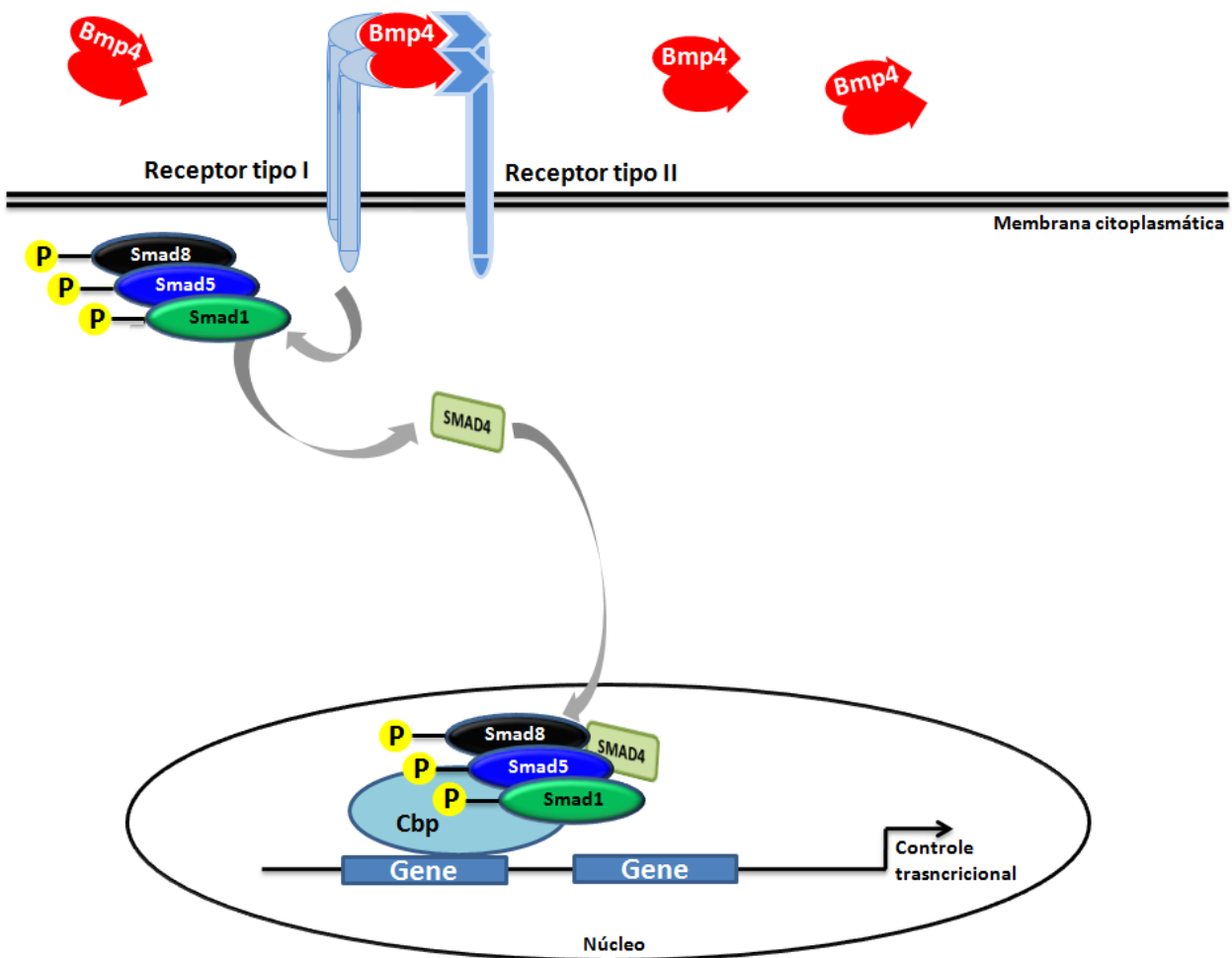


Figura 5 – Via canônica de *Bmp* simplificada. Bmp livre no espaço extracelular liga-se ao receptor I e recruta o receptor II. Este complexo formado pelos receptores e a proteína *Bmp4* é capaz de fosforilar os fatores de transcrição *Smad1*, *Smad5* e *Smad8*. As *Smads* 1, 5 e 8 fosforiladas se ligam a co-*Smad*, conhecida como *Smad4*. Este complexo formado por *Smad1*, *Smad5*, *Smad8* e *Smad4* vai ao núcleo e liga-se a co-ativadores (Cbp) para ativar ou reprimir genes alvos. (Criado a partir de resultados obtidos por: Derynck and Zhang, 2003; Kitisin et al., 2007; Varga and Wrana, 2005)

1.5 - Via de sinalização *Bmp* e o desenvolvimento do cérebro

O modelo para indução e padronização de estruturas derivadas a partir da CN sugere que um gradiente de sinalização *Bmp* subdivide a ectoderme em diferentes domínios (Raible, 2006). A epiderme forma-se através de altos níveis de sinalização *Bmp*, a placa neural com níveis baixos e a CN com níveis intermediários de sinalização *Bmp* (Hu and Marcucio, 2008). Este modelo é baseado em experimentos que examinam as diferentes atividades da sinalização *Bmp* em *Xenopus* (Marchant et al., 1998) e em análises genéticas em embriões de peixe-zebra (Nguyen et al., 1998; Barth et al., 1999; Nguyen et al., 2000). Estes fatos nos entusiasmam a examinar a influência da sinalização *Bmp*, especialmente o papel de *Smad1*, nas células da CNC durante o desenvolvimento craniofacial e cerebral.

A precisa regionalização de estruturas craniofaciais é coordenada principalmente pela ação interligada de quatro vias de sinalização, são elas: *Wnt*, *Fgf8* (Cannig et al., 2008), *Bmp* (Yu et al., 2008b) e *Sonic Hedgehog* (Brito et al., 2008). Estes trabalhos têm explorado a ação de cada uma destas proteínas na formação craniofacial e cerebral. Foi mostrado que ao induzir a expressão de *Bmp* ou *Noggin* (antagonista de *Bmp*) em células mesenquimais, provenientes da CN, através de vetores plasmidiais (*Bmp*-RCAS e *Noggin*-RCAS), promove-se a diminuição ou aumento de estruturas craniofaciais em aves, respectivamente (Wu et al., 2004; Helms et al., 2005). Estes resultados mostram a importância destas moléculas no controle das características morfológicas espécie-dependentes. Análises por hibridização *in situ*, indicam que a via de sinalização *Bmp4* é extremamente importante para o desenvolvimento craniofacial e cerebral. Encontramos a expressão de *Bmp4* na CNC,

no esqueleto facial, no epitélio dental, no mesênquima, nos pré-odontoblastos, no palato e durante a formação da língua (Aberg et al., 1997; Francis-West et al., 1994; Meyer, 1978; Nie, 2005a; Nie, 2005b). Embriões mutantes (nocaute) para *Bmp4* morrem entre o dia embrionário 6.5 e 9.5, com problemas na formação de derivados mesênquimais (Winnier et al., 1995). Experimentos que restringiram a presença de *Bmp* nas células da CNC no estágio de 5-6ss, através da eletroporação de uma construção retroviral (RCAS) contendo antagonistas de *Bmp* como *Noggin* e *Gremlin* (*Noggin*-RCAS e *Gremlin*-RCAS), mostraram que ao diminuir a influência *Bmp* nas células da CNC ocorre um aumento considerável do volume cerebral observados em embriões no oitavo dia de desenvolvimento (Creuzet, 2009b). A deficiência na via de *Bmp4* também resulta em anomalias craniofaciais como, lábios e palatos fendidos sejam em humanos ou em camundongos (Liu et al., 2005; Suzuki et al., 2009). O desenvolvimento craniofacial e cerebral por sua vez depende das células da CNC. Estudos feitos a partir de nocautes das moléculas *Bmp2*, *Bmp4* e *Bmp7* condicionados a expressão de *Wnt1*, mostraram que, sobretudo *Bmp2* e *Bmp4* expressos nas células da CNC são os principais reguladores da condrogênese e osteogênese craniofacial (Bonilla-Claudio et al., 2012). Estudos mais aprofundados utilizando camundongos nocautes para *Smad1*, *Smad5* e *Smad8*, mostram que o nocaute para *Smad1*, o nocaute para *Smad5*, bem como o nocaute para *Smad8*, não possuem graves modificações craniofaciais. Entretanto, o duplo nocaute para *Smad1* e *Smad5* e ou o triplo nocaute para *Smad1*, *Smad5* e *Smad8* gera embriões com graves malformações craniofaciais (Retting et al., 2009). Estes resultados mostram que a via de sinalização *Bmp4* é extremamente importante para o desenvolvimento do esqueleto craniofacial.

Entretanto, nestes embriões não foram analisados o desenvolvimento cerebral decorrente de problemas na via de sinalização *Bmp4*. Deste modo, é desconhecido o efeito da perda de função de *Smad1* nas células da CNC sobre o desenvolvimento do TN cefálico. Ainda tentando elucidar o efeito da molécula *Bmp* no desenvolvimento da cabeça, embriões foram eletroporados com *Bmp*-RCAS na BNA no estágio de 5-6ss e observou-se, a diminuição da colonização das células da CNC na região mais anterior, bem como, problemas no desenvolvimento do telencéfalo (Creuzet, 2009a). O aumento da expressão de *Noggin* na BNA através da eletroporação com *Noggin*-RCAS em embriões que sofreram ablação da CNC foi eficiente para o controle da expressão de *Bmp4* e na recuperação da expressão de *Fgf8*. Estes resultados mostram que a expressão de *Noggin* na BNA é capaz de restaurar o fenótipo craniofacial e cerebral em embriões sem a CNC (Creuzet, 2009b). Estes resultados demonstram a importância da presença da expressão dos antagonistas *Noggin* e *Gremlin* nas células da CNC controlando a ação de *Bmp4* e *Fgf8* na BNA.

1.6 – Modulação das vias de sinalização *Fgf* e *Bmp* através do domínio *Cub*

O mecanismo de regulação do desenvolvimento controlado pela sinalização *Bmp* tem sido revelado pouco a pouco. A molécula *Bmp1* possui em sua estrutura domínios, *Cub1* [Complemento C1r/C1s, e uma sequência de *Egf* de ouriço do mar (fator de crescimento epidermal) e da proteína morfogenética do osso 1 humana], *Cub2*, seguido pelo domínio semelhante ao *Egf* e mais um domínio *Cub3* (Kozyraki and Gofflot, 2007). O domínio *Cub* presente na molécula *Bmp1* pode ligar-se a *Bmp4* (Lee et al., 2009), entretanto não se sabe se esta ligação entre *Bmp1* e *Bmp4* pode

antagonizar a via de sinalização *Bmp4*, conduzindo por exemplo a diminuição da fosforilação das *Smad1*, 5 e 8. Este domínio *Cub* está presente em diversas moléculas da matriz extracelular como: pró-colágeno e fibronectina (Kronenberg et al., 2009; Kuznetsova et al., 2008), bem como na própria molécula *Cubilin*, que possui 460 kDa e está situada na membrana plasmática. *Cubilin* possui em sua estrutura com 8 repetições de *Egf*, seguida por 27 domínios *Cub* (Kozyraki and Gofflot, 2007; Moestrup and Verroust, 2001). Mutantes para a proteína *Cubilin* possuem problemas na formação da cabeça e do eixo corporal e morrem precocemente no estágio de E8.5-9.5 (Moestrup and Verroust, 2001; Smith et al., 2006). Em indivíduos adultos a falta de *Cubilin* promove problemas de absorção de nutrientes pelo intestino e pelos rins (Amsellem et al., 2010; Moestrup and Verroust, 2001). Estudos recentes mostraram que a molécula *Cubilin* interage com *Amnionless* (Amn) e *Megalin* (Lrp2) que estão situadas na membrana plasmática e esta ligação tem sido correlacionada com a absorção de nutrientes durante o desenvolvimento embrionário (Amsellem et al., 2003; Kozyraki and Gofflot, 2007). O receptor *Lrp2* ou *Megalin* pode se ligar a *Bmp4* e sua completa inativação geram problemas no desenvolvimento do telencéfalo (Spoelgen et al., 2005). Alguns de nossos resultados preliminares mostram que *Cubilin* é expressa nas células da CNC no estágio de 5ss em embriões de galinha, e que *Cubilin* interage com *Fgf8* modulando sua via de sinalização. Além disso, nós observamos que a ausência de *Cubilin* nas células da CNC e na ectoderme adjacente a BNA (Zona de grande expressão de *Fgf8*) promove problemas na formação do telencéfalo com a diminuição da expressão de *Foxg1* no neuroepitélio telencefálico e de *Bmp4* na linha média dorsal das vesículas cefálicas. Nossos resultados sugerem que a molécula

Cubilin funciona como um modulador da via de sinalização *Fgf8* (Cases O, Perea-Gomez A, Aguiar D P, et al., Submetido).

1.7 – Os antagonistas de *Wnt* controlam o desenvolvimento cefálico

Em embriões de camundongo observa-se a indução da expressão de *Dkk1* por *Bmp2* durante o desenvolvimento do membro. Foi demonstrado que esta indução é responsável pela ativação da apoptose das membranas interdigitais (Mukhopadhyay et al., 2001). Apesar de estas observações terem sido feitas no desenvolvimento dos membros, os mesmos conceitos de interação entre as sinalizações *Bmp* e *Wnt* podem ser aplicados no desenvolvimento de outras estruturas como a cabeça. A atividade dos genes que influenciam a morfogênese craniofacial e cerebral está ligada potencialmente a via de sinalização *Wnt*, principalmente devido à presença de seus antagonistas extracelulares. Em embriões de camundongo nocautes para *Otx2* (Orthodenticle homeobox 2) e *Foxa2* (Forkhead Box a2), observou-se a importância de *Otx2* na padronização dorsal e *Foxa2* na padronização ventral das vesículas cefálicas. Além disso, estes mutantes apresentam baixos níveis de expressão dos antagonistas de *Wnt*, como *Dkk1* (Kimura et al., 2001; Zakin et al., 2000; Kimura-Yoshida et al., 2007), Secreted Frizzled Protein 1 (*Sfrp1*), Secreted Frizzled Protein 2 (*Sfrp2*) e Secreted Frizzled Protein 3 (*Frzb/Sfrp3*) (Hoang et al., 1998; Mukhopadhyay et al., 2003). Estes embriões possuem graves problemas de malformação craniofacial e cerebral semelhante aos observados no embrião nocaute para *Dkk1* (Mukhopadhyay et al., 2001). Ensaios *in vitro* mostraram que *Dkk1* é capaz de se ligar a *Wnt3a* e antagonizá-lo, o que foi um ponto de partida para analisar embriões mutantes para *Dkk1* e

observar o aumento dos níveis de expressão de *Wnt3a* que por sua vez é deletério para a formação da cabeça destes camundongos (Lewis et al., 2008). Estes resultados mostram que as vias de *Bmp* e *Wnt* estão interligadas através do controle de expressão dos seus antagonistas. Desta forma, é extremamente coerente pensar que ao bloquearmos um dos membros da sinalização *Bmp* como, por exemplo, *Smad1* nas células da CNC acarretaria na perda da sinalização *Bmp* e em uma desregulação completa da via de sinalização *Wnt* e de seus antagonistas.

1.8 – Marcadores do desenvolvimento do tubo neural cefálico

O primeiro evento embrionário durante o desenvolvimento animal, nos mais diferentes modelos, é a indução da região onde será formada a cabeça esta porção é a primeira região que sofrerá induções, comprometimento celular e modificações (Spemann and Mangold, 1924). Dada a importância e complexidade da estrutura craniofacial e cerebral, diversos eventos consecutivos e bem organizados devem ocorrer para que não haja nenhum defeito funcional, seja dos derivados ectodermis, mesodermis, endodermis ou até mesmo derivados da CN. Uma das maiores mudanças no plano corporal durante a evolução dos cordados foi à elaboração gradual da complexidade do cérebro, e essa especialização crescente só foi possível devido à presença da CN (Gans and Northcutt, 1983). Durante anos, diversos trabalhos tem contribuído na descrição do desenvolvimento anatômico do cérebro nos diferentes modelos. Hoje, o modelo de desenvolvimento craniofacial e cerebral proposto a partir de micro-transplantes de tecidos embrionários, propõe uma cartografia aproximada do desenvolvimento embrionário no estágio de 3ss (**Figura 6**) (Couly and Le Douarin,

1985; Couly and Le Douarin, 1987; Le Douarin, 1981). Baseado nesta cartografia se pode distinguir já no estágio de 3ss, a região de origem da cavidade nasal e o placóide olfativo, retina, placóide óptico, epífise, notocorda, CN, placóide trigeminal, adenohipófise, post-hipófise, hipotálamo, ectoderme naso-frontal, ectoderme da pálpebra, ectoderme facial, bem como o prosencéfalo (telencéfalo, diencéfalo) e mesencéfalo (**Figura 6**). No decorrer da indução neural e consequentemente ao comprometimento tecidual durante desenvolvimento da região anterior, as vesículas do cérebro podem ser inicialmente divididas em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Saxén and Toivonen, 1962). Com o decorrer do desenvolvimento a vesícula prosencéfalica é subdividida em telencéfalo e diencéfalo (Wolpert, 1969) (**Figura 7 – A e B**). O avanço das pesquisas tem nos demonstrado que a presença de morfógenos, fatores de transcrição e diversos tipos de antagonistas e agonistas são importantes para o desenvolvimento das partes citadas durante a embriogênese. Muitas moléculas estão envolvidas com a padronização anteroposterior e dorsoventral da estrutura craniofacial e cerebral. Foi demonstrada a presença de *Bmps* no ectoderma dorsal e lateral da cabeça, que além de conduzir o desenvolvimento propriamente dito, controlam a expressão gênica de uma gama de outras moléculas, tais como: *Noggin* (Aikizu et al., 2010; Barth et al., 1999). No lado oposto, à placa do assoalho, ou seja, na porção ventral do cérebro e na notocorda, é observada a presença de *Shh* (Jessell, 2000). Os alvos da sinalização *Bmp* e *Shh* são responsáveis por delinear os domínios dorsais e ventrais. De maneira similar ocorre no eixo anteroposterior, aonde *Fgf8* é expresso na ectoderme e na neuroectoderme anterior,

conduzindo a expressão de *Foxg1* (Forkhead Box g1) na neuroectoderme telencefálica (Crossley et al., 1996) (Figura 7 – C-E).

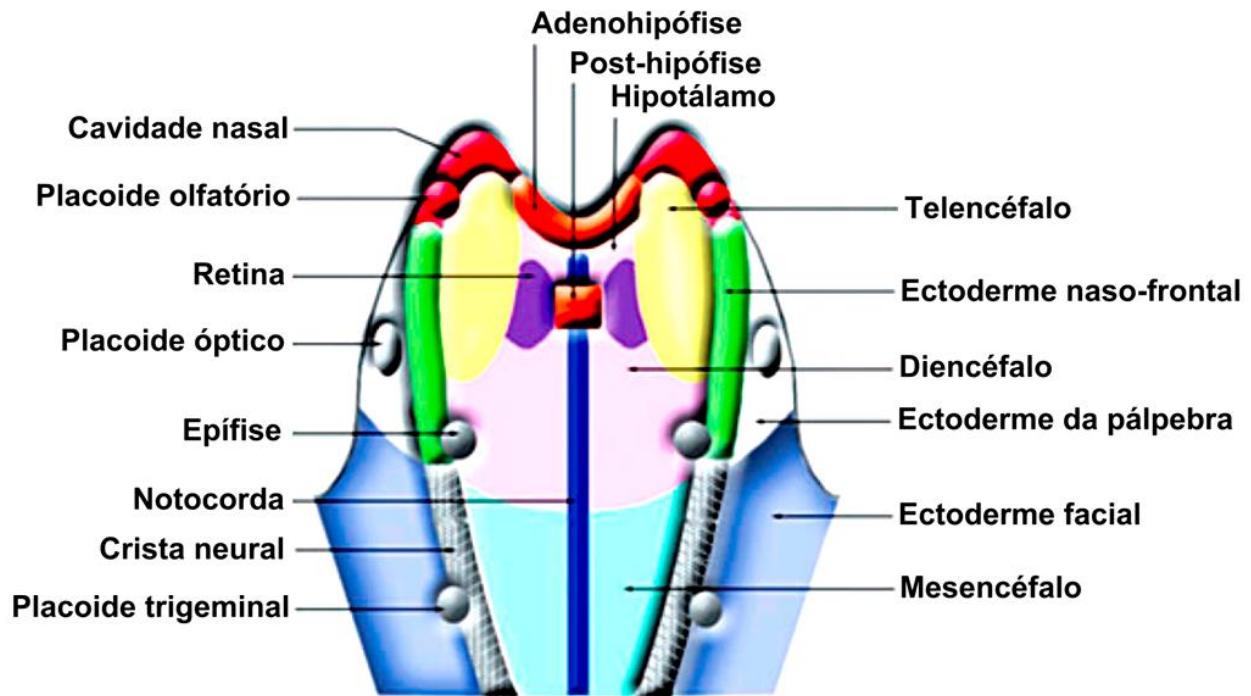


Figura 6 – Cartografia da placa neural do embrião de galinha no estágio de 3 somitos. Localização anatômica das regiões de origem das diferentes estruturas craniofaciais e cerebrais. (Modificado a partir de: Le Douarin, 2008)

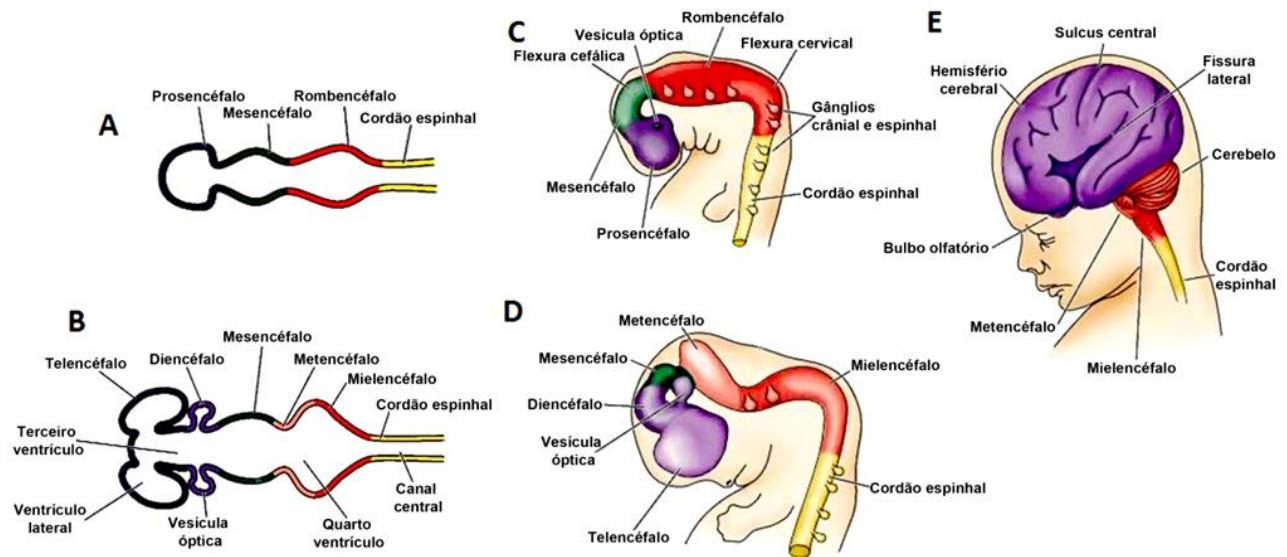


Figura 7 - Desenvolvimento das vesículas cefálicas. (A) Após a gastrulação, no início do estágio de nêurula, o neuroepitélio começa a se subdividir em diferentes vesículas (prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo). (B) Ainda no estágio de nêurula o prosencéfalo se subdivide mais uma vez em telencéfalo e diencefalo. (C) Passado o estágio de nêurula a proliferação e as especializações do neuroepitélio são etapas fundamentais para amadurecimento das vesículas cefálicas. (D-E) A vesícula telencefálica aumenta e se especializa enormemente dando origem ao córtex cerebral com todas as suas particularidades. Além disso, o mielencéfalo também sofre intensa proliferação e especialização celular dá origem ao cerebelo. (Modificado a partir de: Dales Purves et al., 2001)

Os antagonistas de *Bmp*, como *Noggin*, foram identificados em embriões de *Xenopus leavis*, como uma proteína que recuperava os fenótipos gerados pela irradiação UV (Smith and Harland, 1992). Juntamente com *Noggin*, os antagonistas *Gremlin*, *Chordin* e *Follistatin* são expressos no organizador de “Spemann” nos estágios iniciais do desenvolvimento e são determinantes para o desenvolvimento dorso-ventral (Thomsen, 1997). Embriões mutantes para *Noggin* apresentam várias deformidades, como encurtamento dos eixos corporais, somitogênese defeituosa, malformação nos membros e falha no fechamento do tubo neural (Brunet et al., 1998, McMahon et al., 1998). *Gremlin* foi identificado através de um ‘screening’ de cDNAs provenientes de células ovarianas, e quando injetado em embriões de anfíbio promove a formação de um segundo eixo corporal (Hus et al., 1998). Sua expressão é encontrada nas células da CN (Bardot et al., 2001). Camundongos mutantes para *Gremlin* possuem graves problemas no desenvolvimento do esqueleto, no broto dos membros, e no desenvolvimento renal (Khokha et al., 2003). Tem sido demonstrado que *Chordin* juntamente com *Noggin* são extremamente importantes para o desenvolvimento craniofacial, já que embriões mutantes não possuem o desenvolvimento do cérebro, com perda da expressão de *Fgf8*, *Foxg1*, *Foxa2*, *Otx2* (**Figura 8**) e aumento dos níveis dos transcritos de *Bmp4* (Bachiller et al., 2000; Anderson et al., 2002). Todos os embriões mutantes para os antagonistas de *Bmp* possuem o fenótipo de holoprosencefalia. Apesar da presença de *Bmp4* ser extremamente importante tanto para indução neural, como para o desenvolvimento tardio, o excesso de *Bmp4* é extremamente danoso ao desenvolvimento craniofacial e cerebral.

Diversos estudos tentam entender o papel dos fatores de transcrição *Otx2* e *Foxa2* na padronização dorsoventral. Estes trabalhos mostraram que a expressão de *Otx2* em camundongos é encontrada inicialmente no epiblasto e no endoderma visceral, e subsequentemente no mesoderma e neuroectoderma anterior, e na CNC migratória (Simeone et al., 1992, 1993; Kimura et al., 1997). O fator de transcrição *Otx2* também é descrito como uma importante molécula no córtex visual de camundongos no período pós natal (Minichiello et al., 1999). *Otx2* é um fator de transcrição que possui tanto domínios de ligação ao DNA, quanto domínios de presentes em moléculas excretadas (Joliot and Prochiantz, 2004), o que garante à esta molécula uma atuação particular, pois atua como um fator de transcrição e também como um agonista ou antagonista extracelular. Hipoteticamente *Otx2* poderia sair das células neurais presentes da porção dorsal do cérebro e antagonizar *Foxa2* na porção ventral do cérebro durante o desenvolvimento. Camundongos com o nocaute condicional da síntese de *Otx2* através da presença de *En1* (Homeobox protein engrailed-1) na porção ventral do mesencéfalo apresentam uma expansão no domínio de expressão de *Foxa2* e *Shh* (Puelles et al., 2004). Hibridização *in situ* para *Foxa2* e *Otx2* mostra convergência de seus sítios de expressão na endoderme anterior, borda ventral anterior e endomesoderma ventral (**Figura 8 – C**) (Jin et al., 2001). Camundongos que possuem dupla deleção de *Foxa2*^{-/-} e *Otx2*^{-/-} apresentam um fenótipo de malformação craniofacial, com a fusão das vesículas oculares, seguida pela abolição da expressão do *Foxg1* e *Shh* (Jin et al., 2001). A ausência completa desses dois genes é letal para o desenvolvimento embrionário. Isso sugere que *Foxa2* e *Otx2* agem de maneira antagônica e complementar na organização da padronização dorsoventral do cérebro.

Sendo assim, é interessante a utilização dos fatores de transcrição *Foxg1*, *Foxa2*, *Otx2* e do fator de crescimento *Fgf8* como marcadores do desenvolvimento craniofacial e cerebral (**Figura 8**). Esses marcadores podem nos dar uma idéia sobre a influência da via de sinalização *Bmp* nas células da CNC e qual o efeito da ausência de um dos seus efetores como, por exemplo, *Smad1*.

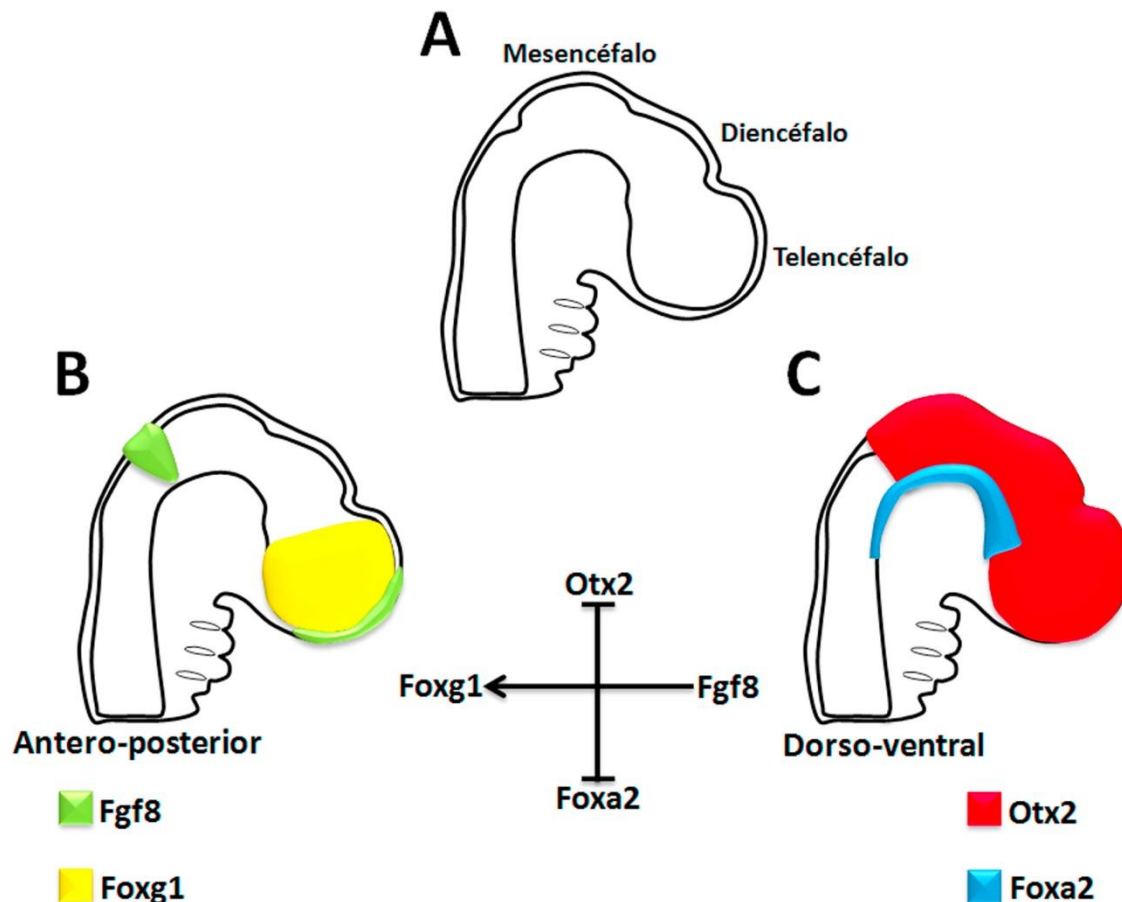


Figura 8 - Representação esquemática da expressão de marcadores moleculares das vesículas cefálicas durante o desenvolvimento embrionário no estágio de 26 somitos. (A) A Representação esquemática de um corte sagital da cabeça de embrião de galinha no estágio de 26 somitos. (B) A padronização do eixo antero-posterior, estabelecida pela expressão do fator de crescimento *Fgf8* na ectoderme, no neuroepitélio anterior e no istmo (verde), e o fator de transcrição *Foxg1* expresso no neuroepitélio telencefálico (amarelo). (C) Modelo de padronização dorsoventral, baseado na representação da expressão dos fatores de transcrição *Foxa2* (azul) e

Otx2 (vermelho). (Construído a partir de resultados obtidos por: Acampora et al., 2001; Garcia-Lopez et al., 2004; Yoshida et al., 2006).

1.9 – A Influência da crista neural cefálica sobre o desenvolvimento do tubo neural

A importância da CN para o desenvolvimento craniofacial e cerebral foi evidenciada após a retirada cirúrgica destas células e observação do fenótipo tardio. Os embriões sem CN sofrem com uma grave malformação craniofacial e cerebral (Yntema and Hammond, 1945). Entretanto, as primeiras retiradas cirúrgicas da CN não eram baseadas numa cartografia embrionária precisa, o que fazia com que os pioneiros no estudo do papel da CN como regulador da ontogenia do tubo neural não fossem tão precisos em suas observações (Landacre, 1921; De Beer, 1947; Platt 1893; 1894; 1897). Um pouco mais tarde na história da compreensão do papel da CN, as cartografias baseadas nos transplantes codorna-galinha (Le Douarin and Kalchem, 1999), juntamente com o padrão de expressão de moléculas em diferentes estágios da embriogênese, possibilitaram o desenvolvimento de uma cartografia precisa. Desta forma, experimentos de retirada da CN cefálica ou da CNC puderam ser realizados em embriões de galinha no estágio de 5-6ss (Creuzet et al., 2006). Assim, foi possível mostrar com mais segurança, que a ausência de CN cefálica ou da CNC gera defeitos graves no desenvolvimento craniofacial e no desenvolvimento do cérebro (anencéfalo) (Creuzet et al., 2004; 2006). Estes resultados sugerem que o mesênquima derivado da CN é capaz de agir como elemento chave no desenvolvimento do tubo neural. A ablação da CNC no estágio de 5 somitos gera uma superexpressão de *Bmp4*, após 1

hora e 30 minutos de sua retirada na porção dorsal do tubo neural (Creuzet, 2009b). Hoje mesmo com alguns trabalhos demonstrando a importância de moléculas presentes na CN que influenciam o desenvolvimento do tubo neural, ainda não é possível montar um cenário molecular completo. As células da CNC colonizam o mesênquima facial e se diferenciam em células cartilaginosas e posteriormente osso (Couly et al., 1993). A ablação da CNC provoca a falta do esqueleto craniofacial e consequentemente malformação da cabeça (Creuzet et al., 2004). Tem sido demonstrado que a via de sinalização *Bmp4* é fundamental para o desenvolvimento craniofacial e cerebral (Nie et al., 2008). *Smad4* é uma co-*Smad* presente na via de sinalização tanto de *Bmp4* como de *TGf-β* que funciona como um co-reguladora destas sinalizações (Waite and Eng, 2003). A deleção de *Smad4* condicionada a expressão de *Wnt1* provoca malformação dos arcos branquiais e da região craniofacial (Nie et al., 2008). Durante o desenvolvimento embrionário *Fgf8* é expresso na ectoderme superficial dos arcos branquiais, no isthmus e na BNA (Crossley and Martin, 1995; Crossley et al., 2001). Uma das consequências imediatas da ablação da CNC é a perda de expressão de *Fgf8* na BNA, o que acarreta em problemas no desenvolvimento do telencéfalo (Creuzet et al., 2004). A ausência de CNC ocasiona a perda de expressão de *Pax6* e *Dlx2* na porção dorsal do telencéfalo e diencéfalo, além da superexpressão de *Shh*. A ausência da CNC também provoca, a perda de expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento dorsal das vesículas cefálicas como *Wnt1* e *Wnt8* (Creuzet, 2009a). Estes resultados sugerem que as células da CNC funcionam como um agente anti-ventralizante durante o desenvolvimento das vesículas

cefálicas, pois a ablação da CNC gera a diminuição da expressão de genes dorsais e a superexpressão de genes ventrais.

Em embriões de camundongo a expressão de *Otx1* é primeiramente detectada entre 1-3ss no neuroepitélio anterior e posterior, que vão originar o cérebro no futuro. Entretanto, *Otx2* é observado nos estágios iniciais da gástrula no epiblasto e no endoderma (Acampora et al., 1999; 2001). No estágio de nêurula podemos observar a presença dos transcritos de *Otx2* nas células da CNC (em embriões de camundongo). Após a delaminação, a expressão de *Otx2* é mantida nas células da CNC migratórias (Acampora et al., 1999). Embriões mutantes sem a expressão de *Otx2* e *Otx1* possuem defeitos na formação craniofacial e cerebral, com a perda completa da porção anterior (Sakurai et al., 2010). A severidade no fenótipo do nocaute de *Otx1* e *Otx2* pode ser explicada pelo padrão de expressão destes genes em todo neuroepitélio.

A molécula beta-catenina foi descrita inicialmente no complexo de adesão celular (Ozawa et al., 1989), e foi muito explorada na polaridade das células epiteliais (Aberle et al., 1996). O papel de beta-catenina foi também examinado nas células da CN. A perda de função de beta-catenina condicionada a presença de *Wnt1*, provoca o aumento de morte celular das células da CNC e a sua ausência provoca graves defeitos no desenvolvimento do cérebro e de estruturas craniofaciais (Brault et al., 2001). Seguindo a filosofia de que a CNC é uma estrutura embrionária trófica no desenvolvimento do cérebro, diversos trabalhos foram publicados. O aumento da expressão dos inibidores de *Bmp*: *Noggin* e *Gremlin* nas células da CNC é capaz de aumentar o volume cerebral em embriões de galinha (Creuzet, 2009b). *Ap2* é um fator de transcrição que durante muito tempo foi explorado como um especificador das

células da CN. A utilização de morfolino contra *Ap2* em embriões de *Xenopus* mostrou a importância de *Ap2* no desenvolvimento craniofacial e cerebral. Já que a ausência deste causa defeitos na formação cartilaginosa da cabeça, bem como malformações nas vesículas cerebrais (Knight et al., 2005).

A malformação craniofacial e cerebral tem sido sempre correlacionada a defeitos e problemas em vias de sinalização no tubo neural e/ou defeitos na padronização do mesênquima. Entretanto, ainda não é considerada a ação reguladora do mesênquima sobre o desenvolvimento e padronização do tubo neural. Este trabalho tem como meta principal entender de que maneira as células mesenquimais derivadas da CNC podem regular troficamente o crescimento, padronização e especialização do cérebro.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Nós focalizamos nossa pesquisa na influência das células da CNC no desenvolvimento das vesículas cerebrais. Uma vez que a via de sinalização *Bmp4* possui papel importante no desenvolvimento craniofacial e cerebral, nós estudamos o papel do fator de transcrição *Smad1* nas células da CNC. *Smad1* funciona como um modulador da via de sinalização *Bmp4*, além de inibir a via de sinalização *Wnt* canônica. Desta forma, *Smad1* apresenta-se como uma molécula chave para a morfogênese. Este trabalho de tese de doutorado tem como objetivo entender qual o papel da molécula *Smad1* nas células da CNC durante o desenvolvimento do tubo neural.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Visualizar a presença no RNA mensageiro do fator de transcrição *Smad1* durante o desenvolvimento embrionário.

2.2.2 - Analisar os efeitos da perda de função de *Smad1* nas células da CNC na morfogênese craniofacial e cerebral.

2.2.3 – Examinar a função de *Smad1* nas células da CNC no controle do painel molecular responsável pelo desenvolvimento do cérebro.

2.2.4 – Avaliar a influência da perda da expressão de *Smad1* nas células da CNC sobre as vias de sinalização *Bmp*, *Fgf8* e *Wnt*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Embriões de galinha

Os experimentos utilizando embriões de galinha seguiram a classificação de estágio embrionário proposto por Hamburger e Hamilton (HH; Hamburger and Hamilton, 1951). O desenvolvimento embrionário também foi classificado segundo o número de somitos [estágio somítico – (ss)]. Para os experimentos utilizando embriões 4, 5, 6, e 12ss (i.e., HH8, 9 e 11, respectivamente) os ovos foram incubados entre 30 à 35 horas a uma temperatura de 38°C em estufa úmida (**Figura 10**).

3.2 - Síntese do RNA de interferência dupla fita (dsRNA)

O RNA dupla fita foi sintetizado a partir de um DNA plasmidial que codifica o gene alvo. A síntese das fitas senso e anti-senso começam pelo corte do DNA plasmidial (10µg) utilizando enzimas de restrição específicas para cada uma das fitas a uma temperatura de 37°C por 2 horas e 30 minutos. Após o corte, cada uma das amostras é exposta a uma temperatura de 70°C por 10 min, com o objetivo de desnaturar a enzima de restrição utilizada. Em seguida é utilizado 16µl do DNA linear para a síntese de cada uma das fitas senso e anti-senso a uma temperatura de 37°C por 4 horas (Pekarik., 2003). Para a confecção dos RNAs dupla fitas foram utilizados as seguintes enzimas de restrição e síntese: *dsSmad1* (sense - HindIII-T7 e anti-sense - EcorI-Sp6), *dsFoxg1* (sense – Sall – T3 e anti-sense – XbaI – T7), *dsGremlin* (sense - HindIII-T7 e anti-sense – EcorI-Sp6), *dsNoggin* (sense – BamH1-T7 e anti-sense - HindIII-T3), *dsSfrp1* (sense – SacI-T3 e anti-sense - EcoRI-T7), *dsSfrp2* (sense – KpnI-T7 e anti-sense – HindIII-T3). Após a síntese cada uma das fitas senso e anti-senso

são purificadas pelo método de precipitação por LiCl (4M). Após a purificação as fitas de RNA senso e anti-senso são expostos a uma temperatura de anelamento de 95°C por 5 min. Após o resfriamento é adicionado a enzima RNase I (Sigma), por 15 min a uma temperatura de 37°C para o corte das fitas simples de RNA. Em seguida o RNA dupla fita é purificado mais uma vez e visualizado por eletroforese usando um gel de agarose 1,5%. Além disso, o RNA dupla fita é dosado pelo aparelho nanodrop (G&E) (Pekarik et al., 2003; Creuzet et al., 2004). As Concentrações dos RNA duplas fitas utilizados na eletroporação foram: *dsSmad1* (0.33 µg/µl), *dsFoxg* (0.4 µg/µl), *dsGremlin* (0.25 µg/µl), *dsNoggin* (0.25 µg/µl), *dsSfrp1* (0.28 µg/µl) e *dsSfrp2* (0.28 µg/µl). Para visualizar as etapas de preparação do RNA interferência dupla fita ver a **Figura 9**.

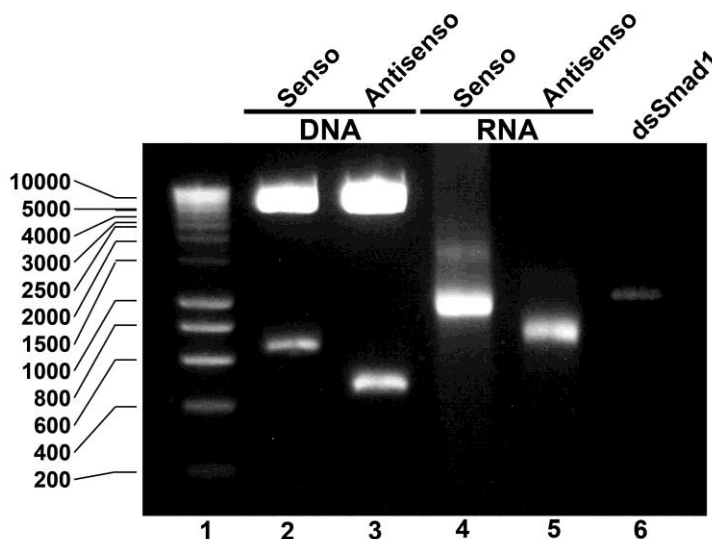


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% das diferentes etapas de preparação do RNA dupla fita para o bloqueio da expressão de *Smad1*. (Coluna 1) Peso molecular. (Coluna 2) Linearização do DNA de *Smad1* no sentido senso, e (Coluna 3) no sentido anti-senso. (Coluna 4) Síntese do RNA senso a partir do DNA senso e (Coluna 5) do DNA anti-senso. (Coluna 6) RNA dupla fita usada como RNA interferência da molécula *Smad1* (*dsSamd1*).

3.3 – Micro-manipulação

3.3.1 - eletroporação *in vivo*

A eletroporação *in vivo* das células da CNC nos estágios de 4 e 6 somitos seguem os princípios sugeridos pelos autores Ogino e Yasuda, 1998; Nakamura; 2009. Para este estudo nós utilizamos três eletrodos para uma eletroporação bilateral (Creuzet et al., 2002). Desta forma, a utilização de um eletrodo que conduz carga negativa situado próximo a BNA a uma distância de 5mm (sem encostar nos anexos embrionários) e outros dois de carga positiva situado na porção lateral do embrião a uma distância também de 5mm. Os eletrodos positivos foram dispostos a uma amplitude 45 graus (Plano horizontal e vertical) em relação ao eletrodo positivo. Tanto os RNAs dupla fita como o vetor plasmidial utilizados na eletroporação bilateral foram misturados ao colorante Fast Green FCF à 0.01% (Sigma), com o objetivo de identificar com maior facilidade a região precisa na qual são injetados os ácidos nucléicos. Em todas as eletroporações foram utilizados 5 pulsos de 27 volts no eletroporador fabricado pela Harvad Apparatus (T830 BTX, Genetronics, CA) (**Figura 10 – A-D**). As concentrações dos plasmídeos de expressão utilizadas foram: *hSmad1* (1,1µg/µl). *hSmad1-P*, Plasmídio que contem o gene *Smad1* com a mutação na região carboxi terminal, Ser para Glu, que ao ser expresso reproduz a forma constitutivamente fosforilada (1,25µg/µl). *hSmad1-MM*, Plasmídio que contem o gene *Smad1* com a mutação na região de fosforilação por *Erk* (1,25µg/µl). *hSmad1-GM*, Plasmídio que contem o gene *Smad1* com a mutação na região de fosforilação por *Gsk3* (1µg/µl) (Fuentealba, et al., 2007) e *Dkk1-RCAS* (1.1µg/µl).

3.3.2- Ablação da borda neural anterior *in ovo*

Embriões no estágio de 5ss (i.e., HH8) foram operados com auxílio de um microscópio estereoscópico. Baseado na cartografia proposta por (Couly and Le Douarin, 1985; Couly and Le Douarin, 1987; Shimamura and Rubenstein 1997) a BNA foi retirada com auxílio de um estilete de vidro preparado manualmente (**Figura 10 – E-F**). A noção de BNA é proveniente da demonstração que a o sítio de expressão de *Fgf8* na BNA é a responsável por dar o senso estrutural no desenvolvimento do telencéfalo (Shimamura et al., 1997; Shimamura and Rubenstein 1997). Em outra estratégia experimental utilizando embriões no estágio de 5ss, as células da CNC foram eletroporadas com diferentes plasmídios que codificam a *Smad1* humana (*hSmad1-P*, *hSmad1-MM* e *hSmad1-GM*), em seguida estes embriões sofreram a ablação da BNA (**Figura 10 – G-H**). Estes embriões foram analisados por hibridização *in situ* 24 horas após a manipulação, no estágio de 26 somitos.

3.3.3 - Adição de esferas de heparina acrílica embebidas em *Fgf8* recombinante *in ovo*

Após a eletroporação do RNAi de *Smad1* (*dsSmad1*) para o bloqueio da síntese de *Smad1* nas células da CNC no estágio de 4 somitos. Foram preparadas esferas de heparina acrílica (Sigma), expostas a proteína *Fgf8* recombinante (R&D systems) a uma concentração de 0.125 µg/µl durante toda a noite a uma temperatura de 4°C. As esferas embebidas em *Fgf8* recombinante foram postas em contato com a BNA (adicionadas bilateralmente, as esferas possuem aproximadamente 50µm de diâmetro), esta concentração de *Fgf8* foi baseada em experimentos anteriores, onde foi capaz de

restabelecer o desenvolvimento craniofacial após a retirada das células da CNC (Creuzet et al., 2004) (**Figura 10 - I**). Estes embriões foram analisados por hibridização *in situ* 24 horas após a manipulação.

3.3.4 - Injeção *in ovo* da proteína Cerberus recombinante na zona de migração das células da crista neural cranial

Primeiramente foi realizado nestes embriões o bloqueio da expressão de *Smad1* nas células da CNC pela eletroporação do *dsSmad1* no estágio de 4 somitos. Após 9 horas do bloqueio de *Smad1* (Embriões no estágio de 12 somitos), nós injetamos a proteína *Cerberus* (R&D Systems) na concentração de 0.1 µg/µl na zona de migração das células da CNC (**Figura 10 – J-K**). Estes embriões foram analisados por hibridização *in situ* 24 horas após a manipulação.

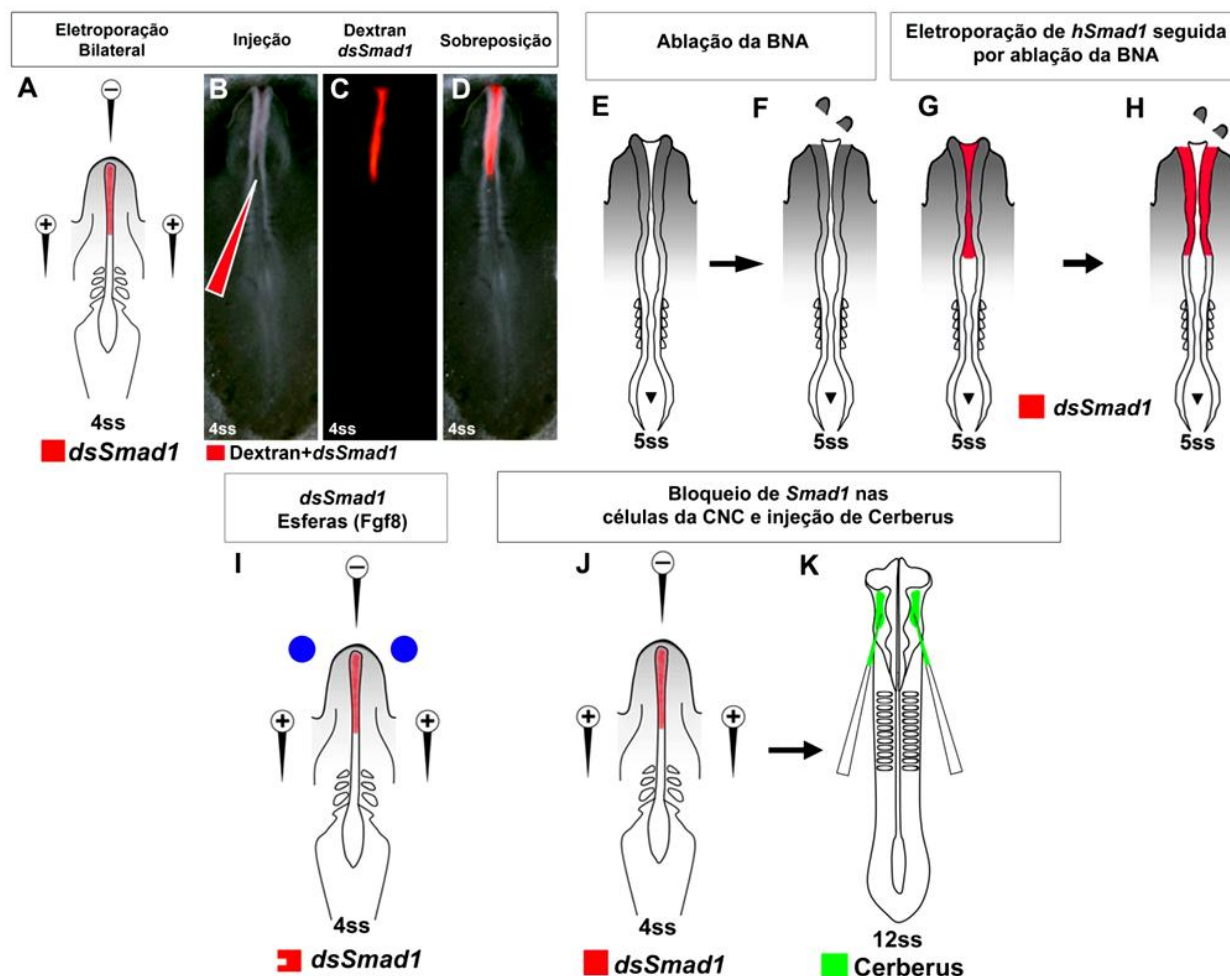


Figura 10 - Representação esquemática das micro-manipulações *in ovo*. (A-D) Eletroporação do RNA de interferência para *Smad1* nas células da CNC no estágio de 4 somitos. A eletroporação bilateral é representada pelo eletrodo negativo que está situado na porção anterior do embrião e os eletrodos positivos situados na lateral. As distâncias entre os eletrodos são de 5 mm entre o eletrodo negativo e os eletrodos positivos, que estão a 3 mm de distância da lateral do embrião a ser eletroporado. Os eletrodos positivos são dispostos em um eixo de 45 graus acima do eletrodo negativo. No momento da eletroporação injetamos a solução contendo o RNA interferência para *Smad1* com auxílio de uma micropipeta. (E-F) Ablação cirúrgica da BNA em embriões no estágio de 5 somitos. (G-H) Eletroporação das células da CNC com o plasmídeo *hSmad1*, seguida pela ablação da BNA. (I) Bloqueio da expressão de *Smad1* nas células da CNC por eletroporação e adição de esferas de heparina acrílica (Esferas azuis) contendo a proteína *Fgf8* recombinante (0.125 µg/µl). (J) Representação do bloqueio da expressão de *Smad1* nas células da CNC no estágio de 4 somitos, (K) seguida pela injeção da proteína Cerberus na zona de migração das células da CNC no estágio de 10-11 somitos. Para a visualização e controle da área de injeção adicionamos um marcador fluorescente Rodamina Dextran a uma concentração de 0.01%.

3.4 – Imunocitoquímica e hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* foi realizada seguindo o protocolo descrito por Henrique et al., 1995 e Creuzet et al., 2006. Os plasmídios utilizados foram: *Bmp4* (Francis et al., 1994), *Cerberus* (Garcez et al., não publicado), *Fgf8* (Crossley et al., 1996), *Foxa2* (Chapman et al., 2002), *Foxg1* (Li and Vogt, 1993), *Gremlin* (Bardot et al., 2001), *Noggin* (Connolly et al., 1996), *Otx2* (Boncinelli et al., 1993), *Pax6* (Walther and Gruss, 1991), *Sfrp1*, *Sfrp2* (Terry et al., 2000), *Shh* (Riddle et al., 1993), *Six3* (Storm et al., 2006), *Smad1*, *Smad5* (Gont and Lough, 2000), *Wnt1*, *Wnt3a* (Hollyday et al., 1995), *Wnt8b* (Garcia-lopez et al., 2004). Para a visualização de células migratórias da CNC utilizamos um sobrenadante produzido por um hibridoma, conhecido como células *HNK-1* de origem murina que sintetiza e libera o anticorpo (IgG1), que por sua vez reconhece uma glicoproteína presente na membrana das células da CN (Developmental Studies Hybridoma Bank). Utilizando o meio condicionado proveniente de células *HNK-1*, incubamos os embriões por 48 horas a uma temperatura de 4°C sobre agitação leve. Em seguida o anticorpo *HNK-1* é reconhecido por um anticorpo secundário a uma diluição de 1:100 [GAM-IgG-FITC (Invitrogen)]. Para a detecção de Phospho-Smad1 foi utilizado anticorpo 1:250 (Santa Cruz Biotechnology). Em embriões, Phospho-Smad1 foi incubado por 48 horas a uma temperatura de 4°C. Para imunohistoquímica sobre cortes feitos em parafina de 7µm foi utilizado o anticorpo contra phospho-Smad1 a uma diluição de 1:250, durante toda a noite a 4°C (Creuzet et al., 2004). A visualização e fotos foram realizadas em um Microscópio Estereoscópio Leica, MZFLIII, munido de um sistema de captura Qimaging (Canadá).

3.5 - RT-PCR e construção das sondas *Dkk1*, *Dkk2* e *Dkk3*.

As amostras foram coletadas em PBS gelado e em seguida transferidos em um tubo contendo Trizol (Gibco - BRL). Para a separação do RNAm foi de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para as reações da transcriptase reversa (RT), bem como da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram seguidas as indicações do fabricante promega (Matermix-promega) e com os primers da invitrogen, **tabela 1**. A clonagem de *Dkk1* foi feita a partir do produto de PCR obtido pelos “Primers” citado na **tabela 1**. O PCR para a clonagem de *Dkk1*, *Dkk2* e *Dkk3* foi realizado utilizando a enzima de síntese Pfu (Promega). A clonagem foi feita seguindo as instruções do fabricante Invitrogen Kit – TOPO TA clonig kit Dual Promoter (pCRII-TOPO Vector - Invitrogen). O sequenciamento foi realizado pela GATC Biotech - Alemanha.

Primers utilizados para amplificação por RT-PCR

Gene	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Sequência (5'-3')	
Smad1	667	60°C	Sense	- ccgaactgtcaacagctgaa
			Antisense	- ctcttccactccctcttcc
Smad7	729	60°C	Sense	- gtgctacaccaggcagttca
			Antisense	- tatgtcacatcccagctcca
Noggin	100	60°C	Sense	- agctgctgcaggaagctgcag
			Antisense	- acgtaccggggccaaaagcg
Fgf8	599	60°C	Sense	- ccctgctctcgtcttccag
			Antisense	- ctctgctggtgaaggggta
Foxg1	100	60°C	Sense	- ctccgtgaacctcttggcgg
			Antisense	- ggccctggcgtcatcgaag
Otx2	100	60°C	Sense	- accaaaccgcctcctggaagt
			Antisense	- cccacgggccttcacaaaacct
Foxa2	100	60°C	Sense	- ccctgctggctccaggtggt
			Antisense	- aaggcaaaccgaggggaccg
Dkk1	100	60°C	Sense	- gcacacttgccagcggcact
			Antisense	- ctcccacgagcggggctaga
Dkk2	577	60°C	Sense	- aggtgatccctgcctgcggt
			Antisense	- agcaggcacagccattgtggaa
Dkk3	643	60°C	Sense	- gcgctgatggaggacacgca
			Antisense	- tgcacatgggcagcgtcta
Sfrp1	100	60°C	Sense	- caggcacggcaggttgaca
			Antisense	- gtcctgcctgctccgtctgc
Sfrp2	100	60°C	Sense	- gttcgaccgcccggctcttc
			Antisense	- atgcctcggcacagcagcat
Gapdh	345	60°C	Sense	- ggcaactgtcaaggctgagaa
			Antisense	- aagaccctccacaatgccaa

Tabela 1 - “Primers” utilizados para amplificação com RT-PCR.

3.6 – Histologia

Para a realização da análise histológica os embriões foram fixados com uma mistura de 60% de etanol Absoluto, 30% de formaldeído 37% (MWR Pro-lab) e 10% de ácido acético 100% (AnaLar normapur) por um período de 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram desidratados com etanol 70%, 80%, 90%, 100% (MWR Pro-lab). A partir deste momento os embriões foram passados para tolueno, dois

banhos de 12 horas e passam para a parafina (Sigma) líquida a uma temperatura de 57°C. Os embriões são emblocados em parafina e então cortados a uma espessura de 7µm. Os cortes são deixados na estufa a 37°C por 24 horas para secar. Os cortes sobre as lâminas são então passados em dois banhos de tolueno (AnaLar normapur) por 10 min, e seguem a hidratação com etanol 100%, 90% e 70% por 10 minutos em cada um. As lâminas passam para H₂O MilliQ por 2 minutos e então os cortes são conduzidos a coloração com crezil violeta 0.1% (Merk) por 15 min. Para a montagem destas lâminas, agora coradas, é feito o caminho inverso com a passagem por H₂O, Etanol 70%, 90%, 100% e tolueno, 2 minutos em cada um dos banhos. Montagem com Entellan (Merk) (Creuzet et al.,2004).

3.7 – Análise estatística

A análise morfométrica foi realizada em embriões E4 através da medida da distância entre o centro da vesícula óptica até o topo das vesículas cefálicas (telencefalo, diencefalo e mesencefalo) nos embriões controle e nos eletroporados com *dsSmad1* e *dsSmad1/hSmad1*. Os dados obtidos nessas medidas foram analisados pelo teste estatístico ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (www.graphpad.com). *** igual $P < 0.0001$ e * igual $P < 0.0125$.

4 – RESULTADOS / RESULTS

4.1 – Controle do desenvolvimento do prosencéfalo e mesencéfalo pela crista neural cefálica: regulação de *Foxg1* pelas vias de sinalização Bmp e Wnt

4.1 – The cephalic neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating *Foxg1* activity through Bmp and Wnt modulators

Diego P. Aguiar, Nicole M. Le Douarin and Sophie Creuzet

Institut de Neurobiologie, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

The transcription factor *Foxg1* is essential for the development and specification of the telencephalon. Mutations for *Foxg1* are causally linked to microcephaly and mental retardation in Atypical Rett and 14q12 microdeletion syndromes. Recent findings show that, early in development, cephalic neural crest (CNC) cells control morphogenetic activities of brain organizers and stimulate the growth of prosencephalic alar plate. To understand how CNC conveys its trophic effect on the telencephalon, we have silenced the gene encoding for *Smad1*, a transcription factor expressed in the CNC cells, which transduces diverse morphogenetic pathways. *Smad1* silencing results in microcephaly and partial holoprosencephaly, which early coincide with the loss of *Foxg1* in the telencephalon. Rescue experiments show that CNC cells can positively regulate *Foxg1* expression independently of *Fgf8* activity in the prosencephalic organizer. Furthermore, the depletion of *Foxg1* activity in the telencephalon alters *Otx2* and *Foxa2* expression in the thalamus and tectum. We have identified the mediators produced by the CNC that controls *Foxg1* activity and showed that Bmp and Wnt antagonists, *Noggin*, *Gremlin* and *Dkk1* initiate the specification of the telencephalon. Additionally, the molecular patterning of the telencephalic and di/mesencephalic compartments requires the activity of *Sfrp1* and *Sfrp2*, and *Cerberus*, respectively. Altogether, we show that CNC cells controls brain patterning by regulating *Foxg1*

expression through a network of morphogenetic modulators controlled by *Smad1* activity.

Introduction

The telencephalon is a site of highly complex cognitive capabilities, emotions and thought in Humans, and represents the most evolutionary recent part of the central nervous system (CNS). Its development, which has accompanied the emergence of Vertebrates during chordate evolution, is a salient trait of Craniates' phylum, and can be therefore regarded as a Vertebrate synapomorphy. Cell tracing studies has unraveled the embryonic origin of this unique structure and showed that the telencephalon, which is destined to form the rostralmost part of the CNS, is exclusively derived from the prosencephalic alar plate (Couly et al. 1985; 1987). At neurula stage, its anlage lies caudally to the pituitary and flanks the diencephalic and retinal primordia (Couly et al., 1985; 1987; Cobos et al, 2003). But, soon after the fusion of the neural plate borders, the cephalic neural tube closes and the telencephalic neuroepithelium grows as paired vesicles, which expand rostrally over the adenohypophysis (for a review, Le Douarin and Kalcheim, 1999, and references therein). Therefore, from a dynamic standpoint, the morphogenesis of telencephalic development, at the early steps of neurogenesis, essentially relies on the dorsalization of its neuroepithelium.

Investigations directed toward understanding its developmental molecular patterning have pointed to the leading role played by discrete signaling centers referred to as "secondary brain organizers" for brain regionlization. These territories are spatially distributed within the cephalic neuroepithelium. Anteriorly, the anterior neural ridge

(ANR) has been identified as “the prosencephalic organizer” which is a potent source of Fgf8 signal (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al; 1998). Along the dorsal and ventral midline, two other distinct brain-organizing centers required for forebrain development massively produce secreted Wnt and Shh molecules, respectively (McMahon and Bradley, 1990; Chiang et al., 2002). Collectively, the diffusible factors emanating from these territories generate a matrix of combinatorial morphogenetic cues which govern planar patterning induction and impart a certain degree of molecular regionalization to the anterior cephalic neuroepithelium (Echevarria et al, 2003; Hoch et al., 2009; Viera et al., 2010). However, the morphogenetic activity of the secondary brain organizers is also tempered by the environmental cues. For instance, the Bmp signaling produced by the ectoderm, when imbalanced, generates telencephalic anomalies, which resemble those of Fgf8-hypomorphic embryos (Ohkubo et al., 2002; Storm et al., 2006). Therefore, the proper molecular patterning of the brain relies on the subtle coordination of the morphogenetic actions of these molecules.

Recent embryological studies have provided evidences that the mesenchymal environment also conveys critical patterning informations to the cephalic neuroepithelium (for a review, Hoch et al., 2009). In this regard, it is important to consider that the telencephalon differs from the rest of the CNS, by the origin of the mesenchymal derivatives, which contribute its ontogenesis and homeostasis. It early benefits from the development of particular vasculature, meninges and skeletal protection which collectively share the common feature of being derived from the cephalic neural crest (CNC; Le Lievre and Le Douarin, 1975; Etchevers et al., 1999;

2001). By contrast, for more caudal CNS components (including the optic tectum, the cerebellum and the spinal chord) these structures are of mesoderm origin (Etchevers et al., 1999; 2001). The CNC arises from the neural plate borders and develops concomitantly to the formation of the CNS; it becomes demarcated from the neural primordium as it engages an epithelio-mesenchymal transition and delaminates (for reviews, see Le Douarin, 1982; Le Douarin and Kalcheim, 1999). The CNC cells that emigrate from the posterior diencephalon down to the second rhombomere (r2) provides the developing head with a wealth of mesenchymal derivatives including pericytes and musculo-connective cells which line the endothelium of blood vessels, leptomeninges, which include pia and arachnoid mater, as well as, chondroblasts and osteoblasts, which together build up the craniofacial structures; this cell population has been coined FSNC (for Facial Skeletogenic NC). So, unlike the cervical and truncal CNS components, the forebrain strictly depends on the FSNC-derived vascular circuitry, meningeal and skeletal protection to develop.

Notable is the fact that the expansion of forebrain and the emergence of the NC population were two coincident events that have developed at the dawn of Vertebrate evolution. It has been proposed that the emergence of the NC was responsible for the formation of a "New Head" characterized by the spectacular development of the forebrain and associated sense organs (Gans and Northcutt, 1983). Recent experimental data have strengthened this contention and shown that, during neural development, the NC behaves like a brain organizer itself (Creuzet 2009a; 2009b) and, therefore, could have promoted the elaboration a "New Brain", during Vertebrate

evolution (for review see, Creuzet 2009b; Le Douarin et al., 2012). These data have pointed out the requirement of a NC-dependent signaling crucial for forebrain development. The absence of FSNC prevented the formation of facial structures and also resulted in anencephaly (Creuzet et al., 2004). Brain defects generated by the loss of FSNC coincide with the mis-patterning of genes that are normally activated in the fore- and midbrain. Accordingly, long-term structural defects in the development of the telencephalic vesicles ensue together with agenesis of the thalamic and pre-tectal nuclei (Creuzet et al., 2006). Much of the defects generated in absence of the FSNC stem from perturbations in the morphogenetic activities of secondary brain organizers: NC ablation is promptly followed by the loss of *Fgf8* expression in the ANR, and subsequently, by the extinction of *Wnt* activity along the dorsal midline, and the expansion of *Shh*, ventro-laterally (Creuzet et al., 2006). We could demonstrate that the migrating FSNC cells, which produce *Bmp*-antagonists, promote *Fgf8* activity in the ANR: as they migrate along the cephalic vesicles, they shield the brain from the detrimental effects of *Bmps* secreted by the neighboring tissues (Creuzet, 2009a). However, to a large extent, the repertoire of CNC molecules required for brain patterning remain to be identified.

Here, we have further explored the role of the CNC in the patterning of the anterior brain and focused our interest on *Smad1* molecule, which is early expressed in CNC cells. *Smad1* is a potent transducer of *Bmp* pathway, but its action is also modulated by the activity of *Fgf* and *Wnt* signaling. Therefore, *Smad1* molecule acts like a platform where multiple signaling converge and are integrated; its role in vertebrate

ontogenesis as been documented during gastrulation and neural induction (Gont and Lough, 2000; Fuentealba et al, 2008), but remains elusive in head and brain development. Here, we show that *Smad1* silencing in FSNC down-regulates the morphogenetic activities of secondary brain organizers. It totally hampers *Foxg1* activity in the telencephalon and results in severe microcephaly. At di- and mesencephalic levels, *Smad1* silencing is detrimental to *Otx2* expression, dorsally, and triggers a concomitant expansion of *Foxa2* ventro-laterally. We show that the defects generated by *Smad1* inactivation on the di- and mesencephalon, are primarily attributable to the loss of *Foxg1* in the telencephalon. By searching for molecules which could mediate the regulatory role played the CNC on *Foxg1* expression, we have identified a cascade of signaling modulators of *Bmp* and *Wnt* pathways, which involves *Gremlin*, *Noggin*, *Dkk1*, *Cerberus* and *Sfrp1* and *Sfrp2* in the developing head, and analyzed their epistatic relationships. Altogether, these data show how the patterning role of the anterior NC in the fore- and midbrain development is exerted.

Results

***Smad1* expression in cephalic neural crest cells**

To study the influence of *Smad1* in CNC cells on head development, *Smad1* gene expression patterning was analyzed by whole-mount *in situ* hybridization in chick embryos from neurula stage onward. In early neurula (2 somite stage; ss), *Smad1* transcripts were detected at the margin of the neural plate corresponding to the presumptive diencephalon and mesencephalic CNC, and to a lesser extent, in the

cephalic superficial ectoderm (Supplementary Fig. 1A). By contrast, the ventro-medial part of the neural plate was devoid of *Smad1* gene expression. While the lateral ridges of the neural plate progressively raised and folded before neural tube closure. *Smad1* expression in the neural fold gained in intensity in the neural fold and was extended down to the anterior rhombencephalic at 3ss, and further down to the level of r6 at 5ss. Shortly after neural tube closure at 7ss (i.e., 30hrs, Supplementary Fig. 1A), *Smad1* expression was rapidly switched off in the CNC cells that have emigrated from the cephalic neural fold, while in the more caudal levels, where the neural plate was still open, the accumulation of *Smad1* transcripts was intense at the neural plate border (Supplementary Fig. 1 A). Later on, in the developing head, *Smad1* expression was evidenced in the CNC-derived mesenchymal cells that have colonized in naso-frontal and maxilla-mandibular buds at 26ss (Supplementary Fig. 1B). At E4, *Smad1* transcripts were accumulated in the naso-frontal and maxilla-mandibular process, as well as in the second branchial arch (BA2). *Smad1* expression was also strongly detected in the telencephalon, and to a lesser extent, in the thalamus, mesencephalon and anterior rhombencephalon (Supplementary Fig. 1C-D).

Morphological defects resulting from Smad1 silencing in CNC cells

In order to decipher the role of the *Smad1* expression in CNC cells in brain development, double-stranded RNA molecules designed against chick *Smad1* (*dsSmad1*) were bilaterally electroporated into the CNC cells at 4ss, while *Smad1* expression is maximal in the cephalic neural fold. The efficacy of *Smad1* silencing was attested by hybridization analysis: ninety minutes after electroporation (i.e 5ss), *Smad1*

expression was abolished in FSNC cells (Supplementary Fig. 1. E-F), but the expression of other *Smad* genes, such a *Smad5*, was left unperturbed (Supplementary Fig. 1G-H).

The morphological changes resulting from *dsSmad1* silencing were observed at 26ss. When compared to the morphology of control embryos, repression of *Smad1* activity in CNC cells caused severe fore- and midbrain malformations (n=76). The development of cephalic vesicles was atrophied and the prosencephalic subdivision into tel- and diencephalon was no longer visible (Fig. 1A,B; arrowheads). At E4 (n=14), the head morphogenesis in experimental embryos was strongly affected by the severe telencephalic atrophy: the development of the nasofrontal and mandibular processes was severely reduced (Fig. 1C-D). The telencephalic territory in *dsSmad1*-electroporated embryos only represented 40% of the normal telencephalon (Fig. 1H). The telencephalic territory displayed a partial holoprosencephaly (Fig. 1C-F; arrowhead; Supplementary Fig. 2A,B). In addition, the optic vesicles were also hypoplastic in *dsSmad1*-electroporated embryos.

To examine the long-term defects generated by *Smad1* loss-of-function in CNC cells on brain development, structural staining of the cephalic neuroepithelium was performed on coronal sections at E8 (Fig. 1. H,I). The development of the telencephalic hemispheres exhibited profound disorganization: the lateral and third ventricles were collapsed and the choroid plexuses were abnormal (Fig. 1J,K; arrowhead). The septal region was atrophied, and the boundaries between the dorsal, lateral and ventral parts of pallium were indistinguishable (Fig. 1L,M; asterisks). Examination of sagittal sections

revealed that the ventro-lateral part of the pre-otic brain (down to the level of the anterior rhombencephalon) was hypertrophied in *dsSmad1* embryos when compared to control embryos (Fig. 2N,O; asterisk). In addition, the olfactory bulbs, the olfactory nerves were missing (Fig. 1P,Q) and the choroid plexus was reduced in *dsSmad1* embryos (Supplementary Fig. 2C,D). Altogether, these observations showed that repressing *Smad1* activity in CNC cells had adverse effects on brain development.

In order to ascertain that the morphological defects were specifically due to *Smad1* repression, we tried to rescue cephalic development by co-electroporating *dsSmad1* with a construct driving the expression of a wild-type form of human *Smad1* (*hSmad1*). We first tested the innocuity of the *hSmad1* construct on cephalic development by transfecting this plasmid alone, according to the same paradigm: *hSmad1* did not entail any alteration of head morphogenesis at 26ss (*dsSmad1/hSmad1*; n=22). In a next step, *hSmad1* construct was electroporated in conjunction with *dsSmad1* in CNC at 4ss (n=42). Twenty-four hours post-transfection, *dsSmad1/hSmad1* embryos exhibited a significant restoration of their cephalic development when compared to *dsSmad1*-electroporated embryos. The growth of the pre-otic brain tended to normalize in this series (Supplementary Fig. 2E-H; Fig. 1G), showing that supplementation with a heterospecific *Smad1* molecule was sufficient to overcome defects resulting from *Smad1* silencing.

FSNC cell migration, proliferation and death

It has been previously shown that the migrating NC cells are essential for brain development. In order to look at the migration route of the *Smad1*-depleted FSNC cells, a pCAGGS-GFP construct was co-electroporated with *dsSmad1*. The expression of GFP showed that CNC cells normally colonized the nasofrontal and maxillo-mandibular processes at 26ss (Supplementary Fig. 2I-L). This observation was confirmed by HNK-1 mAb immunolabeling of NC cells (Fig. 2A-B'). In the same way, the cell proliferation was not significantly perturbed in silenced and rescued embryos at 26ss (Fig. 2A",B" - arrowhead). By contrast, the cell death was augmented in the developing head of *Smad1*-depleted embryos, but similar to control in *dsSmad1/hSmad1*-co-electroporated embryos (Fig. 2D-F).

Molecular changes in brain development resulting from Smad1 silencing

In our experiments, perturbations of brain development in *dsSmad1*-depleted embryos were first evidenced at 26ss. In order to unravel the molecular mechanisms involved in the cephalic hypoplasia, the expression of transcription factors that are involved in brain patterning were analyzed in control, *dsSmad1*-electroporated, embryos at this stage. *Foxg1*, which is the earliest marker of telencephalic vesicles (Chapman et al., 2002; Xuan et al., 1995), was strongly expressed in control embryos at 26ss (Fig. 2G). Knocking-down *Smad1* abrogated its expression (Fig. 2H). By contrast, when *dsSmad1* was electroporation targeted the ANR, no defects were observed: *Foxg1* expression was similar to controls (Supplementary Fig. 2M,N).

Six3, which is strongly expressed along the antero-ventral midline of the telencephalon in normal embryos (Geng et al., 2008), were not perturbed by the loss-of-

function of *Smad1* in CNC cells (Supplementary Fig. 3A-C). *Otx2* expression, which early characterizes the anterior neural plate in neurula (Plouhinec et al., 2005), is normally detected in the telencephalon, and in the alar-plate of the di- and mesencephalon. In absence of *Smad1* activity in CNC cells, *Otx2* domain expression was reduced and limited at the dorsal midline of the di- and mesencephalon. Strikingly, the telencephalic vesicles of *Smad1*-silenced embryos were devoid of *Otx2* expression (Fig. 2J,K). These observations accounted for a reduction of dorsal cephalic cerebral development. We then, looked at the expression of a marker of the di- and mesencephalon basal plate, *Foxa2* (Ruiz i Altaba et al., 1995) (Fig. 2M). In *dsSmad1*-electroporated embryos, *Foxa2* expression was considerably expanded dorsally (Fig. 2N), and also up regulated in the foregut endoderm. Apart from brain defects, embryos also exhibited optic dysmorphogenesis. We have looked at the expression of *Pax6* (as a marker of the retinal primordium) which transcripts are accumulated in the optical vesicles and in the epithalamus. In absence of *Smad1*, the hypoplasia of developing eyes coincided with the severe reduction of *Pax6* (Supplementary Fig. 3D-F').

As the co-electroporation of *dsSmad1* plus *hSmad1* in CNC cells ended up with the complete rescue of the cephalic morphogenesis, we analyzed the regulation of these transcription factors activities in this series. The restoration of *Smad1* activity with *hSmad1*-construct resulted in the normalization of the expression pattern for all the genes considered (Fig. 2I,L,O). These observations showed that, *Foxg1* expression in the telencephalon, *Otx2* in the di- and mesencephalon and *Foxa2* in cephalic basal plate were regulated by CNC cells through *Smad1* activity.

***Foxg1* loss-of-function reproduces *Smad1* silencing in CNC**

The experiments showed that down-regulating *Smad1* activity in CNC cells was sufficient to turn off *Foxg1* activity. More caudally in the di- and mesencephalon, *Smad1* loss-of-function also resulted in a dramatic shift of *Otx2* and *Foxa2*: *Otx2* was down regulated, while *Foxa2* was expanded dorsally. The mutual opposition of these two genes has been previously documented (Nakano et al., 2000) and accounted a balance between ‘dorsalizing’ versus ‘ventralizing’ process of the pre-otic neuroepithelium (Ang et al., 1996). Here, the misregulation of *Smad1* in CNC cells turned out to favor *Foxa2* expansion and *Otx2* reduction: this condition ended up with a potent ventralization of the di- and mesencephalic territory.

The question was then raised as to whether the molecular changes borne on *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* expression were reciprocally linked. In order to see if the loss of *Foxg1* has an impact on *Otx2* and *Foxa2*, *Foxg1* silencing was performed at the expense of the entire telencephalic neuroepithelium: dsRNA designed against *Foxg1* (*dsFoxg1*) were bilaterally electroporated in the telencephalon at 5ss, leaving the CNC cells unperturbed (Fig. 3A). At 26ss, hybridization for *Foxg1* showed the total repression of its activity in the prosencephalon (Fig. 3D,E). As a consequence, *Otx2* expression was limited to the roof-plate (Fig. 3H,I; Fig. 2). In parallel, *Foxa2* expression was expanded in the lateral aspects of the di- and mesencephalon. So, repressing *Foxg1* activity in the telencephalon interfered with the patterning of the more caudal structures, the thalamus and the optic tectum through the regulation of *Otx2* and *Foxa2*. *Foxg1* silencing recapitulated the molecular changes resulting from *Smad1* silencing in CNC

cells (Fig. 3L,M). These observations indicated that in normal development, the regulation of *Foxg1* activity is central to the molecular control of the pre-otic brain patterning.

Morphogenetic changes triggered by Smad1-signaling

The perturbations in the expression of transcriptions factors suggested that crucial changes in the morphogenetic activity of “secondary brain organizers” (Vieira et al., 2010) had occurred in absence of *Smad1* activity in CNC cells. In the ANR, the production of *Fgf8* has been shown to play a leading role in early telencephalic patterning (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Shanmugalingam et al., 2000). At 26ss, in normal embryos *Fgf8* domain of expression is maximal. In *dsSmad1*-electroporated embryos, a significant reduction of its domain was observed, a condition reminiscent of that observed in NC-depleted embryos (Creuzet et al., 2006; Fig. 4. A,B). In the basal plate, *Shh* is the major signaling to be produced and has a deep impact on brain patterning (Viera and Martinez, 2006). In *dsSmad1* experimental series, *Shh* expression was not significantly modulated, but reduced according the global prosencephalic hypoplasia (Supplementary Fig. 3G-I).

At the dorsal midline, *Wnts* signaling is essential for fore- and midbrain patterning (McMahon and Bradley, 1990; Erter et al., 2001; Braun et al., 2003). *Wnt1*, which is expressed at the dorsal midline and by a strand of cells abutting to the isthmus, was strongly reduced dorsally in *dsSmad1*-electroporated embryos (Supplementary Fig. 4A,B; arrowhead). *Wnt3a*, which has an overlapping domain of expression with *Wnt1* at the midline, was totally absent in *dsSmad1*-electroporated embryos (Supplementary Fig.

4D,E; arrowhead). *Wnt8b*, which expression dorsally straddles the anterior diencephalon and posterior telencephalon, was narrowed in the telencephalon and to a lesser in the thalamus (Supplementary Fig. 4G,H).

Dissecting the interactions involved in Foxg1 expression

The current understanding of the prosencephalon development posits a direct planar role of *Fgf8* produced by the ANR in the induction of *Foxg1* expression to the entire telencephalon (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Anderson et al., 2002; Hoch et al., 2009). We tested whether supplying *Fgf8* could rescue *Foxg1* expression in *dsSmad1*-electroporated embryos. Beads soaked with Fgf8 recombinant protein (0.125µg/µl) were implanted in contact to the ANR in a 4ss embryo that has been subjected to *dsSmad1* silencing (Fig. 3B). This concentration has been previously shown to efficiently restore cephalic development in CNC-ablated embryos (Creuzet et al., 2006). Following supplementation with Fgf8, no restoration of telencephalic development occurred and the expression of *Foxg1* was totally absent as in *dsSmad1*-silenced embryos (Fig. 3D,F; compare with Fig. 2). Similarly, *Otx2* domain of expression did not exhibit any restoration and remained similar to that in *dsSmad1*-electroporated embryos (Fig. 3H,J; compare with Fig. 2), *Foxa2* did not tend to normalize with Fgf8 supply (Supplementary Fig. 3L-N – see Fig. 2). These observations suggested that *Foxg1* activity in the telencephalon does not solely depend on the production of Fgf8 in ANR, but relies on a more complex mechanism for its induction and expansion.

Stimulating *Smad1* activity in CNC cells can rescue *Foxg1* expression in the telencephalon

In a first attempt to unravel the mechanisms responsible for the regulation of *Foxg1* expression, we performed the surgical ablation of the ANR at 5ss, before CNC cells start to migrate (Fig. 3C,C'). At 26ss, *Foxg1* expression was maximal in the telencephalon of control embryos but undetectable in ablated embryos (Fig. 3D,G). In these specimens, the morphology of the telencephalon was atrophied, and this effect was consistent with the leading role of *Fgf8* in driving the telencephalic development (Shimamura and Rubenstein, 1997). *Otx2* and *Foxa2* expression were also perturbed, displaying the same pattern as *dsSmad1* and *dsFoxg1*-electroporated embryos (Fig. 3H,K,L,O).

In order to see if FSNC cells could regulate *Foxg1* expression independently of the production of *Fgf8* in the ANR, we then challenged to rescue the molecular patterning of the tel-, di- and mesencephalon in ANR-ablated embryos, by constructs driving the expression of mutated forms of *hSmad1* in CNC cells prior to ANR ablation (Fig. 3P). These constructs have been previously designed to bear either a constitutively phosphorylated carboxy-terminal region (*hSmad1*-P), or unphosphorylatable sites in the linker region for Mapk (*hSmad1*-MM) and Gsk3 pathway (*hSmad1*-GM), respectively (Fuentelba et al., 2007). When electroporated in FSNC cells of ANR-ablated embryos, these constructs generated a potent restoration of *Foxg1* activity in the entire telencephalon (Fig. 3D,Q). These results showed that the regulation of

Smad1 activity in CNC cells was essential to establish the domain of *Foxg1* expression in the developing prosencephalon.

Smad1 regulates the activity of Bmp antagonists in CNC cells

We have previously demonstrated that CNC cells exert a critical role on brain development by counteracting *Bmp* activity through the production of *Bmp*-inhibitors (Creuzet, 2009). At 26ss, *Bmp4* expression in normal embryos is present in the superficial naso-frontal ectoderm surrounding the ANR (Fig. 4D). The *dsSmad1* silencing induced an up-regulation of *Bmp4* expression in the retro-ocular (i.e. presumptive maxillary) region (Fig. 4E). In parallel, the expression of *Noggin*, a potent antagonist to Bmp, which is normally present in the FSNC-derived mesenchyme of the naso-frontal and the retro-ocular region, as well as at the dorsal di- and mesencephalic midline (Fig. 4G), was severely down regulated after *Smad1* silencing in the entire head (Fig. 4H). The loss of *Noggin* activity consecutive to *Smad1* silencing was evidenced as early as one hour and half after electroporation (Fig. 4Q,R). The reduction of *Noggin* activity was confirmed by RT-PCR and correlated with the loss of *Foxg1* and the misexpression of *Otx2/Foxa2* (Fig. 4P). In the same way, *Gremlin*, another potent Bmp inhibitor (Merino et al., 1999), was also down regulated at 6ss after *Smad1* silencing (Fig. 4S,T). Taken, together, these observations indicated that *Smad1* expression in CNC was critical for the regulation of Bmp signaling in the developing head from neurula stage up to 26ss.

To test the possible role of Bmp signaling in the regulation of *Foxg1* expression, the activity of *Noggin* and *Gremlin* was simultaneously knocked-down by dsRNA

(*dsNoggin/dsGremlin*) in FSNC at 4ss. The double silencing of these Bmp-antagonists resulted in the loss of *Foxg1* expression, together with the repression of *Otx2* and the misexpression of *Foxa2* (Fig. 5. A,B,E,F,I,J). These experiments revealed that the loss of *Noggin* and *Gremlin* accounted for the molecular changes consecutive to *Smad1*, hence suggesting that the level of *Smad1* expression can control the amount of Bmp antagonists produced by the migratory FSNC cells.

***Dkk1* expression in CNC is subjected to *Smad1* activity**

Another consequence of *Smad1*-silencing in FSNC cells was that up-regulation of *Dkk1* at 26ss, in the entire CNC population colonizing the development head (Fig. 4J-L; Supplementary Fig. 5A-F). This effect was confirmed by RT-PCR analysis performed on pre-otic heads harvested at 26ss (Fig. 3P). By contrast, the level of *Dkk2* and *Dkk3* was left unperturbed after *Smad1* silencing. To understand the functional significance of the increased *Dkk1* activity for brain patterning, a retroviral construct driving the expression of human *Dkk1* (*Dkk1*-RCAS) was transfected to FSNC cells before their emigration. As far as *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* expression was concerned, the up-regulation of *Dkk1* ended up in the same modifications in brain patterning as *Smad1* silencing did (Fig. 5C,G,K; compare with Fig. 2H,K,N).

To explore the epistatic relationship between *Smad1* and *Dkk1*, we then tried to restore brain patterning by forcing the expression of *hSmad1*-P in FSNC cells at 5ss in combination with *Dkk1*-RCAS. When analyzed at 26ss, experimental embryos showed that the expression of *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* were significantly restored (Fig. 5. D, H, L). From these data, we concluded that *Dkk1* expression in the CNC-derived

mesenchyme was regulated by *Smad1* activity. Moreover, our experiments indicate that the adverse effects of the *Smad1*-silencing on brain development were due to the increased expression of *Dkk1* in CNC cells.

Regulation of Cerberus expression is downstream of Smad1 and Dkk1 activities

In *Smad1*-depleted embryos, the activity of *Cerberus*, which is known to interfere with both Bmp and Wnt signaling, was considered at 26ss: its transcripts are normally accumulated in the retro- and peri-ocular region (Supplementary Fig. 5G-I). Consecutively to *Smad1* silencing, *Cerberus* activity was totally switched off in the developing head (Fig. 4K). Similarly, when *Dkk1* gene was over-expressed in FSNC cells, through the electroporation of the retroviral construct, the expression of *Cerberus* totally disappeared from the retro-ocular region (Fig. 6A,B). Together, these experiments indicated that the activity of *Smad1* in FSNC cells impinges on *Dkk1* level of expression, which in turn, interferes with *Cerberus* expression.

To see whether the loss of *Cerberus* activity can have an effect on brain patterning, we tried to rescue the defects generated by *Smad1* silencing on brain development by injecting Cerberus protein. Briefly, embryos that have been subjected to the electroporation of *dsSmad1* molecules at 4ss, were injected with a solution of Cerberus recombinant protein (0.1 µg/µl; R&D Systems) contrasted with Rhodamin Dextran at 12ss: the sub-ectodermal injection was bilaterally performed, in order to deliver the protein in the migration routes of the FSNC cells (Fig. 6C,D).

Enriching the *Smad1*-depleted embryos with Cerberus resulted in a potent rescue of the morphological defects: the development of the pre-otic vesicles was

significantly restored. In parallel, the expression of *Foxg1* tended to normalize (Fig. 6E,F). More caudally, in the di- and mesencephalon, *Otx2* was broadened as in normal development; *Foxa2* expression was ventrally restricted as in control series (Fig. 6G-J).

Reduction of Sfrp1 and Sfrp2 mediate the effects of Smad1 silencing in telencephalic development

In *dsSmad1*-electroporated embryos, two modulators of Wnt signaling, *Sfrp1* and *Sfrp2* were also perturbed. In normal development, these genes were strongly detected at neurula stage. At 5ss, *Sfrp1* expression characterized the diencephalic NC, while *Sfrp2* was expressed in the entire CNC down to the posterior rhombencephalon (Fig. 7A,B). At 26ss, *Sfrp1* was detected in CNC cells that have colonized the naso-frontal bud and in the stomodeal region. Additionally, *Sfrp1* was evidenced in the basal plate of the mesencephalon and anterior rhombencephalon (Fig. 7C). At this stage, *Sfrp2* was also detected in the naso-frontal bud, and along the dorsal aspects of the di-, mes- and rhombencephalic vesicles (Fig. 7D). After *dsSmad1* silencing in CNC cells, dramatic changes occurred in their expression: *Sfrp1* was totally abolished in the head (except for the stomodeum, Fig. 7E). *Sfrp2* was also abrogated anteriorly and dorsally (Fig. 7H). Here again, the restoration of Smad1 activity with *hSmad1* constructs was able to rescue the normal pattern of *Sfrp1* and *Sfrp2* expression (Fig. 7F,I). We then tested whether the modifications in *Sfrps* gene expression resulting from *Smad1* silencing could be due to the up-regulation of *Dkk1*. When the expression of *Dkk1* was forced in CNC cells, *Sfrp1* and *Sfrp2* were down regulated, thus mimicking the defects observed

in *dsSmad1*-electroporated series (Fig. 7G,J; compared with 7E,H). These observations suggested that the control of *Sfrp1* and *Sfrp2* activity was downstream of *Dkk1*.

These results led us to consider the respective roles of these two molecules in the patterning of the brain. dsRNA designed against *Sfrp1* (*dsSfrp1*) and *Sfrp2* (*dsSfrp2*) were electroporated in FSNC cells at 4ss, as previously described. When silenced alone, neither *dsSfrp1* nor *dsSfrp2* entailed any modification on brain development. In contrast, when *Sfrp1* and *Sfrp2* were simultaneously silenced in FSNC cells before their migration (*dsSfrp1* and *dsSfrp2*), strikingly brain defects were observed. In order to confirm these observations, the gene expression was analyzed in this series: the expression of *Otx2* and *Foxa2* was not significantly perturbed, but *Foxg1* activity was totally inhibited (Fig. 7K-P). These experiments indicate that the loss of *Smad1* in CNC cells leads to an over-expression of *Dkk1*, which in turn, impacts on *Sfrp1* and *Sfrp2* activities. Our results suggest that in normal development, the control of Wnt signaling from the CNC cells is required for *Foxg1* expression in the telencephalon, which in turn, controls the activity of *Otx2/Foxa2* in di- and mesencephalon.

Material and Methods

Avian embryos and surgical procedure

Chick embryos were used as a model throughout this study and staged according the number of somite pairs (ss). Depending on the series, experiments were performed either at 4ss for in ovo electroporation, at 5-to 6-somite stage for ANR ablation, at 10ss for Cerberus protein supplementation. The ablation of the ANR was performed either alone, or immediately after CNC electroporation, by using a glass micro-scalpel. The limit of excision was defined according to the fate map of the cephalic neural fold (NF; Couly and Le Douarin, 1985; Couly and Le Douarin, 1987).

***In ovo* electroporation**

The electroporation was used to deliver exogenous nucleic sequences to premigratory CNC cells. The electroporation was achieved using a triple electrode system that was placed on the vitelline membrane: the two cathodes flanking the developing head with a gap of 5 mm, the anode facing the anterior neuropore (Creuzet et al., 2002). Exogenous nucleic sequences were headed for the targeted tissues by a series of five 27V square pulses (T830 BTX, Genetronics, CA). After electroporation, eggs were sealed and incubated at 38°C until reaching the stage required for analysis. Before electroporation, nucleic acids were contrasted with a solution of 0.01% Fast Green FCF (Sigma) to carefully control the site of injection depending on the experimental series.

Nucleic acid preparation

For loss-of-function experiments, sense and antisense strands of RNA were synthesized from the full length cDNA encoding for the targeted gene. After elimination of the cDNA template, strands of RNA were annealed for 5 minutes at 95°C and then purified (Pekarik et al., 2003). According to this protocol, dsRNA designed from the cDNA encoding *Smad1*, *Foxg1*, *Noggin*, *Gremlin*, *Sfrp1* and *Sfrp2* (Bardot et al., 2001; Gont and Lough, 2000; Li and Vogt, 1993; Osorio et al., 2009) were obtained and used

at the following concentrations: *dsSmad1*, 0.33 µg/µl, *dsFoxg1*, 0.4 µg/µl, *dsNoggin*, 0.25 µg/µl, *dsGremlin*, 0.25 µg/µl, *dsSfrp1*, 0.28 µg/µl, and *dsSfrp2*, 0.28 µg/µl. Gain-of-function experiments were carried out by using the following plasmidic and retroviral (Rcas) constructs: pCAGGS-GFP (Momose et al., 1999), *hSmad1* (human *Smad1* wild-type) at 1.1 µg/µl, *hSmad1-P* (*hSmad1* mutated in the carboxyl terminal region, Ser to Glu in order to mimic a phosphorylate state) at 1.25 µg/µl, *hSmad1-MM* (human *Smad1* mutated in the 3 MAPK sites of linker region) at 1.25 µg/µl, *hSmad1-GM* (human *Smad1* mutated in the 4 Gsk3 sites of linker region) at 1.25 µg/µl (Fuentealba et al., 2007) and *Dkk1-RCAS* at 1.1 µg/µl (Chang et al., 2004).

Supplementation with recombinant proteins

Depending on the series, supplementation with recombinant proteins were delivered in *dsSmad1*-electroporated embryos either by injecting a solution or by implanting soaked beads. A solution of Cerberus protein in PBS (0.100 µg/µl; R&D Systems) was bilaterally injected in the migration routes of CNC cells, adjacent to the di- and mesencephalic vesicles. To visualize the site of protein injection, the solution was contrasted with 0.01% Rhodamine Dextran (Sigma). For supplementation with Fgf8, heparin acrylic beads were soaked in a solution of Fgf8 recombinant protein (0.125 µg/µl; [R&D Systems](#)) overnight at 4°C. This concentration has been shown to induce a potent rescue of head and brain development after CNC ablation (Creuzet et al., 2002). Shortly after *dsSmad1* electroporation, Fgf8-soaked beads were bilaterally implanted in contact to the ANR.

In situ hybridization

Whole-mount in situ hybridizations was performed as previously described (Henrique et al., 1995; Creuzet et al., 2006). Gene expression was analyzed in chick embryos using the following probes: *Bmp4* (Francis et al., 1994), *Cerberus* (Dr. Garcez), *Fgf8* (Crossley et al., 1996), *Foxa2* (Chapman et al., 2002), *Foxg1* (Li and Vogt, 1993), *Gremlin* (Bardot et al., 2001), *Noggin* (Connely et al., 1997), *Otx2*

(Boncinelli et al., 1993), *Pax6* (Walther and Gruss, 1991), *Sfrp1*, *Sfrp2* (Terry et al., 2000), *Shh* (Riddle et al., 1993), *Six3* (Storm et al., 2006), *Smad1*, *Smad5* (Gont and Lough, 2000), *Wnt1*, *Wnt3a* (Hollyday et al., 1995), *Wnt8b* (Garcia-lopez et al., 2004).

Immunocytochemistry and cell death detection

For identification of migratory NC cells, we used HNK-1 Ab (Developmental Studies Hybridoma Bank) and GAM-IgM-Alexa488 (1:100; Invitrogen). The phosphorylated form of Smad1 (1:250; Santa Cruz Biotechnology) was evidenced on 7 µm-thick paraffin sections of embryos at 5ss and 10ss, (Creuzet et al., 2004). The major sites of cell death were evidenced on whole-mount embryos using Lysotracker staining (Molecular probes). The embryos were dissected and incubated in a 2.5µM Lysotracker solution for 15 min in RT, prior to fixation in 4% formaldehyde (Schaefer et al., 2004).

Histology

Embryos were fixed in a solution of 60% ethanol, 30% formaldehyde (37%) and 10% acetic acid (100%), for 24 hours. After dehydration in 70%, 90%, 100% ethanol and permeabilization in 100% toluene, embryos were embedded in paraffin. Cresyl violet staining was performed on 7µm-thick sections.

RT-PCR analysis and *Dkk1* probe construction

The RNA of a pre-otic brain of embryos at E2.5 was isolated with Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was constructed by using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and oligo (dT12-18) primer. Amplification was performed from 1 µg cDNA, using specific primer pairs for *Fgf8* (5'-ccctgctcctcgctcttcag-3' and 3'-ctcctgcggttgaaggggta-5'), *Foxg1* (5'-ctccgtgaacctcctggcgg-3' and 3'-ggccctggccgtcatcgaag-5'), *Otx2* (5'-accaaaccgcctcctggaagt-3' and 3'-cccacgggccttcacaaaacct-5'), *Foxa2* (5'-ccctgctggctccaggtggt-3' and 3'-aaggcaaaccgaggggaccg-5'), *Noggin* (5'-agctgctgcaggaagctgcag-3' and 3'-acgtaccggggccaaaagcg-5'), *Dkk1* (5'-gcacacttgccagcggcact-3' and 3'-ctcccacgagcgggggctaga-5'), *Dkk2* (5'-aggatgatccctgcctgcggt-3' and 3'-

agcaggcacagccattgtggaa-5') and *Dkk3* (5'-gcgctgatggaggacacgca-3' and 3'-tgacatgggcagcgctcta-5'). The amplification was achieved through 13 cycles (94° 1 min, 60° 1 min, 72° 1 min). cDNA synthesis was monitored by PCR with *Gapdh*-primers. According to the same paradigm, partial *Dkk1* cDNAs were amplified by RT-PCR from total RNA. The cDNA was cloned in pCRII-TOPO vector (Invitrogen) for subsequent sequencing.

Statistical analysis

Morphometric analysis of brain growth was performed on whole-mount E4 embryos by measuring the distance from the optic stalk (lens) to the top of each cephalic vesicles (telencephalon, thalamus, and optic tectum, respectively) in controls and electroporated embryos. For each set of data, one way ANOVA was used to compare the control, *dsSmad1*-electroporated, and *dsSmad1/hSmad1*-co-transfected embryos. The values obtained for different experimental conditions were analyzed with the GraphPad Prism 4.0 software (www.graphpad.com). The results were plotted in the graphic and the representative differences shown as: *** equal $P < 0.0001$ and * equal $P < 0.0125$.

Discussion

In this work, we have explored the role of cephalic NC in brain development by knocking-down the expression of a signaling transducer, *Smad1*, which complexes with specific DNA binding proteins to regulate gene expression. It belongs to a large family of cytoplasmic mediators which translocation to the nucleus is triggered by the activity of Tgf β signaling. *Smad1* expression which is first evidenced in the CNC, at the neural plate border, declines during NC cell migration, then regains in intensity and persists in the NC-derived mesenchyme of the facial processes and BAs until E5.

In order to investigate molecular mechanisms by which *Smad1* expression in CNC affected the developmental program of the cephalic vesicles, we generated a specific inactivation of this gene in the CNC cells at 4ss, when *Smad1* expression is maximal in this cell population. dsRNA-driven silencing efficiently inhibited *Smad1* activity in CNC in one hour and half following electroporation, and generated conspicuous defects in brain development 24 hours later. Those consist in a microcephaly that encompasses the fore- and midbrain, which was particularly pronounced at telencephalic level: the telencephalon dramatically drops by 40% of the normal size. Hemispheres display a partial holoprosencephaly, the septal region being vestigial, and the choroid plexuses severely atrophied. In addition, the *Smad1*-depleted embryos display a severe microphthalmia.

The morphological defects early coincide with the downregulation of *Fgf8* in the ANR and the complete loss of *Foxg1* expression in the telencephalic anlage. *Foxg1* is an early marker of the telencephalic development, which features the anterior neural plate at gastrula stage in Chordates (Toresson et al., 1998; Chapman et al., 2002). However, the expansion of its expression to the entire telencephalon is specific to Vertebrates. The cerebral defects encountered in *Smad1*-depleted embryos virtually reproduce the anomalies recorded in the *Foxg1* mutants (Tao and Lai, 1992). The effect of ANR in the telencephalic development has been first investigated by microsurgical experiments showing the leading role played by this discrete territory in forebrain specification; these studies assigned the morphogenetic action of what was then referred to as the “prosencephalic organizer” to the production of *Fgf8* at this level

(Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al, 1998; Shanmugalingam et al., 2000). It has been then established that the cooperation between *Fgf8* and *Foxg1* is the main mechanism by which the telencephalon becomes specified from the primary prosencephalon (Rubenstein and Beachy, 1998; Rubenstein et al., 1998). However, in loss of *Smad1* function experiments, the supplementation with Fgf8 recombinant protein had no effect on *Foxg1* expression and telencephalic development. This indicates that the morphogenetic regulation of CNC is crucial to impulse the specification of the rostral prosencephalon by stimulating *Foxg1* expression.

To unravel the involvement of the FSNC in the regulation of *Foxg1*, we performed the ablation of the ANR at 5ss (i.e. before the onset of FSNC cell migration): the predictable loss of *Foxg1* expression ensued. By contrast, when mutated forms of *Smad1* were alternatively transfected into the FSNC cells at the time of ANR ablation, a potent rescue of telencephalic development occurred together with the restoration of *Foxg1* expression.

The molecular changes in the telencephalon were accompanied by perturbations in *Otx2* and *Foxa2* activity in thalamus and tectum. At these levels, the expression pattern of these two genes characterizes the alar and basal plate, respectively. *Otx2* is an important marker of dorsal patterning of the pros- and mesencephalon (Kimura et al, 2001; 2005). Its activity is antagonized by the expression of *Foxa2* in the basal plate of the di and mesencephalon (Weinstein et al., 1994; Nakano et al., 2000). In absence, of FSNC, a conspicuous ventralization of the cephalic neuroepithelium occurs, the domain of *Shh* becoming considerably expanded laterally (Creuzet et al., 2004). In our

experiments, *Smad1* silencing also entails a potent ventralization of the pre-otic brain, as attested by the thickening of the ventral structures at E8. This phenotype early coincides with the lateral expansion of *Foxa2* at the expense of *Otx2* expression, dorsally. Surprisingly, the domain of *Shh* remains unchanged whatever the experimental conditions examined. So, the *Smad1*-depleted CNC decouples the expression of *Foxa2* and *Shh* in the di and mesencephalic floor plate: this experimental condition unmasks the divergent regulation of these two basal markers and shows that CNC plays a critical role in this mechanism.

When compared to the phenotype of *dsSmad1*-depleted embryos, the outcome of cerebral structures in *Foxg1*-depleted embryos was similar, indicating that the molecular changes in *Otx2* and *Foxa2* primarily stem from the downregulation of *Foxg1*. So, our data uncover an unsuspected role of *Foxg1* for the patterning of the thalamus and tectum through the regulation of *Otx2/Foxa2*. These observations indicate that these two genes are subjected to a planar regulation by the telencephalic neuroepithelium. The loss of *Foxg1* function in the telencephalon imbalances *Otx2* and *Foxa2* expression reproducing the effects of *Smad1* silencing in CNC cells.

In our experiments, we show that when *Smad1* was knocked-down in CNC cells, *Noggin* and Gremlin activity is rapidly switched off in this cell population. In the spinal cord, it has been demonstrated that *Smad1* is the transcriptional regulator of Bmp antagonists such as *Noggin* (Akizu et al., 2010). In our experiments, *Smad1* silencing also impinges on Bmp antagonist expression. This condition leads to an imbalanced Bmp signaling, which, in turn, compromises the production of *Fgf8* in the ANR and the

telencephalic development (Okhubo et al., 2002; Creuzet, 2009a). It is known that the level of Fgf8 signaling closely influences *Foxg1* activity in the telencephalon (Storm et al., 2006; Cases et al., 2012). The adverse effects generated by *Smad1* inactivation in CNC cells can be reproduced by the combined loss of *Noggin* and *Gremlin* function in the migratory CNC cells, these molecules being required for the regulation of Fgf8 in the ANR.

Recently, the spectrum of molecules inhibited by the so-called 'Bmp antagonists' was broader than expected. Studies led in *Xenopus* have demonstrated that at least, *Noggin* can directly bind and antagonize Wnt ligands (Bayramov et al., 2011). These observations suggest that interfering with the amount of *Noggin* in *Smad1*-depleted embryos could potentially result in the blockade of Wnt signaling. The loss of *Smad1* in CNC cells leads to an over-expression of *Dkk1*, which in turn, impacts on *Sfrp1* and *Sfrp2* activities. We demonstrate that, the CNC cells in the nasofrontal bud initiate the specification of the telencephalon by regulating *Foxg1* activity through the balanced expression of *Dkk1*, *Sfrp1* and *Sfrp2*. By contrast, in the retro-ocular region, *Dkk1* interferes with the level of *Cerberus*, which itself, when supplemented in *dsSmad1*-depleted embryos, can normalize the balance between *Otx2* and *Foxa2*. The CNC cells can therefore control the specification of the telencephalon by *Foxg1* activity through a bimodal regulation in a spatially restricted manner, which chiefly involves modulators of Wnt signaling.

The cerebral phenotype resulting from *Smad1* silencing in CNC evokes the deficits encountered in septo-ocular dysplasia (de Morsier, 1956). In this syndrome, the

dysmorphies are characterized by microphthalmia and cerebral midline defects, the latter including the agenesis of the septum and/or corpus callosum which together lead cortical malformations and intellectual deficits. This syndrome may be caused by heterozygous mutations of *Otx2* (Ragge et al., 2005). Moreover, recent evidences have been brought on the implication of *Fgf8* mutations in the etiology of holoprosencephaly and septo-ocula dysplasia (McCabe et al., 2011). On the other hand, mutations in *Foxg1* has been causally linked to microcephaly, intellectual deficits, regression of language and manual skills in Atypical Rett and 14q12 microdeletion syndromes. In the latter, cerebral defects are also accompanied by facial dysmorphism (Papa et al., 2008). The overlapping spectrum of cephalic defects encountered in these congenital diseases suggests that convergent mechanisms are responsible for the clinical picture of these syndromes and their related variant forms. However, the ontogenic scenario linking the common defects generated by different mutations remain to be elucidated. Our data concur in building up a network of patterning interactions between the CNC and the developing brain. We show here that the CNC exerts a key role in the control of *Foxg1* activity and, in turn, the focal downregulation of *Foxg1* in the telencephalon impinges on the level of *Otx2* activity in the pros- and mesencephalon. Our data shed a new light on the molecular control of these two transcription factors by the CNC. This study may open new avenues for understanding the etiology of related intellectual deficits in the light of CNC dysfunctions.

Acknowledgements

We thank Drs. Chapman, Kiecker, Lough, Widelitz and Prs. De Robertis, and Monsoro-Burq for providing plasmids. DPA held fellowships from CAPES-College Doctoral Franco-Brésilien, Fondation des Treilles and Institut Necker Paris. This work was supported by the CNRS, and grants from the ANR (ANR-Blan-0153), the ENP (RTRA-ENP-Stem cells) and SETCI (Region Ile-de-France).

References

- Anderson RM, Lawrence AR, Stottmann RW, Bachiller D, Klingensmith J. 2002. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development* **129**: 4975-87.
- Ang SL, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J. 1996. A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**: 243-52.
- Bardot B, Lecoin L, Huillard E, Calothy G, Marx M. 2001. Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech Dev* **101**: 263-5.
- Bayramov AV, Eroshkin FM, Martynova NY, Ermakova GV, Solovieva EA, Zarausky AG. 2011. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development*, **138**: 5345-56.
- Boncinelli E, Gulisano M, Broccoli V. 1993. *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain. *J Neurobiol* **24**: 1356-66.
- Braun MM, Etheridge A, Bernard A, Robertson CP, Roelink H. 2003. Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain. *Development* **130**: 5579-87.
- Cases O, Perea-Gomez A, Aguiar DP, Nykjaer A, Amsellem S, Chandellier J, Umbhauer M, Cereghini S, Madsen M, Collignon J, Verroust P, Riou JF, Creuzet SE, Kozyraki R.

2012. Cubilin is required for Fgf-promoted cell survival in the developing vertebrate head. *Submitted*.

Chang CH, Jiang TX, Lin CM, Burrus LW, Chuong CM, Widelitz R. 2004. Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. *Mech Dev* **121**: 157-71.

Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A. 2002. Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev Biol* **245**: 187-99.

Cobos A, Lima D, Almeida A, Tavares I. 2003. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* **120**: 485-98.

Connolly DJ, Patel K, Cooke J. 1997. Chick noggin is expressed in the organizer and neural plate during axial development, but offers no evidence of involvement in primary axis formation. *Int J Dev Biol.* **41**: 389-396.

Couly GF, Le Douarin NM. 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol.* **110**:422-39.

Couly GF, Le Douarin NM. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol* **120**: 198-214.

Creuzet S, Schuler B, Couly G, Le Douarin NM. 2004. Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4843-7.

Creuzet SE, Martinez S, Le Douarin NM. 2006. The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14033-8.

- Creuzet SE. 2009a. Neural crest contribution to forebrain development. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 751-9.
- Creuzet SE. 2009b. Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15774-9.
- Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**: 127-36.
- Echevarría D, Vieira C, Gimeno L, Martínez S. 2003. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev* **43**: 179-91.
- Erter CE, Wilm TP, Basler N, Wright CV, Solnica-Krezel L. 2001. Wnt8 is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development* **128**: 3571-83.
- Etchevers HC, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. 1999. Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development* **126**: 3533-43.
- Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. 2001. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* **128**: 1059-68.
- Francis PH, Richardson MK, Brickell PM, Tickle C. 1994. Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**: 209-18.
- Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM. 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**: 980-93.
- Gans C, Northcutt RG. 1983. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* **220**: 268-273.

- Garcia-Lopez R, Vieira C, Echevarria D, Martinez S. 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* **268**: 514-30.
- Geng X, Speirs C, Lagutin O, Inbal A, Liu W, Solnica-Krezel L, Jeong Y, Epstein DJ, Oliver G. 2008. Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell* **15**: 236-47.
- Gont L, Lough J. 2000. Differential expression of cSmad1 and cSmad5 in the primitive streak during chick embryo gastrulation. *Anat. Rec.* **260**: 102-5.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**: 231-72.
- Hoch RV, Rubenstein JL, Pleasure S. 2009. Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 378-86.
- Hollyday M, McMahon JA, McMahon AP 1995. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev.* **52**: 9-25.
- Houart C, Westerfield M, Wilson SW. 1998. A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**: 788-92.
- Kimura C, Shen MM, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I. 2001. Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev Biol* **235**: 12-32.
- Kimura J, Suda Y, Kurokawa D, Hossain ZM, Nakamura M, Takahashi M, Hara A, Aizawa S. 2005. Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J Neurosci* **25**: 5097-108.
- Le Douarin N. 1982. The Neural Crest. *Cambridge Univ Press, Cambridge, UK.*
- Le Douarin NM, Couly G, Creuzet SE. 2012. The neural crest is a powerful regulator of pre-otic brain development. *Dev Biol* In press.
- Le Douarin NM, Kalcheim C. 1999. The Neural Crest, 2nd ed. *Cambridge Univ Press, Cambridge, UK.*

- Le Lièvre CS, Le Douarin NM. 1974. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**: 125-54.
- Li J, Vogt PK. 1993. The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4490-4.
- McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, Puellas E, Gerrelli D, Sadaf F, Raza J, Walker J, Kavanaugh SI, Tsai PS, Pitteloud N, Martinez-Barbera JP, Dattani MT. 2011. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* **96**: E1709-18.
- McMahon AP, Bradley A. 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**: 1073-85.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides NA, Hurler JM. 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**: 5515-22.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, Yasuda K. 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* **41**:335-44.
- Morsier (de) G. 1956. Études sur les dysraphies, crânioencéphaliques. III. Agénésie du septum pellucidum avec malformation du tractus optique. La dysplasie septo-optique. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie*, Zurich, **77**: 267-92.
- Nakano T, Murata T, Matsuo I, Aizawa S. 2000. OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem. Biophys. Res Commun* **267**: 64-70.
- Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JL. 2002. Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **111**: 1-17.

Osorio L, Teillet MA, Catala M. 2009. Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. *Development* **136**: 1717-26.

Papa FT, Mencarelli MA, Caselli R, Katzaki E, Sampieri K, Meloni I, Ariani F, Longo I, Maggio A, Balestri P, Grosso S, Farnetani MA, Berardi R, Mari F, Renieri A. 2008 . A 3 Mb deletion in 14q12 causes severe mental retardation, mild facial dysmorphisms and Rett-like features. *Am J Med Genet A* **146**: 1994-8.

Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, Stoeckli ET. 2003. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* **21**: 93-6.

Plouhinec JL, Leconte L, Sauka-Spengler T, Bovolenta P, Mazan S, Saule S. 2005. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev Biol* **278**: 560-75.

Quinlan R, Graf M, Mason I, Lumsden A, Kiecker C. 2009. Complex and dynamic patterns of Wnt pathway gene expression in the developing chick forebrain. *Neural Dev* **4**: 35.

Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddle P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V, Hanson IM. 2005 Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet.* 76:1008-22.

Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-16.

Ruiz i Altaba A, Placzek M, Baldassare M, Dodd J, Jessell TM. 1995. Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Dev Biol* **170**: 299-313.

- Rubenstein JL, Beachy PA. 1998. Patterning of the embryonic forebrain. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 18-26.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L. 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* **21**: 445-77.
- Schaefer KS, Doughman YQ, Fisher SA, Watanabe M. 2004. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn* **229**: 489-99.
- Shanmugalingam S, Houart C, Picker A, Reifers F, Macdonald R, Barth A, Griffin K, Brand M, Wilson SW. *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development*, **127**: 2549-61.
- Shimamura K, Rubenstein JL. 1997. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**: 2709-18.
- Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, McConnell SK., Martin GR, Rubenstein JL. 2006. Dose-dependent functions of *Fgf8* in regulating telencephalic patterning centers. *Development* **133**: 1831-44.
- Tao W, Lai E. 1992. Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron*, **8**: 957-66.
- Terry K, Magan H, Baranski M, Burrus LW. 2000. *Sfrp-1* and *Sfrp-2* are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. *Mech Dev* **97**: 177-82.
- Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S. 1998. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev Genes Evol* **208**: 431-39.
- Vieira C, Martinez S. 2006. Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience*, **143**: 129-40.

Vieira C, Pombero A, Garcia-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, Martinez S. 2010. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* **54** :7-20.

Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**: 1435-49.

Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr. 1994. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**: 575-88.

Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC, Lai E. 1995. Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* **14**: 1141-52.

Figure legends

Figure 1 – *Smad1* silencing in CNC cells entails severe brain malformations. (A-F and H,I) Morphology of control and *dsSmad1*-electroporated embryos at 26ss, at E4 (C-F, lateral and fontal view). (G) Morphometric analysis of brain development: measurement of the distance between lens-dorsal telencephalon (Tel), lens-epiphysis (Di), lens-optic tectum (Mes) in control, *dsSmad1*-transfected and *dsSmad1/hSmad1* co-electroporated embryos. Morphological analysis at E8 of control and *dsSmad1*-transfected embryos (H-I, arrowhead). (J-M) Coronal sections of control and experimental brains showing that in *dsSmad1*-electroporated embryo, the choroid plexuses (arrowhead) and the third ventricle (asterisk) are reduced; the *pallium* subdivision in telencephalon is indistinguishable (asterisk) (L-M). (N-Q) E8 sagittal sections of control and *dsSmad1*-transfected embryos, showing that the ventral part of brain is augmented (asterisk) (N-O), the olfactory bulbs and olfactory nerves are missing (arrowhead) (P-Q). Scale bar: J-O, 1mm and P-Q, 300µm. *** equal $P<0.0001$ and * equal $P<0.0125$.

Figure 2 – *Smad1* loss-of-function in CNC cell alters the molecular patterning of fore- and midbrain. (A-O) Lateral view of 26ss control, *dsSmad1*-transfected and *dsSmad1/hSmad1* co-electroporated embryos. Immunocytochemistry with HNK-1 (A'-C') and anti-phospho-H3 (A''-C''). Whole-mount Lysotracker staining at 26ss (D-F). *In situ* hybridization for *Foxg1* (G-I), *Otx2* (J-L) and *Foxa2* (M-O).

Figure 3 – *Foxg1* is essential for pre-otic brain development: its expression is controlled by *Smad1* activity in CNC cells. (A) *dsFoxg1* bilateral electroporation in ANR at 5ss: electroporated site at 26ss, visualized with GFP labeling. (B) Bilateral electroporation of the *dsSmad1* in CNC cells (red) followed by Fgf8-soaked beads implantation in contact to the ANR (blue). (C-C') Bilateral ablation of the ANR at 5ss. *In situ* hybridization at 26ss for (D-G) *Foxg1*, (H-K) *Otx2* and (L-O) *Foxa2* in control, (E, I and M) *dsFoxg1*-transfected, (F, J and N) *dsSmad1*-transfected and Fgf8-supplemented, (G, K and O) ANR-ablated embryos. (P) Bilateral electroporation of CNC

with mutated form of *hSmad1* construct at 5ss (red), followed by ANR ablation. *In situ* hybridization at 26ss for *Foxg1* in (Q) *hSmad1*-P-, (R) *hSmad1*-MM- or (S) *hSmad1*-GM-, electroporated embryos.

Figure 4 – Modulation of morphogen activity by *Smad1* silencing. (A-O) *In situ* hybridization in (A, D, G, J and M) control, (B, E, H, K and N) *dsSmad1*-transfected, and (C, F, I, L and O) *dsSmad1/hSmad1* co-electroporated embryos, for *Fgf8* (A-C), *Bmp4* (D-F), *Noggin* (G-I), *Dkk1* (J-L) and *Cerberus* (M-O). (P) RT-PCR analysis at 26ss of the gene expression of pre-otic head harvested from control and *dsSmad1*-transfected embryos. Expression of (Q-R) *Noggin* and (S-T) *Gremlin* in control and *dsSmad1*-silenced embryos, showing the loss of their respective expression in experimental series. NFB, nasofrontal bud; Mx, maxillary bud; Md, mandibular bud.

Figure 5 – *Bmp* and *Wnt* antagonists are required for pre-otic brain development. *In situ* hybridizations for (A-D) *Foxg1*, (E-H) *Otx2* and (I-L) *Foxa2* in (A, E and I) control, (B, F and J) *Noggin/Gremlin*-co-silenced (*dsNoggin* and *dsGremlin*), (C, G and K) *Dkk1*-RCAS-transfected, and (D, H and L) *Dkk1*-RCAS/*Smad1*-P-co-transfected embryos at 26ss.

Figure 6 – *Sfrp1* and *Sfrp2* are essential for telencephalic development. (A-J) Gene expression pattern of *Sfrp1* and *Sfrp2* at 5ss (A-B) and 26ss (C-D). *In situ* hybridization for *Sfrp1* and *Sfrp2* in *dsSmad1*-transfected (E and H), *dsSmad1/hSmad1*-co-electroporated (F and I) and *Dkk1*-RCAS-electroporated embryos (G and J). *In situ* hybridizations for (K and N) *Foxg1*, (L and O) *Otx2* and (M and P) *Foxa2* in (K-M) control and (N-P) *Sfrp1/Sfrp2*-co-silenced embryos.

Figure 7 – *Cerberus* supplementation overcomes the molecular defects generated by *Smad1* silencing in CNC cells on brain patterning. (A-B) *In situ* hybridization for *Cerberus* in control and *Dkk1*-RCAS-transfected embryos. (C) Schematic representation of *Smad1*-silencing in CNC cells at 4ss followed by *Cerberus* protein injection into the CNC-derived mesenchyme at 12ss. (D) *Cerberus* protein was contrasted with 0.01% Rhodamine Dextran. *In situ* hybridization at 26ss, in (E, G and I)

control and (F, H and J) *dsSmad1*-transfected Cerberus-injected embryos, for (E-F) *Foxg1*, (G-H) *Otx2* and (I-J) *Foxa2*, showing the significant rescue of the gene expression in the developing brain consecutive to Cerberus injection.

Supplementary Figure 1 – *Smad1* pattern expression in chick embryo. (A) Expression pattern of the *Smad1* in 2ss, 3ss, 5ss, 7ss, (B), 26ss, and (C-D) E4 chick embryos. *In situ* hybridization for (E-F) *Smad1* and *Smad5* at 5ss, 90 min after *Smad1* silencing in CNC cells, showing that the *dsSmad1* specifically alters *Smad1* activity but leaves *Smad5* unchanged.

Supplementary Figure 2 – Co-electroporation of *dsSmad1/hSmad1* restores fore- and midbrain development in *dsSmad1*-electroporated embryo. (A-B) Morphological analysis in control and *dsSmad1*-transfected embryos at E6. (C-D) E8 Sagittal section of control and *dsSmad1*-transfected embryos, showing the reduction of choroid plexus development after *Smad1* silencing (asterisks). Morphological analysis of 26ss (E) control and (F) *dsSmad1*-transfected, (G) *hSmad1*-transfected and (H) *dsSmad1/hSmad1*-co-transfected embryos. Morphological analysis and GFP expression in CNC cells after (I,J) *dsSmad1*/GFP- and (K,L) *dsSmad1/hSmad1*/GFP-co-electroporation. *In situ* hybridization at 26ss for *Foxg1* in (M) control series and after (N) *dsSmad1* silencing only in ANR. *Foxg1* expression was not altered. Scale bar: C-D, 300µm.

Supplementary Figure 3 – *dsSmad1* silencing at 4ss does not interfere with *Six3*, *Pax6* and *Shh* expression at 26ss. *In situ* hybridization for (A-C) *Six3*, (D-F') *Pax6* and (G-I) *Shh* in control, *dsSmad1*-electroporated and *dsSmad1/hSmad1*-co-electroporated embryos.

Supplementary Figure 4 – Reduction of *Wnt* expression at the dorsal midline after *Smad1* silencing in CNC cells. *In situ* hybridization for (A-C) *Wnt1*, (D-F) *Wnt3a* and (G-I) *Wnt8b* in control, *dsSmad1*-electroporated and *dsSmad1/hSmad1*-co-electroporated embryos.

Supplementary Figure 5 – Immunocytochemistry against Dkk1 and *in situ* hybridization for *Cerberus*. (A-F) *Dkk1* is found in primitive streak, mesencephalon anlagen, head process (A,B), and mainly accumulated by neural crest cells (C). At cephalic level, *Dkk1* is found in migratory neural crest cells (D-F, arrow), and cephalic mesenchyme (F). (G-I) *Cerberus* expression is expressed the in peri-ocular mesenchyme at 26ss. Di, diencephalon.

Fig 1 - Aguiar et al.,

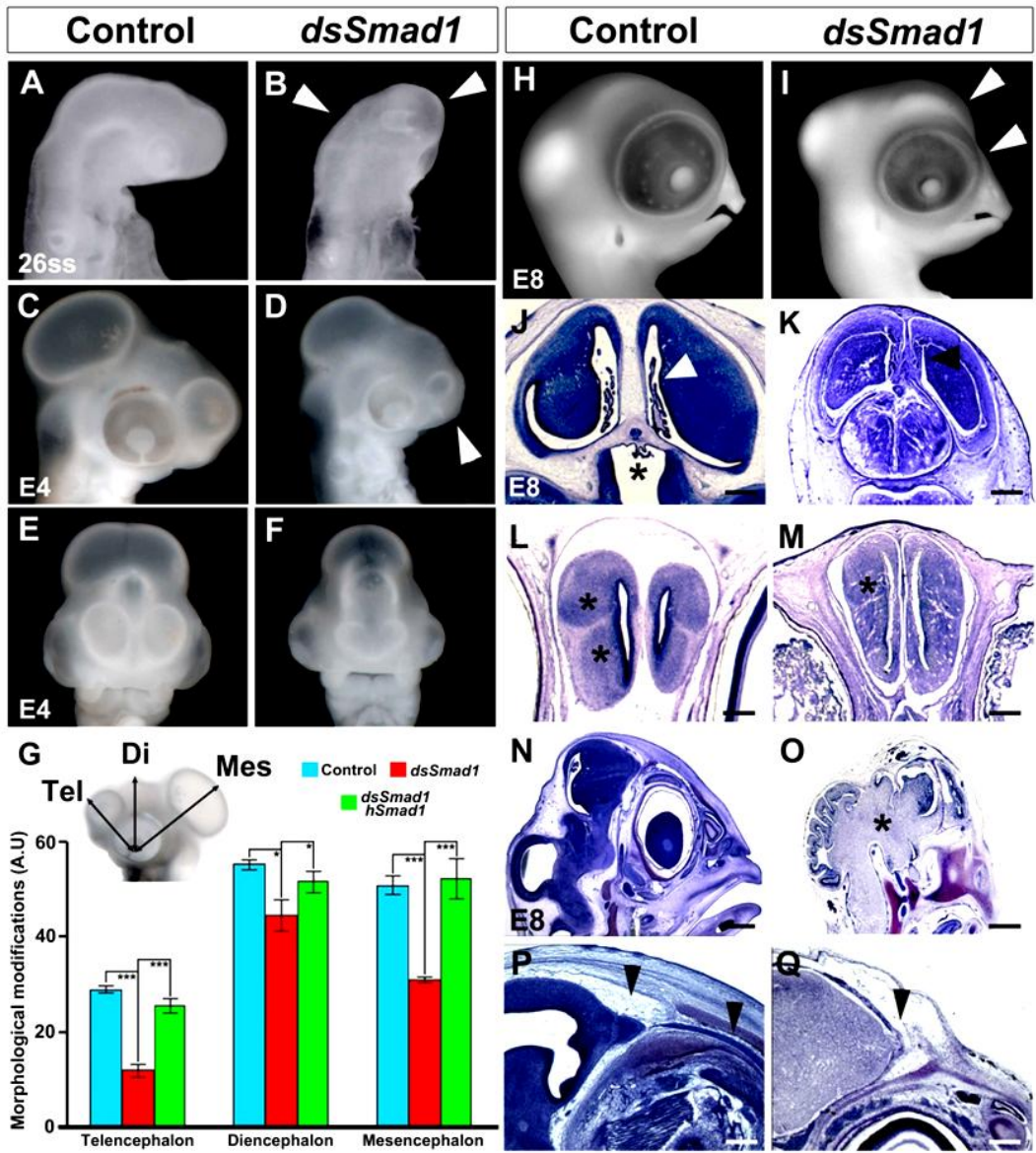


Fig 2 - Aguiar et al.,

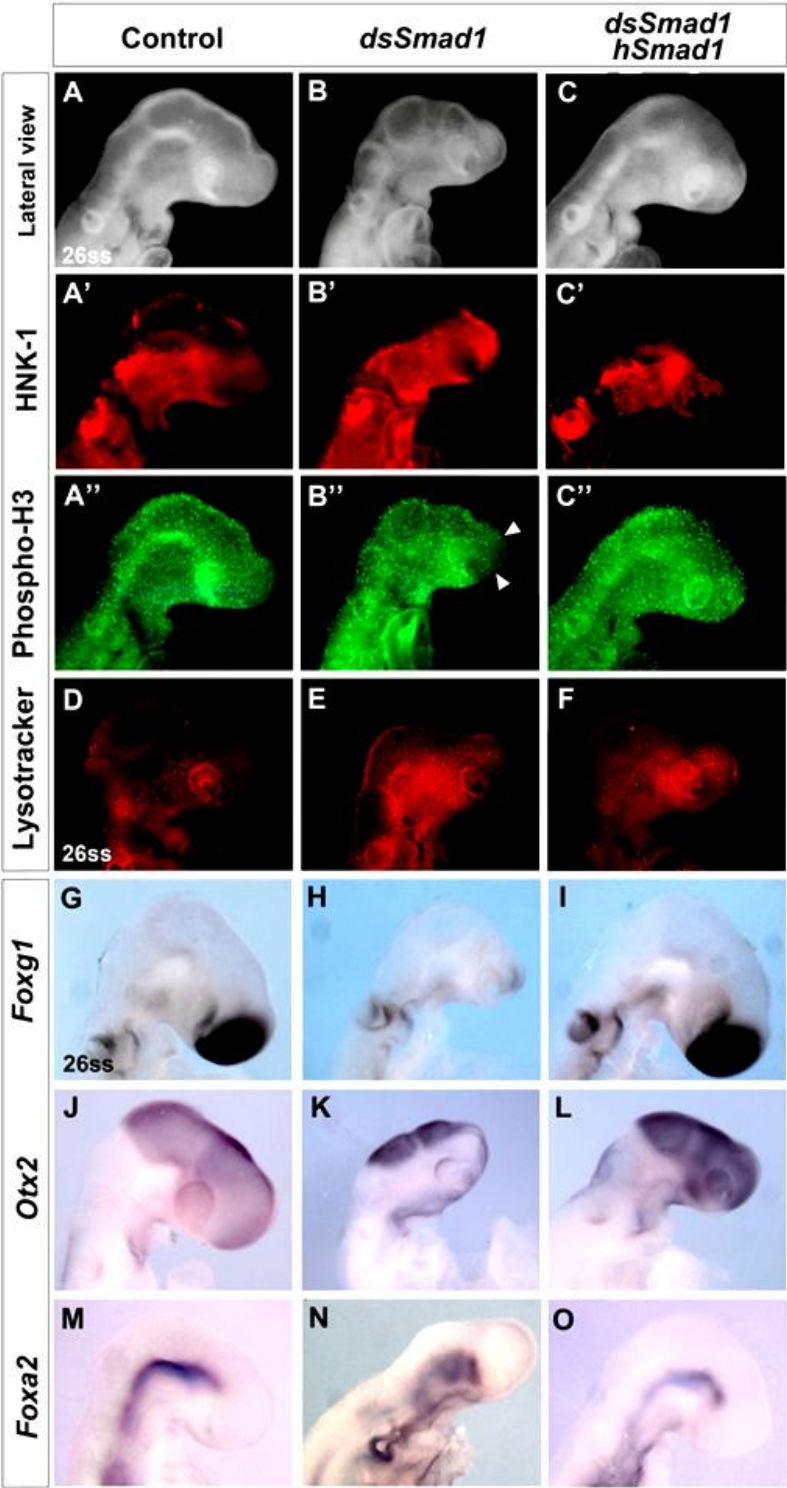


Fig 3 - Aguiar et al.,

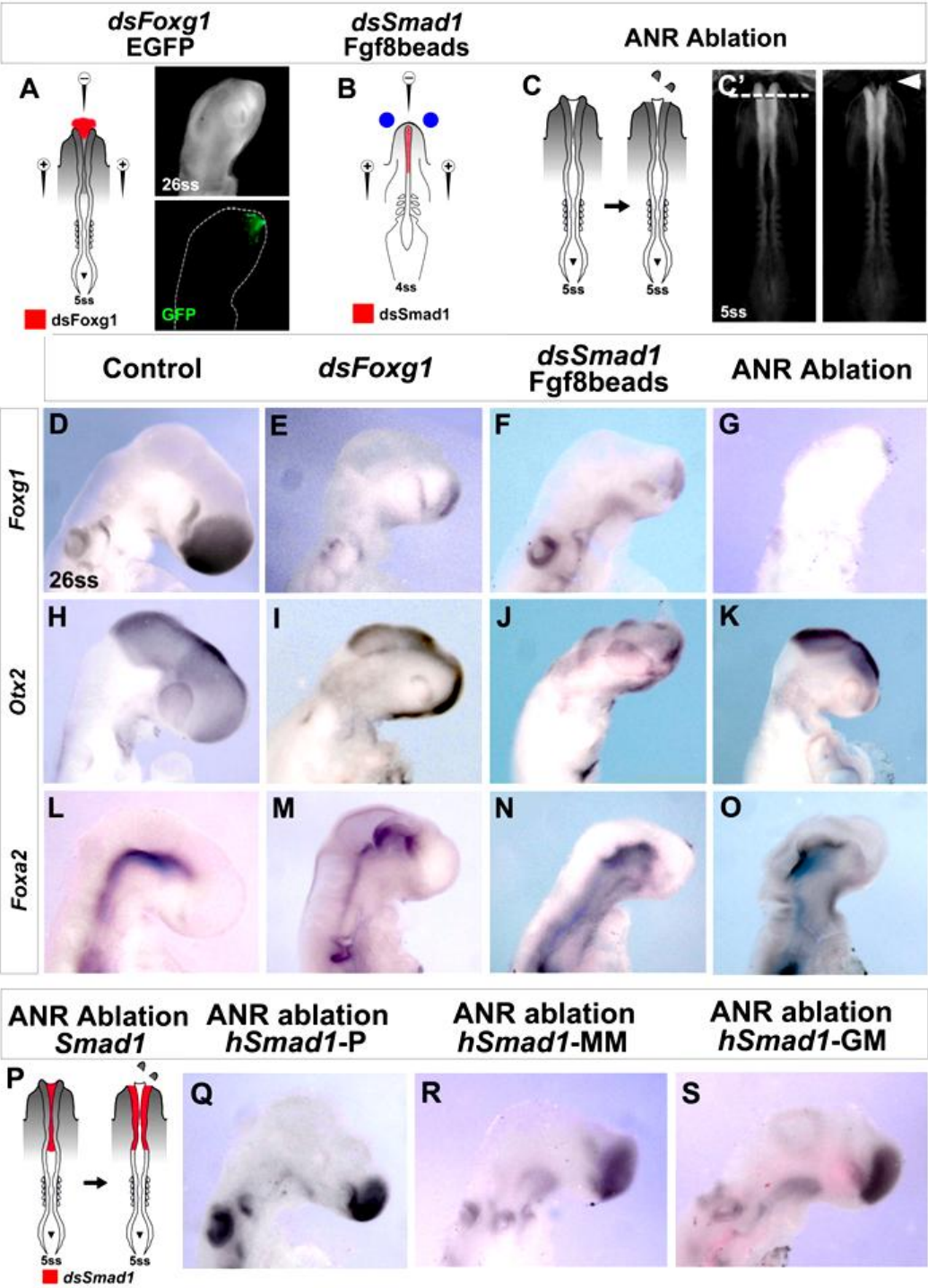


Fig 4 - Aguiar et al.,

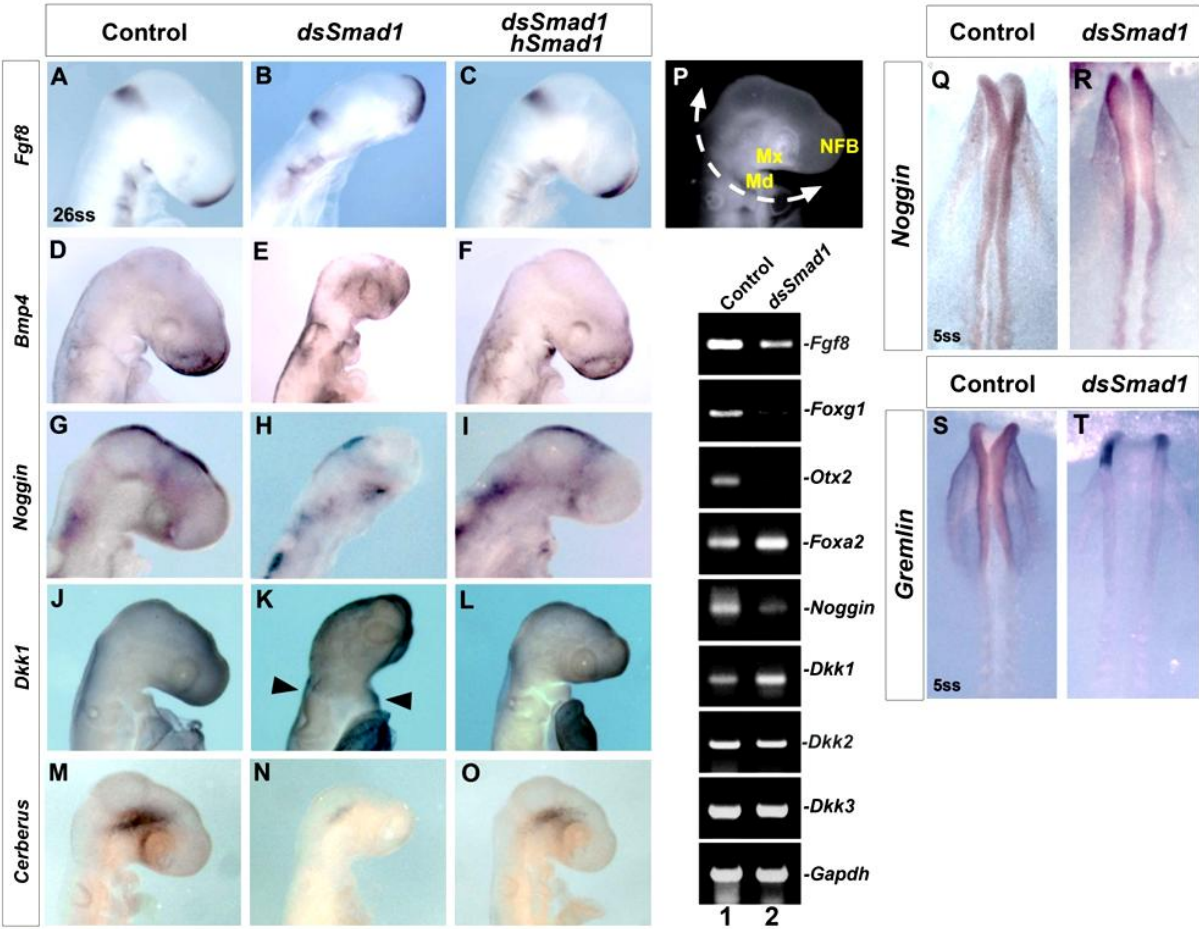


Fig 5 - Aguiar et al.,

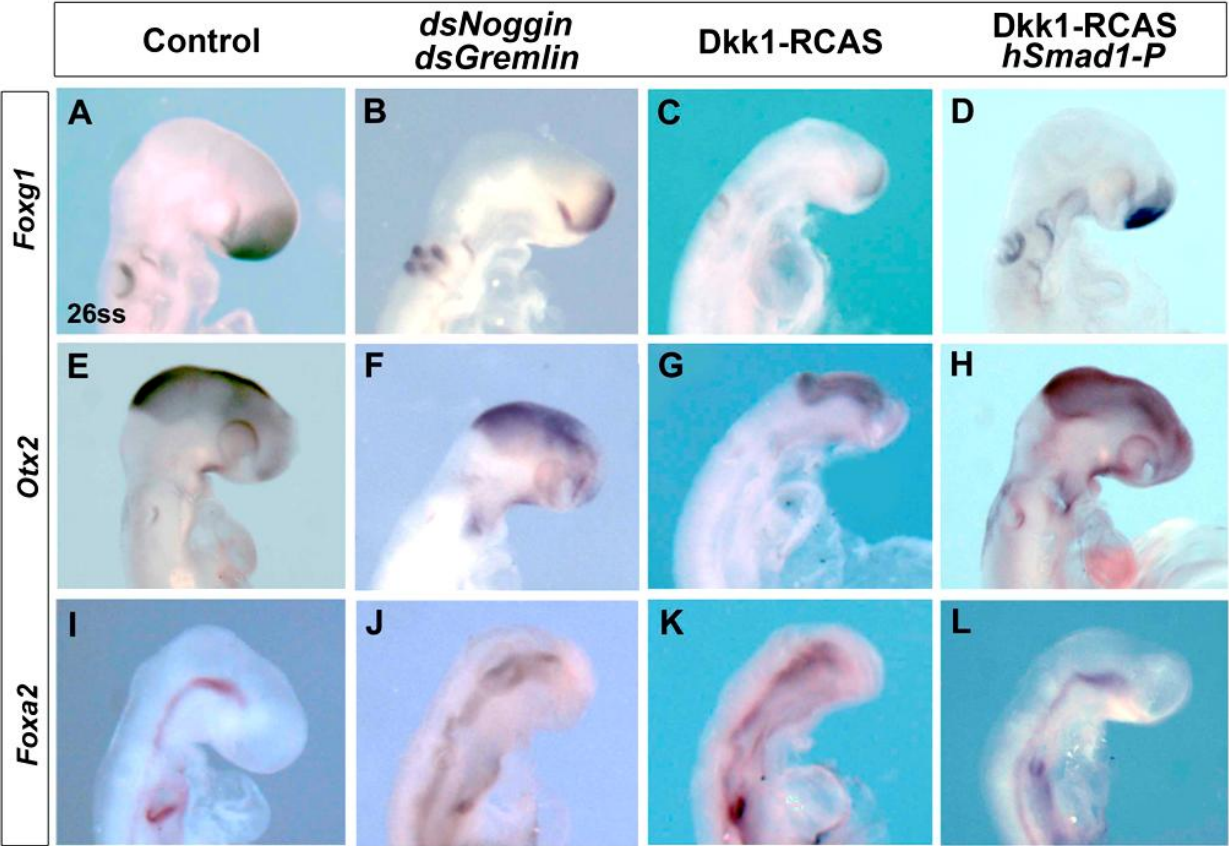


Fig 6 - Aguiar et al.,

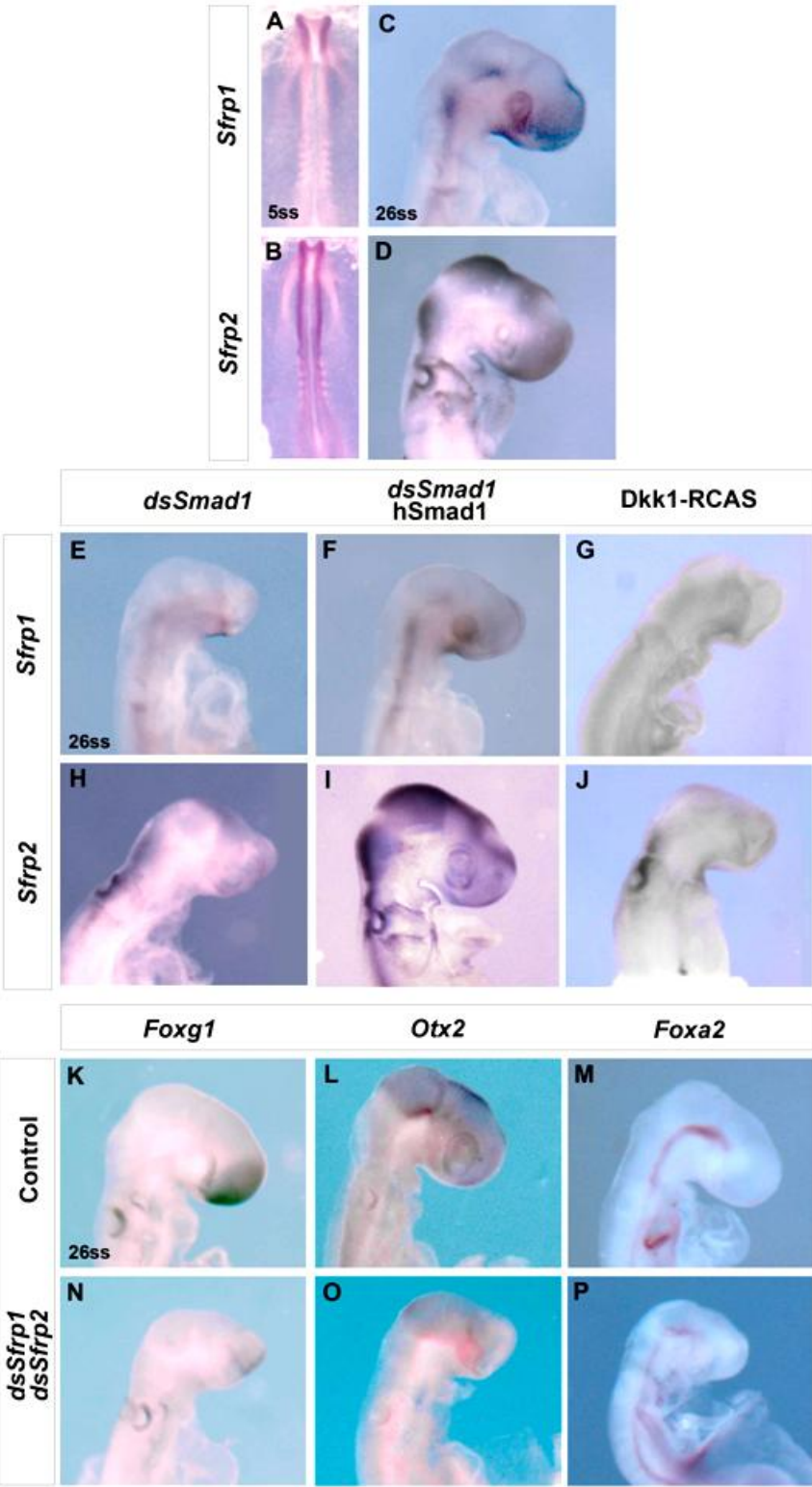
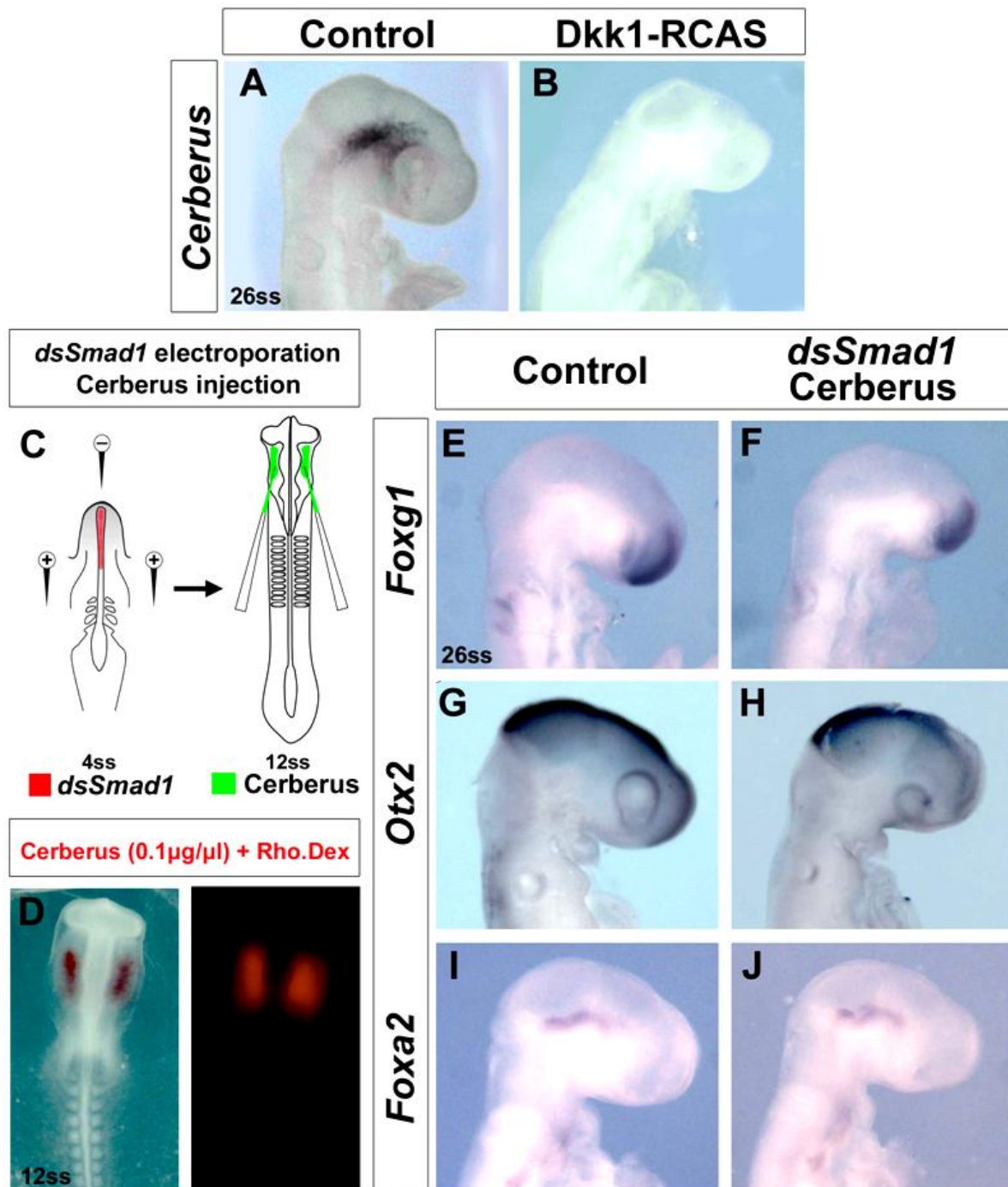
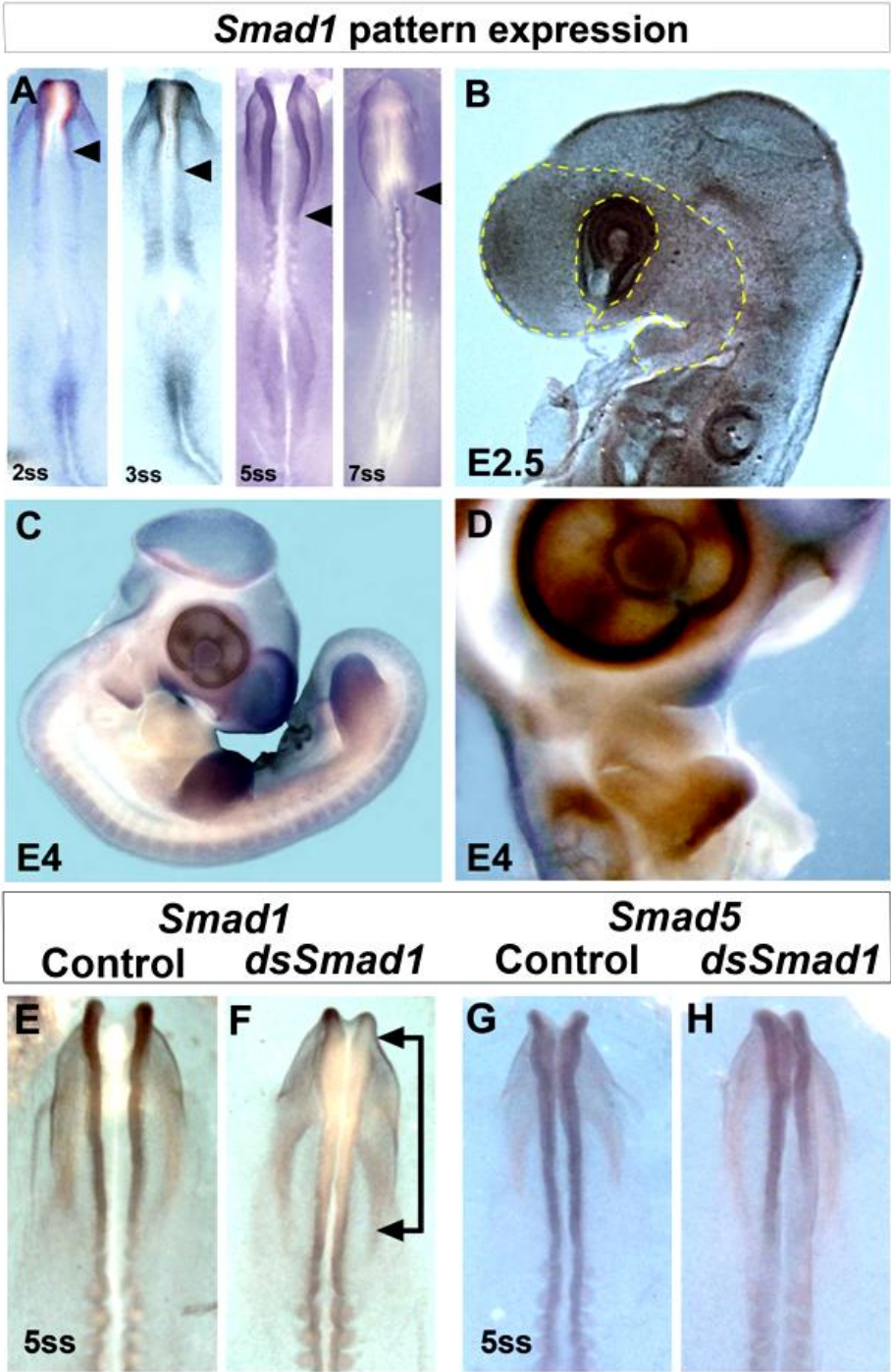


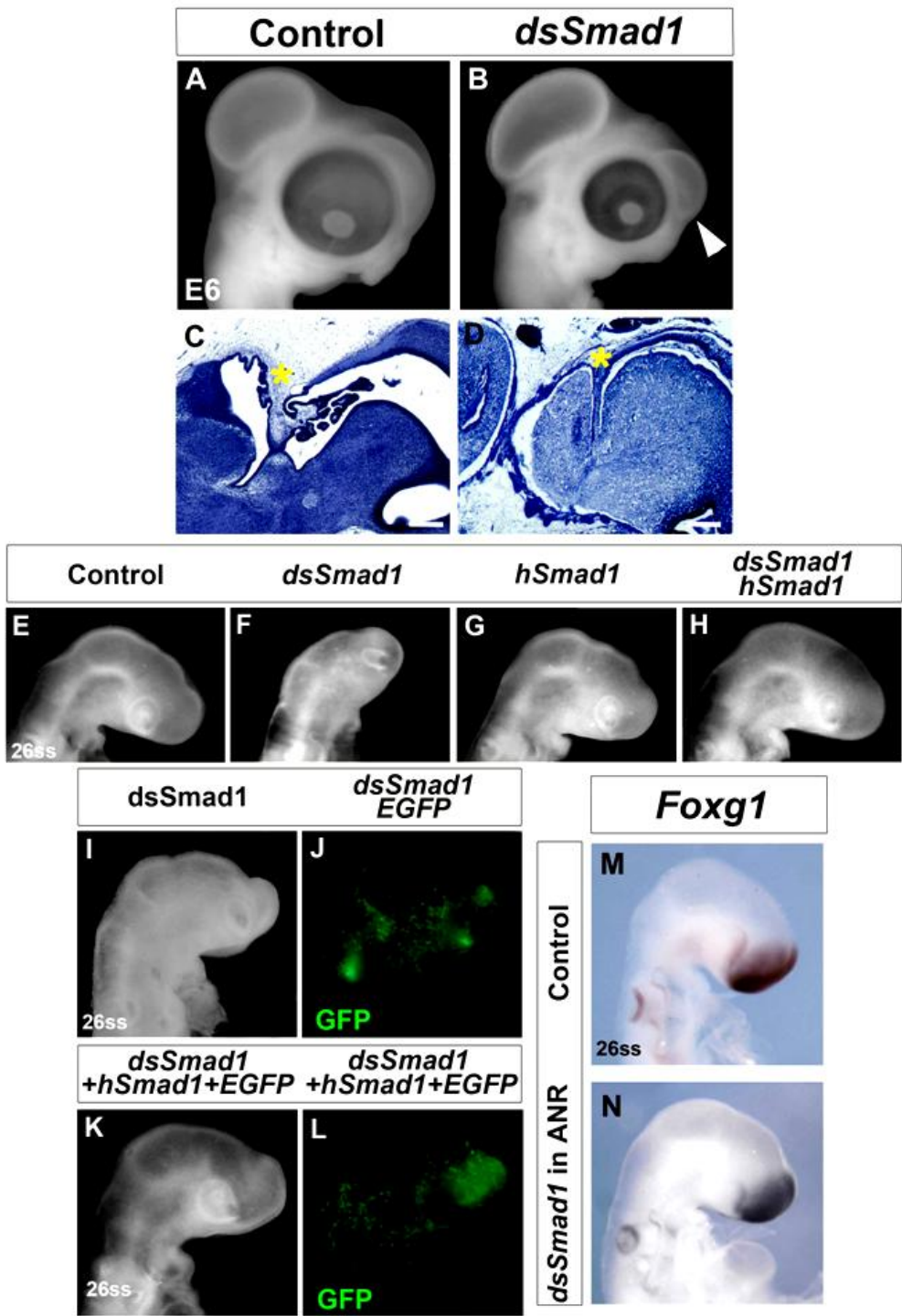
Fig 7 - Aguiar et al.,



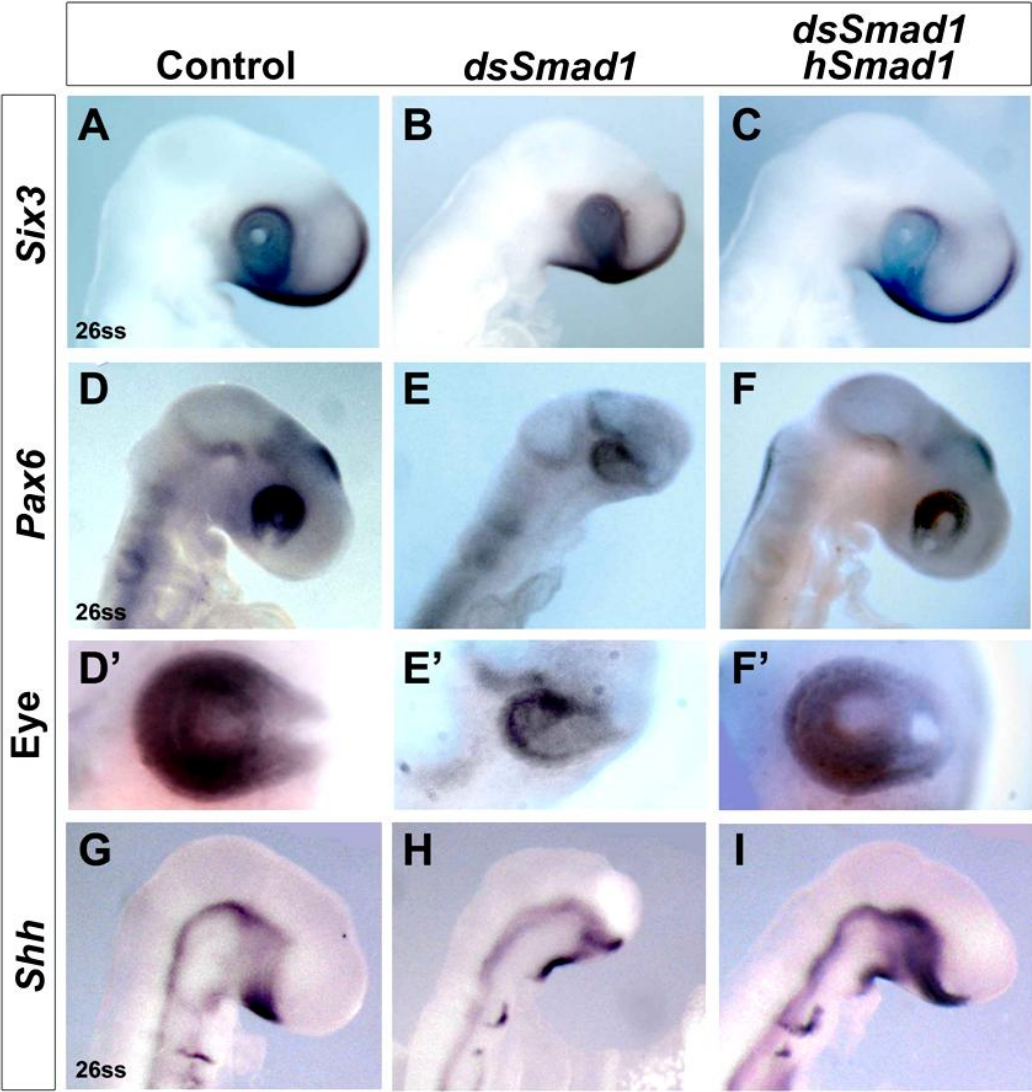
Supp fig 1 - Aguiar et al.,



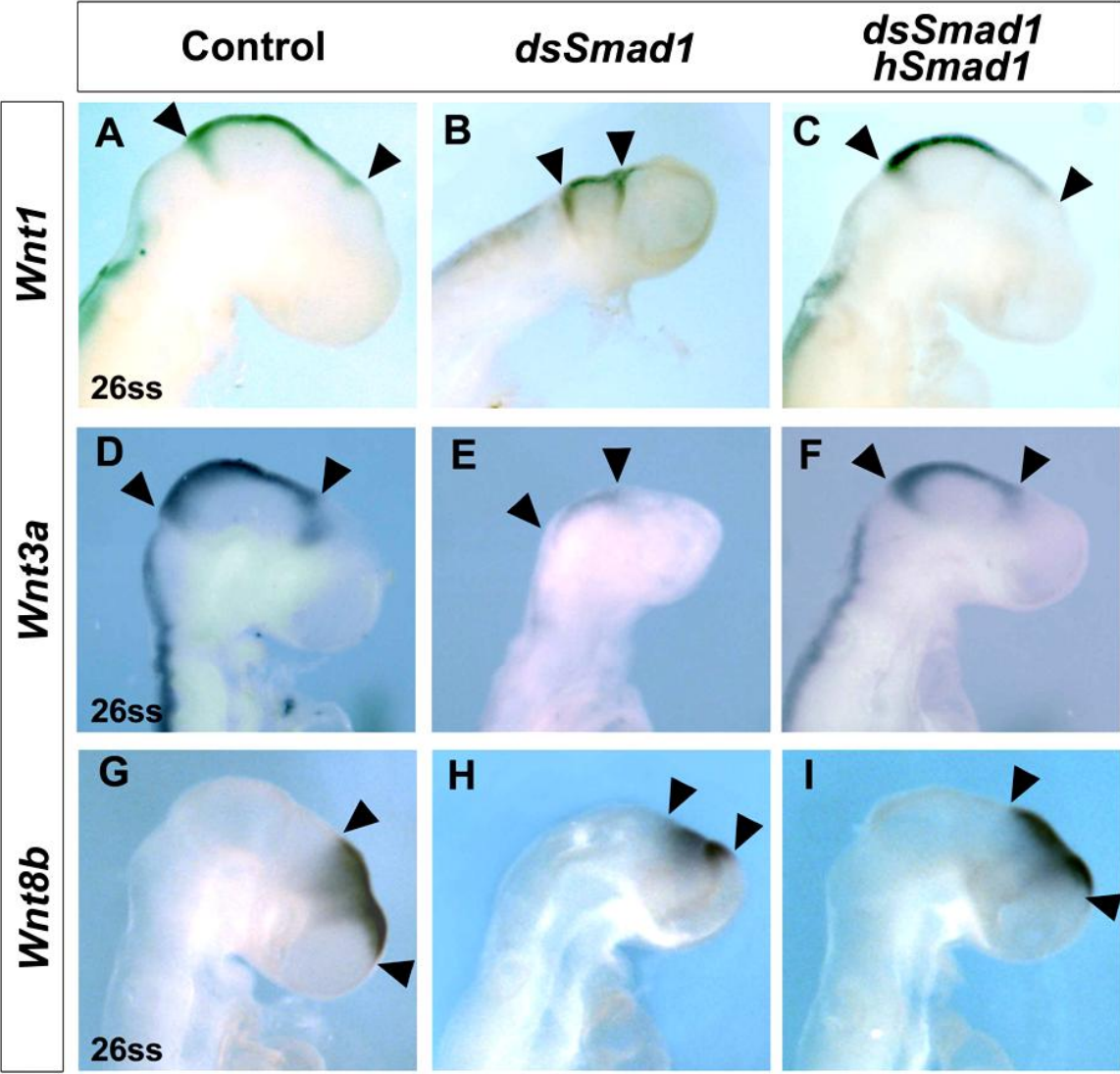
Supp fig 2 - Aguiar et al.,



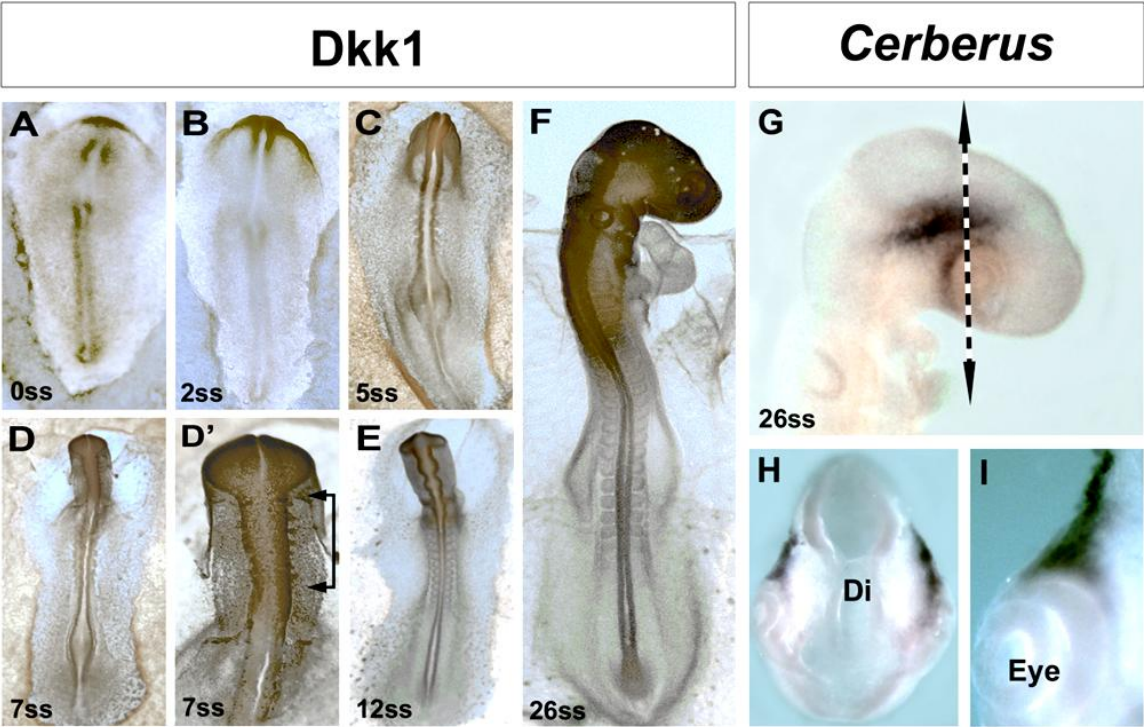
Supp fig 3 - Aguiar et al.,



Supp fig 4 - Aguiar et al.,



Supp fig 5 - Aguiar et al.,



4.2 – Cubilin controla a sinalização Fgf induzindo a sobrevivência celular durante o desenvolvimento da cabeça dos vertebrados.

4.2 – Cubilin is required for Fgf-promoted cell survival in the developing vertebrate head

Olivier Cases¹, Aitana Perea-Gomez², Diego P. Aguiar³, Anders Nykjaer⁴, Sabine Amsellem¹, Jacqueline Chandellier¹, Muriel Umbhauer⁵, Silvia Cereghini⁵, Mette Madsen⁶, Jérôme Collignon², Pierre Verroust¹, Jean-François Riou⁵, Sophie E. Creuzet³ and Renata Kozyraki^{1*}

1 Institut de la Vision; INSERM U968; CNRS UMR7210; Université Pierre et Marie Curie UMRS968; 75012 Paris, France

2 Institut Jacques Monod; CNRS UMR7592; Université Paris Diderot; Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France

3 Institut de Neurobiologie Alfred-Fessard, Laboratoire Développement, Evolution et Plasticité du Système Nerveux, 91198 Gif-sur-Yvette, France

4 The Lundbeck Foundation Centre MIND, Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus, 8000 Aarhus, Denmark

5 CNRS UMR7622 ; Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Biologie du Développement, 75005 Paris, France

6 Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus, 8000 Aarhus Denmark

Running title

Cubilin is a novel receptor for Fgf8.

Keywords

Cell survival, neural crest, cubilin, fgf8, endocytosis

* Corresponding author:

Renata Kozyraki UMRS968, CNRS 7210, Institut de la Vision, 17 rue Moreau 75012, Paris, France

renata.kozyraki@inserm.fr

Abstract

Fibroblast growth factors (Fgf) are key mediators of cell survival, migration, proliferation and patterning in the developing head. How the same Fgfs exert such diverse functions is still an open question. We now report that the multiligand endocytic receptor Cubilin (Cubn) is a novel, interspecies conserved Fgf receptor, critical for cell survival in the developing vertebrate head. Epiblast- versus forebrain-specific inactivation of *Cubn* in the mouse embryo or *Cubn* silencing in the frog and chick embryos show that *Cubn* is required during early somite stages together with Fgfs to convey survival signals in the forebrain and adjacent tissues. Surface Plasmon resonance analysis and cell uptake studies reveal that Fgf8 is a high affinity ligand for Cubn and that binding to Cubn is a prerequisite for the activation of the Fgf signaling mediators MAPK and Smad1. We propose that plasma membrane binding of Fgf8 and most likely Fgf17 and Fgf18 to Cubn allows FgfR-independent endocytosis of the Fgf ligand and contributes to fully efficient Fgf signaling.

Introduction

Cubn encodes a 460 kDa peripheral membrane protein composed of eight epidermal growth factor repeats and 27 CUB domains (Complement C1r/C1s, Urchin Egf, Bone morphogenic protein-1), which carry multiple potential sites for interaction with proteins, sugars or phospholipids (Kozyraki and Gofflot 2007). Whereas the endocytic function of *Cubn* in the adult kidney and gut is defined (Amsellem, Gburek, Hamard, Nielsen, Willnow, Devuyst, Nexo, Verroust, Christensen, and Kozyraki 2010) its contribution in embryonic development remains poorly characterized. During mouse embryonic development *Cubn* is expressed in both embryonic and extraembryonic tissues (Assemat, Vinot, Gofflot, Linsel, Nitschke, Illien, Chatelet, Verroust, Louvet-Vallee, Rinninger, and Kozyraki 2005). Germ line inactivation of *Cubn* perturbs the development of the head and body axis and leads to embryo-lethality (Smith, Mussell, Fleming, Barth, Spyropoulos, Cooley, Drake, and Argraves 2006). Because of the strong expression of *Cubn* in the extraembryonic visceral endoderm this phenotype has been attributed to defective lipoprotein uptake and transport to the developing embryo. However the nature of the defects, i.e. absence of organized head and somites at embryonic day 9.5 (E9.5), cannot be fully explained by inappropriate nutrient supply and suggests that *Cubn* expressed in the embryo proper may have additional functions. Here we focus on the involvement of embryonic *Cubn* in the morphogenesis of the anterior-most region of the embryo, i.e. the forebrain and craniofacial tissues. Soon after the induction of the forebrain during gastrulation, signaling interactions between the rostral neuroectoderm and adjacent tissues lead to the establishment, around the 4th

somite stage (4ss) of the rostral signaling center, at the ridge between the anterior neuroectoderm and surface ectoderm (Geng and Oliver 2009;Hoch, Rubenstein, and Pleasure 2009;Klingensmith, Matsui, Yang, and Anderson 2010;Mason 2007;Rubenstein, Shimamura, Martinez, and Puelles 1998). Fgf8 signaling from the anterior neural ridge (ANR), together with BMPs and Wnts from the ANR and surrounding tissues promotes patterning of the telencephalic neuroectoderm, anterior cell survival, cephalic neural crest cell (CNCC) migration and regulates cell proliferation (Borello, Cobos, Long, McWhirter, Murre, and Rubenstein 2008;Creuzet, Martinez, and Le Douarin 2006;Paek, Hwang, Zukin, and Hebert 2011). It is postulated (Dailey, Ambrosetti, Mansukhani, and Basilico 2005;Gutin, Fernandes, Palazzolo, Paek, Yu, Ornitz, McConnell, and Hebert 2006) that yet unidentified extracellular and/or intracellular modulators modify ligand availability and receptor activation thus imparting specificity in Fgf8-responsiveness during head morphogenesis. In this study we show that *Cubn* is critical for cell survival in the anterior vertebrate head. *Cubn* is a conserved, high affinity receptor for Fgf8, which is essential for Fgf8 dependent activation of MAPK/ERK.

Results

***Cubn* is expressed in the cephalic neuroepithelium and neural crest cells during early somite stages.**

Cubn is first expressed in the anterior epiblast at E7.5 (Assemat, Vinot, Gofflot, Linsel-Nitschke, Illien, Chatelet, Verroust, Louvet-Vallee, Rinninger, and Kozyraki 2005).

During neurulation (E8.5, 5-7 ss,) *Cubn* mRNA is found in the prospective forebrain neuroepithelium, in the optic eminences, at the margins of the cephalic neural folds and in a narrow strip of cells adjacent to the surface ectoderm at the levels of the first branchial arch (BA) (Fig.1A). At E9.0 (13-16 ss,) an intense *Cubn* immunostaining is observed in the mesenchyme at the levels of the dorsal forebrain, mid- and hindbrain including the presumptive trigeminal neural crest region (Fig. 1B). *Cubn* is expressed in the CNCCs of the lateral cephalic mesenchyme and periocular region (Fig. 1C) in a pattern similar to that of the neural crest marker *Tfap2 α* (Fig. 1D). At this stage, the neuroepithelium of the forebrain and the surface ectoderm overlying the ventral forebrain and the first BA are also stained for *Cubn* (Fig. 1C).

Sox2-Cre mediated ablation of embryonic *Cubn* leads to rostral head hypoplasia by E9.5.

To allow complete inactivation of embryonic *Cubn* we used a floxed *Cubn* allele (Amsellem, Gburek, Hamard, Nielsen, Willnow, Devuyt, Nexø, Verroust, Christensen, and Kozyraki 2010) and the paternally inherited *Sox2-Cre* transgene active in the epiblast from E6.0 onwards (Hayashi, Lewis, Pevny, and McMahon 2002). *Cubn*^{L/+};*Sox2-Cre* heterozygous mice were viable and morphologically normal. *Cubn*^{L/L}; *Sox2-Cre* (hereafter designed as *Cubn Sox2-Cre-KO*) mutants did not develop beyond E12.5 (Table S1). At E8.5 (Fig. 1E, E') the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants were similar to the controls. At E9.5 (~25 ss) the telencephalon and the optic vesicles were markedly reduced in size (Fig. 1F, F'). From E10.5 onwards the nasal buds, the telencephalic and optic vesicles were hypoplastic or absent and the development of the

branchial arches was severely affected (Fig. 1G-I'). Despite the reduction of the mutant telencephalic tissue (33% compared to the controls, n=7) at E10.5, the general prosomeric organization of the forebrain was preserved (Fig. 1H, H'). Deletion of *Cubn* specifically in the telencephalic neuroectoderm after E9.0 using the *Foxg1-Cre* allele (Paek, Gutin, and Hebert 2009) did not affect telencephalic development. *Cubn^{L/L};Foxg1-Cre* mutants were viable and exhibited minor cortical defects, including the absence of corpus callosum (Fig. 1J-K' and Fig. S1). These results indicate that *Cubn* in the cephalic mesenchyme, including the CNCC, probably plays a crucial role during early steps of head morphogenesis. They do not exclude that *Cubn* may be necessary in the developing neuroepithelium before E9.0.

Forebrain and face hypoplasia in E9.25 Cubn Sox2-Cre-KO mutants is due to decreased cell survival.

At E9.25 (~20 ss), prior to the appearance of major telencephalic hypoplasia, cell proliferation evidenced by the M-phase cell cycle marker phospho-histone H3 (PH3) was not modified in the cephalic region of *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants (Fig. 2A, A', B). However cell death, followed by the fluorescent dye Lysotracker (Anderson, Stottmann, Choi, and Klingensmith 2006), was significantly increased in the mutant telencephalon and overlying tissues (Fig. 2A, A', C). Immunoblotting of E9.25 anterior cephalic extracts showed increased expression of activated caspase-3 in the mutants (Fig. S2A) confirming enhanced apoptosis.

Forebrain patterning is maintained in E9.25 Cubn Sox2-Cre-KO mutants.

Foxg1, *Fgf8* and *Fgf17* were normally distributed in the anterior telencephalon of ~E9.25 *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants (Fig. 2D- F'). The occupancy percentage of *Foxg1* in the telencephalon was identical in wild-type and mutants (35% versus 33% respectively) showing that the reduction of the *Foxg1* expression domain was following the telencephalic hypoplasia. *Six3* was normally distributed in the mutant rostroventral telencephalon and optic vesicles and its expression domain was reduced due to the telencephalic hypoplasia (Fig. 2G, G'). *Shh* was absent from the mutant preoptic area only (Fig. 2H, H') and *Nkx2.1*, which is necessary in the ventral forebrain for the activation of *Shh*, was also absent from the preoptic area but remained normal in the hypothalamus (Fig. 2I, I'). *Spry1*, an Fgf signaling antagonist was present in the mutant commissural plate but did not expand ventrally in the frontonasal processes although it remained unaltered in the mutant isthmus (Fig. S2B, B'). *Emx2* along the dorsal telencephalon (Fig. 2J, J'), and *Bmp7* at the dorsal midline were similarly expressed in wild-type and mutant embryos (Fig. S2C, C'). *Sp8* was expressed in a high to low, medial to lateral gradient in both the control and mutant telencephalon (Fig. S2D, D'). The caudodorsal and diencephalic marker *Wnt8b* was normally expressed in the mutants (Fig. S2E, E') and *En2* was normally detected at the diencephalic-mesencephalic boundary (Fig. S2F, F'). The above data show that, despite the strong reduction of the forebrain tissue, forebrain patterning is maintained in the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants.

Abnormal distribution of CNCCs contributes to head defects in *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants.

The rostroventral distribution of *Tfap2α* was patchy in the mutants, particularly at the level of the telencephalon and the periocular region. *Tfap2α* was normally expressed in the first BA (Fig. 2K, K'). The ectodermal and CNCC marker *Dlx5* was decreased at the level of the telencephalon but remained expressed in the frontonasal processes and BA region (Fig. 2L, L'). *Dlx2* was patchy at the level of the telencephalon and periocular region but normally expressed in the first BA (Fig. 2M, M'). Thus, around E9.25, a stage at which in wild-type embryos the spread of CNCC over the forebrain and first BA region is complete, the distribution of representative CNCC markers is abnormal in the mutants indicating defective migration and/or survival of CNCC in the rostral head. Taken altogether the above results show that rostral head hypoplasia in the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutant embryos is not associated with or result from defective telencephalic patterning. Hypoplasia is rather due i) to decreased cell survival in both the cephalic neuroepithelium and surrounding mesenchyme and ii) to defective CNCC distribution in the anterior head.

Normal forebrain regionalization and perturbed Fgf signaling in E8.75 *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants

In order to identify the onset of the defects we analyzed embryos of earlier developmental stages. Between E7.5 and E8.25 we could not see any alteration in the

expression of the early anterior neuroectoderm and rostralateral ectoderm markers *Otx2*, *Hesx1*, *Six3* and *Dlx5* (Fig. S3A-D') indicating that forebrain specification was normally initiated in the mutants. At E8.75 (8-10 ss) *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants were phenotypically normal, albeit frequently smaller than the age-matched controls. The rates of cell proliferation and cell death were similar in E8.75 mutant and wild-type littermates (Fig. 3A, A' and Fig. S4A). *Fgf8* was normally expressed in the mutant ANR (Fig. 3B, B' and Fig. S3E, E'). *Foxg1* marked the mutant ANR and neuroectoderm but was clearly reduced in the mutant pharyngeal region (Fig. 3C, C' and Fig. S4B-C'). The BMP antagonist-encoding *Noggin* and *Bmp7* were unaffected in the mutant axial mesendoderm and cephalic mesenchyme (Fig. 3D, D' and Fig. S4D, D') and *Bmp4* was normally expressed in the mutants (Fig. S4E, E'). *Wnt1* and *Wnt8b*, were normally distributed in the presumptive diencephalon and midbrain (Fig. 3E-F') and *Shh* was unaffected in the mutant neuroectoderm and axial mesendoderm (Fig. S4F, F'). *Six3*, a repressor of *Wnt1* and *Wnt8b* (Geng, Speirs, Lagutin, Inbal, Liu, Solnica-Krezel, Jeong, Epstein, and Oliver 2008; Liu, Lagutin, Swindell, Jamrich, and Oliver 2010) and an activator of *Shh*, appropriately marked the developing mutant ventral forebrain and eyes (Fig. S4G, G'). Finally, the early CNCC and ectodermal markers *Tfap2α*, *Msx1* and *Dlx5* were normally distributed at the dorsal neural folds of mid-, and hindbrain and in the cephalic ectoderm (Fig. 3G-H' and Fig. S4H, H'). *Noggin* and *Dlx2* were normally expressed along the dorsal neural folds but were slightly decreased in the lateral cephalic mesenchyme of the mutants (Fig. 3I, I' and Fig. S4I, I'). Thus, forebrain regionalization and CNCC generation are normal in E8.75 *CubnSox2-Cre-KO* mutants.

However the formation of the cephalic mesenchyme including in the pharyngeal region appears to be perturbed.

Fgf signaling is deficient in E8.75 CubnSox2-Cre-KO mutants.

We analyzed the phosphorylation of the known Tgf- β /BMP, Wnt and Fgf signaling effectors in anterior cephalic extracts of E8.75-E9.0 control and mutant embryos (Eswarakumar, Lax, and Schlessinger 2005; Itasaki and Hoppler 2010; Shi and Massague 2003; Turner and Grose 2010). Similar expression levels of Phospho Smad1/5/8 and Phospho Smad2 suggested that Tgf- β /BMP activity was unaffected in the mutants (Fig. 3J). Wnt and Fgf signaling catalyze phosphorylation of Smad1 in the linker region, predominantly at Ser206 (Eivers, Demagny, and De Robertis 2009; Sapkota, Alarcon, Spagnoli, Brivanlou, and Massague 2007) constraining thus Bmp activity. We could not detect Smad1 phosphorylated at Ser206 in the mutants (Fig. 3J). The levels of β -catenin and phosphorylated β -catenin were similar in control and mutant extracts (Fig. 3J) suggesting unmodified Wnt activity. We next analyzed the phosphorylation of Akt and ERK1/2 which mediate the intracellular responses downstream to Fgf/FgfR1-3 signaling in the anterior head (Regad, Roth, Bredenkamp, Illing, and Papalopulu 2007; Shinya, Koshida, Sawada, Kuroiwa, and Takeda 2001). The levels of Akt were unchanged but the levels of ERK1/2 which triggers linker phosphorylation of Smad1 (Sapkota, Alarcon, Spagnoli, Brivanlou, and Massague 2007) were clearly decreased in the mutant extracts (Fig. 3K) suggesting decreased Fgf activity. However, the unaltered levels of FgfR1-3 and Akt (Fig. 3K) indicated that Fgf signaling was, at least partly, operating in the mutants and this was consistent with the

normal forebrain patterning (Regad, Roth, Bredenkamp, Illing, and Papalopulu 2007). Taken together these results support the idea that in *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants Fgf signaling is not fully efficient and that unrestricted Bmp activity may be the consequence of this defect.

The high affinity binding of Fgf8 to Cubn leads to efficient ERK1/2 and Smad1 linker phosphorylation.

Fgf8 the best studied Fgf ligand during head morphogenesis and the structurally similar Fgf17 (Guillemot and Zimmer 2011) were co-immunoprecipitated with Cubn in anterior cephalic extracts of wild-type E8.75-9.0 embryos but Fgf2 and the ANR produced Fgf3 and Fgf15 were not. (Fig. 4A). Wnt1, Wnt8b, Wnt3, Bmp7 or Noggin were not detected in the immunoprecipitates (Fig. S5A). Recombinant mouse Fgf8a and Fgf8b, the two biologically active Fgf8 isomorphs (Guo, Li, Sunmonu, and Li 2010;Olsen, Li, Bromleigh, Eliseenkova, Ibrahimi, Lao, Zhang, Linhardt, Joyner, and Mohammadi 2006), bound in a Ca²⁺-dependent manner and with equally high affinity to a purified Cubn chip (Fig. 4B) as demonstrated by surface-plasmon resonance (SPR) analysis. The dissociation constant (K_d) was calculated to 20 nM, a value orders of magnitudes higher than those reported for binding of Fgf8b and Fgf8a to their established receptors (K_ds ~126-492 nM and 1-2.5 mM, respectively)(Olsen, Li, Bromleigh, Eliseenkova, Ibrahimi, Lao, Zhang, Linhardt, Joyner, and Mohammadi 2006). The equally high affinity of Fgf8a, the shorter Fgf8 isoform, and Fgf8b for Cubn indicated that the binding site of Fgf8 to Cubn was localized in the common core of the Fgf8-subfamily members. Binding of Fgf8a or Fgf8b to Cubn was neither enhanced nor

inhibited by recombinant FgfR1 or FgfR2 (Fig. S5B) indicating i) that the binding sites of Fgf8 to Cubn and to FgfRs are distinct, ii) that FgfRs and Cubn do not directly interact and iii) that Cubn, Fgf8 and FgfRs do not form ternary complexes. Fgf8b did not bind to a control chip with immobilized Lrp2, a molecular partner of Cubn expressed in the neuroepithelium (Christ, Christa, Kur, Lioubinski, Bachmann, Willnow, and Hammes 2012). A very low affinity in the micromolar range was recorded for recombinant mouse Bmp7, which interacted also with the control Lrp2 chip (not shown). To further characterize the interaction between Cubn and Fgf8 we incubated Fgf8b with overlapping recombinant Cubn constructs encoding the CUB domains 1-8, 7-14, 13-20 and 19-27 (Kristiansen, Kozyraki, Jacobsen, Nexø, Verroust, and Moestrup 1999). Immunoprecipitation with sepharose-bound anti-Cubn and anti-Fgf8b antibodies identified CUB domains 1-8 and 7-14 as the most likely involved in the interaction with Fgf8b (Fig. 4C). To directly assess the role of Cubn in the phosphorylation of ERK1/2 and Smad1 linker we incubated Cubn expressing BN/MSV cells (Nykjaer, Fyfe, Kozyraki, Lehestø, Jacobsen, Nielsen, Verroust, Aminoff, de la, Moestrup, Ray, Gliemann, Willnow, and Christensen 2001) with recombinant Fgf8b for five minutes without the addition of heparin, a component required for all Fgf-FgfR interactions (Mohammadi, Olsen, and Goetz 2005). In parallel, we incubated BN/MSV cells with recombinant heparin-bound Fgf2. Phosphorylation of ERK1/2 and Smad1 linker was first detectable five minutes after addition of Fgf8b or Fgf2- heparin and was sustained over the time of the experiment, i.e. 60 min (Fig. 4D). In Fgf8b-treated cells endocytosis blocking anti-Cubn antibodies (Le Panse, Galceran, Pontillon, Lelongt, van de, Ronco,

and Verroust 1995) or bioactivity neutralizing anti-Fgf8b antibodies (100µg/ml) prevented the phosphorylation of both ERK1/2 and Smad1 linker (Ser206) whereas control IgG had no effect (Fig. 4D). In contrast, in Fgf2-heparin treated cells the phosphorylation of neither ERK1/2 nor Smad1 linker was modified by anti-Cubn antibodies. These results demonstrate that Fgf8 is a specific high affinity ligand for Cubn and that binding of Fgf8 to plasma membrane Cubn results in active Fgf8 signaling.

Synergistic interplay between *Cubn* and *Fgf8* during head formation.

Quantitative RT-PCR analysis showed that *XCubn* mRNA was enriched in the anterior neural plate of neurula stage frog embryos and this was confirmed at the protein level (Fig. S6A, B). We depleted *Cubn* in the left side of the head by microinjecting translation-blocking antisense morpholino nucleotides (Fig. S6C) into the left dorso-animal blastomere of 8-cell stage embryos. The morpholinos did not modify the expression of *XFgf8* in the ANR nor the isthmus (Fig. 5A, A'). However, they both led to reduction of the expression domain of *FOxg1* (Fig. 5B, B') and of the general head marker *XOtx2* (Fig. 5C, C') as well as to hypoplasia of the telencephalic and eye vesicles (Fig. 5D and Fig. S6D). The hypoplasia was most likely due to apoptosis as evidenced by the increased levels of activated caspase-3 in the treated embryos (Fig. 5E). Forebrain hypoplasia and reduced *Foxg1* expression were equally observed after depletion of *XFgf8* (Fig. 5F). We next identified concentrations of *XCubn* and *XFgf8* morpholinos, which did not modify telencephalic development and *FOxg1* expression when injected individually (Fig. 4G, H). Combined these morpholinos induced severe

telencephalic hypoplasia evidenced by the complete downregulation of *XFoxg1* in two independent experiments and in 24 out of 27 doubly-injected embryos (Fig. 5I, J and Fig. S6E). Thus *XCubn* and *XFgf8* act synergistically during telencephalic and head morphogenesis.

***Cubn* and *FgfR3* are together required for CNCC survival and head formation.**

In the chick embryo, before CNCC migration, at the 5 ss, low levels of *Cubn* are detectable in the cephalic ectoderm (CE) flanking the ANR region and in the neural folds at the level of the prospective fore-, mid- and rostral hindbrain (Fig. S7A, B). After neural tube closure and CNCC migration *Cubn* remains restricted to the prospective anterior CE, rostroventral forebrain and post-migratory CNCC (Fig. S7C-E). To gain insight into the function of *Cubn* expressed in non-neural tissues we silenced endogenous *Cubn* specifically in the anterior CE and/or the cephalic neural folds, i.e. the presumptive CNCC, by electroporating *dsCubn* mRNA at the 5 ss. Twenty-four hours later, i.e. at the 25 ss, and independently of the experimental design used head morphogenesis was severely affected (Fig. 6A-B', G-H') and the head volume was reduced by 42% in the treated embryos compared to the controls (n=10). In the forebrain of the electroporated embryos the expression domains of *Foxg1* (Fig. 6C, C', I) and *Otx2* (Fig. 6D, D', J) were reduced and *Fgf8* was readily detected in the ANR and isthmus (Fig. 6E, E'). Extensive cell death, mainly in the cephalic mesenchyme was observed as soon as the morphological defects were obvious i. e. at the 18 ss (Fig. 6F, F') indicating that *Cubn* was essential for anterior cell survival. To confirm that *Cubn*-depleted neural folds did not respond to Fgf8 we added Fgf8b soaked beads in contact

with the ANR of *dsCubn* treated embryos (Fig. 6K-K”), an experimental condition known to promote CNCC migration and survival in the anterior head and *Foxg1* expression in the forebrain (Creuzet 2009;Ohkubo, Chiang, and Rubenstein 2002;Shimamura and Rubenstein 1997). Addition of Fgf8b did not rescue the *dsCubn* head defects. *Foxg1* was not induced in the forebrain of the treated embryos (Fig. 6K-K”), suggesting that the *Cubn*-depleted tissues could not respond to Fgf8b. We hypothesized that deficient Fgf signaling in the CNCC and CE would result in unrestricted pro-apoptotic BMP activity in the *dsCubn*-treated embryos. Reduction of the Bmp activity by over-expression of RCAS-*Noggin* in the CNCC indeed rescued the head phenotype (Fig. 7A-A”) indicating that cell death and head hypoplasia in the *dsCubn* treated embryos were due to imbalanced pro-survival Fgf and pro-apoptotic BMP activities. *FgfR3*, *FgfR1* and to a lesser extent *FgfR2* are expressed in the presumptive CNCC and CE (Lunn, Fishwick, Halley, and Storey 2007;Walshe and Mason 2000) in a pattern similar to *Cubn*. Silencing of *FgfR3* at the 5 ss resulted in forebrain and facial hypoplasia (Fig. 7B-C’) almost as severe as that seen in *dsCubn* treated embryos whereas electroporation with *dsFgfR1* or *dsFgfR2* did not affect head development (Fig. 7B”-C”). We therefore depleted the CE and cephalic neural folds from both *Cubn* and *FgfR3*. This double *Cubn-FgfR3* depletion aggravated the individual phenotypes (Fig. 7B’, 7D’) and lead to severe cephalic hypoplasia (Fig. 7D”) and lethality the day following the electroporation. Taken together these results provide additional evidence that *Cubn* is required for fully active FgfR signaling and that, at least in the chick, anterior cell survival and head

morphogenesis depend on signals conveyed by both *Cubn* and *FgfR3* in the CNCC and CE.

Discussion

In this paper we show that embryonic *Cubn* is required for normal vertebrate head development. *Cubn* binds *Fgf8* with high affinity (KD ~20 nM) in an *FgfR*-independent manner and contributes to *Fgf8-FgfR* induced activation of ERK1/2 promoting thus early anterior cell survival (Fig. 7E).

Embryonic *Cubn* controls anterior cell survival but not forebrain patterning.

Cubn expressed in the CNCC is crucial for anterior cell survival, forebrain and facial morphogenesis. This is first indicated in the mouse embryo by the distinct effects of epiblast versus telencephalic-specific inactivation of mouse *Cubn*: loss of embryonic *Cubn* leads to increased cell death, altered CNCC distribution and rostral head hypoplasia by E9.25-9.5 whereas ablation of telencephalic *Cubn* at ~E9.0 does not modify head morphogenesis. Similarly, increased cell death and cephalic hypoplasia are observed in morphants lacking *XCubn* in both the presumptive neural plate and crest. Finally, specific silencing of chick *Cubn* in the CNCC, rapidly compromises anterior cell survival and head morphogenesis. *Cubn* is not absolutely required for forebrain patterning. In the mouse embryo, despite the reduction of the forebrain tissue the rostral signaling center and the isthmus are formed and maintained and the dorsoventral distribution of *Fgf8*, *Fgf17*, *Foxg1*, *Six3*, *Emx2*, *Wnt8b*, *En2* is unaffected at E9.25, indicating that Bmp-, Wnt-, Shh-, RA- and Fgf-signaling pathways are operating

in the mutants (Hoch, Rubenstein, and Pleasure 2009; Ribes, Wang, Dolle, and Niederreither 2006). The lack of *Shh* and *Nkx2.1* specifically in the preoptic area is the only forebrain defect. This defect previously described in *Fgf8* hypomorphs (Storm, Garel, Borello, Hebert, Martinez, McConnell, Martin, and Rubenstein 2006), may be explained by deficient *Fgf8*-signal reception within the neuroepithelium of the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants implicating *Cubn* in early ventral forebrain development. Forebrain patterning is equally preserved in the frog and chick embryos after *Cubn* silencing as shown by the normal distribution of *Fgf8*, *Foxg1* and *Otx2* in the hypoplastic forebrain and/or midbrain or isthmus. Thus *Cubn* is a novel, essential and conserved modulator of anterior cell survival, but not patterning, in the developing vertebrate head.

Cubn and Fgf8 counteract pro-apoptotic Bmp activity.

On the basis of our current knowledge (Borello, Cobos, Long, McWhirter, Murre, and Rubenstein 2008; Creuzet 2009; Paek, Hwang, Zukin, and Hebert 2011; Ribes, Wang, Dolle, and Niederreither 2006; Woodhead, Mutch, Olson, and Chenn 2006) the increased rate of cell death in the anterior head of the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants results from a disequilibrium between pro-apoptotic Bmp and synergistic anti-apoptotic Wnt and Fgf activities. Fine-tuning of this equilibrium depends on the phosphorylation of the main Bmp effector Smad1. Bmps promote C-terminal phosphorylation of Smad1/5/8 which is required for Bmp signaling (Eivers, Demagny, and De Robertis 2009). This process is identical in wild-type and *Cubn Sox2-Cre-KO* mutant embryos indicating that i) the intensity of the Bmp signal is not modified and ii) that RA activity which promotes degradation of C-terminal phosphorylated Smad1 (Sheng, Xie, Wang, Bai, Zhang, Zhu,

Song, Guillemot, Chen, Lin, and Jing 2010) is normal. We thus cannot find any evidence for increased pro-apoptotic stimuli in the mutants. On the anti-apoptotic side, Fgfs and Wnts mediate two sequential phosphorylations of the Smad1 linker region, which limit the duration of the Bmp signal (Sapkota, Alarcon, Spagnoli, Brivanlou, and Massague 2007). In our model, as early as E8.75 before any morphological abnormality can be seen, phosphorylation of Smad1 linker is undetectable indicating prolonged apoptotic activity. There is no evidence to link deficient Smad1 linker phosphorylation with deficient Wnt activity since the expression levels of the Wnt targets β -catenin and phosphorylated β -catenin are normal. In contrast, the decreased levels of phosphorylated ERK1/2 in the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants suggest decreased activity of the Fgf/ERK1/2 pathway, which is normally required to prime Smad1 linker for a second phosphorylation by Wnts (Sapkota, Alarcon, Spagnoli, Brivanlou, and Massague 2007). Direct evidence for the involvement of Cubn in the Fgf8/ERK1/2 pathway comes from *in vitro* studies of Cubn expressing BN/MSV cells. In this model, the phosphorylation of ERK1/2 is similarly induced by Fgf8b or by heparin-bound Fgf2. In contrast, anti-Cubn or anti-Fgf8b antibodies block selectively the phosphorylation of ERK1/2 and the phosphorylation of Smad1 linker promoted by Fgf8b. We propose that absence of Smad1 phosphorylated in the linker region in the *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants is due to a not fully efficient Fgf signaling and to a subsequently prolonged Bmp signal duration. The rescue of the phenotype of *dsCubn* mRNA treated chick embryos by the over-expression of the Bmp antagonist Noggin confirms this conclusion and

shows that *Cubn* is absolutely necessary *in vivo* for an efficient Fgf-Bmp cross-regulation and anterior cell survival.

Cubn, a novel Fgf8 receptor and FgfRs co-operate for anterior head survival.

Our results show that *Cubn*, *Fgf8* and *FgfRs* are together required to convey survival signals in the anterior head. Joint silencing of *Cubn* and *Fgf8* in the early frog embryo aggravates the individual effects and double *Cubn* and *FgfR3* downregulation in the chick CNCC results in almost complete head truncation and embryonic death indicating that *Cubn*, *Fgf8* and *FgfRs* act within the same conserved pathway. How this cooperation occurs at the cell level is not known. The sub-cellular distribution of *FgfRs* *in vivo* has not been reported extensively in the developing brain but cell surface availability may be low (Regad, Roth, Bredenkamp, Illing, and Papalopulu 2007). Gutin et al (Gutin, Fernandes, Palazzolo, Paek, Yu, Ornitz, McConnell, and Hebert 2006) postulated the existence of extracellular and/or intracellular modulators that would impart specificity in Fgf-responsiveness. In this context, *Cubn*, which binds to the core region of *Fgf8* with high affinity could “focus” members of the *Fgf8* family to specific cell types, including the CNCC, and allow internalization of *Fgf8* independently of *FgfRs*. Still in the same context it is relevant to note that *Cubn* is absolutely required for only some aspects of *Fgf8*-mediated effects: *Erk1/2* and *Smad1* linker phosphorylation. *Cubn* is dispensable for *Akt* phosphorylation and dependent activities including telencephalic expression of *Foxg1* (Regad, Roth, Bredenkamp, Illing, and Papalopulu 2007), which is unaffected in *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants. Hypotheses to account for the subsequent steps, in particular how *Fgf8* becomes available for *FgfR* activation,

must take into account the distinct binding properties of Fgf8 to Cubn and to FgfRs. Cubn does not interact with FgfR1 or FgfR2 and because of structural similarities, most likely with the other FgfRs (Olsen, Ibrahimi, Raucci, Zhang, Eliseenkova, Yayon, Basilico, Linhardt, Schlessinger, and Mohammadi 2004). Thus Cubn, Fgf8 and FgfRs do not form ternary complexes but Cubn-bound Fgf8 may dissociate from Cubn within the intracellular compartments, as all the known Cubn ligands (Kozyraki, Fyfe, Verroust, Jacobsen, Dautry-Varsat, Gburek, Willnow, Christensen, and Moestrup 2001), and activate FgfRs. In conclusion, Cubn is a novel receptor for Fgf8 and most likely the Fgf8-subfamily members Fgf17 and Fgf18, necessary for efficient activation of FgfRs and cell survival during early head morphogenesis. We propose that Cubn facilitates FgfR activation by increasing Fgf-ligand availability. Cubn-assisted Fgf endocytosis may be a mechanism for fully active FgfR signaling in all Cubn-expressing tissues.

Experimental procedures

Supplemental Information accompanies this paper; seven supplemental figures with legends and one supplemental table

Acknowledgements

This work was supported in part by INSERM, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, EuReGene (FP6, GA#5085), CNRS-ANR (ANR-BLANC-0153), CNRS-ANR-06-BLANC-0200, the GEFLUC-Paris Ile de France, the Novo Nordisk Foundation and the Lundbeck foundation. DPA is recipient of a fellowship from Fondation des Treilles. We wish to thank Ronan Le Bouffant and Isabelle Buisson for qRT-PCR studies, A. Brändli

for *XCubn* plasmid, A. Camus, Laure Bally-Cuif, U. Borelo, A. Pierani and S. Schneider-Maunoury for discussions and critical reading of the manuscript, and J. A Sahel for constant support. The technical assistance of S. Thomasseau and I. Anselme is acknowledged.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Inactivation of *Cubn* expressed in the ventral forebrain and cephalic mesenchyme before E9.0 leads to hypoplasia of the rostral head tissues. **(A)** horizontal cryostat section through the optic evagination of an E8.5 embryo showing expression of *Cubn* in the ventral neuroepithelium (asterisk) and the presumptive neural crest at the level of the neural folds (nf), the first branchial arch (arrow) and the midbrain (arrowhead); anterior is down; **(B)** whole-mount immunodetection of *Cubn* in the cephalic mesenchyme of the fore-, mid- (arrow) and hindbrain (r2-r3) at E9.0; lateral view; **(C, D)** immunodetection of *Cubn* (C) and the neural crest marker *Tfap2α* (D) on adjacent sagittal cryostat sections showing partially overlapping expression patterns in the cephalic mesenchyme (arrows) and the surface ectoderm at E9.0 (arrowheads). *Cubn* is also detected in the prospective forebrain (C); **(E, I')** Morphology of *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants and wild-type littermates between E8.5-E11.5. **(E, E')** Normal morphology of *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants at E8.5; frontal view; **(F-G')** The mutant telencephalon (tel), eye (asterisk in F') and frontonasal process (fnp, arrow in F') are reduced at E9.5 and 10.5 (F', G'); lateral view; **(H, H')** sagittal cryostat section showing a marked reduction of the mutant ventral and dorsal telencephalon; **(I, I')** severe hypoplasia of the anterior head structures, including the telencephalon and frontonasal process (arrow) at E11.5; **(J, K')** The telencephalic inactivation of *Cubn* does not alter gross anatomical organization of the telencephalon, except for the corpus callosum formation at both anterior (J, J') and posterior (K, K') levels. (ce) cephalic ectoderm, (di) diencephalon, (dtel) dorsal telencephalon, (dt) dorsal thalamus, (fb) forebrain, (fp)

floorplate, (ht) hypothalamus, (mes) mesencephalon, (vtel) ventral telencephalon, (vt) ventral thalamus, (pt) pretectum. Scale bar 200µm in A-D, 400µm in E, F, 120µm in J-K'.

Figure 2. Increased cell death and globally maintained forebrain patterning in *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants. (**A, A'**) Representative lateral views of embryos stained with Lysotracker (in red) and anti-phospho Histone H3 (in green). Dotted lines demarcate the ventral cephalic region (v), dorsal cephalic region (d) and diencephalic region (di) of E9.25 control (**A**) and mutant (**A'**) embryos. Cell proliferation is similar at E9.25 (**B**) whereas the number of Lysotracker+ cells is significantly increased (**C**) in the mutant forehead (mean $\pm$ s.e.m, n=3 embryos of each genotype; Student's t-test, $P<0.05$). Representative whole-mount mRNA staining of control (**D-M**) and mutant (**D'-M'**) embryos around E9.25. (**D, D'**) reduced expression domain of *Foxg1* in the mutant telencephalon (arrows); (**E, E'**) *Fgf8* is normally expressed in the commissural plate (arrow) and the isthmus (ist); (**F, F'**) *Fgf17* is normally detected at the commissural plate (arrowheads) and isthmus; (**G, G'**) reduced expression domain of *Six3* in the ventral telencephalon (arrow) and eye region (arrowhead); (**H, H'**) *Shh* is lost in the mutant preoptic area (arrow); (**I, I'**) downregulation of *Nkx2.1* in the mutant preoptic area (arrow) but not the hypothalamus (arrowhead); (**J, J'**) the dorsal domain of *Emx2* is conserved; (**K, K'**) *Tfap2a* displays a patchy distribution in the mutant telencephalon and periocular region (arrows); (**L, L'**) Downregulation of *Dlx5* in the mutant rostro-ventral cephalic tissues (asterisk). (**M, M'**) Patchy *Dlx2* expression in the mutant rostral

cephalic tissues (arrowheads), and in migratory cephalic neural crest cells that contribute to the neurogenic sensory cranial ganglia (snc; arrows). *Dlx2* is normally expressed in the mandibular (md) component of the first branchial arch and in the hyoid (h). Lateral views, anterior is to the left. Scale bar 125µm.

Figure 3. Normal forebrain and neural tube regionalization, but reduced activation of ERK1/2 in E8.75 *Cubn Sox2-Cre-KO* mutants. (**A, A'**) Representative lateral views of embryos stained with Lysotracker (in red) and anti-phospho Histone H3 (in green). Dotted lines demarcate the forebrain region in confocal sections of an 8 ss control (**A**) and mutant (**A'**) embryo. Nuclei colored by Hoechst are shown in blue. Representative whole-mount mRNA staining of control (**B-I**) and mutant (**B'-I'**) embryos at E8.75; (**B, B'**) normal *Fg8* expression in the ANR (arrow) and the isthmus (arrowhead); (**C, C'**) *Foxg1* is expressed in the anterior neural plate (arrow); it is reduced in the mutant pharyngeal region (arrowhead); (**D, D'**) *Noggin* is normally detected in the rostral axial mesendoderm (arrowhead) and the rostral lateral ectoderm (arrow); (**E, E'**) Normal expression of *Wnt1* in the developing midbrain (arrowheads) and of (**F, F'**) *Wnt8b* in the developing caudal forebrain (arrow); (**G, G'**) *Tfap2α* is normally expressed in the dorsal neural folds (arrowhead). (**H, H'**) *Msx1* is detected in the dorsal neural folds and cephalic mesenchyme; dorsal views at the level of the prospective midbrain (arrowhead) and hindbrain; (**I, I'**) *Noggin* is found in a strip of cells between the rostral-most cephalic mesenchyme and the border of the rhombencephalon (r2-r3). In the mutant, this lateral strip appears narrower. Frontal views (B-D'); lateral views with the

anterior to the left (E-F', I, I'); dorsal views (G-H'). (J) Immunoblot analysis of cephalic extracts for phospho-Smad2, phospho-Smad1/5/8, phospho-Smad1Linker, phospho- β -catenin and β -catenin; (K) phospho-Erk1/2 is decreased whereas phospho-Akt is maintained. The levels of FgfR1, FgfR2c and Fgfr3c are normal in the mutants. Scale bar 200 μ m.

Figure 4. Cubn binds Fgf8 *in vivo* and *in vitro*, and contributes to Fgf8-ERK signaling.

(A) Co-immunoprecipitation of Fgf8 and the structurally similar Fgf17 with Cubn; Fgf2, Fgf3 or Fgf15 do not interact with Cubn; (B) SPR analysis on immobilized Cubn. Fgf8a and Fgf8b bind with equally high affinity to Cubn; (C) immunoprecipitation of the “mini-proteins” CUB1-8, 7-14, 13-20, 19-27 pre-incubated with recombinant Fgf8b without heparin, with anti-Fgf8b and anti-Cubn antibodies. Fgf8b preferentially co-immunoprecipitates with CUB1-8 and CUB7-14; (D) incubation of serum-deprived BN/MSV cells with either 5ng/ml of recombinant Fgf8b without heparin or recombinant Fgf2-heparin results to similar phosphorylation of ERK1/2 and Smad1Linker. Anti-Cubn antibodies or anti-Fgf8b antibodies block the phosphorylation of ERK1/2 and Smad1Linker specifically in Fgf8b treated cells. Control IgG has no effect.

Figure 5. *XCubn* and *XFgf8* are together necessary for telencephalic and anterior head morphogenesis. Representative whole-mount mRNA staining of tailbud stage frog embryos unilaterally injected with control (A-C) and MoCubn (A'-C') morpholinos. (A, A') Normal *XFgf8* expression in the ANR (arrowhead) and the isthmus (arrow) of the

MoCubn treated embryos; **(B, B')** reduced *XFoxg1* expression domain in the developing telencephalon (arrowhead) and eye (arrow) after MoCubn injection; **(C, C')** reduced expression domain of *XOtx2* in the developing telencephalon (arrowhead), eye (arrow) and slightly in the midbrain of the MoCubn treated embryo; **(D)** telencephalic and eye (arrowhead) hypoplasia, and downregulation of *XFoxg1* mRNA staining in the injected part of the embryo (upper dotted line); **(E)** increased levels of cleaved caspase-3 in cephalic extracts of MoCubn treated embryos; **(F)** telencephalic hypoplasia and downregulation of *XFoxg1* in *MoFgf8* injected embryos; **(G, H)** low *MoFgf8* (0.5pmol) or *MoCubn* (0.25pmol) concentrations do not affect telencephalic development and *XFoxg1* expression; **(I)** strong reduction of *XFoxg1* in embryos co-injected with *MoCubn* and *MoFgf8* at the same low concentrations; **(J)** coinjection of MoCubn and MoFgf8 at the concentrations indicated strongly, weakly or not at all affects the expression of *XFoxg1*. The number of embryos analyzed is indicated. Scale bar 250µm.

Figure 6. *Cubn* in the CNCC is required for anterior cell survival and head morphogenesis in the chick embryo. **(A-B')** Electroporation of *dsCubn* in the premigratory cephalic neural crest (CNCC) leads to severe telencephalic (arrow), eye and facial hypoplasia at E2 **(A, A')** or E4 **(B, B')**. Representative whole-mount mRNA staining for *Foxg1*, *Otx2* and *Fgf8* in control **(CE)** and *dsCubn*-treated **(C'-E')** embryos. Silencing of *Cubn* in the CNCC leads to downregulation of *Foxg1* **(C, C')**, and *Otx2* **(D, D')** in the telencephalon whereas *Fgf8* **(E, E')** remains expressed in the ANR; **(F, F')** whole-mount Lysotracker staining ~ E1.5 shows enhanced cell death in the head at the

level of the rostral forebrain (thick arrow), the lateral cephalic mesenchyme (asterisk) and the ventral head mesenchyme (arrow) of a *dsCubn* treated embryo; **(G-H')** silencing of *Cubn* in the premigratory CNCC and the cephalic ectoderm leads to severe telencephalic, eye and facial hypoplasia (G, G'), and brain morphology is severely affected including in the diencephalon and mesencephalon (H, H'); **(I, J)** representative whole-mount mRNA staining for *Foxg1* (I), and *Otx2* (J) after *Cubn* silencing in the CNCC and CE. Despite correct patterning the *Foxg1* and *Otx2* domains are strongly decreased; **(K-K'')** addition of Fgf8b beads in *dsCubn* treated embryos neither modifies the expression domain of *Foxg1* nor rescues forebrain morphology. Lateral views, anterior is to the left. (di) diencephalon, (e) eye, (ist) isthmus, (mes) mesencephalon, (o) otic, (tel) telencephalon. Scale bars: A, A', C-E', I, J, and K-K'': 100µm; B, B': 600µm; G-H': 900µm.

Figure 7. *Cubn* and *FgfR3* convey Fgf signaling in the CNCC and CE during anterior head morphogenesis. **(A-A'')** Overexpression of *Noggin* in the CNCC of *dsCubn* treated embryos restores head and face morphology; representative gross **(B-B''')** and brain **(C-C''')** morphology of E5 embryos electroporated in the CNCC and cephalic ectoderm with *dsControl* (B, C), *dsFgfR3* (B', C'), *dsFgfR1* (B'', C''), and *dsFgfR2* (B''', C'''). Telencephalic (arrowhead) hypoplasia is observed exclusively in *dsFgfR3* treated embryos. **(D-D'')** Extremely severe head hypoplasia in double *dsCubn-dsFgfR3* electroporated embryos at E2 (D''); compare with *dsCubn*-treated embryos of the same stage (D'). **(E)** Proposed *Cubn*-Fgf8 interaction in the CNCC and CE. *Cubn* expressed

at the plasma membrane binds extracellular Fgf8, favors its endocytosis and increases its availability for FgfRs within the cell. Cubndependent FgfR activation together with Bmp antagonism, here via Noggin, is necessary to counter Bmp activity and promote CNCC and CE survival. Scale bars: A-C''': 900µm; DD'': 100µm.

Reference List

- Amsellem,S., J.Gburek, G.Hamard, R.Nielsen, T.E.Willnow, O.Devuyst, E.Nexo, P.J.Verroust, E.I.Christensen, and R.Kozyraki. 2010. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc.Nephrol.* **21**: 1859-1867.
- Anderson,R.M., R.W.Stottmann, M.Choi, and J.Klingensmith. 2006. Endogenous bone morphogenetic protein antagonists regulate mammalian neural crest generation and survival. *Dev.Dyn.* **235**: 2507-2520.
- Assemat,E., S.Vinot, F.Gofflot, P.Linsel-Nitschke, F.Illien, F.Chatelet, P.Verroust, S.Louvet-Vallee, F.Rinninger, and R.Kozyraki. 2005. Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol Reprod.* **72**: 1079-1086.
- Borello,U., I.Cobos, J.E.Long, J.R.McWhirter, C.Murre, and J.L.Rubenstein. 2008. FGF15 promotes neurogenesis and opposes FGF8 function during neocortical development *Neural Dev.* **3**: 17.
- Christ,A., A.Christa, E.Kur, O.Lioubinski, S.Bachmann, T.E.Willnow, and A.Hammes. 2012. LRP2 Is an Auxiliary SHH Receptor Required to Condition the Forebrain Ventral Midline for Inductive Signals *Dev.Cell* **22**: 268-278.
- Creuzet,S.E. 2009. Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **106**: 15774-15779.
- Creuzet,S.E., S.Martinez, and N.M.Le Douarin. 2006. The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **103**: 14033-14038.
- Dailey,L., D.Ambrosetti, A.Mansukhani, and C.Basilico. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 233-247.
- Eivers,E., H.Demagny, and E.M.De Robertis. 2009. Integration of BMP and Wnt signaling via vertebrate Smad1/5/8 and Drosophila Mad *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 357-365.
- Eswarakumar,V.P., I.Lax, and J.Schlessinger. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 139-149.
- Geng,X. and G.Oliver. 2009. Pathogenesis of holoprosencephaly *J Clin.Invest* **119**: 1403-1413.

Geng,X., C.Speirs, O.Lagutin, A.Inbal, W.Liu, L.Solnica-Krezel, Y.Jeong, D.J.Epstein, and G.Oliver. 2008. Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly *Dev.Cell* **15**: 236-247.

Guillemot,F. and C.Zimmer. 2011. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development *Neuron* **71**: 574-588.

Guo,Q., K.Li, N.A.Sunmonu, and J.Y.Li. 2010. Fgf8b-containing spliceforms, but not Fgf8a, are essential for Fgf8 function during development of the midbrain and cerebellum *Dev.Biol* **338**: 183-192.

Gutin,G., M.Fernandes, L.Palazzolo, H.Paek, K.Yu, D.M.Ornitz, S.K.McConnell, and J.M.Hebert. 2006. FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH *Development* **133**: 2937-2946.

Hayashi,S., P.Lewis, L.Pevny, and A.P.McMahon. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain *Gene Expr.Patterns* **2**: 93-97.

Hoch,R.V., J.L.Rubenstein, and S.Pleasure. 2009. Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain *Semin.Cell Dev.Biol* **20**: 378-386.

Itasaki,N. and S.Hoppler. 2010. Crosstalk between Wnt and bone morphogenic protein signaling: a turbulent relationship *Dev.Dyn.* **239**: 16-33.

Klingensmith,J., M.Matsui, Y.P.Yang, and R.M.Anderson. 2010. Roles of bone morphogenetic protein signaling and its antagonism in holoprosencephaly *Am J Med Genet C.Semin.Med Genet* **154C**: 43-51.

Kozyraki,R., J.Fyfe, P.J.Verroust, C.Jacobsen, A.Dautry-Varsat, J.Gburek, T.E.Willnow, E.I.Christensen, and S.K.Moestrup. 2001. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **98**: 12491-12496.

Kozyraki,R. and F.Gofflot. 2007. Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr.Pharm.Des* **13**: 3038-3046.

Kristiansen,M., R.Kozyraki, C.Jacobsen, E.Nexo, P.J.Verroust, and S.K.Moestrup. 1999. Molecular dissection of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, discloses regions important for membrane association and ligand binding. *J Biol Chem.* **274**: 20540-20544.

Le Panse,S., M.Galceran, F.Pontillon, B.Lelongt, P.M.van de, P.M.Ronco, and P.J.Verroust. 1995. Immunofunctional properties of a yolk sac epithelial cell line expressing two proteins gp280 and gp330 of the intermicrovillar area of proximal tubule cells: inhibition of endocytosis by the specific antibodies Eur J Cell Biol **67**: 120-129.

Liu,W., O.Lagutin, E.Swindell, M.Jamrich, and G.Oliver. 2010. Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate J Clin.Invest **120**: 3568-3577.

Lunn,J.S., K.J.Fishwick, P.A.Halley, and K.G.Storey. 2007. A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo Dev.Biol **302**: 536-552.

Mason,I. 2007. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development Nat Rev Neurosci. **8**: 583-596.

Mohammadi,M., S.K.Olsen, and R.Goetz. 2005. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs Curr.Opin.Struct.Biol **15**: 506-516.

Nykjaer,A., J.C.Fyfe, R.Kozyraki, J.R.Leheste, C.Jacobsen, M.S.Nielsen, P.J.Verroust, M.Aminoff, C.A.de la, S.K.Moestrup, R.Ray, J.Gliemann, T.E.Willnow, and E.I.Christensen. 2001. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **98**: 13895-13900.

Ohkubo,Y., C.Chiang, and J.L.Rubenstein. 2002. Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles Neuroscience **111**: 1-17.

Olsen,S.K., O.A.Ibrahimi, A.Rauci, F.Zhang, A.V.Eliseenkova, A.Yayon, C.Basilico, R.J.Linhardt, J.Schlessinger, and M.Mohammadi. 2004. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **101**: 935-940.

Olsen,S.K., J.Y.Li, C.Bromleigh, A.V.Eliseenkova, O.A.Ibrahimi, Z.Lao, F.Zhang, R.J.Linhardt, A.L.Joyner, and M.Mohammadi. 2006. Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of FGF8 in the brain Genes Dev. **20**: 185-198.

Paek,H., G.Gutin, and J.M.Hebert. 2009. FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival Development **136**: 2457-2465.

Paek,H., J.Y.Hwang, R.S.Zukin, and J.M.Hebert. 2011. beta-Catenin-dependent FGF signaling sustains cell survival in the anterior embryonic head by countering Smad4 Dev.Cell **20**: 689-699.

Regad,T., M.Roth, N.Bredenkamp, N.Illing, and N.Papalopulu. 2007. The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF Nat Cell Biol **9**: 531-540.

Ribes,V., Z.Wang, P.Dolle, and K.Niederreither. 2006. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling Development **133**: 351-361.

Rubenstein,J.L., K.Shimamura, S.Martinez, and L.Puelles. 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate Annu.Rev Neurosci. **21**: 445-477.

Sapkota,G., C.Alarcon, F.M.Spagnoli, A.H.Brivanlou, and J.Massague. 2007. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker Mol.Cell **25**: 441-454.

Sheng,N., Z.Xie, C.Wang, G.Bai, K.Zhang, Q.Zhu, J.Song, F.Guillemot, Y.G.Chen, A.Lin, and N.Jing. 2010. Retinoic acid regulates bone morphogenic protein signal duration by promoting the degradation of phosphorylated Smad1 Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **107**: 18886-18891.

Shi,Y. and J.Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus Cell **113**: 685-700.

Shimamura,K. and J.L.Rubenstein. 1997. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain Development **124**: 2709-2718.

Shinya,M., S.Koshida, A.Sawada, A.Kuroiwa, and H.Takeda. 2001. Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos Development **128**: 4153-4164.

Smith,B.T., J.C.Mussell, P.A.Fleming, J.L.Barth, D.D.Spyropoulos, M.A.Cooley, C.J.Drake, and W.S.Argaves. 2006. Targeted disruption of cubilin reveals essential developmental roles in the structure and function of endoderm and in somite formation BMC.Dev.Biol **6**: 30.

Storm,E.E., S.Garel, U.Borello, J.M.Hebert, S.Martinez, S.K.McConnell, G.R.Martin, and J.L.Rubenstein. 2006. Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers Development **133**: 1831-1844.

Turner,N. and R.Grose. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer Nat Rev Cancer **10**: 116-129.

Walshe,J. and I.Mason. 2000. Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo Mech.Dev. **90**: 103-110.

Woodhead,G.J., C.A.Mutch, E.C.Olson, and A.Chenn. 2006. Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation J Neurosci. **26**: 12620-12630.

Fig 1 - Cases et al.,

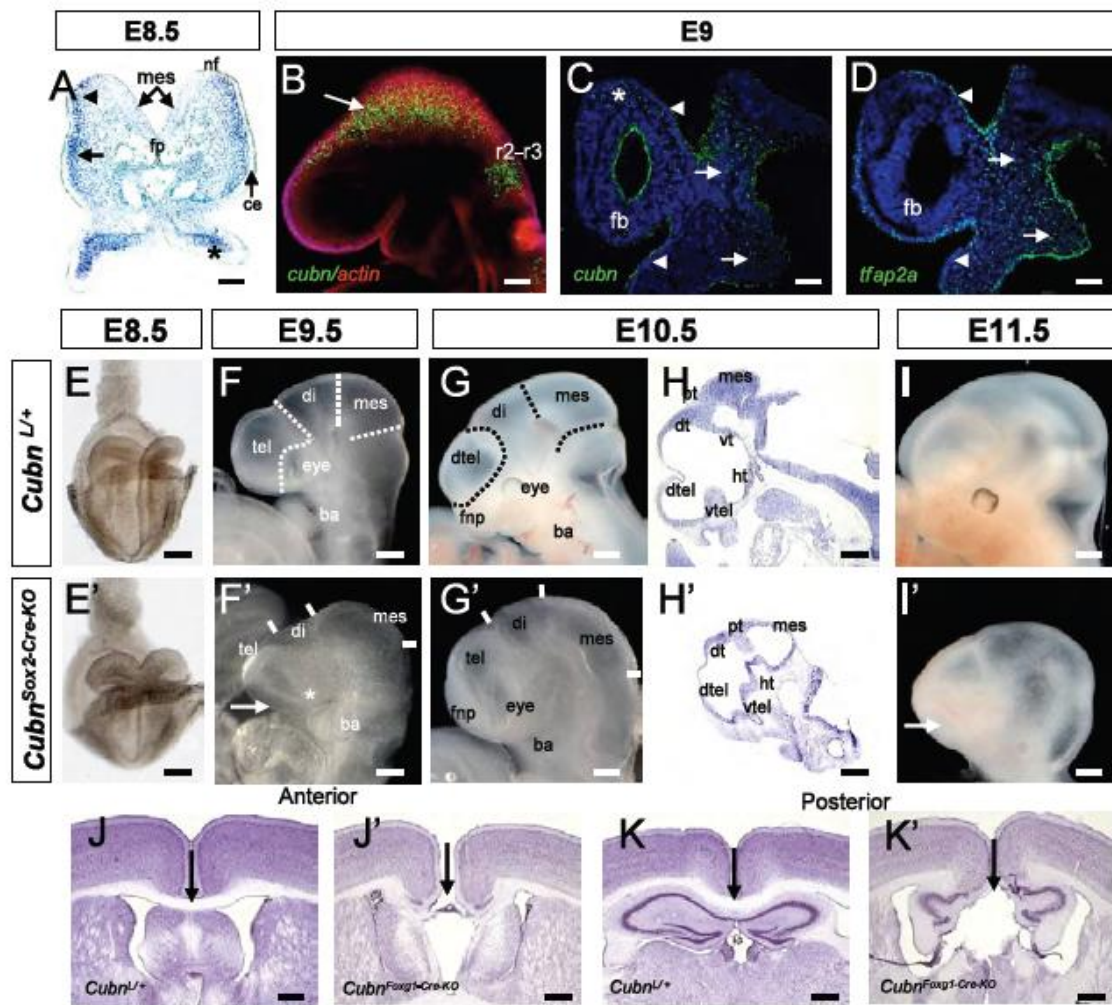


Fig 2 - Cases et al.,

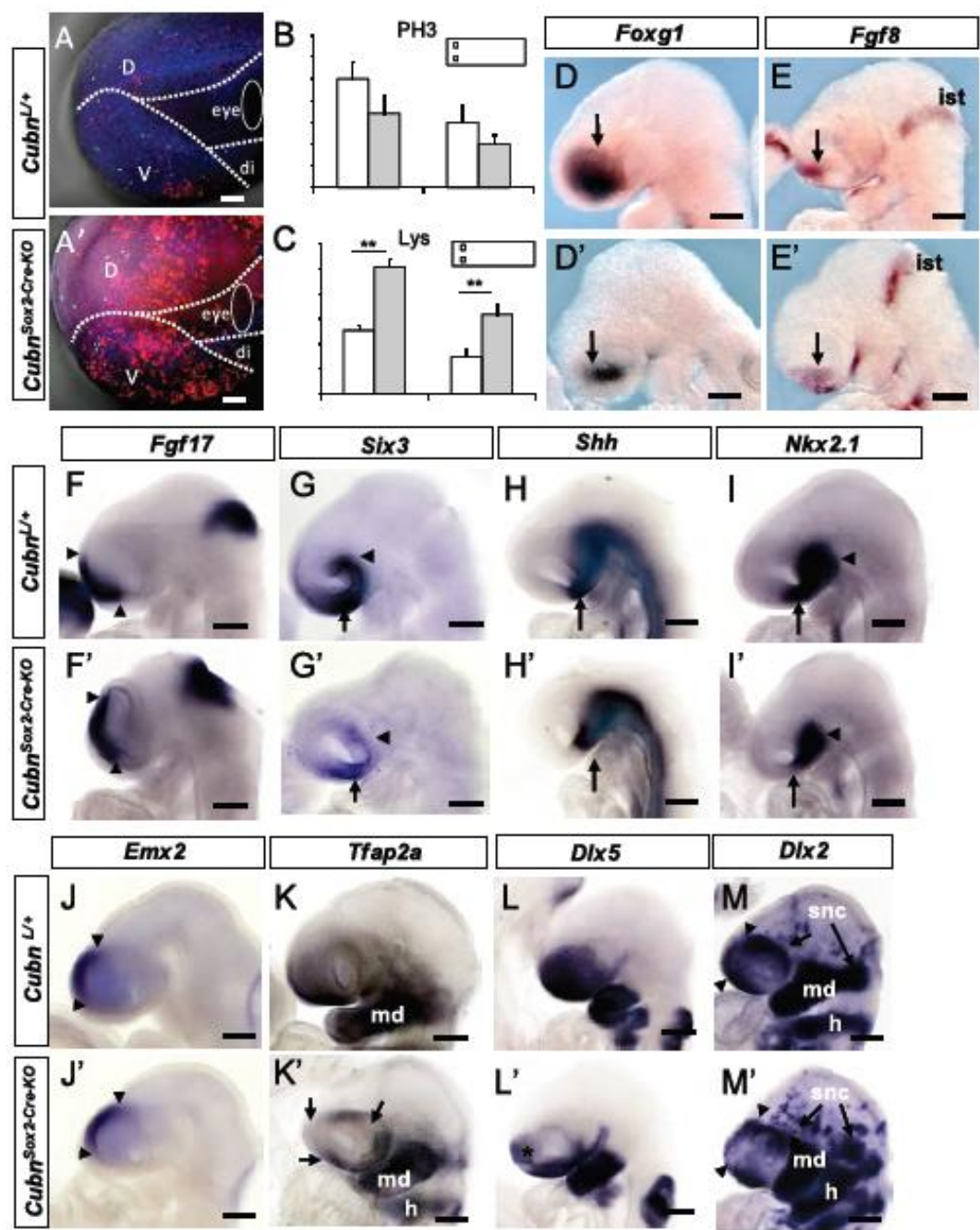


Fig 3 - Cases et al.,

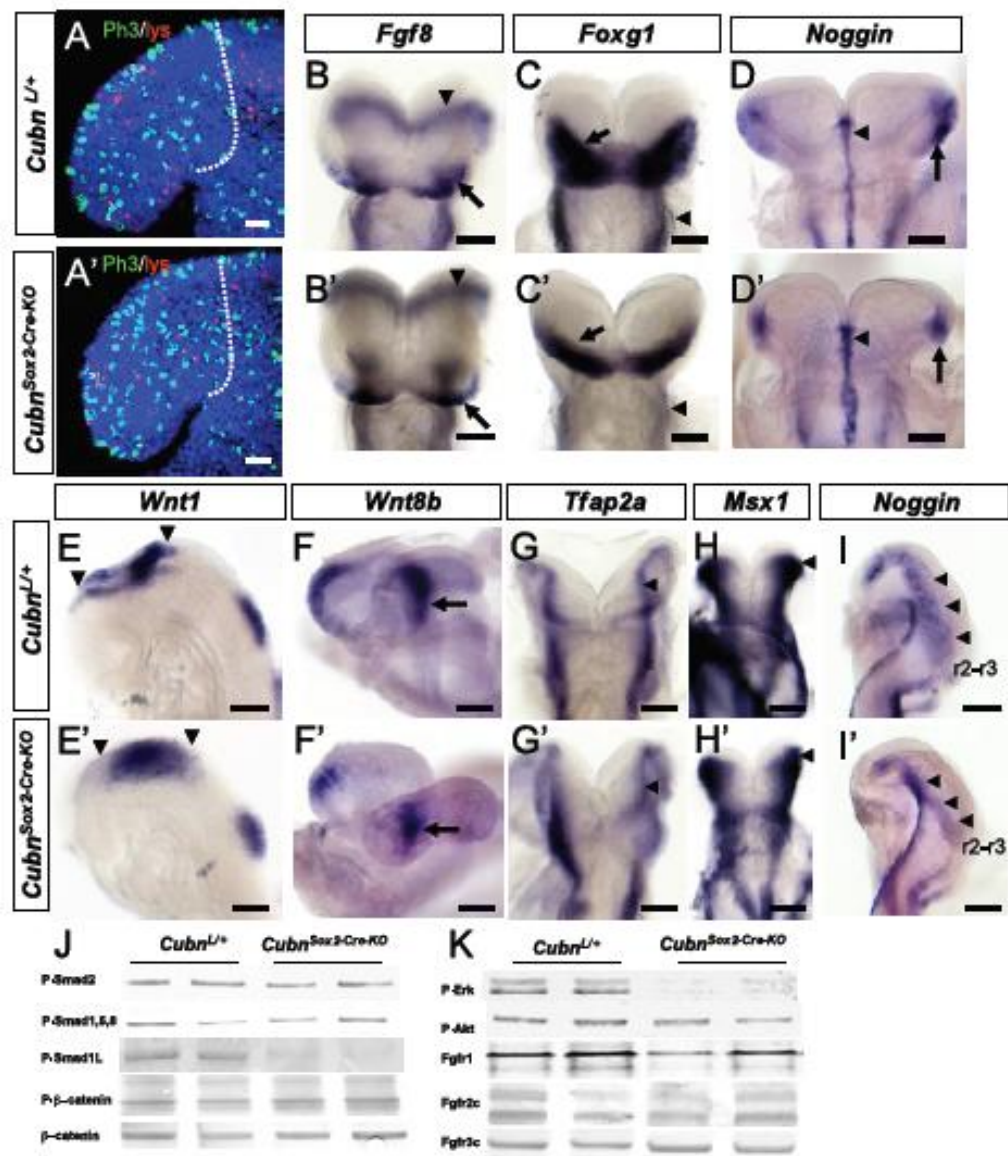


Fig 4 - Cases et al.,

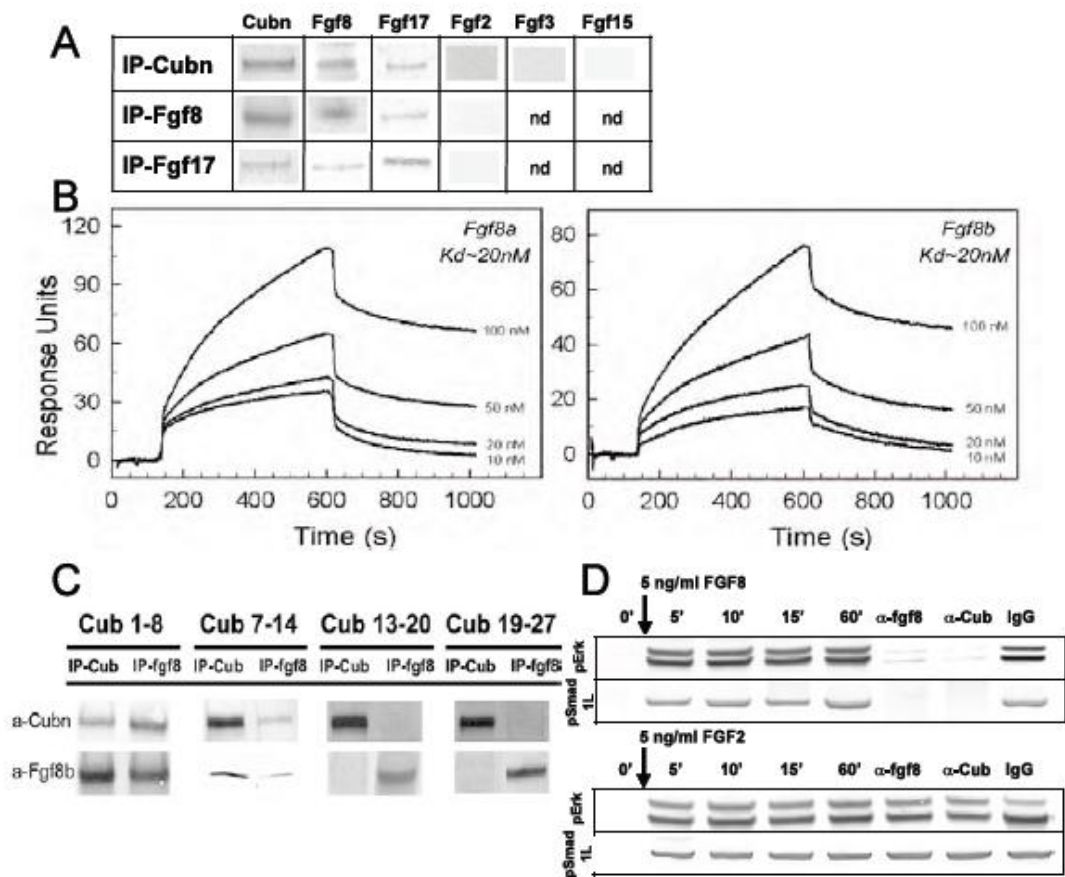


Fig 5 - Cases et al.,

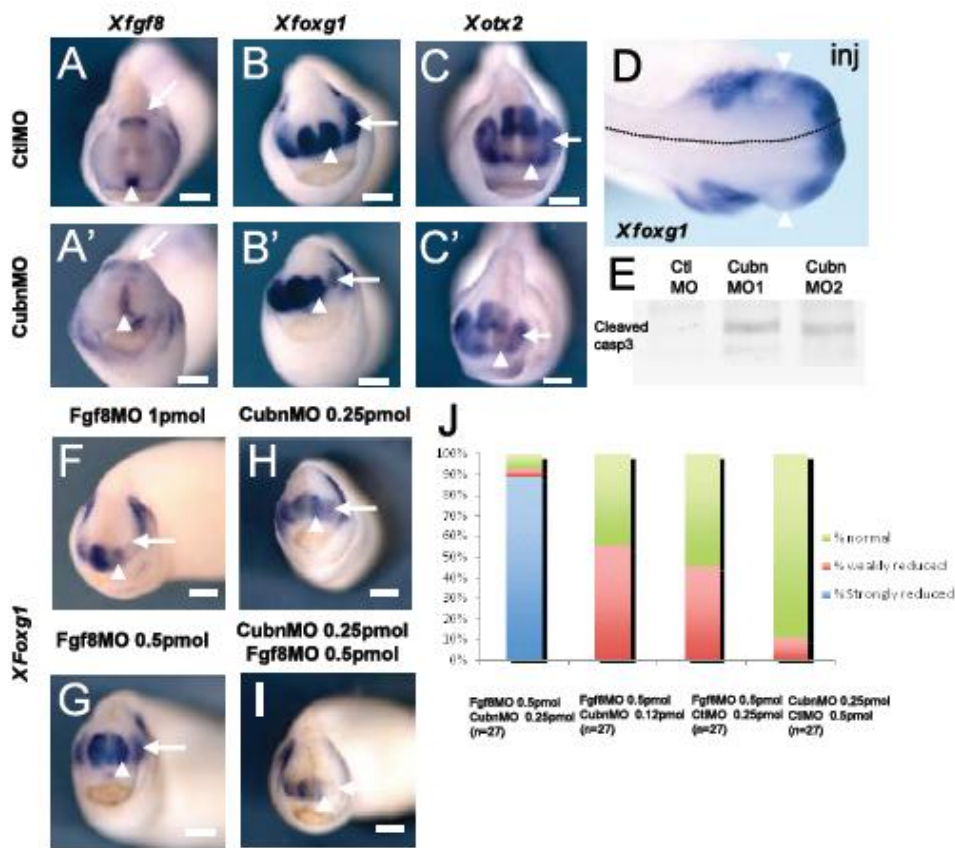


Fig 6 - Cases et al.,

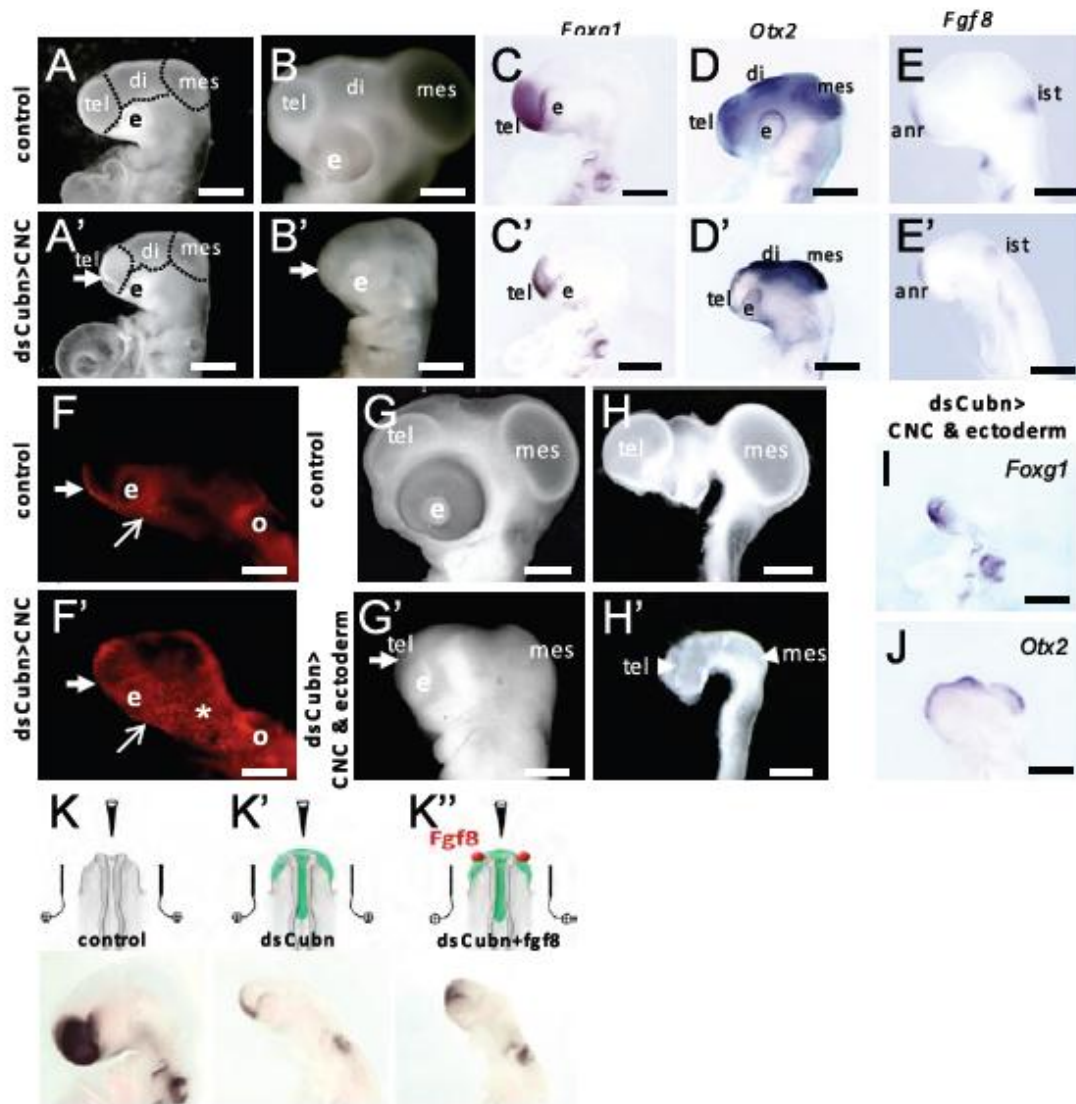
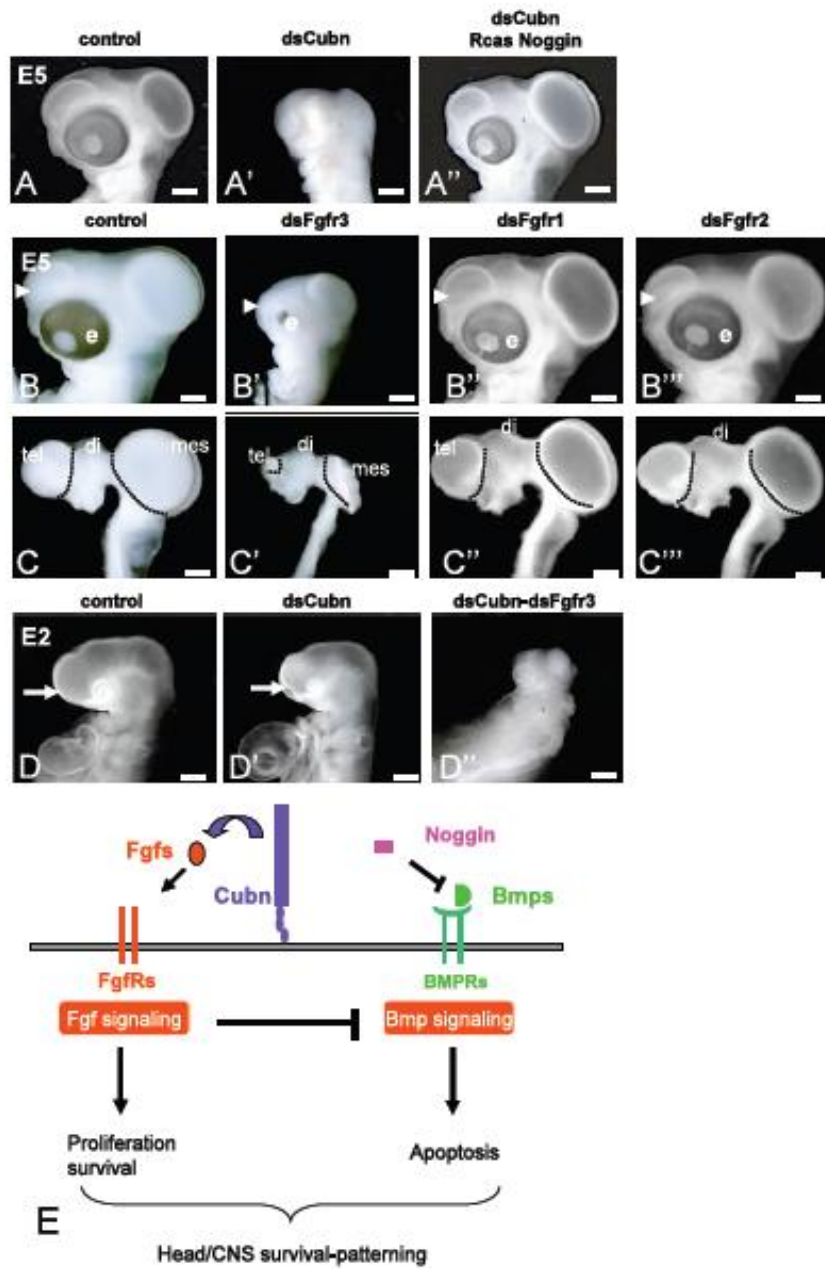


Fig 7 - Cases et al.,



Supplemental online information for

Cubilin is required for Fgf-promoted cell survival in the developing vertebrate head.

Olivier Cases, Aitana Perea-Gomez, Diego P. Aguiar, Anders Nykjaer, Sabine Amsellem, Jacqueline Chandellier, Muriel Umbhauer, Silvia Cereghini, Mette Madsen, Jérôme Collignon, Pierre Verroust, Jean-François Riou, Sophie E. Creuzet and Renata Kozyraki.

Supplemental inventory: Seven supplemental figures, one supplemental table, Supplemental experimental procedures.

Figure S1: supports Figure 1, showing the cortical organization of *CubnFoxg1-cre-KO*.

Figure S2: supports Figure 2, showing enhanced apoptosis in *CubnSox2-cre-KO* embryos and additional forebrain, midbrain and neural crest markers at E9.25.

Figure S3: supports Figure 3, showing the expression of anterior markers in E7.5-8.25 *Cubnsox2-cre-KO* embryos.

Figure S4 supports Figure 3, showing the expression of additional molecular markers in E8.75 *CubnSox2-cre-KO* embryos.

Figure S5 supports Figure 4, showing further analysis of *Cubn* interactions with Wnts, Bmps and FgfRs.

Figure S6: supports Figure 5, showing *Cubn* in the *Xenopus* neural plate and morphological consequences of *XCubn* silencing.

Figure S7: supports Figure 6, showing the spatio-temporal pattern of *Cubn* mRNA in the early avian embryo.

Table S1: Embryonic lethality of *Cubnsox2-cre-KO* embryos, related to Figure1.

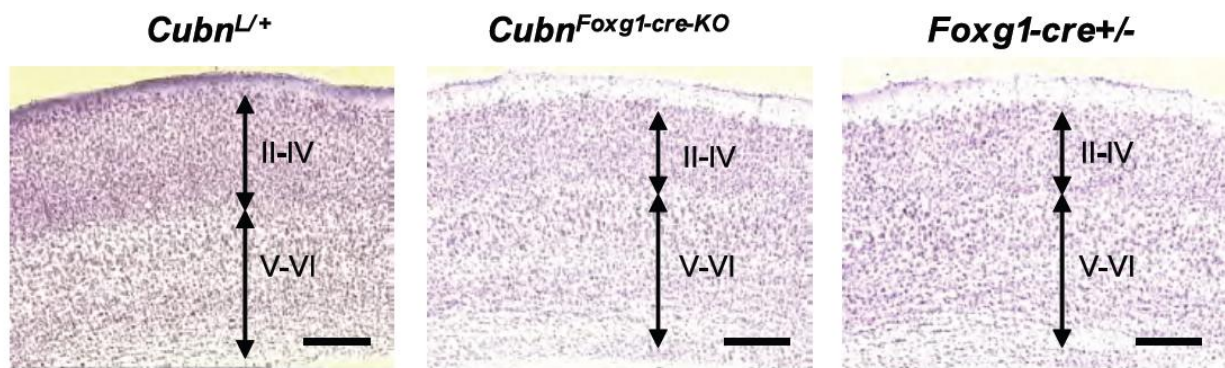


Figure S1. The specific loss of *Cubn* in the telencephalon does not alter gross anatomical organization of cerebral cortex. Coronal sections from wild-type, *Cubn*^{Foxg1-cre-KO}, and *Foxg1-cre+/-* at the same cortical level were stained with Nissl. The reduced thickness observed in the superficial layers (II-IV) is due to the reduced expression of *Foxg1* (haploinsufficiency). Scale bar: 200 μ m.

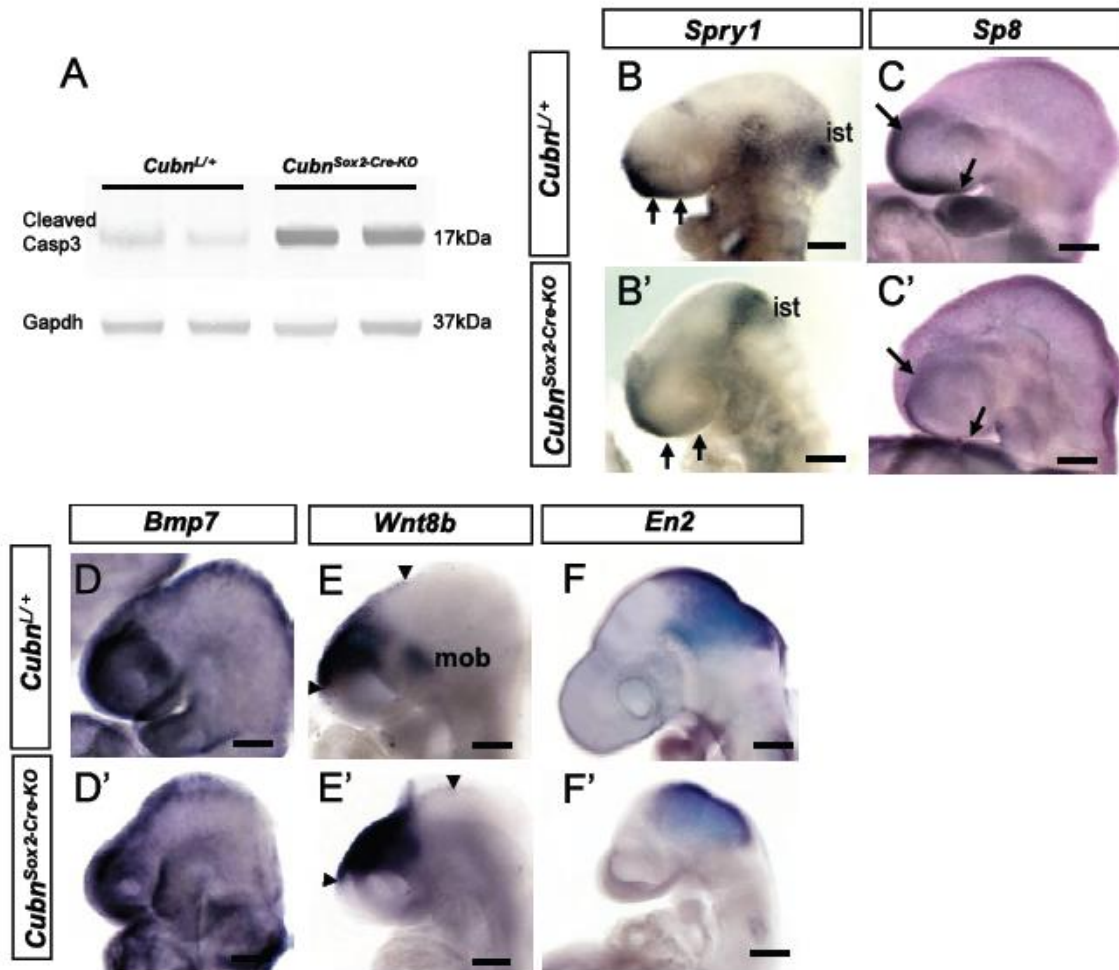


Figure S2. Increased apoptosis and normal forebrain patterning at E9.25. (A) Western blot analysis of E9.25 cephalic extracts shows increased expression of cleaved caspase 3 in the mutants. GAPDH is used as an internal control. Representative whole-mount mRNA staining of control (B-F) and mutant (B'-F') embryos. (B, B') *Sprouty1* is reduced in the mutant ventral cephalic ectoderm (arrows), but not in the commissural plate and isthmus. (C, C') *Bmp7* is normally expressed in the mutant dorsal telencephalon, diencephalon and mesencephalon. (D, D') *Sp8* is detected in the mutant telencephalic midline (arrows). (E, E') *Wnt8b* expression is restricted to the dorsal prosencephalon, with its anterior-most boundary clearly excluding the eye field territory in both control and mutants. Note the beginning of expression in the mammillary body (mob) of the slightly older (around 18 ss) control embryo. (F, F') The di-mesencephalic boundary defined by *En2* expression is normally formed. Lateral views, anterior is to the left. Scale bar: 200 μ m.

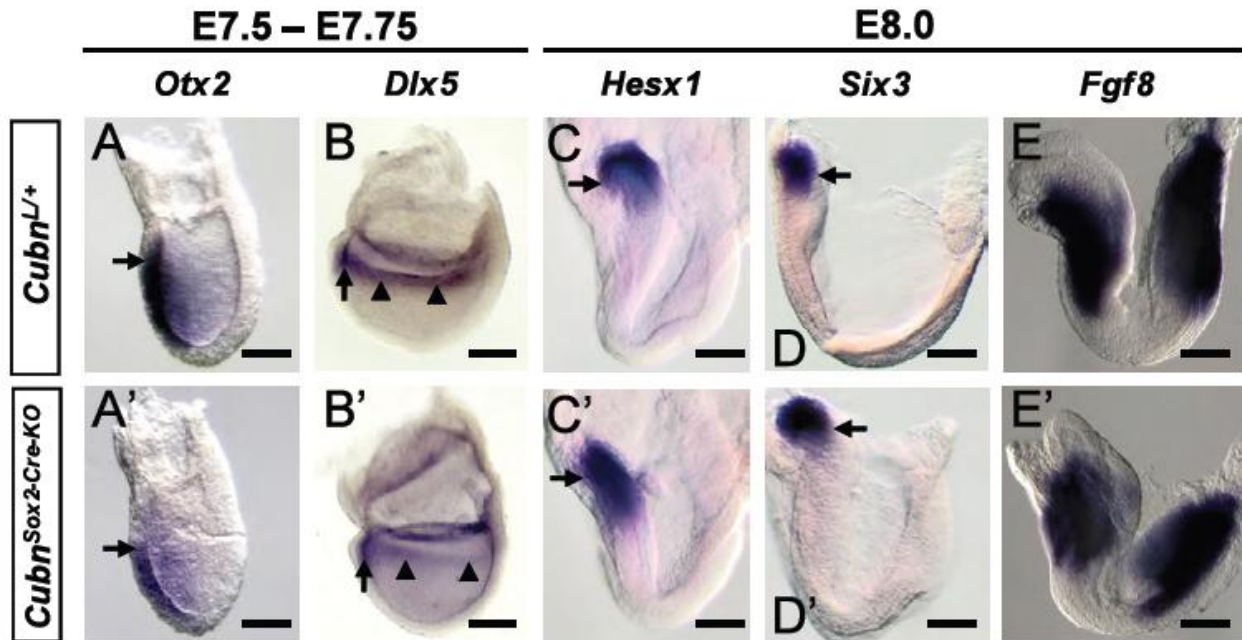


Figure S3. The forebrain identity is normally induced in *CubnSox2-cre-KO* mutants. Representative whole-mount mRNA staining of control (**A-E**) and mutant (**A'-E'**) embryos between the late gastrulation (E7.5) and early somite stages (E8.25). (**A, A'**) *Otx2* is normally expressed in the anterior neuroectoderm, the arrow points to the presumptive headfolds; (**B, B'**) *Dlx5* is expressed in the presumptive headfolds (arrow) and neural crest (arrowheads); *Hesx1* (**C, C'**) and *Six3* (**D, D'**) mark the prospective forebrain region (arrow); (**E, E'**) *Fgf8* is at this stage barely detectable the ANR but is normally expressed anteriorly in the splachnic mesoderm and caudally in the streak region. Lateral views, anterior is to the left. Scale bar: 100 μ m.

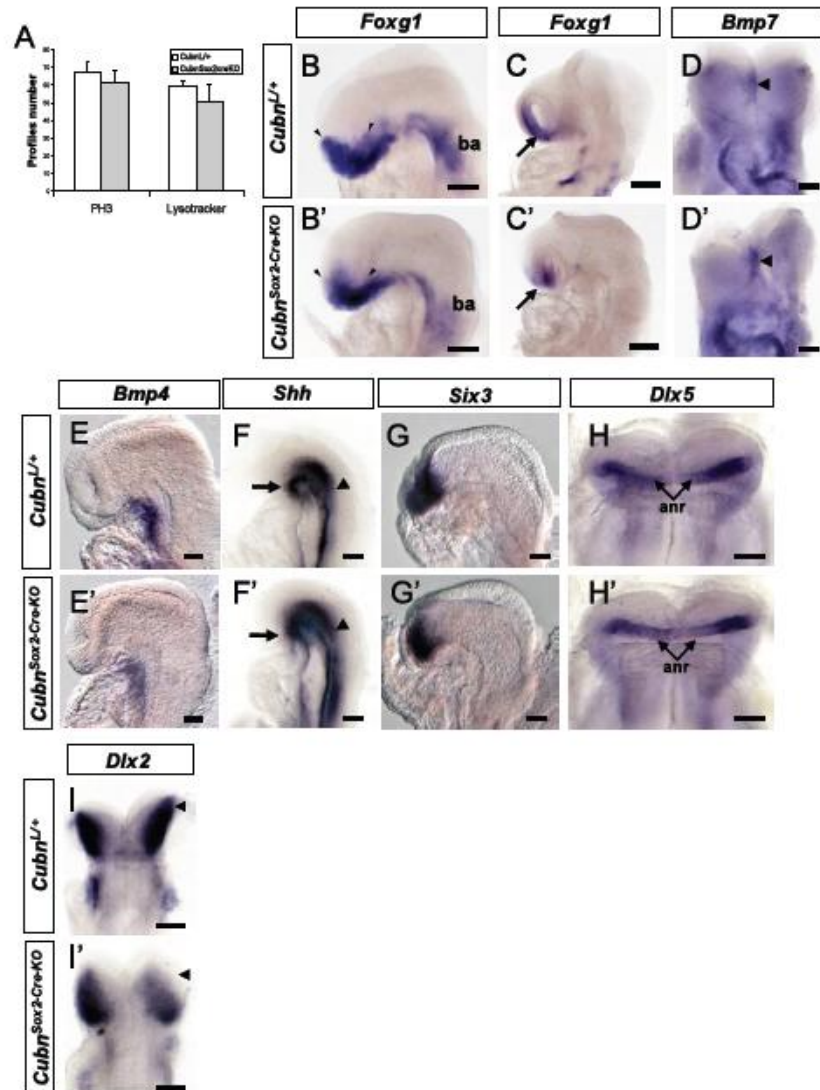


Figure S4. Forebrain regionalization is normal in E8.75 *CubnSox2-cre-KO* mutants. (A) The number of PH3+ (cell proliferation) and Lysotracker+ (Lys) cells is similar at E8.75 (mean ± s.e.m, n = 3 embryos of each genotype). (B- C') *Foxg1* is expressed in the anterior part of the neural plate (arrowheads) but its expression in the pharyngeal region is decreased at E8.75 (B, B') and absent at E9.0 (C, C'). (D, D') Normal *Bmp7* expression in the rostral axial mesendoderm (arrowhead) and head mesenchyme; (E, E') *Bmp4* is not expressed in the forebrain at this stage. (F, F') *Shh* is normally expressed in the axial mesendoderm and the ventral midline of the forebrain (arrow), the expression domain extends anteriorly to the forebrain and caudally to the hindbrain (arrowhead); (G, G') normal *Six3* expression in the presumptive mutant ventral forebrain. (H, H') *Dlx5* is normally expressed in the ANR. (I, I') *Dlx2* is reduced in the mutant cephalic mesenchyme; the arrow points to the prospective midbrain. (B-C', E-G') Lateral views, anterior is to the left. (D, D', H, H') frontal views. (I, I') Dorsal view. Scale bars: 200 µm.

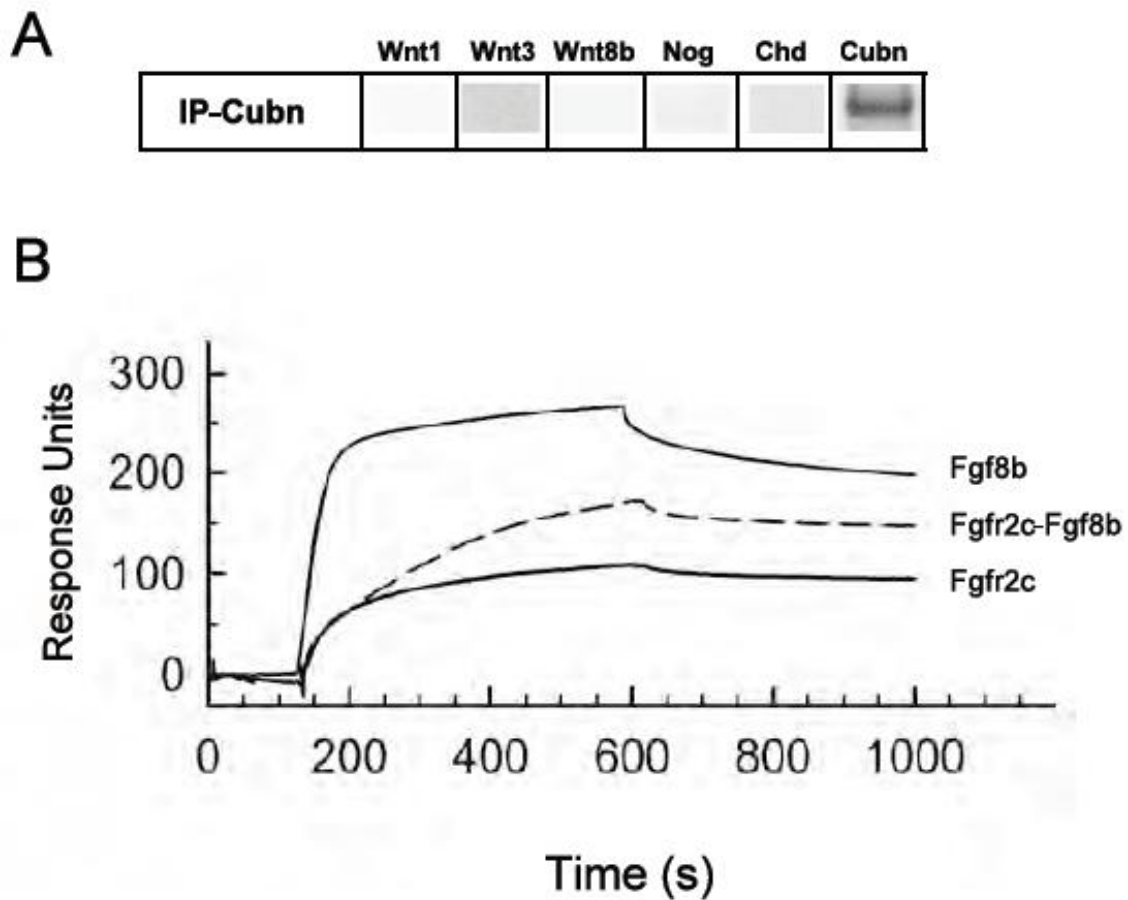


Figure S5. Cubn interacts specifically with Fgf8. **(A)** Cubn does not co-immunoprecipitate with Wnt1, Wnt3, Wnt8b, Noggin, or Bmp7 in cephalic extracts of E8.75-9.0 embryos. **(B)** Neither Fgfr2c (lower solid line) nor Fgfr2c-Fgf8b (dotted line) interact with Cubn or modify the binding of Fgf8b to Cubn (upper solid line) *in vitro*.

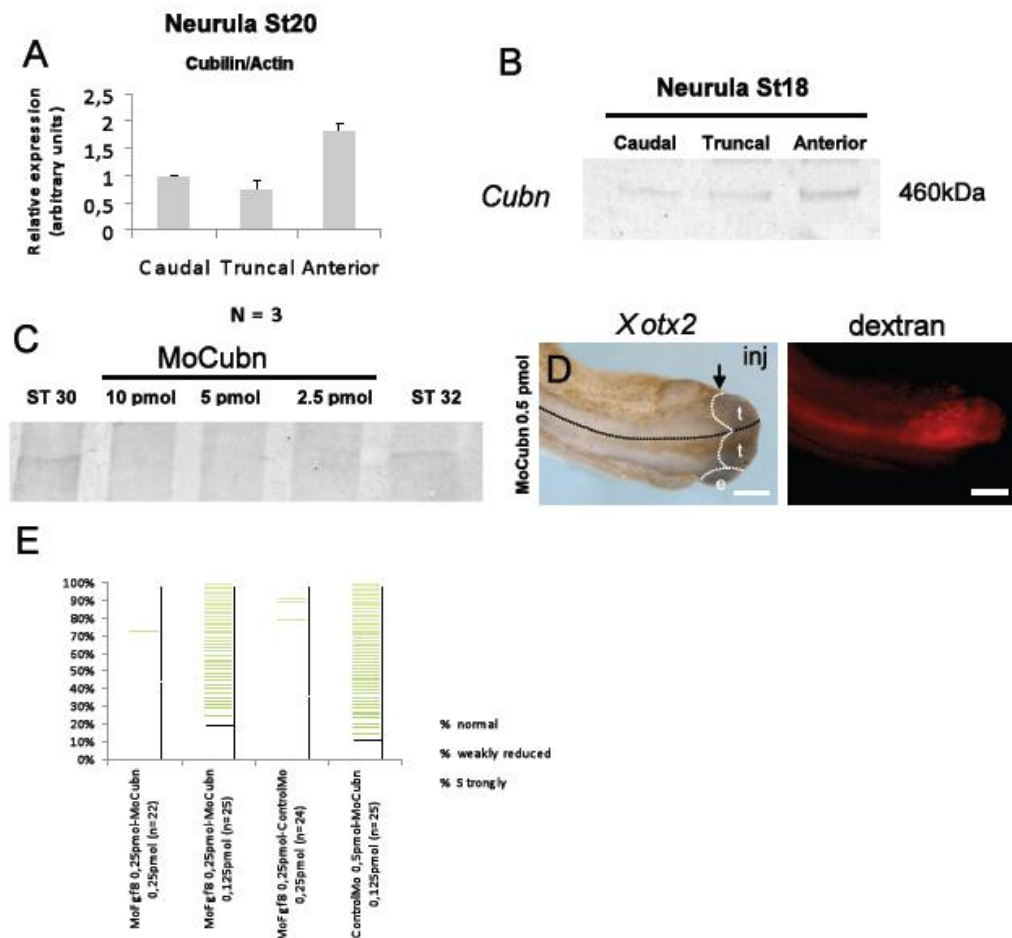


Figure S6. *XCubn* is expressed during early neurula stages and is required for forebrain and eye morphogenesis. (A, B) Cubilin is enriched in anterior neural plate extracts of neurula stage 18-20 frog embryos. (A) Quantitative RT-PCR analysis shows relatively higher *XCubn* expression in the anterior neural plate compared to the truncal and caudal parts. Primers to *Actin* are used to normalize mRNA levels. Relative expression represents the ratio of *Cubn/Actin* mRNA. In the caudal region this is arbitrary noted as 1; mean of three independent groups of six explants is shown. (B) Immunoblot analysis shows higher expression of *Cubn* in the same region; (C) Immunoblot analysis of control embryos and embryos injected at the 2-cell stage with the translation-blocking morpholinos designed here (MoCubn). At all the concentrations tested MoCubn efficiently silences the expression of *Cubn*; (D) Marked eye hypoplasia (arrow) and downregulation of *XOtx2* mRNA (blue) in the telencephalic and eye region of the injected part of a late tailbud-stage embryo. Rhodaminelysinated dextran is used as lineage tracer of the injection. Black indent line demarcates the dorsal midline, white indent lines demarcate eye (e) and the telencephalon (t). (E) Coinjection of various concentrations of MoCubn and MoFgf8, or MoFgf8 and MoControl, or MoCubn and MoControl, and their effect on the expression of *XFoxg1*. Summary of two independent experiments indicating the number of embryos analyzed. Scale bar: 250 μ m.

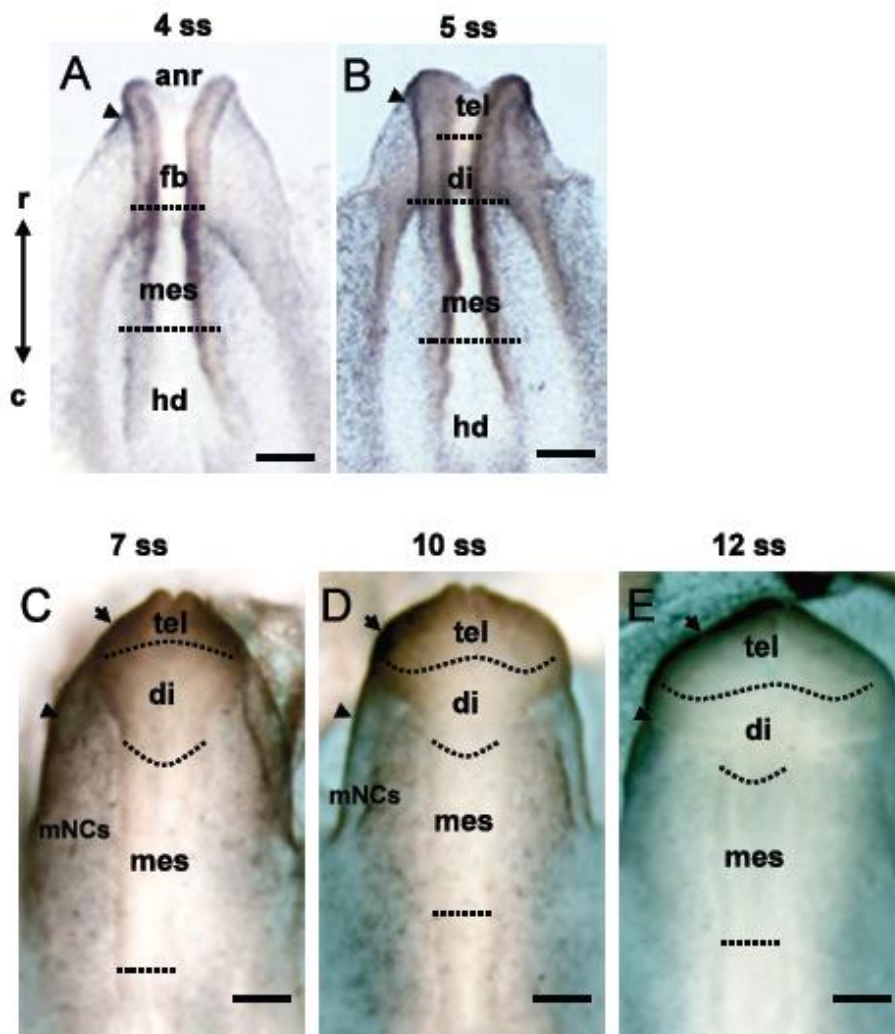


Figure S7. Spatio-temporal *Cubn* expression in the early chick embryo. (A-E) Representative mRNA staining for *Cubn* between the 4-12 somite stage (ss). (A-B) At the 3-5 ss *Cubn* is expressed in the anterior cephalic ectoderm (arrowhead) surrounding the ANR and the closing neural folds at the levels of the fore-, mid- and anterior hindbrain; (C-E) Between the 7-12 ss *Cubn* is detected in the developing telencephalon (tel), probably at the level of the subpallial septum (arrows), the CE (arrowhead) and the post-migratory neural crest cells (mNCs). (di) diencephalon, (fb) forebrain, (hd) hindbrain, (mes) mesencephalon. Scale bar: 100 μ m.

Supplemental Table 1: Embryonic lethality of *Cubn*^{sox2-cre-KO} mutants

<i>Cubn</i> ^{LL} X <i>Cubn</i> ^{L/+} ; <i>Sox2-Cre</i> intercross				
	<i>Cubn</i> ^{L/+} , <i>Cubn</i> ^{LL}	<i>Cubn</i> ^{L/+} ; <i>Sox-Cre</i>	<i>Cubn</i> ^{LL} ; <i>Sox2-Cre</i>	Total
E9.5	206 (58%)	78 (22%)	69 (20%)	353
E12.5	41 (73%)	15 (27%)	0	56
	50%	25%	25%	

5 - DISCUSSÃO

5.1 - A expressão de *Smad1* nas células da CNC controla a morfogênese do cérebro

Neste trabalho nós estudamos o papel do fator de transcrição *Smad1* nas células da CNC em embriões de galinha no estágio embrionário de 4-5 somitos. Em nossos experimentos nós bloqueamos a expressão de *Smad1* somente nas células da CNC, através da eletroporação do RNA dupla fita de *Smad1* em embriões no estágio de 4 somitos. Estes embriões foram analisados no estágio de 26 somitos; as primeiras observações morfológicas mostraram que a ausência de *Smad1* promoveu a diminuição da região prosencefálica, que compreende o telencéfalo e diencéfalo. Estas modificações morfológicas são mantidas em E4 e E6. Estes mesmo embriões privados da expressão de *Smad1* nas células da CNC foram analisados no Estágio E8. A morfologia craniofacial nestes indivíduos não sofreu grandes modificações, entretanto a análise histológica revelou graves problemas na padronização dorso-ventral do cérebro. Em cortes coronais, observamos profunda desorganização dos limites dorsal, lateral e ventral do *pallium*. Nestes embriões observamos também a redução da região septal do telencéfalo, bem como uma diminuição representativa do plexo coróide. Nestes cortes sagitais, observamos que nos embriões privados da expressão de *Smad1* nas células da CNC, ocorre um aumento do desenvolvimento ventral do cérebro em detrimento da região dorsal. Estes primeiros resultados nos possibilitam concluir que a presença de *Smad1* nas células da CNC é responsável controlar o desenvolvimento ventral do cérebro. Deste modo, é possível dizer que a CNC é uma estrutura anti-ventralizante no desenvolvimento do TN anterior. Estas observações sugerem que

disfunções das células da CNC podem acarretar malformações craniofaciais e cerebrais como a holoprosencefalia parcial.

5.2 – Expressão de *Smad1* nas células da CNC controla a expressão de marcadores do cérebro durante o desenvolvimento

Com o intuito de entender de que maneira a expressão de *Smad1* pode controlar o desenvolvimento do TN, nós analisamos marcadores do seu desenvolvimento. *Foxg1* é o marcador mais precoce do desenvolvimento do telencéfalo, aparecendo já durante a gastrulação quando a região anterior está sendo induzida (Chapman et al., 2002). A cooperação entre *Foxg1* e *Fgf8* funciona como o principal indutor do desenvolvimento do telencéfalo (Rubenstein and Beachy, 1998; Rubenstein et al., 1998). Desta forma, a análise da expressão destes genes é fundamental para a compreensão do efeito da perda de função de *Smad1*. Nós observamos em embriões privados da expressão de *Smad1* nas células da CNC a diminuição da expressão de *Fgf8* na BNA, acompanhado pela ausência da expressão de *Foxg1* no neuroepitélio telencefálico. Estes resultados corroboram com observações independentes, que mostram que a holoprosencefalia, atrelada a problemas craniofaciais e a disfunções na glândula pituitária e no hipotálamo são devido a uma mutação do gene da proteína *Fgf8*, que impede sua atividade (McCabe et al., 2011). Estas observações explicam os problemas encontrados no desenvolvimento do telencéfalo decorrente da perda de expressão de *Smad1*.

Nós também analisamos nestes embriões o marcador *Otx2* no estágio de 26 somitos. *Otx2* que tem sido demonstrado ser importante para a padronização dorsal do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo (Kimura et al., 2005). A ação do fator de

transcrição *Otx2* é antagonizada por *Foxa2* que é expresso na porção ventral do diencéfalo e do mesencéfalo (Nakano et al., 2000; Weinstein et al., 1994). Nós observamos em embriões no estágio de 26 somitos que sofreram a perda de função de *Smad1* na CNC, a diminuição da expressão de *Otx2* na porção lateral e dorsal do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Bem como, o aumento da expressão de *Foxa2* na porção ventral e lateral do diencéfalo e mesencéfalo. O padrão de expressão alterado de *Otx2* e *Foxa2* decorrente da perda de expressão de *Smad1* na CNC explica o aumento da “ventralização” do cérebro, observado em embriões no estágio E8 (**Tabela 2**). Nossos resultados mostram que ao bloquearmos a expressão de *Foxg1* (*dsFoxg1*) presente no telencéfalo promoveu a restrição da expressão de *Otx2* na porção dorsal e o aumento da expressão *Foxa2* na porção ventral das vesículas cerebrais. Estas observações sugerem que a região anterior (telencéfalo) que expressa *Foxg1* controla o desenvolvimento da região posterior (diencéfalo e mesencéfalo) que expressa *Otx2* e *Foxa2*.

5.3 – *Smad1* modula a sinalização *Fgf8* e o controle do desenvolvimento do telencéfalo

O complexo controle do desenvolvimento craniofacial e cerebral é produzido pela ação sinérgica entre as vias de sinalização *Wnt*, *Fgf8*, *Bmp4* e seus antagonistas. O fator de transcrição *Smad1* é o regulador transcricional de *Noggin* (Akizu et al., 2010), antagonista de *Bmp*, que junto com *Gremlin* modulam a intensidade da sinalização *Bmp* nos tecidos adjacentes. Desta forma, ao bloquearmos a expressão de *Smad1* nas CNC, foi coerente observarmos a diminuição dos níveis de expressão de *Noggin* na CNC, e o aumento da sinalização *Bmp4* presente na ectoderme.

Consequente ao aumento dos níveis relativos de *Bmp4*, o papel de *Fgf8* na ectoderme e na neuroectoderme é comprometido. Com a diminuição da ação de *Fgf8*, a ativação e manutenção de *Foxg1* são afetadas no neuroepitélio (Storm et al., 2006). A perda de função de *Smad1* nas células da CNC gera o mesmo padrão de expressão de *Foxg1* e *Fgf8* encontrado na região anterior de embriões de anfioxo durante o desenvolvimento embrionário (Toresson et al., 1998). Estas observações reforçam a idéia da influência das células da CNC como agente trófico no desenvolvimento das vesículas cefálicas.

Em embriões nocautes para *Smad1*, *Smad5* e *Smad8* observam-se redundância na ação destas três *Smads* durante a diferenciação endocondral, entretanto, a ossificação intramembranosa não sofre grandes modificações (Retting et al., 2009). Análise por RT-PCR nestes embriões mostrou que os nocautes para *Smad1* e *Smad5* perdem a expressão dos receptores de *Fgfr2* e *Fgfr3*, e redução na expressão dos receptores *Bmpr1a*, *Bmpr1b* e *Bmpr2*. Estes resultados revelam que *Smad1* e *Smad5* controlam a expressão dos receptores de *Bmp* e *Fgf* (Retting et al., 2009). Nestes embriões, não foi analisado minuciosamente se o desenvolvimento craniofacial ou cerebral foi afetado decorrente da ausência de *Smad1*, *Smad5* e *Smad8*.

Em explantes de neuroectoderma expostos a esferas de heparina acrílica embebidas da proteína *Fgf8*, observa-se a indução da expressão de *Foxg1* (Shimamura and Rubenstein, 1997). Estas observações mostram que a presença da sinalização *Fgf8* na BNA durante o desenvolvimento do prosencéfalo é fundamental para a indução e proliferação da região anterior. Em um de nossos trabalhos em colaboração que se apresenta anexado a esta tese de doutorado, nós mostramos que a molécula *Cubilin* é um importante mediador da via de sinalização *Fgf8*. A *Cubilin* liga-

se ao *Fgf8* no espaço extracelular, ocorre a internalização deste complexo através de vesículas e conseqüentemente o aumento na sinalização *Fgf8*. A perda de expressão de *Cubilin* condicionada a expressão de *Sox2* gera embriões com severo grau de malformação telencefálica (Cases O, Perea-Gomez A, Aguiar D P, et al., submetido). Nestes embriões não se observou nenhuma modificação na via de sinalização *Wnt*, entretanto ocorre a diminuição da fosforilação de *Smad1* (Cases O, Perea-Gomez A, Aguiar D P, et al., submetido).

Para testarmos mais uma vez a influência da expressão de *Smad1* nas células da CNC sobre o desenvolvimento das vesículas cefálicas, foi realizada a ablação cirúrgica da BNA em embriões no estágio de 5ss. Esta ablação resulta na perda de expressão do *Foxg1*, *Fgf8* no telencéfalo, bem como na perda de expressão de *Otx2* na porção ventral e lateral do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Nestes embriões observamos também o aumento dos níveis de transcritos de *Foxa2* na porção ventral destas vesículas. Nesta mesma série experimental, nós eletroporamos as células da CNC com o plasmídeo que contém o gene humano de *Smad1*, que ao ser expressa apresentará uma forma constitutivamente fosforilada (*hSmad1-P*), seguida pela ablação da BNA no estágio de 5 somitos. Os resultados desta manipulação indicam que o aumento dos níveis dos transcritos de *Smad1* nestes embriões é capaz de restaurar o padrão de expressão normal de *Fgf8*, *Foxg1*, *Otx2* e *Foxa2*. Estes observações sugerem um mecanismo, onde *Smad1* controla a expressão de *Noggin* nas células da CNC e assim antagoniza *Bmp4* expresso na ectoderme. Logo, com os baixos níveis de *Bmp4*, *Fgf8* presente na neuroectoderme pode induzir a expressão de *Foxg1* e assim restaurar o desenvolvimento do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo.

Estes resultados revelam que as células da CNC são fundamentais para permitir o desenvolvimento do telencéfalo.

	CNC		BNA		Telen		Di- and Mesen
Controle	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i>		<i>Foxg1</i>	>	<i>Otx2/Foxa2</i>
<i>dsSmad1</i>	<i>dsSmad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
<i>dsSmad1</i> + <i>hSmad1</i>	<i>dsSmad1</i>	>	<i>Fgf8</i>		<i>Foxg1</i>	>	<i>Otx2/Foxa2</i>
<i>dsSmad1</i> + <i>Fgf8</i> Beads	<i>dsSmad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
<i>dsSmad1</i> + <i>Cerberus</i>	<i>dsSmad1</i>	>	<i>Fgf8</i>		<i>Foxg1</i>	>	<i>Otx2/Foxa2</i>
<i>dsNoggin</i> <i>dsGremlin</i>	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
<i>dsFoxg1</i>	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>dsFoxg1</i>	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
Abla da BNA	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
Abla da BNA + <i>hSmad1</i> -P	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i>		<i>Foxg1</i>	>	<i>Otx2/Foxa2</i>
Dkk1-RCAS	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2</i> ↓/ <i>Foxa2</i> ↑
Dkk1-RCAS + <i>hSmad1</i> -P	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i>		<i>Foxg1</i>	>	<i>Otx2/Foxa2</i>
<i>dsSfrp1</i> <i>dsSfrp2</i>	<i>Smad1</i>	>	<i>Fgf8</i> ↓		<i>Foxg1</i> ↓	>	<i>Otx2/Foxa2</i>

Tabela 2 - Condição experimental por padrão de expressão de *Fgf8*, *Foxg1*, *Otx2* e *Foxa2*. Esta tabela resume o padrão de expressão de marcadores do tubo neural anterior, observado após as mais diferentes modificações realizadas nas células da CNC ou na ablação da BNA.

5.4 – *Smad1* controla a intensidade da sinalização *Wnt* nas vesículas cefálicas através da CNC

Em nossos experimentos a perda da função de *Smad1* na CNC promove a diminuição representativa nos níveis dos transcritos de *Wnt1* e *Wnt3a* na porção dorsal do mesencéfalo e do diencéfalo. Notamos também o aumento dos níveis de transcrição de *Dkk1*, que por sua vez é um forte antagonista da via de sinalização *Wnt*. Ao aumentarmos os níveis de expressão de *Dkk1* através da eletroporação de um plasmídeo *Dkk1*-RCAS nas células da CNC, observamos exatamente as mesmas modificações nos níveis de transcrição de *Foxg1*, *Fgf8*, *Otx2*, *Foxa2* e *Cerberus*. Sendo assim, estas observações sugerem que *Dkk1* pode estar sobre a regulação transcricional de *Smad1* na CNC. Para examinar se o fator de transcrição *Smad1* presente na CNC é o responsável pela modulação do desenvolvimento dorsoventral do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo através do controle transcricional de *Dkk1*, nós co-eletroporamos as células da CNC com os plasmídios *Dkk1*-RCAS e *hSmad1*-P, e observamos que a presença de *hSmad1*-P é capaz de recuperar o fenótipo normal gerado pelo aumento dos níveis de *Dkk1* nas células da CNC. Estas observações sugerem que *Smad1* pode agir como supressor transcricional de *Dkk1* nas células da CNC. Deste modo, podemos concluir que a via de sinalização *Bmp* pode controlar a via de sinalização *Wnt*.

Os mecanismos de controle da via de sinalização de *Wnt* durante o desenvolvimento embrionário são extremamente refinados, pois foi demonstrado que a molécula *Smad1* é capaz de se ligar a *Dishevelled* e impedir a fosforilação de *Gsk-3*, mesmo sobre a estimulação da proteína *Wnt* (Liu et al., 2006). Além disso, as proteínas *Wnt* e *Bmp4* podem ser antagonizadas no espaço extracelular por *Cerberus*, que impede a atividade destas vias de sinalização (Piccolo et al., 1999). Nós observamos em nossos experimentos que a perda de função de *Smad1* nas células da CNC, gera a diminuição dos níveis dos transcritos de *Cerberus* no mesênquima peri-ocular. Além disso, foi possível recuperarmos o padrão de expressão normal de *Foxg1*, *Otx2* e *Foxa2* nos embriões *dsSmad1* com a injeção da proteína *Cerberus* (0,1µg/µl) na zona de migração das células da CNC no estágio de 12 somitos. Estes resultados mostram que as vias de sinalização *Bmp* e *Wnt* se auto-regulam no decorrer do desenvolvimento, sendo assim mais uma vez nossos resultados corroboram com a noção de que o excesso de *Bmp4* produzido pela ectoderme decorrente do bloqueio da expressão de *Smad1* nas células da CNC pode ser controlado pela adição de um dos seus antagonistas, como por exemplo, *Cerberus*. Ainda estudando o efeito da perda de função de *Smad1* sobre a regulação transcricional dos inibidores de *Wnt*. Nós analisamos nestes embriões os transcritos de *Sfrp1* e *Sfrp2*. Eles são expressos na CNC e sofrem diminuição nos seus níveis de expressão decorrente da perda de função de *Smad1*. Com o objetivo de verificar se o desenvolvimento das vesículas cefálicas está também sobre o controle destes inibidores de *Wnt*. Nós bloqueamos a expressão destes inibidores (*dsSfrp1* e *dsSfrp2*) nas células da CNC no estágio de 4 somitos, e observamos que somente a expressão do gene *Foxg1* no telencéfalo foi afetada. Os

transcritos de *Otx2* e *Foxa2* não sofreram nenhuma modificação representativa. Estas observações sugerem que a expressão de *Sfrp1* e *Sfrp2* nas células da CNC é exclusivamente importante para a manutenção do desenvolvimento do telencéfalo e não para o desenvolvimento do diencéfalo e do mesencéfalo.

Este conjunto de resultados nos possibilita mostrar que as células da CNC funcionam com um agente trófico durante o desenvolvimento das vesículas cefálicas expressando inibidores de *Bmp*, como *Noggin* e *Gremlin*, e inibidores de *Wnt*, como *Dkk1*, *Sfrp1* e *Sfrp2*. Nossos resultados nos possibilitam sugerir que em condições fisiológicas, *Smad1* promove a perfeita distribuição da expressão de destes inibidores construindo a regionalização precisa das estruturas cefálicas.

6 - CONCLUSÕES

1. A expressão de *Smad1* nas células da CNC controla o desenvolvimento do tubo neural cefálico.
2. A presença de *Smad1* nas células da CNC permite que a via de sinalização *Fgf8* na BNA controle o desenvolvimento do telencéfalo.
3. A superexpressão de *Smad1* nas células da CNC é capaz de restaurar o desenvolvimento do telencéfalo mesmo na ausência da BNA.
4. A expressão de *Smad1* nas células da CNC controla a expressão de *Noggin*, que bloqueia *Bmp4* produzido pela ectoderme permitindo o desenvolvimento do telencéfalo por *Fgf8*.
5. *Smad1* nas células da CNC controla o desenvolvimento ventral do diencéfalo e mesencéfalo através da expressão de *Foxa2*.
6. *Smad1* nas células da CNC controla a expressão de *Cerberus* no mesênquima periocular.
7. A suplementação com a proteína *Cerberus* é capaz de recuperar o fenótipo promovido pelo bloqueio de *Smad1* nas células da CNC.
8. *Smad1* nas células da CNC atua na inibição da expressão de *Dkk1* e permite o desenvolvimento dorsal das vesículas cefálicas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

Aberg T, Wozney J, Thesleff I. 1997. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* **210**: 383-96.

Aberle H, Schwartz H, Hoschuetzky H, Kemler R. 1996. Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J Biol Chem* **271**: 1520-6.

Acampora D, Boyl PP, Martinez-Barbera JP, Annino A, Signore M, Simeone A. 2001. Otx genes in evolution: are they involved in instructing the vertebrate brain morphology? *J Anat* **199**: 53-62.

Acompara D, Gulisano M, Simeone A, 1999. Otx genes and genetic control forebrain morphogenesis. *Molecular and cellular neuroscience* **13**: 1-8.

Akizu N, Estarás C, Guerrero L, Martí E, Martínez-Balbás MA. 2010. H3K27me3 regulates BMP activity in developing spinal cord. *Development* **137**: 2915-25.

Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, Nexø E, Verroust PJ, Christensen EI, Kozyraki R. 2010. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* **21**: 1859-67.

Anderson RM, Lawrence AR, Stottmann RW, Bachiller D, Klingensmith J. 2002. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development* **129**: 4975-87.

Angell SM, Baulcombe DC. 1999. Technical advance: potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant J* **20**: 357-62.

Arnold SJ, Maretto S, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. 2006. Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev Biol* **296**: 104-18.

Aybar MJ, Nieto MA, Mayor R, 2003. Snail precedes Slug in genetic cascade required for the specification and migration of Xenopus neural crest. *Development* **130**: 483-494.

Aybar MJ, Glavic A, Mayor R. 2002. Extracellular signals, cell interactions and transcription factors involved in the induction of the neural crest cells. *Biol Res* **35**: 267-75.

Aybar MJ, Mayor R. 2002. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 452-8.

- Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM, Rossant J, De Robertis EM. 2000. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* **403**: 658-61.
- Bardot B, Lecoin L, Huillard E, Calothy G, Marx M. 2001. Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech Dev* **101**: 263-5.
- Barth KA, Kishimoto Y, Rohr KB, Seydler C, Schulte-Merker S, Wilson SW. 1999. Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* **126**: 4977-4987.
- Basch ML, Bronner-Fraser M, García-Castro MI. 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* **441**: 218-22.
- Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 581-603.
- Boncinelli E, Gulisano M, Broccoli V. 1993. *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain. *J Neurobiol* **24**: 1356-66.
- Bonilla-Claudio M, Wang J, Bai Y, Klysik E, Selever J, Martin JF. 2012. Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development* **139**: 709-719.
- Brain K. Hall. 2009. The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution. 387 paginas.
- Brault V., Moore R., Kutsch S., Ishibashi M., Rowitch D.H., McMahon A.P., Sommer L., Boussadia O., Kemler R., 2001. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* **128**: 1253-64.
- Brito JM, Teillet MA, Le Douarin NM. 2008. Induction of mirror-image supernumerary jaws in chicken mandibular mesenchyme by Sonic Hedgehog-producing cells. *Development* **135**: 2311-2329.
- Bronner ME, Cohen AM. 1979. Migratory patterns of cloned neural crest melanocytes injected into host chicken embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 1843-7.
- Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**: 1455-7.

- Canning CA, Lee L, Luo SX, Graham A, Jones CM. 2008. Neural tube derived Wnt signals cooperate with FGF signaling in the formation and differentiation of the trigeminal placodes. *Neural Develop* **15**: 35-45.
- Cases O, Perea-Gomez A, Aguiar DP, Nykjaer A, Amsellem S, Chandellier J, Umbhauer M, Cereghini S, Madsen M, Collignon J, Verroust P, Riou JF, Creuzet SE, Kozyraki R. Cubilin imparts Fgf signaling in the developing vertebrate head. Submetido.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* **127**: 1671-9.
- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A. 2002. Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev Biol* **245**: 187-99.
- Cheung M, Briscoe J. 2003. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* **130**: 5681-93.
- Chibon P. 1964. Analyse par la méthode de marquage nucléaire à la thymidine tritiée des dérivés de la crête neurale céphalique chez l'Urodèle *Pleurodeles waltii*. *C. R. Acad. Sci* **259**: 3624–3627.
- Collazo A, Bronner-Fraser M, Fraser SE. 1993. Vital dye labeling of xenopus laevis trunk neural crest reveals multipotency and novel pathway of migration. *Development* **118**: 363-376.
- Couly G, Creuzet S, Bennaceur S, Vincent C, Le Douarin NM. 2002. Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development* **129**: 1061-1073.
- Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Le Douarin NM. 1996. The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development* **122**: 3393-407.
- Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Ruhin B, Le Douarin NM. 1998. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development* **125**: 3445-59.
- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. 1992. The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development* **114**: 1-15.
- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. 1993. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* **117**: 409-29.

Couly GF, Le Douarin NM. 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* **110**: 422-39.

Couly GF, Le Douarin NM. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol* **120**: 198-214.

Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. 2002. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* **129**: 4301-4313.

Creuzet S, Schuler B, Couly G, Le Douarin NM. 2004. Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4843-7.

Creuzet SE, Martinez S, Le Douarin NM. 2006. The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14033-8.

Creuzet SE. 2009a. Neural crest contribution to forebrain development. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 751-9.

Creuzet SE. 2009b. Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15774-9.

Crossley PH, Martin GR. 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**: 439-51.

Crossley PH, Martinez S, Ohkubo Y, Rubenstein JL. 2001. Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **108**: 183-206.

Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin, G. R. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**: 127-36.

Dale Purves, George J Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara, and Mark Williams. 2001. *Neuroscience*, 2nd edition.

- Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, Papalopulu N, Houart C, 2009. Integration of Telencephalic Wnt and Hedgehog Signaling Center Activities by Foxg1. *Developmental Cell* **16**: 576–587.
- De Beer GR. 1946. The differentiation of neural crest cells into visceral cartilages and odontoblasts in Amblystoma, and a re-examination of the germ-layer theory. 1-30.
- Del Barrio MG, Nieto MA. 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* **129**: 1583-193.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577-84.
- Dottori M, Gross MK, Labosk P, Goulding M. 2001. The winged-helix transcription factors FoxD3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* **128**: 4127-4138.
- Eivers E, Fuentealba LE, De Robertis EM. 2008. Integrating positional information at the level of Smad1/5/8. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 304-310.
- Etchevers HC, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. 1999. Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development* **126**: 3533-43.
- Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. 2001. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* **128**: 1059-68.
- Francis PH, Richardson MK, Brickell PM, Tickle C. 1994. Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**: 209-18.
- Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM. 1994. Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Dev Dyn* **201**: 168-78.
- Freeman and Bracegirdle. 1986. Atlas of Embryology. Heinemann Educational Publishers, 3 ed.
- Fristrom JW. 1970. The developmental biology of Drosophila. *Annu Rev Genet* **4**: 325-46.
- Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM. 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**: 980-993.

- Gale E, Prince V, Lumsden A, Clarke J, Holder N, Maden M. 1996. Late effects of retinoic acid on neural crest and aspects of rhombomere identity. *Development* **122**: 783-793.
- Gans C, Northcutt RG. 1983. Neural Crest and the Origin of Vertebrates: A New Head Carl. *Science* **220**: 268-274.
- García-Castro MI, Marcelle C, Bronner-Fraser M. 2002. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* **297**: 848-51.
- Garcia-Lopez R, Vieira C, Echevarria D, Martinez S. 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* **268**: 514-30.
- Gont L, Lough J. 2000. Differential expression of cSmad1 and cSmad5 in the primitive streak during chick embryo gastrulation. *Anat Rec* **260**: 102-5.
- Goronowitsch N. 1892. Die axiale and die laterale Kopfmentamerie des Vögelembryonen. Die Rolle der sog. "Ganglienleisten" im Aufbaue der Nervenstämme. *Anat Anz* **7**: 454-464.
- Goronowitsch N. 1893. Weiters über die ektodermale Entstehung von Skeletanlagen im Kopfe der Wirbeltiere. *Morphol Jahrb* **20**: 425-428.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **38**: 49-92.
- Hébert JM, Mishina Y, McConnell SK. 2002. BMP Signaling Is Required Locally to Pattern the Dorsal Telencephalic Midline. *Neuron* **35**: 1029-1041.
- Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. 2005. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* **132**: 851-861.
- His W. 1868. Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. F.C.W. Vogel, Leipzig.
- Hoang BH, Thomas JT, Abdul-Karim FW, Correia KM, Conlon RA, Luyten FP, Ballock RT. 1998. Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev Dyn* **212**: 364-372.
- Hollyday M, McMahon JA, McMahon AP. 1995. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev* **52**: 9-25.

- Hoppler S, Moon RT. 1998. BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mech Dev* **71**: 119–129.
- Horstadius S, Sellman S. 1941. Experimental studies on the determination of the chondroranium in *Amblystoma mexicanum*. **13**: 1-7.
- Horstadius S, Sellman S. 1945. Experimentelle untersuchungen uber die determination des knorpeligen kopfskelettes bei urodelen. *Nova Acta Regiae societatis Scientiarum Upsaliensis* **13**: 1-169.
- Hörstadius S. 1950. The Neural Crest: its Properties and Derivatives in the Light of Experimental Research. Oxford University Press, London.
- Hu D, Marcucio RS. 2009. Unique organization of the frontonasal ectodermal zone in birds and mammals. *Dev Biol* **325**: 200-210.
- Hurtado C, De Robertis EM. 2007. Neural induction in the absence of organizer in salamanders is mediated by MAPK. *Dev Biol* **307**: 282-289.
- Hus DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. 1998. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* **1**: 673–683.
- Jessell TM. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**: 20-29.
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. 2000. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* **127**: 1607-16.
- Jin O, Harpal K, Ang SL, Rossant J. 2001. Otx2 and HNF3beta genetically interact in anterior patterning. *Int J Dev Biol* **45**: 357-65.
- Johnston MC. 1966. An autoradiographic study of the migration and fate of cefálica neural crest cells in the chick embryo. *Anat. Rec* **156**: 143–156.
- Joliot A, Prochiantz A. 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell Biol* **6**: 189–196.
- Kalcheim C. 2000. Mechanism of neural rest development: from cell specification migration. *International Rev Cytol A Survey of Cell Biology* **200**: 143-195.
- Katschenko N. 1888. Zur Entwicklungsgeschichte des selachierembryos. *Anat Anz* **3**: 445–467.

- Kaufmann E, Knochel W. 1996. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**: 3-20.
- Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. 2003. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* **34**: 303–307.
- Kimura C, Shen MM, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I. 2001. Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev Biol* **235**: 12-32.
- Kimura J, Suda Y, Kurokawa D, Hossain ZM, Nakamura M, Takahashi M, Hara A, Aizawa S. 2005. Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J Neurosci* **25**: 5097-108.
- Kimura-Yoshida C, Tian E, Nakano H, Amazaki S, Shimokawa K, Rossant J, Aizawa S, Matsuo I. 2007. Crucial roles of Foxa2 in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5919-5924.
- Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L. 2007. Tgf-Beta signaling in development. *Sci STKE* **14**: 399-401.
- Knecht A, Bronner-Fraser M. 2003. Induction of neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* **3**: 453-461.
- Knight RD, Javidan Y, Zhang T, Nelson S, Schilling TF. 2005. AP2-dependent signals from the ectoderm regulate craniofacial development in the zebrafish embryo. *Development* **132**: 3127-38.
- Kos R, Reedy MV, Johnson RL, Erickson CA. 2001. The winged-helix transcription factors FoxD3 is important for stabilizing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* **128**: 1476-1479.
- Kozyraki R, Gofflot F. 2007. Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr Pharm Des* **13**: 3038-46.
- Kronenberg D, Vadon-Le Goff S, Bourhis JM, Font B, Eichenberger D, Hulmes DJ, Moali C. 2009. Strong cooperativity and loose geometry between CUB domains are the basis for procollagen c-proteinase enhancer activity. *J Biol Chem* **284**: 33437-46.
- Kuznetsova SA, Mahoney DJ, Martin-Manso G, Ali T, Nentwich HA, Sipes JM, Zeng B, Vogel T, Day AJ, Roberts DD. 2008. TSG-6 binds via its CUB_C domain to the cell-

binding domain of fibronectin and increases fibronectin matrix assembly. *Matrix Biol* **27**: 201-10.

LaBonne C, Bronner-Fraser M. 1998. Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* **125**: 2403-2414.

Landacre FL. 1921. The fate of the neural crest in the head of the urodeles. 34 paginas.

Le Douarin MN, Creuzet S, Couly G, Dupin E. 2004. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**: 4637-4650

Le Douarin MN. 1982. The Neural Crest. Cambridge University Press.

Le Douarin N M. 1981. Plasticity in the development of the peripheral nervous system. *Ciba Found Symp* **83**: 19-50.

Le Douarin N, Teillet MA. 1970. Several aspects of migration of neural cells in chick embryo studied by the method of heterospecific grafts of the neural tube. *C R Seances Soc Biol Fil* **164**:390-7.

Le Douarin N. 1969. Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Bull Biol Fr Belg*. **103**: 435-52.

Le Douarin N. 1973. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol* **30**: 217-222.

Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. 2007. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Research Review* **55**: 237–247.

Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. 2007. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev* **55**: 237-47.

Le Douarin NM, Kalcheim C. 1999. The Neural Crest (Second edition). Cambridge University Press.

Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, Le Douarin GH. 1975. Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 728-32.

Le Douarin NM, Teillet MA, Le Lièvre C. 1977. Influence of the tissue environment on the differentiation of neural crest cells. *Soc Gen Physiol Ser* **32**: 11-27.

Le Douarin NM. 2008. Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev Growth Differ* **1**: 11-28.

- Le Lièvre CS. 1978. Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J Embryol Exp Morphol* **47**: 17-37.
- Lee HX, Mendes FA, Plouhinec JL, De Robertis EM. 2009. Enzymatic regulation of pattern: BMP4 binds CUB domains of Tolloids and inhibits proteinase activity. *Genes Dev* **23**: 2551-62.
- Lewis SL, Khoo PL, De Young RA, Steiner K, Wilcock C, Mukhopadhyay M, Westphal H, Jamieson RV, Robb L, Tam PP. 2008. Dkk1 and Wnt3 interact to control head morphogenesis in the mouse. *Development* **135**: 1791-801.
- Li J, Vogt PK. 1993. The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4490-4.
- Liang YY, Brunicardi FC, Lin X. 2009. Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res* **19**: 140-148.
- Liem KF Jr, Tremml G, Roelink H, Jessell TM. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**: 969-79.
- Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger SM, Ma L, Schwartz RJ, Maxson R, Furuta Y, Martin JF. 2005. Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development. *Dev Biol* **283**: 282-93.
- Liu Z, Tang Y, Qiu T, Cao X, Clemens TL. 2006. A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* **281**: 17156-63.
- Lou T, Lee Y, Saint Jeannett J, Sargent T. 2003. Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 532-537.
- Marchant L, Linker C, Ruiz P, Guerrero N, Mayor R. 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev Biol* **198**: 319-329.
- Marshall AM. 1879. The morphology of the vertebrate olfactory organ. *Q J Microsc Sci* **19**: 300-340.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783-810.
- McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, Puellas E, Gerrelli D, Farooqi IS, Raza J. 2011. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: 1709-18.

- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**: 1438–1452.
- Mehlen P, Mille F, Thibert C. 2005. Morphogens and cell survival during development. *J Neurobiol* **64**: 357-66.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Hurlé JM. 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**: 5515-22.
- Meulemans D, Bronner-Fraser M. 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell* **7**: 291-9.
- Meyer H. 1978. Therapy of pulmonary symptoms of cystic fibrosis. *Monatsschr Kinderheilkd* **126**: 168-71.
- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-ABNAud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. 1999. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**: 401–414.
- Moestrup SK, Verroust PJ. 2001. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* **21**: 407-28.
- Morgan R, Sargent MG. 1997. The role in neural patterning of translation initiation factor eIF4AII; induction of neural fold genes. *Development* **124**: 2751-2760.
- Mukhopadhyay M, Teufel A, Yamashita T, Agulnick AD, Chen L, Downs KM, Schindler A, Grinberg A, Huang SP, Dorward D. 2003. Functional ablation of the mouse Ldb1 gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development* **130**: 495-505.
- Mukhopadhyay, M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Belmonte JC, Westphal H. 2001. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **1**: 423–434.
- Nakamura H. 2009. Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology. (Ed.) XXIX, 331 paginas.
- Nakano T, Murata T, Matsuo I, Aizawa S. 2000. OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 64-70.

- Nakata K, Koyabu Y, Aruga J, Mikoshiba K. 2000. A novel member of the xenopus Zinc family, Zic5, mediates neural crest development. *Mech Dev* **105**: 27-35.
- Nguyen VH, Schmid B, Trout J, Connors SA, Ekker M, Mullins MC. 1998. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a bmp2/swirl pathway of genes. *Dev Biol* **199**: 103-110.
- Nguyen VH, Trout J, Connors SA, Andermann P, Weinberg E, Mullins MC. 2000. Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development* **127**: 1209-1220.
- Nie X, Deng CX, Wang Q, Jiao K. 2008. Disruption of Smad4 in neural crest cells leads to mid-gestation death with pharyngeal arch, craniofacial and cardiac defects. *Dev Biol* **316**: 417-30.
- Nie X. 2005a. Apoptosis, proliferation and gene expression patterns in mouse developing tongue. *Anat Embryol (Berl)* **210**: 125-32.
- Nie X. 2005b. Cranial base in craniofacial development: developmental features, influence on facial growth, anomaly, and molecular basis. *Acta Odontol Scand* **63**: 127-35.
- Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. 1994. Control of cell behavior during vertebrate development by slug, zinc finger gene. *Science* **264**: 835-839.
- Northcutt RG, Gans C. 1983. The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Rev Biol* **58**: 1-28.
- Ogino H, Yasuda K. 1998. Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* **280**: 115-8.
- Ohnemus S, Kanzler B, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE, Boehm T, Mallo M. 2002. Aortic arch and pharyngeal phenotype in the absence of BMP-dependent neural crest in the mouse. *Mech Dev* **119**: 127-35.
- Osório, L., Teillet, M.A., Catala, M., (2009). Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. *Development* **136**:1717-26.
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**: 1711-7.

- Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, Stoeckli ET. 2003. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* **21**: 93-6.
- Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM. 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707-10.
- Platt J. 1893. Ectodermic origin of the cartilage of the head. *Anat Anz* **8**: 506–509.
- Platt J. 1897. The development of the cartilaginous skull and the branchial and hypoglossal musculature in Necturus. *Morphol Jahrb* **25**: 377–464.
- Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W, Simeone A. 2004. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* **131**: 2037-48.
- Raible DW. 2006. Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 698–703
- Raven PC. 1931. Zur entwicklung der ganglienleiste. I. Diekinematik der ganglienleistenentwicklung bei den urodelen. **65**: 211-290.
- Raven PC. 1936. Zur entwicklung der ganglienleiste.Y. uber die differenzierung des rumpfganglienleisten materials. **13**: 122-143.
- Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. 2009. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* **136**: 1093-104.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-16.
- Ripamonti U, Herbst NN, Ramoshebi LN. 2005. Bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal tissue engineering: experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 357-68.
- Rubenstein JL, Beachy PA. 1998. Patterning of the embryonic forebrain. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 18-26.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L. 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* **21**: 445-77.

- Sahar DE, Longaker MT, Quarto N. 2005. Sox9 neural crest determinant gene controls patterning and closure of the posterior frontal cranial suture. *Dev Biol* **280**: 344-61.
- Sakurai Y, Kurokawa D, Kiyonari H, Kajikawa E, Suda Y, Aizawa S. 2010. Otx2 and Otx1 protect diencephalon and mesencephalon from caudalization into metencephalon during early brain regionalization. *Dev Biol* **347**: 392-403.
- Sauka-Spengler T, Barembaum M. 2008. Gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo. *Methods Cell Biol* **87**: 237-56.
- Saxén L, Toivonen S. 1962. Primary Embryonic Induction. Prentice-Hall, NJ.
- Schmidt C, McGonnell I, Allen S, Patel K. 2008. The role of Wnt signalling in the development of somites and neural crest. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **195**: 1-64.
- Sellek MAJ, Bronner-Fraser M. 1995. Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. *Development* **121**: 525-538.
- Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X. 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**: 951-961.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700.
- Shimamura K, Martinez S, Puellas L, Rubenstein JL. 1997. Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev Neurosci* **19**: 88-96.
- Shimamura K, Rubenstein JL. 1997. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**: 2709-18.
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E. 1992. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**: 687-90.
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E. 1993. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* **12**: 2735-47.
- Smith WC, Harland RM. 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**: 829-40.

- Spemann H, Mangold H. 1924. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik des Organismen* **100**: 599-638.
- Spoelgen R, Hammes A, Anzenberger U, Zechner D, Andersen OM, Jerchow B, Willnow TE. 2005. LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development* **132**: 405-14.
- Spokony RF, Aoki Y, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet JP. 2002. The transcription factor Sox9 is required for cephalic neural crest development in *Xenopus*. *Development* **129**: 421-32.
- Stone LS. 1922. Further experiments on the extirpation and transplantation of mesectoderm in *Amblystoma punctatum*. **44**: 95-131.
- Stone LS. 1929. Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in the formation of head skeleton and loose connective tissue in *Rana palustris*. 40-76
- Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, McConnell SK, Martin GR, Rubenstein JL. 2006. Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* **133**: 1831-44.
- Sugiyama S, Prochiantz A, Hensch TK. 2009. From brain formation to plasticity: insights on Otx2 homeoprotein. *Dev Growth Differ* **51**: 369-77.
- Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, Natsume N, Shimozato K, Ohbayashi N, Suzuki Y. 2009. Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet* **84**: 406-11.
- Teillet M, Watanabe Y, Jeffs P, Duprez D, Lapointe F, Le Douarin NM. 1998. Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development* **125**: 2019-30.
- Teillet MA, Kalcheim C, Le Douarin NM. 1987. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev Biol* **120**: 329-47.
- Terry K, Magan H, Baranski M, Burrus LW. 2000. Sfrp-1 and sfrp-2 are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. *Mech Dev* **97**: 177-82.
- Thomsen GH. 1997. Antagonism within and around the organizer: BMP inhibitors in vertebrate body patterning. *Trends Genet* **13**: 209– 211.

- Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S. 1998. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev Genes Evol* **208**: 431–439.
- Tzahor E, Kempf H, Mootosamy RC, Poon AC, Abzhanov A, Tabin CJ, Dietrich S, Lassar AB. 2003. Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev* **17**: 3087-99.
- Varga AC, Wrana JL. 2005. The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* **24**: 5713-21.
- Vargesson N, Patel K, Lewis J, Tickle C. 1995. Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev* **77**: 197-9.
- Vilhais-Neto GC, Pourquié O. 2008. Retinoic acid. *Curr. Biol.* 18:550-2.
- Waite KA, Eng C. 2003. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* **4**: 763-73.
- Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**: 1435-49.
- Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr. 1994. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**: 575-88.
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**: 2105-16.
- Wu JW, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, Rigotti DJ, Kyin S, Muir TW, Fairman R, Massagué J, Shi Y. 2001. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* **8**: 1277-89.
- Wu P, Jiang TX, Suksaweang S, Widelitz RB, Chuong CM. 2004. Molecular shaping of the beak. *Science* **305**: 1465-1466.
- Yao S, Qian M, Deng S, Xie L, Yang H, Xiao C, Zhang T, Xu H, Zhao X, Wei YQ, Mo X. 2010. Kzfp controls canonical Wnt8 signaling to modulate dorsoventral patterning during zebrafish gastrulation. *J Biol Chem* **31**: 42086-42096.

- Yntema CL, Hammond WS. 1945. Depletions and abnormalities in the cervical sympathetic system of the chick following extirpation of neural crest. *J Exp Zool* **100**: 237-63.
- Yoshida M, Assimacopoulos S, Jones KR, Grove EA. 2006. Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* **133**: 537–545.
- Yu JK, Meulemans D, McKeown SJ, Bronner-Fraser M. 2008. Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome Res* **18**: 1127-1132.
- Yu X, He F, Zhang T, Espinoza-Lewis RA, Lin L, Yang J, Chen Y. 2008b. Cerberus functions as a BMP agonist to synergistically induce nodal expression during left-right axis determination in the chick embryo. *Dev Dyn* **237**: 3613-23.
- Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf JM, Brulet. 2000. Gene expression profiles in normal and *Otx2*^{-/-} early gastrulating mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14388-14393.

Abstract

The transcription factor *Foxg1* is essential for the development and specification of the telencephalon. Mutations for *Foxg1* are causally linked to microcephaly and mental retardation in Atypical Rett and 14q12 microdeletion syndromes. Recent findings show that, early in development, cephalic neural crest (CNC) cells control morphogenetic activities of brain organizers and stimulate the growth of prosencephalic alar plate. To understand how CNC conveys its trophic effect on the telencephalon, we have silenced the gene encoding for *Smad1*, a transcription factor expressed in the CNC cells, which transduces diverse morphogenetic pathways. *Smad1* silencing results in microcephaly and partial holoprosencephaly, which early coincide with the loss of *Foxg1* in the telencephalon. Rescue experiments show that CNC cells can positively regulate *Foxg1* expression independently of Fgf8 activity in the prosencephalic organizer. Furthermore, the depletion of *Foxg1* activity in the telencephalon alters *Otx2* and *Foxa2* expression in the thalamus and tectum. We have identified the mediators produced by the CNC that controls *Foxg1* activity and showed that Bmp and Wnt antagonists, *Noggin*, *Gremlin* and *Dkk1* initiate the specification of the telencephalon. Additionally, the molecular patterning of the telencephalic and di/mesencephalic compartments requires the activity of *Sfrp1* and *Sfrp2*, and *Cerberus*, respectively. Altogether, we show that CNC cells controls brain patterning by regulating *Foxg1* expression through a network of morphogenetic modulators controlled by *Smad1* activity.