



**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRB Y
PROTEÍNAS ASOCIADAS EN EL DESARROLLO
DE LA RETINA Y EN DISTROFIAS RETINIANAS**

SAÚL HERRANZ MARTÍN

**TESIS DOCTORAL
SALAMANCA, 2013**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**Participación de las proteínas CRB y
proteínas asociadas en el desarrollo de la
retina y en distrofias retinianas**

-TESIS DOCTORAL-

SAÚL HERRANZ MARTÍN

Salamanca, marzo 2013



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



Participación de las proteínas CRB y proteínas asociadas en el desarrollo de la retina y en distrofias retinianas

Memoria presentada por Saúl Herranz Martín para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Salamanca con
mención de “Doctorado Internacional”

Directores:

Prof. Dra. D^a. Concepción Lillo Delgado

Prof. Dra. D^a. Almudena Velasco Arranz

Marzo 2013



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

**Participación de las proteínas CRB y
proteínas asociadas en el desarrollo de la
retina y en distrofias retinianas**

Saúl Herranz Martín

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Saul', enclosed within a blue oval.

Salamanca, marzo de 2013

D^a María Concepción Lillo Delgado, Profesora Titular de Biología Celular, y D^a Almudena Velasco Arranz, Profesora Titular de Biología Celular

HACEN CONSTAR:

QUE la Tesis Doctoral titulada “Participación de las proteínas CRB y proteínas asociadas en el desarrollo de la retina y en distrofias retinianas”, ha sido realizada por el licenciado en Biología D. Saúl Herranz Martín en el departamento de Biología Celular y Patología y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado en *Neurociencias* de nuestra Universidad.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales, y por tanto, autorizan la defensa de la Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca con mención de “Doctorado Internacional”.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a 13 de marzo de 2013,

La directora



Fdo.: M^a Concepción Lillo Delgado

La directora



Fdo.: Almudena Velasco Arranz

Y parece que fue ayer cuando empecé esta Tesis y de repente han pasado ya unos cuantos años. Años de duro trabajo, pero que han sido mucho más llevaderos y satisfactorios gracias a muchas personas. Aquí va mi pequeño homenaje para todos vosotros y vosotras:

Al antiguo director del Departamento el Prof. Dr. José Aijón. Gracias por haberme permitido entrar a formar de este grupo de investigación, por firmarme la beca que me permitió realizar esta Tesis y por toda su ayuda y apoyo siempre que lo he necesitado.

A mi directora, la Prof. Dra. Conchi Lillo. Gracias por tu ciencia y tus ideas, por tu infinita ayuda y tu extraordinaria dirección, pero sobre todo gracias a tu extraordinaria calidad humana. Ha sido fácil hacer la Tesis contigo, y eso es algo muy importante durante esta etapa. A mí codirectora, la Prof. Dra. Almudena Velasco, por tus efectivas correcciones, por haberme alentado en los momentos más difíciles, siempre con una sonrisa, y por tus buenas ideas para mejorar el trabajo.

Al nuevo director del departamento, el Prof. Dr. Juan Lara, porque ante cualquier pregunta que te he planteado, por muy descabellada que fuera, siempre me has ayudado a encontrar la respuesta.

A todos los miembros de los laboratorios donde realicé mis dos estancias, el laboratorio dirigido por la Prof. Maria-Therese Perez en Lund (Suecia) y el de Cork (Irlanda), dirigido por el Prof. Tom Cotter. Gracias por hacerme sentir como uno más del laboratorio desde el primer día, por ayudarme y enseñarme lo que sabíais de ciencia: tack så mycket, thank you very much. Y gracias al laboratorio dirigido por el Prof. Pedro de la Villa en la Universidad de Alcalá de Henares y al laboratorio 15 del INCYL, dirigido por la Prof. Dra. Arantxa Tabernero. Los primeros me hicieron sencillo el complejo mundo de la electrofisiología; los segundos me enseñaron a desenvolverme en la vida del cultivo celular.

Al Dr. David Jimeno con el que tantísimo he aprendido. Gracias por enseñarme a manejar el microscopio confocal y por resolverme todas mis dudas en Biología Molecular.

A los profesores Drs. Rosario Arévalo, Ángel Porteros, Jose Ramón Alonso, Eduardo Weruaga y Jesús García Briñón, que siempre se me han echado una mano cuando lo he necesitado. Especialmente Eduardo, que me ha dejado un hueco de su laboratorio para escribir la Tesis.

Gracias a todo el personal del Incyl, conserjes, secretarios, técnicos del animalario... A los directores, los Prof. Drs. Raquel Rodríguez y Miguel Merchán, por hacer que el edificio funcione día a día. Al Dr. Javier Herrero, que siempre deja lo que está haciendo para ayudarme cuando tengo algún problema.

Y por supuesto, gracias a todos mis compañeros del INCYL, tanto a los presentes como a los pasados, por todos los momentos vividos dentro y fuera del "edificio inteligente". A David, Rodri y las chicas del laboratorio 7 por haberme acogido mientras escribía esta Tesis, y a Azu, que tanto me ayudó siempre que lo necesité. A todos los miembros del lab 10, y a mis compañeros del laboratorio 3. A Marta, mi maestra y el camino a seguir, la coronada como reina de la ciencia. A Miguel, mi compañero de fatigas, de andanzas, incluso de clown. A Maite, mi otra compañera de fatigas, la persona más solidaria que conozco. A Fernando, el digno heredero del ojo de ARVO. Al prof. Juan Carlos Arevalo, un gran atleta

con una ciencia ejemplar. A Tao, la china que más se españolizó. A Saray, la perfección hecha ciencia. A Cris, la que pone paz en el gallinero del lab 3. A Laurita y su energía desbordante. A doña Bego y sus enseñanzas (populares y científicas) inigualables. A Ángela, que tanto me ha ayudado a acabar la Tesis, y siempre con una sonrisa. Llegarás muy lejos. A Antonio, mi padawan, un gran proyecto de científico, pero sobretodo el mejor compañero que podía tener.

A la perfección de Ana y la sabiduría de Charli, mis dos más que amigos. A pesar de todo el tiempo vivido, sé que aun sólo estamos en los primeros años de nuestra amistad. Os admiro. A la alegría de la Titxu, a mi único brother de esclusa, Javi Sánchez, al ingenio de Carol, al patriotismo cántabro con toques de Osorno de Car, al saber estar de "mami" Belén, al misticismo de Silvi y al resto de biologuitos. Hicisteis que los años de la carrera fueran los mejores de mi vida. ¿Cuándo la próxima quedada? A Charli versión compañero de piso. 8 años compartiendo sofá deberían dar derecho a herencia. Gracias a las cañas y pinchos, las risas, las fiestas y las espaldas, los viajes, la nieve y algún rato de sol y a la amistad de: Marta, Miguel, Maite, Fernando, Laura, Bego, Antonio, Ángela, Ester, Seila, Patri. A la sonrisa (y las risas y chistes) de Bea, pero sobre todo a tu inigualable amistad y al resto de mis amigos y amigas del pueblo. Gracias a todos vosotros y vosotras por estos años. La próxima pinta la tomamos en Sheffield.

A toda mi familia, especialmente a mi primo Julio, por enseñarme a luchar y a sonreír en las situaciones más complicadas. Siempre seguiré tu ejemplo. Gracias a mis abuelos, los que están y los que se fueron durante el transcurso de la Tesis. A David, que es casi como un hermano empeñado en robarme el sofá. A mi hermana, la "locuaz", pero con una generosidad, cariño y trabajo difíciles de igualar. Gracias por estar siempre ahí y ocuparte de todo, eres la mejor. A mis padres, gracias por apoyar mis decisiones, por ayudarme siempre, por educarme en la vida y por ser tan buenas personas y ser tan buenos conmigo. En definitiva, gracias por darme la vida.

Ah, y no podía olvidarme de la ciudad de Salamanca, cuyos habitantes (pasados y presentes) y doradas calles, llenas de historia, me han hecho sentirme como en casa desde el momento en el que llegué, un lejano septiembre de 2002. Y ahora que me voy "p'ahí", siempre recordaré con nostalgia, melancolía y una sonrisa los diez años vividos "p'aquí", en los que a pesar de no haber "caído" ninguna cosa, ni "soñarme" en ningún momento y ni tan siquiera haber preguntado "lo que" cuando las dudas me desbordaban, me he sentido como un salmantino más todo este tiempo.

Este trabajo ha sido financiado gracias a: Red de Terapia Celular de Castilla y León, Junta de Castilla y León (SA005B07), grupos de excelencia de Castilla y León (GR-185), Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2008-04490, Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Fundación Ramón Areces y Junta de Castilla y León por los contratos de personal investigador a recién titulados cofinanciados por el fondo social europeo.

**Lo maravilloso de aprender algo es que
nadie puede arrebatárnoslo (*B. B. King*)**

A mi primo Julio

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. LA RETINA	5
2. TIPOS CELULARES DE LA RETINA	6
2.1. EPITELIO PIGMENTARIO.....	6
2.2. ELEMENTOS NEURONALES	8
2.2.1. FOTORRECEPTORES.....	8
2.2.1.1. CONOS.....	9
2.2.1.2 BASTONES.....	10
2.2.2. CÉLULAS BIPOLARES	10
2.2.3. CÉLULAS HORIZONTALES.....	11
2.2.4. CÉLULAS INTERPLEXIFORMES.....	11
2.2.5. CÉLULAS AMACRINAS	12
2.2.6. CÉLULAS GANGLIONARES	12
2.3. CÉLULAS GLIALES	13
2.3.1. CÉLULAS DE MÜLLER	13
2.3.1.1. MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA	15
2.3.1.2. MEMBRANA LIMITANTE INTERNA.....	16
2.3.2. ASTROCITOS	16
2.3.3. CÉLULAS DE LA MICROGLÍA.....	17
3. VASCULARIZACIÓN DE LA RETINA.....	18
4. FISIOLOGÍA DE LA RETINA	19
4.1. LA FOTOTRANSDUCCIÓN	19
4.2. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA DE LA RETINA.....	20
5. DESARROLLO DE LA RETINA	22
5.1. GÉNESIS DEL EP.....	22
5.2. RETINOGENÉESIS NEURAL	23
5.3. DESARROLLO DE LAS CAPAS DE LA RETINA.....	26
6. FAMILIA DE PROTEÍNAS CRB	27
6.1. CRB1.....	28
6.2. CRB2.....	30
6.3. CRB3.....	31
6.4. DOMINIOS CITOPLASMÁTICOS Y COMPLEJO INTRACELULAR DE LAS PROTEÍNAS CRB32	
6.5. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS CRB EN MAMÍFEROS	34
7. DISTROFIAS RETINIANAS.....	35
7.1. RETINOSIS PIGMENTARIA	35
7.2. AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER.....	36
7.3. TERAPIAS RETINIANAS	38

7.3.1.	REEMPLAZAMIENTO GÉNICO	39
7.3.2.	SUPRESIÓN DE LOS ALELOS MUTANTES	39
7.3.3.	LIBERACIÓN TERAPÉUTICA DE PROTEÍNAS.....	40
8.	MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CRB	41
8.1.	EL RATÓN KNOCK-OUT PARA CRB1.....	42
8.2.	EL RATÓN KNOCK-IN PARA CRB1	42
8.3.	EL RATÓN MUTANTE <i>Crb1</i> ^{rd8}	42
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....		45
MATERIAL Y MÉTODOS.....		51
1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	53
2.	GENOTIPADO	53
2.1.	EXTRACCIÓN DEL ADN	53
2.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	54
2.3.	ELECTROFORESIS.....	55
3.	GENERACIÓN DE ANTICUERPOS	56
4.	CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER.....	57
4.1.	ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR: ENSAYO DE MTT	59
4.2.	RECOGIDA DE MUESTRAS DE CÉLULAS EN CULTIVO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA..	59
4.3.	RECOGIDA DE MUESTRAS DE CÉLULAS EN CULTIVO PARA WESTERN BLOT	60
5.	INMUNOHISTOQUÍMICA	60
5.1.	PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.....	60
5.2.	RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA.....	61
5.3.	TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES Y EN CULTIVO	61
5.4.	MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO “in toto”	63
5.5.	MARCADORES.....	63
5.6.	CONTROLES DE ESPECIFICIDAD DE LA IHQ.....	68
5.7.	MICROSCOPIA Y CUANTIFICACIÓN.....	69
5.7.1.	CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CONOS EN RETINAS	69
5.7.2.	CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.....	69
5.7.3.	RECONSTRUCCIÓN DE RETINAS <i>IN TOTO</i> Y CUANTIFICACIÓN DE LA VASCULARIZACIÓN	70
5.7.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CUANTIFICACIONES	70
6.	WESTERN BLOTTING	71
6.1.	PROCESAMIENTO DE LAS RETINAS	71
6.2.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PROCEDENTES DE TEJIDO Y CULTIVO	71
6.3.	ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	72
6.4.	INMUNODETECCIÓN	73
6.5.	ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN	75

7.	INMUNOPRECIPITACIÓN Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.....	75
7.1.	UNIÓN “DYNABEADS PROTEIN A/G” - ANTICUERPO	76
7.2.	PREPARACIÓN DEL LISADO PROTEICO	77
7.3.	INMUNOPRECIPITACIÓN.....	77
7.4.	ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN	78
8.	ELECTRORRETINOGRAMAS Y REGISTROS CELULARES.....	78
8.1.	ELECTRORRETINOGRAMA DE CAMPO COMPLETO	79
8.2.	PATCH-CLAMP.....	80
9.	TRANSFECCIONES CELULARES	81
9.1.	TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO USANDO EL MÉTODO CHARIOT	82
9.2.	TRANSFECCIÓN DE RETINAS IN VIVO USANDO EL AGENTE CHARIOT®	82
9.3.	HISTOQUÍMICA	83
10.	MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA.....	84
10.1.	FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	84
10.2.	INCLUSIÓN.....	84
10.3.	PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES.....	85
10.4.	OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES.....	85
	RESULTADOS	87
1.	LA RETINA DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	89
1.1.	LA MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA EN LA RETINA DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	89
1.2.	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CRB1 Y LAS PROTEÍNAS MAGUK.....	91
1.2.1.	LA PROTEÍNA RESIDUAL CRB1 EN LA RETINA DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	91
1.2.2.	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MAGUK: PALS1 Y MPP4	92
1.2.2.1.	INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A PALS1	93
1.2.2.2.	INMUNORREACTIVIDAD PARA MPP4	94
1.3.	LOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINA DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	95
1.3.1.	INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A RECOVERINA, RODOPSINA Y PNA	95
1.3.1.1.	RECOVERINA.....	96
1.3.1.2.	PNA Y RODOPSINA.....	97
1.3.2.	RECuento DEL NÚMERO DE CONOS Y ERG	99
1.3.3.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SINAPSIS.....	100
1.3.3.1.	INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A SINAPTOFISINA	101
1.3.3.2.	TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y GLUTAMATÉRGICA	102
1.4.	LAS CÉLULAS DE MÜLLER DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	102
1.4.1.	ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN TEJIDO	103
1.4.1.1.	PATRÓN DE MARCAJE DE CRALBP	103
1.4.1.2.	INMUNORREACTIVIDAD PARA GLAST Y GS	104
1.4.1.3.	INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A GFAP Y SOX2	106
1.4.1.4.	DISTRIBUCIÓN DE LOS CANALES DE K ⁺ Kir 4.1 EN LA RETINA DEL RATÓN <i>CrB1^{rd8}</i>	108

1.4.1.5. LA VASCULARIZACIÓN EN LA RETINA DEL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i> EN EL ESTADIO DE P7	109
1.4.2. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER <i>IN VITRO</i>	111
1.4.2.1. SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS Y CARACTERIZACIÓN	111
1.4.2.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD Y DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER	112
1.4.2.3. LAS UNIONES ADHERENTES EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO.	
INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A β -CATENINA	113
1.4.2.4. GFAP Y SOX2 EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO	114
1.4.2.5. REGISTROS DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO	115
1.5. TRANSFECCIÓN PROTEICA MEDIANTE EL AGENTE CHARIOT <i>IN VITRO E IN VIVO</i>	116
2. EVIDENCIA INMUNOCITOQUÍMICA DE LA LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN ADULTO Y EN DESARROLLO POSTNATAL	118
2.1. ANÁLISIS GENERAL DE LA PRESENCIA DE CRB3 EN LA RETINA ADULTA Y DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.....	118
2.2. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN ADULTO	119
2.2.1. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LOS SEGMENTOS INTERNOS DE LOS FOTORRECEPTORES	119
2.2.2. DISTRIBUCIÓN DE CRB3 EN LA CAPA PLEXIFORME EXTERNA.....	121
2.2.3. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA CAPA PLEXIFORME INTERNA.....	123
2.3. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA RETINA DURANTE EL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO	124
2.4. PATRÓN DE INTERACCIÓN DE CRB3 CON LAS PROTEÍNAS MAGUK EN LA RETINA SILVESTRE	125
ICONOGRAFÍA.....	128
DISCUSIÓN.....	130
1. LA RETINA DEL RATÓN <i>CRB1^{rd8}</i>	162
1.1. LA DESORGANIZACIÓN DE LA MLE DE LA RETINA DEL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i>	162
1.1.1. MODIFICACIONES DE LA MLE DE LA RETINA DEL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i>	163
1.1.2. FALLOS DE LA MLE Y ESTABLECIMIENTO DE ROSETAS	164
1.2. <i>CRB1 Y PROTEÍNAS MAGUK ASOCIADAS</i>	165
1.2.1. PALS1 Y MPP4 EN LA RETINA <i>Crb1^{rd8}</i>	167
1.3. <i>LOS FOTORRECEPTORES EN DEGENERACIÓN DEL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i></i>	169
1.3.1. ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES EN CONOS Y BASTONES	170
1.3.2. LA FUNCIÓN VISUAL DEL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i>	171
1.3.3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SINAPSI	171
1.4. <i>LA GLIA REACTIVA EN EL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i>: CÉLULAS DE MÜLLER</i>	172
1.4.1. PRIMEROS ESTADIOS DE LA RESPUESTA GLIAL EN EL RATÓN <i>Crb1^{rd8}</i>	173
1.4.2. LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN EL RATÓN ADULTO <i>Crb1^{rd8}</i>	175
1.4.3. LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO	178
1.4.3.1. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER.....	179
1.4.3.2. SOX2 Y β -CATENINA EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER	180
1.5. <i>CHARIOT, ¿UN BUEN MÉTODO DE TRANSFECCIÓN?</i>	181

2.	ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN	183
2.1.	<i>DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LOS SEGMENTOS INTERNOS DE LOS FOTORRECEPTORES</i>	<i>183</i>
2.2.	<i>CRB3 EN LAS UNIONES ADHERENTES.....</i>	<i>185</i>
2.3.	<i>CRB3 EN LAS CAPAS PLEXIFORMES.....</i>	<i>185</i>
2.4.	<i>CRB3 EN EL COMPLEJO ENSAMBLADO A PARTIR DE LA FAMILIA CRB.....</i>	<i>188</i>
3.	RESUMEN.....	189
	CONCLUSIONES.....	161
	BIBLIOGRAFÍA.....	193
	ENGLISH SUMMARY.....	217

Abreviaturas

AT: Tubulina acetilada	NO: Nervio óptico
CB: Calbindina	NT: Nasotemporal
CC: Cilio de conexión de los fotorreceptores	NV: Nasoventral
CCG: Capa de las células ganglionares	P: Estadio postnatal
CFNO: Capa de las fibras del nervio óptico	PALS1: Proteína asociada con LIN7
CNB: Capa de los neuroblastos	PATJ: <i>Protein associated with tight junctions</i>
CNE: Capa nuclear externa	pb: Pares de bases
CNI: Capa nuclear interna	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CNO: Cabeza de nervio óptico	PFA: Paraformaldehído despolimerizado
Co-IP: Co-inmunoprecipitación	PKCα: Proteína quinasa C α
CPE: Capa plexiforme externa	PNA: Aglutinina de cacahuete
CPI: Capa plexiforme interna	PTTG1: Factor transformador de tumores pituitarios 1
CR: Calretinina	RP: Retinosis pigmentaria
CRALBP: Proteína de unión al retinaldehído celular	RP12: Retinosis pigmentaria tipo 12
DIC: Días en cultivo	RSA: Región subapical de la MLE
DMEM: <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	SDS: Dodecil sulfato sódico
DMSO: Dimetilsulfóxido	SE: Segmentos externos de los fotorreceptores
DO: Disco óptico	SEM: Error estándar de la media
DT: Dorsotemporal	SF: Segmentos de los fotorreceptores
DV: Dorsoventral	SI: Segmentos internos de los fotorreceptores
E: Estadio embrionario	SNC: Sistema nervioso central
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	SOX2: <i>Sex determining region Y-box 2</i>
EP: Epitelio pigmentario	SYP: Sinaptofisina
EPB41L5: <i>Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5</i>	TH: Tirosina hidroxilasa
ERG: Electrorretinograma	TA: Temperatura ambiente
FBS: Suero fetal bovino	TBE: Tris-borato EDTA
GABA: Ácido γ -aminobutírico	TC: Tampón cacodilato
GAD65/67: Glutamato descarboxilasa 65/67.	TF: Tampón fosfato
GFAP: Proteína ácida glial fibrilar	TFS: Tampón fosfato salino
GLAST: Transportador de glutamato-aspartato	TFS-Tx: Tampón fosfato salino con triton X-100
GNB3: Proteína G subunidad β 3	TFS-Tween: Tampón fosfato salino con tween 20
GS: Glutamina sintetasa	TTS: Tampón tris salino
IHQ: Inmunohistoquímica	TTS-T: Tampón tris salino con tween 20
IP: Inmunoprecipitación	WB: <i>Western blot</i>
Kir 4.1: <i>Inwardly rectifying potassium channel</i>	VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular
MLE: Membrana limitante externa	VELI3: <i>Vertebrate lin-7 homolog 3</i>
MLI: Membrana limitante interna	VGLUT1: Transportador vesicular de glutamato 1
MPP: Proteína de membrana palmitoilada	ZO1: Zónula ocluyente 1
MUPP: <i>Multi-PDZ domain protein-1</i>	

Introducción

1. LA RETINA

La retina es la porción neural que tapiza el fondo del ojo. Embriológicamente se desarrolla a partir de una evaginación del prosencéfalo, por lo que se considera una parte más del sistema nervioso central (SNC). Su misión es transformar las señales luminosas que recibe en impulsos nerviosos, en un proceso conocido como fototransducción. Esos impulsos nerviosos salen de la retina a través del nervio óptico (NO) y viajan a la corteza cerebral para su procesamiento (Kolb, 2000).

Estructuralmente la retina presenta una organización laminar donde se alternan capas de somas celulares con capas de neuropilo (**Fig. 1**) (Cajal, 1893). Desde la zona más escleral o externa, a la más vitreal o interna, estas capas son:

- ✓ Epitelio pigmentario (EP): se trata de un componente no neural de la retina. Es imprescindible para mantener la integridad de los segmentos de los fotorreceptores y que puedan llevar a cabo su función.
- ✓ Segmentos de los fotorreceptores (SF), divididos a su vez en:
 - Segmentos externos (SE)
 - Segmentos internos (SI)
- ✓ Membrana limitante externa (MLE): formada por uniones especializadas de tipo adherente que se establecen entre las prolongaciones más esclerales de las células de Müller y los SI de los fotorreceptores.
- ✓ Capa nuclear externa (CNE): formada por los somas de las células fotorreceptoras (conos y bastones).
- ✓ Capa plexiforme externa (CPE): lámina de neuropilo donde se produce la sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y horizontales.
- ✓ Capa nuclear interna (CNI): formada por los somas de las células bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas, así como por los cuerpos de las células de Müller.
- ✓ Capa plexiforme interna (CPI): capa de neuropilo de la retina, donde se realizan las sinapsis entre células bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares.
- ✓ Capa de las células ganglionares (CCG): constituida por los somas de células ganglionares y algunas amacrinas desplazadas.
- ✓ Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO): formada por los axones de las células ganglionares dispuestos paralelamente a la superficie de la retina para formar el nervio óptico (NO), que sale de la retina hacia los centros superiores del sistema visual a

través de la cabeza de nervio óptico (CNO). Además, en esta capa se localizan algunos tipos de células gliales como astrocitos y microglía.

- ✓ Membrana limitante interna (MLI): capa más interna de la retina constituida por los procesos vitreales de las células de Müller unidos entre sí.

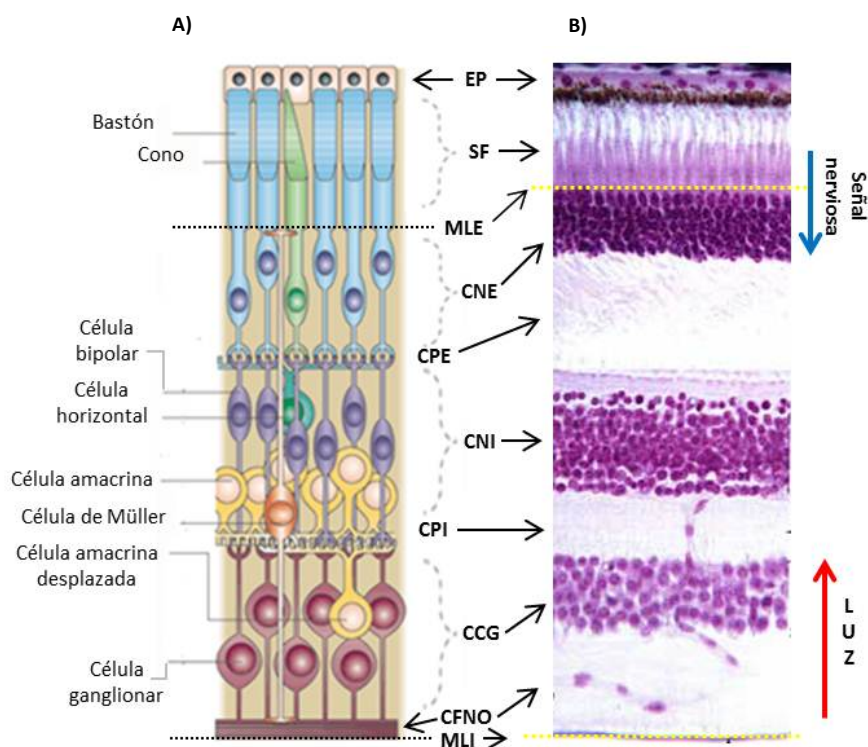


Figura 1: Imágenes de dos secciones transversales de retina de mamífero. **A)** Esquema de la disposición de las capas de la retina, y algunos de sus principales tipos celulares. **B)** Sección de retina teñida con hematoxilina-eosina donde se aprecian los diferentes estratos retinianos. La luz (flecha roja) penetra por la zona más vitreal atravesando toda la retina llegando a los fotorreceptores donde se transforma en señal eléctrica (flecha azul) que viajará por todo el espesor de la retina para transmitirse por el nervio óptico hacia los centros superiores de control visual del encéfalo. EP, epitelio pigmentario; SF, segmentos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares; CFNO, capa de las fibras del nervio óptico; MLI, membrana limitante interna. Modificado de Dyer and Cepko, 2001 y <http://www.bio.miami.edu>

2. TIPOS CELULARES DE LA RETINA

2.1. EPITELIO PIGMENTARIO

Capa de células epiteliales cúbicas asociadas entre sí por medio de uniones de tipo ocluyente, y adherente en su cara ápico-lateral. Se trata de un tejido altamente polarizado cuyo lado basal tiene numerosos pliegues formando un laberinto basal. Este lado basal se une a la cara interna de la coroides formando la lámina de Bruch. Hacia la zona más apical, las

células del epitelio pigmentario cuentan con numerosas microvellosidades de hasta 7 μm de largo que rodean a los SF con los que no forman complejos de unión (**Fig. 2**) (Geneser, 2000; Sparrow et al., 2010).

Dentro de su maquinaria celular cabe destacar que hacia su zona más basal encontramos el núcleo, mientras que en el lado apical se localizan numerosos gránulos de melanina, así como abundantes orgánulos y fagosomas, imprescindibles para llevar a cabo algunas de las funciones más importantes del EP (**Fig. 2**). Dentro de esas funciones, destacan:

- ✓ Absorción de la luz por parte de la melanina contribuyendo a la correcta formación de la imagen.
- ✓ Transporte de iones, agua y productos metabólicos desde la retina a la sangre, y captación de nutrientes como glucosa, retinol o ácidos grasos de la sangre para transportarlos hacia los fotorreceptores.
- ✓ Mantenimiento de la homeostasis retiniana.
- ✓ Participación en el ciclo visual: las células del EP isomerizan el retinol a 11-cis retinal, y lo devuelven a los fotorreceptores.
- ✓ Fagocitosis de los discos de los SE de los fotorreceptores.
- ✓ Secreción de factores de crecimiento que ayudan a mantener la integridad de los fotorreceptores.
- ✓ Mantenimiento de la barrera hemato-retiniana contribuyendo a la separación de la retina del torrente sanguíneo activando o silenciando reacciones inmunes que puedan afectar a la retina.

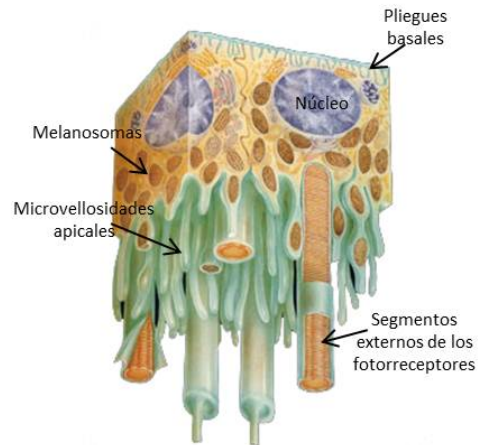


Figura 2: Esquema de una célula del epitelio pigmentario de la retina
Modificado de www.augenklinikchemnitz.de

El EP y los fotorreceptores están íntimamente relacionados de forma que, mutaciones en genes expresados en fotorreceptores conducen a la degeneración del EP en patologías como la enfermedad de Stargardt, y en otros casos, mutaciones de genes típicos del EP provocan distrofias retinianas como la Amaurosis congénita de Leber, la Retinosis pigmentaria (RP) o la degeneración macular asociada a la edad (Strauss, 2005).

2.2. ELEMENTOS NEURONALES

2.2.1. FOTORRECEPTORES

Los conos y bastones son las células fotorreceptoras de la retina de los vertebrados. Se disponen desde el EP hasta la CPE. La zona más próxima al EP está formada por los SF, mientras que en la más cercana a la CPE se ubican sus terminales sinápticos, quedando sus cuerpos celulares en una posición intermedia, en la denominada CNE (**Fig. 3**). Entre los SF y los núcleos se localiza la MLE que, como mencionamos anteriormente, es el lugar de unión entre los procesos de las células de Müller y fotorreceptores a través de uniones especializadas de tipo adherentes (Geneser, 2000).

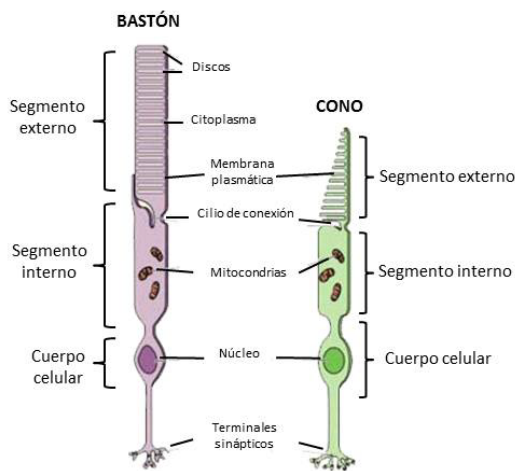


Figura 3: Esquema de los dos tipos de células fotorreceptoras, conos y bastones.
Modificado de <http://thebrain.mcgill.ca>

Los SE de los fotorreceptores son la porción fotosensible de la célula. Están formados por apilamientos de membrana o discos, en cuyo interior se encuentran los pigmentos sensibles a la luz (**Fig. 3**). Los SI de los fotorreceptores contienen mitocondrias, ribosomas y discos membranosos apilados donde se localizan las moléculas de opsina (**Fig. 3**) (Kolb, 2000). Los SE e internos se unen entre sí por medio de un cilio primario de conexión (CC), cuya estructura es del tipo 9+0, es decir, 9 dobletes de microtúbulos sin ningún doblete central (**Fig. 3**) (Eley et al.,

2005). El cilio de conexión es una estructura clave para la supervivencia del fotorreceptor:

- ✓ Durante el desarrollo, los SE de los fotorreceptores surgen a partir del cilio, siendo por tanto un cilio modificado.
- ✓ Permiten el paso de los pigmentos visuales y discos membranosos producidos en los SI de los fotorreceptores hacia los SE, así como de otras proteínas y productos de síntesis del segmento interno al externo y en sentido contrario.
- ✓ Fallos en el cilio de conexión son responsables de algunas patologías retinianas, como el síndrome de Usher o el síndrome de Bardet-Biedt (Eley et al., 2005; Williams, 2008).

A nivel de la CNE se ubican los cuerpos celulares de los fotorreceptores, formando varias hileras de células. Los terminales sinápticos de los fotorreceptores se localizan en la CPE, y hacen sinapsis con las células bipolares y horizontales (**Fig. 3**). Estos terminales cuentan con

una gran cantidad de vesículas sinápticas, y presentan unas estructuras densas denominadas bastoncillos sinápticos (Kolb, 2000).

Los conos y los bastones presentan diferencias en su estructura, así como en la función en la que están especializados. A continuación, describimos en detalle cada uno de estos dos tipos celulares.

2.2.1.1. CONOS

El segmento externo de los conos presenta forma cónica y una longitud aproximada de 13 μm . Los discos membranosos de los conos tienen un diámetro mayor que los de los bastones, aunque su extremo distal es afilado. Además la membrana plasmática de los SE de los conos presenta repliegues, de forma que algunos de los discos están en contacto con el espacio extracelular (**Fig. 3**) (Kaufman, 2004; Kolb, 2000).

En la CNE, los cuerpos celulares de los conos se disponen en una única hilera de células, justo debajo de la MLE (**Fig. 4**) (Kolb, 2000).

Los terminales sinápticos de los conos se denominan pedículos, y poseen una morfología cónica cuyo diámetro oscila entre 8-10 μm . En los pedículos de los conos se producen unos treinta bastoncillos sinápticos, que se asocian con otras tantas triadas de elementos postsinápticos. Estas triadas están formadas por un elemento central que es una dendrita de célula bipolar, y dos dendritas de células horizontales que actúan como elementos laterales (Kolb, 2000).

Los conos son los tipos de fotorreceptores encargados de la visión en color. Sus pigmentos visuales son las opsinas. En función de la longitud de onda a las que estas opsinas son más sensibles, se distinguen tres tipos de conos: conos rojos, que son más sensibles a longitudes de onda larga (560 nm, conos L), conos verdes, a longitudes de onda media (530 nm, conos M), y conos azules, a longitudes de onda corta (430 nm, conos S).

La existencia de tres tipos de conos, y la diferencia en la sensibilidad a las diferentes longitudes de onda de cada uno de ellos, es la responsable de la visión tricromática típica de primates y humanos (Kolb, 2000, 2003). Sin embargo, muchas especies de mamíferos, como los murinos, presentan visión dicromática ya que sólo cuentan con dos tipos de conos, conos tipo M y tipo S (Applebury et al., 2000; Kolb, 2000; Szel and Rohlich, 1992; Szel et al., 1993).

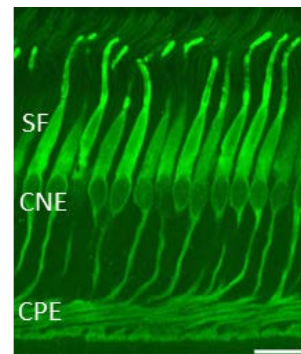


Figura 4: Imagen de microscopía de fluorescencia de una sección transversal de retina de mono. El marcate en verde representa los conos. SF, segmentos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa. Barra de escala 20 mm. Modificado de www.retinalmicroscopy.com

2.2.1.2 BASTONES

Los SE de los bastones son cilíndricos con una longitud aproximada de 24 μm (**Fig. 3**). Su membrana plasmática es continua y sin repliegues, y tiene un diámetro de los discos más o menos constante en toda la longitud del segmento (**Fig. 3**) (Kaufman, 2004; Kolb, 2000).

Los núcleos de los bastones en la CNE se localizan en varios estratos de células, justo debajo de los núcleos de los conos (**Fig. 5**) (Kolb, 2000).

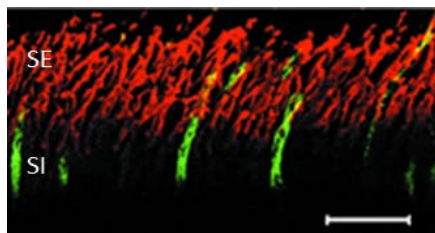


Figura 5: Imagen de microscopía de fluorescencia de una retina de ratón. Teñidos en color rojo se observan los segmentos externos de los bastones, en verde los segmentos de los conos. OS, segmentos externos de los fotorreceptores; IS, segmentos internos de los fotorreceptores. Modificado de Michalakis et al., 2005.

Los terminales sinápticos de los bastones se denominan esférulas. Tienen forma redondeada y un diámetro aproximado que varía entre las 3-5 μm . A nivel de la CPE, las esférulas se localizan escleralmente a los pedículos de los conos. Dos bastoncillos sinápticos de cada esférula se asocian centralmente con dos dendritas de células bipolares, y lateralmente con dos dendritas de células horizontales (Kolb, 2000).

Los bastones son los encargados de llevar a cabo la visión en condiciones de baja iluminación, o visión escotópica. Contienen como pigmento visual principal la rodopsina, que es sensible a longitudes de onda cercanas a los 500 nm. Los roedores, como los ratones o las ratas, son animales nocturnos cuya retina cuenta con una mayor proporción de bastones; entre el 95 y el 97 % de sus fotorreceptores (Kolb, 2000, 2003).

2.2.2. CÉLULAS BIPOLARES

Las células bipolares tienen su soma en la CNI, y a partir de él parten dos extensiones, una expansión dendrítica que hace sinapsis con los fotorreceptores en la CPE, y una expansión axónica que contacta con las células ganglionares y amacrinas a nivel de la CPI (**Fig. 6**). Por tanto, la misión de las células bipolares es transmitir la señal nerviosa desde los fotorreceptores a las células ganglionares y amacrinas (Bear, 1998). La retina del ratón presenta diez tipos de células bipolares que se diferencian por el tipo de fotorreceptor con el que contactan y su ramificación dendrítica, así como por la forma y el nivel de ramificación de sus axones dentro de la IPL. Nueve de estos tipos son células bipolares de conos, y hay un tipo de célula bipolar de bastón. A su vez, hay tres clases de células bipolares de cono tipo OFF que realizan sinapsis en la zona más externa de la CPI, y seis clases de células bipolares de cono tipo ON cuyos axones terminan en la zona más interna de la CPI. Las células bipolares de bastón son del tipo ON, realizan sinapsis en la zona más vitreal de la CPI y, en la retina del

ratón, suponen hasta el 50% de todas las células bipolares (**Fig. 6**) (Ghosh et al., 2004; Pignatelli and Strettoi, 2004; Strettoi and Pignatelli, 2000; Strettoi and Volpini, 2002).

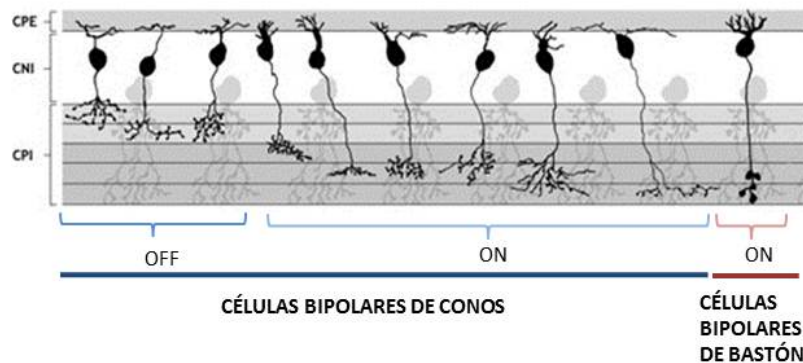


Figura 6: Esquema de los diferentes tipos de células bipolares de la retina del ratón. Sobre la línea azul se representan los diez tipos de células bipolares de conos, 3 de tipo OFF y 6 de tipo ON. Encima de la línea roja vemos la única célula bipolar de bastón que es tipo ON. CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Modificado de Pignatelli and Strettoi, 2004.

2.2.3. CÉLULAS HORIZONTALES

Se trata de neuronas multipolares de asociación lateral cuyo soma se sitúa hacia la parte más escleral de la CNI. Sus dendritas contactan a nivel de la CPE con los pedículos de los conos y las esférulas de los bastones, modulando la transmisión del impulso nervioso (Geneser, 2000; Kolb, 2003; Wassle, 2004).

La retina de los humanos presenta tres tipos de células horizontales, que se diferencian en función de su forma y del tipo de fotorreceptor con el que hacen sinapsis (Kolb et al., 1994; Kolb, 2000). Sin embargo, la retina del ratón sólo cuenta con un tipo de célula horizontal, denominado célula horizontal de tipo B portador de axón, que contacta y modula la información nerviosa de ambos tipos de fotorreceptores, conos y bastones (Peichl and Gonzalez-Soriano, 1994).

2.2.4. CÉLULAS INTERPLEXIFORMES

Son células de asociación cuyo soma se encuentra en la zona central de la CNI, y cuentan con ramificaciones hacia las dos capas plexiformes de la retina, de forma que reciben aferencias sinápticas desde la CPI, y envían eferencias hacia la CPE (Kolb, 2000). Fueron descritas por primera vez en la retina del gato, y posteriormente se han encontrado en la retina de la mayor parte de las especies (Fisher, 1979b; Gallego, 1971; Kolb et al., 1992).

2.2.5. CÉLULAS AMACRINAS

Las células amacrinas tienen su cuerpo celular en la CNI y envían prolongaciones que se extienden por la CPI. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando a las células bipolares. Por tanto, forman la vía de asociación lateral a nivel de la CPI. Su función es controlar la información que llega a las células ganglionares. Algunas células amacrinas tienen su soma en la CCG y se denominan amacrinas desplazadas (Bear, 1998; Kolb, 2000).

Este tipo celular supone, aproximadamente, el 40% de las neuronas de la CNI de la retina de los mamíferos (Jeon et al., 1998). Se han identificado hasta 25 tipos diferentes de células amacrinas en la retina de humanos y primates, que se dividen en función de la arborización del árbol dendrítico, el tamaño, y el lugar donde realizan sinapsis dentro de la CPI (**Fig. 7**). Además, los diferentes tipos de células amacrinas pueden estar especializados en liberar un único neurotransmisor, como acetilcolina o GABA, nombrándose en estos casos como células amacrinas colinérgicas o gabaérgicas, entre otras (Jeon et al., 1998; Kolb, 2000; Kolb et al., 1992; Mariani, 1990).

2.2.6. CÉLULAS GANGLIONARES

Son las neuronas de proyección de la retina. Poseen un cuerpo celular voluminoso que se localiza en la capa de su mismo nombre, CCG. Sus ramificaciones dendríticas contactan con las terminaciones sinápticas de las células bipolares y amacrinas dentro de la CPI (**Fig. 7**). Sus axones se ubican a nivel de la CFNO formando dicha capa. El conjunto de axones de las células ganglionares forman el NO que es el encargado de llevar la información hasta el núcleo geniculado lateral del tálamo, la siguiente estación de relevo del proceso visual en el encéfalo de los mamíferos (Kolb, 2000).

En función de su morfología, tamaño y ramificación del árbol dendrítico pueden distinguirse hasta 25 tipos de células ganglionares en la retina humana, aunque típicamente suelen simplificarse en tres grupos principales: células ganglionares difusas grandes, células ganglionares difusas pequeñas y células ganglionares enanas (Kolb, 2000). En la retina del ratón, las células ganglionares se dividen en tres tipos en función del tamaño del soma y del campo dendrítico (Doi et al., 1995).

2.3. CÉLULAS GLIALES

2.3.1. CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller son la glía radial de la retina, y el tipo de célula glial predominante en este tejido (Cajal, 1893; Müller, 1952). Se originan a partir del neuroepitelio que da lugar a todas las neuronas retinianas (Turner and Cepko, 1987). Las células de Müller localizan su cuerpo celular en la CNI, y desde ahí envían procesos dirigidos a ambos extremos de la retina. Estos procesos se intercalan entre los somas de las neuronas en las capas nucleares y envuelven axones y dendritas de las capas plexiformes. Finalmente, los extremos más esclerales y más vitreales de las células de Müller contribuyen a la formación de la MLE y MLI respectivamente. Apicalmente a la MLE, las células de Müller forman una serie de evaginaciones ricas en filamentos de actina, denominadas microvellosidades, cuya misión es

aumentar la superficie de membrana (**Fig. 7**) (Kolb, 2000).

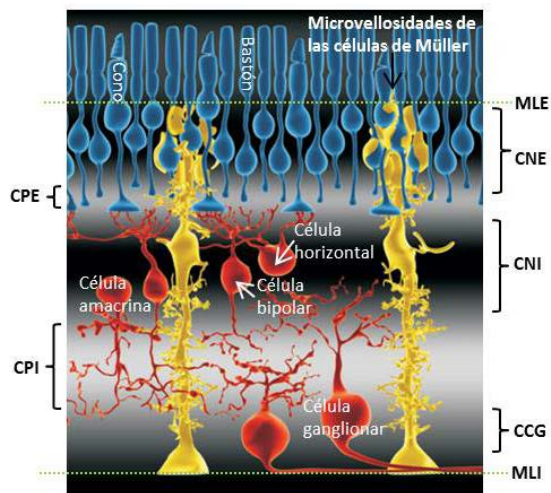


Figura 7: Esquema de la disposición de las células de Müller (en amarillo) en la retina de los vertebrados. Su soma se dispone en la CNI, el extremo más escleral en la MLE y las microvellosidades apicales a la misma, sus pies en la MLI, y los procesos radiales rodeando el resto de capas nucleares y plexiformes de la retina. MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares; MLI, membrana limitante interna. Modificado de Lu et al., 2006.

Las células de Müller son especialmente ricas en glucógeno, en mitocondrias y elementos del citoesqueleto como los filamentos intermedios (Kolb, 2000). En las porciones más vitreales de la célula de Müller, esos filamentos son ricos en la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), típica de filamentos intermedios de astrocitos. Sin embargo, tras un daño en la retina, la GFAP es sobrepresada y puede llegar a aparecer a lo largo de todo el cuerpo de la célula de Müller (Bignami and Dahl, 1979; Ekstrom et al., 1988; Fisher and Lewis, 2003; Guerin et al., 1990; Okada et al., 1990).

Las células de Müller son vitales para la supervivencia neuronal y para el correcto procesamiento de la información visual (Bringmann and Reichenbach, 2001). Entre sus funciones principales destacan:

- ✓ Son el soporte arquitectónico de la retina al extenderse radialmente a través de la misma.

- ✓ Regulan la homeostasis del medio extracelular, controlando iones como el K^+ . La membrana plasmática de las células de Müller es altamente permeable al K^+ , ya que presenta una gran cantidad de canales de K^+ Kir. A través de estos canales, las células de Müller captan los iones de K^+ liberados por las neuronas al espacio extracelular, y los redistribuyen a otras localizaciones, como el vítreo, los vasos sanguíneos o el espacio subretinal (Bringmann and Reichenbach, 2001; Karwoski et al., 1989; Newman et al., 1984; Reichenbach et al., 1992). Además, esta regulación y redistribución de K^+ a través de toda la retina por parte de las células de Müller contribuye a la generación de la respuesta en el electroretinograma (Kolb, 2000; Miller and Dowling, 1970; Newman, 1989; Newman and Odette, 1984).
- ✓ Proporcionan a las neuronas de la retina combustible energético y eliminan productos de desecho del metabolismo. Entre otros, las células de Müller metabolizan la glucosa a lactato, principal sustrato de los fotorreceptores en su metabolismo oxidativo (Bringmann and Reichenbach, 2001; Poitry-Yamate et al., 1995).
- ✓ Contribuyen al procesamiento de la información visual por la captación o liberación de neurotransmisores, evitando la exposición prolongada de las neuronas a los mismos. Es especialmente importante el papel de las células de Müller en el ciclo glutamato-glutamina en la retina. La enzima glutamina sintetasa (GS) se localiza en las células de Müller en la retina (Bringmann et al., 2009b; Linser and Moscona, 1979; Riepe and Norenburg, 1977). A través del transportador de glutamato-aspartato (GLAST), las células de Müller captan el exceso de glutamato del medio extracelular y lo convierten a glutamina. Posteriormente transfieren esa glutamina a las neuronas, que la usan como precursor para la síntesis de glutamato (Bringmann et al., 2009b).
- ✓ Intervienen en la fagocitosis de desechos celulares y en la liberación de sustancias neuroactivas, tales como dopamina, taurina y ácido γ -aminobutírico (GABA), así como en la retirada de este último (Bringmann et al., 2009b; Kolb, 2000).
- ✓ Sintetizan ácido retinoico a partir de retinol, sustancia muy importante durante el desarrollo del ojo y de todo el sistema nervioso (Edwards, 1994; Kolb, 2000).

Recientemente se ha descrito el papel de las células de Müller como células madre, y parece que en la regulación de esta función son claves las vías de señalización de Notch y Wnt (Das et al., 2006). Las células de Müller en cultivo son capaces de formar neuroesferas que expresan marcadores de progenitores neurales, entre otros SOX2 ("sex determining region Y-box 2") o Nestina (Das et al., 2006). Estas neuroesferas originan neuronas y células gliales, así

como neuroesferas secundarias y terciarias capaces de dar lugar a nuevas células, lo que les define como verdaderas células madre (Ahmad et al., 2011; Das et al., 2006).

Como mencionamos anteriormente, los procesos más esclerales de las células de Müller forman parte de la MLE, y las prolongaciones más vitreales organizan la MLI. A continuación detallamos las principales características de ambas regiones.

2.3.1.1. MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA

A microscopía óptica se distingue como una membrana delgada y fenestrada, aunque en realidad es un término incorrecto, ya que a microscopía electrónica no se observa una membrana como tal (**Fig. 8A**). Está formada por las uniones especializadas de tipo adherente establecidas entre las células de Müller y los SI de los fotorreceptores, o en ocasiones entre dos células de Müller y, de manera más excepcional, entre células fotorreceptoras (**Figs 7 y 8A**) (Geneser, 2000). Las uniones de tipo adherente están formadas por complejos multiproteicos que se anclan al citoesqueleto de la célula. En la MLE, ese complejo está constituido por proteínas del tipo β - y α -catenina, N-cadherinas o zónula ocluyente 1 (ZO-1) (**Fig. 8B**) (Itoh et al., 1997; Matsunaga et al., 1988; Paffenholz et al., 1999). Entre las funciones de la MLE se encuentran:

- ✓ Actuar como barrera selectiva que regula el paso de sustancias entre el espacio subretinal y la retina neural (Asayama, 1976; Gosens et al., 2008; Omri et al., 2010).
- ✓ Contribuir al mantenimiento e integridad de la CNE (Campbell et al., 2007; Rivolta et al., 2002; Stuck et al., 2012).
- ✓ Separar la membrana plasmática de las células de Müller y fotorreceptores en dos dominios, uno apical y otro basolateral, confiriendo polaridad a ambos tipos celulares. Ambos dominios contienen diferentes proteínas y complejos de lípidos que realizan distintas funciones (Gosens et al., 2008).

Apicalmente a las uniones adherentes que conforman la MLE se localiza la región subapical (RSA) (**Fig. 8**). Es en esta área donde se sitúan algunos de los complejos multiproteicos claves para determinar la polaridad de fotorreceptores y células de Müller. En mamíferos, entre estos complejos destaca el ensamblado a partir de las proteínas de la familia Crumbs (proteínas CRB) que se unen a las proteínas de membrana asociadas a dominios guanilato kinasa (proteínas MAGUK) (**Fig. 8B**) (Gosens et al., 2008; Kantardzhieva et al., 2005; Koike et al., 2005; Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002; Roh et al., 2002; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006).

Introducción

La pérdida de integridad de la MLE produce algunas de las distrofias retinianas más frecuentes, como diferentes tipos de RP o la Amaurosis congénita de Leber, provocadas por el fallo de algunas de las proteínas que forman parte de los complejos multiproteicos mencionados anteriormente (Alves et al., 2012; Campbell et al., 2007; Mehalow et al., 2003; Richard et al., 2006).

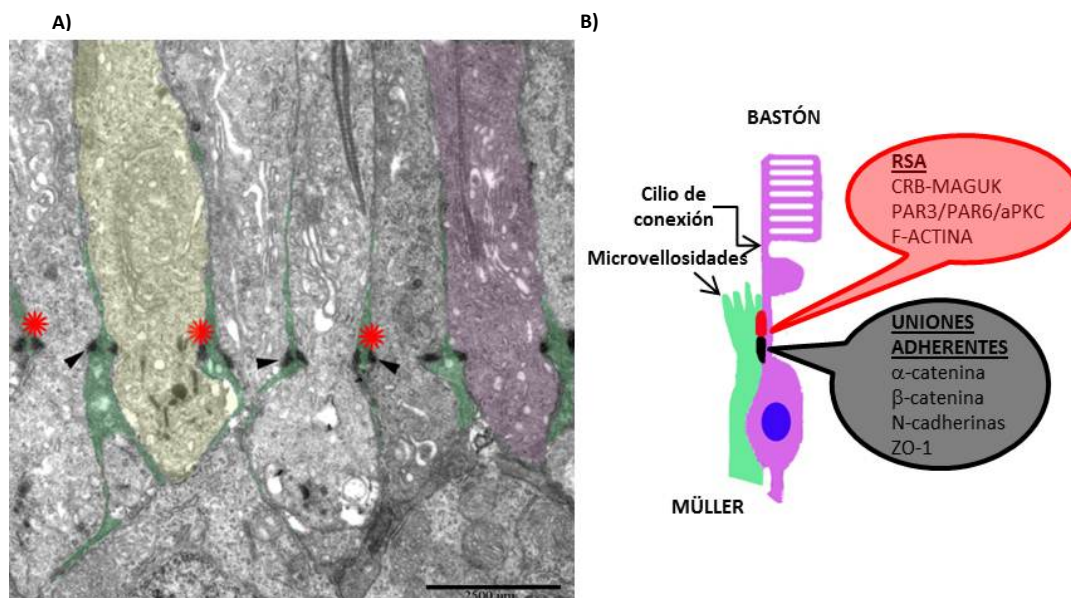


Figura 8: **A)** Imagen de microscopía electrónica de transmisión donde se observan las uniones adherentes (cabeza de flecha) establecidas entre las células de Müller y los fotorreceptores formando la MLE. Apicalmente a esas uniones se dispone la RSA de la MLE (asteriscos en rojo). En verde, algunos de los procesos de las células de Müller, de amarillo un fotorreceptor de tipo cono, y en violeta, un bastón. **B)** Esquema de un fotorreceptor y una célula de Müller formando una unión adherente de la MLE. En negro dicha unión con algunas de las proteínas principales que la componen. En rojo la RSA de la MLE, donde se encuentran los complejos de polaridad celular y F-actina. RSA, región subapical de la membrana limitante externa. Barra de escala: 2500nm.

2.3.1.2. MEMBRANA LIMITANTE INTERNA

Está formada por los pies de las células de Müller que se extienden lateralmente, asociados entre ellos mediante uniones no especializadas (**Fig. 7**). La cara vitreal de los pies de estas células está recubierta por mucopolisacáridos, lo que permite la formación de una membrana basal que establece una barrera entre la retina y el humor vítreo. (Kolb, 2000).

Aparte de la formación de la MLI, los pies de las células Müller también rodean los vasos sanguíneos que irrigan la retina (Kolb, 2000).

2.3.2. ASTROCITOS

Células gliales que se localizan casi exclusivamente en la CFNO. Su distribución a lo largo de esta capa no es uniforme, encontrando la máxima densidad de astrocitos en la zona central de la retina, hacia la CNO, y su número disminuye a medida que nos acercamos a la periferia

(Kolb, 2000). Estas células no derivan del neuroepitelio que originan las neuronas retinianas y células de Müller, sino que llegan a este tejido desde el cerebro, a través del nervio óptico en desarrollo (Chan-Ling, 1994; Kolb, 2000; Stone and Dreher, 1987).

Los astrocitos de la retina se caracterizan por tener un cuerpo celular aplanado y un gran número de procesos radiales, aunque su estructura varía en función de su localización: elongadas a nivel de la retina central, y estrelladas en la periferia (Schnitzer, 1988). Dentro de su maquinaria celular destaca su núcleo eucromático redondeado u oval y la gran cantidad de filamentos intermedios que poseen (Kolb, 2000). Entre sus funciones destacan:

- ✓ Forman parte de la barrera hematoencefálica: están en contacto con los vasos sanguíneos de la CFNO (Hollander et al., 1991; Kolb, 2000).
- ✓ Sus somas y prolongaciones se disponen sobre los axones de las células ganglionares, sirviéndolos de soporte estructural y nutritivo (Hollander et al., 1991; Kolb, 2000).
- ✓ Nutren de metabolitos a las neuronas debido a la gran cantidad de glucógeno con la que cuentan en su citoplasma (Kolb, 2000).
- ✓ Al igual que las células de Müller, los astrocitos parecen intervenir en la regulación de la homeostasis iónica, controlando los niveles extracelulares de K^+ y el metabolismo de ciertos neurotransmisores (Kolb, 2000).
- ✓ Protegen a las neuronas de radicales libres debido a su elevado contenido en antioxidantes y a su capacidad para regenerar glutatión y ascorbato (Bringmann et al., 2009b; Schutte and Werner, 1998; Wilson, 1997).
- ✓ Intercambio de desechos entre el humor vítreo y la retina en algunos procesos degenerativos de la retina (Ramirez et al., 2001).

Finalmente destacar que en la retina de algunos vertebrados, como es el caso de los teleósteos, los astrocitos parecen tener un papel fundamental en la regeneración axonal tras una lesión (Lillo et al., 2002; Parrilla et al., 2012a, b).

2.3.3. CÉLULAS DE LA MICROGLÍA

La microglía en la retina se sitúa prácticamente en todas las capas retinianas (Chan-Ling, 1994; Kolb, 2000). Derivan de células precursoras de la médula ósea, llegando a la retina con los precursores de los vasos sanguíneos, durante la embriogénesis (Grossmann et al., 2002).

En una retina no lesionada presentan una morfología estrellada que rodea los vasos sanguíneos, actuando como macrófagos residentes (Gupta et al., 2003). Al producirse una lesión, las células de microglía se activan y pasan a denominarse microglía reactiva. En este estado, las células son de mayor tamaño, presentan una morfología redondeada o ameboide y

migran al área dañada donde fagocitan los desechos celulares generados (Gupta et al., 2003; Jimeno et al., 1999; Kolb, 2000).

3. VASCULARIZACIÓN DE LA RETINA

La irrigación de la retina es doble, ya que por un lado se nutre a partir de los vasos sanguíneos coroideos y por otro, a partir de la arteria retinal central.

La coroides recibe la mayor parte del flujo sanguíneo, entre el 65 y 85% (Henkind, 1979). Los vasos coroideos son esenciales para el mantenimiento de la retina externa, especialmente para los fotorreceptores. Penetran en la esclera alrededor del NO y se diseminan en la coroides formando sus tres capas vasculares: la *externa*, que es la más escleral, la *medial* y la *interna*, que es la más cercana a la membrana de Bruch del EP (Kolb, 2000). A su vez, los correspondientes lóbulos venosos drenan en vénulas y venas que discurren hacia el centro del globo ocular, penetran en la esclera y se fusionan para formar la vena oftálmica (Kolb, 2000).

El resto del flujo sanguíneo llega a través de la arteria retinal central. Ésta penetra en la retina a través de la CNO y nutre a los estratos más internos del tejido. Para ello, la arteria retinal se ramifica una vez ha alcanzado la retina, formando redes capilares que se introducen desde la CFNO hasta las CPI y CPE (**Fig. 9**)(Kolb, 2000; Zhang, 1994). En cuanto al retorno venoso, los capilares venosos confluyen en vénulas de mayor tamaño, que se fusionan formando la vena retinal central (Kolb, 2000). A diferencia de lo que ocurre en el humano, cuya vascularización está completa en el momento del nacimiento, en el ratón, el desarrollo del sistema vascular proveniente de esta arteria no se completa hasta las tres semanas de edad

(**Fig. 9**) (Dorrell et al., 2002; Edwards et al., 2011; Saint-Geniez and D'Amore, 2004). Durante la formación del árbol vascular, las capas internas de la retina, así como el cristalino, se nutren a partir del sistema vascular hialoideo fetal, localizado en el humor vítreo (**Fig. 9**). Este sistema vascular se elimina en humanos en el momento del nacimiento. Sin embargo, en el ratón no comienza a eliminarse hasta que la vascularización desarrollada desde la arteria retinal central se encuentra en

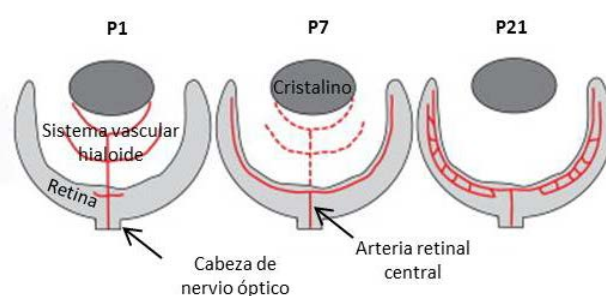


Figura 9: Esquema que representa la vascularización de la retina a partir de la arteria retinal central a diferentes edades de desarrollo postnatal. A P1, apenas ha comenzado la vascularización y hay un sistema vascular hialoideo en el humor vítreo completamente definido. A P7, éste comienza a eliminarse, a la vez que los vasos sanguíneos retinianos alcanzan la periferia del tejido. A P21, la vascularización ha concluido, y el sistema vascular hialoideo ha desaparecido totalmente. Modificado de Edwards et al., 2011.

un estadio avanzado (aproximadamente a la edad de P7), y no desaparece totalmente hasta que el árbol vascular retiniano no se encuentre completamente formado, a la edad de P21 (Fig. 9) (Edwards et al., 2011).

4. FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

4.1. LA FOTOTRANSDUCCIÓN

El proceso de fototransducción se inicia en los SE de los fotorreceptores, que transforman la luz que reciben en impulsos eléctricos. Éstos viajan por el cuerpo celular de los fotorreceptores hacia los axones estableciendo sinapsis con las dendritas de las neuronas bipolares en la CPE.

Los pigmentos fotosensibles se sintetizan en los SI de los fotorreceptores, y a través del cilio de conexión se transportan a los SE. En condiciones de oscuridad la membrana plasmática de los SE está despolarizada, gracias a la entrada de Na^+ a través de los canales regulados por GMP cíclico (GMPc), permitiendo que se libere glutamato por los terminales sinápticos de los fotorreceptores en la CPE (Fig. 10A). En respuesta a la luz se cierran los canales de Na^+ , hiperpolarizándose la membrana plasmática de los SE de los fotorreceptores. Esto se produce debido a que en los discos membranosos de los SE se localiza el fotopigmento sensible a la luz (rodopsina en bastones y diferentes tipos de opsinas en conos), cuya conformación cambia con los estímulos lumínicos. El cambio de conformación activa a una proteína G denominada transducina, que a su vez activa a una enzima fosfodiesterasa que degrada el GMPc presente en el citoplasma de los SE en condiciones de oscuridad. El descenso en la concentración de GMPc provoca el cierre de los canales de Na^+ , se hiperpolariza la membrana plasmática, suprimiendo la liberación de glutamato por parte de los terminales sinápticos de los fotorreceptores (Fig. 10B) (Bear, 1998).

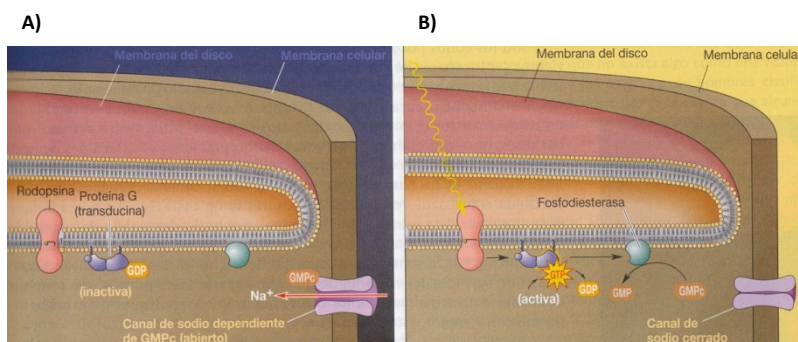


Figura 10: Cascada bioquímica de fototransducción en los segmentos externos de los fotorreceptores:
A) Condiciones de oscuridad;
B) Respuesta al estímulo lumínico.
 Tomado de Bear et al., 1998.

Las células bipolares son la primera estación de relevo en el tránsito de la información visual por la retina. Captan el impulso nervioso de los fotorreceptores, y a través de sus axones lo transmiten a las dendritas de las células ganglionares en la CPI (**Fig. 11**). En respuesta al cese de la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores, las neuronas bipolares pueden actuar de dos formas (Werblin, 1991; Werblin and Dowling, 1969):

- ✓ Células bipolares tipo ON: se despolarizan y liberan glutamato a la CPI. Originan la vía ON de la información visual, responsable de detectar imágenes claras sobre fondos oscuros (Kolb, 2003).

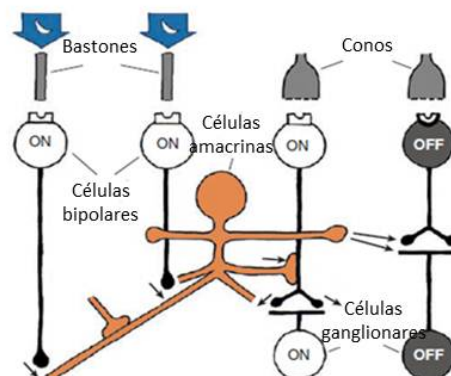


Figura 11: Esquema representativo de la señalización de tipo ON y OFF en la retina de los mamíferos. Las flechas indican el flujo de la información visual. Modificado de Kolb et al., 2003.

- ✓ Células bipolares tipo OFF: se hiperpolarizan y no liberan glutamato. Dan lugar a la vía OFF, por la que detectamos imágenes oscuras sobre fondos claros (Kolb, 2003).

Como explicamos en la sección 2.2.2., las células bipolares de conos son del tipo ON y OFF, mientras que las de bastón son solo ON (**Fig. 11**).

La siguiente estación de relevo en el procesamiento de la información visual es en la CPI. Las células bipolares OFF excitan a células ganglionares OFF (**Fig. 11**), mientras que las células bipolares ON sinaptan con células ganglionares ON, excepto las bipolares de bastón, que son del tipo ON, pero contactan con células amacrinas (**Fig. 11**).

Los axones de las células ganglionares forman el NO, que viaja a través de la CFNO y abandona la retina a través de la CNO, llevando la señal nerviosa producida hacia los centros superiores de control visual en el encéfalo.

El flujo de la información visual a través de la retina es modulado por las células horizontales y amacrinas en las CPE y CPI, respectivamente. Las células horizontales hacen sinapsis con los fotorreceptores enviando información visual de retorno a los mismos, mientras que las células amacrinas contactan con células bipolares y con otras amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares (Kolb, 2000)

4.2. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

Para estudiar la función de la retina existen diferentes aproximaciones experimentales, entre ellas el electroretinograma (ERG) y el *patch clamp*.

El ERG es una técnica de registro electrofisiológico en la que se mide la actividad eléctrica de todas las células de la retina en conjunto al recibir un estímulo luminoso. De esta forma permite analizar y estudiar de forma objetiva el estado funcional de la retina. Es ampliamente utilizada en animales de experimentación para valorar el grado de afectación visual y en seres humanos para diagnosticar distintas distrofias retinianas (Barhoum, 2006).

La actividad eléctrica generada ante el estímulo luminoso se divide en una serie de ondas (Fig.12) (Kolb, 2000). En función del tipo celular que produzca esa onda se dividen en:

- ✓ **Onda a:** Es la respuesta de los fotorreceptores (Hood and Birch, 1990; Niemeyer, 2002). Se puede dividir en (Vilela, 1998):
 - Subonda a1: representa el primer fragmento de la onda a. Es de respuesta rápida e indica la actividad de los conos.
 - Subonda b: es el segundo fragmento de la onda a. Es de respuesta más lenta e indica la actividad de los bastones.
- ✓ **Onda b:** Representa la respuesta producida debido a la actividad de las células de la CNI (Kolb, 2000).
- ✓ **Onda c:** Aparece tras la onda b, pero sólo cuando se usan estímulos luminosos de larga duración (segundos). La originan las células del EP (Oakley, 1977; Oakley and Green, 1976).
- ✓ **Onda d:** Es la más difícil de detectar y aparece después de la onda c. Parece que es debida a la transmisión sináptica de tipo AMPA/kainato que ocurre entre fotorreceptores y células bipolares tipo OFF (Sieving et al., 1994).

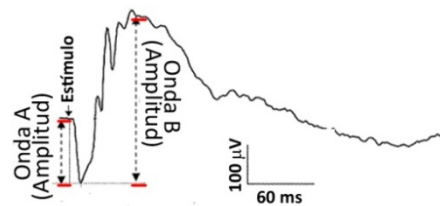


Figura 12: Ejemplo de un ERG realizado a un ratón de la estirpe C57BL/6. Se observan las ondas de tipo A y B, las más fáciles de detectar ante estímulos cortos. Modificado de http://www.ics-mci.fr/test_electroretinogram.html

El tipo de ERG más común es el ERG de campo completo, que consiste en la aplicación de un estímulo luminoso, distribuido homogéneamente sobre toda la retina, por lo que aporta información de todo el tejido en conjunto. Existen otros tipos de ERG que aportan información adicional sobre la función de la retina, entre otros, el ERG de respuesta umbral escotópica o STR que refleja la actividad de las células de la retina interna que participan en la vía de los bastones (Saszik et al., 2002), o el ERG de doble flash, que separa la respuesta de conos de la de bastones (Barhoum, 2006).

Aparte de las técnicas *in vivo* descritas anteriormente para el estudio de la función de la retina, existen otra serie de técnicas *in vitro* que permiten estudiar la actividad de una célula en particular. Entre esas técnicas, destaca el *patch clamp* (Neher and Sakmann, 1976).

El *patch-clamp* permite estudiar las propiedades electrofisiológicas de las membranas biológicas, registrando las corrientes iónicas de una célula entera o de un canal iónico aislado en un “parche” de membrana. En esta técnica, el movimiento de iones hacia dentro o hacia afuera a través de una pequeña porción de membrana, es cuantificada teniendo en cuenta la cantidad de corriente eléctrica necesaria para mantener el potencial de membrana a un valor fijo (Lodish, 2005). Para medir esa corriente iónica es necesario que la punta de una

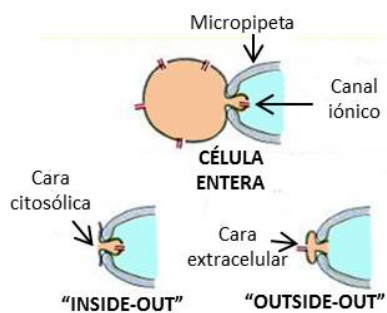


Figura 13: Imágenes representativas de las diferentes variantes de la técnica del “patch-clamp” en función de la configuración del gigasello. Modificado de Lodish et al., 2005.

micropipeta de registro haga contacto con la superficie de la membrana plasmática de una célula, creándose una presión negativa que hace que se establezca entre la pipeta y membrana un sello de alta resistencia, llamado gigasello. En función de la configuración de ese gigasello surgen diferentes variantes del *patch clamp*, como “célula entera”, “inside-out” y “outside-out” (Barhoum, 2006)

(Fig. 13).

La técnica del *patch clamp* es muy usada para el estudio de células aisladas de la retina (Barhoum et al., 2008; Varela et al., 2005). Además, como mencionamos anteriormente, la membrana plasmática de las células de Müller presentan en su membrana plasmática gran cantidad de canales iónicos de K^+ , lo que ha hecho que su actividad haya sido ampliamente registrada mediante esta técnica (Hirrlinger et al., 2011; Reichelt et al., 1993).

5. DESARROLLO DE LA RETINA

La retina de los vertebrados tiene origen neuroectodérmico. Se forma a partir de evaginaciones laterales del prosencéfalo, denominadas vesículas ópticas, (Chow and Lang, 2001). En los ratones este proceso se inicia en el estadio embrionario (E) de E8,5. Las vesículas ópticas contactan con el ectodermo superficial induciendo la formación de la placoda del cristalino, que dará lugar al cristalino del ojo. A la vez, las vesículas ópticas se invaginan y forman las copas ópticas o vesículas secundarias, donde se diferencian dos capas: *pars pigmentosa o capa pigmentaria*, que es la capa más externa y originará al EP, y *pars nervosa o capa neural*, la más interna y dará lugar la retina neural (Chow and Lang, 2001; Geneser, 2000).

5.1. GÉNESIS DEL EP

Para la determinación y diferenciación del EP son claves una serie de factores de transcripción como OTX2 (*orthodenticle homeobox 2*) y MiTF (*microphthalmia-associated*

transcription factor). Además para su correcto desarrollo debe interactuar con la retina neural en desarrollo y viceversa, por medio de una serie de morfógenos como el ácido retinoico y otros factores de crecimiento (Strauss, 2005).

5.2. RETINOGENÉISIS NEURAL

La diferenciación celular en la retina de los vertebrados se inicia en las capas más internas de la copa óptica, y desde ahí progresa hasta alcanzar la periferia. En esas capas internas se aloja la población de progenitores de células retinianas multipotentes, que dan lugar a todos los tipos neuronales de la retina y a la glía de Müller, comenzando ese proceso a partir del estadio embrionario de E10,5. La aparición de los diferentes tipos neurales es un proceso cronológicamente muy ordenado. (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Marquardt and Gruss, 2002; Prada et al., 1991; Young, 1985). Parece que el destino celular de cada subpoblación de células progenitoras de la retina esta mediado principalmente por un grupo de factores de transcripción con el dominio estructural hélice-bucle-hélice (bHLH) (**Fig. 14**) (Guillemot, 1999; Hatakeyama and Kageyama, 2004; Marquardt and Gruss, 2002; Perron and Harris, 2000). Además, las señales extrínsecas a la célula también parecen jugar un papel fundamental para alcanzar la determinación celular (Marquardt and Gruss, 2002).

Existen dos grupos funcionales de factores bHLH: los represores y los activadores (Hatakeyama and Kageyama, 2004):

- ✓ Represores: entre ellos *Hes1* y *Hes5*. Son expresados por los progenitores de células retinianas, e inhiben la diferenciación neuronal. En la retina embrionaria promueven el mantenimiento indiferenciado de los progenitores, y en la retina postembrionaria facilitan la diferenciación glial (Hatakeyama and Kageyama, 2004). *Hes1* y *Hes5* son efectores de la vía de señalización Notch, que actúa mediante interacciones célula-célula (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Ohtsuka et al., 1999). Esta vía de señalización se inicia por la estimulación del receptor Notch por su ligando, que es expresado por las células vecinas, provocando que el dominio intracelular de Notch migre al núcleo induciendo la expresión de *Hes1* y *Hes5*, cuyos productos inhiben la expresión de los genes activadores de la familia bHLH (**Fig. 14**) (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Hatakeyama and Kageyama, 2004).
- ✓ Activadores: entre ellos *Mash1*, *Math3*, *Math5* y *NeuroD*. Se activan si se inhibe la expresión de los genes represores de la familia bHLH, provocando diferenciación neuronal (**Fig. 14**). Para la neurogénesis promovida por estas proteínas activadoras parecen esenciales otros factores de transcripción, como aquellos con un dominio estructural de tipo homeodominio, entre ellos *PAX6* (Hatakeyama and Kageyama,

2004). PAX6 se expresa en progenitores de células retinianas. Para su activación requiere, entre otros, de factores extrínsecos como SHH (*sonic hedgehog*) o el factor de crecimiento epidermal. PAX6 activado promueve la transcripción de los genes activadores de la familia bHLH, y provoca la salida del ciclo celular originando neuronas post-mitóticas que se diferencian a los distintos tipos neuronales de la retina (Marquardt et al., 2001; Marquardt and Gruss, 2002).

Finalmente destacar que, en la cascada de señalización mediada por Notch, el factor de transcripción SOX2 parece jugar un papel importante, debido a que es el encargado de regular la transcripción del gen Notch (Ohsawa and Kageyama, 2008; Taranova et al., 2006).

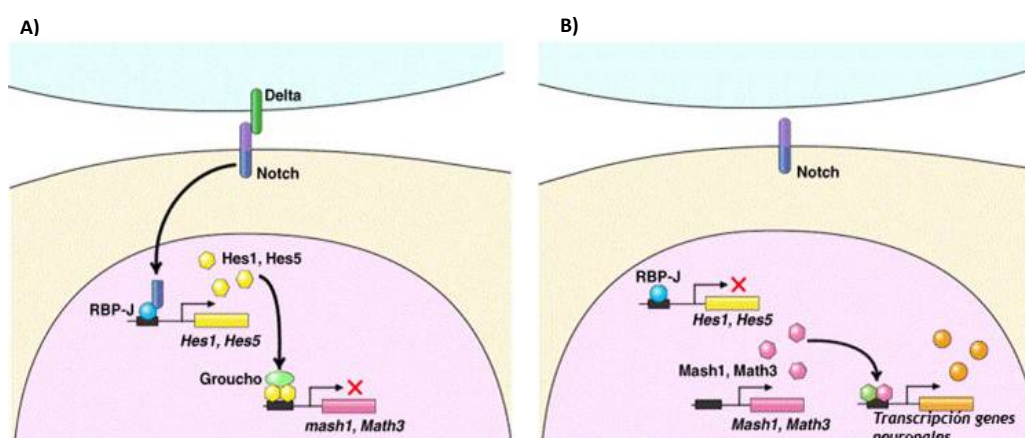


Figura 14: Esquema de la cascada de señalización mediada por Notch en la diferenciación retiniana. **A)** En presencia de su ligando, el dominio intracelular del receptor Notch viaja al núcleo donde activa los genes represores de la familia bHLH, cuyos productos inhiben a los genes activadores de la misma familia. **B)** En ausencia del ligando de Notch no se activan los genes represores, por lo que permanece activa la transcripción de los genes activadores de tipo bHLH. Modificado de Hatakeyama and Kageyama, 2004.

Como mencionamos anteriormente, la diferenciación de los diversos tipos neurales que conforman la retina es un proceso cronológicamente muy ordenado. Las primeras células que se desarrollan son de naturaleza neuronal, iniciando este proceso las células ganglionares, que comienzan a diferenciarse en un estadio embrionario aproximado de E11,5 y terminan en periodo postembrionario a una edad postnatal (P) de P3 (**Fig. 15**). A continuación, y antes de llegar al estadio de E12, comienzan a desarrollarse las células horizontales, conos y células amacrinas. Tanto las células horizontales como los conos terminan su diferenciación durante el periodo embrionario, mientras que las células amacrinas finalizan este proceso a P5 (**Fig. 15A**) (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Marquardt and Gruss, 2002). En el estadio embrionario de E14 los bastones comienzan su diferenciación, y lo terminan en el periodo postnatal de P10 (**Fig. 15A**). Finalmente, el último tipo neuronal que comienza a generarse son las células bipolares, que lo hacen en un estadio de E15, culminado su desarrollo a P11 (Hatakeyama and

Kageyama, 2004; Marquardt and Gruss, 2002; Ohsawa and Kageyama, 2008). Para la determinación de los fotorreceptores, uno de las principales tipos celulares afectados en degeneraciones retinianas tales como RP o Amaurosis congénita de Leber, parecen necesarios los miembros de la familia bHLH, NeuroD y Mash1 (**Fig. 15B**) (Ahmad, 1995; Akagi et al., 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008; Tomita et al., 1996). En cuanto a la elección cono-bastón, el factor de transcripción con el motivo cremallera de leucina, NRL, parece ser clave en la determinación de los bastones (**Fig. 15B**) (Chen et al., 2005; Cheng et al., 2006; Cheng et al., 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008; Peng et al., 2005).

Las células que comienzan su diferenciación más tardíamente son las células de Müller, cuyo desarrollo se inicia en el estadio embrionario de E16, finalizando a P9 (Marquardt and Gruss, 2002). La génesis de las células de Müller se produce a partir de los progenitores retinianos que permanecían en un estado indiferenciado, y que por tanto estaban expresando los genes represores de la familia bHLH, *hes1* y *hes5*, estando activos gracias a la vía de señalización Notch (**Fig. 15**) (Furukawa et al., 2000; Ohsawa and Kageyama, 2008). Una vez que las células de Müller se han desarrollado y han salido del ciclo celular, genes relacionados con la vía de señalización Notch continúan activos durante varios días, por lo que parece que además de ser imprescindibles para definir el fenotipo glial de estas células, deben estar implicados en su maduración y estabilización de la identidad (Nelson et al., 2011).

La **figura 15** muestra el patrón de desarrollo temporal de los principales tipos neurales de la retina del ratón, así como algunos de los factores de transcripción necesarios para que cada tipo celular logre diferenciarse correctamente.

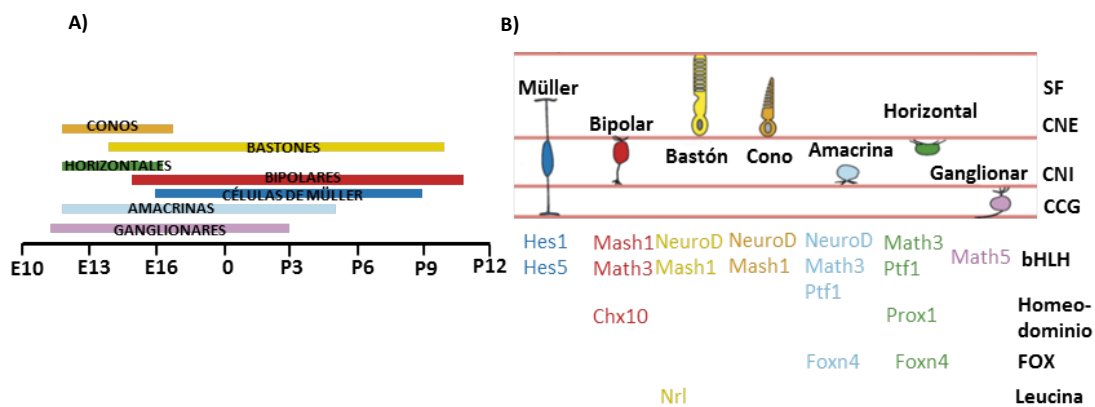


Figura 15: **A)** Esquema que representa la aparición y el período de desarrollo de los diferentes tipos neuronales y células de Müller que forman la retina de ratón. **B)** Disposición de las neuronas y células de Müller en la retina y factores de transcripción necesarios para que se produzca la diferenciación de cada tipo celular. SF, segmentos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de las células ganglionares. Modificado de Ohsawa and Kageyama, 2008.

5.3. DESARROLLO DE LAS CAPAS DE LA RETINA

Durante el desarrollo retiniano no sólo es importante que los distintos tipos celulares se diferencien correctamente. Además, es necesario que esas células migren al lugar adecuado para establecer los diferentes estratos retinianos. Parece que para que esa migración ocurra de manera correcta son importantes las interacciones célula-célula mediadas por las moléculas de adhesión celular (Sharma and Johnson, 2000).

Como mencionamos anteriormente, las células que primero se diferencian son las ganglionares. Durante su desarrollo embrionario, estas células migran hacia la zona más vitreal de la retina, a la vez que se va desarrollando su árbol dendrítico, de forma que se crea la primera estratificación de la retina, la capa de los neuroblastos (CNB) y la CCG (**Fig. 16**) (Galli-Resta et al., 2008).

Una vez que las células amacrinas comienzan a desarrollarse y a formar su árbol dendrítico se establece la primera capa plexiforme, la CPI, la cual es perfectamente visible en ratones recién nacidos (**Fig. 16**). Posteriormente los fotorreceptores y células horizontales contactarán unos con otros, formando la CPE, la cual es distinguible en la retina del ratón a la edad de P4-5 (**Fig. 16**) (Kolb, 2000; Sherry et al., 2003).

Previa a la formación de la CPE, los conos y bastones comienzan a desarrollar sus segmentos, y posicionar sus núcleos en la CNE en desarrollo, a la vez que se van diferenciando sus axones, mientras que las células horizontales son ya inmunorreactivas a marcadores típicos como calbindina (Liu and Williams, 2001; Sharma et al., 2003). A la edad de P5 se producen los primeros contactos entre los conos y las células horizontales, mientras que los axones de las células bipolares comienzan a invadir la capa plexiforme interna (**Fig. 16**). Durante los estadios de P6-P7 se produce la llegada de las primeras dendritas de las células bipolares de conos a la CPE (Blanks and Johnson, 1984; Fisher, 1979a; Olney, 1968; Sherry et al., 2003). Así pues, a la edad de P7, las células bipolares conectarán ya las dos capas plexiformes, quedando establecidos los diferentes estratos retinianos de la retina del ratón (**Fig. 16**) (Kolb, 2000). A esta edad de P7 todos los elementos que conforman la CPE y la CPI son perfectamente distinguibles, así como muchas de las sinapsis que ocurren, siendo posible detectar varias de sus proteínas específicas, como sinaptofisina, el transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) o GABA (Johnson et al., 2003; Sharma et al., 2003; Sherry et al., 2003).

Las sinapsis que involucran la vía de los bastones no se inicia hasta la edad de P8, estadio en el que los axones de este tipo celular invaden la CPE, estableciendo contactos con las células horizontales. Hasta la edad de P10 no llegan las primeras dendritas de las células bipolares de bastón a la CPE, y es en ese momento en el que comienza la transmisión de la

señal nerviosa de la vía de los bastones. Finalmente, a la edad de P14, momento en el que se produce la apertura del ojo del ratón, concluye la formación de las sinapsis y el establecimiento de las capas de la retina (Blanks and Johnson, 1984; Fisher, 1979a; Olney, 1968; Sherry et al., 2003).

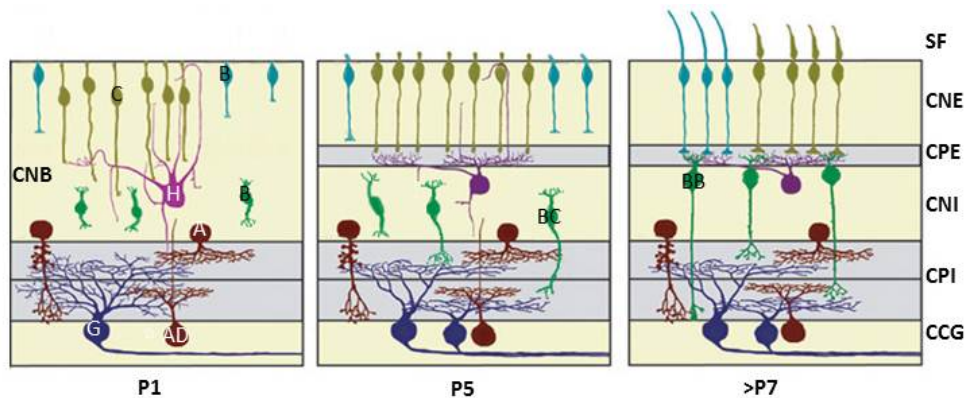


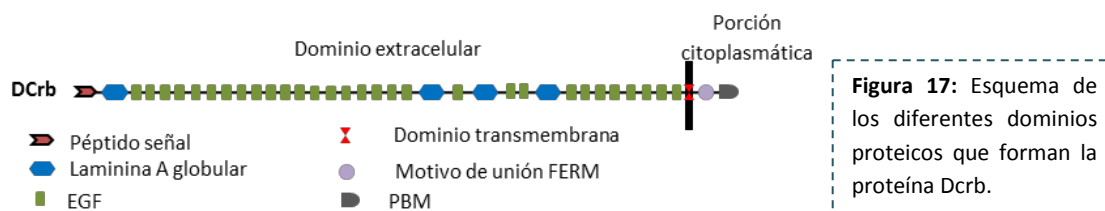
Figura 16: Esquema representativo de la formación de las diferentes capas retinianas y sus conexiones sinápticas durante el desarrollo postembrionario (P1, P5 y P7 en adelante) en la retina del ratón. C, conos; B: bastones; H: células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; AD, células amacrinas desplazadas; G, células ganglionares; BC: células bipolares de conos; BB, células bipolares de bastón; SF, segmentos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Modificado de <http://webvision.med.utah.edu>

En cuanto a la formación de la MLE, parece que en la retina del ratón no es perfectamente distinguible hasta la edad de P5 (Uga and Smelser, 1973). Sin embargo, muchos de los elementos que la conforman están presentes previamente en el área donde se desarrolla dicha capa, como son la proteína β -catenina o los miembros de los complejos de polaridad PAR3/PAR6/aPKC o en ensamblado a partir de las proteínas CRB (Cho et al., 2012; Fu et al., 2006). La membrana limitante interna comienza a formarse durante el desarrollo embrionario del ratón, de forma que alguna de las proteínas que conforman esta membrana se localizan en la misma desde estadios tempranos, como el colágeno IV o la laminina a E12 (Sarthy and Fu, 1990; Sarthy, 1993).

6. FAMILIA DE PROTEÍNAS CRB

El gen *crumbs* fue identificado en 1984 (Jürgens. G., 1984). Más tarde, en 1990, se describió en *Drosophila melanogaster* que este gen codificaba para una proteína transmembrana, denominada Crumbs (también nombradas como DCrb, de *Drosophila* Crumbs), que se localizaba exclusivamente en el dominio apical de las células epiteliales (Tepass et al., 1990). Fue en ese estudio de Tepass y cols. donde se identificó que esta proteína

poseía un largo dominio extracelular, mucho mayor que el citoplasmático (**Fig. 17**), y que estaba involucrada en el desarrollo embrionario del tejido epitelial de *D. melanogaster* (Tepass et al., 1990). Unos años después, en 1993, se describió que los genes *crumbs* junto con los *stardust* (*sdt*) actuaban conjuntamente en la organización epitelial de *D. melanogaster* (Tepass and Knust, 1993). *Sdt*, mediante *splicing alternativo* codifica para 4 proteínas diferentes, de las cuales algunas de ellas son proteínas MAGUK que interaccionan con el dominio intracelular de DCrb, ayudándolas a ensamblar un complejo que interviene en el control de la polaridad epitelial en *D. melanogaster*, y participa en el desarrollo embrionario (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Tepass, 2002).



Las células fotorreceptoras tienen características neuroepiteliales. En *D. melanogaster* el pigmento fotosensible a la luz se aloja en el rabdómero y los fotorreceptores se unen entre sí por medio de zónulas adherentes, que separan las membranas en dos dominios: uno apical y otro basolateral. Crumbs se localiza apicalmente a esas uniones adherentes, y parece intervenir en la morfogénesis de los fotorreceptores, participando en la elongación del rabdómero, manteniendo la integridad de las zónulas adherentes y ayudando a definir el dominio ápico-basal de la célula (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002). En la mosca adulta, DCrb va a tener un papel clave en el mantenimiento de las uniones adherentes de los fotorreceptores, entre otras funciones (Izaddoost et al., 2002).

Hasta la fecha se han encontrado proteínas Crumbs en muchos organismos, desde invertebrados a mamíferos (Richard et al., 2006). Así, se han identificado dos ortólogos de *crumbs* en el gusano *Caenorhabditis elegans*, *crb-1* y *crl-1*, y hasta cinco en el pez cebra (*Danio rerio*), *crb1*, *crb2a*, *crb2b*, *crb3a* y *crb3b*. Existen tres genes que codifican los ortólogos del gen *DCrb* de *D. melanogaster* en humanos y ratones, cuyos productos proteicos son CRB1, CRB2 y CRB3 (Gosens et al., 2008; Richard et al., 2006).

A continuación, se muestran las principales similitudes y diferencias entre las proteínas de la familia Crumbs en humanos y ratones.

6.1. CRB1

En 1999 se describió por primera vez la presencia de proteínas de la familia Crumbs en mamíferos, demostrándose que la Retinosis pigmentaria de tipo 12 (RP12) en humanos estaba

causada por mutaciones en un gen muy similar a *crumbs* (den Hollander et al., 1999). Este gen se denominó *CRB1* (Bazellieres et al., 2009; den Hollander et al., 1999). Más tarde se describió su presencia en el ratón, donde está altamente conservado (Bazellieres et al., 2009; den Hollander et al., 2002).

El gen *CRB1/Crb1* (humano/ratón respectivamente) codifica para la proteína CRB1. La expresión de este gen sólo ha sido detectada en retina y cerebro (den Hollander et al., 2002; Gosens et al., 2008). Estudios en el desarrollo embrionario del ratón muestra que en ambas localizaciones, la expresión del gen *Crb1* comienza durante el desarrollo embrionario y se mantiene en el adulto (den Hollander et al., 2002). Cabe destacar que la expresión del gen *Crb1* en el cerebro del ratón adulto está restringida al giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio, la corriente migratoria rostral y la zona subventricular, así como en la capa granular del cerebelo, que son las zonas donde se ha demostrado neurogénesis en el adulto (den Hollander et al., 2002).

La proteína CRB1 cuenta en humano y ratón con 1406 y 1405 aminoácidos respectivamente. Como en DCrb, se trata de proteínas transmembrana con un dominio extracelular más largo que el intracelular. La parte extracelular cuenta con 1345/1344 aminoácidos que corresponden a la proteína humana y a la de ratón respectivamente, que forman repeticiones de diferentes dominios proteicos, tales como 19 dominios EGF y 3 dominios laminina A globular (**Fig. 18**) (Gosens et al., 2008). La porción citoplasmática se encuentra altamente conservada en todas las proteínas de la familia CRB, que describiremos más adelante (**Fig. 18**). La proteína es susceptible de sufrir modificaciones postraduccionales, de forma que el dominio extracelular puede sufrir glicosilaciones (Kantardzhieva et al., 2005). En función de si la proteína se encuentra glicosilada o no, su peso molecular puede variar, 154 kDa para la isoforma sin glicosilar y 220 kDa para la glicosilada (Kantardzhieva et al., 2005; van de Pavert et al., 2004). Parece que en el ratón, la proteína CRB1 se encuentra principalmente en su estado glicosilado (Kantardzhieva et al., 2005; van de Pavert et al., 2004).

Aparte de glicosilaciones, la proteína CRB1 puede sufrir otras modificaciones postraduccionales, que le hacen perder sus dominios transmembrana e intracelular, originando varias isoformas:

- ✓ CRB1b: Tiene un peso molecular predicho de 144 kDa, y se postula que pueda ser secretada. Su transcrito ha sido detectado en la retina y cerebro humanos (**Fig. 18**) (den Hollander et al., 2001; Gosens et al., 2008; van den Hurk et al., 2005).
- ✓ CRB1s: Esta proteína tiene un peso molecular de 83 kDa. Ha sido detectada en queratinocitos de ratón, si bien, mediante análisis de RT-PCR (“Reverse transcription polymerase chain reaction”) se ha visto que su expresión es mucho más ubicua,

detectándose, entre otros órganos, en cerebro, ojo, piel, riñón e hígado (**Fig. 18**) (den Hollander et al., 2001; Gosens et al., 2008; Watanabe et al., 2004).

Existe una cuarta isoforma predicha para esta proteína, aunque a día de hoy no hay evidencias experimentales que lo confirmen (den Hollander et al., 2001).

Como mencionamos anteriormente, mutaciones en el gen humano que codifica para la proteína CRB1 causan distrofias retinianas, tales como Amaurosis congénita de Leber o diferentes subtipos de RP (den Hollander et al., 2008; den Hollander et al., 1999; Lotery et al., 2001).

6.2. CRB2

La proteína CRB2 fue descrita por primera vez en el año 2002, y su expresión fue analizada en el año 2005 (Lemmers et al., 2002; van den Hurk et al., 2005). El ARN mensajero (ARNm) de *CRB2* ha sido detectado en la retina, EP y coroides, riñón y cerebro, y en menor nivel en el corazón, pulmón y placenta (van den Hurk et al., 2005). El análisis de la expresión del transcrito de *Crb2* en la retina del ratón muestra que se expresa en la CNE, CNI y más débilmente en la CCG. Sin embargo hasta la fecha, la proteína CRB2 sólo se ha detectado en la retina en la RSA de la MLE, tanto en las células de Müller como en los fotorreceptores (Alves et al., 2012; van Rossum et al., 2006). Su presencia también ha sido postulada en la CPE de la retina (Gosens et al., 2008).

Esta proteína tiene 1285 y 1282 aminoácidos respectivamente en humano y ratón y, al igual que CRB1, tiene una larga porción extracelular de 1224 aminoácidos en el humano, y 1221 en el ratón, compuesta por una serie de dominios EGF y laminina A globular (**Fig. 18**) (Gosens et al., 2008; van den Hurk et al., 2005). El peso molecular predicho para CRB2 es de 134 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q80YA8>) y, a diferencia de lo que se conoce para CRB1 y CRB3, que analizaremos más adelante, no se ha descrito la presencia de glicosilaciones en CRB2. Respecto a las posibles mutaciones en el gen que codifica para esta proteína, se había descrito que no parecían ser causa de distrofias retinianas tales como RP o Amaurosis congénita de Leber (Richard et al., 2006; van den Hurk et al., 2005). Sin embargo, recientemente se ha publicado un artículo en el que se muestra que la degeneración ocurrida en un ratón mutante para CRB2 mimetiza la retinosis pigmentaria humana y es similar a la degeneración ocurrida por mutaciones en el gen que codifica para CRB1 (Alves et al., 2012).

No se ha descrito la presencia de diferentes isoformas para CRB2 en humano y/o ratón. Sin embargo, en el pez cebra existen dos isoformas: *Crb2a* y *Crb2b*, que se diferencian en su porción extracelular. Entre otras funciones, estas isoformas intervienen en la regulación del

tamaño de los fotorreceptores, y sus dominios extracelulares median la adhesión entre esas células (Gosens et al., 2008; Hsu and Jensen, 2010; Hsu et al., 2006; Zou et al., 2012).

6.3. CRB3

La expresión del gen y la presencia de la proteína transmembrana CRB3 fue detectada por primera vez en los primeros años de este siglo en células epiteliales de la línea celular humana Caco-2, así como en células de la línea MDCK, procedentes de riñón de perro (Lemmers et al., 2002; Makarova et al., 2003). Su función se ha estudiado en éstas y otras líneas celulares derivadas del epitelio, y parece que interviene regulando y manteniendo las uniones ocluyentes (Assemat et al., 2008; Bazellieres et al., 2009; Lemmers et al., 2004).

La expresión de *CRB3/Crb3* en los tejidos es más ubicua que la de la *CRB1* y *CRB2*. Su ARNm ha sido detectado en tejidos tales como riñón, retina, glándulas mamarias, colon y pulmón, y en menor cantidad en hígado, bazo, placenta, páncreas y próstata (Gosens et al., 2008; Makarova et al., 2003). En la retina del ratón se ha descrito la presencia de la proteína CRB3 en la RSA de la MLE, tanto en fotorreceptores, como en células de Müller y, como en el caso de CRB2, también se ha sugerido que podría estar localizada en la CPE (Gosens et al., 2008; van Rossum et al., 2006).

La proteína que codifica el gen *CRB3/Crb3* en humano y ratón tiene una longitud de 120 y 113 aminoácidos, respectivamente. A diferencia de CRB1 y CRB2, la porción extracelular de la proteína CRB3 es prácticamente inexistente, contando sólo con 56 aminoácidos (**Fig. 18**) (Gosens et al., 2008; Makarova et al., 2003). Sin embargo su dominio intracelular es parecido al de las anteriores, y será detallado más adelante.

Existen dos isoformas para la proteína CRB3 que difieren en parte de su porción citoplasmática, y se denominan en función de los cuatro aminoácidos finales de su secuencia: CRB3-ERLI y CRB3-CLPI (**Fig. 18**) (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Makarova et al., 2003). La isoforma CRB3-CLPI fue la última en ser descrita e interviene en la ciliogénesis del cilio primario en líneas celulares de riñón (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004). Se piensa que también podría intervenir en la ciliogénesis del cilio de conexión de los fotorreceptores, sin embargo, esta hipótesis aún no se ha demostrado (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Gosens et al., 2008).

CRB3 es susceptible de ser glicosilada, y en función de ello su peso molecular varía. Las isoformas sin glicosilar tienen un peso molecular aproximado de 12 kDa. Las formas glicosiladas oscilan entre los 20 y 28 kDa: la isoforma terminada en ERLI tiene un mayor peso molecular; si bien, esto puede variar en función del grado de glicosilación de ambas isoformas (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Makarova et al., 2003).

Hasta la fecha no han sido descritas distrofias retinianas causadas por el gen que codifican para la proteína CRB3, aunque es posible que pueda estar alterada en alguna patología (Bazellieres et al., 2009).

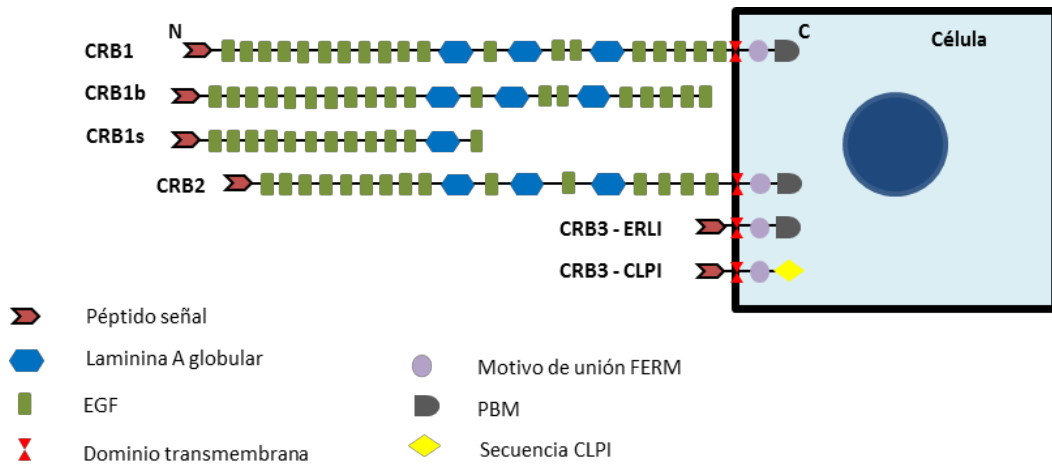


Figura 18: Esquema que representa la disposición de los diferentes dominios proteicos que conforman las proteínas CRB en humano y ratón. N, extremo amino terminal; C, extremo carboxi-terminal.

6.4. DOMINIOS CITOPASMÁTICOS Y COMPLEJO INTRACELULAR DE LAS PROTEÍNAS CRB

Los dominios intracelulares de las proteínas ortólogas a Crumbs están altamente conservados en todas las especies. Corresponden a dos motivos de unión: un dominio de unión a FERM y otro a dominios PDZ, denominado PBM (**Fig. 18**). A partir de ambos dominios se ensambla el complejo proteico intracelular creado por las proteínas de la familia Crumbs (Gosens et al., 2008).

La proteína de la familia MAGUK, PALS1 (proteína asociada con LIN7), también conocida como MPP5 (proteína de membrana palmitoilada 5), es el ortólogo de la proteína de *D.melanogaster* Sdt. Está formada por 675 aminoácidos que establecen una serie de dominios de interacción: 1 dominio GUK, 1 HOOK, 1 motivo SH3, 1 PDZ, 2 dominios L27 y una región cola-cola (**Fig. 19**) (Bazellieres et al., 2009; Gosens et al., 2008; Kamberov et al., 2000). Al igual que Sdt, PALS1 interacciona a través de su región PDZ con el dominio citoplasmático PBM de las proteínas CRB (Bazellieres et al., 2009; Gosens et al., 2008; Makarova et al., 2003; Park et al., 2011; Roh et al., 2003).

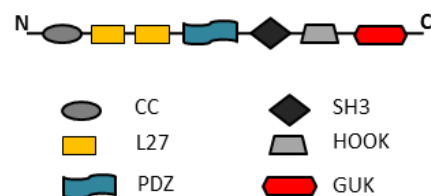


Figura 19: Diagrama de la estructura de Pals1, con los diferentes dominios proteicos que la conforman. N, extremo amino terminal; C, extremo carboxi-terminal; CC, región cola-cola.

El segundo dominio intracelular de las proteínas CRB, el motivo de unión a proteínas FERM, es capaz de unirse con la proteína EPB41L5 (*erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5*). A su vez, el motivo HOOK de PALS1 es susceptible de unirse a proteínas FERM, de forma que EPB41L5 se une a PALS1 formando un complejo CRB-EPB41L5-PALS1 altamente conservado en diferentes especies (Gosens et al., 2008; Gosens et al., 2007a).

A través de los dominios de interacción de PALS1, otras proteínas se unen al complejo CRB-EPB41L5-PALS1 en la retina de diferentes especies animales, así como en otros tipos de células epiteliales. Los dominios de unión L27 de PALS1 son capaces de unir otras dos proteínas: la proteína asociada a uniones ocluyentes, PATJ (*protein associated with tight junctions*) y la proteína con múltiples dominios PDZ, MUPP1 (*multi-PDZ domain protein-1*) (Gosens et al., 2008; Lemmers et al., 2002; Roh et al., 2002; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). En células epiteliales, el complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB se une al citoesqueleto de la célula a través de la interacción de PATJ y MUPP1 con otras proteínas; sin embargo esta interacción aún no ha sido demostrada en la retina (**Fig. 20**) (Gosens et al., 2008).

Se ha visto que en la retina, PALS1 es capaz de unirse a otras proteínas de la familia MAGUK a través de sus dominios SH3 y GUK y a proteínas de la familia Lin7 por medio de sus motivos L27. Así en la RSA de la MLE se ha visto la presencia MPP1 (proteína de membrana palmitoilada 1), MPP3 (proteína de membrana palmitoilada 3), MPP4 (proteína de membrana palmitoilada 4) y Veli3 (*vertebrate lin-7 homolog 3*, perteneciente a la familia Lin7) y su interacción con PALS1, formando un gran complejo proteico en este área de la retina (**Fig. 20**) (Gosens et al., 2008; Gosens et al., 2007b; Kantardzhieva et al., 2006; Kantardzhieva et al., 2005; Stohr et al., 2005). En dicho complejo la proteína PALS1 es clave, ya que su ausencia total o parcial, conduce a una pérdida de la localización del complejo en la RSA de la MLE (Park et al., 2011; van Rossum et al., 2006).

Algunos miembros de este complejo proteico intracelular han sido también detectados en la CPE. Hasta la fecha no se ha comprobado la presencia de ninguna de las proteínas CRB en este área, pero se postula la presencia de CRB2 y/o CRB3, ya que anticuerpos específicos para la detección de CRB1 no detectan esta proteína en la CPE (Gosens et al., 2008). Respecto a las proteínas MAGUK, aún no se ha detectado la presencia de PALS1 en la CPE, aunque sí se han localizado MPP1, MPP3 y MPP4, e interaccionando con MPP4, la proteína Veli3 (Aartsen et al., 2006; Gosens et al., 2007b; Kantardzhieva et al., 2006; Stohr et al., 2005; van de Pavert et al., 2004; Yang et al., 2007).

Finalmente, destacar que una de las funciones claves del complejo proteico ensamblado a partir de las proteínas CRB es el mantenimiento de la polaridad ápico-basal de células de

Müller y fotorreceptores (van de Pavert et al., 2004). Existen otras proteínas fundamentales para dotar a las células de polaridad, como es el caso del complejo aPKC-PAR6-PAR3 y algunas de ellas se localizan en la RSA de la MLE de la retina, como es el caso de aPKC o PAR3 (van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Además en líneas celulares epiteliales se ha demostrado la unión directa entre CRB3 y PAR6 (Lemmers et al., 2004).

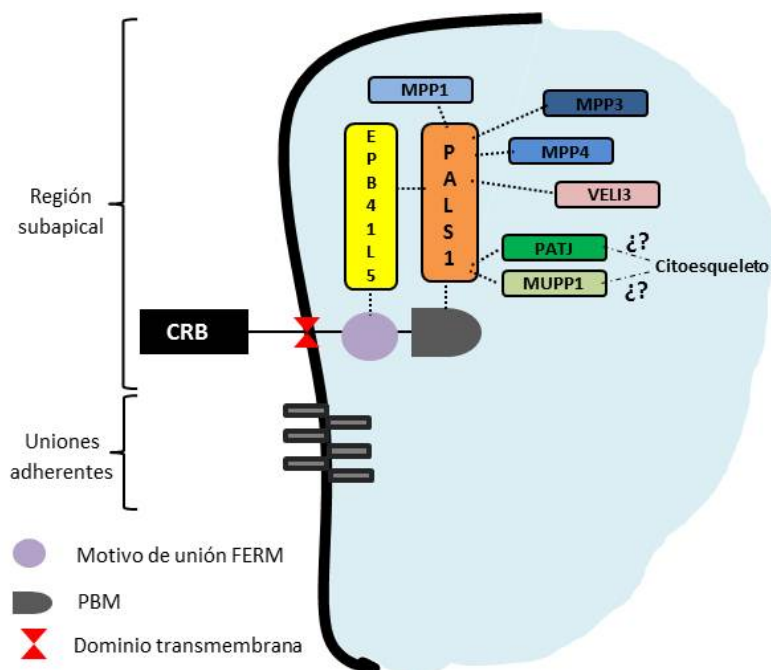


Figura 20: Esquema que representa el complejo intracelular ensamblado a partir de las proteínas CRB, en la región subapical de la MLE de la retina de los mamíferos.

6.5. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS CRB EN MAMÍFEROS

CRB1 es el miembro de la familia de proteínas Crumbs más estudiado en la retina de mamíferos. Así pues, la mayoría de las funciones conocidas para este complejo se basan en estudios realizados con esa proteína:

- ✓ Mantenimiento de la polaridad celular de fotorreceptores y células de Müller, así como de su integridad estructural (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006).
- ✓ Intervención en la morfogénesis de los fotorreceptores (Mehalow et al., 2003).
- ✓ Mantenimiento de las uniones adherentes establecidas entre células de Müller y fotorreceptores en la MLE (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004).
- ✓ Regulación del número y tamaño de las microvellosidades de las células de Müller (van de Pavert et al., 2007b).

7. DISTROFIAS RETINIANAS

Las distrofias retinianas heredadas son un grupo de patologías degenerativas y progresivas, generalmente causadas por una afectación primaria de las células fotorreceptoras, que provocan la pérdida total o parcial de la visión. Actualmente no existe un tratamiento curativo para la mayoría de ellas, por lo que finalmente derivan en una pérdida total de visión (Rivolta et al., 2002; Smith et al., 2009). Estas distrofias afectan a 1 de cada 30.000 personas nacidas en occidente. Algunas de ellas son ciertos tipos de Retinosis pigmentaria o de Amaurosis congénita de Leber (Smith et al., 2009).

7.1. RETINOSIS PIGMENTARIA

La Retinosis pigmentaria (RP) es un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que provocan la degeneración de las células fotorreceptoras de la retina, así como alteraciones de otros tipos celulares de la retina e incluso del sistema vascular (Gutiérrez-Torre, 1995; Milam et al., 1998).

Se trata de la distrofia retiniana más frecuente y la cuarta causa de ceguera en el mundo (Gutiérrez-Torre, 1995). El número de personas afectada en España por RP supera las 15.000 personas, y se estima en unas 60.000 las personas portadoras de genes defectuosos y, por tanto, posibles transmisores de la distrofia (Milam et al., 1998).

Entre los principales síntomas de la RP destacan:

- ✓ Ceguera nocturna: Es uno de los síntomas clínicos más tempranos de la enfermedad. Se caracteriza por una deficiente adaptación a la oscuridad o a lugares poco iluminados, debido a la mala funcionalidad de los bastones.
- ✓ Pérdida de la visión periférica: Provocada por la muerte de las células fotorreceptoras de la periferia de la retina. Es la causa de la denominada “visión en túnel”.
- ✓ Pérdida de la agudeza visual debido a la muerte de los conos de la fóvea, que es la zona de la retina responsable de la agudeza visual. Suele ocurrir en un estadio avanzado de la enfermedad (Milam et al., 1998).

La degeneración de la retina en personas con RP comienza generalmente con alteraciones en el ERG y fallo de los bastones, seguida por cambios en los conos, células gliales y ganglionares. En el EP se produce pérdida de pigmento y fibrosis de los vasos sanguíneos coroideos alrededor de la zona despigmentada (Milam et al., 1998).

Se trata de una enfermedad genéticamente heterogénea, mostrando herencia autosómica dominante, autosómica recesiva (que es la más frecuente) o rasgos de herencia recesiva ligada al cromosoma X (Dryja, 1992; Milam et al., 1998). La RP también forma parte de

más de 30 síndromes, en la mayoría de los cuales presenta herencia autosómica recesiva. Dentro de esos síndromes, uno de los más conocidos y con mayor incidencia es el síndrome de Usher, en el cual la pérdida visual va acompañada de una severa pérdida auditiva (Usher, 1935; Vernon, 1969; von Gräfe, 1858).

Han sido propuestos hasta 35 genes candidatos cuyas mutaciones pueden causar RP. En función de la misión que realiza la proteína que codifican se pueden encuadrar en diferentes grupos, (Valverde, 2001):

- ✓ Proteínas implicadas en la fototransducción: entre otras, la rodopsina o la fosfodiesterasa de bastones.
- ✓ Factores de transcripción: cómo NRL o CRX, ambos causantes de la patología autosómica dominante.
- ✓ Proteínas implicadas en el transporte de sustancias entre los segmentos de los fotorreceptores: como la proteína RPGR (*Retinitis pigmentosa GTPase regulator*).
- ✓ Proteínas estructurales: destaca la proteína RDS/periferina, responsable de establecer la forma del segmento externo de los fotorreceptores, o CRB1.
- ✓ Proteínas de función desconocida.

Las mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1 humana es la causante de aproximadamente el 4% de los casos de RP a nivel mundial (Richard et al., 2006). Sin embargo, en el caso de la población española, ese porcentaje aumenta hasta el 6,25% de los casos (Vallespin, 2008). La RP causada por la mutación de CRB1 fue descrita por primera vez en 1999 (den Hollander et al., 1999). Se caracteriza por seguir un patrón de herencia autosómico recesivo. Los pacientes que sufren esta distrofia pueden llegar a desarrollar trastornos en la irrigación de la retina, deposiciones extravasculares de lípidos y daño retiniano. La mutación en CRB1 también puede provocar RP de inicio precoz, como la RP tipo 12 (Bulgakova and Knust, 2009; Richard et al., 2006).

7.2. AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER

Enfermedad degenerativa rara que se caracteriza por un grave déficit visual en los niños desde los primeros meses de vida (Leber, 1869). Es una distrofia retiniana generalmente de herencia autosómica recesiva; aunque se han descrito algunos casos con herencia autosómica dominante. Se caracteriza por cuatro signos clínicos: fuerte pérdida visual desde aproximadamente las primeras 6 semanas de vida, nistagmo sensorial, pupilas amauróticas y ausencias de señales eléctricas en los electrorretinogramas. Además, se le asocian otros

síntomas, ya que algunos niños pueden tener pérdida de audición, cierto retraso psicomotor y mental, así como hipoplasia (desarrollo incompleto o defectuoso) (den Hollander et al., 2008).

Se trata de una enfermedad rara que supone el 5% de los casos de distrofia retiniana a nivel mundial, y entre el 10-18% de ceguera congénita (Kaplan et al., 1990). Su frecuencia varía entre 1/30.000 (Koenekoop, 2004) y 1/81.000 afectados (Stone, 2007). En España, 1,2 de cada 100.000 nacidos están afectados con Amaurosis congénita de Leber (Vallespin, 2008).

Hasta la fecha se han descrito 14 genes que se expresan en fotorreceptores, EP o células de Müller cuyas mutaciones causan Amaurosis congénita de Leber (**Fig. 21A**) (den Hollander et al., 2008). De entre todas esas mutaciones, aquellas que presentan mayor prevalencia en esta distrofia, son las que codifican para las proteínas: CEP290, implicada en el transporte a través del cilio de conexión de los fotorreceptores y que supone el 15% de los casos, GUCY2D, interviene en la hidrólisis del GMPc, suponiendo el 11,7% de los casos y CRB1, cuyas mutaciones implican el 9,9% de los casos. Además se desconocen las mutaciones que originan algo más del 30% de los casos (**Fig. 21B**) (den Hollander et al., 2008).

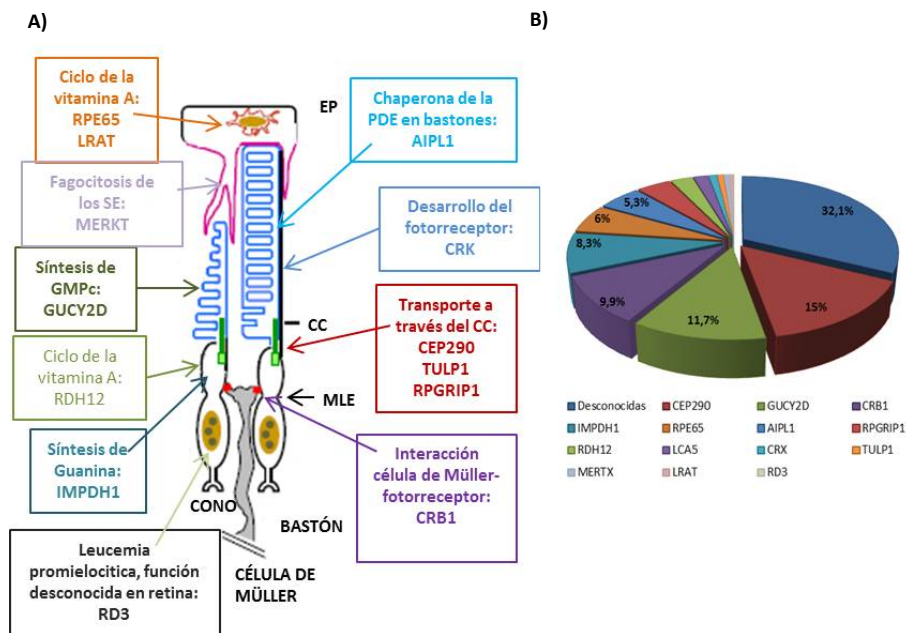


Figura 21: A) Esquema que representa las principales proteínas mutadas en la Amaurosis congénita de Leber agrupadas bajo las funciones que realizan en fotorreceptores, células de Müller y epitelio pigmentario. B) Gráfico que muestra la incidencia de las diferentes mutaciones genéticas que causan Amaurosis congénita de Leber. El porcentaje marca la prevalencia de aquellas mutaciones que suponen más del 5% de los casos de la distrofia. PDE, fosfodiesterasa; SE, segmentos externos de los fotorreceptores; CC, cilio de conexión. Modificado de den Hollander and cols., 2008

La Amaurosis congénita de Leber provocada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1, fue descrita por primera vez en 2001 (Lotery et al., 2001). Los pacientes con mutaciones en este gen se caracterizan porque su retina tiene defectos durante el desarrollo, ya que en individuos adultos, los estratos retinianos no están completamente desarrollados,

presenta engrosamientos y tiene el aspecto de una retina inmadura (Gosens et al., 2008; Jacobson et al., 2003).

El gen *CRB1* es el principal responsable de la Amaurosis congénita de Leber en la población española, de forma que el 20,4% de los casos presentan mutaciones en ese gen (Vallespin et al., 2007). Por países, España es el que presenta más casos de Amaurosis congénita de Leber provocados por mutaciones en el gen *CRB1* (Vallespin, 2008). En otros países, esa tasa es más baja: en Bélgica y Holanda es del 15,5%, en Estados Unidos el 11% y en Canadá el 3% (Lotery et al., 2001; Vallespin, 2008; Yzer et al., 2006; Zernant et al., 2005). Como mencionamos anteriormente, 1,2 de cada 100.000 nacidos en España desarrollan la enfermedad y de ellos, el 20,4% tiene mutaciones en el gen *CRB1*, por lo que este gen estará mutado en 1 de cada 2.448.000 personas en nuestro país. Las estimaciones apuntan que 1 de cada 3.130 españoles portan una mutación en *CRB1* en alguno de sus dos alelos, no manifestando la enfermedad debido a su patrón de herencia autosómico recesivo. Por comunidades autónomas, Castilla y León es a nivel estatal, la comunidad con mayor prevalencia de Amaurosis congénitas de Leber debida a mutaciones en *CRB1* (Vallespin, 2008).

7.3. TERAPIAS RETINIANAS

Ya se ha mencionado que hasta la fecha, no existen tratamientos paliativos o curativos para la mayoría de las distrofias retinianas. Sin embargo, en los últimos años, diferentes terapias retinianas han logrado grandes avances para el tratamiento de estas degeneraciones.

Las terapias retinianas que se ensayan en la actualidad pueden dividirse en varios tipos (Stone, 2009):

- ✓ Terapia personalizada a través de diagnósticos moleculares.
- ✓ Modificaciones ambientales: mediante suplementos nutricionales, por ejemplo de vitamina A, o evitando la exposición a algunos tipos de luz.
- ✓ Uso de drogas: de gran tamaño, como factores de crecimiento, o de pequeño tamaño que puedan ser liberadas en el ojo tras inyecciones subretinales, por el torrente sanguíneo e incluso por vía tópica. Se han llevado a cabo importantes avances con el uso del ácido tauroursodeoxicólico (TUCDA), un pequeño agente neuroprotector cuya administración reduce la pérdida de fotorreceptores preservando parte de su función en modelos de degeneración de fotorreceptores (Fernandez-Sanchez et al., 2011; Phillips et al., 2008).
- ✓ Terapia génica: una de las estrategias más eficaces, debido a que en la mayor parte de los casos la degeneración de los fotorreceptores se produce por fallos o variaciones en su ADN. Este tipo de terapia se puede dividir en tres grupos (Stone,

2009): reemplazamiento génico, supresión de los alelos mutantes y liberación terapéutica de proteínas. En las siguientes secciones analizaremos cada uno de estos grupos.

- ✓ Terapia celular: Estrategia útil cuando el número de células fotorreceptoras que se han perdido durante la degeneración es elevado. Las células muertas se suelen reemplazar por un trasplante celular. Es una estrategia ampliamente usada para tratar degeneraciones retinianas en modelos murinos de RP, como por ejemplo en el ratón *rd1* (Sancho-Pelluz et al., 2008), o en el ratón *rd8* (Lakowski et al., 2010).
- ✓ Prótesis retinianas: Basados en el éxito los implantes cocleares del oído. En el caso de la retina, el implante es más complicado debido a la gran cantidad de información que manda la retina al cerebro; aun así, se han logrado grandes avances en los últimos 15 años (Stone, 2009).

7.3.1. REEMPLAZAMIENTO GÉNICO

Muchas de las distrofias retinianas se producen por la falta de un gen, por lo que una de las estrategias que se siguen para paliar la degeneración es el reemplazamiento de ese gen (Stone, 2009). Hasta la fecha, una de las terapias con más éxito ha sido el reemplazamiento del gen que codifica para RPE65, proteína necesaria para realizar la conversión del retinol, permitiendo que el ciclo visual se desarrolle correctamente. Mutaciones en el gen *RPE65* provocan el 6% de los casos de Amaurosis congénita de Leber (**Fig. 21B**). En 2001, se publicó la eficiencia del reemplazamiento de ese gen usando adenovirus en un modelo canino de Amaurosis congénita de Leber (Acland et al., 2001). Unos años después, varios grupos han publicado importantes resultados en ensayos clínicos con pacientes humanos, inyectando subretinalmente adenovirus que llevan el gen que codifica para la proteína RPE65 (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008; Smith et al., 2009; Stone, 2009). En otras distrofias, como el Síndrome de Usher, existen defectos en proteínas implicadas en el transporte a través del cilio de conexión de los fotorreceptores. Una de esas proteínas es *MYO7A*, la cual está en fotorreceptores y en el EP, donde regula el tráfico de los melanosomas. El uso de terapia génica utilizando vectores lentivirales en ratones mutantes para el gen *MYO7A*, han conseguido corregir el defecto del gen en el EP, y paliar parcialmente el defecto de las células fotorreceptoras (Hashimoto et al., 2007; Smith et al., 2009; Stone, 2009).

7.3.2. SUPRESIÓN DE LOS ALELOS MUTANTES

El 15% de las distrofias retinianas humanas se transmiten con un patrón de herencia autosómico dominante. En muchas de ellas se produce un efecto tóxico del alelo mutante.

Esta estrategia trata de suprimir ese alelo mediante el uso de ARN pequeño de interferencia o ribozimas. Mediante el uso de esta terapia se ha logrado preservar parcialmente la morfología y función en un modelo murino de RP (Gorbatyuk et al., 2007; Stone, 2009).

7.3.3. LIBERACIÓN TERAPÉUTICA DE PROTEÍNAS

Esta estrategia consiste en usar un mecanismo que libere constantemente moléculas, por ejemplo factores de crecimiento, en las células de la retina (Stone, 2009).

Dentro de esta terapia podrían encuadrarse aquellos métodos que usan otras proteínas como vehículo para la liberación de proteínas activas en el interior de la célula. Éstas son péptidos sintéticos que, debido a sus propiedades, pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática de la célula y liberar la proteína de interés en el citoplasma. Dentro de estos péptidos que actúan como vehículo y que han sido usados en la retina, tenemos, entre otros: Tat, POD, ambos con buena eficiencia para la transfección en la retina y Pep1 (Barnett et al., 2006; Johnson et al., 2008; Raz-Prag et al., 2010; Wang et al., 2009).

Pep1 es un péptido de naturaleza anfipática, que establece uniones no covalentes con la proteína a liberar en el interior celular, estabilizándola y permitiendo su pase a través de la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula, la proteína de interés, biológicamente activa, se incorpora a la maquinaria celular para alcanzar su localización correcta en el interior de la misma. A su vez, Pep1 es degradado (**Fig. 22**). El sistema de transfección de Pep1 tiene como principales ventajas que es un método no citotóxico de rápida preparación y transfección, pudiendo ser analizado dos horas después de haber llevado a cabo el experimento (Morris et al., 2001; Wang et al., 2009). Ha sido usado para liberar proteínas tanto en células en cultivo, entre ellas células de Müller, como en diferentes tejidos, incluida la retina (Cho et al., 2008; Raz-Prag et al., 2010; Selim et al., 2003; Wang et al., 2009).

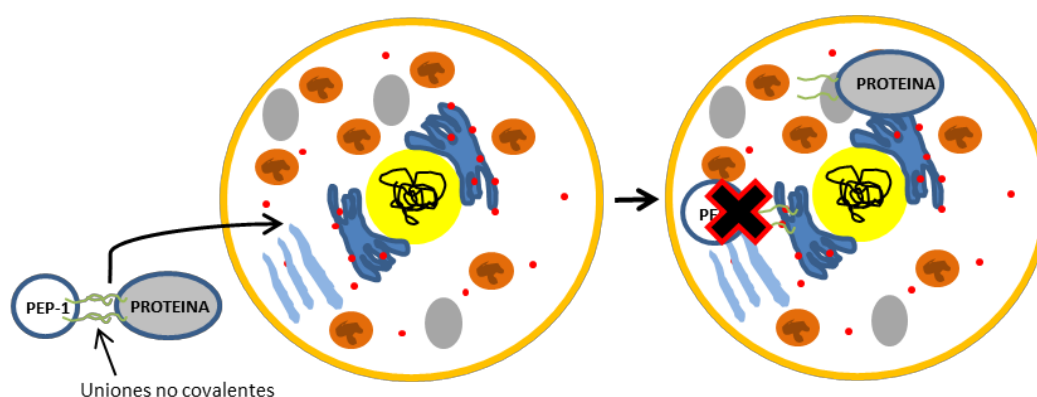


Figura 22: Esquema que representa el modelo de actuación del sistema de transfección basado en el péptido sintético Pep-1. La proteína de interés se une a Pep-1 mediante uniones no covalentes, lo que le permite atravesar la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, la proteína se incorpora a la maquinaria celular para alcanzar su ubicación definitiva, mientras que Pep-1 es degradado.

8. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CRB

Existen varios modelos animales para el estudio de las proteínas CRB y del complejo ensamblado a partir de ellas en diferentes especies: *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (pez cebra) y *Mus musculus* (ratón) (Gosens et al., 2008). En los modelos de *D. melanogaster* se altera la función de *crumbs*, *sdt* o *yurt* (el ortólogo a *Epb4.115*), entre otros, produciendo fenotipos donde las zónulas adherentes se encuentran fragmentadas, se reduce la longitud del rabdómero o se generan defectos en la expansión del dominio apical de los fotorreceptores (Gosens et al., 2008). En el pez cebra, mediante el uso de morfolinós se silencia la expresión de algunas de las isoformas de los genes *crb2* o *crb3*, o se estudian los ortólogos de los genes de mamíferos *Pals1* (*nok* en pez cebra) ó *Epb4.115* (*moe*) entre otros, observado fenotipos en los que hay una reducción en la longitud del segmento interno de los fotorreceptores y del cilio de conexión o un defecto en la laminación de la retina.

En la **tabla 1** resumimos los modelos murinos existentes para el estudio de las proteínas CRB y su complejo proteico intracelular asociado.

Modelo	Mutación	Defecto	Fenotipo en la retina	Bibliografía
<i>Crb1</i> ^{-/-}	“Knock-out”	CRB1 sin función	Fragmentación de la MLE, aparición de rosetas, muerte celular tras 3-9 meses, defectos en células de Müller	(van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b)
<i>Crb1</i> ^{C249W}	“Knock-in”	Similar a pacientes con RP12	Pérdida tardía de fotorreceptores	(van de Pavert et al., 2007a)
<i>Crb1</i> ^{rd88}	Mutación natural	Pérdida de dominios transmembrana y citoplasmático	MLE fragmentada, SF más cortos, parches y pseudorosetas a las 2 semanas	(Lakowski et al., 2010; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010)
<i>Crb2</i> ^{-/-}	“Knock-out”	Pérdida de CRB2 desde el estadio embrionario E12,5	Desorganización retiniana desde el desarrollo, degeneración de fotorreceptores y alteraciones en el ERG y en la proliferación	(Alves et al., 2012)
<i>MPP4</i> ^{-/-}	“Knock-out”	MPP4 sin función	Desestabilización del complejo proteico presináptico, fallos en la homeostasis del Ca ²⁺ y en la transmisión nerviosa	(Aartsen et al., 2006; Yang et al., 2007)
<i>Pals1</i>	“Knock-out”	Niveles reducidos de proteínas del complejo ensamblado a partir de CRB	Defectuosa laminación de la retina, MLE irregular, rosetas de fotorreceptores y degeneración.	(Park et al., 2011)
<i>Limulus</i> (EPB4115)	“Knock-out”	Defectos en mesodermo, ectodermo y placa neural. Letal a E8,5.	-	(Garcia-Garcia et al., 2005; Lee et al., 2007)

Tabla 1: Resumen de los modelos murinos que existen para el estudio del complejo de proteínas ensamblado a partir de las proteínas CRB. MLE, membrana limitante externa. SF, segmentos de los fotorreceptores. Modificado de Gosens et al., 2008

8.1. EL RATÓN *KNOCK-OUT* PARA CRB1

El ratón *knock-out* para CRB1 (*Crb1*^{-/-}) se generó por delección del promotor y del primer exón que codifica para el extremo N-terminal de la proteína CRB1, lo que provoca la pérdida total de la misma (Richard et al., 2006; van de Pavert et al., 2004).

Los primeros cambios morfológicos causados por la degeneración se pueden observar a los 14 días de edad del ratón (van de Pavert et al., 2007b). A partir de los 3 meses de edad la degeneración se acelera, y está focalizada en el cuadrante temporal inferior (van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b). Como resumimos en la tabla 1, su fenotipo se caracteriza por la aparición de medias rosetas debido a la pérdida de integridad de la MLE. Además, se produce una elevada muerte neuronal en las capas nucleares de la retina. Las células gliales están alteradas, de forma que se reduce el número y tamaño de las microvellosidades de las células de Müller. Existe también degeneración del EP, lo que provoca neovascularización de vasos sanguíneos procedentes de la coroides y aparición de gránulos de pigmento en la retina neural. (Gosens et al., 2008; Richard et al., 2006; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b).

8.2. EL RATÓN *KNOCK-IN* PARA CRB1

El ratón mutante *Crb1*^{C249W} se generó como un modelo para el estudio de los pacientes con RP12. Presenta una sustitución de un aminoácido cisteína por un triptófano en el dominio extracelular de la proteína CRB1 (van de Pavert et al., 2007a). El complejo intracelular ensamblado a partir de las proteínas CRB se localiza correctamente en la RSA de la MLE, manteniendo la integridad de las uniones adherentes de esta zona. La pérdida de fotorreceptores es relativamente tardía, si se compara con el resto de ratones mutantes para la proteína CRB1 (Gosens et al., 2008; van de Pavert et al., 2007a).

Además, este ratón presenta defectos en la regulación del gen *Pttg1* ("pituitary tumor transforming gene 1"). La proteína codificada por este gen inhibe la separación de los cromátidas hermanas durante la mitosis, y está implicada en la regulación de la transcripción génica, proliferación celular y apoptosis. El ratón mutante *Crb1*^{C249W} presenta bajos niveles del transcrito del gen *Pttg1* por lo que por primera vez se le otorga una función al dominio extracelular de las proteínas de la familia CRB en mamíferos (Gosens et al., 2008; van de Pavert et al., 2007a).

8.3. EL RATÓN MUTANTE *Crb1*^{rd8}

El ratón mutante *Crb1*^{rd8} presenta una mutación natural identificada en el cromosoma 1, que consiste en una delección de un par de bases en el nucleótido número 3481. Su

consecuencia es la aparición de un codón stop prematuro. La mutación tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. El gen codifica una proteína truncada que pierde los dominios intracelular y transmembrana, sintetizándose únicamente los 15 primeros dominios EGF y 2 dominios laminina A globular desde el extremo N-terminal, además de 47 aminoácidos adicionales, sumando un total de 1207 aminoácidos (**Fig. 23**). Se desconoce si la proteína en el ratón *Crb1^{rd8}* mantiene una función residual (Gosens et al., 2008; Mehalow et al., 2003; Richard et al., 2006). Este ratón ha sido usado como modelo de estudio en varios trabajos publicados hasta la fecha (Lakowski et al., 2010; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010).

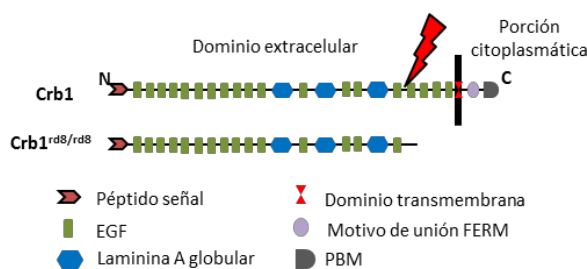


Figura 23: Diagrama que muestra la disposición de los dominios proteicos que conforman la proteína CRB1 en un ratón silvestre (secuencia superior) y mutante (secuencia inferior). La mutación (rayo rojo), origina una proteína truncada (*Crb1^{rd8}*) en la que desaparecen totalmente los dominios transmembrana y citoplasmático, y parte del extracelular. N, extremo amino terminal; C, extremo carboxi-terminal.

El fondo de ojo se caracteriza por tener manchas grandes e irregulares que pueden ser detectadas desde las tres semanas de edad, y que se concentran principalmente en el cuadrante nasal inferior. Si se observa la histología de la retina de los ratones *Crb1^{rd8}* se aprecia que a las 2 semanas de edad del ratón, la MLE aparece fragmentada y desorganizada por la zona nasal inferior, y en ese mismo área se ven las primeras pseudorosetas en torno a las tres semanas de edad, las cuales maduran durante el transcurso de la degeneración del ratón (**Fig.**

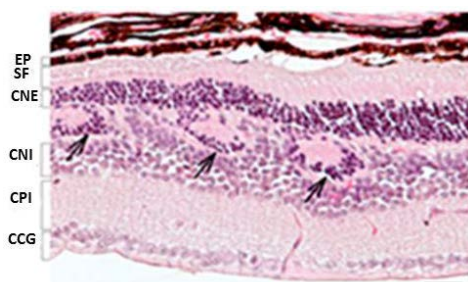


Figura 24: Región ventral de la retina de un ratón mutante *Crb1^{rd8}* de 6,5 meses de edad teñida con hematoxilina- eosina. Las flechas señalan rosetas de fotorreceptores. EP, epitelio pigmentario; SF, segmento de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barra de escala: 30 μ m. Modificado de Alemán et al., 2011

24). A la cuarta semana, la fragmentación y desorganización de la MLE se aprecia a lo largo de toda la retina, lo que provoca severas alteraciones en fotorreceptores y células de Müller (Mehalow et al., 2003; Richard et al., 2006).

Es a la cuarta semana de edad cuando los SI de los fotorreceptores son un 25% más cortos si se comparan con un ratón silvestre. A las 10 semanas, los SE comienzan a fragmentarse, de forma que en las regiones más afectadas, a los 5 meses de edad sólo se aprecian algunos de ellos. A medida que avanza la degeneración, la

CNE puede reducirse a una sola hilera de células. Las células de Müller del ratón mutante *Crb1^{rd8}* presentan una morfología anómala y se vuelven reactivas. Los procesos gliales que cruzan las capas nucleares de la retina sufren hipertrofia y son más prominentes. El EP también está afectado presentando una elevada vacuolización (Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010).

De todos los modelos murinos que presentan mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1, parece que es el ratón *Crb1^{rd8}* el que presenta más semejanzas con la mutación ocurrida en humanos. Sin embargo, aunque ratones *Crb1^{rd8}* y humanos homocigotos para el gen *CRB1* tienen un fenotipo retiniano similar, la degeneración es más acusada en humanos. De hecho, los ratones conservan la función visual prácticamente intacta, algo que no ocurre en los humanos (Aleman et al., 2011).

Justificación y objetivos

Hasta la fecha se conoce la presencia de tres proteínas de la familia CRB: CRB1, CRB2 y CRB3 en la retina de mamíferos. Se ha demostrado que las tres se expresan en la región subapical de la membrana limitante externa, donde ensamblan un complejo proteico intracelular (Pellikka et al., 2002; Richard et al., 2006; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006), denominado complejo proteico de CRB.

De las tres proteínas CRB, CRB1 ha sido la más estudiada en la retina de ratón. Dicha proteína interviene entre otras funciones, en el mantenimiento de las uniones adherentes que conforman la membrana limitante externa, en la morfogénesis de los fotorreceptores y en la correcta determinación de la polaridad celular de fotorreceptores y células de Müller (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Hasta ahora se desconocen las funciones de CRB2 y CRB3 en este tejido, aunque sí se conoce ampliamente el papel que desempeña CRB3 en otros tipos celulares (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Lemmers et al., 2002; Lemmers et al., 2004; Makarova et al., 2003; Roh et al., 2003). De esta forma, se ha demostrado que CRB3 es crucial para la ciliogénesis del cilio primario de diversos tipos celulares epiteliales (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004), y se ha llegado a sugerir que también podría encontrarse en el cilio de conexión de los fotorreceptores (Gosens et al., 2008). Aparte de en la región subapical de la membrana limitante externa, se sabe que algunos miembros del complejo proteico de CRB se localizan en la capa plexiforme externa de la retina, y anticuerpos que reconocen las tres proteínas han puesto de manifiesto la presencia de CRB2, o CRB3, o ambas en esa capa, ya que CRB1 no ha sido detectada a ese nivel (Aartsen et al., 2006; Gosens et al., 2008; Gosens et al., 2007b; Stohr et al., 2005).

Hasta la fecha no se conoce que mutaciones en *CRB3/Crb3* provoquen ningún tipo de degeneración retiniana, y recientemente se publicó que mutaciones en *Crb2* producen Retinosis pigmentaria (Alves et al., 2012). A su vez, mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1 humana se han asociado a varias distrofias retinianas, tales como Retinosis pigmentaria tipo 12 o Amaurosis congénita de Leber (den Hollander et al., 2001; den Hollander et al., 1999), siendo esta mutación especialmente frecuente dentro de la población española (Vallespin, 2008; Vallespin et al., 2007). Existen diferentes modelos murinos para el estudio de las funciones de la proteína CRB1, entre ellos el ratón mutante *Crb1^{rd8}* (Aleman et al., 2011; Barber et al., 2013; Lakowski et al., 2010; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010), que sufre un tipo de mutación que puede mimetizar a la mutación que ocurre en humanos. Se ha descrito que las alteraciones en la retina de este ratón mutante no comienzan hasta las dos semanas de edad y se corresponden con fallos en la membrana limitante externa (Mehalow et al., 2003). Se desconoce si existen alteraciones previas a esta edad. Además, aunque se sabe que CRB1 es imprescindible para el desarrollo de ciertos tipos celulares, no existen estudios

que analicen si la mutación en CRB1 afecta a la localización y niveles del resto de proteínas asociadas al complejo proteico de CRB, ni durante el desarrollo, ni en estado adulto, y se desconoce si las capas plexiformes de la retina también experimentan algún tipo de alteración. Finalmente, cabe destacar que CRB1 se expresa principalmente en las células de Müller (van Rossum et al., 2006) sin embargo, se desconoce la biología celular y el fenotipo de este tipo celular en el ratón *Crb1^{rd8}*.

Partiendo de estos datos e ideas previas, nos planteamos dos hipótesis de trabajo:

- ✓ Si algunas de las funciones de la proteína CRB1 son claves para el correcto desarrollo de fotorreceptores y células de Müller, el ratón mutante *Crb1^{rd8}* debería presentar alteraciones en la formación de estos tipos celulares. Además, el fallo en CRB1 debería provocar que el resto de componentes del complejo proteico de CRB estuvieran severamente afectados, así como afectar a la organización de las diferentes capas de la retina. Además, dado que en las células de Müller se acumula la mayor parte de proteína CRB1 en la retina, el uso de terapias dirigidas a este tipo celular podría ser clave para el desarrollo de un tratamiento que minimice las alteraciones asociadas a este modelo de degeneración
- ✓ Si CRB3 interviene en la ciliogénesis del cilio primario de células epiteliales, y los fotorreceptores poseen un cilio de estas características, CRB3 también podría realizar este tipo de funciones en los fotorreceptores. Además, sabiendo que existen proteínas del complejo proteico de CRB en la CPE de la retina, y que CRB1 no se localiza en esta capa, CRB3 podría ser la encargada de ensamblar dicho complejo.

Para tratar de comprobar estas hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de las alteraciones morfológicas y de expresión de proteínas ocurridas en la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}* desde estadios tempranos de desarrollo postembrionario.
- 2) Estudio de la localización de CRB1 en la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}*, y análisis de la distribución y niveles de las proteínas MAGUK asociadas a CRB en la retina del ratón silvestre y mutante *Crb1^{rd8}*.
- 3) Análisis de la respuesta de los fotorreceptores y caracterización de la activación glial y del fenotipo de las células de Müller del ratón mutante *Crb1^{rd8}*.
- 4) Análisis de la capacidad de transfección de las células de Müller, usando métodos de liberación de proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*.

- 5) Estudio de la localización de la proteína CRB3 en la retina silvestre durante diferentes estadios del desarrollo y en edad adulta, y análisis de su interacción con las proteínas MAGUK asociadas a CRB.

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La especie de experimentación empleada para la realización de la presente Tesis Doctoral ha sido el ratón, *Mus musculus*, L. 1758 (Muridae, Rodentia, Mammalia). Hemos usado animales silvestres procedentes de la estirpe C57BL/6J así como animales portadores de la mutación $Crb1^{rd8}$ en homocigosis de la misma estirpe, C57BL/6J $Crb1^{rd8}/Crb1^{rd8}$ (Fig. 25). De aquí en adelante nombramos a este ratón como $Crb1^{rd8}$.

Los estadios de edad empleados en este trabajo han sido postnatales (P): P0, P4, P7, P21 y P30 y P90, este último considerado como ratón adulto. Para las dos primeras edades sólo fueron usados animales silvestres, mientras que para los estadios P7, P21, P30 y P90 fueron utilizados ambos genotipos, control y mutante.

La colonia de ratones establecida para la realización de esta Tesis Doctoral se generó por transferencia embrionaria y se mantuvo hasta su sacrificio en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con agua y pienso, y mantenidos a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas.

Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron acorde a las líneas establecidas por la legislación europea (86/609/ECC, directiva 2003/65/CE) y española (RD 1201/2005, ley 32/2007) vigentes actualmente para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Como explicamos en el apartado 8.3 de la introducción, el ratón mutante $Crb1^{rd8}$ presenta una mutación en el nucleótido 3481, identificada en el cromosoma 1. Detectamos específicamente esa mutación mediante la técnica PCR, lo que nos sirve para diferenciar ratones silvestres de mutantes dentro de la estirpe C57BL/6J.

2. GENOTIPADO

Como explicamos en el apartado 8.3 de la introducción, el ratón mutante $Crb1^{rd8}$ presenta una mutación en el nucleótido 3481, identificada en el cromosoma 1. Detectamos específicamente esa mutación mediante la técnica PCR, lo que nos sirve para diferenciar ratones silvestres de mutantes dentro de la estirpe C57BL/6J.

2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN necesario para realizar la PCR se obtuvo a partir de una muestra de tejido de la cola de cada uno de los ratones. Las colas se homogenizan en un termobloque en agitación ("Mixing Block MB-102", Lan Technics) a 55°C durante 12 h, con proteinasa K (6 U/ml, Sigma-Aldrich®) en un tampón de lisis compuesto por dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,02% (p/v),

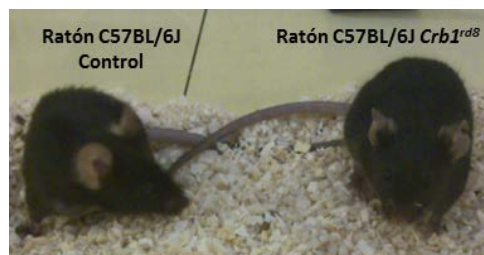


Figura 25: Ratones C57BL/6J control y portador de la mutación en homocigosis $Crb1^{rd8}$.

Material y métodos

5mM de ácido etilenoldiaminotetraacético (EDTA) a pH 8, 0,2M de cloruro sódico (NaCl), tampón tris 0,1M a pH 8 y todo ello diluido en agua destilada.

Tras 12 h de incubación para la completa digestión de las colas, el protocolo seguido fue el siguiente:

- 6) Se resuspende el homogenado y se centrifuga durante 2 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente (TA) en una centrífuga (Galaxy 16DH, VWR™). Recogemos el sobrenadante y se desecha el precipitado. Se añade un volumen de isopropanol equivalente al volumen del sobrenadante y agitamos esa mezcla suavemente.
- 7) A continuación la mezcla se centrifuga durante 10 min a 13.000 rpm a TA. En este caso se descarta el sobrenadante, conservando el precipitado que contiene el ADN.
- 8) Al ADN se le añade etanol al 70% (v/v) y se centrifuga a 13.000 rpm a TA. Se descarta el sobrenadante y recogemos el precipitado con el ADN.
- 9) Finalmente, el precipitado se resuspende en 25 µl de agua ELIX, y lo almacenamos a 4°C o a -20°C en caso de no ser usado inmediatamente.

2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la obtención de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN, a partir de poca cantidad de ADN original (Mullis et al., 1986).

Para realizar esta técnica es necesario el uso de cebadores que permitan la amplificación del fragmento de ADN deseado. Estos cebadores son oligonucleótidos con grupos 3'OH libres y cuyas bases nitrogenadas se aparean con las bases de una hebra molde, permitiendo el inicio de la replicación de esta última. En el presente trabajo hemos usado tres cebadores (Maddatu and Naggert, 1997) que son específicos para detectar y diferenciar los ratones silvestres de aquellos con la mutación *Crb1^{rd8}*, y que se presentan en la **Tabla 2**.

La solución para el desarrollo de la PCR consta de los siguientes reactivos: 0,375 µM de cada uno de los tres oligonucleótidos anteriormente descritos, 20% (v/v) de tampón 1X para Taq polimerasa (Promega®), 1,5 mM de Cl₂Mg (Promega®), 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®), 0,2 mM de desoxinucleótidos (Promega®), 0,125 U/µl de Taq polimerasa y ADN (entre 50 y 200 ng por muestra), todo ello disuelto en agua ELIX. Además usamos controles positivos en los cuáles se

Cebador	Secuencia
mCrb1-mF1	5' GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC 3'
mCrb1-mF2	5' GCCCCTGTTTGCATGGAGGAAACTT GGAAGACAGCTACAGTTCTTCTG 3'
mCrb1-mR	5' GCCCCATTGCACTGATGAC 3'

Tabla 2: Oligonucleótidos usados para detectar y diferenciar los ratones mutantes *Crb1^{rd8}* de los animales control y heterocigotos.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1	95°C	2:00	1
2	95°C	0:35	
3	56°C	0:30	40
4	72°C	0:30	
5	72°C	7:00	1
6	4°C	∞	-

Tabla 3: Ciclos de repetición, tiempos y temperaturas óptimas para la técnica de PCR.

añade ADN de genotipo conocido y controles negativos en los que el ADN es sustituido por agua estéril. La mezcla de la reacción para cada una de las muestras se introdujo en un termociclador (AB Applied Biosystems, Verity 96 well Thermal Cycler) donde se llevó a cabo la reacción de PCR, usando los ciclos que se detallan en la **Tabla 3**.

2.3. ELECTROFORESIS

Los productos genómicos obtenidos a partir de la PCR se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) del tipo MS-8 (Pronadisa®), disuelta en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. A esa dilución le añadimos 0,4 µg/ml de bromuro de etidio para visualizar las distintas bandas del ADN amplificado. Esta mezcla se deja solidificar en un molde para electroforesis horizontal, y se coloca un peine que permite la formación de los pocillos. Una vez solidificado el gel, se coloca en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 0,5X y se cargan las muestras en los diferentes pocillos, reservando uno para el marcador de peso molecular (PerfectSize 50 bp Ladder – 100, 5 PRIME). Las muestras corren en el gel a velocidad constante de 100V. Terminada la migración de las bandas de ADN amplificado, usamos una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories) para su visualización y captura de imágenes.

La aparición de un fragmento de ADN de 218 pares de bases (pb) indica la presencia de un ratón homocigoto silvestre. Si la banda equivale a un peso de 243 pb, corresponde a un ratón homocigoto mutante *Crb1^{rd8}*. La presencia de dos bandas, una de 218 pb y otra de 243 pb indica el genotipo de un ratón heterocigoto (**Fig. 26**).

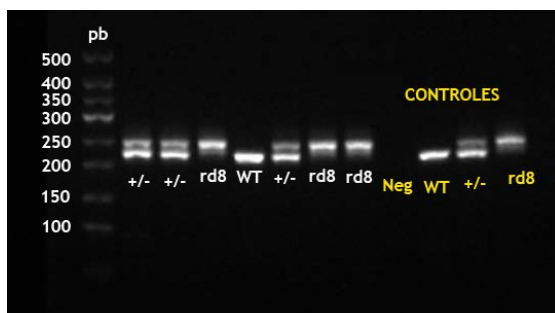


Figura 26: Genotipado de los ratones. La imagen muestra los diferentes genotipos obtenidos en los productos de la PCR. WT, silvestre; +/-, heterocigoto; rd8, mutante para *Crb1*; Neg, control negativo; pb, pares de bases.

3. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos policlonales anti-CRB1, anti-MPP4 y anti-CRB3 específicos para retina de ratón y usados en esta Tesis Doctoral, fueron diseñados por nuestro grupo de trabajo y producidos por Genosphere Biotechnology®, en el caso de CRB1 y MPP4, y GenScript® para CRB3.

Para la generación de estos tres anticuerpos se seleccionaron en primer lugar, secuencias de aminoácidos exclusivas para cada una de las tres proteínas en el ratón. De esta forma, los anticuerpos anti-CRB1, anti-CRB3 y anti-MPP4 reconocen específicamente a su antígeno correspondiente en la retina de ratón (**Fig. 27**). La secuencia aminoacídica completa de cada proteína se obtuvo a partir de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

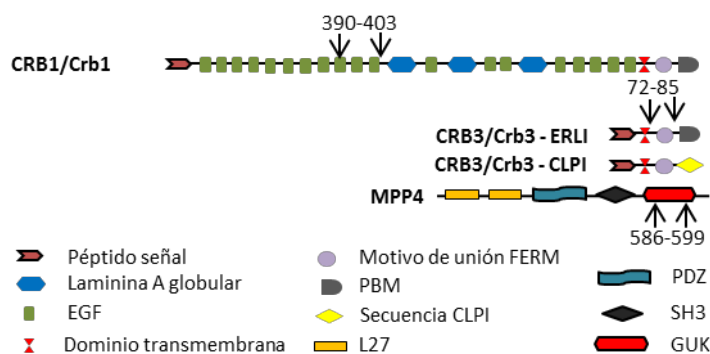


Figura 27: Esquema que representa las proteínas contra las que fueron desarrollados los anticuerpos empleados en el presente estudio. Los números y flechas indican las regiones de cada proteína elegidas para generar los anticuerpos.

A la hora de elegir la secuencia de aminoácidos para la generación de cada anticuerpo, se deben tener en cuenta una serie de criterios: que sea una región suficientemente antigénica, que no forme parte de dominios transmembrana y que su conformación terciaria no constituya ningún tipo de hélice o bucle que pueda entorpecer su reconocimiento por parte del anticuerpo. Con la ayuda de software de libre acceso en Internet como: <http://molbiol-tools.ca>, TMHMM Server v. 2.0 (predicción de dominios transmembrana en proteínas) o <http://www.sacs.ucsf.edu/Links/transmem.html> y similares, se analizó si las secuencias elegidas para la generación de los tres anticuerpos cumplían los criterios anteriormente expuestos.

Una vez seleccionadas las secuencias de aminoácidos, se enviaron a las empresas Genosphere Biotechnology® para el caso de CRB1 y MPP4 y a GenScript Corporation® para CRB3. Estas empresas sintetizaron cada uno de los tres péptidos, que fueron inyectados a diferentes conejos. Tras cuatro inyecciones de los péptidos durante tres meses, se extrajeron

los sueros de los distintos conejos, donde se encontraban los anticuerpos para detectar las diferentes proteínas.

Cabe destacar que además del suero con el anticuerpo, se nos proporcionó los sueros pre-inmunes de los conejos antes de la primera inyección y el péptido liofilizado para su uso como controles negativos.

4. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER

Para llevar a cabo los cultivos celulares se usaron retinas de ratones control y mutante. El protocolo establecido para la puesta a punto de los cultivos es una modificación del desarrollado por D. Hicks y Y. Courtois (Hicks and Courtois, 1990), que desarrollamos en los siguientes pasos:

- 1) Sacrificamos ratones de edad postnatal P7, mediante dislocación cervical. Se extraen los globos oculares y se mantienen en un medio compuesto por DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, Lonza®), suplementado con el 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, “fetal bovine serum”, Gibco®) y 1% (v/v) de antibiótico penicilina/estreptomina (Gibco®), durante 12 h, a TA y en oscuridad. De aquí en adelante, nombraremos este medio como DMEM+FBS+Ab.
- 2) A la mañana siguiente se incuban cada globo ocular en 500 µl de un medio compuesto por DMEM, al que se añade 70 U/ml de enzima colagenasa (Sigma-Aldrich®) y 0,1% (p/v) de tripsina (Sigma-Aldrich®) durante 30 min, en un incubador a temperatura constante a 37°C y 5% de CO₂.
- 3) La reacción enzimática se detiene al añadir el medio DMEM+FBS+Ab. A continuación las retinas se aíslan bajo lupa con tijeras y pinzas.
- 4) Posteriormente, las retinas aisladas se transfieren a placas Petri de 35mm con 2 ml de DMEM+FBS+Ab. Sembramos una retina por placa, que se disgrega previamente en porciones de aproximadamente 1mm².
- 5) Finalmente, las retinas cultivadas y disgregadas en el medio DMEM+FBS+Ab se incuban durante cinco días a temperatura constante de 37°C y 5% de CO₂. En el transcurso de esos cinco días el medio de cultivo no se renueva.

El primer cambio de medio del cultivo se realiza al 5º día de cultivo o DIC 5 (DIC, del inglés “days in culture”). Para realizar ese cambio, se retira el medio anterior, con los restos celulares que flotan en él, y se añade 1 ml de medio fresco DMEM+FBS+Ab. Se pipetea vigorosamente sobre la placa de cultivo con ese medio nuevo para recoger y despegar más desechos y restos celulares. Se retira ese medio, y se añaden 2 ml de medio de cultivo DMEM+FBS+Ab fresco a la

Material y métodos

placa. Transcurridos dos días, el medio de cultivo se retira con la ayuda de una bomba de vacío (KNFLab, Laboport) y se añaden otros 2 ml de medio fresco DMEM+FBS+Ab. Los siguientes cambios de medio de cultivo se realizan cada dos días del mismo modo.

Al día de cultivo 15, DIC 15, se alcanza una confluencia de las células en la placa Petri de aproximadamente el 80-90%. En este punto, algunas de las placas se destinaron para análisis proteico mediante *Western Blot* (WB), inmunohistoquímica (IHQ) o análisis de viabilidad celular, entre otros, que se detallarán en las siguientes secciones. Otras células del cultivo fueron resembradas en nuevas placas Petri. Para llevar a cabo la resiembra, se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se retira el medio de cultivo DMEM+FBS+Ab de las placas, y se añade 1 ml de tampón fosfato salino (TFS) para lavar las células.
- 2) A continuación se retira el TFS, y se añaden 500 μ l de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®) sobre la placa. Estas placas se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 min, tiempo necesario para que las células se despeguen de la superficie de la placa. La reacción de tripsinización se detiene con 1,5 ml DMEM+FBS+Ab que se añade a cada una de las placas.
- 3) Las células de Müller en cultivo se encuentran ahora en suspensión en un medio compuesto por tripsina y de DMEM+FBS+Ab. Este medio con las células se recoge y centrifuga a 800 g a TA durante 5 min, descartando el sobrenadante. En el precipitado se encuentran las células de Müller a las que se añade 1 ml de DMEM+FBS+Ab para resuspenderlas.
- 4) Finalmente las células se siembran en nuevas placas Petri de 35 mm. En función del experimento a realizar, el número de células que se siembran por placa es diferente: 50000 células para experimentos de viabilidad y WB y entre 5000 y 10000 células en estudios de IHQ. Para conocer el número de células a sembrar, se contabilizan en una cámara Thoma. Para ello, se mezclan 10 μ l de células con una solución de 70 μ l de azul de tripán (Trypan blue, Sigma-Aldrich®). Sobre la cámara Thoma se añaden 10 μ l de esa mezcla y se contabilizan las células, descartando aquellas teñidas de azul, que se consideran inviables. Tras el conteo, se determina el número de células/ml de la muestra inicial aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Nº células/ml} = \text{Nº células contadas} * 8 * 10^4$$

Una vez conocido el número de células, se toma el volumen equivalente a 5000, 10000 o 50000 células, y se siembran en las placas de Petri. Finalmente, se añade DMEM+FBS+Ab hasta completar el volumen de 2 ml por placa.

Tras la resiembra, el medio de cultivo se renueva cada dos días hasta que las células presentan una confluencia del 80 al 90%, que se alcanza aproximadamente a día DIC21. En ese momento, las células se recogen para llevar a cabo diferentes análisis, como WB, IHQ o análisis de viabilidad.

4.1. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR: ENSAYO DE MTT

El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, Sigma-Aldrich) es un método colorimétrico que mide la viabilidad celular teniendo en cuenta la supervivencia y proliferación celular, mediante la reducción del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Mosmann, 1983; van Meerloo et al., 2011). Para realizar este ensayo se diluyen 100 μ l de MTT a una concentración 5 mg/ml en 1 ml de medio DMEM+FBS+Ab. Se retira el medio de cultivo de las células y se añade 1 ml de la mezcla anterior a cada placa, incubándolas durante 1 h y 15 min a de 37°C y 5% de CO₂, protegidas de la luz. A continuación, el medio se retira y se añaden por 400 μ l de DMSO durante 10 min a TA en agitación y oscuridad. Finalmente, se mide su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas ELISA, obteniendo valores que varían de 0 a 4 (mínima y máxima viabilidad respectivamente) (LT-4000 Microplate Reader, LabTech).

Para analizar posibles diferencias significativas en la viabilidad de las células de Müller en cultivo, se realizó un análisis estadístico usando el programa informático SPSS 20.0, estableciendo el nivel de significación de la diferencia en significativo si $*p < 0,05$, y altamente significativo si $**p < 0,01$. Se realizó el test paramétrico de la *t de Student* cuando los datos seguían una distribución normal, y el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* si no seguían distribución normal.

4.2. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CÉLULAS EN CULTIVO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

La recogida de muestras para estudios de IHQ se realiza a los días 15 y 21 de cultivo. Primero se elimina el medio de cultivo de las células, y se añade TFS para lavarlas y eliminar los restos de medio. A continuación, las células se fijan con una solución de paraformaldehído despolimerizado (PFA) al 4% (p/v) durante 10 min a TA. Posteriormente, las células se lavan con TFS y se post-fijan 5 min a -20°C con metanol. Finalmente, los restos de metanol se eliminan con TFS y se continúa con el protocolo de IHQ que se detalla en la sección 5.3.

4.3. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CÉLULAS EN CULTIVO PARA WESTERN BLOT

Para los estudios de WB se emplearon células de DIC15 y 21. Las células se despegan de la placa con la ayuda de un raspador (“cell scraper”, BDFalcon®) y se centrifugan a 800 g durante 5 min a TA. Se descarta el sobrenadante donde se encuentran los restos del medio de cultivo y reservamos el precipitado, donde se encuentran las células. El precipitado se mantiene en hielo, se lava con TFS y se añade un volumen de 50 µl de un tampón de extracción de proteínas (RIPA Lysis Buffer, Santa Cruz Biotechnology®), suplementado con inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich®) diluido cien veces. A partir de aquí se continúa con el protocolo de extracción y cuantificación de proteínas, así como de WB que se describe en la sección 6 de este apartado de material y métodos.

5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Mediante el uso de la técnica IHQ hemos analizado la distribución de las proteínas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral en tejido de retina de ratón, así como en los cultivos primarios de las células de Müller.

5.1. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Los animales se anestesian con una solución al 5% (p/v) de hidrato de cloral (10 µl/g de peso del animal, Prolabo®). El efecto de la anestesia se comprueba por la ausencia del reflejo parpebral. Debido a que la fijación de las muestras puede afectar notablemente a la conformación de las proteínas a estudiar, llevamos a cabo dos métodos de fijación diferentes: inmersión y perfusión.

- ✓ Perfusión: En primer lugar se inyecta de forma intracardial 50 µl de una solución de heparina sódica. A continuación se coloca la cánula de una bomba peristáltica en el cono aórtico del ratón, a partir de la cual pasa una solución salina al 0,9 % (p/v) durante 1 min, y seguidamente la solución de fijación, con una velocidad de flujo de 12 ml/min. Dicha solución se compone de una mezcla de PFA al 4% (p/v) y ácido pícrico al 0,2% (v/v), diluido en tampón fosfato (TF) 0,1 M a pH 7,4. Se permite que el fijador actúe durante 15 min y, transcurrido ese tiempo, se extraen los globos oculares, y se post-fijan durante 2 h a TA en la misma mezcla fijadora.
- ✓ Inmersión: Los animales se sacrifican por dislocación cervical, y se extraen sus globos oculares con pinzas de disección. A continuación, se realiza un pequeño corte en la córnea que facilita la penetración del fijador en el globo ocular. Seguidamente los

globos oculares se sumergen en la solución de fijación, compuesta por una mezcla de PFA al 4% (p/v) en TF 0,1 M a pH 7,4 durante 12 h a 4°C.

Tras ambos tipos de fijación se elimina el exceso de fijador lavando los globos oculares con TF varias veces durante 24 h. Durante este paso se elimina la córnea y se extrae el cristalino con tijeras y bajo lupa.

Para evitar la formación de cristales de hielo al ser congelados, los ojos se crioprotegen al someterlos a baños de concentraciones crecientes de sacarosa: 10, 20 y 30% (p/v) diluida en TF 0,1 M a pH 7,4. Cada baño se realiza durante 12 h a 4°C.

Tras la crioprotección, las muestras se encastran en un medio óptimo para su congelación y corte, como es el OCT (Tissue-Tek® O.C.T.™, Sakura). A continuación se congelan y se almacenan a -80°C hasta el momento de su seccionamiento.

Las muestras fueron seccionadas en un criostato (Microm HM560, Thermo Scientific). Se obtuvieron secciones seriadas de 14 µm de grosor, que se adhieren a portaobjetos Superfrost Ultra Plus®. Las secciones se conservan a -20°C hasta el momento de su uso.

5.2. RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA

Para la correcta inmunodetección de algunos marcadores, tales como CRB1, MPP4 o PALS1, es necesario someter al tejido a una recuperación antigénica previa a la realización de la IHQ. Esta técnica se basa en que tras calentar las secciones, las proteínas pierden su estructura tridimensional, y los sitios antigénicos quedan más expuestos para su interacción con el anticuerpo (Yamashita, 2007).

Tras descongelar las secciones, se realizan dos lavados de 10 min en TFS. A continuación, y en función del anticuerpo primario a utilizar, los cortes se someten a diversos baños en una solución 10 mM de citrato sódico en agua destilada a pH 6. Cada baño es de 3 min de duración a 450 w en un microondas. Para la inmunodetección de PALS1 y MPP4, los cortes se someten a dos baños, mientras que para CRB1 son cuatro. Finalmente se realizan otros dos lavados de 10 min en TFS para retirar el exceso de citrato sódico, y a partir de aquí se continúa con el protocolo de IHQ que detallamos en la siguiente sección.

5.3. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES Y EN CULTIVO

Para iniciar el análisis de IHQ en secciones, éstas se descongelan y se mantienen a TA durante 1 h. Posteriormente se efectúan tres lavados de 10 min cada uno en TFS. A continuación se elimina la autofluorescencia del tejido, sometiendo a las muestras a un baño

de 15 min en 0,25 g de NaBH₄ diluidos en 100 ml de TFS. A partir de aquí se sigue un protocolo similar para realizar el marcaje de IHQ en secciones y cultivo (**Fig. 28**):

- 1) Se realizan tres lavados de 10 min cada uno en TFS con Triton X-100 (Tx-100, Sigma-Aldrich®) al 0,02% (v/v) (TFS-Tx).
- 2) Se lleva a cabo una preincubación para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Para ello las secciones se incuban durante 1 h a TA en un medio con BSA al 1% (p/v), TFS-Tx y suero del animal donde esté hecho el anticuerpo secundario al 5% (v/v). En el caso de los cultivos, esta preincubación se realiza de forma similar pero con Triton X-100 al 0,2%.
- 3) Posteriormente incubamos con el anticuerpo primario (**Tabla 4**, ubicada al final del apartado de material y métodos y sección 5.6 de material y métodos) diluido en el mismo medio donde se realiza la preincubación durante 12 h a 4°C.
- 4) El exceso de anticuerpo primario se elimina con tres lavados con TFS de 10 min cada uno.
- 5) A continuación se incuba con el anticuerpo secundario (**Tabla 4**) durante 45 min a TA. El anticuerpo está conjugado con moléculas fluorescentes: Alexa Fluor® 488 o Alexa Fluor® 555 (Life Technologies™). Estos anticuerpos se diluyen en una solución de TFS con el 2% (v/v) del suero del animal donde está hecho el anticuerpo secundario y un marcador nuclear diluido (**Tabla 5**), que se une específicamente al ADN.
- 6) Con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo secundario y de marcador nuclear, se efectúan tres lavados en TFS de 10 min cada uno.
- 7) Finalmente las secciones se montan en un medio con protector de fluorescencia: ProLong® Gold antifading reagent (Life Technologies™).

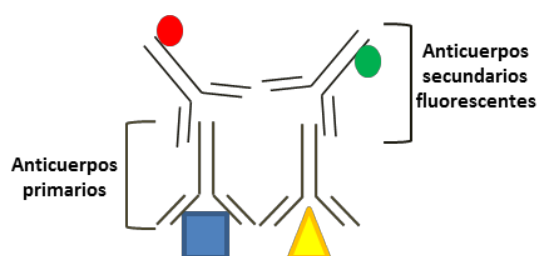


Figura 28: Esquema representativo de un marcaje inmunohistoquímico frente a dos epítomos (cuadrado y triángulo) diferentes.

Marcador nuclear	Casa comercial	Espectro máximo de emisión	Dilución de uso
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma-Aldrich®	454 nm	1:10.000
TO-PRO® 3-Iodide	Life Technologies™	661 nm	1:1.000

Tabla 5: Marcadores nucleares usados en el presente estudio junto con su procedencia, espectro máximo de emisión y dilución de uso.

5.4. MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO “in toto”

Para este procedimiento, las retinas de ratones control y mutante a P7 se aíslan del globo ocular y se fijan con PFA al 4% durante 2 h. a 4°C. El exceso de fijador se elimina con lavados en TFS. A continuación, las retinas se permeabilizan durante 12 h a 4°C en una solución compuesta por TFS suplementado con suero de cabra al 5% (v/v) y Triton x-100 al 0,5% (v/v). Posteriormente, se incuban con el marcador Isolectina B4 (**Tabla 4** y sección 5.6 de material y métodos) diluido 80 veces en el medio anterior sin suero de cabra. Esa incubación se realiza a TA durante 6 h y en oscuridad, ya que la Isolectina lleva acoplada el fluorocromo FITC (fluoresceína-5-isotiocianato). Finalmente, las retinas se lavan con TFS y se extienden sobre un portaobjetos. Para su montaje con cubreobjetos, se usa un medio con protector de fluorescencia, ProLong® Gold antifading reagent.

5.5. MARCADORES

- ✓ **AT (tubulina acetilada):** Proteína de la familia de las tubulinas. Estas proteínas pueden sufrir una modificación postraduccional reversible como la acetilación de la lisina 40, convirtiéndola en AT. En la retina se localiza, entre otros sitios, en el cilio de conexión de los fotorreceptores (Omori et al., 2010).
- ✓ **Bassoon:** Proteína localizada en las zonas activas de los terminales presinápticos, donde participa en su organización estructural y funcional facilitando la liberación del neurotransmisor. En la retina se sitúa en ambas capas plexiformes (Brandstatter et al., 1999).
- ✓ **β-catenina:** Proteína de 92 kDa de unión a la cola citoplasmática (extremo COOH terminal) de las cadherinas. Las cadherinas son proteínas transmembrana de adhesión que aparecen en las uniones adherentes (Ozawa et al., 1989). β-catenina es clave en dichas uniones, pues la pérdida de su unión con las cadherinas conduce a la eliminación de la unión celular (Eger et al., 2000). En la retina, esta proteína se localiza en las uniones adherentes presentes entre sus células desde estadios embrionarios (Fu et al., 2006).
- ✓ **CB (calbindina):** Proteína ligante de iones de calcio, que regula la distribución y concentración de los mismos en el citoplasma (Roth et al., 1981; Wasserman and Taylor, 1966). En la retina del ratón, las células teñidas con anticuerpos frente a CB son las horizontales, así como algunas amacrinas y ganglionares. Los axones de células amacrinas que contienen CB se localizan en tres estratos inmunorreactivos dentro de la CPI (Haverkamp and Wassle, 2000; Marchena et al., 2011; Pochet et al., 1991).

- ✓ **CD44:** Glicoproteína de la superficie celular implicada en las interacciones célula-célula, adhesión y migración (Goodison et al., 1999; Spring et al., 1988). Se localiza en un gran número de células, entre ellas las células de Müller, donde se sitúa en las microvellosidades apicales a la MLE (Chaitin et al., 1994).
- ✓ **CR (calretinina):** Se identificó por primera vez en la retina del pollo. Es una proteína ligante de calcio, al igual que CB (Rogers, 1987). En el ratón, diferentes tipos de células amacrinas y la mayoría de las ganglionares son inmunorreactivas para CR. Análogamente a lo que ocurre con la proteína CB, se expresa en tres bandas en la CPI (Haverkamp and Wassle, 2000; Marchena et al., 2011).
- ✓ **CRALBP (proteína de unión al retinaldehído celular):** Proteína citoplasmática cuya misión es inhibir la conversión del 11 cis retinal en la forma trans, contribuyendo a la correcta generación del ciclo visual (Saari et al., 1994). Se localiza en las células de Müller y en el EP (Bunt-Milam and Saari, 1983).
- ✓ **CRB1 y CRB3:** Proteínas transmembrana miembros de la familia de proteínas Crumbs. Ambas han sido ampliamente detalladas en la sección 6 de la introducción de esta Tesis Doctoral.
- ✓ **GABA (ácido γ -aminobutírico):** Se trata del principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (McCormick, 1989). Está presente en las vesículas sinápticas de las neuronas GABAérgicas, donde es transportado por medio del transportador vesicular de GABA, VGAT (McIntire et al., 1997). En la retina del ratón se sitúa a nivel de la CNI y CPI, donde presenta un patrón de marcaje característico localizándose en diferentes subpoblaciones de células amacrinas, entre ellas células amacrinas colinérgicas (Haverkamp and Wassle, 2000).
- ✓ **GAD 65/67 (glutamato descarboxilasa 65/67):** La enzima glutamato descarboxilasa cataliza la descarboxilación de glutamato a GABA. En función de su peso molecular hay dos isoformas: GAD 65 y GAD 67 (Erlander et al., 1991). El anticuerpo anti-GAD 65/67 reconoce ambas. En la retina del ratón, las dos isoformas están presentes en células amacrinas GABAérgicas (Bumsted-O'Brien et al., 2007; Haverkamp and Wassle, 2000).
- ✓ **GFAP:** Esta proteína de 49 kDa fue descrita en 1971 como el principal componente de los filamentos intermedios de los astrocitos (Eng et al., 1971). Los astrocitos de la CFNO de la retina son inmunorreactivos a anticuerpos frente a GFAP (Kolb, 2000). Además, como explicamos en la introducción, los pies de las células de Müller también son inmunorreactivos a GFAP; sin embargo, tras un daño en la retina la proteína se sobreexpresa y puede aparecer a lo largo de toda la célula (Ekstrom et al., 1988; Fisher and Lewis, 2003; Guerin et al., 1990).

- ✓ **Giantin:** Proteína transmembrana presente en el aparato de Golgi, donde interviene en la formación de sus cisternas internas (Linstedt and Hauri, 1993). Como ya se ha mencionado anteriormente, en los SI de los fotorreceptores se sintetizan la mayor parte de los componentes de los SE, por lo que poseen un desarrollado aparato de Golgi que se pone de manifiesto con anticuerpos frente a giantin (Keady et al., 2011).
- ✓ **GLAST (transportador de glutamato-aspartato ó transportador de aminoácidos excitatorios 1):** Transportador glial de alta afinidad dependiente de sodio. Regula las concentraciones de glutamato en las sinapsis excitatorias del sistema nervioso central (Arriza et al., 1994; Tanaka, 1993). En la retina se localiza en las células de Müller, a través de toda su longitud, desde la MLE hasta la MLI. GLAST es crucial en estas células, ya que regulando los niveles de glutamato, favorece la correcta transmisión de la señal nerviosa entre fotorreceptores y células bipolares (Harada et al., 1998).
- ✓ **GNB3 (“guanine nucleotide-binding protein (G protein) subunit β 3”):** Las proteínas G son transductores de la señal celular. Llevan la información desde el receptor en la membrana plasmática hasta una proteína efectora. La subunidad β interviene en la actividad GTPasa de la proteína (Lodish, 2005). GNB3 es una isoforma de la subunidad b que en la retina del ratón, GNB3 se sitúa en los SE de los fotorreceptores, así como a través de toda la longitud de las células bipolares de cono tipo ON (Ritchey et al., 2010).
- ✓ **GS (glutamina sintetasa):** Enzima de 42 kDa que cataliza la amidación del glutamato a glutamina. Esta actividad enzimática ocurre en los astrocitos (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979). Sin embargo, en la retina las únicas células con GS son las células de Müller (Lewis et al., 1988; Linser and Moscona, 1979), localizándose en la retina murina a lo largo de todo su citoplasma (Haverkamp and Wassle, 2000).
- ✓ **Isolectina B4:** Molécula de lectina procedente de *Griffonia simplicifolia* que muestra alta afinidad hacia su unión con moléculas de galactosa (Goldstein et al., 1981; Kirkeby and Moe, 2001; Laitinen, 1987). Se une preferente a los residuos de galactosa presentes en la superficie de las células endoteliales de diferentes tejidos (Laitinen, 1987), incluida la retina, donde varios trabajos lo han puesto de manifiesto (Sarlos and Wilkinson-Berka, 2005; Viores et al., 1999). El marcador usado en esta Tesis Doctoral lleva acoplado el fluorocromo FITC.
- ✓ **Ki67:** Marcador de proliferación celular que se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto en las fases G_0 y al comienzo de la G_1 . Tampoco se detecta durante los procesos de reparación del ADN, ni en células quiescentes (Gerdes et al., 1983; von Bohlen und Halbach, 2011; Zacchetti et al., 2003). Ki67 ha sido ampliamente usado

para marcar eventos proliferativos en células retinianas (Bhatia et al., 2011; Pacal and Bremner, 2012; Smirnov and Puchkov, 2004).

- ✓ **Kir 4.1. (del inglés, “inwardly rectifying potassium channel”)**: Una de las funciones de las células gliales es regular la concentración de K^+ del medio extracelular, y para ello son claves los canales de potasio. En la retina, los canales Kir son fundamentales para controlar el K^+ en este tejido, y se localizan en las células de Müller. En los mamíferos, a diferencia de otras especies, estos canales pueden aparecer a lo largo de toda la superficie de la célula de Müller (Bringmann and Reichenbach, 2001; Newman, 1987, 1993).
- ✓ **MPP4**: Proteína de 72 kDa miembro de la subfamilia de proteínas MAGUK. Se localiza en la retina y en el cerebro desde estadios postnatales (Conte et al., 2002; Inagaki et al., 2002; Li et al., 2003). En la retina se sitúa en las vesículas de la CPE y de la RSA de la MLE, donde interacciona con otros miembros de la familia MAGUK (Aartsen et al., 2006; Kantardzhieva et al., 2005; Stohr et al., 2003; Yang et al., 2007). Algunos estudios también la localizan en el cilio de conexión de los fotorreceptores, así como en la CPI (Stohr et al., 2003)
- ✓ **Opsinas**: Cada uno de los tres tipos de conos presenta una opsina característica, que difiere de las otras dos por la longitud de onda a la cual es más sensible. Para este estudio se han usado dos anticuerpos que detectan esas opsinas: uno que marca indistintamente a la opsina roja y verde, presente en conos de onda larga y media (conos L y conos M), y otro específico para la opsina azul, localizada en los conos de onda corta (conos S). En la retina del ratón no hay conos tipo L (Applebury et al., 2000; Kolb, 2000; Szel et al., 1993).
- ✓ **PALS1 o MMP5**: Esta proteína tiene un peso molecular de 77 kDa. Se localiza en muchos tipos celulares epiteliales, y su presencia también ha sido descrita en la RSA de la MLE, donde interacciona, entre otras, con las proteínas CRB (Cao et al., 2005; Kamberov et al., 2000; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006).
- ✓ **PKC α (proteína quinasa C alpha)**: Proteína de la familia de las quinasas. La PKC es dependiente de Ca^{2+} y se localiza fundamentalmente en el cerebro, donde, entre otras misiones, fosforila los canales iónicos de células nerviosas (Lodish, 2005). En la retina humana y de ratón, la isoforma α de la PKC está ampliamente representada en las células bipolares de bastón y en algunas células amacrinas (Grunert and Martin, 1991; Haverkamp and Wassle, 2000).
- ✓ **PNA (aglutinina de cacahuete)**: Molécula de lectina que se une preferentemente a los disacáridos galactosil- β (1,3)-N-acetilgalactosamina presente en algunas glicoproteínas

y glicolípidos de la superficie de las membranas plasmáticas de diferentes tipos celulares, como por ejemplo los conos de la retina. En estas células se adhieren a los SI y a los procesos sinápticos (Blanks and Johnson, 1984). El marcador utilizado en este trabajo lleva acoplado el fluorocromo FITC.

- ✓ **Recoverina:** Se trata de una proteína ligante de calcio con un peso molecular de 23 kDa. Se localiza en ambos tipos de fotorreceptores en sus segmentos, soma y terminales sinápticos. Además también se encuentra en una subpoblación de células bipolares de conos y células ganglionares (Yan and Wiechmann, 1997). En los fotorreceptores actúa controlando la fosforilación de la rodopsina, inhibiendo a la enzima rodopsina kinasa (Hurley et al., 1998).
- ✓ **Rodopsina:** Pigmento visual de los bastones que media la visión en condiciones de baja luminosidad. Es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que cuenta con una parte proteica, la opsina y un derivado de la vitamina A, el 11-cis retinal (Kolb, 2000).
- ✓ **SOX2:** Factor de transcripción expresado principalmente en cerebro y retina, aunque también se ha visto en pulmones y estómago. Se une a OCT4 formando un complejo que controla la expresión de varios genes. Es crítico durante el desarrollo embrionario temprano, así como para mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias. Entre otras misiones, suprime la diferenciación neuronal y mantiene a las células madre indiferenciadas (Andreu-Agullo et al., 2012; Boiani and Scholer, 2005; Kondoh and Kamachi, 2010; Tsuruzoe et al., 2006). SOX2 regula la diferenciación celular retiniana (Ohsawa and Kageyama, 2008; Taranova et al., 2006) y además, en estadio adulto se localiza en las células de Müller, así como en astrocitos y células amacrinas colinérgicas (Fischer et al., 2010).
- ✓ **SYP (sinaptofisina):** Proteína de 38 kDa que es un componente de la membrana de las vesículas sinápticas, donde parece tener funciones estructurales y de plasticidad sináptica (Janz et al., 1999). En la retina se localiza en ambas capas plexiformes, tanto en fotorreceptores como en los elementos presinápticos de células bipolares y amacrinas, en las sinapsis convencionales y “en bastoncillo” (Brandstatter et al., 1996).
- ✓ **TH (tirosina hidroxilasa):** Enzima encargada de catalizar la conversión de la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), que es el precursor de la dopamina. En la retina, la enzima TH se localiza en una subpoblación de células amacrinas dopaminérgicas, localizada en la zona más externa de la CPI (Haverkamp and Wassle, 2000; Wulle and Schnitzer, 1989).

- ✓ **VGLUT1 (transportador vesicular de glutamato 1):** Este transportador de glutamato fue identificado inicialmente en el cerebro de la rata, como un transportador específico de fosfato (Bellocchio et al., 1998; Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000). Se localiza únicamente en vesículas sinápticas de células glutamatérgicas (Bellocchio et al., 1998). En la retina, VGLUT1 se encuentra en ambas capas plexiformes (Johnson et al., 2003). Aparece en los terminales sinápticos de los fotorreceptores y de las células bipolares desde períodos postnatales tempranos (Johnson et al., 2003; Sherry et al., 2003).
- ✓ **Vimentina:** Proteína de los filamentos intermedios que en el SNC aparece en células gliales (Schnitzer et al., 1981). En la retina del ratón, la proteína vimentina se localiza en los astrocitos y en los pies de las células de Müller a nivel de la MLI; sin embargo, tras un daño en la retina, se sobreexpresa y puede aparecer a lo largo de toda la célula (Fischer et al., 2010; Kolb, 2000). Es un marcador que ha sido ampliamente usado en el estudio de células de Müller en cultivo (Harada et al., 2003; Picard et al., 2008).

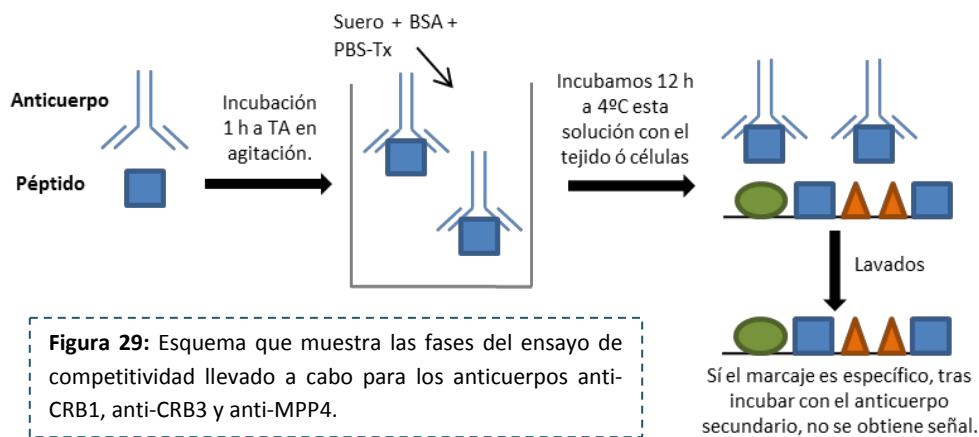
5.6. CONTROLES DE ESPECIFICIDAD DE LA IHQ

Para determinar la especificidad de los anticuerpos utilizados, realizamos diferentes tipos de controles negativos:

- ✓ Eliminación del anticuerpo primario en la primera incubación: se usa para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- ✓ Eliminación de la incubación con el anticuerpo secundario: con ello determinamos la presencia de autofluorescencia en el tejido.
- ✓ Ensayo de competitividad.

El ensayo de competitividad es una técnica en la cual se incuban el anticuerpo primario junto con el péptido utilizado para la generación de dicho anticuerpo. Su objetivo es bloquear el marcaje generado por el anticuerpo. En el presente estudio se realizó el ensayo de competitividad para los anticuerpos α -CRB1, α -CRB3 y α -MPP4 (**Fig. 29**). Para ello, se lavan las secciones con TFS, se elimina la autofluorescencia del tejido y se realiza la preincubación, como en una IHQ convencional. Durante el tiempo de esa preincubación se prepara la solución para bloquear el anticuerpo. Así, se incuban juntos el anticuerpo primario a la concentración normal de uso junto con su péptido, tres veces más concentrado que el anticuerpo, lo que permite la unión específica y covalente del péptido al anticuerpo, saturando todos sus sitios de unión. Esta incubación se realiza durante 1 h, a TA y en agitación. Seguidamente se incuban las secciones con la solución anterior durante 12 h, a 4°C. Transcurrido este tiempo se lava con

TFS y, finalmente, incubamos con el anticuerpo secundario que reconoce específicamente al anticuerpo primario. Así pues, si al realizar esta técnica no se obtiene marcaje positivo para CRB1, CRB3 o MPP4, significa que el anticuerpo es específico para esa proteína. Por el contrario, si se observa algún marcaje implica inespecificidad del antisuero debido a la presencia de otros anticuerpos diferentes a α -CRB1, α -CRB3 o α -MPP4 en el suero del conejo o cabra.



5.7. MICROSCOPIA Y CUANTIFICACIÓN

Las imágenes de las diferentes técnicas IHQ fueron obtenidas bien con un microscopio Olympus PROVIS AX70 o con un microscopio láser confocal invertido Leica SP2, y se capturaron con los programas informáticos Micro CDD y Leica Confocal Software, respectivamente. Posteriormente, para ajustar los niveles de brillo y contraste a los observados directamente con el microscopio se utilizó el programa informático Adobe® Photoshop CS5®.

5.7.1. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CONOS EN RETINAS

Para el recuento del número de conos se eligieron retinas de ratones mutantes y control de edades P21 y P30. Se analizaron 3 retinas por cada uno de los grupos experimentales. Cada una de las retinas se procesó para técnicas de IHQ y se tiñeron con el marcador específico de conos PNA. El recuento de células positivas para este marcador se realizó usando los programas Neurolicida y Neuroexplorer, acoplados al microscopio Leica DMRXA2.

5.7.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

Para la cuantificación de las células en cultivo se escogieron cultivos obtenidos de las retinas de tres ratones mutantes *Crb1^{rd8}* y tres controles. Las retinas de estos animales se disgregaron y cultivaron en tres pocillos diferentes de una placa multipocillo de 12. A los 15 y 21 días en cultivo, DIC15 y DIC21, las células se fijaron y, posteriormente, se tiñeron mediante

la técnica de IHQ frente al marcador de proliferación celular Ki67. Posteriormente se tomaron fotografías, todas al mismo aumento, de 10 áreas seleccionadas al azar en cada uno de los tres pocillos. El recuento de células positivas para Ki67 se realizó con el programa informático *Image J*.

5.7.3. RECONSTRUCCIÓN DE RETINAS *IN TOTO* Y CUANTIFICACIÓN DE LA VASCULARIZACIÓN

Las retinas controles y mutantes de edad P7 teñidas con el marcador isolectina B4 para evaluar la vascularización, se reconstruyeron a partir de fotografías tomadas al mismo aumento, y realizadas sobre toda la cara vitreal de la retina. Estas fotografías se fusionaron con ayuda del programa informático Adobe® Photoshop CS5®.

Para medir la intensidad del marcaje y la densidad en la vascularización se dividió a cada una de las retinas en 4 regiones: nasoventral (NV), nasotemporal (NT), dorsoventral (DV) y dorsoventral (DV). De cada región se seleccionaron 4 o 5 partes al azar, cuya intensidad y densidad de vasos sanguíneos se midieron con el programa informático *Image J*.

5.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CUANTIFICACIONES

El análisis de las posibles diferencias significativas en el número de conos entre retinas de ratones mutantes y control, así como en el número de células de Müller proliferativas en cultivo, se realizó mediante el test paramétrico de la *t de Student* cuando los datos seguían una distribución normal, y el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* con una distribución no normal.

Para determinar si existían diferencias significativas en la intensidad y densidad media en la vascularización de cada región entre retinas silvestres y *Crb1^{rd8}*, se usó el test paramétrico de la *t de Student* si los datos seguían una distribución normal, y el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* cuando había una distribución no normal. Por otro lado, para analizar las diferencias en la densidad de la vascularización entre las diferentes regiones de las retinas mutantes se usó el test ANOVA de un factor, seguido del test *post-hoc HSD de Tukey*.

En todos los casos, los análisis estadísticos se realizaron usando el programa informático SPSS 20.0, estableciendo el nivel de significación de la diferencia en significativo si $*p < 0,05$, y altamente significativo si $**p < 0,01$.

6. WESTERN BLOTTING

Hemos usado la técnica de WB para comprobar la especificidad de algunos de los anticuerpos utilizados en la presente Tesis Doctoral, así como para analizar las diferencias en la cantidad de ciertas proteínas entre ratones mutantes *Crb1^{rd8}* y ratones silvestres.

6.1. PROCESAMIENTO DE LAS RETINAS

Los sujetos de experimentación para esta técnica se seleccionaron a las edades de P7 y P90 y tras la anestesia, se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente aislamos las retinas bajo lupa, usando tijera y pinzas. Esas retinas se transfieren a un vial, se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su empleo. Este procedimiento asegura una preservación óptima de las proteínas.

6.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PROCEDENTES DE TEJIDO Y CULTIVO

Las retinas se descongelan y homogenizan en un tampón de extracción de proteínas (RIPA Lysis Buffer, Santa Cruz Biotechnology®). Se usan 3 ml de tampón por cada gramo de tejido suplementado con inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich®), diluido 1:100 en el tampón de extracción. Las proteínas procedentes de los cultivos de las células de Müller también se lisan en tampón RIPA con inhibidor de proteasas (descrito en apartado 4.3. de material y métodos).

Ambos homogenizados se mantienen en hielo y agitación durante 2 h. Pasado ese tiempo, se centrifugan a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, de forma que en el sobrenadante quedan disueltas las proteínas, y en el precipitado, restos celulares. El precipitado se descarta y se recoge el sobrenadante, que se conserva a -80°C hasta su posterior cuantificación y análisis mediante WB.

Las proteínas se cuantifican usando el método colorimétrico de Bradford. Para ello, previamente se realiza una recta patrón de valores conocidos de BSA. En primer lugar se prepara una solución con el 20% (v/v) del medio "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad®) en agua destilada. En cada ml de esa solución se diluyen por un lado, cinco valores conocidos de BSA: 0, 1, 2, 5 y 10 (µg/µl) y por otro, 2 µl de las proteínas a cuantificar. Estas muestras se incuban durante 5 min a TA y posteriormente se transfieren 200 µl de cada una de estas diluciones a una placa de 96 pocillos, y se mide su absorbancia a 595 nm en un lector de placas LT-4000 Microplate Reader (LabTech). Con la ayuda del programa informático MANTA acoplado al lector de placas y a partir de los valores obtenidos por la recta patrón de BSA, se determina la concentración de proteínas existente en cada una de las muestras.

6.3. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Para llevar a cabo la electroforesis se emplearon dos geles: un gel separador, situado en la parte de abajo de la electroforesis en columna, y por el que migran las proteínas separándose en función de su peso molecular; y un gel concentrador, que se sitúa en la parte de arriba de la electroforesis, y cuya misión es acumular todas las proteínas para que migren a la vez. La **Tabla 6** muestra los componentes de cada uno de estos dos geles. Además, es importante señalar que la concentración de los geles varía en función de la proporción de acrilamida-bisacrilamida empleada. Así pues, en el presente estudio hemos usado geles separadores cuya concentración varía desde el 7% para la detección de proteínas de alto peso molecular, al 14% para las proteínas de bajo peso molecular. En el gel concentrador, la concentración utilizada ha sido el 4%.

Gel separador	Gel concentrador
30%-0,3% Acrilamida-bisacrilamida	30%-0,3% Acrilamida-bisacrilamida
1/5 Tris glicina glicerol (TGGG) 5X	1/5 Tris EDTA glycerol (TEG) 5X
1/25 SDS 10%	1/25 SDS 10%
1/100 Persulfato amónico (APS) 10%	1/50 APS 10%
1/2000 N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	1/1000 TEMED
Agua MILIQ	Agua MiliQ

Tabla 6: Reactivos usados para la elaboración de los geles separadores y concentradores de las electroforesis realizadas en los WB de esta Tesis Doctoral.

Las muestras se cargan sobre los pocillos formados en el gel concentrador. Se han empleado entre 30 y 50 μg de proteínas por pocillo, a las que se añade tampón de carga, formado por una solución con: 50% de glicerol, 10% de SDS, 0,012% de azul de bromofenol y Tris-HCL 312,5 mM, todo ello diluido en agua MiliQ y al que añadimos β -mercaptoetanol a una concentración final de 1X. Posteriormente las muestras se calientan a 100°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas, e inmediatamente después se pasan a hielo evitando su re-naturalización. Estas muestras son las que se cargan directamente en los pocillos del gel. Finalmente, en uno de los pocillos se cargan 5 μl de un marcador con proteínas estándar de pesos moleculares conocidos (Precision Plus Protein™ Standards de BioRad®).

El gel se introduce en una cubeta mini-PROTEAN® que se llena con el tampón de migración formado por: 25 mM de TRIS base a pH 8,3, 192 mM de glicina y SDS al 0,1% en agua ultrapura, conectándose a una fuente de alimentación PowerPac Basic™ (BioRad). Para que las proteínas migren correctamente por el gel, se usa un voltaje de 90 V para la migración por el gel concentrador y de 120 V para su migración por el gel separador. De esta forma, las proteínas se separan en función de su peso molecular.

Concluida la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de transferencia (Inmobilon™ de Millipore®) que se activa con metanol antes de su uso. Para llevar a cabo la transferencia se crea un “sandwich” usando unas láminas de plástico con rejilla conteniendo una esponja, papel de filtro Whatman, el gel de poliacrilamida con las proteínas, la membrana de transferencia, otro papel de filtro Whatman y otra esponja. Este sándwich se introduce en una cubeta (Mini Trans-Blot de Bio Rad®) que contiene tampón de transferencia formado por: 25 mM de Tris-base a pH 8,3, 192 mM de glicina y 10% (v/v) de metanol en agua ultrapura. Realizamos la transferencia a 4°C durante 3 h a una intensidad de corriente de 300 mA.

Terminada la transferencia y para comprobar que se realiza correctamente, teñimos la membrana con una solución de Rosa Ponceau al 0,1% (p/v) diluido en ácido acético al 5% (v/v), que tiñe las proteínas transferidas a la membrana. A continuación lavamos con agua destilada para eliminar el colorante. Posteriormente sobre esta membrana se realiza la inmunodetección de las proteínas transferidas.

6.4. INMUNODETECCIÓN

Para detectar las proteínas de interés se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Se realizan dos lavados de 10 min cada uno con tampón tris salino (TTS) a pH 7,6 con detergente Tween-20 (Sigma-Aldrich®) al 0,1% (v/v). Este medio se denomina TTS-T.
- 2) Se bloquean los sitios inespecíficos de la membrana durante 1 h a TA en una solución con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) diluida en TTS-T.
- 3) A continuación se realiza la incubación con el anticuerpo primario. Para ello, se diluye el anticuerpo de interés (**Tabla 7**, situada al final de la presente sección) en un medio con TTS-T y BSA al 2%. La incubación se realiza durante 12 h a 4°C.
- 4) Posteriormente se efectúan tres lavados de diez min cada uno con TTS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario.
- 5) A continuación se procede a la incubación con el anticuerpo secundario (**Tabla 7**), que se diluye en un medio con TTS-T y leche en polvo al 5%. Ese anticuerpo secundario está conjugado con una enzima y en función del método de revelado elegido, esta enzima es diferente. En unos casos, la enzima es una fosfatasa alcalina y en otros es la peroxidasa de rábano. En ambos casos la incubación se realiza durante 1 h a TA y el anticuerpo se diluye 5.000 veces, en el caso de la enzima fosfatasa alcalina, y 10.000 veces para la peroxidasa de rábano.
- 6) A continuación se dan tres lavados de 10 min cada uno con TTS-T.
- 7) Finalmente se realiza el revelado del marcaje:

- Si la membrana se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, se realiza un lavado de 15 min a TA en un tampón apropiado para la actuación de la enzima. Este tampón se compone de: 1 M de Tris-HCl a pH 9,5, 1 M de MgCl₂, 4 M de NaCl y 20% de Triton-X100 en agua MiliQ. A continuación se incuba con el medio de revelado, formado por el tampón anterior y la adición de los dos sustratos de la enzima: 50 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, de Roche Applied Science®) y 37,5 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, de Roche Applied Science®) por cada 10 ml del tampón. La enzima lleva a cabo una reacción de óxido-reducción sobre la membrana dando un precipitado de color azul. La reacción se bloquea con TTS-T y la membrana se seca a TA y en oscuridad.
- Si la membrana se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano, se usa un kit de quimioluminiscencia (Pierce® ECL Western Blotting, Thermo Scientific). Este kit posee H₂O₂ que se reduce en presencia de la enzima peroxidasa y luminol que se oxida. La membrana se incuba durante 1 min con una solución formada por 1 ml de H₂O₂ y 1 ml de “Luminol enhancer solution”, de forma que la oxidación del luminol da lugar a un compuesto que emite luz (**Fig. 30**). Para detectar la señal quimioluminiscente la membrana se expone a una película fotográfica, que se revela de forma manual con un compuesto revelador y otro fijador (Kodak). Finalmente, obtenida la impresión del marcaje en la película fotográfica, y tras la obtención de los resultados, en algunos casos se realiza un protocolo de borrado de la membrana o *stripping* para eliminar las uniones entre la membrana y el anticuerpo primario. De esta forma la membrana puede ser reutilizada e incubada con otro anticuerpo primario. Para llevar a cabo el *stripping*, la membrana se incuba durante 10 min a TA con una solución de glicina 0,1M a pH 2,5. A continuación se impregna con SDS al 1% (p/v) durante 10 min a TA y finalmente se lava con TTS-T, pudiendo reiniciar el protocolo normal de inmunodetección para otra proteína.

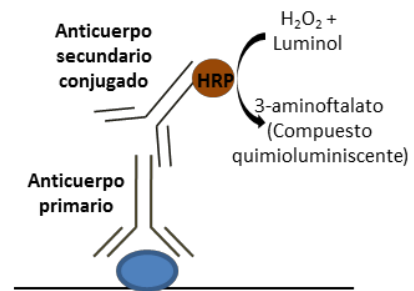


Figura 30: Esquema que muestra la detección inmunohistoquímica en membrana con el uso de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).

6.5. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN

Para obtener las imágenes de WB, las películas y/o las membranas se digitalizaron con un escáner Duoscan HiD (AGFA®) y los parámetros de la imagen se ajustaron usando Adobe® Photoshop CS5®.

Para conocer los valores relativos de las cantidades de proteínas presentes en las muestras se cuantifica la cantidad de píxeles de cada una de las bandas de proteínas y su intensidad media, usando el programa informático *ImageJ*. Los datos se normalizaron en función de la expresión de la proteína β -actina o GAPDH de cada muestra, usadas como control de carga. Finalmente, los datos se representan como porcentajes de variación respecto a la cantidad relativa de proteína en los animales control de uno de los estadios. Para determinar las posibles diferencias significativas en la cantidad de proteína entre retinas de ratones mutante y control se realizó un análisis estadístico usando el programa informático SPSS 20.0, y estableciendo el nivel de significación de la diferencia en: significativo si $*p < 0,05$ y altamente significativo si $**p < 0,01$. Se realizó el test paramétrico de la *t de Student* cuando los datos seguían una distribución normal, y el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* si no tenían distribución normal.

Anticuerpo primario	Casa comercial, número de catálogo	Dilución de uso		Procedencia
		Tejido	Cultivo	
α - β -catenina	BD Transduction Laboratories™, 610153	1:1000	1:500	Monoclonal de ratón
α - CRB3	GenScript	1:100	-	Policlonal de conejo
α - CRB3	Santa Cruz Biotechnologies®, sc, 27906	1:500	-	Policlonal de cabra
α - GFAP	Sigma-Aldrich®, G6171	1:1000	-	Monoclonal de ratón
α - GS	Millipore™, MAB302	1:1000	-	Monoclonal de ratón
α - MPP4	Genosphere Biotechnologies	1:2500	-	Policlonal de conejo
α - PALS1	Abnova, H00064398-A01	1:1000	-	Policlonal de ratón
α - Recoverina	Millipore™, AB5585	1:3000	-	Policlonal de conejo
α - SOX2	Abcam®, ab97959	1:1000	1:500	Policlonal de conejo
α - SYP	Sigma-Aldrich®, S5768	1:5000	-	Monoclonal de ratón

Tabla 7: Anticuerpos primarios para la realización de los WB, junto con su procedencia, dilución de uso y el tipo de secundario necesario para reconocerlo.

7. INMUNOPRECIPITACIÓN Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

La técnica de inmunoprecipitación (IP) se ha empleado para aislar proteínas específicas de la retina del ratón. Para aislar complejos proteicos, se ha usado la técnica de co-inmunoprecipitación (Co-IP).

El fundamento de ambas técnicas se basa en el uso de una proteína A o proteína G que presenta gran afinidad por la región constante de las inmunoglobulinas de los anticuerpos, de forma que establecen enlaces. Tras esa unión se incuban con un lisado proteico, en el que el anticuerpo reconoce específicamente a su antígeno, que es la proteína de interés. Finalmente se detecta ese antígeno mediante la técnica de WB (**Fig. 31**).

El protocolo seguido para las técnicas de IP y Co-IP fue similar y se detalla en los siguientes apartados.

7.1. UNIÓN “DYNABEADS PROTEIN A/G” - ANTICUERPO

Para realizar cualquiera de las dos técnicas usamos 50 μ l de “Dynabeads protein A” ó “Dynabeads protein G” (Life technologies™). Estas esferas o Dynabeads se encuentran fuertemente imantadas, de forma que usando un imán “DynaMag™-2 (Life technologies™) se aíslan fácilmente. Una vez aisladas se bloquean con una solución de TFS con BSA al 2% (p/v) y Tween-20 al 0,02% (v/v) en agitación durante 1 h a TA. Posteriormente, las esferas se aíslan con el imán y se desecha la solución de bloqueo.

Para la unión con las esferas se eligieron los anticuerpos anti-CRB3 y anti-PALS1. Para ello se diluyen 15 μ g del anticuerpo elegido en un medio con 200 μ l de TFS con 0,02% (v/v) de Tween-20 (TFS-Tween). Esta mezcla se incubaba con las esferas durante 12 h a 4°C y en agitación (**Fig. 31**). Seguidamente se realiza una técnica de *crosslinking* para las esferas unidas al anticuerpo. Mediante esta técnica se promueve la unión covalente del anticuerpo con la proteína A o G, evitando su disociación durante el procesamiento posterior, la elución del antígeno o proteína de interés. Así se evita que las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo unido a la proteína A o G contaminen la proteína eluida (**Fig. 31**). El protocolo para el *crosslinking* consta de los siguientes pasos:

- 1) Se aíslan las esferas unidas al anticuerpo, se desecha el sobrenadante y se lavan con TFS-Tween durante 5 min a TA y en agitación.
- 2) Las esferas unidas al anticuerpo se incuban dos veces en un tampón de conjugación, formado por una solución de TF 20mM y NaCl 0,15M con pH entre 7 y 9 durante 5 min y en agitación.
- 3) A continuación, las esferas unidas al anticuerpo se incuban en una solución compuesta por 5mM del reactivo BS³ (Thermo Scientific®) en el tampón de conjugación durante 40 min a TA y en agitación.
- 4) La reacción se para por la adición de 12,5 μ l del tampón Tris-HCl 1M pH 7,5 al medio anterior durante 15 min a TA y en agitación.

5) Finalmente se desecha el sobrenadante y las esferas unidas al anticuerpo se aíslan y se lavan 3 veces con TFS-Tween durante 5 min a TA y en agitación.

Al finalizar este proceso, las esferas unidas al anticuerpo están listas para su incubación con el lisado proteico.

7.2. PREPARACIÓN DEL LISADO PROTEICO

Para preparar el lisado proteico es importante destacar que, si las muestras que se pretenden usar en este proceso han sido previamente congeladas, las uniones entre las proteínas se pierden, y no son válidas para estudios de Co-IP. Por tanto, la extracción de proteínas destinadas para análisis de Co-IP tiene que llevarse a cabo en el mismo momento de desarrollo de la técnica.

Para el desarrollo de las técnicas de IP y Co-IP, la extracción y cuantificación de proteínas obtenidas de retinas de ratones control y mutante sigue un protocolo similar al detallado en el apartado 6.2 de esta sección; aunque en este caso, usamos un tampón de extracción diferente que permite una mejor preservación de las uniones proteicas. Este tampón está formado por 1% (v/v) de NP-40 (Nonidet™ P40 Substitute, Sigma-Aldrich®), NaCl 5M al 3% (v/v) y Tris-HCl 0,35M, todo ello disuelto en agua destilada a pH 8. Terminada la extracción, procedimos a su cuantificación.

7.3. INMUNOPRECIPITACIÓN

Las esferas unidas al anticuerpo se incuban con un lisado proteico que contiene entre 1000 y 1500 µg de proteínas en un volumen de 500 µl, durante 12 h a 4°C y en agitación (**Fig. 31**). Previamente a esta incubación se toma una muestra del lisado proteico, que se denomina “input 1” para su posterior análisis.

Tras el proceso de IP, el complejo formado por las esferas y el anticuerpo se une al antígeno correspondiente presente en el lisado de tejido. Seguidamente, este complejo se aísla del resto del lisado proteico al aplicar un imán que atrae a las esferas imantadas (**Fig. 31**). Los restos del lisado proteico sin esferas denominado “Input 2” se conserva para su análisis posterior.

A continuación, el complejo esferas–anticuerpo–antígeno se lavan tres veces por 5 min con TFS-Tween a TA y en agitación. Finalmente se procede a eluir el antígeno de interés. Para ello, se prepara tampón de carga 1X (en apartado 6.3 de material y métodos) que se añade al complejo final y a los input 1 y 2. Todas las muestras se calientan durante 10 min a 70°C, lo que permite al antígeno separarse de las esferas y del anticuerpo (**Fig. 31**).

Las muestras así preparadas se pueden analizar mediante electroforesis y WB.

7.4. ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN

El protocolo relativo a la electroforesis en gel de poliacrilamida, transferencia e inmunodetección es similar al detallado en los apartados 6.3 y 6.4 de material y métodos.

Con la técnica de IP únicamente se detecta la proteína eluída, usando para ello un anticuerpo que reconoce dicha proteína. Con la técnica de Co-IP se pretende revelar, además de ésta, las posibles proteínas con las cuales esta proteína pudiese interactuar.

Finalmente destacar que, como control negativo de la técnica de IP se emplean inmunoglobulinas de conejo que sustituyen al anticuerpo que se une a las esferas.

La **figura 31** resume los principales pasos del protocolo de IP.

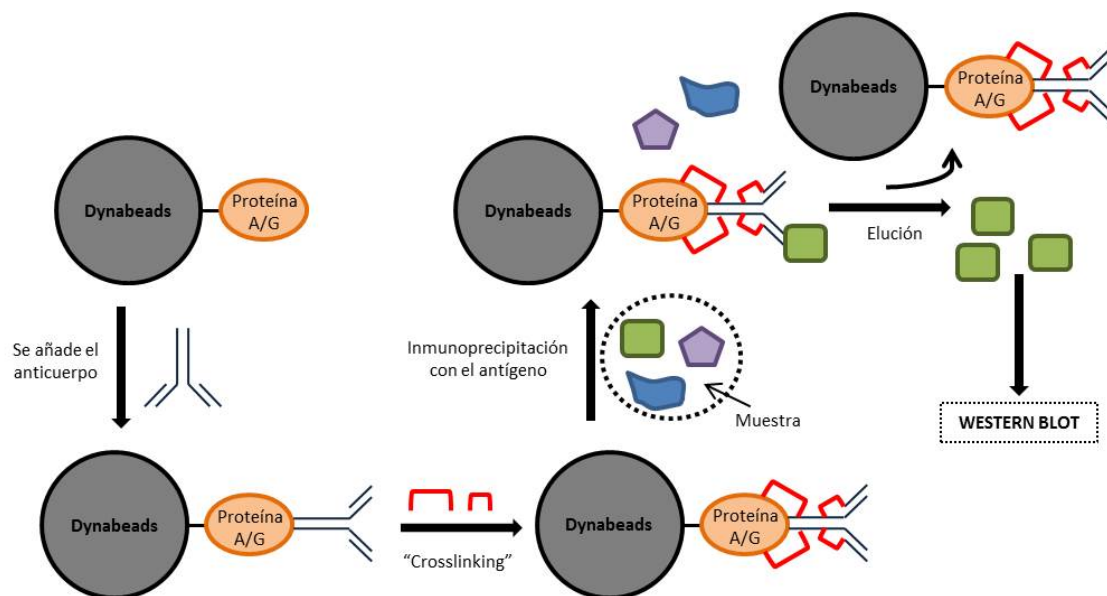


Figura 31: Resumen esquemático del protocolo para inmunoprecipitar proteínas usando "Dynabeads" conjugadas con proteína A o G. En el paso final, la proteína inmunoprecipitada se carga en un gel de poliacrilamida para su separación mediante electroforesis y su posterior detección en la membrana de nitrocelulosa.

8. ELECTORRETINOGRAMAS Y REGISTROS CELULARES

Para la realización de esta Tesis Doctoral hemos realizado electrorretinogramas (ERG) de campo completo y registros celulares mediante la técnica de *patch clamp*. Ambas técnicas se realizaron en colaboración con el Profesor Pedro de la Villa en el departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares.

8.1. ELECTORRETINOGRAMA DE CAMPO COMPLETO

Realizamos electroretinogramas de campo completo para conocer la actividad de la retina de ratones *Crb1^{rd8}* de edad P30.

Para llevar cabo esta técnica se requiere que la iluminación sea homogénea en toda la retina del animal donde se va a realizar el registro. Brevemente resumimos el protocolo efectuado. En primer lugar se realiza un periodo de adaptación a la oscuridad, para lo cual se mantiene al ratón en oscuridad absoluta durante un mínimo de 12 h. A continuación, el animal se anestesia mediante inyección intraperitoneal con una solución de ketamina (70 mg/kg) y xylazina (7 mg/kg) diluidos en solución salina, y posteriormente se introduce en una caja de Faraday (**Fig. 32**), lugar donde se realiza el registro. Dentro de la caja de Faraday se anulan los campos electromagnéticos externos, y el animal se mantiene a una temperatura constante de 37°C. A continuación se dilata la pupila del ratón aplicando 2 gotas de colirio de tropicamida al 1% en el ojo a registrar, y se administra tópicamente Methocel al 2% en cada ojo, para evitar la desecación de la córnea. Seguidamente se procede a la colocación de los electrodos de registro: el electrodo de tierra, sobre la cola del animal, el electrodo de referencia, en la boca del ratón y el electrodo corneal, dispuesto en el eje visual a una distancia aproximada



Figura 32: Caja de Faraday

de 5 mm de la córnea. Una vez colocados los tres electrodos, y con el animal en absoluta oscuridad, se comienza al registro de las respuestas electroretinográficas, para lo cual se aplicaron diferentes protocolos. Es importante destacar que las tareas de anestesia, instilación ocular y disposición de los electrodos se realizan bajo una iluminación monocromática roja tenue.

Los protocolos aplicados para medir la respuesta retiniana de los ratones *Crb1^{rd8}* fueron:

- ✓ **Respuesta escotópica mixta:** para medir la respuesta combinada de conos y bastones en condiciones escotópicas (en oscuridad). Se aplica un estímulo de 5 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta de la retina. Los estímulos se realizaron en intervalos de 30 s.
- ✓ **Potenciales oscilatorios:** registran la actividad que generan la vía de los bastones y la vía de los conos. Como en el caso anterior se aplica un estímulo de 5 ms midiendo la respuesta retiniana durante 500 ms. El intervalo entre estímulos fue de 15 s.
- ✓ **Respuesta de conos:** a diferencia de los protocolos anteriores, ahora se mantiene al animal en condiciones fototópicas, es decir, se expone al ratón a una iluminación basal

que permita adaptar su retina a la luz. Para el registro se aplican estímulos de 5 ms de duración, y la respuesta se mide durante 500 ms. El intervalo entre estímulos fue de 1 s, y se mantuvo al ratón con la iluminación basal.

- ✓ **Flicker:** miden la respuesta de la retina interna en relación a la actividad de los conos. Se registra aplicando estímulos de 5 ms de duración cada 50 ms de forma continuada. Cada ciclo de ciclo de estimulación duró 1,2 s con un intervalo entre uno y otro de 1s.

Los datos obtenidos a partir de cada protocolo de estimulación se compararon cualitativamente con datos de ERG de campo lleno estándar (Lam, 2005).

8.2. PATCH-CLAMP

Llevamos a cabo registros celulares, usando la técnica de *patch clamp*, para estudiar las propiedades electrofisiológicas de las células de Müller en cultivo de ratones control y mutante *Crb1^{rd8}*.

Para poder realizar estos registros resembramos las células de Müller a DIC 15 a baja densidad sobre placas Petri con fondo de cristal, permitiendo su crecimiento y proliferación hasta el DIC 21, cuando se realizaron los registros. Para ello es preciso que las células estén bañadas en un líquido extracelular que mantenga las óptimas condiciones fisiológicas, medio denominado BSA+ (**Tabla 8**). Así pues, se sustituye el medio de cultivo DMEM+FBS+Ab por el medio BSA+.

Medio extracelular BSA ⁺		Medio intracelular	
Compuesto	Concentraciones	Compuesto	Concentraciones
NaCl	135 mM	K-Gluconato	-
KCl	5 mM	KCl	110 mM
MgCl ₂	1 mM	NaCl	5 mM
CaCl ₂	2 mM	CaCl ₂	0,5 mM
CoCl ₂	-	Glucosa	-
Glucosa	10 mM	EGTA	5 mM
HEPES	10 mM	MgCl ₂	10 mM
Rojo de Fenol	0,001%	HEPES	10 mM
BSA	0,001%	Rojo de Fenol	0,001%
pH	7,4	pH	7,2

Tabla 8: Soluciones extracelulares e intracelulares empleadas para llevar a cabo los registros celulares por “patch-clamp”. El pH de ambos medios se ajustó usando soluciones que basifican o acidifican.

A continuación se coloca la placa Petri en un microscopio invertido con óptica de contraste de fases (Nikon, TMD) introduciendo en la placa un anillo de acero para reducir el

volumen del medio a aproximadamente 0,15 ml. Este medio es continuamente renovado al perfundir las células con un flujo de 0,6 ml/min con solución externa de BSA+.

Las corrientes de membrana son registradas por una micropipeta de vidrio (omega-dot, 1.2 mm o.d.; CED, Harvard apparatus) en configuración de célula entera (Hamill et al., 1981) (**Fig. 33**). La micropipeta se prepara con un estirador de pipetas PN83 (Narishige Scientific Instruments), y se rellena con una solución semejante al líquido intracelular, basada en cloruro de potasio (**Tabla 8**). Para cada registro celular se usó una micropipeta diferente. El diámetro



Figura 33: Imagen de una célula de Müller en cultivo pinzada en configuración de célula-entera, para su registro por "patch-clamp".

interno de la punta de la micropipeta es de aproximadamente 1 μm , y está conectada a un convertidor de corriente-voltaje (Axoclamp 200A, Axon Instruments). El electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl) se conecta mediante un puente de agarosa al baño. La resolución de tiempo y voltaje del pulso generador fue de 0.5 ms y 1mV. La frecuencia de muestreo se ajustó al valor necesario, dependiendo del tipo de análisis a realizar (0.2-20 ms). Los datos fueron analizados posteriormente por un ordenador con un programa fabricado en el laboratorio del Prof. Pedro de la Villa (Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá de

Henares, Madrid), basado en el software de adquisición de datos Lab-View (Data Acquisition Driver Software, National Instruments).

Para llevar a cabo el *patch clamp* es necesario tener un "ruido eléctrico" bajo. Esto se consigue al acercar la punta de la micropipeta de registro a la superficie de la membrana plasmática de la célula y aplicar una presión negativa que permite establecer el denominado gigasello y la disminución del ruido eléctrico. Una vez obtenida la configuración de registro en célula entera, que como mencionamos anteriormente fue la usada en el presente estudio, se procedió al registro de las corrientes iónicas. La resistencia de la membrana y la corriente de fuga fueron estimadas aplicando pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de 10mV desde el potencial fijado a -40mV.

9. TRANSFECCIONES CELULARES

Esta técnica se ha realizado para probar la capacidad de las retinas *in vivo* y de las células de Müller *in vitro* de ser transfectadas con el agente comercial Chariot®. El objetivo de esta transfección es poder diseñar en el futuro una terapia que consiga restaurar la proteína dañada en el ratón mutante.

9.1. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO USANDO EL MÉTODO CHARIOT

El medio de transfección está compuesto por una dilución de Pep-1 (Active Motif®), que es el agente de transfección, al 4% (v/v) en agua doblemente destilada. Por otro lado se diluye la proteína a transfectar, que en este caso es la β -galactosidasa (Active Motif®), al 8% (v/v) en TFS. Ambas soluciones se mezclan en una proporción 1:1 y se incuban juntas durante 30 min a TA. Posteriormente se procede a la transfección proteica con este compuesto:

- 1) Las células de Müller en cultivo se disponen en placas de 35 mm. Primero se retira el medio DMEM+FBS+Ab de las placas, y se sustituye por medio fresco DMEM sin suero.
- 2) Se retira el medio DMEM y se añaden 100 μ l del complejo Pep-1+ β -galactosidasa preparado anteriormente y 200 μ l de medio DMEM libre de suero, incubando durante 60 min. A continuación se añaden a la placa 200 μ l de DMEM+FCS+Ab y se incuba durante 3 h más. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y 5% de CO₂.
- 3) Tras retirar el medio, se efectúan 3 lavados de un min cada uno con TFS a TA.
- 4) Finalmente las células se fijan siguiendo el protocolo que detallamos en el apartado 9.3 de esta misma sección.

9.2. TRANSFECCIÓN DE RETINAS *IN VIVO* USANDO EL AGENTE CHARIOT®

El medio para realizar la transfección está compuesto en este caso por una solución que contiene Pep-1 (Active Motif®) al 20% (v/v) en agua doblemente destilada y β -galactosidasa (Active Motif®) al 40% (v/v) en TFS. Ambos medios se mezclan en proporción 1:1 y se incuban durante 30 min a TA.

La transfección de retinas *in vivo* se realiza usando dos tipos de aproximación: inyecciones subretinales e inyecciones intravitreales. El aprendizaje de ambas técnicas se realizó en el laboratorio de la Dra. Maria–Thereza Perez en el Departamento de Oftalmología de la Universidad de Lund (Suecia), durante una estancia predoctoral de tres meses de duración.

Para ambos tipos de aproximación se utilizaron animales de edad P30, y la inyección siempre se realiza en uno de los dos ojos del ratón. En primer lugar los animales se anestesian con una inyección intraperitoneal de Rompun 10x (Bayer®) diluido 10 veces en 1 ml de NaCl al 0,09%. A los 2 min, se les vuelve a inyectar con 40 μ l de ketamina (Pfizer®) mezclada con 60 μ l de NaCl al 0,09%. El efecto de la anestesia se comprueba con la pérdida del reflejo parpebral.

Para llevar a cabo las inyecciones se expone el globo ocular al desplazarlo levemente de la órbita, evitando dañar el nervio óptico. Para impedir que el globo ocular se mueva durante el procedimiento, se pasa un hilo de sutura a través de la zona nasal del párpado, quedando así el

ojo fijo. Posteriormente, se perfora el limbo del globo ocular (límite entre la escleroides y córnea) en un solo punto con una aguja. A continuación realizamos la inyección, teniendo en cuenta si ésta es intravitreal o subretinal. En ambos casos recogemos con una pipeta Hamilton 0,5 μ l del medio de transfección, que corresponde con el volumen a inyectar. En función del tipo de inyección, se procede de forma diferente:

- ✓ Intravitreal: se introduce la punta de la pipeta Hamilton por el agujero realizado en el limbo y el medio de transfección se libera en la cavidad vítrea del ojo.
- ✓ Subretinal: la punta de la pipeta Hamilton se introduce por el agujero del limbo. Una vez en la cavidad vítrea, se gira la punta de forma que atraviese la retina y alcance el espacio subretinal, donde el medio de transfección es liberado.

Tras la inyección se quita el hilo de sutura del párpado del ratón, permitiendo que el globo ocular vuelva dentro de la órbita. Se espera a que el ratón despierte de la anestesia.

Para evaluar la eficacia de ambas inyecciones se estudiaron 2 tiempos de supervivencia: 3 y 5 h después de la transfección. Pasado ese tiempo se sacrifican los animales de experimentación, y el globo ocular se fija y procesa según el protocolo descrito en las secciones 5.1. y 9.3.

9.3. HISTOQUÍMICA

La técnica histoquímica permite detectar la actividad funcional de las enzimas. En el presente estudio hemos realizado esta técnica para analizar la actividad de la enzima β -galactosidasa, usada como control de la transfección celular. De esta forma comprobamos si se ha introducido de forma correcta y funcional, tanto en las células en cultivo como en la retina.

En primer lugar fijamos las células en cultivo tratadas, así como los globos oculares de los animales inyectados. Para ello usamos una solución "Fixing Solution", proporcionada por el " β -galactosidase staining kit" (Active Motif®), diluida diez veces en agua destilada. Las células en cultivo se fijan durante 10 min a TA; los globos oculares durante 2 h también a TA. En ambos casos, tras la fijación, se efectúan tres lavados de 15 min con TFS y en el caso de los globos oculares, éstos son procesados como se ha descrito en el apartado 5.1 de esta sección.

A continuación, tanto las células en cultivo como las secciones de tejido se incuban con una solución que permite detectar la actividad de la enzima β -galactosidasa usando el " β -galactosidase staining kit" (Active Motif®). Ese medio está formado por el 1% de cada una de las tres soluciones de tinción y el 5% de X-gal en TFS. La incubación se realiza durante 2 h a 37°C. Finalmente, se realizan tres lavados con TFS y se coloca un cubreobjetos con el medio de montaje Entellan® (Merck).

Las imágenes correspondientes se obtuvieron con el microscopio Olympus PROVIS AX70 a través del programa informático Micro CDD. Los niveles de brillo y contraste se ajustan con el programa informático Adobe® Photoshop CS5®.

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La técnica de microscopia electrónica de transmisión se ha empleado para analizar específicamente las uniones adherentes que conforman la MLE del ratón mutante *Crb1^{rd8}*.

10.1. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los ratones control y mutante *Crb1^{rd8}* de edades P7 y P30, tras anestésarlos, se sacrifican por dislocación cervical. Se extraen los globos oculares y se fijan por inmersión en una solución con PFA al 2% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en 0,1M tampón cacodilato (TC) a pH 7,4 durante 12 h a 4°C. A continuación, los globos oculares se lavan en TC para eliminar los restos de fijador y con ayuda de unas pinzas y tijeras se corta la córnea y se extrae el cristalino.

Estas muestras se postfijan con una solución de tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% (v/v) y ferricianuro potásico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) al 1% (v/v) en agua destilada, durante 2 h a 4°C en agitación y en oscuridad. A continuación se lavan abundantemente con agua destilada y se procede a la inclusión del tejido en resinas plásticas.

10.2. INCLUSIÓN

En primer lugar, las muestras son deshidratadas con gradaciones ascendentes de etanol: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y dos baños de 100%, durante 10 min en cada uno a 4°C y en agitación. Posteriormente se termina de deshidratar el tejido con óxido de propileno mediante tres baños de 10 min cada uno a 4°C y en agitación.

Tras la deshidratación se procede a la infiltración del tejido en resina Epon (Embed 812: 20 ml Epon 812, 16 ml DDSA, 8 ml MNA, 0,66 ml DMP-30). Previa a esta infiltración, y para facilitar una mejor penetración de la resina en el tejido, éste se somete a diferentes mezclas de óxido de propileno con resina. Todos estos baños se realizan a TA y en agitación en el orden:

- 1) Óxido de propileno:Epon 3:1 durante 1 h.
- 2) Óxido de propileno:Epon 1:1 durante 12 h.
- 3) Óxido de propileno:Epon 1:3 durante 1 h.
- 4) Dos veces en Epon, 1 h cada una.

Finalmente procedimos a la inclusión definitiva en resina Epon, al colocar el tejido en la orientación deseada en moldes planos, permitiendo la polimerización de la resina en estufa durante 12 h a 60°C.

10.3. PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES

A partir de los bloques obtenidos realizamos cortes semifinos de 1 μm de grosor, y ultrafinos de entre 50-80 nm de grosor, usando un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung). Los cortes semifinos se recogen de forma seriada en portas objetos gelatinizados y, se tiñen con Azul de Toluidina (0,5% de tetraborato sódico (v/v) en agua destilada).

La visualización de los cortes semifinos a microscopía óptica permite localizar la zona de la retina a analizar a nivel de microscopía electrónica. A continuación, el bloque se retalla para delimitar la zona elegida y poder realizar las secciones ultrafinas consecutivas. Los cortes ultrafinos se recogen en rejillas de ojal de cobre (Electron Microscopy Science) recubiertas con una película de 0,5% (v/v) de colodión en amil acetato. Seguidamente, las rejillas se contrastan, en primer lugar con acetato de uranilo (2% acetato de uranilo (v/v) en etanol al 50%) durante 15 min en oscuridad a TA, y posteriormente con citrato de plomo (Merck) durante 10 min a TA en una atmósfera sin CO_2 , para evitar precipitado del plomo. Finalmente, las secciones se lavan abundantemente con agua destilada, y se dejan secar para poder observarlas al microscopio electrónico.

10.4. OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES

Las secciones semifinas se visualizaron utilizando un microscopio Olympus PROVIS AX70, y las imágenes fueron capturadas con el programa informático *Micro CCD*. Las rejillas con las secciones ultrafinas se observaron con un microscopio electrónico ZEISS-EM 900 acoplado a una cámara TRS (*Slow Scan CCD*), y las imágenes se obtuvieron con el programa informático *ImageSP Viewer*. Finalmente, todas las imágenes fueron tratadas con el programa informático Adobe® Photoshop CS5®.

Anticuerpo primario o marcador	Casa comercial, referencia	Dilución de uso		Procedencia
		Tejido	Cultivo	
α - AT	Sigma-Aldrich®, T7451	1:2500	-	Monoclonal de ratón
α - Bassoon	Stressgen®, VAM-PS003	1:5000	-	Monoclonal de ratón
α - β -catenina	BD Transduction Laboratories™, 610153	1:500	1:250	Monoclonal de ratón
α - CB	Swant®, CB-38a	1:2000	-	Policlonal de conejo
α - CD44	BD Pharmingen™, 550538	-	1:500	Monoclonal de rata
α - CR	Swant®, 7699/3H	1:10000	-	Policlonal de conejo
α - CRALBP	Abcam®, ab15051	1:500	-	Monoclonal de ratón
α - CRB1	Genosphere Biotechnologies	1:50	-	Policlonal de conejo
α - CRB3	GenScript	1:100	-	Policlonal de conejo
α - CRB3	Santa Cruz Biotechnologies®, sc, 27906	1:500	-	Policlonal de cabra
α - GABA	Sigma-Aldrich®, A2052	1:1000	-	Policlonal de conejo
α - GAD 65/67	Millipore™, AB1511	1:100	-	Policlonal de conejo
α - GFAP	Sigma-Aldrich®, G6171	1:500	1:500	Monoclonal de ratón
α - Giantin	Abcam®, ab24586	1:1500	-	Policlonal de conejo
α - GLAST	Lifespan Biosciences, LS-C94136	1:500	1:100	Policlonal de conejo
α - GNB3	Sigma-Aldrich®, HPA005645	1:50	-	Policlonal de conejo
α - GS	Millipore™, MAB302	1:500	-	Monoclonal de ratón
Isolectina B4	Vector Laboratories, FL-1201	1:80	-	-
α - Ki67	Abcam®, ab15580	-	1:1000	Policlonal de conejo
α - Kir 4.1	Alomone Labs, APC-035	1:400	-	Policlonal de conejo
α - MPP4	Genosphere Biotechnologies	1:1000	-	Policlonal de conejo
α - Opsina (M)	Millipore™, AB5405	1:2000	-	Policlonal de conejo
α - Opsina (S)	Millipore™, AB5407	1:1000	-	Policlonal de conejo
α - PALS1	Abnova, H00064398-A01	1:250	-	Policlonal de ratón
α - PKC α	Sigma-Aldrich®, P4334	1:5000	-	Policlonal de conejo
PNA	Sigma-Aldrich®, L7381	1:500	-	-
α - Recoverina	Millipore™, AB5585	1:2000	-	Policlonal de conejo
α - Rodopsina	Abcam®, ab5417	1:1000	-	Monoclonal de ratón
α - SOX2	Abcam®, ab97959	1:1000	1:500	Policlonal de conejo
α - SYP	Sigma-Aldrich®, S5768	1:5000	-	Monoclonal de ratón
α - TH	Jacques Roy Institute	1:5000	-	Policlonal de conejo
α - VGLUT1	Synaptic Systems, 135302	1:500	-	Policlonal de conejo
α - Vimentina	Sigma-Aldrich®, V6630	-	1:100	Monoclonal de ratón

Tabla 4: Anticuerpos primarios o marcadores usados en el presente estudio junto con su procedencia, dilución de uso y tipo de secundario necesario para reconocerlo.

Resultados

1. LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

En esta sección analizamos cómo la mutación en el gen que codifica para la proteína CRB1 afecta a algunos miembros del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB y al fenotipo de algunos tipos celulares de la retina, principalmente a fotorreceptores y células de Müller. Entre otras modificaciones observadas, es notoria la temprana pérdida de organización de la MLE, lo que conduce a alteraciones ya conocidas en éste y otros tipos de degeneraciones retinianas, como son la formación de rosetas de fotorreceptores.

1.1. LA MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA EN LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Para comenzar a analizar las alteraciones morfológicas de la retina del ratón *Crb1^{rd8}* estudiamos en primer lugar la estructura de la MLE, que como hemos mencionado con anterioridad y analizaremos posteriormente, es el estrato donde se encuentra la proteína CRB1 en la retina. Para ello llevamos a cabo un análisis de la ultraestructura de la MLE eligiendo dos estadios diferentes:

- ✓ P7: edad anterior a los estudios realizados por otros autores utilizando este modelo, que es P15 (Mehalow et al., 2003), debido a que estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio apuntan a cambios estructurales en este estadio.
- ✓ P30: estadio en el que se ha demostrado que se pierden muchas de las uniones adherentes que conforman la MLE en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* (Mehalow et al., 2003).

En las retinas de los animales silvestres de edad P7, los cortes semifinos muestran que la laminación de la retina ha concluido, aunque aún prosiga la maduración de diversos tipos celulares, entre ellos, los fotorreceptores (**Fig. 34A, A'**). Al analizar las áreas más esclerales, se aprecia que la MLE forma una línea continua (**Fig. 34B**). La retina de los ratones *Crb1^{rd8}* también está laminada a P7 (**Fig. 34C, C'**); sin embargo, se observan una serie de invaginaciones de la capas más esclerales, a nivel de los fotorreceptores en formación. Identificamos esas modificaciones como rosetas en desarrollo que se sitúan en las zonas ventro-nasales de la retina (**Fig. 34C, C'**), áreas donde está descrito que es más evidente la degeneración en este modelo mutante a estadios posteriores (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003). Además, la MLE en la retina *Crb1^{rd8}* pierde su continuidad en algunos puntos, y en esas zonas, los núcleos de los fotorreceptores aparecen desplazados hacia el espacio subretinal (**Fig. 34D**). En otras áreas de la retina mutante, la MLE aparece totalmente continua, y sin fragmentar (**Fig. 34E**).

También es importante destacar que la afectación de la MLE en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* en el estadio de P7 no es única, y otros estratos retinianos también se encuentran modificados

Resultados

en las áreas que presentan mayor degeneración. Entre estas capas destacan la CNE y la CPE (**Fig. 34C, C'**). En comparación con la retina control, la CNE de la retina mutante presenta algunas rosetas de fotorreceptores, mientras que la CPE pierde la continuidad observada en los animales control (**Fig. 34A', C'**). En apartados posteriores haremos un estudio de cada una de estas dos capas en retinas *Crb1^{rd8}*, usando marcadores específicos para ellas.

Mediante microscopía electrónica hemos analizado la ultraestructura de la MLE de las retinas control y mutante en estadios de P7. En la retina silvestre, las uniones adherentes que forman la MLE y que permiten la unión de las células de Müller con los fotorreceptores se aprecian como densificaciones en la cara citosólica de la membrana plasmática de estas células (**Fig. 34F**). En la MLE, los procesos de las células de Müller se intercalan entre los segmentos de los fotorreceptores, donde se encuentran muchas mitocondrias y se pueden apreciar algunos de los cilios de conexión en formación (**Fig. 34F**). Las uniones adherentes de la MLE de las retinas mutantes también se observan como estructuras densas a los electrones (**Fig. 34G**); sin embargo, a diferencia de las retinas control, algunas de esas uniones se pierden, y en los puntos donde la unión desaparece, los núcleos de los fotorreceptores se desplazan hacia el espacio subretinal (**Fig. 34G**). Además, la microscopía electrónica desvela que los SI de los fotorreceptores de las retinas mutantes parecen ser más cortos que los de la retina control (**Fig. 34G**). A pesar de que algunas uniones adherentes de la retina mutante se pierden en el estadio de P7, éstas se mantienen en muchas zonas, incluso en áreas donde la MLE se ha invaginado y se desarrollan rosetas de fotorreceptores (**Fig. 34H**).

Las retinas *Crb1^{rd8}* de 30 días de edad presentan en su estructura varias rosetas de fotorreceptores, algunas de ellas bastante desarrolladas (**Fig. 35A-A'**). En este estadio es muy frecuente encontrar zonas donde la MLE pierde su continuidad, tanto en rosetas de fotorreceptores (**Fig. 35B**) como en otras áreas de degeneración (**Fig. 35C**). Esto provoca el desplazamiento de los núcleos de los fotorreceptores hacia el espacio subretinal al igual que ocurre en P7 (**Fig. 35B-C**). Además, se aprecian algunos núcleos apoptóticos de fotorreceptores localizados a diferentes niveles dentro de la CNE (**Fig. 35B-C**). En relación a la CNE y a la CPE también se observan modificaciones en la estructura de ambas capas, al igual que hemos apreciado en el estadio anterior (**Fig. 35A'**).

El análisis ultraestructural de la retina *Crb1^{rd8}* a P30 revela que existen zonas de la MLE donde hay uniones adherentes que se mantienen, mientras que otras han desaparecido (**Fig. 35D**). En las rosetas de los fotorreceptores, muchas de las uniones adherentes parecen haber perdido gran cantidad de proteínas, ya que en estas zonas de unión no se aprecia una abundante densidad a los electrones, como ocurre en retinas control o en zonas sin degeneración (**Fig. 35E**). Por otro lado, existen áreas de la retina mutante, generalmente fuera

de las zonas con rosetas, donde las uniones adherentes permanecen perfectamente estructuradas (**Fig. 35F**). Si comparamos áreas en degeneración con zonas aparentemente normales se observa la diferencia en las uniones adherentes: en las rosetas de fotorreceptores esas uniones presentan una densidad a los electrones mucho menor que la observada en áreas normales, lo que evidencia la degeneración de la MLE a ese nivel (**Fig. 35E-F**).

1.2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CRB1 Y LAS PROTEÍNAS MAGUK

Como detallamos en la introducción de esta Tesis Doctoral, el ratón *Crb1^{rd8}* sintetiza una proteína CRB1 truncada. Así pues, en este apartado de los resultados analizamos la localización inmunohistoquímica de la proteína CRB1 expresada por las retinas de estos ratones de forma residual, y cómo esta alteración afecta a la expresión y localización de otras proteínas, en concreto dos de los miembros de la familia MAGUK, MPP4 y PALS1. Para ello elegimos dos estadios, P7, edad a la que como hemos analizado encontramos las primeras modificaciones en la MLE de la retina del ratón *Crb1^{rd8}* y P90, estadio en el que se manifiestan las modificaciones más importantes en otros modelos de degeneración generados a partir de mutaciones en *Crb1* (van de Pavert et al., 2004)

1.2.1. LA PROTEÍNA RESIDUAL CRB1 EN LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Mediante el uso de diferentes anticuerpos se ha localizado la proteína CRB1 a nivel de la RSA de la MLE (Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002; van de Pavert et al., 2004). Nuestro grupo ha diseñado un nuevo anticuerpo anti-CRB1 específico para la detección de la proteína en tejido murino. La secuencia peptídica seleccionada se envió a Genosphere Biotechnologies, empresa que generó el anticuerpo.

La técnica de inmunofluorescencia para detectar CRB1 en retinas de ratón adulto control muestra que el anticuerpo diseñado por nuestro grupo de trabajo también localiza la proteína a nivel de la MLE, situándose de forma continua a lo largo de todo ese estrato (**Fig. 36A, E, G**). Para comprobar la especificidad del marcaje llevamos a cabo un ensayo de competitividad en el cual toda la tinción para CRB1 desaparece de la MLE. No obstante permanece una leve tinción de fondo a nivel de la CPE, que consideramos marcaje inespecífico (**Fig. 36B**). La mutación que posee el ratón *Crb1^{rd8}* permite que se sintetice una proteína CRB1truncada, que nuestro anticuerpo localiza en la MLE, aunque el marcaje se presenta de forma parcheada, ya que su expresión se pierde en muchas regiones de esta capa (**Fig. 36C, F, H**) Además, hacia el interior de las rosetas de fotorreceptores que ya se han formado en la retina adulta, se observa marcaje para la proteína CRB1 en la zona en la que se debería ubicar la MLE. En esta tinción también se observan espacios sin marcaje, que aparecen como consecuencia de la

Resultados

pérdida de la proteína (**Fig. 36C**). Finalmente, apreciamos marcaje para CRB1 en algunos de los procesos celulares que cruzan las capas más internas de la retina, y que alcanzan la CPE (**Fig. 36C**). Dobles tinciones para CRB1 y la proteína GFAP, cuyo papel durante la degeneración de las retinas de los ratones *Crb1^{rd8}* se detalla en el apartado 1.5. de estos resultados, indican que ambas proteínas colocalizan en muchas de estas prolongaciones, señalando que podrían pertenecer a células de Müller reactivas (**Fig. 36C**). En el ensayo de competitividad efectuado en la retina del ratón mutante adulto, desaparece el marcaje a nivel de la MLE y de los procesos de las células de Müller, mostrando la especificidad del anticuerpo anti-CRB1 (**Fig. 36D**).

Para determinar la región de la MLE donde se sitúa CRB1, llevamos a cabo dobles tinciones para CRB1 y β -catenina, que se localiza en las uniones adherentes de la retina y por tanto está presente en la MLE, y con PALS1, que se sitúa en la RSA de la MLE. Así, en retinas control y mutante de ratones adultos, el marcaje para CRB1 se localiza de forma precisa en la RSA de la MLE, es decir, de forma apical a las uniones adherentes inmunorreactivas para β -catenina (**Fig. 36E-F**). En las retinas silvestres, este marcaje es similar a lo largo de toda la MLE (**Fig. 36E**). En las regiones donde desaparece la tinción para CRB1 en la retina de los ratones mutantes, también se produce la pérdida del marcaje para β -catenina en las uniones adherentes subyacentes (**Fig. 36F**). La doble IHQ PALS1/CRB1 muestra que ambas proteínas colocalizan totalmente en la RSA de la MLE, tanto en retinas control como en mutantes (**Fig. 36G-H**). En la retina silvestre, la colocalización es continua a lo largo de todo el estrato (**Fig. 36G**). Sin embargo, y de forma similar a lo descrito para la proteína β -catenina, en las áreas de la RSA de la retina del ratón mutante donde se pierde la tinción para CRB1, también desaparece el marcaje para PALS1 (**Fig. 36H**). Finalmente destacar que en la RSA del ratón mutante, parece haber zonas donde permanece una tinción residual y poco definida para CRB1 en las que no se observa tinción para PALS1 y viceversa (**Fig. 36H**).

1.2.2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MAGUK: PALS1 Y MPP4

En el apartado 6.4. de la introducción de esta Tesis Doctoral hemos expuesto que diferentes proteínas de la familia MAGUK forman parte del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB. De todas ellas, PALS1 parece clave, ya que su defecto o modificación provoca la pérdida de la distribución del complejo en la RSA de la retina del ratón (Cho et al., 2012; Park et al., 2011; van Rossum et al., 2006). Además, PALS1 puede interactuar y reclutar a otras proteínas MAGUK a la RSA, como a MPP4 (Kantardzhieva et al., 2005). En este apartado describimos lo que sucede en la situación contraria, en la que la proteína modificada

es CRB1, analizando la alteración que experimentan las proteínas PALS1 y MPP4 en la retina del ratón *Crb1^{rd8}*.

1.2.2.1. INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A PALS1

PALS1 se localiza a nivel de la RSA de la MLE en los dos estadios analizados, P7 y P90, y se observan claras diferencias entre las retinas de los ratones mutantes y control (**Fig. 37A-J**).

En el estadio de P7 se aprecia un marcaje exclusivo para PALS1 en la zona donde se dispone la MLE (**Fig. 37A-C**). En la retina control y en las áreas de la retina mutante donde aún no ha comenzado la degeneración de la MLE, la tinción indica que PALS1 se dispone a lo largo de todo ese estrato (**Fig. 37A-B**). Sin embargo, en las regiones de la retina del ratón mutante donde comienzan a intuirse las rosetas de fotorreceptores en este estadio, el marcaje para PALS1 aparece parcheado (**Fig. 37C**).

El marcaje de PALS1 en ratones adultos revela importantes alteraciones en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* en comparación con la retina control (**Fig. 37D-J**). En la MLE del ratón silvestre se observa un intenso marcaje que forma una línea continua a lo largo de toda esta capa (**Fig. 37D, G**). Por el contrario, en las retinas mutantes, la inmunofluorescencia frente a PALS1 revela una menor intensidad del marcaje en la MLE (**Fig. 37E-F**) y además existen zonas donde la tinción se pierde, apreciándose un marcaje parcheado (**Fig. 37E-F, H-J**). Esta pérdida de inmunorreactividad es más notoria en las zonas donde la MLE se invagina hacia capas más profundas de la retina como consecuencia de la formación de rosetas de fotorreceptores (**Fig. 37F, I**), e incluso en algunos casos, la tinción desaparece totalmente (**Fig. 37F**). Además, como se observa en la figura **36H** y adelantamos en el apartado anterior, la pérdida de señal para PALS1, suele coincidir con la ausencia de CRB1. Por otro lado, apreciamos también que en algunas de las rosetas de fotorreceptores que ya están totalmente desarrolladas en este estadio, el marcaje para PALS1 permanece en el interior de la misma, en el lugar donde debería estar ubicada la MLE aberrante (**Fig. 37J**). No obstante, la presencia de PALS1 en esas rosetas no es frecuente, ya que en otras la tinción para la proteína está disminuida (**Fig. 37F**).

Finalmente señalar que en las retinas del ratón *Crb1^{rd8}* adulto, y a diferencia de lo que ocurre en retinas control, la localización de PALS1 no parece exclusiva de la MLE. Así, observamos un marcaje tenue para esta proteína en algunas áreas de las porciones más vitreales de la CPE (**Fig. 37E**).

Una vez hemos detectado las diferencias en la distribución de PALS1 entre las retinas de ratones mutantes y control, analizamos la posibilidad de que también existan variaciones en la cantidad de proteína. Para ello llevamos a cabo análisis de WB a los estadios de P7 y P90, en retinas de ratón control y mutante (**Fig. 37K**). Con esta técnica se detecta una sola banda

Resultados

proteica equivalente a 77 kDa en todas las edades y genotipos analizados (**Fig. 37K**). Hemos cuantificado los niveles proteicos de cada experimento por separado ($n=6$), y hemos realizado el test paramétrico de la *t de student* para comparar los valores obtenidos. Así, en el estadio de P7 existe una mayor cantidad relativa de PALS1 en la retina del ratón mutante con respecto al control, si bien, esa diferencia no es significativa ($p>0,05$) (**Fig. 37K-L**). Sin embargo, en el estadio de P90 las retinas control presentan una cantidad de PALS1 superior a lo observado en el ratón *Crb1^{rd8}* adulto (**Fig. 37K**), siendo esa diferencia estadísticamente significativa ($*p<0,05$) (**Fig. 37L**). Si analizamos la variación en los niveles de la proteína entre los dos estadios analizados, se aprecia que en los ratones silvestres la cantidad relativa de PALS1 es 1,31 veces superior en P90 respecto a P7 (**Fig. 37M**). Por el contrario, esta ganancia de proteína no ocurre en los ratones mutantes. En ellos, los niveles de proteína a P90 son inferiores a los cuantificados a P7, de forma que la relación en la cantidad relativa de PALS1 entre ambas edades es inferior a la unidad (0,66). Este último resultado indica una pérdida evidente en la expresión de PALS1 con el transcurso de la degeneración (**Fig. 37M**).

1.2.2.2. INMUNORREACTIVIDAD PARA MPP4

Para estudiar la localización y los niveles de MPP4, nuestro grupo de trabajo diseñó un anticuerpo específico para la detección de esta proteína en la retina del ratón. La secuencia elegida fue enviada a la empresa Genosphere Biotechnologies, que generó los anticuerpos.

Una vez recibido el anticuerpo anti-MPP4 sintetizado, comprobamos la especificidad del mismo mediante su análisis por WB. En retinas de ratón adulto detectamos una banda para la proteína a una altura equivalente a unos 72 kDa (**Fig. 38A**), que es el peso molecular predicho para MPP4 de ratón (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6P7F1>). Esta banda desaparece al realizar un ensayo de competitividad sobre la membrana, demostrando la especificidad del anticuerpo generado (**Fig. 38A**).

Para analizar la localización y niveles de MPP4 en la retina del ratón realizamos estudios de inmunofluorescencia y WB. A la edad de P7 se ha demostrado que la expresión del gen *Mpp4* en la retina es muy baja comparado con el adulto (Li et al., 2003) y de acuerdo a estas observaciones, nosotros no hemos logrado detectar el producto proteico en ese estadio (**Fig. 38F**). Por tanto, únicamente hemos analizado la distribución y cantidad relativa de MPP4 en la retina adulta.

En el ratón silvestre a la edad de P90, el anticuerpo generado detecta la proteína a nivel de la MLE, concretamente en la RSA, y en los terminales sinápticos de los fotorreceptores de la CPE, presentando una intensidad de marcaje superior en esta capa (**Fig. 38B**). Este marcaje corresponde a lo ya descrito por otros autores empleando diferentes anticuerpos

(Kantardzhieva et al., 2005; van de Pavert et al., 2004; Yang et al., 2007). Además, hemos detectado un leve marcaje para MPP4 en la capa de los segmentos de los fotorreceptores (**Fig. 38B**), en la zona que parece corresponder al cilio de conexión de los fotorreceptores, área donde otros autores han indicado su presencia (Stohr et al., 2003). Para comprobar que la tinción obtenida es específica, realizamos un ensayo de competitividad sobre las secciones de retina. El marcaje para MPP4 desaparece en todas estas regiones, lo que prueba la especificidad del anticuerpo (**Fig. 38C**).

En la retina del ratón adulto *Crb1^{rd8}* la presencia de MPP4 en la MLE prácticamente desaparece, y sólo parece persistir un marcaje residual en las áreas donde aún no se están formando las rosetas de fotorreceptores (**Fig. 38D-E**). Tampoco se observa la presencia de la proteína en la zona del cilio de conexión (**Fig. 38D-E**). En la CPE de la retina del ratón mutante, la proteína MPP4 permanece, aunque con una intensidad de marcaje inferior a la observada en el ratón silvestre (**Fig. 38B, D-E**), y esa intensidad es incluso menor en las porciones de la retina donde aparecen rosetas de fotorreceptores (**Fig. 38E**). De hecho, en las áreas más vitreales de las rosetas se aprecia una reducción drástica del marcaje para esta proteína (**Fig. 38E**).

Mediante análisis de WB cuantificamos la cantidad de proteína en la retina del ratón a la edad de P90 (n=6), en animales silvestres y mutantes para CRB1 y llevamos a cabo el test paramétrico de la *t de student* para comparar los valores obtenidos. Así, comprobamos que los niveles relativos de proteína en la retina *Crb1^{rd8}* están reducidos con respecto a los valores obtenidos en la retina silvestre, siendo esta diferencia altamente significativa (**p<0,01) (**Fig. 38F-G**).

1.3. LOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Como hemos detallado anteriormente, la MLE es una de las primeras estructuras que pierde su integridad en el estadio de P7 en el ratón *Crb1^{rd8}*. En este apartado nos centramos en analizar las alteraciones que experimentan uno de los tipos celulares que forman parte de la MLE, los fotorreceptores, células muy afectadas en otros modelos de degeneración, como el ratón *rd10* o el *pcd* (Barhoum et al., 2008; Chang et al., 2002; Marchena et al., 2011).

1.3.1. INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A RECOVERINA, RODOPSINA Y PNA

En primer lugar, estudiamos las modificaciones sufridas por los fotorreceptores mediante el estudio inmunohistoquímico y de WB de una proteína presente en conos y bastones, recoverina. Por otro lado, para conocer específicamente la afectación de cada uno de los dos

Resultados

tipos de fotorreceptores por separado, identificamos los conos con un marcador exclusivo para este tipo celular, como la PNA, y los bastones con un anticuerpo frente a rodopsina.

1.3.1.1. RECOVERINA

En condiciones normales, la proteína recoverina se localiza en los fotorreceptores y en algunas subpoblaciones de células bipolares de conos y células ganglionares.

En el estadio de P7, observamos que tanto en ratones control como en mutantes, la proteína recoverina se sitúa en el cuerpo celular de los fotorreceptores localizados en la CNE, así como en los segmentos en formación y en los terminales presinápticos de los conos, que son los únicos terminales de fotorreceptores presentes en la CPE a esta edad (**Fig. 39A-C**). En este estadio, los somas de los conos y bastones se ubican en diferentes estratos dentro de la CNE, de forma paralela a los procesos radiales que cruzan la retina. Los segmentos de los fotorreceptores crecen en la región apical a la MLE y los terminales sinápticos se distribuyen a lo largo de la CPE. Esta configuración se observa tanto en retinas control, como en las áreas sin rosetas en las retinas mutantes, aunque en éstas, los cuerpos celulares parecen tener una disposición más desordenada que en las retinas control (**Fig. 39A-B**). En los lugares donde la MLE comienza a degenerar, que suele corresponder a las áreas más nasales de la retina del ratón *Crb1^{rd8}*, los somas de los fotorreceptores pierden la disposición en paralelo (**Fig. 39C**). En esas zonas alteradas, los terminales presinápticos y los segmentos de los fotorreceptores se invaginan hacia áreas más internas de la retina, lo que provoca la desorganización, aunque los terminales sinápticos se encuentran dentro de la CPE, y los segmentos de los conos y bastones aún se observan creciendo en la porción apical de la MLE (**Fig. 39C**).

En las retinas del ratón adulto, el anticuerpo frente a la proteína recoverina tiñe los SI y los terminales presinápticos de los conos y bastones, así como su cuerpo celular en la CNE (**Fig. 39D**). En el estadio adulto, las rosetas de fotorreceptores se distribuyen a lo largo de la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}*, pudiendo aparecer a cualquier nivel. Esto provoca importantes diferencias en la distribución del marcaje para la proteína recoverina, tanto en la intensidad de la tinción, que es menor en la retina del ratón mutante con respecto al control, como en la disposición de los fotorreceptores (**Fig. 39D-F**). En las áreas de la retina del ratón *Crb1^{rd8}* donde la MLE parece no haber perdido su integridad, a pesar de que la baja intensidad del marcaje, los núcleos, los terminales sinápticos y los SI de los fotorreceptores se encuentran organizados (**Fig. 39E**). En las zonas donde la degeneración se encuentra más avanzada, los núcleos de los fotorreceptores pierden su disposición en hileras y se sitúan formando rosetas, de forma que disponen sus terminales sinápticos hacia el exterior de la roseta, quedando la zona donde deberían ubicarse los segmentos hacia el interior de la misma (**Fig. 39F**). Incluso, en algunas

zonas de degeneración, la pérdida de polaridad de los fotorreceptores es tal, que su invaginación hacía el interior de la retina hace que se observen núcleos ectópicos de fotorreceptores dentro de la CNI, dispuestos en forma de roseta (**Fig. 39F**). Finalmente, en las áreas de las retinas mutantes donde la MLE pierde su conformación se produce una pérdida del número de hileras de núcleos de fotorreceptores, con la consiguiente reducción del grosor de la CNE. Dicho grosor disminuye hasta aproximadamente la mitad del tamaño que tiene en condiciones normales (38,8 μm vs 72,3 μm , respectivamente), o en condiciones donde no existe una aparente fragmentación de la MLE (38,8 μm vs 73,9 μm) (**Fig. 39G**).

Para cuantificar si la pérdida de intensidad de la tinción para recoverina se correlaciona con un descenso en la cantidad de proteína que se expresa en el tejido, llevamos a cabo análisis de WB en los estadios de P7 y P90, con retinas control y mutante (**Fig. 39H**). En todos los casos analizados obtenemos una única banda positiva para la proteína con un peso molecular de 23 kDa (**Fig. 39H**), que corresponde con el peso conocido de la proteína en el ratón (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q2TB46>). Cuantificamos los niveles proteicos de cada experimento de WB por separado (n=7), y realizamos el test paramétrico de la *t de student* para comparar los valores obtenidos. A la edad de P7, existe una mayor cantidad relativa de recoverina en la retina del ratón mutante con respecto al control, aunque esa diferencia no es significativa ($p>0,05$) (**Fig. 39H-I**). Sin embargo, ese patrón cambia en el estadio de P90. En ambos genotipos aumentan los niveles de proteína, pero a esta edad hay una cantidad relativa de recoverina mayor en la retina del ratón control con respecto al ratón mutante, siendo esta diferencia significativa ($*p<0,05$) (**Fig. 39H-I**). Finalmente, para valorar el transcurso de la degeneración sufrida por los fotorreceptores se comparó el incremento de recoverina a P90 con respecto a P7. Según esto, en los ratones silvestres existe un incremento de recoverina a P90 de 9,71 veces con respecto a P7 (**Fig. 39J**); por el contrario, en la retina mutante ese aumento es de solo 4,84 órdenes de magnitud, es decir, el ritmo de ganancia de recoverina es el doble en la retina control comparada con la mutante *Crb1^{rd8}* (**Fig. 39J**).

1.3.1.2. PNA Y RODOPSINA

Para analizar por separado el comportamiento de conos y bastones en la degeneración que ocurre en la retina del ratón *Crb1^{rd8}*, marcamos de forma específica los conos con PNA, y los bastones con rodopsina. A la edad de P7 el marcaje con PNA sólo pone de manifiesto los SI de los conos en formación (**Fig. 40A-C**). Esos segmentos presentan un desarrollo de su estructura normal en las retinas control, creciendo en la región apical a la MLE (**Fig. 40A**), al igual que ocurre en las zonas de la retina mutante donde no ha comenzado la fragmentación de la MLE (**Fig. 40B-C**). En algunos casos se puede apreciar que la forma del segmento interno

Resultados

varía, aunque esto podría ser causa del plano de corte de la sección, y por tanto no lo consideramos como una diferencia real (**Fig. 40A-B**). Sin embargo, sí existen zonas donde se observa una importante degeneración de los SI de los conos en el estadio P7. Se trata de aquellas áreas donde la MLE comienza a fragmentarse e invaginarse hacia el interior de la CNE (**Fig. 40C**). En estas zonas, el segmento interno continúa formándose, pero se observa un área del segmento sensiblemente inferior, y una intensidad de marcaje menor, si se compara con una retina control o con una zona de la retina mutante en la que no ha comenzado la desorganización de la MLE (**Fig. 40A-C**).

En la retina adulta, la tinción con PNA pone de manifiesto los SI y los pedículos de los conos (**Fig. 40D-F**). En retinas control y en retinas mutantes en las que no se han formado rosetas de fotorreceptores, observamos que los SI de los conos se disponen alineados de forma regular (**Fig. 40D-E**); sin embargo, en la retina mutante la tinción para PNA revela que los SI han perdido buena parte de su organización (**Fig. 40E**). También se aprecian diferencias en los terminales sinápticos de los conos, ya que, mientras en retinas control se disponen en forma de hilera, en las retinas mutantes, no se aprecia esta distribución (**Fig. 40D-E**). Respecto a las zonas en las que la MLE está degenerada y se forman rosetas de fotorreceptores, tanto los SI como los pedículos de los conos pierden buena parte de su conformación, de forma que prácticamente llegan a desaparecer (**Fig. 40F**). No obstante, en las áreas adyacentes a la roseta ambas estructuras del cono continúan presentes, aunque con importantes alteraciones en su estructura (**Fig. 40F**).

La proteína rodopsina tiñe todo el bastón en desarrollo a la edad de P7 (**Fig. 40G-I**). Los núcleos de este tipo celular en la retina mutante parecen ser más numerosos y presentan una distribución más desorganizada, en comparación con los núcleos de la retina control. Esta desorganización también se observa a nivel de los segmentos en formación (**Fig. 40G-I**). Destacar que al igual que ocurría para los conos, en las áreas más ventrales donde comienza la degeneración de la MLE, los segmentos de los bastones se invaginan hacia el interior de la CNE. Como se ha mencionado en la introducción, los terminales sinápticos de los bastones no invaden la CPE hasta el estadio de P8. Sin embargo, dicho estrato se encuentra parcialmente modificado a la edad de P7. La tinción con rodopsina revela que los procesos de los bastones que se aproximan a la CPE parecen perder su polaridad y alcanzan capas más internas de la retina (**Fig. 40I**).

En las retinas control de ratones adultos se observa un marcaje muy intenso para la proteína rodopsina a nivel de los SE de los bastones, y otro más tenue alrededor de los núcleos de este tipo celular (**Fig. 40J**). La tinción en las retinas mutantes *Crb1^{rd8}* revela un marcaje intenso para esta proteína a nivel de los SE de los fotorreceptores (**Fig. 40K**), siendo éste algo

más débil en áreas con rosetas de fotorreceptores (**Fig. 40L**). Además, en las zonas donde la degeneración no es muy evidente permanece el marcaje alrededor de los núcleos (**Fig. 40K**). Cabe destacar que a nivel de las rosetas de fotorreceptores se observan importantes diferencias. En estas áreas, la tinción pone de manifiesto una fuerte presencia de rodopsina en las mismas, con una intensidad de marcaje superior con respecto a los somas de los fotorreceptores adyacentes (**Fig. 40L**).

1.3.2. RECUENTO DEL NÚMERO DE CONOS Y ERG

Tal y como hemos observado, tanto los conos como los bastones sufren modificaciones en su localización y estructura desde estadios postnatales tempranos. Para conocer si la mutación de CRB1 afecta al número de conos, realizamos un recuento de células positivas para PNA. Hemos analizado dos edades diferentes: P30, estadio en el que, como hemos comprobado, han desaparecido muchas de las uniones adherentes que conforman la MLE, y un estadio previo, P21, edad en la que estaba descrita la presencia de las primeras rosetas de fotorreceptores (Mehalow et al., 2003).

PNA pone de manifiesto los SI de los conos, algunos de los SE y los terminales sinápticos de este tipo celular, en ambas retinas, control y *Crb1^{rd8}*, en ambos estadios analizados (**Fig. 41A-D**). A la edad de P21 ya se visualizan rosetas de fotorreceptores en las retinas mutantes, cuyo desarrollo parece bastante avanzado (**Fig. 41B**). En el estadio de P30, en las retinas mutantes aparecen áreas carentes de conos que no se aprecian en las retinas silvestres, ni tampoco son tan evidentes en retinas *Crb1^{rd8}* de edad P21 (**Fig. 41A-D**). Además, también observamos a P30 un aspecto más desordenado de los segmentos de los fotorreceptores en las retinas mutantes (**Fig. 41D**).

Para cuantificar el número de células positivas para PNA, usamos secciones de similar localización procedentes de, al menos, 3 animales diferentes para cada uno de los 4 grupos experimentales. Los resultados expresan la media del número de conos por mm \pm SEM. A la edad de P21, el número de conos en las retinas control es ligeramente superior al cuantificado en las retinas mutantes ($464,7 \pm 16,05$ vs $442,7 \pm 20$, respectivamente) sin embargo, la diferencia no es significativa (**Fig. 41E**). Por el contrario, en el estadio P30, la diferencia en el número de conos entre las retinas silvestres y *Crb1^{rd8}* es significativa, siendo el número de conos inferior en las retinas mutantes ($376,7 \pm 25,07$ vs $453 \pm 4,3$) (**Fig. 41E**). Además, también comparamos los 4 grupos experimentales entre sí usando un test estadístico ANOVA. A partir de este test encontramos diferencias significativas entre los diferentes estadios y genotipos (* $p < 0,05$), por lo que realizamos un test *post-hoc* de LSD para conocer entre que grupos existen esas diferencias. En todos los casos hay diferencias entre los ratones *Crb1^{rd8}* de edad

Resultados

P30 y el resto de los grupos, que son significativas al comparar con los grupos P21 mutantes y P30 silvestres (* $p=0,032$ y $0,017$, respectivamente), y altamente significativas con los ratones de edad P21 control (** $p=0,009$). No existen diferencias entre los otros tres grupos entre sí ($p>0,05$) (**Fig. 41E**). Esto implica que, entre los estadios de P21 y P30, existe un descenso importante en el número de conos de la retina del ratón mutante, evidenciado la degeneración sufrida en la retina de estos ratones.

Una vez realizado el recuento del número de conos, llevamos a cabo experimentos de ERG de campo completo para conocer si el descenso en el número de conos en los ratones mutantes *Crb1^{rd8}* a la edad de P30 tiene un reflejo en la actividad funcional de la retina. Para ello, nos centramos principalmente, aunque no de forma exclusiva, en la respuesta que producen los conos ante diferentes protocolos de estimulación. Estos protocolos se basaron en la respuesta escotópica mixta para medir la respuesta conjunta de conos y bastones y en los potenciales oscilatorios para determinar la actividad en las vías de transducción de ambos tipos celulares. Por último, se analizaron la respuesta de los conos y la respuesta flicker, que analiza la actividad de la retina interna debido a la actividad de los conos (**Fig. 41F-G**).

En la figura ERG mostramos la respuesta registrada en la retina de los ratones *Crb1^{rd8}* ante los diferentes protocolos de estimulación (**Fig. 41G**). Al comparar cualitativamente estas respuestas con las obtenidas en ERG de campo completo estándar sometidos a los mismos estímulos (Lam, 2005) (**Fig. 41F**), no se aprecian diferencias importantes ni en la amplitud de las ondas, ni en tiempo de respuesta. Tanto las respuestas mixtas de conos y bastones y de sus vías de transducción, como la respuesta aislada de los conos y su señal en la retina interna siguen un patrón similar al registrado en los ratones silvestres (**Fig. 41F-G**).

Tomando en conjunto los resultados del recuento del número de conos y los datos de la respuesta electroretinográfica de la retina, podemos asegurar que, a pesar de la desaparición del número de conos, la actividad eléctrica de la retina no se ve afectada, al menos en la retina en su conjunto.

1.3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SINAPSIS

Tras conocer las alteraciones morfológicas y estructurales de los fotorreceptores en los ratones mutantes para CRB1, en esta sección estudiamos la posible alteración de algunas de las proteínas típicas que intervienen en la sinapsis de la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}*. Para ello analizamos los niveles y la localización de la proteína que se expresa en las vesículas sinápticas, sinaptofisina (SYP). Además examinamos dos de los tipos principales de proteínas involucradas en la transmisión sináptica del sistema nervioso central, la transmisión gabaérgica

y la glutamatérgica. Estudiamos la sinapsis de los fotorreceptores a nivel de la CPE y analizamos también la segunda estación del relevo de información, la CPI.

1.3.3.1. INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A SINAPTOFISINA

Mediante pruebas inmunohistoquímicas hemos comprobado que la proteína SYP se localiza a nivel de los terminales presinápticos en ambas capas plexiformes de la retina de ratón, desde estadios tempranos del desarrollo postnatal (**Fig. 42A-C**) hasta estadios adultos en animales control (**Fig. 42D-F**).

Al comparar el marcaje para esta proteína en retinas mutantes *Crb1^{rd8}* y retinas control a la edad de P7, observamos una mayor desorganización de la CPE en el mutante (**Fig. 42A-C**). Esta desorganización es más evidente en las zonas nasales, más alteradas en este estadio del desarrollo (**Fig. 42C**). Sin embargo, no se observan diferencias en la tinción para la proteína SYP entre retinas mutantes y control en la CPI (**Fig. 42A-C**).

En el estadio adulto, el marcaje para SYP revela importantes modificaciones entre retinas control y mutante. Así, a lo largo de la CPE de las retinas del ratón *Crb1^{rd8}* apreciamos una disminución evidente en la intensidad de la tinción para dicha proteína (**Fig. 42D-E**). Además, en las rosetas de fotorreceptores esta reducción en la intensidad de marcaje es mayor, llegando incluso casi a desaparecer (**Fig. 42F**). En la CPI de las retinas mutantes también se observa un marcaje más leve para la proteína SYP, aunque en este estrato, el descenso de la tinción parece más focalizado en las áreas que presentan una mayor degeneración (**Fig. 42D-F**).

La variación en la tinción para esta proteína nos llevó a analizar si esto era debido a un descenso de los niveles de la proteína. Para ello, llevamos a cabo un estudio de WB con retinas de ratones control y mutantes de edades P7 y P90 (**Fig. 42G**). En todos los casos se observó la banda correspondiente a la proteína a una altura equivalente a 38 kDa (**Fig. 42G**). Se cuantificaron los niveles proteicos de cada experimento por separado (n=4), y realizamos el test paramétrico de la *t de student* para comparar los valores obtenidos. Así, en el estadio de P7 hay una cantidad relativa de SYP mayor en el ratón mutante con respecto al control, pero esa diferencia no es significativa ($p > 0,05$) (**Fig. 42G-H**). A la edad de P90 aumentan sustancialmente los niveles relativos de proteína, tanto en retinas control como en retinas mutantes; sin embargo, en este estadio las retinas silvestres presentan mayor cantidad de SYP que las mutantes *Crb1^{rd8}*, siendo esta diferencia significativa ($*p < 0,05$) (**Fig. 42G-I**). La ganancia de SYP entre ambas edades también presenta alteraciones. En las retinas de los ratones control hay 22 veces más proteína a P90 con respecto a P7, mientras que en la retina mutante ese aumento es de solo 4,5 unidades (**Fig. 42I**). Es decir, en el transcurso de la degeneración, el

Resultados

incremento de sinaptofisina entre ambas edades es casi 5 órdenes de magnitud superior en la retina de los ratones control.

1.3.3.2. TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y GLUTAMATÉRGICA

A continuación analizamos específicamente la transmisión sináptica mediada por el neurotransmisor inhibitorio GABA, y por el excitatorio VGLUT-1.

A las edades de P7 y de P90, el anticuerpo que pone de manifiesto el marcaje para GABA detecta esta proteína a nivel de la CNI, CPI y CCG, en retinas de ratones control y mutante (**Fig. 43A-D**). En ambos estadios se observan algunas células GABAérgicas en la zona más vitreal de la CNI y a lo largo de la CCG, sin apreciarse diferencias entre retinas control y mutantes (**Fig. 43A-D**). A la edad de P7, el marcaje para GABA de la CPI se aprecia distribuido en dos filas de procesos celulares, siendo la tinción similar entre control y mutante (**Fig. 43A-B**). En la CPI del ratón adulto, la inmunofluorescencia para GABA revela que la proteína se localiza hacia la zona más vitreal del estrato y en dos hileras de procesos celulares en el área más escleral. A esta edad tampoco se observan diferencias entre retinas mutante y control (**Fig. 43C-D**), ni siquiera en zonas con rosetas de fotorreceptores.

En el estadio de P7 estudiamos la localización de VGLUT1 en la CPE, donde se ha descrito que se encuentra la mayor cantidad de proteína (Sherry et al., 2003). En retinas de ratones control observamos un fuerte marcaje para VGLUT1 en los terminales sinápticos de los fotorreceptores (**Fig. 43E**). Esta tinción permanece en retinas de ratones mutantes, con una intensidad similar, incluso en áreas en degeneración (**Fig. 43F**). Sin embargo, en esas zonas en las que la degeneración provoca una pérdida de la integridad de la CPE y su consecuente desplazamiento hacia zonas más vitreales, el marcaje para VGLUT1 se localiza en zonas más profundas de la retina (**Fig. 43F**). En ratones adultos, la proteína VGLUT1 se sitúa en ambas capas plexiformes, en retinas control y *Crb1^{rd8}* (**Fig. 43G-H**). En las rosetas de fotorreceptores y zonas adyacentes de la CPE de la retina del ratón mutante, se produce una pérdida de la localización y del marcaje de la proteína (**Fig. 43H**). La CPI teñida con el anticuerpo frente a VGLUT1 presenta un aspecto similar en ratones *Crb1^{rd8}* y ratones silvestres, aunque parece existir una menor intensidad de marcaje en los primeros (**Fig. 43G-H**). En las retinas *Crb1^{rd8}* en las que aún no se están formando rosetas de fotorreceptores, la inmunorreactividad para VGLUT1 no presenta diferencias respecto al control (no mostrado).

1.4. LAS CÉLULAS DE MÜLLER DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Las células de Müller responden frente a diferentes lesiones o distrofias de la retina actuando y comportándose como glía reactiva (Ekstrom et al., 1988; Lewis and Fisher, 2003).

Por otro lado, diversos trabajos han mostrado que CRB1 se localiza fundamentalmente en las células de Müller, a nivel de la RSA de la MLE (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2007b; van Rossum et al., 2006), y es esta estructura la primera en perder su integridad en los ratones mutantes *Crb1^{rd8}*, como hemos mostrado en este trabajo. Por ello, hemos analizado el papel de las células de Müller en este tipo de degeneración retiniana, mediante el estudio de la expresión de diferentes proteínas típicas de células de Müller en tejido de retina de ratón, así como realizando análisis *in vitro* de algunas de sus alteraciones más importantes.

1.4.1. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN TEJIDO

Para estudiar las características de las células de Müller en la retina del ratón silvestre y mutante *Crb1^{rd8}*, llevamos a cabo tinciones específicas frente a marcadores característicos de este tipo celular, como CRALBP (Fig. 44), GS (Fig. 45), GLAST (Fig. 45), SOX2 (Fig. 46), GFAP (Fig. 46) y Kir 4.1 (Fig. 47), a edades P7 y P90. A estos mismos estadios medimos los niveles de dos proteínas que suelen presentar alteraciones en degeneraciones retinianas, como son GS y GFAP (Figs 45 y 46). Además, analizamos las posibles diferencias en la expresión del factor de transcripción SOX2 (Fig. 46). Finalmente, estudiamos cómo se ve afectada la vascularización ante los cambios ocurridos en las células gliales de la retina mutante (Fig. 48).

1.4.1.1. PATRÓN DE MARCAJE DE CRALBP

En el estadio de P7 detectamos a la proteína CRALBP en las células de Müller de la retina del ratón silvestre y mutante. En ambos casos, el marcaje se localiza a lo largo de toda la célula, aunque las prolongaciones más vitreales y aquellas que rodean a los núcleos de la CNI presentan una mayor intensidad de la tinción (Fig. 44A-C). No se observan grandes diferencias en el marcaje para CRALBP entre ambos genotipos, excepto en las áreas donde la MLE presenta alteraciones morfológicas (Fig. 44A-C). En estas regiones de la retina, los procesos de las células de Müller pierden su polaridad y se desorganizan, siendo esa pérdida de orientación más evidente a nivel de la CNE (Fig. 44C).

En el estadio de P90, la proteína CRALBP sigue presente en las células de Müller, tanto en la retina del ratón mutante como en el control. En ambos casos, observamos mayor intensidad de marcaje hacia las zonas más internas de la retina (Fig. 44D-F). No obstante, a esta edad ya se aprecian alteraciones más evidentes en las células de Müller del ratón *Crb1^{rd8}*. En primer lugar, la intensidad del marcaje para CRALBP está disminuida al compararla con la tinción de la retina del ratón control, siendo esta reducción mucho más notoria en las prolongaciones que rodean a las sinapsis situadas en la CPI y la CPE (Fig. 44D-E), así como en los procesos gliales que organizan la MLE de las áreas más degeneradas (Fig. 44F). Por otro lado, se aprecia una

Resultados

fuerte desorganización de la glía radial a lo largo de todo el espesor de la retina mutante. En la retina control, los núcleos de las células de Müller se disponen de forma relativamente ordenada a lo largo de la CNI, situándose todos ellos a una altura aproximada, y los procesos gliales cruzando la retina con una disposición paralela entre unos y otros (**Fig. 44D, D'**). Esta disposición se altera en la retina del ratón mutante. Así, aunque los núcleos de las células de Müller están presentes en la CNI, algunos de ellos parecen haber perdido la alineación y se ubican a diferentes alturas dentro de ese estrato (**Fig. 44E,**). Las prolongaciones de estas células también pierden su disposición en paralelo, sobre todo a nivel de la CNE (**Fig. 44E, E'**). Asimismo, a nivel de la CNE, estas prolongaciones presentan un aspecto hipertrófico (**Fig. 44E, E'**). En las áreas de la retina mutante con rosetas de fotorreceptores es donde se detectan las mayores alteraciones. Los cuerpos celulares de los fotorreceptores que forman la roseta se encuentran rodeados por procesos gliales CRALBP positivos, cuya naturaleza hipertrófica es similar a la observada en el resto de las prolongaciones gliales que se distribuyen en la CNE (**Fig. 44F, F'**). Además, las rosetas de fotorreceptores que se encuentran embebidas en la CNI, están rodeadas por los núcleos y los procesos de las células de Müller que se distribuyen por esa capa. A ese nivel, las células de Müller pierden su orientación, desorganizándose y presentando también un aspecto hipertrófico (**Fig. 44F, F'**).

1.4.1.2. INMUNORREACTIVIDAD PARA GLAST Y GS

Como explicamos en el apartado 2.3.1. de la introducción, las células de Müller participan activamente en la vía del glutamato en la retina. GLAST y GS son enzimas cruciales para el metabolismo del glutamato, y ambas se expresan en las células de Müller de los ratones silvestres y mutantes (**Fig. 45A-I**).

Diferentes trabajos han mostrado que en el estadio postnatal de P7, la presencia de GS en las células de Müller es muy baja, siendo GLAST algo más abundante (Bringmann et al., 2009b; Lee et al., 2010; Magnuson and Young, 1988; Pow and Barnett, 1999). Sobre secciones de retinas de ratones mutantes y control a P7, llevamos a cabo marcajes inmunofluorescentes frente a GLAST. Detectamos a la proteína a lo largo de todas las prolongaciones de las células de Müller, sin observar diferencias entre retinas de ratones silvestres y *Crb1^{rd8}* (**Fig. 45A-C**).

A P90, la tinción para el transportador GLAST también marca por completo las células de Müller de las retinas silvestres y mutantes, pero en este caso la intensidad de ese marcaje está fuertemente reducida en el ratón *Crb1^{rd8}* (**Fig. 45D-F**). Además, se observa cierta desorganización en los procesos gliales GLAST positivos que atraviesan la retina mutante, desorganización que se incrementa en las áreas más esclerales de la retina, donde se dispone la MLE (**Fig. 45E-F**).

Las tinciones para la enzima GS ponen de manifiesto que ésta se localiza por toda la célula de Müller en las retinas silvestres y mutantes adultas (**Fig. 45G-I**). Observamos importantes modificaciones en el marcaje para esta proteína entre ambos genotipos. En primer lugar, y al igual que lo observado en las tinciones para el transportador GLAST, los procesos de las células de Müller del ratón *Crb1^{rd8}* presentan un aspecto más desordenado que los de la retina control (**Fig. 45G-I**), siendo estas alteraciones más evidentes en las zonas donde se sitúan las rosetas de fotorreceptores (**Fig. 45I**). Además, hacia las zonas más vitreales, las prolongaciones radiales de las células de Müller en la retina control presentan un aspecto más robusto con respecto a lo observado en la retina mutante (**Fig. 45G-I**). Asimismo, la intensidad de la tinción para la enzima GS es superior en las áreas más vitreales de la retina control, sobre todo al compararlo con las áreas de la retina mutante donde se forman rosetas de fotorreceptores (**Fig. 45G, I**). A nivel de la CNE, como vimos con el marcaje para la proteína CRALBP, los procesos gliales que rodean los núcleos de los fotorreceptores presentan un aspecto hipertrófico (**Fig. 45G-I**). Esta morfología también se observa en las prolongaciones de las células de Müller positivas a GS que se intercalan entre los somas en las rosetas de fotorreceptores, así como en los procesos que los rodean a nivel de la CNI (**Fig. 45I**).

La MLE de las retinas silvestres teñidas con anticuerpos frente a la proteína GLAST y/o GS se observa sin discontinuidades, en una hilera orientada de forma perpendicular a los núcleos de los fotorreceptores (**Fig. 45D, G**). En las retinas mutantes, las tinciones frente a GLAST y/o GS ponen de manifiesto la alteración de la estructura de la MLE, apreciándose cómo se modifica su alineación, incluso llegando a observar cómo los procesos de las células de Müller se alternan con los núcleos de la CNE (**Fig. 45E-F, H-I**). Esa configuración se observa en áreas donde la pérdida de la estructura de la MLE provoca su invaginación (**Fig. 45F, I**), así como en zonas donde esta alteración no es tan clara (**Fig. 45E, H**).

Para analizar si la variación en el marcaje para la proteína GS en las retinas adultas era debido a una modificación en la cantidad de proteína, llevamos a cabo pruebas de WB. Usamos para ello 6 ratones mutantes y control de una edad de P90. Se aprecia una única banda para la proteína a una altura aproximada de 44 kDa, que es su peso molecular estimado. Observamos cómo la expresión de la proteína es mucho mayor en los ratones adultos en comparación con la banda que aparece a P7 (**Fig. 45J**). Al cuantificar la señal obtenida en las retinas de edad P90 comprobamos que los niveles relativos de GS en la retina silvestre son superiores a los valores obtenidos en la retina *Crb1^{rd8}*. Sin embargo, el test de la *t student* indica que esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (**Fig. 45K**).

Resultados

1.4.1.3. INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A GFAP Y SOX2

Una de las respuestas de las células de Müller ante un daño o degeneración en la retina es la sobreexpresión de GFAP (Ekstrom et al., 1988; Lewis and Fisher, 2003), proteína que en condiciones normales sólo expresan los astrocitos y los procesos más vitreales de las células de Müller. Para conocer si la mutación en el gen *Crb1* también activa esa respuesta glial, estudiamos la inmunorreactividad para GFAP en los estadios de P7 y P90. Además, para asegurar el fenotipo glial de las células que expresan GFAP bajo estas condiciones, realizamos un doble marcaje de GFAP y el factor de transcripción SOX2, el cual está presente en células de Müller y astrocitos, así como en una subpoblación de células amacrinas colinérgicas (Fischer et al., 2010).

A la edad de P7, el marcaje para GFAP se localiza en los procesos vitreales localizados a la altura de la CCG, mientras que los anticuerpos frente a SOX2 tiñen diferentes núcleos de la CCG, así como de la CNI (**Fig. 46A-C**). En animales control, el doble marcaje GFAP/SOX2 muestra que la mayoría de procesos GFAP positivos se asocian a núcleos que son SOX2⁺, indicando que son astrocitos (**Fig. 46A**). Además, dentro de la CCG, existen procesos teñidos para GFAP no asociados a ningún núcleo SOX2 positivo, que corresponden a las prolongaciones vitreales de las células de Müller (**Fig. 46A**); y núcleos SOX2 positivos que carecen de procesos marcados para GFAP, que son de células amacrinas colinérgicas desplazadas (**Fig. 46A**). A nivel de la CNI no se observa marcaje para GFAP, sin embargo, SOX2 tiñe diferentes cuerpos celulares, presumiblemente de células de Müller y de células amacrinas colinérgicas en esta capa (**Fig. 46A**). En animales mutantes a la edad de P7, los anticuerpos frente a GFAP y SOX2 tiñen las mismas capas de la retina que lo observado en animales control (**Fig. 46B-C**). No se observan alteraciones en el patrón de marcaje para SOX2, pero en relación con GFAP apreciamos importantes diferencias a nivel de la CCG. Así, se aprecia un aumento en la intensidad y amplitud en la tinción para esta proteína, de forma que se distribuye a lo largo de toda la CCG, poniendo de manifiesto algunos procesos celulares asociados a núcleos SOX2 positivos, así como pies de las células de Müller no relacionados con núcleos marcados para SOX2 (**Fig. 46B-C**). Además, en las zonas de la retina mutante donde han comenzado a formarse rosetas de fotorreceptores, el marcaje para la proteína GFAP se extiende también por los procesos gliales que cruzan la CPI (**Fig. 46C**).

La retina del ratón adulto silvestre a P90 mantiene la presencia de la proteína GFAP en la CCG, tanto en los astrocitos como en los procesos vitreales de las células de Müller (**Fig. 46D**), aunque con una mayor intensidad en el marcaje que lo observado en las retinas control y *Crb1*^{rd8} a P7 (**Fig. 46A-D**). A P90, el factor de transcripción SOX2 sigue presente en muchos de los núcleos ubicados en la CCG, y en algunos de la CNI. Además, gran parte de los cuerpos

celulares SOX2 positivos localizados a nivel de la CNI se organizan en un estrato que recorre la zona media de la CNI (**Fig. 46D**). En las retinas adultas del ratón mutante *Crb1^{rd8}*, el patrón de marcaje para la proteína GFAP y SOX2 se encuentra totalmente alterado. En las áreas de la retina donde no se han desarrollado rosetas de fotorreceptores, el marcaje para la proteína GFAP se distribuye en las mismas capas que en lo descrito para el animal silvestre. A nivel de la CCG, observamos astrocitos SOX2/GFAP positivos y prolongaciones vitreales de las células de Müller que están teñidos para GFAP aunque no se asocian a núcleos con marcaje para SOX2 (**Fig. 46E**). Asimismo, los núcleos de la CNI que expresan SOX2, pierden la organización observada en retinas control, disponiéndose ahora a diferentes niveles de la capa (**Fig. 46E**). Los cambios más dramáticos en el patrón de marcaje para GFAP y SOX2 se observan en las zonas donde se desarrollan las rosetas de fotorreceptores. En primer lugar, la intensidad de marcaje para la proteína GFAP aumenta considerablemente a lo largo de la toda la CCG, aunque no se altera la distribución de las células SOX2 positivas a este nivel (**Fig. 46F**). Además, la sobreexpresión de GFAP hace que en estas áreas desorganizadas, la proteína esté presente a lo largo de muchos de los procesos gliales que cruzan la CPI y la CNI, el marcaje rodea a las rosetas de los fotorreceptores e incluso llega a alcanzar la CPE (**Fig. 46F**). Conjuntamente, muchos de los procesos gliales GFAP positivos que envuelven a las rosetas en la CNI, están asociados a núcleos teñidos para la proteína SOX2. La ubicación de estos cuerpos celulares es diferente respecto a lo observado en los ratones silvestres, evidenciando la translocación de los núcleos de las células de Müller en las retinas en degeneración (**Fig. 46F**).

Para comprobar el aumento en la expresión de la proteína GFAP que morfológicamente se observa en las retinas mutantes, llevamos a cabo análisis de WB. Usamos para ello 7 ratones de cada edad y genotipo. Se obtiene una banda a una altura aproximada de 49 kDa, que corresponde al peso molecular estimado para la proteína GFAP (**Fig. 46G**). Tras la cuantificación de los valores y análisis de los datos obtenidos mediante el test de la *t de student*, hemos detectado que los niveles relativos de GFAP son siempre superiores en las retinas mutantes en comparación con las retinas control tanto a la edad de P7, como a la edad de P90, siendo la diferencia en ambos estadios altamente significativa (** $p < 0,01$) (**Fig. 46H**). Además, el aumento en la expresión de la proteína GFAP entre ambas edades también se encuentra modificado. Mientras que en las retinas control los niveles de GFAP son algo más de 4 órdenes de magnitud superiores en P90 con respecto a P7, en los mutantes *Crb1^{rd8}* este aumento supera las 5 unidades (**Fig. 46I**), evidenciando el proceso degenerativo que experimentan estas retinas.

SOX2 es un factor de transcripción que está regulado por múltiples modificaciones postraduccionales, como sumoilación, fosforilación, acetilación o metilación, entre otras

Resultados

(Baltus et al., 2009; Jeong et al., 2010; Tsuruzoe et al., 2006; Zhao et al., 2011). Para analizar los niveles en el marcaje para SOX2, y estudiar las posibles alteraciones en las diferentes modificaciones postraduccionales descritas, llevamos a cabo estudios de WB. A las dos edades estudiadas, y tanto en ratones silvestres como mutantes, el patrón de marcaje observado señala la existencia de una banda a una altura aproximada de 34 kDa, que es el peso molecular estimado para la proteína (**Fig. 46J**). Esta banda se aprecia con mayor intensidad en las retinas adultas. Cuantificamos la intensidad de dicha banda en 5 ratones diferentes de cada estadio y genotipo. Analizamos los valores relativos obtenidos mediante el test de la *t de student* para los ratones de edad P7 y según el test de la *U de Mann-Whitney* para P90. Así, hemos obtenido que en ambos estadios no existen diferencias significativas en los niveles de SOX2 entre retinas de ratones silvestres y *Crb1^{rd8}* ($p>0,05$) (**Fig. 46K**). Además, en ambos genotipos aumentan los niveles relativos de proteína a P90 con respecto a P7, estando ese aumento en torno a 1,5 órdenes de magnitud (**Fig. 46L**). Cabe destacar en los WB realizados frente a SOX2, que en todos los casos analizados se observan diferentes bandas a una altura equivalente de entre 37 y 50 kDa, no apreciando marcaje en pesos moleculares superiores (**Fig. 46J**). Estas bandas podrían corresponder a algunas de las modificaciones postraduccionales descritas para SOX2, exceptuando la sumoilación, ya que esta modificación hace que SOX2 alcance un peso molecular de entre 50 y 70 kDa (Tsuruzoe et al., 2006). Por otra parte, no se observan diferencias en la naturaleza de estas bandas entre ratones mutantes y control (**Fig. 46J**).

1.4.1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS CANALES DE K⁺ Kir 4.1 EN LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

La membrana plasmática de la célula de Müller es muy permeable al K⁺, presentando gran cantidad de canales Kir de K⁺, entre ellos, los canales del tipo Kir 4.1 que se localizan de forma polarizada en la membrana de este tipo celular (Bringmann et al., 2006; Ishii et al., 1997; Kofuji et al., 2002). En muchas de las lesiones o alteraciones retinianas se produce un descenso en la conductancia del K⁺ por parte de las células de Müller, lo cual se debe, en gran parte, a la pérdida o deslocalización de los canales Kir 4.1 (Bringmann et al., 2006). Así pues, para estudiar la distribución de estos canales en la retina de ratones control y mutante *Crb1^{rd8}*, hemos realizado marcajes inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para detectar la proteína Kir 4.1.

Las tinciones frente a Kir 4.1 a la edad de P7 ponen de manifiesto que los canales de K⁺ se distribuyen a lo largo de todas las prolongaciones de las células de Müller en retinas de ratones mutantes y silvestres, aunque este marcaje es más intenso en las capas más esclerales, como la CPE, la CNE y la MLE (**Fig. 47A-C**). En este estadio no se observan grandes diferencias entre ratones mutantes y control en relación al patrón de marcaje de Kir4.1 en la MLE, ya que

la tinción se distribuye de forma uniforme a lo largo de todo este estrato (**Fig. 47A-C**). Sin embargo, en las áreas de la retina donde comienzan a formarse rosetas de fotorreceptores, la tinción para estos canales de K^+ evidencia la desorganización de los procesos gliales que cruzan la CNE, y a nivel de la CPE se aprecia pérdida de marcaje (**Fig. 47C**).

En las retinas control adultas, los canales de potasio Kir 4.1 se sitúan a lo largo de toda la célula de Müller, si bien, el marcaje más intenso se localiza en las zonas más internas de la retina, a nivel de la MLI, CCG, CPI y las áreas más basales de la CPE (**Fig. 47D**). En los ratones mutantes *Crb1^{rd8}* P90 se pierde gran parte de la tinción para Kir 4.1 (**Fig. 47E-F, H**). En las áreas de la retina mutante carentes de rosetas de fotorreceptores, se aprecia una menor intensidad en el marcaje para Kir 4.1 en las zonas más esclerales de la retina, así como en la porción más basal de la CPE, donde la proteína prácticamente desaparece (**Fig. 47E**). Los procesos que rodean los núcleos de la CNI también presentan un marcaje menos intenso. Sólo permanece una tinción fuerte para Kir 4.1 a nivel de la MLI, la CCG y en algunas de las prolongaciones radiales que cruzan la CPI (**Fig. 47E**); si bien, la cantidad de estos procesos Kir 4.1 positivos parece ser mucho menor en las retinas mutantes en comparación con las control (**Fig. 47D-E**). En las zonas donde se han formado rosetas de fotorreceptores, el marcaje en las partes más esclerales de la retina, así como en la CNI es aún menos intenso, aunque parece existir una tinción residual en los procesos que envuelven a las rosetas (**Fig. 47F**). Al igual que en las zonas con menor degeneración, existe un fuerte marcaje para Kir 4.1 en la MLI, CCG y en algunos de los procesos gliales que atraviesan la CPI (**Fig. 47F**). Para comprobar la naturaleza de esos procesos radiales hemos realizado dobles marcajes para Kir 4.1 y GFAP. Las prolongaciones de las células de Müller en estado reactivo que cruzan la CPI y son GFAP positivas, presentan marcaje para Kir 4.1 (**Fig. 47G-H**); sin embargo, también hemos detectado algunos procesos gliales de la CPI Kir4.1 positivos, que son GFAP negativos (**Fig. 47G-H**).

1.4.1.5. LA VASCULARIZACIÓN EN LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}* EN EL ESTADIO DE P7

Dado que los procesos de gliosis provocan alteraciones en la vascularización (Bringmann et al., 2006) y, conociendo la importancia que las proteínas CRB parecen tener en la determinación de muchos tipos celulares, especialmente de naturaleza epitelial, nos propusimos analizar si CRB1 podría estar implicada en el desarrollo de la red vascular en la retina, donde son cruciales los procesos de adhesión y que no termina de desarrollarse hasta el estadio postnatal de P21 (Dorrell et al., 2002; Edwards et al., 2011; Saint-Geniez and D'Amore, 2004). Para analizar si existen diferencias en el desarrollo de la vascularización entre retinas control y mutante *Crb1^{rd8}*, llevamos a cabo tinciones de inmunofluorescencia *in toto* en el estadio P7, usando el marcador de la isolectina B4 (**Fig. 48**).

Resultados

Como mencionamos en la introducción, los vasos sanguíneos centrales penetran en la retina a través del disco óptico (DO). En las retinas de los ratones silvestres y mutantes se observa que desde el DO se distribuyen radialmente vasos de gran calibre que se ramifican en capilares de menor diámetro, constituyendo una extensa red vascular que cubre toda la superficie de la cara vitreal de la retina (**Fig. 48A-B**). A P7, los vasos sanguíneos llegan a alcanzar la periferia de la retina siendo en ese área donde, visualmente, podemos encontrar la mayor concentración de capilares sanguíneos en las retinas de ambos genotipos (**Fig. 48A-B**). Para el estudio en detalle de la ramificación de la vascularización de la cara interna de la retina, dividimos las retinas en cuatro partes diferentes según su orientación: dorsotemporal (DT), dorsonasal (DN), ventrotemporal (VT) y ventronasal (VN) (**Fig. 48A-D**).

En estas 4 regiones de la retina hemos cuantificado la intensidad de la tinción obtenida con el marcador isolectina B4, usando para ello 4 retinas control y 4 mutantes (n=4). La intensidad de tinción se midió seleccionando al azar 4 áreas de cada una de las regiones en estudio y usando el programa informático *ImageJ*. Los resultados muestran el porcentaje medio de intensidad de la tinción en un área de 250 μm^2 (**Fig. 48E**). El marcaje en cada una de las 4 regiones en análisis de las retinas silvestres presenta una intensidad en torno al 15% (**Fig. 48C;E**). Este porcentaje aumenta hasta situarse aproximadamente en el 20% en todas las regiones de las retinas mutantes (**Fig. 48D;E**). El análisis estadístico de la *t de student* muestra que existen diferencias significativas (* $p < 0,05$) en la intensidad de la tinción en las áreas DT y DN, y altamente significativas (** $p < 0,01$) en las regiones VT y VN (**Fig. 48E**).

Cualitativamente se aprecia que la diferencia en la intensidad de la tinción puede ser debida a una mayor densidad de los vasos sanguíneos en las retinas mutantes con respecto a las controles. Para comprobar esa observación calculamos el área ocupada por vasos sanguíneos en cada una de las áreas en estudio, empleando para ello 4 retinas silvestres y 4 *Crb1^{rd8}* (n=4). Se eligieron al azar 5 áreas de cada una de las regiones en estudio, y mediante el programa informático *Image J* se calculó el porcentaje del área ocupado por la red vascular en función de la superficie seleccionada. Para ello, el programa establece un umbral de intensidad de tinción, de forma que elimina el marcaje de fondo de la retina, cuantificando únicamente aquel presente en los vasos sanguíneos. Así, se observa que, aproximadamente el 45% de la superficie en cada región de las retinas control está ocupada por capilares sanguíneos (**Fig. 48F**). Por el contrario, en las retinas mutantes se detecta una mayor vascularización en la región VN, de forma que, en esa área, casi el 60% de la superficie está ocupado por vasos sanguíneos (**Fig. 48F**); mientras que en la región VT ese porcentaje alcanza el 50%, y es sólo del 45% en las áreas DT y DN (**Fig. 48F**). Tras analizar mediante el test paramétrico de la *t de Student* la diferencia entre cada una de las regiones de las retinas silvestres y *Crb1^{rd8}*,

obtenemos que en el área NV existen diferencias altamente significativas (** $p < 0,01$) y significativas en la región NT ($p < 0,05$) (**Fig. 48F**). Sin embargo, no existen diferencias significativas en las otras dos áreas en estudio ($p > 0,05$) (**Fig. 48F**). Finalmente, también analizamos estadísticamente las diferencias existentes entre las distintas regiones de las retinas mutantes. Para ello, llevamos a cabo un test ANOVA de un factor, mediante el cual encontramos diferencias altamente significativas en la densidad de vasos sanguíneos entre las diferentes áreas analizadas (** $p < 0,01$). Para descubrir cuáles de esas regiones son las que presentan diferencias entre sí, realizamos el test *post-hoc* de *HSD de Tukey*. Los resultados de este test indican que la diferencia en la densidad de la vascularización entre el área NV y NT es estadísticamente significativa ($p = 0,047$), y altamente significativa entre los áreas NV y/o DT y DN (** $p = 0,003$). No existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en la densidad de vasos sanguíneos entre el resto de las regiones (**Fig. 48G**).

1.4.2. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER *IN VITRO*

Para analizar de manera aislada el comportamiento de las células de Müller de los ratones mutantes para CRB1 frente a las de los ratones silvestres, hemos realizado cultivos primarios siguiendo una modificación del protocolo establecido por D. Hicks e Y. Courtois en 1990 (Hicks and Courtois, 1990).

1.4.2.1. SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS Y CARACTERIZACIÓN

Las células de Müller se han cultivado en un medio que favorecía su crecimiento y diferenciación, descrito en el apartado de Material y Métodos. A los dos días de cultivo (DIC2), observamos numerosos agregados celulares adheridos a la superficie de la placa (no mostrado). A partir de esos agregados se empiezan a diferenciar las células, de forma que a DIC5, momento del primer cambio de medio, se aprecian algunas células aisladas rodeando a estos agregados (**Fig. 49A**). A DIC9 ya hay numerosas células adheridas a la placa de cultivo, creciendo y estableciendo uniones entre sí (**Fig. 49B**), y algunas parecen adquirir una morfología parecida a la de las células de Müller en la retina (**Fig. 49B**). Sin embargo, a pesar de la alta diferenciación observada en este estadio, aún se aprecian agregados celulares a partir de los cuales se generan nuevas células (**Fig. 49B**). A DIC15 se observa un elevado número de células tapizando el fondo de la placa de cultivo, unidas entre sí y con el aspecto alargado típico de glía radial (**Fig. 49C**). No se visualizan agregados celulares y la confluencia de estas células es superior al 80%, por lo que en este periodo se realiza su resiembra (**Fig. 49C**). A DIC21, las células han vuelto a adherirse a la placa de cultivo, estableciendo nuevas uniones entre ellas y su aspecto es similar al descrito para DIC15 (**Fig. 49D**).

Resultados

Para caracterizar los cultivos primarios llevamos a cabo marcajes inmunofluorescentes para proteínas específicas de las células de Müller (**Fig. 49E-H**) y otras no presentes en estas células para descartar la contaminación de los cultivos con otros tipos celulares. Observamos que el 100% de las células son positivas para vimentina, GLAST y CD44 (**Fig. 49E-G**). La tinción para la proteína vimentina tiñe por completo el citoplasma de la célula, siendo el marcaje especialmente intenso en las regiones perinucleares (**Fig. 49E**). En el caso de la inmunofluorescencia frente al transportador GLAST, observamos marcaje por toda la célula, aunque con especial intensidad en las áreas próximas al núcleo, así como en las prolongaciones celulares (**Fig. 49F**). El marcaje de la glicoproteína CD44 tiñe de forma tenue todo el citoplasma de la célula de Müller (**Fig. 49G**). Esa tinción se vuelve más intensa en la periferia celular, hacia la zona donde se dispone la membrana plasmática, y a lo largo de los filopodios (**Fig. 49G**). Además, CD44 parece acumularse en algunas regiones del citoplasma celular, ya que se observa un marcaje punteado en ciertas zonas del citosol (**Fig. 49G**). También hemos realizado tinciones para poner de manifiesto la proteína GFAP. En este caso, no todas las células en cultivo son positivas para este marcador de glía reactiva (**Fig. 49H**). La inmunofluorescencia frente a GFAP tiñe todo el citoplasma, de forma que el marcaje pone de manifiesto los filamentos intermedios que recorren el interior celular (**Fig. 49H**).

Para evaluar la posible contaminación de los cultivos primarios de células de Müller con otros tipos celulares, realizamos marcajes frente a una proteína de la superficie de los fibroblastos (**Fig. 49I**), y una proteína típica del epitelio pigmentario, RPE65 (**Fig. 49J**). En ninguno de los dos casos observamos marcaje positivo para estas proteínas en las células de Müller en cultivo (**Fig. 49I-J**).

1.4.2.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD Y DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Para analizar la viabilidad de las células de Müller en cultivo llevamos a cabo ensayos de MTT, que tiene en cuenta la supervivencia y proliferación celular. Para ello utilizamos células de 15 y 21 días en cultivo, DIC15 y DIC21, estadios ambos en los que la confluencia celular es máxima. La viabilidad celular se representa en función de la absorbancia, medida a una longitud de onda de 570 nm (**Fig. 50A, E**). Para comprobar la proliferación celular, se realizaron marcajes frente a la proteína Ki67, marcador típico de división celular (von Bohlen und Halbach, 2011). Contamos el número de células teñidas para Ki67, representando los resultados del recuento como el porcentaje de células Ki67 positivas respecto al número total de células del cultivo. Como en el caso del análisis de la viabilidad, elegimos para el estudio de la proliferación celular, cultivos de 15 y 21 días (**Fig. 50B-D, F-H**).

A DIC15, las células de Müller procedentes de ratones control presentan una viabilidad inferior a las células cuyo origen son ratones *Crb1^{rd8}* correspondiendo, respectivamente, a $1,407 \pm 0,31$ vs $2,657 \pm 0,31$ (los resultados representan la media de los valores medidos en 6 cultivos diferentes, procedentes de 6 ratones distintos ($n=6$) \pm SEM). A partir del test paramétrico de la *t de student* se analiza la significación de esa diferencia, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa ($*p<0,05$) (**Fig. 50A**). Mediante inmunofluorescencias frente a Ki67 realizadas en los cultivos celulares, analizamos si la variación en la viabilidad se debe a alteraciones en la proliferación celular. De esta forma, a DIC15, las tinciones para Ki67 sobre células de Müller mutantes y control indican que parte de las células presentes en el cultivo se encuentran en proliferación (**Fig. 50B, C**). Tras realizar el recuento se obtiene que el $12,34 \pm 1,27\%$ de las células de Müller de ratones silvestres son positivas para Ki67, mientras que en ratones *Crb1^{rd8}* ese porcentaje aumenta hasta el $20,37 \pm 2\%$ (porcentaje de la media del recuento de 4 cultivos procedentes de 4 ratones distintos ($n=4$) \pm SEM). El análisis de la diferencia, usando el test paramétrico de la *t de student*, muestra que a DIC15 la diferencia es significativa ($*p<0,05$) (**Fig. 50D**). Por tanto, la mayor viabilidad de las células de Müller *Crb1^{rd8}* en cultivo podría ser causada por su alta proliferación.

Por el contrario, el ensayo de MTT a DIC21 señala que las células de Müller que provienen de ratones silvestres presentan una mayor viabilidad celular que las procedentes de ratones mutantes, siendo estos valores $1,81 \pm 0,23$ vs $0,85 \pm 0,3$, respectivamente ($n=10$ en las células control; $n=7$ para ratones *Crb1^{rd8}*). El test de la *t de student* indica que esa diferencia es estadísticamente significativa ($*p<0,05$) (**Fig. 50E**). De nuevo realizamos tinciones para el marcador de proliferación Ki67 en los cultivos celulares. Como en el caso anterior, algunas de las células de Müller en cultivo se marcan con anticuerpos frente a Ki67, indicando su estado proliferativo (**Fig. 50F-G**). En concreto, el $38,46 \pm 2,74\%$ de células de Müller silvestres son positivas para Ki67, frente al $26,86 \pm 4\%$ ($n=5$ para las células silvestres; $n=4$ en mutantes) (**Fig. 50H**). Mediante el test de la *t de student* se obtiene que esa diferencia es estadísticamente significativa ($*p<0,05$). Así pues, la menor viabilidad de las células de Müller *Crb1^{rd8}* en cultivo puede ser debido a una baja tasa de proliferación con respecto a la ocurrida en células silvestres en este estadio.

1.4.2.3. LAS UNIONES ADHERENTES EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO. INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A β -CATENINA

Según estudios previos, y lo expuesto en el presente trabajo, la mutación en CRB1 parece interferir en la correcta formación o mantenimiento de las uniones entre células de Müller y fotorreceptores en la MLE. Para estudiar las posibles alteraciones de estas uniones en las

Resultados

células de Müller con defectos en esta proteína, hemos analizado su comportamiento en cultivos primarios mediante técnicas de inmunofluorescencia frente a la proteína β -catenina, así como estudios de WB.

Tanto a DIC15 como a DIC 21, la tinción para la proteína β -catenina pone de manifiesto su localización a nivel de la membrana plasmática en las células de Müller en cultivo. Este patrón de marcaje se observa en células procedentes de retinas control y de retinas *Crb1^{rd8}* y no se aprecian diferencias aparentes entre ambos genotipos (**Fig. 51A-D**). En todos los casos analizados, los anticuerpos frente a la proteína β -catenina tiñen la mayor parte de la periferia celular, sin embargo, el grueso del marcaje parece localizarse a nivel de los filopodios, así como en las uniones que parecen establecerse entre las diferentes células del cultivo (**Fig. 51A-D**).

Para estudiar los posibles cambios en los niveles proteicos de β -catenina, llevamos a cabo análisis de WB. Para ello usamos proteínas extraídas de células de Müller de 15 y 21 días en cultivo procedentes de retinas de ratones control y mutante. Se aprecia en todos los casos la banda de la proteína a una altura equivalente a 92 kDa. La intensidad y tamaño de la banda no muestra diferencias entre edades de cultivos, ni entre genotipos (**Fig. 51E**). Para comprobarlo llevamos a cabo la cuantificación de los WB frente a la proteína β -catenina de 5 cultivos diferentes para cada estadio y genotipo (n=5). Analizamos los datos obtenidos mediante el test paramétrico de la *t de student* y, a pesar de que en ambos estadios los niveles relativos de β -catenina son superiores en las células de Müller de ratones mutantes con respecto al control, las diferencias no son significativas ($p>0,05$) (**Fig. 51F**). En ambos genotipos se aprecia un leve descenso en la cantidad de proteína en el estadio de DIC21 con respecto a DIC15. Esa disminución del nivel de β -catenina tiene una orden de magnitud similar en ratones controles y mutantes (**Fig. 51G**).

1.4.2.4. GFAP Y SOX2 EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO

La proteína GFAP es un indicador del estado de reacción (o gliosis) de las células de Müller (Ekstrom et al., 1988; Lewis and Fisher, 2003). Como comentamos en el apartado 1.4.2.1. de esta sección, y mostramos en la **figura 49H**, esta proteína sólo se expresa en algunas de las células de Müller en cultivo, siendo posible observar su presencia en células control y mutantes para CRB1 a DIC15 y DIC21 (**Fig. 52A-D**). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en tejidos, no hemos encontrado diferencias en el nivel de GFAP entre las células de los dos genotipos; aunque visualmente observamos una aparente mayor cantidad de células GFAP positivas a DIC15 comparado con DIC21, en cultivos controles y mutantes (**Fig. 52A-D**).

SOX2 es un factor de transcripción clave en la diferenciación y el mantenimiento del fenotipo glial de las células de Müller en la retina del ratón. Está presente en todas las células

de Müller en cultivo en los dos estadios analizados, DIC15 y DIC21, tanto en las células silvestres como en las *Crb1^{rd8}*. Aparte de localizarse en el núcleo, también se observa marcaje para la proteína en el citoplasma alrededor del núcleo (**Fig. 52E-L**). Para analizar si la distribución de SOX2 se ve afectada por el estado reactivo de la célula, llevamos a cabo dobles marcajes de inmunofluorescencia de este factor de transcripción con la proteína GFAP en células de Müller en cultivo controles y mutantes a DIC15 y DIC21. En las células GFAP⁺ observamos que la localización de SOX2 es mayoritariamente nuclear (**Fig. 52E-L**); sin embargo, en las células de Müller donde no detectamos la expresión de proteína GFAP, el factor de transcripción SOX2 se distribuye fundamentalmente por el citoplasma de la célula, rodeando el núcleo (**Fig. 52E-L**). Esta diferencia en la localización de SOX2 dependiente de la expresión de GFAP se aprecia en todas las situaciones analizadas (**Fig. 52E-L**).

SOX2 es una proteína que puede sufrir numerosas modificaciones postraduccionales que parecen provocar cambios en su localización celular, así como en su peso molecular (Baltus et al., 2009; Tsuruzoe et al., 2006). Mediante análisis de WB, hemos estudiado los niveles de SOX2, así como la presencia de diferentes isoformas. Para ello utilizamos células de Müller obtenidas de animales silvestres y mutantes a DIC15 y DIC21. Elegimos cultivos procedentes de 5 retinas diferentes de cada estadio y genotipo en análisis (n=5). Los resultados de WB muestran que en todos los casos, la mayor cantidad de proteína se localiza en un peso molecular superior a 50 kDa e inferior a 75 kDa (**Fig. 52M**). Esos valores de peso molecular se encuentran en el rango de lo descrito para la isoforma de Sox2 sumoilizada (Tsuruzoe et al., 2006). En ocasiones, es posible observar parte de la proteína en su peso molecular estimado que corresponde a 34 kDa, o incluso en pesos moleculares correspondientes a otras modificaciones postraduccionales para el factor de transcripción. Sin embargo, en todos los casos, el porcentaje de proteína en la forma sumoilizada parece muy superior al resto de formas de la proteína (**Fig. 52M**). Para comprobar si existen diferencias entre genotipos de la misma edad de cultivo, realizamos la cuantificación de la intensidad de las bandas positivas para la isoforma de SOX2 sumoilizada. Tras llevar a cabo el test paramétrico de la *t de student*, concluimos que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre células de Müller en cultivo procedentes de retinas control y de retinas *Crb1^{rd8}*, ni a DIC15, ni a DIC21 (**Fig. 52N**). Además, en ambos genotipos existe un ligero descenso, inferior a 1 orden de magnitud, en la cantidad de proteína de SOX2 sumoilizada a DIC21 respecto a DIC15, siendo ese descenso algo superior en las células silvestres comparadas con las mutantes (**Fig. 52O**).

1.4.2.5. REGISTROS DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO

Resultados

Las células de Müller son altamente permeables al K^+ presentando en su membrana plasmática de forma polarizada, canales kir 4.1 de K^+ dependientes de voltaje. Anteriormente hemos descrito que los animales mutantes y control presentan diferencias en la localización de estos canales Kir 4.1 de K^+ cuando los analizamos mediante IHQ sobre tejido. Debido a la importancia que presenta la variación en la conductancia al K^+ en diferentes degeneraciones retinianas, quisimos analizar las características eléctricas de este tipo celular de forma aislada. Para ello registramos las células de Müller en cultivo usando la técnica de *patch-clamp*.

Para poder desarrollar un registro adecuado es necesario una baja densidad celular. Por ese motivo, tras llevar a cabo la resiembra celular a los quince días de cultivo, sembramos diferentes concentraciones de células en cada uno de los pocillos a registrar permitiendo su crecimiento adheridas al sustrato durante una semana hasta DIC21. Transcurrido ese tiempo, determinamos visualmente que la concentración ideal para registrar las células de Müller en cultivo, tanto controles como mutantes, era de aproximadamente 1000 células por ml. Sobre esas células llevamos a cabo la técnica de *patch-clamp* usando la configuración de registro en célula entera midiendo la variación del voltaje tras aplicar diferentes pulsos de intensidad. Para ello se despolarizan las células desde un potencial negativo de -100 mV mediante rampas despolarizantes de 5 mV/ms. Comparando las dos curvas obtenidas, una para las células de Müller procedentes de animales control (**Fig.53A**) y otra para las células mutantes (**Fig. 53B**) no se aprecian diferencias significativas en la relación corriente voltaje, lo que indica que bajo estas condiciones de cultivo la expresión de los canales iónicos dependientes de voltaje es similar en ambos casos.

El hecho de no haber encontrado diferencias entre células de Müller control y mutantes puede estar debido a que dichas células pierden su polaridad cuando están en cultivo y los canales Kir 4.1 de K^+ se localizan de manera polarizada en la célula en el tejido. Por tanto, sería más apropiado realizar los registros sobre células de Müller disociadas sin cultivar.

1.5. TRANSFECCIÓN PROTEICA MEDIANTE EL AGENTE CHARIOT *IN VITRO* E *IN VIVO*

En este trabajo hemos analizado la capacidad de las células de Müller en cultivo y en retinas *in vivo* de ser transfectadas con el agente de transfección de proteínas Chariot (Active Motif®), para en un futuro poder ser utilizado como vehículo para la transfección de sustancias en este tipo celular en ensayos de diferentes tipos de terapias. Mediante este método, la proteína a transfectar se libera en su forma nativa y activa en el citoplasma celular, y allí se incorpora a la maquinaria de transporte de la célula para dirigirse a su destino final.

En primer lugar probamos el método de transfección en células *in vitro*. Para ello las células de Müller en cultivo se transfectan con una proteína control, en este caso la enzima β -galactosidasa, y posteriormente se tiñen para detectar su actividad enzimática. Hemos observado que, tanto en los cultivos procedentes de retinas control, como en aquellos obtenidos a partir de tejido mutante *Crb1^{rd8}*, el rendimiento de la transfección es muy alto. El marcaje positivo que pone de manifiesto la actividad de la enzima β -galactosidasa se aprecia en la mayor parte de las células de Müller de ambos genotipos (**Fig. 54A-B**). Finalmente, realizamos varios controles negativos para probar la especificidad y eficacia del método de transfección. En el primero de ellos realizamos la técnica histoquímica frente a la enzima β -galactosidasa sin haber realizado la transfección previa. En este caso no se observa marcaje positivo para la actividad enzimática en las células de Müller en cultivo, lo que prueba la especificidad de la tinción (**Fig. 54C**). En el segundo de los controles negativos probamos la eficacia del agente de transfección. Para ello intentamos transfectar la enzima β -galactosidasa sin usar el péptido Pep-1, que es el agente de transfección utilizado en el método Chariot. Tras realizar la tinción histoquímica no se aprecia marcaje para la actividad enzimática de β -galactosidasa, lo que indica que es necesario usar Pep-1 para que la enzima alcance el citoplasma celular (**Fig. 54C'**).

Para llevar a cabo la transfección en las células de Müller *in vivo* de la enzima β -galactosidasa usamos dos tipos de aproximación: inyecciones intravitreales e inyecciones subretinales en ratones silvestres utilizando las técnicas descritas en Material y Métodos. Tras realizar ambos tipos de inyecciones, se permite una supervivencia del ratón de 3 y 5 horas, y tras procesar el tejido, se detecta la actividad de la enzima β -galactosidasa. Con los dos tipos de inyección logramos una mayor eficacia del método tras 5 horas de supervivencia del ratón (**Fig. 54D-G**), por lo que en esta memoria presentamos los resultados referidos a ese tiempo. En las inyecciones intravitreales se observa marcaje para la actividad de la enzima a nivel de la CCG; sin embargo, no se aprecia tinción positiva en las capas más externas de la retina (**Fig. 54D**). Cuando realizamos inyecciones subretinales, detectamos la función enzimática en diferentes estratos retinianos (**Fig. 54E-G**). Así, en las zonas más esclerales cercanas al punto de inyección, como son los segmentos de los fotorreceptores, se observa una alta actividad para la enzima β -galactosidasa (**Fig. 54G**). Además, en zonas más alejadas a la inyección, es posible detectar marcaje positivo en casi la totalidad de las capas de la retina (**Fig. 54F**), e incluso a nivel de las partes más vitreales, llegando a alcanzar la CCG (**Fig. 54E**). Por tanto, el rendimiento de la inyección subretinal parece superior al obtenido con la inyección intravitreal.

2. EVIDENCIA INMUNOCITOQUÍMICA DE LA LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN ADULTO Y EN DESARROLLO POSTNATAL

La proteína CRB3 ha sido ampliamente estudiada en diferentes líneas celulares, donde se ha demostrado que regula el establecimiento y estabilidad de las uniones celulares, así como el desarrollo del cilio primario (Bazellieres et al., 2009; Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Lemmers et al., 2004). Su presencia se ha demostrado en la retina, donde se localiza a nivel de la RSA de la MLE, tanto en células de Müller como en fotorreceptores (van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Sin embargo, se desconoce si se localiza en otros estratos de la retina, a pesar de que se haya sugerido su presencia en la CPE, así como en el cilio primario de conexión de los fotorreceptores (Gosens et al., 2008). Además, también se desconoce la función que puede desarrollar CRB3 en la retina. Por tanto, en este apartado de los resultados de la presente Tesis Doctoral, analizamos la localización de esta proteína en la retina del ratón en diferentes estadios del desarrollo y en estado adulto, para intentar dilucidar su función en este tejido.

2.1. ANÁLISIS GENERAL DE LA PRESENCIA DE CRB3 EN LA RETINA ADULTA Y DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

Para estudiar la localización de esta proteína, hemos usado dos anticuerpos, uno comercial distribuido por Santa Cruz Biotechnology®, y que nombramos como gCRB3, y un anticuerpo policlonal específico para detectar esta proteína en retina de ratón diseñado por nuestro grupo de trabajo y generado por la empresa GenScript, y que hemos denominado rCRB3. Mediante análisis por WB testamos la especificidad de ambos anticuerpos para reconocer a la proteína CRB3 en la retina del ratón. De esta forma observamos que los anticuerpos detectan dos bandas en este tejido. Estas bandas tienen un peso molecular que varía entre 20 y 28 kDa (**Fig. 55A, D**), lo que corresponde con lo publicado para las dos isoformas glicosiladas conocidas de CRB3, la isoforma que termina en la secuencia ERLI, y la isoforma que termina en la secuencia CLPI (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Makarova et al., 2003).

Una vez comprobada la especificidad del anticuerpo, llevamos a cabo pruebas inmunohistoquímicas para conocer la distribución de la proteína en la retina del ratón adulto y en desarrollo postnatal. En el estadio adulto, CRB3 se localiza a nivel de ambas capas plexiformes de la retina, la CPE y la CPI, si bien, el marcaje en esta capa es heterogéneo (**Fig. 55B, E**). Además, CRB3 está presente en los SI de los fotorreceptores, donde su marcaje es

especialmente intenso en la zona próxima a la MLE y en el área entre los SI y SE de los fotorreceptores (**Fig. 55B, E**). La especificidad del marcaje fue probada mediante un ensayo de competitividad para el anticuerpo anti-CRB3, mediante el cual se elimina todo el marcaje para la proteína, verificando su especificidad (**Fig. 55C, F**). Dado que la señal obtenida por el anticuerpo gCRB3 es más intensa que la que se logra con el anticuerpo rCRB3, decidimos hacer el resto de marcajes inmunohistoquímicos con el anticuerpo gCRB3. Respecto al desarrollo postnatal, estudiamos la localización de la proteína a dos edades diferentes, a P0, que es cuando el cilio de conexión de los fotorreceptores empieza a desarrollarse, y a P4, edad previa al completo establecimiento de la CPE. En ambos estadios del desarrollo la tinción para la proteína CRB3 revela que ésta se localiza en la CPI en formación, y en diferentes áreas de la incipiente retina externa (**Fig. 55G-H**). Posteriormente, a la edad de P4 es posible distinguir la presencia de CRB3 dentro de la retina externa en dos lugares diferenciados: en la zona donde se va a establecer la CPE y en el área donde se están desarrollando los fotorreceptores (**Fig. 55H**). El ensayo de competitividad para CRB3 a P0 y a P4 muestra que el marcaje para esta proteína es específico (**Fig. 55I-J**).

A continuación analizamos la localización de la proteína CRB3 en los diferentes tipos celulares que conforman la retina del ratón, diferenciando el estadio adulto del desarrollo postnatal.

2.2. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN ADULTO

En primer lugar estudiamos el patrón de distribución de CRB3 en la retina del ratón adulto, analizando cada una de las áreas donde la proteína está presente.

2.2.1. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LOS SEGMENTOS INTERNOS DE LOS FOTORRECEPTORES

Para estudiar la presencia de CRB3 en los SI de conos y bastones hicimos dobles marcajes para CRB3 y diferentes proteínas específicas de estos tipos celulares: recoverina, presente en ambos tipos de fotorreceptores, dos anticuerpos M-opsina y S-opsina y un marcador, PNA, que tiñen específicamente los conos.

Al igual que los observado en la sección 1.3.1. de estos resultados, el marcaje para la proteína recoverina pone de manifiesto su localización en ambos tipos de fotorreceptores, a nivel de los SI, de los cuerpos celulares ubicados en la CNE y de sus terminales pre-sinápticos de la CPE (**Fig. 56B; 59H**). La doble tinción con CRB3 muestra colocalización parcial de ambas proteínas en los SI de conos y bastones (**Fig. 56A-C**). PNA, cuya localización también la

Resultados

estudiamos con anterioridad, es un marcador específico de conos que tiñe la superficie externa de los pedículos en la CPE, de los SI y de algunos SE (**Fig. 56E; 59B**). Para marcar los conos tipo M, usamos un anticuerpo frente a la proteína M-opsina, detectando esta proteína a lo largo de todo el segmento del fotorreceptor, en el soma de los conos rodeando a los núcleos de la CNE y en algunos de los terminales sinápticos (**Fig. 56H; 59E**). Teñimos los conos tipo S realizando una IHQ frente a S-opsina, en la que se muestra su localización exclusiva a nivel de los SE de estos conos (**Fig. 56I**). Los dobles marcajes para CRB3 y cada uno de estos tres marcadores indican colocalización parcial en los diferentes tipos de conos (**Fig. 56D-I**). CRB3 parece estar presente hacia la base del SI, en el mioide del cono (**Fig. 56D,F-H**); sin embargo, se observan otros lugares en el SI donde se localizan las opsinas o PNA, donde no se aprecia marcaje para CRB3 (**Fig. 56D-I**).

Una vez conocida la presencia de CRB3 en los SI de ambos tipos de fotorreceptores, estudiamos su patrón de distribución en los mismos. Para ello llevamos a cabo dobles marcajes para CRB3 y diferentes proteínas presentes en esta área: β -catenina, MPP4, giantin, AT y rodopsina (**Fig. 57B, E, H, K, N**).

β -catenina, como mostramos anteriormente, es una proteína que forma parte de las uniones adherentes, por los que se localiza a nivel de las uniones establecidas entre fotorreceptores y células de Müller en la MLE (**Fig. 57B**). En el doble marcaje para CRB3 y β -catenina no se observa colocalización entre ambas proteínas, ya que CRB3 se localiza en la RSA de la MLE, es decir, de forma apical a las uniones adherentes teñidas con β -catenina (**Fig. 57A-C**).

La ausencia de colocalización entre estas dos proteínas en la MLE, nos hizo estudiar la distribución precisa de CRB3 en la RSA. Como analizamos en el apartado 1.2.2.2, el anticuerpo que generamos frente a MPP4 sitúa a esta proteína en la RSA de la MLE y en la CPE (**Fig. 38B; 57E; 59K**). A nivel de la RSA de la MLE, la doble tinción para CRB3 y MPP4 muestra colocalización parcial de estas dos proteínas (**Fig. 57D-F**). La tinción para CRB3 no parece exclusiva de la membrana del fotorreceptor, sino que encontramos un marcaje punteado por el segmento interno. Para determinar en qué orgánulos se encuentra llevamos a cabo dobles inmunohistoquímicas con CRB3 y el anticuerpo giantin, específico para la detección del aparato de Golgi. Este orgánulo se ubica hacia la zona más vitreal del segmento interno del fotorreceptor (**Fig. 57H**). La doble tinción CRB3/giantin muestra colocalización entre ambas proteínas en el área membranoso de Golgi, excepto en algunos perfiles positivos para giantin y negativos para CRB3 (**Fig. 57G-I**).

Como hemos indicado anteriormente, el marcaje para CRB3 parece más intenso hacia la zona donde se unen los SI y externos de los fotorreceptores (**Fig. 55B, E; 57A, G, J, M, P**). En esta área se encuentra el cilio de conexión, que es la estructura que enlaza los SI y externos de los fotorreceptores. Este cilio se pone de manifiesto con anticuerpos frente a diferentes proteínas, como la AT que marca parte del citoesqueleto presente en el cilio (**Fig. 57K**). La doble tinción AT/CRB3 revela que ambas proteínas se localizan en el área del cilio de conexión y colocalizan parcialmente (**Fig 57J-L**). Se observan algunos puntos donde las dos proteínas están presentes, pero la mayoría del marcaje para CRB3 parece ser adyacente al cilio de conexión teñido para AT (**Fig 57L**). Para confirmar la presencia de CRB3 en la zona donde se unen los SI y externos de los fotorreceptores, llevamos a cabo un marcaje doble para CRB3 y la proteína rodopsina, cuya localización mayoritaria es a nivel de los SE de los bastones (**Fig. 57N**). El doble marcaje CRB3/rodopsina muestra colocalización entre ambas proteínas en la zona más apical del segmento interno (**Fig. 57M-O**).

Hasta la fecha sólo se ha detectado a CRB3 en la RSA de la MLE, tanto en los SI de los fotorreceptores como en las microvellosidades apicales de las células de Müller (van Rossum et al., 2006). En nuestro trabajo hemos analizado su presencia en los fotorreceptores. Para confirmar la presencia de CRB3 en las microvellosidades de las células de Müller, realizamos dobles inmunofluorescencias con un anticuerpo frente a la proteína CRALBP, el cual tiñe por completo a la célula de Müller (**Fig. 57Q; 59Q; 61K**). El doble marcaje CRB3/CRALBP muestra algunos puntos de colocalización para ambas proteínas a nivel de las microvellosidades apicales de las células de Müller (**Fig. 57P-R**).

2.2.2. DISTRIBUCIÓN DE CRB3 EN LA CAPA PLEXIFORME EXTERNA

Como se menciona anteriormente, CRB3 se localiza en ambas capas plexiformes de la retina (**Fig. 55B**). En este apartado analizamos su distribución en la más escleral, la CPE, donde los fotorreceptores realizan sinapsis con las células horizontales y bipolares.

En primer lugar estudiamos la posible distribución de CRB3 a nivel de los terminales sinápticos de los fotorreceptores. Para ello llevamos a cabo dobles marcajes para la detección de CRB3 y de proteínas presentes en los mismos, como bassoon, sinaptofisina y VGLUT1 (**Fig. 58B, E, H**). La proteína bassoon se localiza en la región citoplasmática de los terminales presinápticos de conos y bastones (**Fig. 58B**). La doble tinción con CRB3 revela que ambas proteínas no colocalizan en dichos terminales, ya que CRB3 parece rodear el marcaje de bassoon (**Fig. 58A-C**). En esta misma región, la proteína sinaptofisina se localiza en las vesículas presinápticas de los fotorreceptores (**Fig. 58E**). Los dobles marcajes inmunohistoquímicos CRB3/SYP muestran que existe una colocalización total entre las dos proteínas (**Fig. 58D-F**). El

Resultados

transportador de glutamato VGLUT1 es una proteína que también se ubica en los terminales presinápticos de los fotorreceptores (**Fig. 58H**). El doble marcaje para VGLUT1 y CRB3 muestra que todos los terminales sinápticos positivos para VGLUT1 lo son también para CRB3 (**Fig. 58G-I**); sin embargo, a pesar de que ambas proteínas se sitúan en los mismos terminales, su colocalización no es completa (**Fig. 58I**).

En el establecimiento de los contactos sinápticos también intervienen las uniones adherentes, que se ponen de manifiesto con anticuerpos frente a la proteína β -catenina (**Fig. 58K**). El doble marcaje para β -catenina y CRB3 muestra que no existe colocalización entre ambas proteínas, ya que β -catenina parece localizarse en los espacios carentes de CRB3 (**Fig. 58J-L**).

Una vez conocida la presencia de CRB3 en los terminales presinápticos de fotorreceptores, analizamos si esta proteína se localiza en conos y en bastones, y si también se expresa en otros tipos celulares de la CPE. Para ello, usamos diferentes marcadores que ponen de manifiesto los terminales presinápticos de conos y bastones (PNA, opsinas, recoverina y MPP4) y los distinguen de las dendritas de las células horizontales (CB) o células bipolares (PKC α y GNB3).

Dobles marcajes para CRB3 con marcadores frente a la proteína M-opsina o PNA, que tiñen la base del pedículo de los conos (**Fig. 59B, E**) indican que este componente de la familia de proteínas CRB está presente a lo largo de la base del terminal sináptico de los conos (**Fig. 59A-F**). Además, como mencionamos anteriormente, la proteína recoverina se localiza en los terminales presinápticos de todos los fotorreceptores (**Fig. 59H; 39D**). La doble tinción de CRB3 y recoverina muestra colocalización para estas proteínas a nivel de la CPE (**Fig. 59G-I**). Finalmente llevamos a cabo un doble marcaje de CRB3 con MPP4, proteína que también se localiza en los terminales presinápticos de los fotorreceptores (**Fig. 59K; 38B**), y al igual que con el doble marcaje para recoverina, demostramos que CRB3 y MPP4 colocalizan a nivel de la CPE, tanto en conos como en bastones (**Fig. 59J-L**).

A continuación analizamos la presencia de CRB3 en las dendritas de las células horizontales y bipolares en la CPE. La doble IHQ CRB3/CB muestra que CRB3 no se sitúa en las células horizontales, ya que la tinción para CB parece rodear los procesos positivos para CRB3 (**Fig. 59M**). Los anticuerpos frente a la proteína PKC α tiñen las células bipolares de bastón, mientras que para poner de manifiesto las células bipolares de conos tipo ON usamos anticuerpos frente a la proteína GNB3. En ambos casos, se marcan tanto los somas de las células bipolares como todos sus procesos (**Fig. 59N, O; Fig. 60H, K**). Las dobles tinciones de

PKC α o GNB3 con CRB3 indican que esta proteína no está presente en las dendritas de las células bipolares a nivel de la CPE (**Fig. 59N, O**).

Como mencionamos en la introducción, los procesos de las células de Müller envuelven los axones y dendritas de las capas plexiformes de la retina. Para analizar la presencia de CRB3 en las células de Müller a nivel de la CPE, realizamos dobles marcajes de esta proteína con CRALBP. No observamos colocalización entre ambas proteínas (**Fig. 59P-R**), de forma que el marcaje para los procesos de las células de Müller parece ocupar los espacios dejados por los perfiles positivos para CRB3 (**Fig. 59R**).

2.2.3. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA CAPA PLEXIFORME INTERNA

En esta sección analizamos el patrón de distribución de CRB3 en la CPI, mediante dobles marcajes para esta proteína y otras específicas para células o procesos que se localizan en este estrato.

En esta capa, bassoon se encuentra en los terminales presinápticos de las células amacrinas y en los terminales de tipo cintilla de las células bipolares. Al igual que lo visto en la CPE, CRB3 parece rodear el marcaje para bassoon, no habiendo colocalización entre ambas proteínas (**Fig. 60A-C**). La proteína sinaptofisina se encuentra en las vesículas presinápticas, y la doble tinción con CRB3 revela colocalización entre estas dos proteínas, si bien, existen algunos terminales sinápticos positivos para sinaptofisina donde no se encuentra CRB3, y al contrario (**Fig. 60D-F**).

Para identificar en que tipos celulares de los presentes en la CPI se localiza CRB3, llevamos a cabo dobles marcajes de esta proteína con marcadores conocidos para las diferentes subpoblaciones de células bipolares, amacrinas y ganglionares.

Como mencionamos en el apartado anterior, la proteína PKC α se localiza a lo largo de todas las células bipolares de bastón, al igual que GNB3 lo hace en las células bipolares de conos de tipo ON. Así, los anticuerpos frente a la proteína PKC α tiñen en la CPI todos los terminales sinápticos y las prolongaciones de las células bipolares de bastón (**Fig. 60H**). Estos terminales se distribuyen principalmente en la zona más interna de la CPI, y es en esa parte de la célula donde PKC α y CRB3 colocalizan (**Fig. 60G-I**). Se aprecia que en algunos de los perfiles positivos para ambas proteínas, el patrón de marcaje para CRB3 aparece en forma de anillo asociado a los terminales sinápticos de las células bipolares de bastón (**Fig. 60I**). Respecto a la distribución de GNB3 en la CPI, esta proteína se encuentra en prolongaciones y terminales sinápticos de las células bipolares de conos (**Fig. Fig. 60K**). El doble marcaje CRB3/GBN3 muestra que estas dos proteínas sólo colocalizan hacia la zona más interna de la CPI (**Fig. 60J-L**). Además, las células bipolares son glutamatérgicas, de forma que en sus terminales

Resultados

presinápticos se encuentra el transportador VGLUT1 (**Fig. 60N**). El doble marcaje de CRB3 y VGLUT1 revela que, a nivel de la CPI, todos los procesos positivos para VGLUT1 lo son también para CRB3, pero no al contrario (**Fig. 60M-O**).

Las células amacrinas GABAérgicas suponen del 25-55% de todas las células amacrinas de la retina, dependiendo de las especies (Nguyen-Legros et al., 1997). Para poner de manifiesto las diferentes subpoblaciones de células amacrinas GABAérgicas, usamos el anticuerpo GAD65/67, que marca las dos isoformas de la enzima que sintetiza GABA (**Fig. 61B**). Las dobles inmunohistoquímicas de CRB3 y GAD65/67 indican un alto grado de colocalización entre ambas proteínas (**Fig. 61A-C**), aunque se observan algunos perfiles positivos para CRB3 donde GAD65/67 no está presente, y viceversa (**Fig. 61C**).

CB y CR son proteínas presentes en una subpoblación de células amacrinas localizada a lo largo de tres estratos dentro de la CPI, y CRB3 parece no estar presente en esa subpoblación (**Fig. 61D-E**). Además, anticuerpos frente a la proteína CR también ponen de manifiesto una subpoblación de células ganglionares, donde CRB3 tampoco se sitúa (**Fig. 61E**). También hemos analizado su presencia en células amacrinas dopaminérgicas, mediante dobles marcajes CRB3/TH. La enzima TH se ubica en la parte más externa de la CPI y no colocaliza con CRB3, excepto en algunos procesos aislados (**Fig. 61F**).

Finalmente estudiamos la posible presencia de CRB3 en las uniones adherentes y en los procesos de las células de Müller que se localizan en la CPI. Dobles marcajes de CRB3 con β -catenina y con CRALBP muestran respectivamente que, a nivel de la CPI, CRB3 no se sitúa ni en las uniones adherentes (**Fig. 61G-I**), ni tampoco en los procesos de las células de Müller (**Fig. 61J-L**).

2.3. LOCALIZACIÓN DE CRB3 EN LA RETINA DURANTE EL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO

Al inicio del presente apartado mostramos que CRB3 se localiza en la retina del ratón, al menos, desde una edad postnatal de P0 (**Fig. 55G-H**). Para analizar su patrón de distribución durante el desarrollo postnatal de la retina, en el presente trabajo hemos analizado la expresión de CRB3 en dos estadios, P0 y P4.

Algunas de las capas de la retina ya han empezado a desarrollarse a P0, como la CCG o la CPI. Proteínas presentes en los terminales sinápticos, como sinaptofisina, son detectadas en este estadio en la CPI, y con menos intensidad en la zona escleral de la retina (**Fig. 62B**). A P0, CRB3 se distribuye en la CPI, y también detectamos marcaje para la proteína hacia el área más externa de la retina (**Fig. 62A**). Dobles marcajes para CRB3 y SYP muestran colocalización entre ambas proteínas a nivel de la CPI (**Fig. 62A-C**), de forma que todos los terminales positivos para

SYP contienen también la proteína CRB3, aunque no ocurre lo contrario (**Fig. 62C**). Además, en la zona escleral de la retina, SYP y CRB3 también colocalizan (**Fig. 62C, F**). En el estadio de P0, el marcador PNA pone de manifiesto los SI de los conos en formación (**Fig. 62D**). La doble tinción de CRB3 y PNA indica que la presencia de la proteína CRB3 en esos SI aún no está definida (**Fig. 62D**). A P0, el anticuerpo frente a recoverina detecta esta proteína en los fotorreceptores en desarrollo (**Fig. 62E**). Mediante una doble tinción CRB3/recoverina observamos colocalización parcial entre ambas proteínas en el área donde se están formando los SI de los fotorreceptores, así como en algunos de sus cuerpos celulares (**Fig. 62E**).

En el estadio de P4, la doble tinción de sinaptofisina con CRB3 muestra colocalización para las dos proteínas a nivel de la CPI (**Fig. 62G-I**). A esta edad, el marcaje para sinaptofisina en el área de la retina externa es más fuerte que a P0 (**Fig. 62H**), y colocaliza parcialmente con la tinción para la proteína CRB3 (**Fig. 62G-I**), de manera que todos los procesos positivos para sinaptofisina, son también positivos para CRB3, pero no lo opuesto (**Fig. 62I, M**). A P4 permanece el marcaje para la proteína recoverina en los fotorreceptores en desarrollo (**Fig. 62J**). CRB3 colocaliza con recoverina en las zonas donde se están formando los SI de los fotorreceptores, así como en el área donde se ubicará la CPE (**Fig. 62J**). En esa CPE en desarrollo, todos los terminales teñidos con anticuerpos frente a recoverina también presentan marcaje para la proteína CRB3, pero no lo contrario (**Fig. 62J**). Además, se observa la presencia de CRB3 en algunas células localizadas debajo de la CPE en formación (**Fig. 62G, I, J, M**). Por último, analizamos la posible localización de CRB3 en las uniones adherentes establecidas durante el desarrollo de la retina, y las ponemos de manifiesto con anticuerpos frente a la proteína β -catenina. A P4, y a diferencia de lo observado en la retina del ratón adulto, encontramos colocalización parcial entre CRB3 y β -catenina en la CPE en formación, y también en la CPI (**Fig. 62K, L**). Sin embargo, en el área de la MLE en desarrollo, CRB3 no colocaliza con β -catenina, como hemos observado durante el estadio adulto (**Fig. 62K; Fig. 57C**).

2.4. PATRÓN DE INTERACCIÓN DE CRB3 CON LAS PROTEÍNAS MAGUK EN LA RETINA SILVESTRE

En la introducción de esta Tesis Doctoral explicamos la estructura terciaria de las proteínas CRB1 y PALS1, y cómo a partir de sus dominios PBM y PDZ pueden interaccionar formando un complejo proteico intracelular en la retina del ratón. En el presente trabajo, además de investigar la posible interacción de CRB3 con PALS1, hemos analizado la posibilidad de que CRB3 también interaccione con otra de las proteínas MAGUK, la denominada MPP4,

Resultados

con la cual hemos mostrado que colocaliza tanto en la CPE como en la RSA de la MLE (**Fig. 57F; 59L**).

Para ello, hemos realizado experimentos de inmunoprecipitación (IP), para los cuales hemos usado el anticuerpo policlonal diseñado por nuestro grupo de trabajo, rCRB3. Tras la IP de CRB3, y su posterior WB e inmunodetección, obtenemos dos bandas positivas para la proteína, una con una altura algo superior a 25 kDa, y otra inferior a ese peso (**Fig. 63A**), que corresponden a las dos isoformas glicosiladas conocidas de CRB3 (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Makarova et al., 2003). Estas mismas bandas también fueron detectadas en las muestras del lisado proteico previo a la IP, el llamado *input*, referido en toda la figura 63 como lisado (**Fig. 63A**). Para testar la especificidad de la IP llevamos a cabo un control con inmunoglobulinas de tipo G (IgG) procedentes de conejo (Santa Cruz Biotechnology®). Sobre esas muestras inmunoprecipitadas y tras realizar el WB, se realiza una incubación usando el anticuerpo α -CRB3. No se observa marcaje para CRB3 en la membrana, demostrando la especificidad de la IP (**Fig. 63A**). Además, llevamos a cabo un control positivo, en el cual inmunoprecipitamos CRB3 en muestras procedentes de riñón, donde se ha demostrado la presencia de esta proteína mediante IP (Gosens et al., 2007a; Makarova et al., 2003). Tras llevar a cabo este control obtenemos dos únicas bandas positivas para CRB3, de una altura similar a lo descrito anteriormente para la retina (**Fig. 63A**).

A continuación analizamos la interacción de CRB3 con MPP4 y PALS1 mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP). Para ello, sobre muestras de retina de ratón adulto control inmunoprecipitadas para la proteína CRB3, llevamos a cabo una detección mediante WB incubando las membranas con anticuerpos frente a MPP4 o PALS1. De esta forma comprobamos si CRB3 está interaccionando con estas proteínas MAGUK. La banda positiva para la proteína MPP4 se observa a una altura equivalente a 72 kDa, tanto en el *input*, como en las muestras inmunoprecipitadas, demostrando la interacción entre CRB3 y MPP4 en la retina del ratón silvestre (**Fig. 63B**). Por el contrario, tras realizar la IP para CRB3 no se aprecia marcaje positivo para PALS1 a la altura de 77 kDa, marcaje que sí se observa en el *input* previo a la IP (**Fig. 63B**). De manera paralela llevamos a cabo el experimento opuesto, en el cual se realiza un WB frente a CRB3 a partir de muestras inmunoprecipitadas con anticuerpos frente a PALS1. Tanto en el *input* como en las muestras inmunoprecipitadas observamos la banda positiva para PALS1 con un peso molecular de 77 kDa (**Fig. 63C**). Sin embargo, sólo apreciamos marcaje para CRB3 en el *input* inicial y no en las muestras inmunoprecipitadas (**Fig. 63C**). Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, podemos asegurar que CRB3 y MPP4 están interaccionando en la retina del ratón silvestre adulto; sin

embargo, no podemos probar la interacción entre PALS1 y CRB3 a partir de sus niveles basales en este mismo tejido.

Iconografía

Figura 34: Análisis de la MLE a microscopía óptica y electrónica en el estadio de P7. A-A', secciones semifinas de una retina silvestre, en la que se muestra la laminación de la retina. **B**, la MLE aparece como una estructura continua (cabezas de flecha en inserto de **B**). **C-C'**, secciones semifinas de una retina *Crb1^{rd8}* donde se observan rosetas de fotorreceptores (flechas). **D-E**, la MLE se aprecia como un estrato continuo (cabezas de flecha en inserto en **D** y en **E**), aunque en algunos puntos pierde la continuidad, y los núcleos de los fotorreceptores se desplazan hacia áreas esclerales (flecha en inserto en **D**). **F-H**, imágenes de microscopía electrónica de la MLE en el estadio P7 en retinas control (**F**) y mutantes (**G-H**). Las uniones adherentes (cabezas de flecha en **F-H**) que conforman la MLE se organizan en una hilera continua y permiten la unión de fotorreceptores (segmento interno rodeado de rojo en **F-G**) y células de Müller (asteriscos en **F-G**). Las cabezas de flecha hueca en **F** señalan cilios de conexión de fotorreceptores. La flecha en **G** muestra una zona de la MLE de una retina mutante donde se ha perdido la unión adherente, y el núcleo del fotorreceptor se desplaza hacia el espacio subretinal. La micrografía en **H** muestra una roseta de fotorreceptores, donde las uniones adherentes se mantienen. EP, epitelio pigmentario; SF, segmentos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa. Barras de escala: 100µm en A y C; 10µm en B, D-E; 5 µm en insertos de B y D; 1000 nm en F-H.

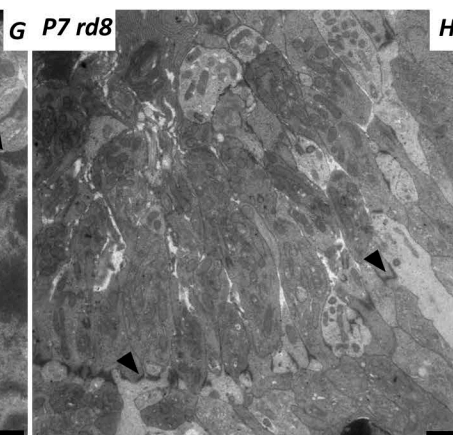
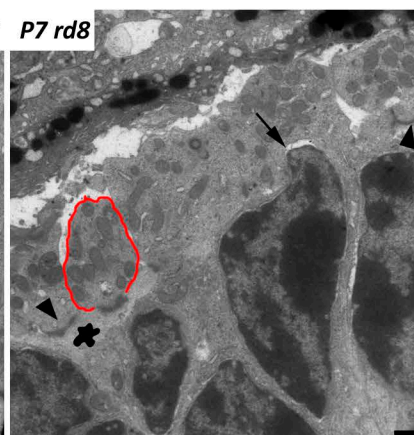
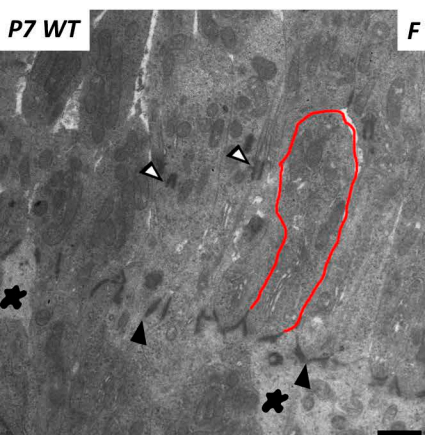
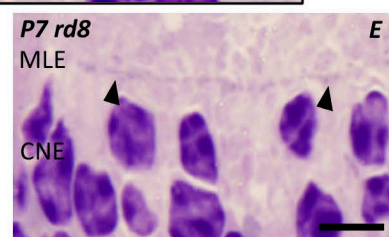
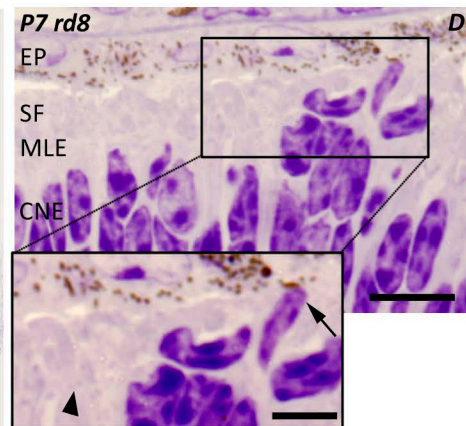
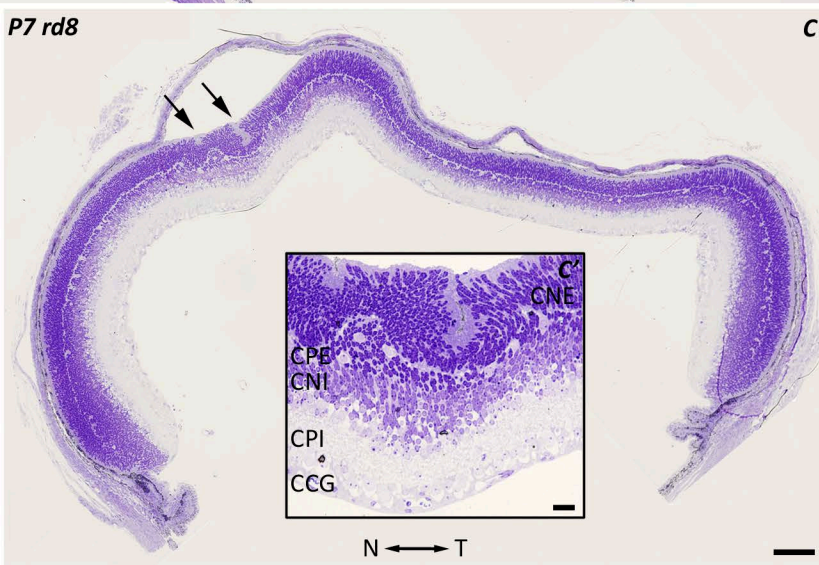
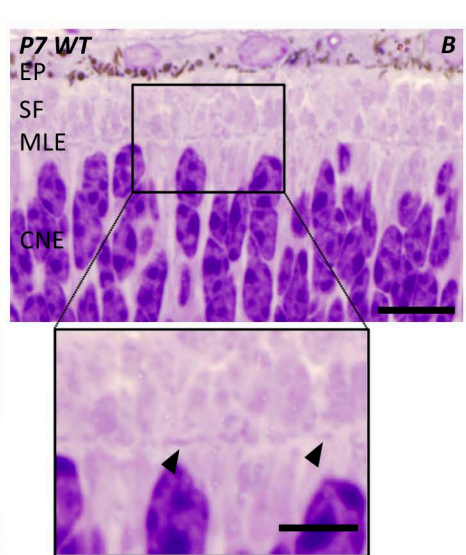
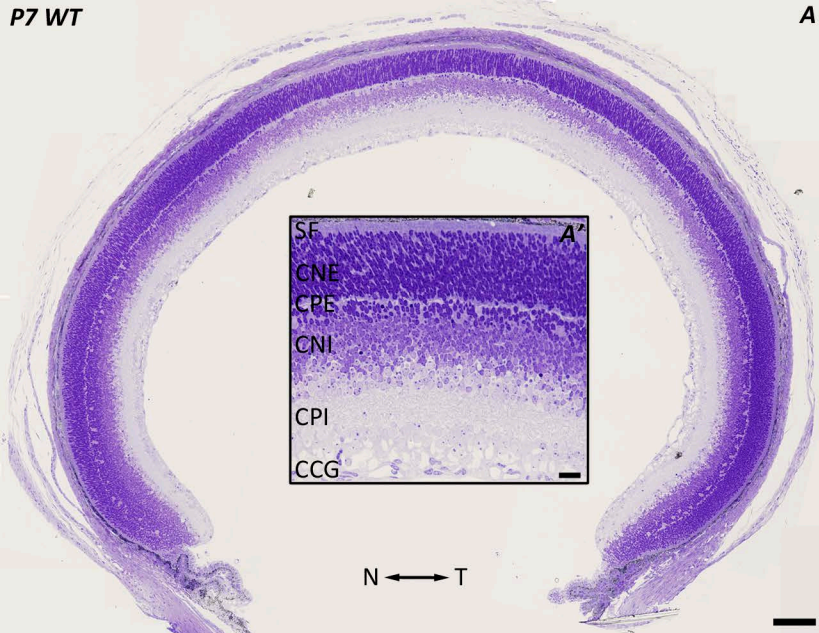
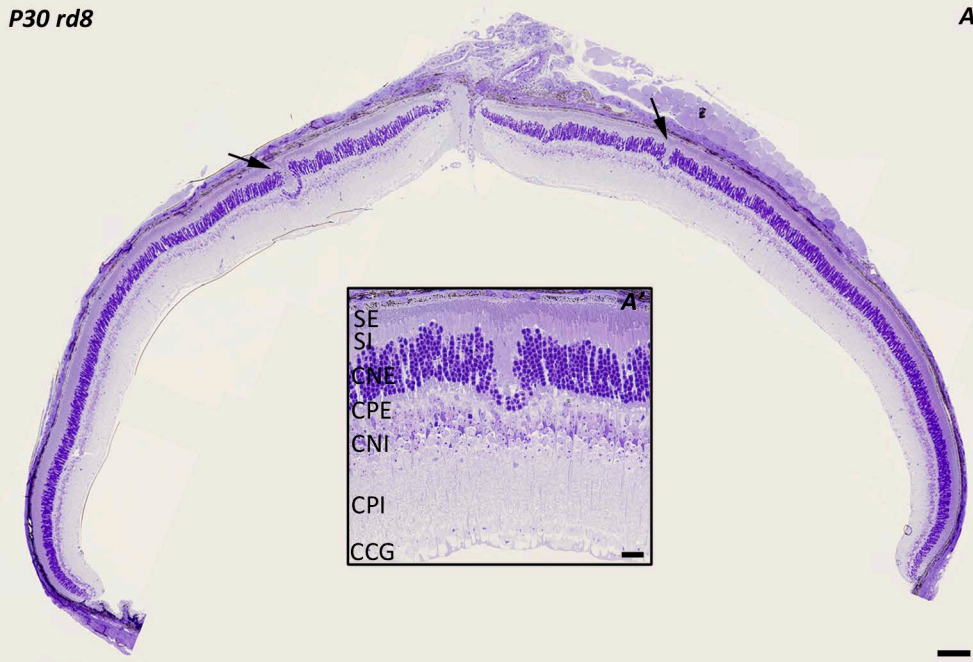
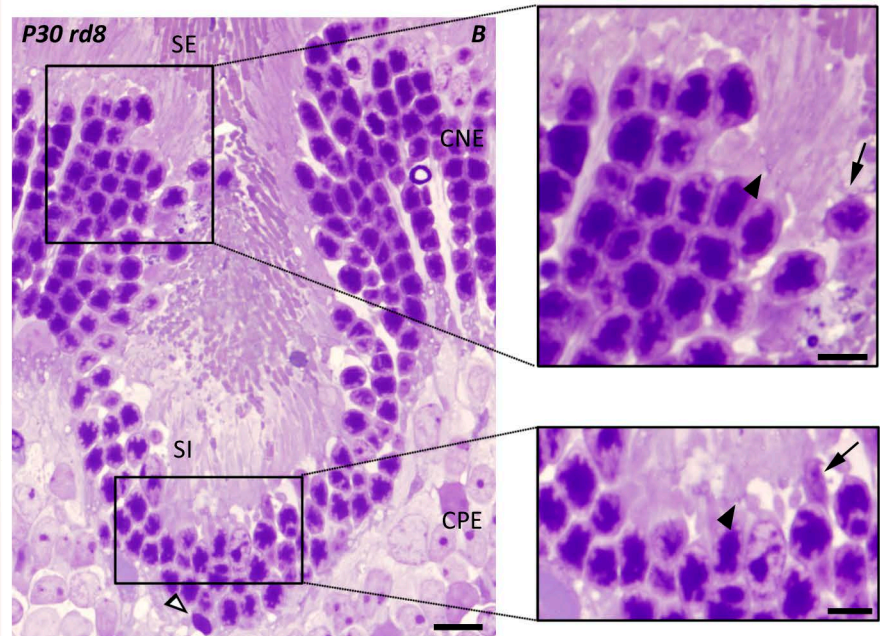


Figura 35: Análisis de la MLE a microscopía óptica y electrónica de retinas *Crb1^{rd8}* en el estadio P30. A-A', secciones semifinas de una retina mutante con varias rosetas de fotorreceptores en la CNE (flechas). **B-C**, detalles de una roseta de fotorreceptores (**B**) y de la MLE en una zona sin roseta (**C**). En **B-C** y sus insertos se muestran zonas donde la MLE se aprecia como una línea continua (cabezas de flecha), áreas en las que la MLE pierde su continuidad y los núcleos de los fotorreceptores se desplazan (flechas) y algunos núcleos de fotorreceptores apoptóticos (cabezas de flecha huecas). **D-F**, imágenes de microscopía electrónica de la MLE de retinas *Crb1^{rd8}* a edad P30. **D**, los segmentos internos de los fotorreceptores (rodeados de rojo) se unen a las células de Müller (asteriscos) mediante uniones adherentes, algunas de las cuales se mantienen (cabezas de flecha) y otras se han desorganizado (flechas). Las uniones adherentes de la MLE en zonas en degeneración se aprecian como estructuras menos densas a los electrones (flechas en **E**), que las uniones adherentes de la MLE de zonas sin aparente degeneración (cabezas de flecha en **F**). SE, segmentos externos de los fotorreceptores; SI, segmentos internos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa. Barras de escala: 100µm en A; 10µm en B-C D-E; 5 µm en insertos de B-C; 1000 nm en D-F.

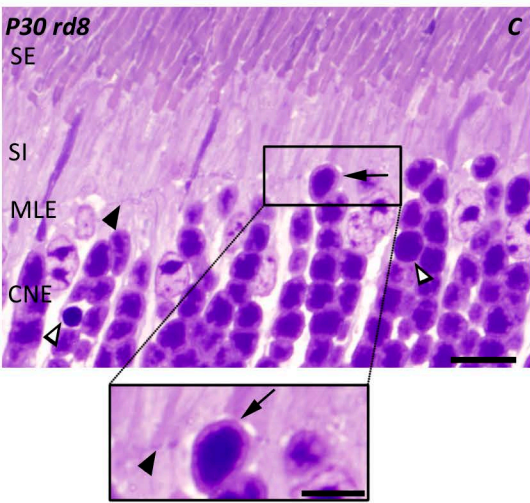
P30 rd8



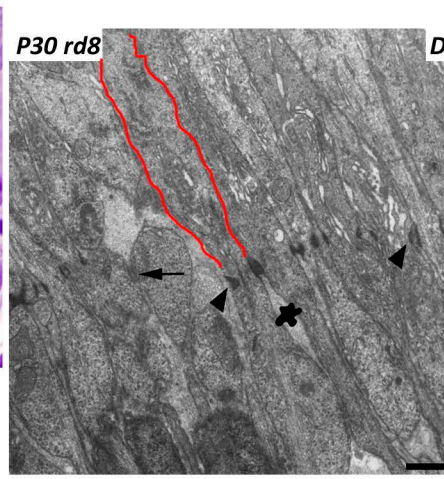
A



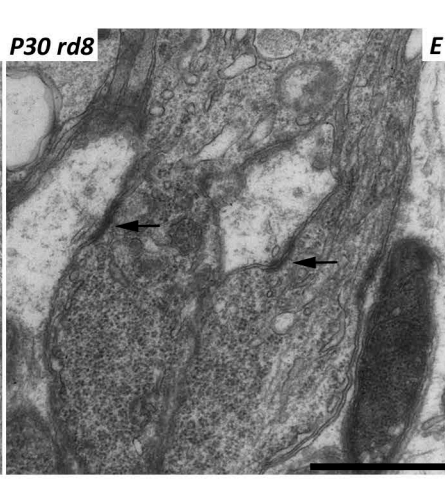
P30 rd8



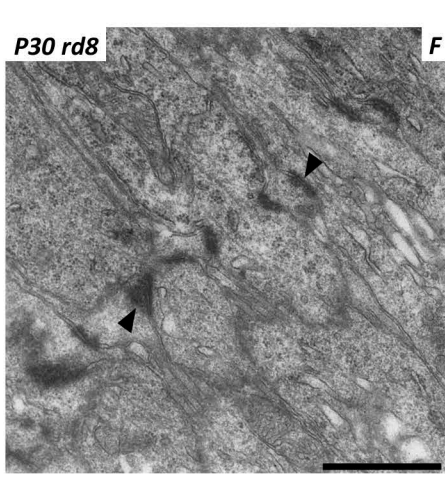
C



D



E



F

Figura 36: Localización de CRB1 en la retina adulta. **A**, el anticuerpo α -CRB1 diseñado por nuestro grupo de trabajo detecta a CRB1 (verde) en la MLE en retinas de ratón silvestre. **B**, en el ensayo de competitividad desaparece toda la tinción para CRB1 y sólo permanece un tenue marcaje de fondo a nivel de la CPE. **C**, en retinas mutantes la tinción para CRB1 en la MLE se encuentra parcheada (flechas). Ampliación en **C** muestra marcaje para CRB1 en el interior de la roseta de fotorreceptores (cabezas de flecha), y en los procesos reactivos de las células de Müller, donde colocaliza con GFAP (rojo). **D**, ensayo de competitividad en la retina mutante en el que desaparece toda la tinción para CRB1, permaneciendo un leve marcaje de fondo a nivel de las capas plexiformes. **E-F**, doble IHQ para CRB1 (verde) y β -catenina (rojo). En ambos genotipos, CRB1 se sitúa apicalmente a las uniones adherentes de la MLE teñidas frente a la proteína β -catenina. Ambas proteínas desaparecen en las mismas áreas de la MLE (inserto y flechas en **F**). **G-H**, en retinas control y mutante CRB1 (verde) y PALS1 (rojo) colocalizan en la RSA de la MLE. Ambas proteínas desaparecen en las mismas zonas de la MLE (inserto y flechas en **H**); sin embargo, CRB1 permanece en algunas zonas de la RSA de la MLE donde PALS1 está ausente (flecha hueca en **H**), y al contrario (cabeza de flecha hueca en **H'**). Núcleos marcados con TO-PRO 3 (azul). MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m; 5 μ m en insertos de E-F y H.

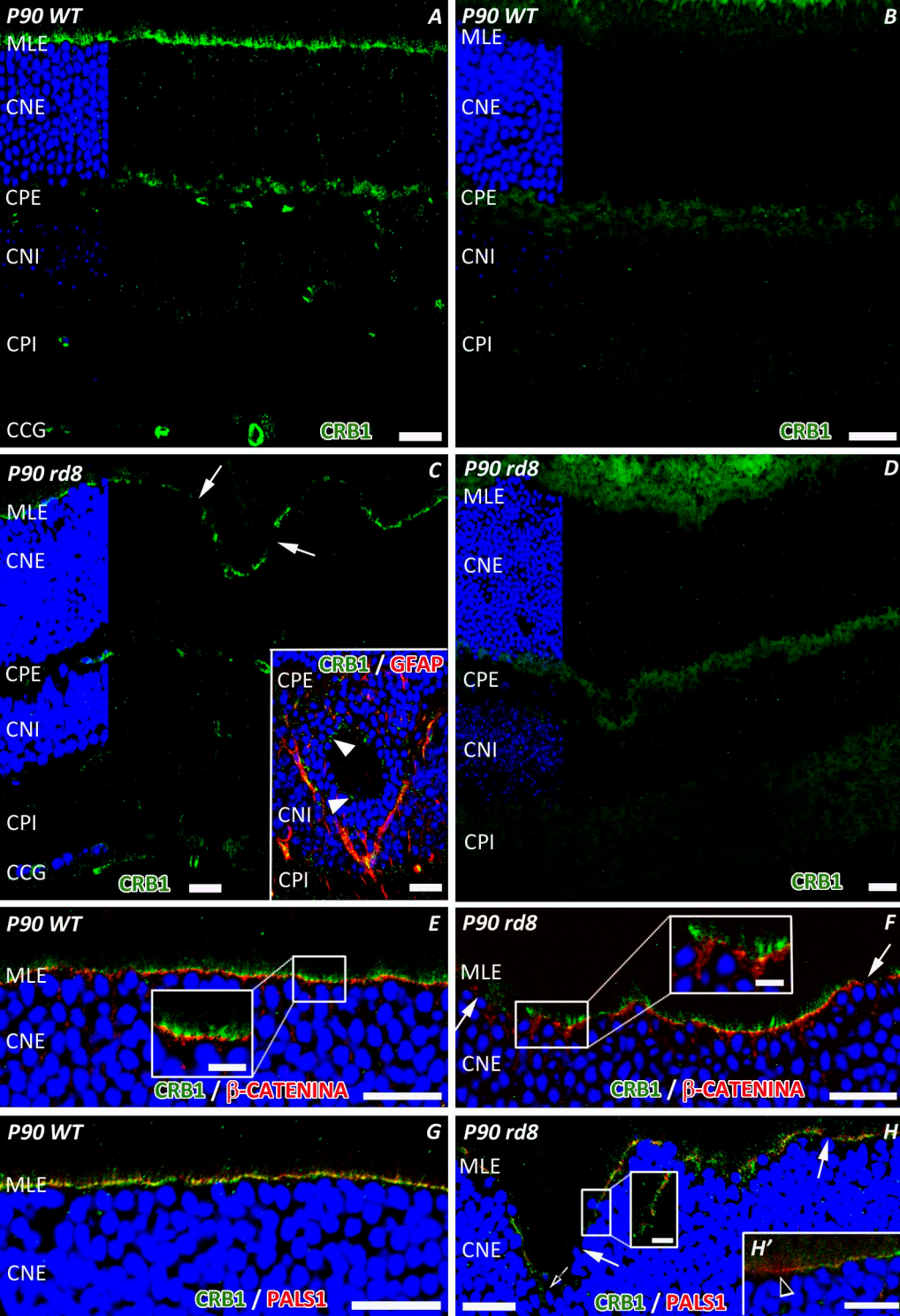


Figura 37: Inmunorreactividad frente a PALS1 en estadios de P7 y P90. A-C, localización de PALS1 (verde) en la MLE de la retina del ratón silvestre (A) y mutante *Crb1^{rd8}* a P7 (B-C). En este estadio el marcaje de la MLE se desorganiza en áreas en degeneración (inserto en C). **D-J,** tinción para PALS1 (verde en D-F; rojo en G-J) en la MLE de la retina del ratón adulto. En el animal control el marcaje para PALS1 es continuo a lo largo de la capa (D, G); y en el mutante aparece parcheado (flechas en F, H-J). En algunas rosetas de fotorreceptores, el marcaje de PALS1 permanece (cabezas de flecha en J), pero en otras está muy reducido (cabezas de flecha huecas en F). A nivel de la CPE, marcaje para PALS1 en retinas *Crb1^{rd8}* (inserto en E). **K,** WB para PALS1. Se observa una única banda a 77 kDa a P7 y P90 en ratones mutantes y control. GAPDH como control de carga. **L,** cuantificación de los niveles relativos de PALS1 (n=6). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. A P7 no hay diferencias significativas entre retinas mutantes y control. A P90, los niveles de PALS1 del ratón *Crb1^{rd8}* disminuyen con respecto al control, con diferencias estadísticamente significativas. **M,** variación de los niveles proteicos entre los estadios de P7 y P90. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de PALS1 a P7 y P90. En retinas control se produce una ganancia de proteína a P90; mientras que en la retina *Crb1^{rd8}* hay mayor cantidad de proteína a P7. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-F, y con TO-PRO 3 (azul) en G-J. MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20 μ m; 10 μ m en insertos.

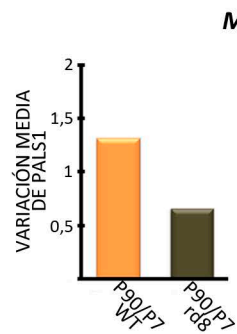
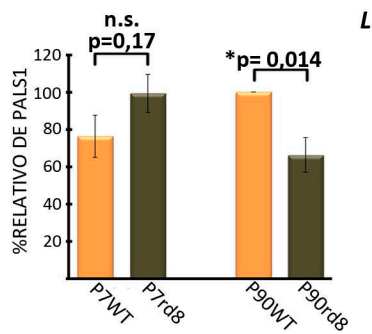
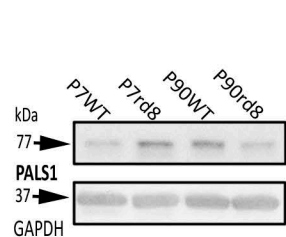
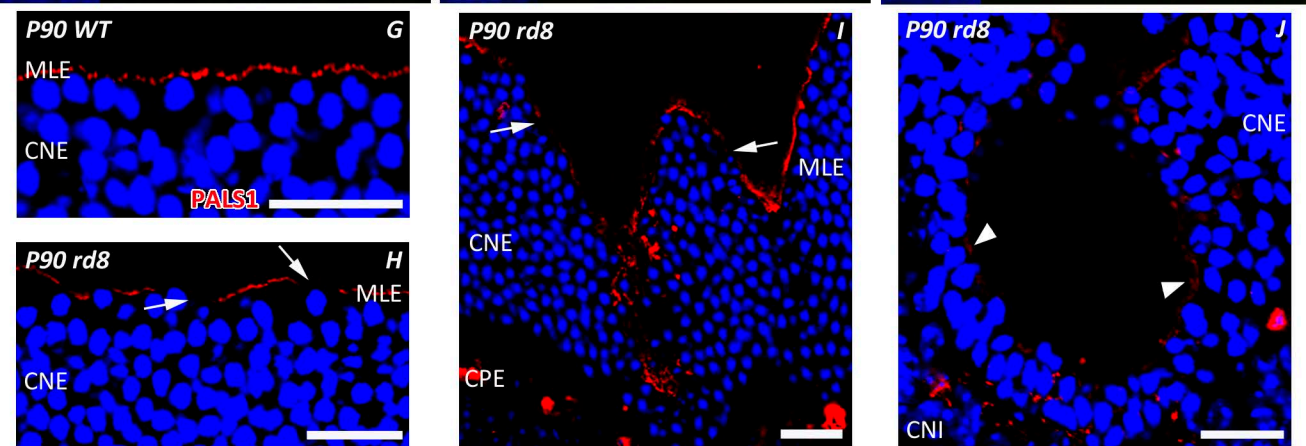
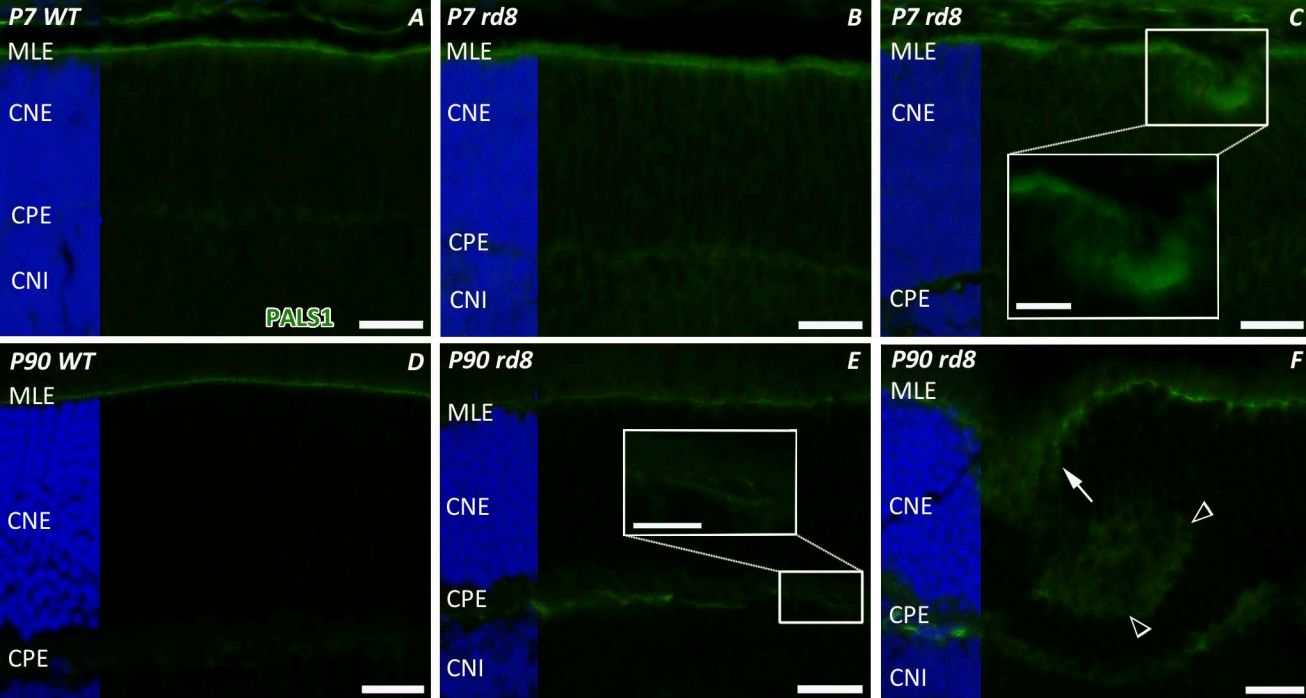


Figura 38: Inmunorreactividad frente a MPP4 en retinas de ratón a P90. **A**, WB frente a MPP4, donde en lisados de retina control aparece una única banda a 72 KDa. En el ensayo de competitividad desaparece el marcaje. GAPDH es usado como control de carga. **B**, inmunofluorescencia para MPP4 (rojo) en la retina adulta silvestre, mostrando su localización en el área del cilio de conexión de los fotorreceptores (cabecitas de flecha en **B**), región subapical de la MLE (inserto esquina inferior izquierda) y CPE (inserto central). **C**, ensayo de competitividad para MPP4 sobre secciones de retina de ratón control mostrando que el marcaje desaparece. **D-E**, IHQ frente a MPP4 en la retina del ratón *Crb1^{rd8}*. **D**, en zonas sin aparente degeneración permanece el marcaje en la CPE, se reduce en la MLE (cabecita de flecha en **D**) y desaparece de los segmentos de los fotorreceptores. **E**, en la zona con rosetas de fotorreceptores se pierde la tinción de la MLE y disminuye en la CPE, llegando casi a desaparecer (flechas en **E**). **F**, WB frente a MPP4. La proteína no se expresa en retinas a P7. En adulto se observa una banda a 72 kDa en ratones mutantes y control (flecha en **F**). Se usa GAPDH como control de carga. **G**, cuantificación de los niveles relativos de MPP4 (n=6). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. Los niveles relativos de MPP4 en la retina del ratón adulto *Crb1^{rd8}* son menores respecto al control, con diferencias altamente significativas. Núcleos marcados con TO-PRO 3 (azul) en B, D-E. MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20 μ m.

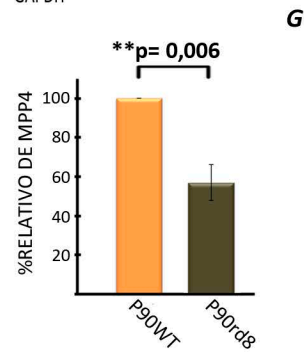
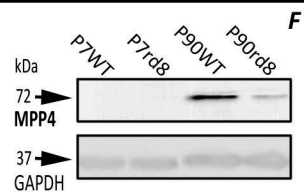
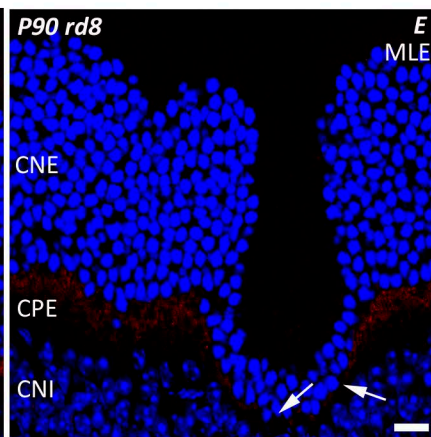
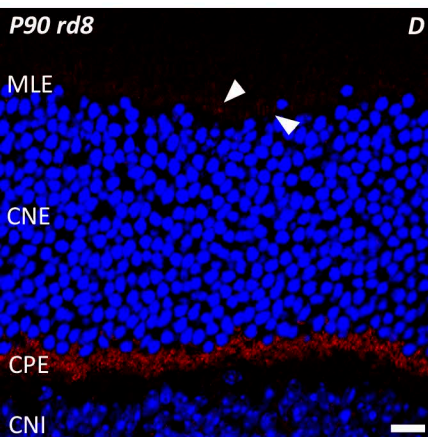
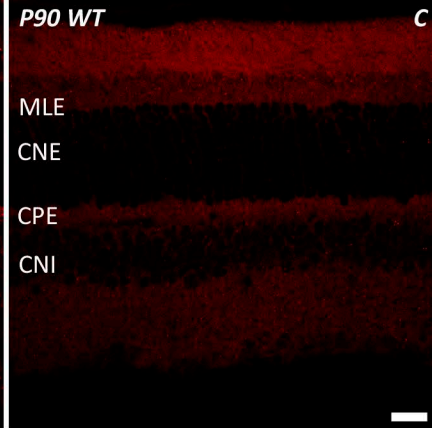
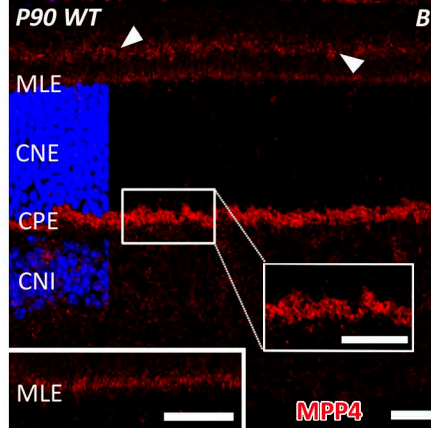
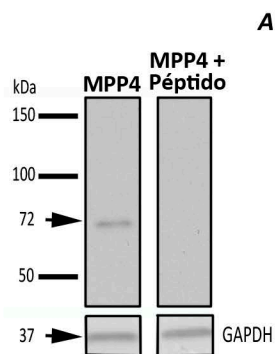


Figura 39: La proteína recoverina en la retina del ratón control y mutante *Crb1^{rd8}* a estadios P7 y P90. A-C, a P7 la inmunofluorescencia frente a recoverina (rojo) muestra que la proteína se localiza a lo largo del fotorreceptor en desarrollo en animales silvestres (A) y mutantes (B-C). En las retinas *Crb1^{rd8}*, los núcleos pierden su organización (cabezas de flecha en A-C), así como los SI y terminales sinápticos de las áreas más afectadas en este estadio (flechas en A-C). D-G, a P90, la proteína recoverina se sitúa en los cuerpos celulares, segmentos internos y terminales sinápticos de fotorreceptores en animales control (inserto en D) y mutantes *Crb1^{rd8}* (inserto en E y F-G). En las zonas con mayor degeneración se forman rosetas de fotorreceptores (inserto en F) que pueden invadir la CNI (cabeza de flecha en F). Los asteriscos y las barras amarillas en D y G señalan el grosor en μm de la CNE de la retina silvestre (D), y mutante a diferentes niveles (G). H, WB para recoverina. Se observa una única banda a 23 kDa a P7 y P90 en ratones mutantes y control. GAPDH se usa como control de carga. I, cuantificación de los niveles relativos de recoverina ($n=7$). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. A P7 no hay diferencias significativas entre retinas mutantes y control. A P90, hay más recoverina en la retina del ratón silvestre que en *Crb1^{rd8}*, con una diferencia estadísticamente significativa. J, variación de los niveles proteicos entre los estadios de P7 y P90. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de recoverina a P7 y P90. La ganancia de proteína a P90 es dos veces superior al observado en el mutante. Núcleos marcados con DAPI (azul). SI, segmentos internos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: $20\mu\text{m}$.

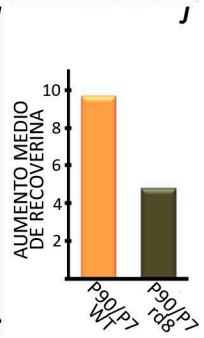
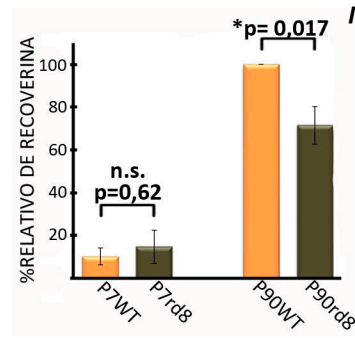
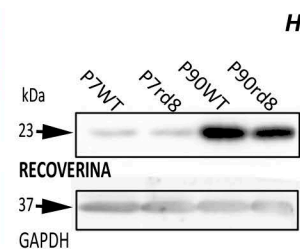
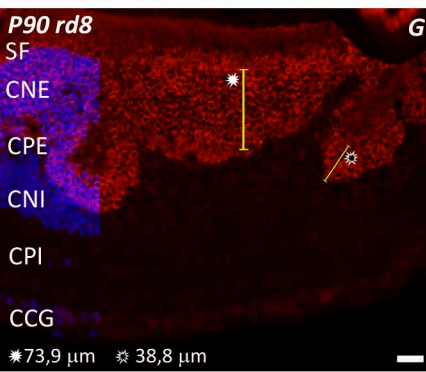
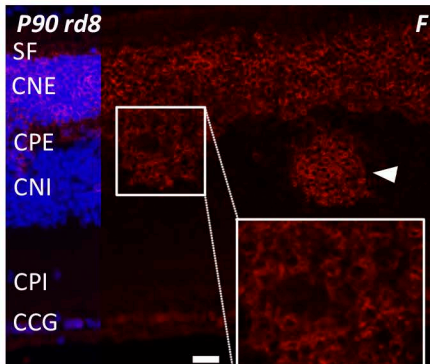
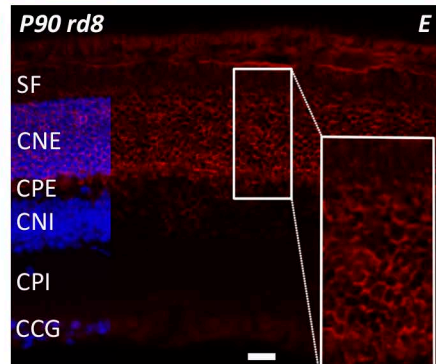
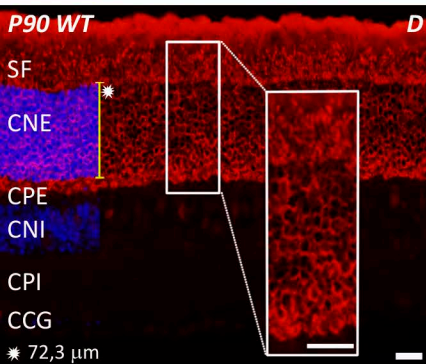
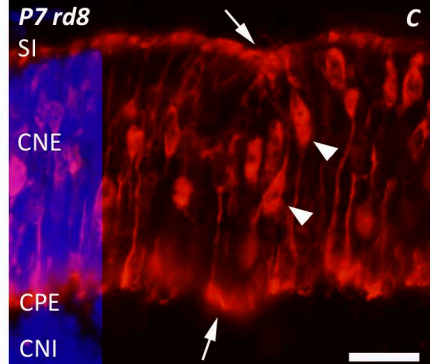
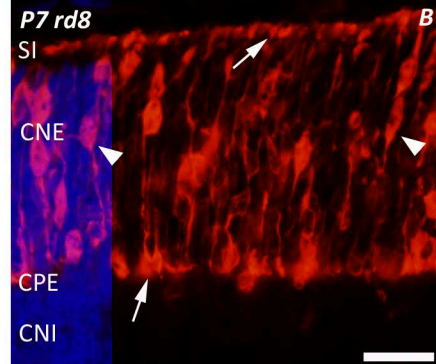
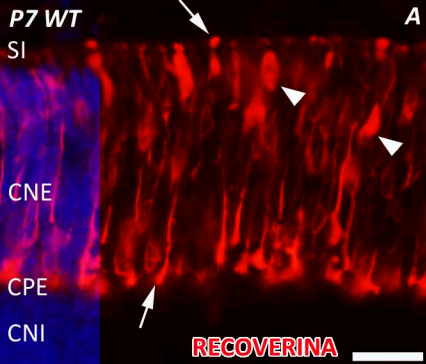


Figura 40: Patrón de marcaje para PNA y rodopsina en retinas control y mutante a estadios P7 y P90. A-C, a P7, los segmentos internos de los conos teñidos con PNA (verde) presentan una morfología similar en retinas control (inserto en **A**) y mutantes (inserto en **B**), excepto en las zonas con la MLE en degeneración (inserto en **C**). **D-F**, en adultos, el marcador PNA pone de manifiesto los SI y los terminales sinápticos de los conos (verde) en ratones control (**D**) y *Crb1^{rd8}* (**E-F**). Las cabezas de flecha en **E-F** muestran la desorganización y pérdida de conformación de los terminales sinápticos de los conos del ratón mutante. Las flechas en **F** señalan la alteración en la estructura de los SI de los conos en la retina mutante. **G-I**, la proteína rodopsina (rojo) se localiza a lo largo de los bastones en desarrollo a P7 en retinas silvestres (**G**), y mutantes (**H-I**). Las flechas en **I** muestran la alteración en los bastones a nivel de los SI y la CPE. **J-L**, a P90, tanto en retinas control (**J**), como en *Crb1^{rd8}* (**K-L**), la proteína rodopsina se localiza mayoritariamente en los SE de los bastones, aunque existe una leve inmunorreactividad a través de los somas. En las rosetas de fotorreceptores aparece un marcaje muy intenso para rodopsina (cabeza de flecha en **L**). Núcleos teñidos con DAPI (azul). SE, segmentos externos de los fotorreceptores; SI, segmentos internos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20µm; 10µm en insertos.

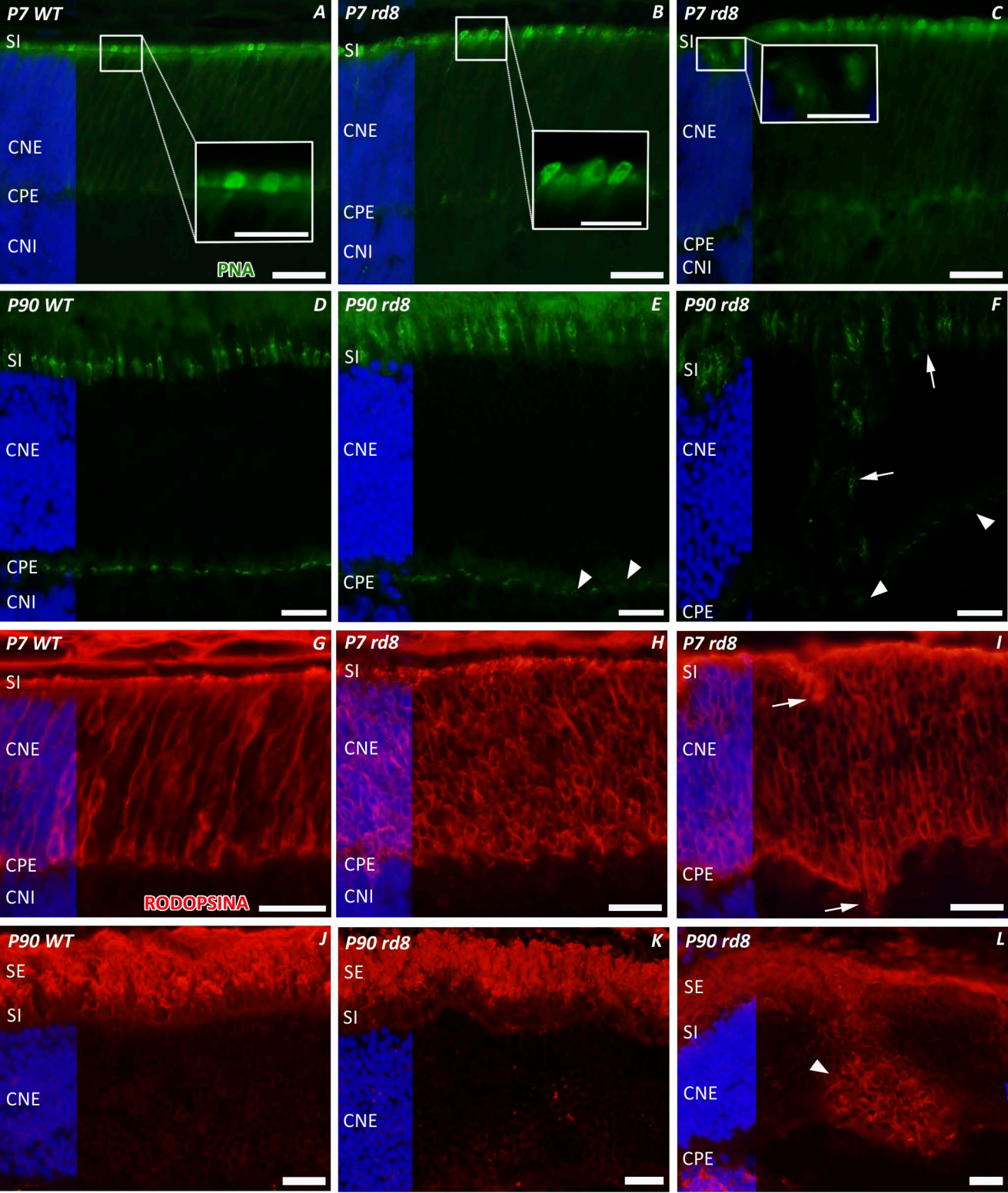
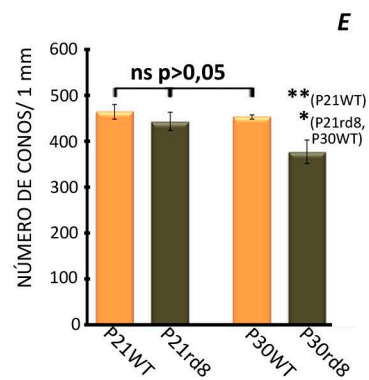
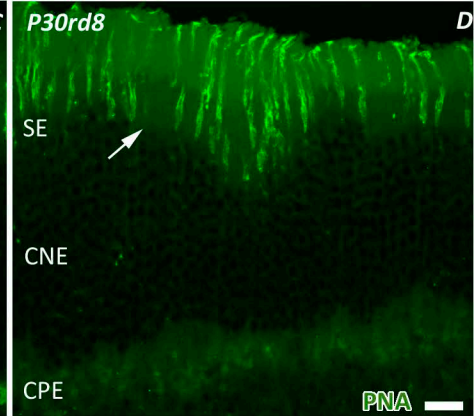
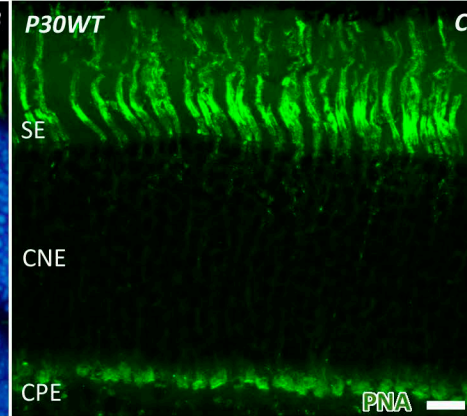
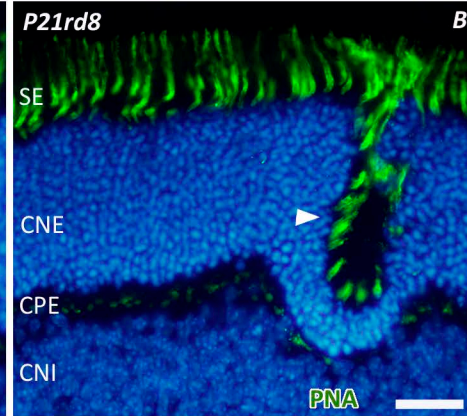
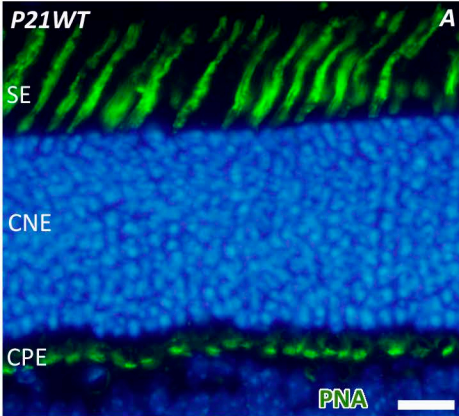
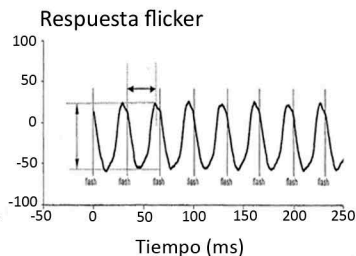
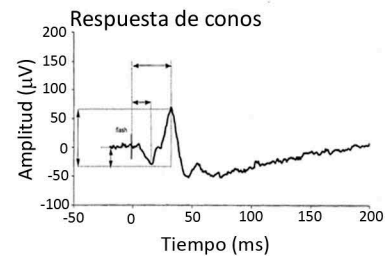
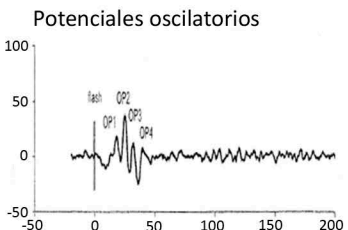
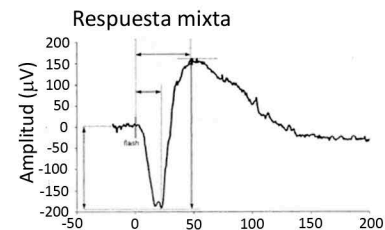


Figura 41: Recuento del número de conos en los estadios P21 y P30. ERG a P30. A-D, el marcador PNA (verde) tiñe los segmentos y los terminales sinápticos de los fotorreceptores de las retinas de control (A, C) y mutante (B, D), en los estadios P21 (A-B) y P30 (C-D). La cabeza de flecha en B señala una roseta de fotorreceptores; la flecha en D, un área de la retina mutante carente de segmentos de fotorreceptores. E, recuento del número de conos en retinas control y mutantes en estadios de P21 y P30 (n≥3). Los resultados se representan gráficamente como la media de la densidad celular de cada grupo experimental ± SEM. En las retinas *Crb1^{rd8}* de edad P30 el número de conos es inferior, con diferencias significativas respecto a las retinas P30 silvestre y P21 mutante, y altamente significativas con el grupo P21 control. F-G, ERG en ratones silvestres (F) y mutantes (G). No se aprecian diferencias en la amplitud de las ondas entre ambos genotipos en ninguno de los protocolos de estimulación realizados. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-B. SE, segmentos externos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20 μm.

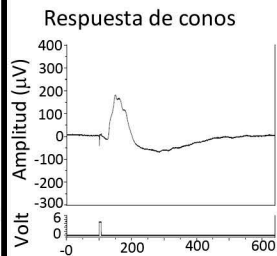
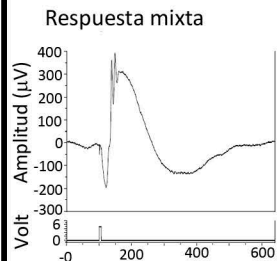


P30WT



F

P30rd8



G

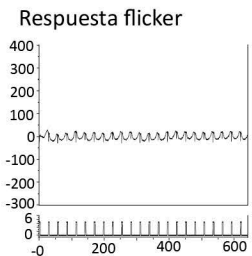
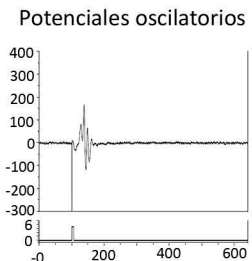


Figura 42: Inmunorreactividad para la proteína sinaptofisina en retinas control y mutante a estadios P7 y P90. A-F, SYP (verde) se localiza en ambas capas plexiformes de la retina a edades de P7 (A-C) y P90 (D-F), en ratones control (A, D) y *Crb1^{rd8}* (B-C, E-F). La flecha en C muestra la desorganización de la CPE en las zonas más nasales de la retina a P7. En las rosetas de fotorreceptores a P90, el marcaje para SYP está muy reducido (inserto en F). G, WB para SYP. Se observa una banda a 38 kDa a P7 y P90 en ratones mutantes y control. β -actina se usa como control de carga. H, cuantificación de los niveles relativos de SYP (n=4). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. A P7 no hay diferencias significativas entre retinas mutantes y control. A P90, la cantidad de SYP es menor en la retina del ratón mutante comparada con la control, con una diferencia estadísticamente significativa. I, variación de los niveles proteicos entre los estadios de P7 y P90. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de SYP a P7 y P90. La ganancia de proteína en la retina *Crb1^{rd8}* es unas 5 veces inferior a la que ocurre en condiciones control. Núcleos marcados con DAPI (azul). CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m; 10 μ m en ampliación.

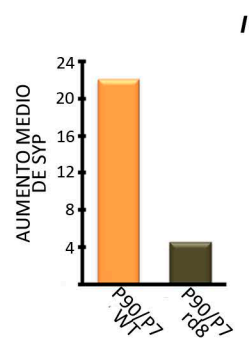
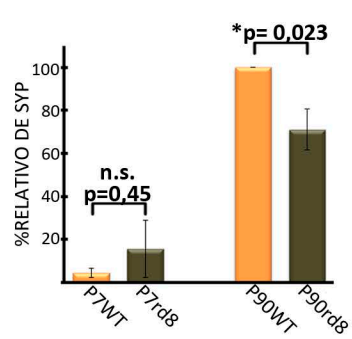
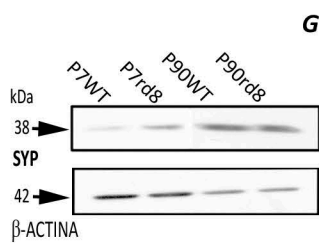
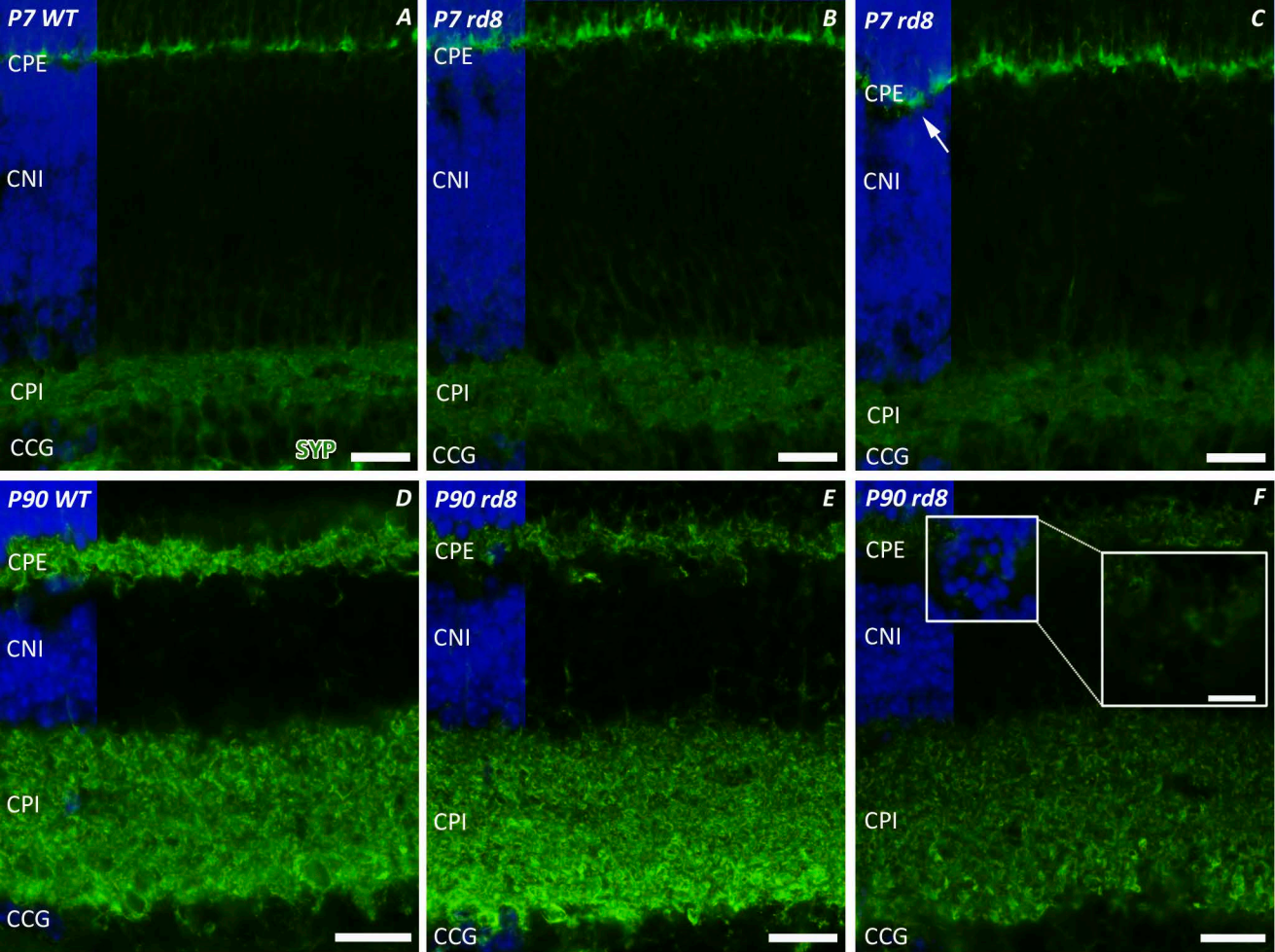


Figura 43: Localización del neurotransmisor GABA y del transportador VGLUT1 en retinas control y mutante a estadios P7 y P90. **A-D**, a P7 (**A-B**) y P90 (**C-D**), GABA (verde) se localiza en los núcleos gabaérgicos de la CNI y de la CCG (cabezas de flecha en **A-D**), así como en varios estratos de prolongaciones dentro de la CPI, tanto en ratones control (**A, C**), como en *Crb1^{rd8}* (**B, D**). **E-F**, a P7, VGLUT1 (rojo) se localiza en la CPE en retinas silvestres (**E**) y mutantes (**F**). La flecha en **F** señala el marcaje para VGLUT1 en terminales sinápticos de fotorreceptores que han perdido la organización. **G-H**, a P90, VGLUT se expresa en ambas capas plexiformes en retinas control (**G**) y *Crb1^{rd8}* (**H**). En las zonas con rosetas de fotorreceptores, el patrón de marcaje para VGLUT1 está alterado (flechas en **H**). Núcleos marcados con DAPI (azul). CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20µm.

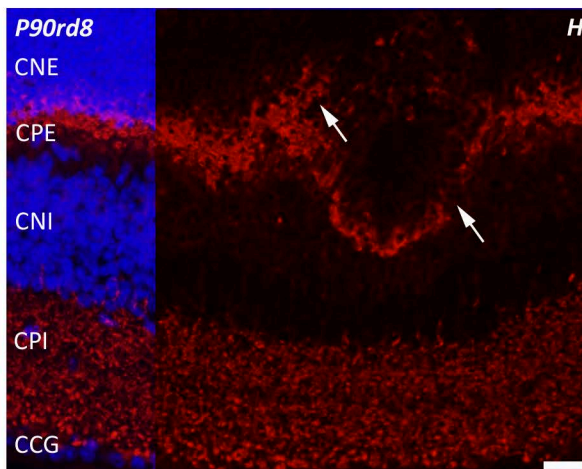
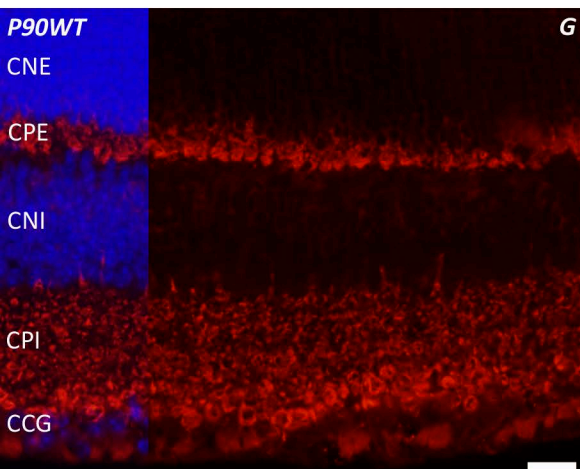
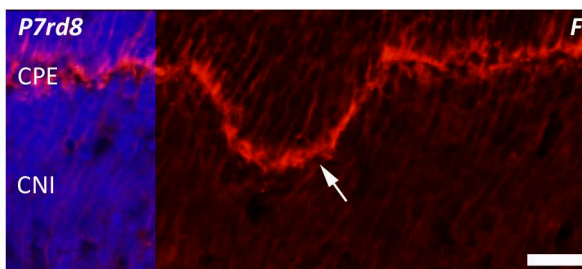
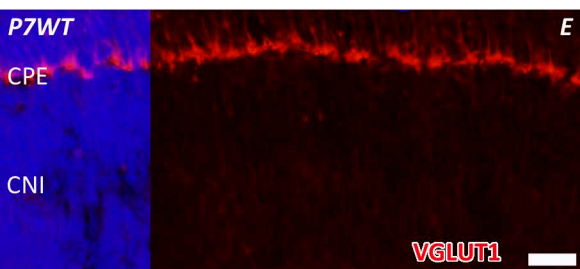
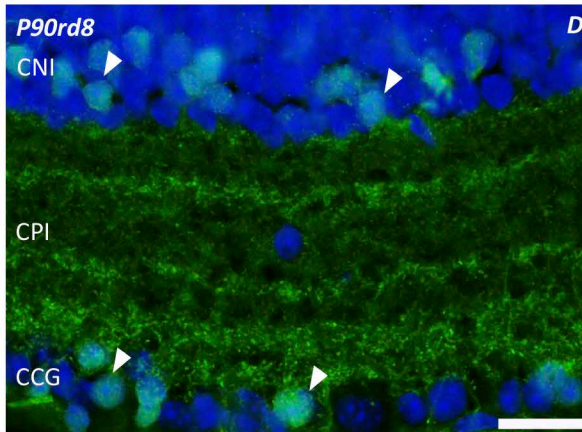
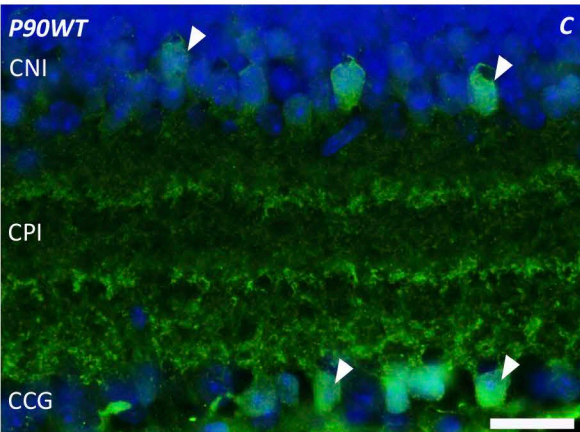
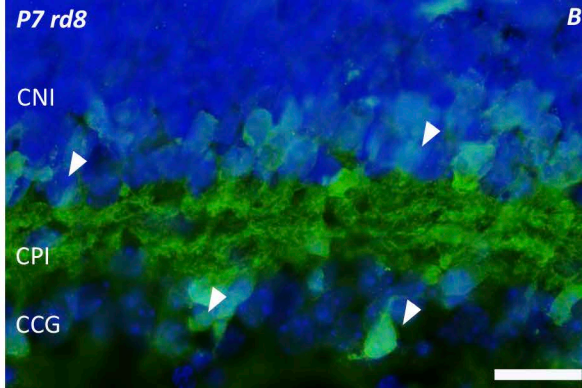
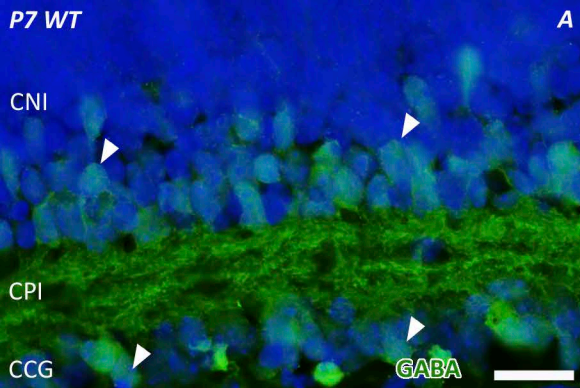


Figura 44: Patrón de marcaje para CRALBP en las retinas control y mutante a estadios P7 y P90. A-C, a P7, CRALBP (verde) se localiza a lo largo de los procesos radiales de las células de Müller, en retinas silvestre (A) y *Crb1^{rd8}* (B-C). En las áreas donde la MLE empieza a degenerar, los procesos gliales están desorganizados (cabeza de flecha en C). D, localización de CRALBP en los procesos gliales de las células de Müller del ratón control adulto. Las cabezas de flecha en D señalan la disposición en hileras de los núcleos de este tipo celular en la CNI. D', procesos de las células de Müller rodeando los núcleos de los fotorreceptores en la CNE del ratón silvestre adulto. E-F, en retinas mutantes a P90, los procesos gliales teñidos frente a CRALBP están desorganizados y presentan un aspecto hipertrófico (E, E' y F), mientras que los núcleos de las células de Müller pierden su disposición en hileras (cabezas de flecha en E, F y F'). La imagen F' muestra una roseta de fotorreceptores (delimitada por una línea discontinua) y la CNI adyacente con procesos gliales hipertróficos. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-F. D', E' y F': ampliación de los cuadrados pequeños de D, E y F, respectivamente. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μm ; 10 μm en D', F' y E'.

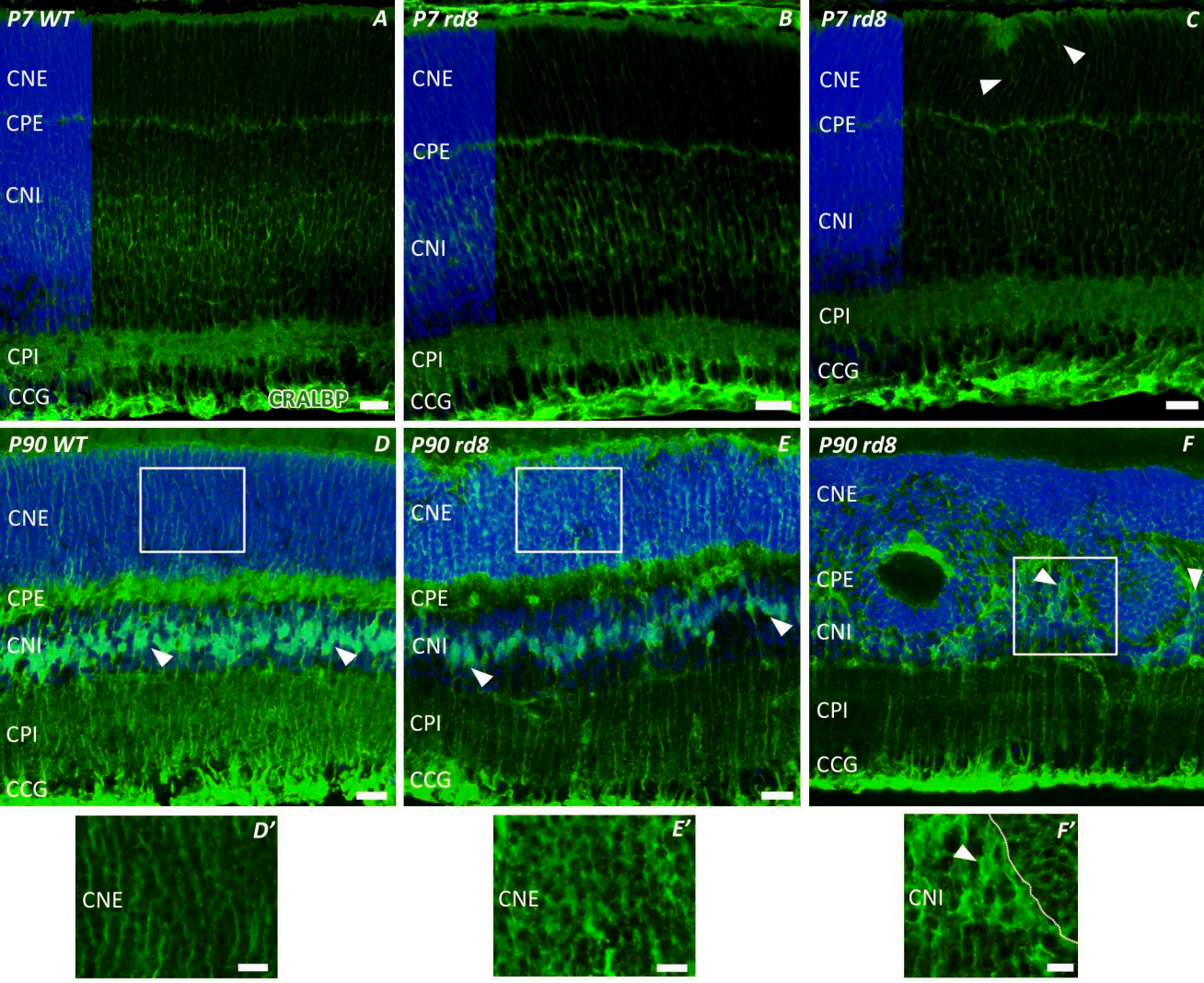


Figura 45: Inmunorreactividad frente a GLAST y GS en retinas de ratones control y mutante a estadios P7 y P90. A-C, la tinción para GLAST (verde) pone de manifiesto a P7 todos los procesos de las células de Müller de las retinas control (A) y mutante (B-C). D-F, en estadio adulto, GLAST se localiza en la glía radial, aunque en retinas *Crb1^{rd8}* (E-F) la intensidad de la tinción es menor que en el silvestre (D). Los insertos en D-F muestran el marcaje para GLAST (rojo) en la MLE de ratones adultos control (inserto en D) y mutantes (insertos de E-F). G-I, inmunofluorescencia para GS (verde) en retinas a P90 de ratones silvestre (G) y *Crb1^{rd8}* (H-I). En las zonas vitreales de la retina control los procesos de las células de Müller positivos para GS parecen más robustos (cabezas de flecha en G) que los de la retina mutante (cabezas de flecha en H-I). En áreas con rosetas de fotorreceptores, las prolongaciones de las células de Müller pierden su orientación (flechas en I). Los insertos en G-I muestran el marcaje para GS (rojo) en la MLE de ratones adultos control (inserto en G) y mutantes (insertos de H-I). J, WB para GS. Se aprecia una banda de mayor intensidad a 42 kDa a P90 que a P7. GAPDH se usa como control de carga. K, cuantificación de los niveles relativos de GS a P90 (n=6). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. A P90, la cantidad de GS es menor en la retina del ratón mutante comparada con la control, aunque la diferencia no es significativa. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-I. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m; 10 μ m en insertos.

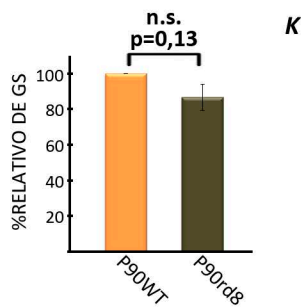
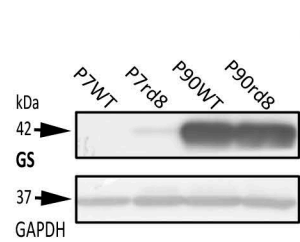
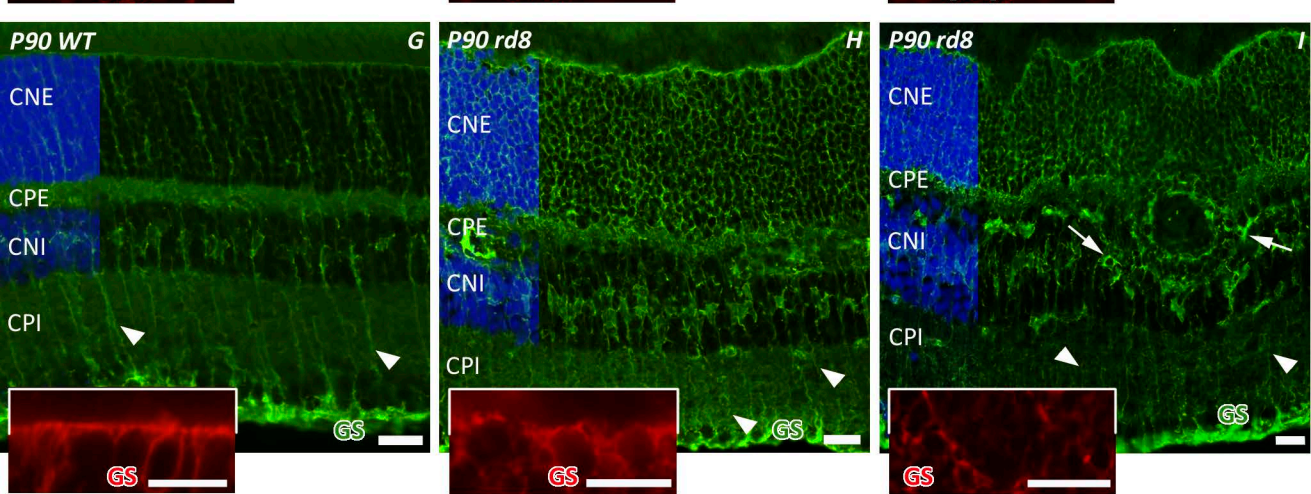
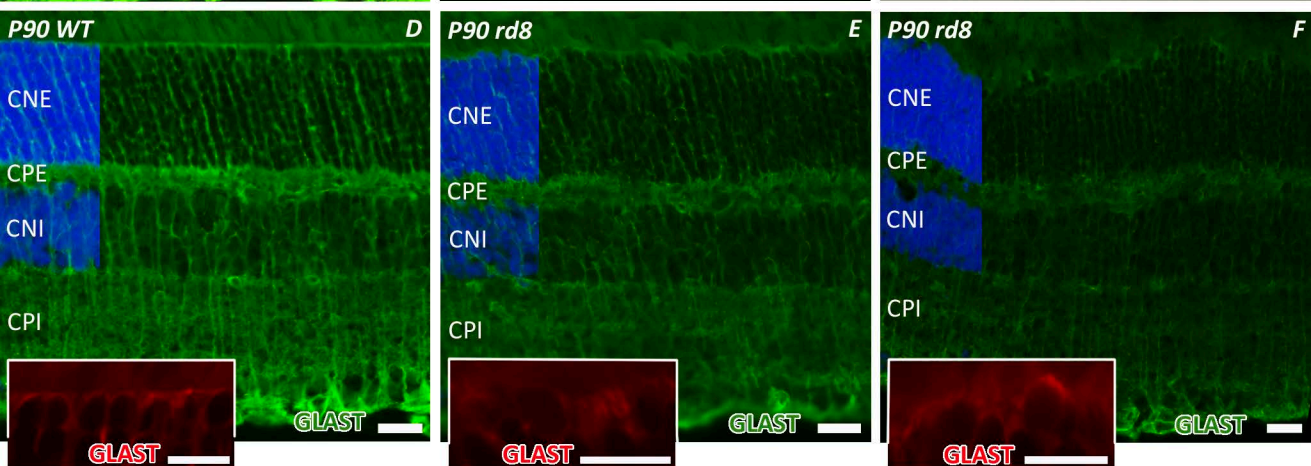
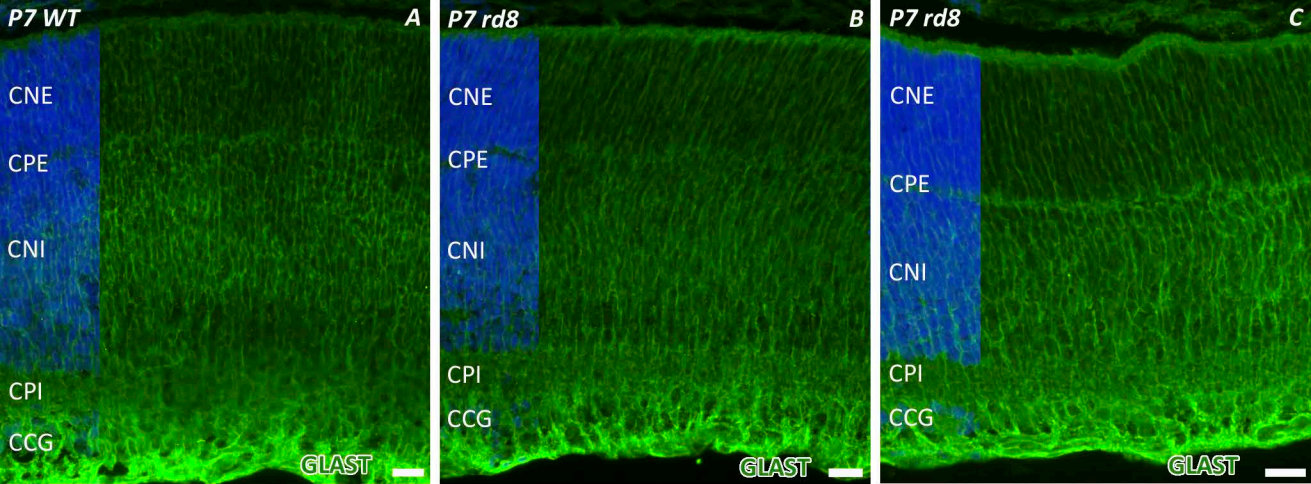


Figura 46: Inmunorreactividad de GFAP y SOX2 en retinas control y mutante a estadios P7 y P90. A-F, inmunofluorescencia frente a GFAP (verde) y SOX2 (rojo) a P7 (A-C) y P90 (D-E), en retinas de ratones control (A, D) y *Crb1^{rd8}* (B-C, E-F). SOX2 está presente en los núcleos de astrocitos, células de Müller y una subpoblación de células amacrinas (A-F). En la CCG de ambos genotipos a P7, los astrocitos expresan SOX2 y GFAP (cabezas de flecha en A-B), con mayor intensidad de marcaje en las retinas mutantes (B-C). Hay procesos gliales GFAP⁺ no asociados a núcleos SOX2⁺ (cabezas de flecha hueca en A-B). En zonas en degeneración del mutante a P7, GFAP se expresa en algunas prolongaciones de las células de Müller que cruzan la CPI (flecha en C). D, en animales adultos control, el marcaje para GFAP tiñe los procesos gliales de la CCG. Las cabezas de flecha en D muestran los núcleos SOX2⁺ en una hilera a lo largo de la CNI. E, en áreas sin rosetas de fotorreceptores de retinas *Crb1^{rd8}* adultas, la proteína GFAP sólo se expresa en procesos de las células de Müller que atraviesan la CPI (flechas en E). F, en las rosetas, GFAP tiñe los procesos de glía reactiva que cruzan la retina y envuelven las rosetas (flechas en F). Los núcleos SOX2⁺ de la CNI pierden su disposición en hilera (E-F), rodean las rosetas de fotorreceptores (F) y algunos están asociados a procesos de glía reactiva (cabeza de flecha en F). G, WB para GFAP (49 kDa), cuya intensidad aumenta desde retinas P7 control hasta retinas P90 *Crb1^{rd8}*. GAPDH se usa como control de carga. H, cuantificación de los niveles relativos de GFAP a P7 y P90 (n=7). Los resultados se representan gráficamente como la media ± SEM. La cantidad de GFAP es superior en el ratón mutante en ambos estadios, con diferencias altamente significativas. I, variación de los niveles de GFAP entre los estadios de P7 y P90. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de proteína a P7 y P90. La ganancia de GFAP a P90 con respecto a P7 es superior en retinas *Crb1^{rd8}* comparadas con las silvestres. J, WB para SOX2 (34 kDa), aunque también aparecen varias bandas extra entre 37 y 50 kDa. GAPDH se usa como control de carga. K, la cuantificación de los niveles relativos de SOX2 a P7 y P90 (n=5) no muestra diferencias significativas entre los genotipos. Los resultados se representan gráficamente como la media ± SEM. L, variación de los niveles de SOX2 entre los estadios de P7 y P90. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de proteína a P7 y P90. La ganancia de SOX2 a P90 con respecto a P7 es aproximadamente 1,5 veces superior en ambos genotipos. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-F. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 µm.

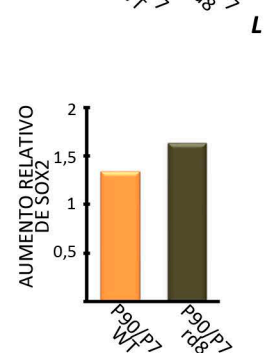
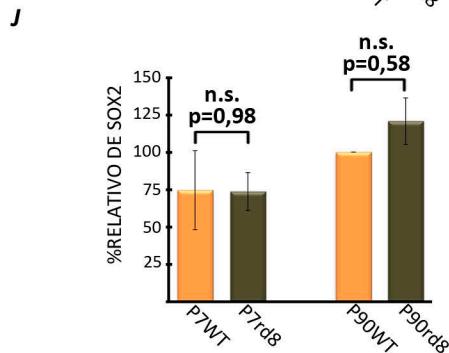
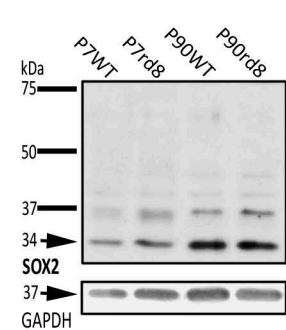
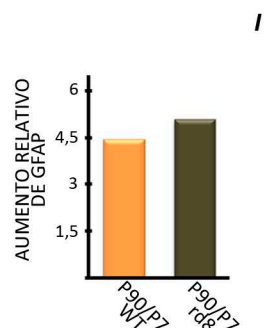
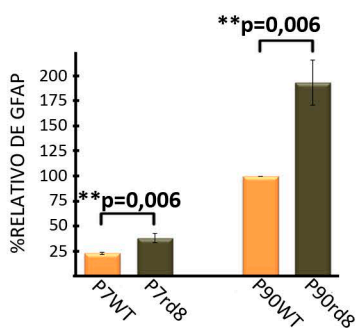
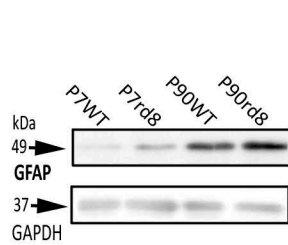
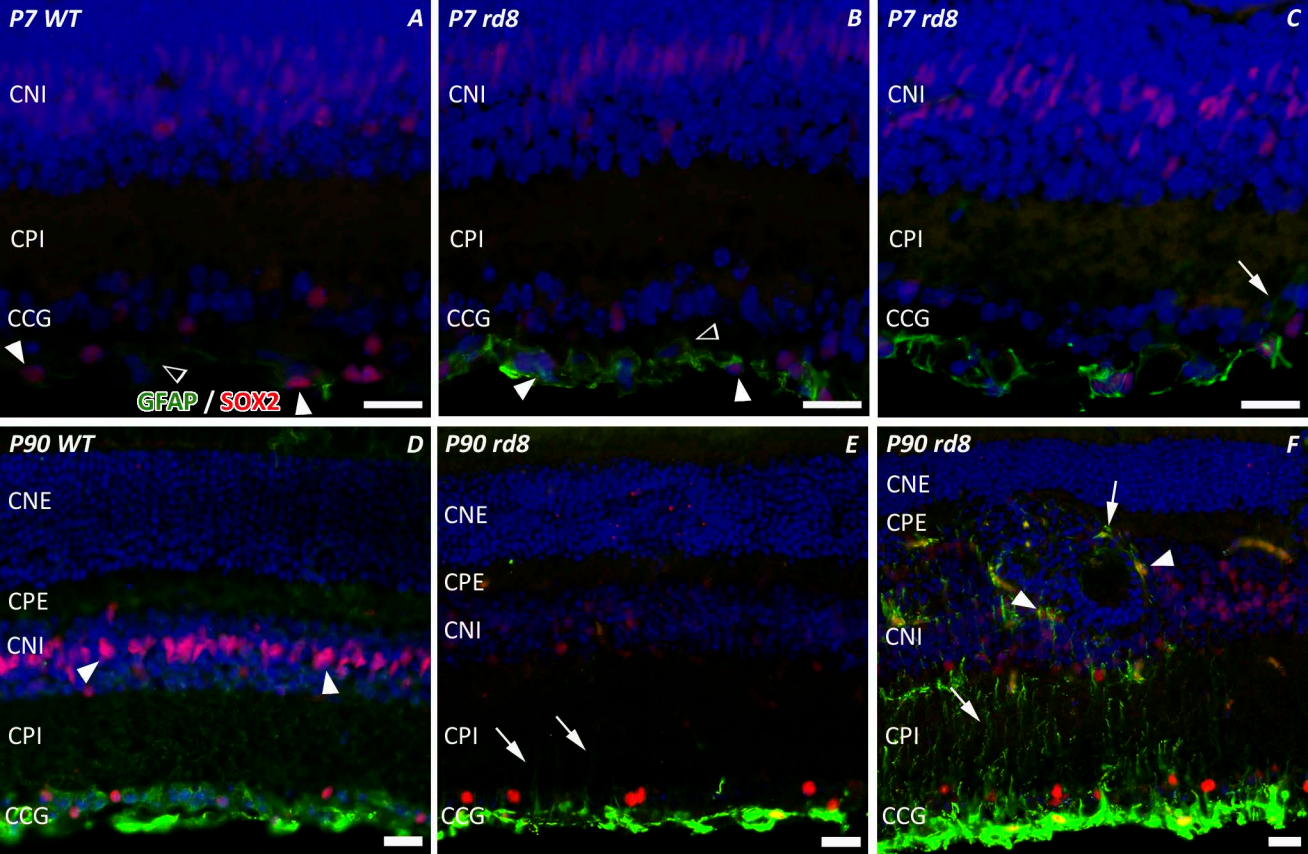


Figura 47: Patrón de expresión de kir 4.1 en retinas control y mutantes a estadios P7 y P90. **A-C**, a P7, las prolongaciones que contienen los canales de K⁺ Kir 4.1 (verde) atraviesan tanto la retina silvestre (**A**) como la mutante (**B-C**). En ambos genotipos están concentrados en áreas esclerales (insertos en **A-C**). En zonas en degeneración hay pérdida de marcaje para Kir 4.1 en la CPE (flecha en **C**). **D**, localización de Kir 4.1 en la retina silvestre adulta. **E-F**, la tinción para Kir 4.1 (verde) en retinas *Crb1^{rd8}* está prácticamente restringida a las capas más internas. En los procesos gliales que rodean las rosetas de fotorreceptores aparece un leve marcaje residual (cabeza de flecha en inserto de **F**). **G-H**, doble inmunofluorescencia para GFAP (rojo) y Kir 4.1 (verde) en retinas mutantes adultas. Los procesos gliales GFAP⁺ de la CPI son kir 4.1⁺ (cabezas de flecha en **G-H**); aunque hay procesos kir 4.1⁺/GFAP⁻ (flechas en **G-H**). Núcleos marcados con DAPI (azul). MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μm.

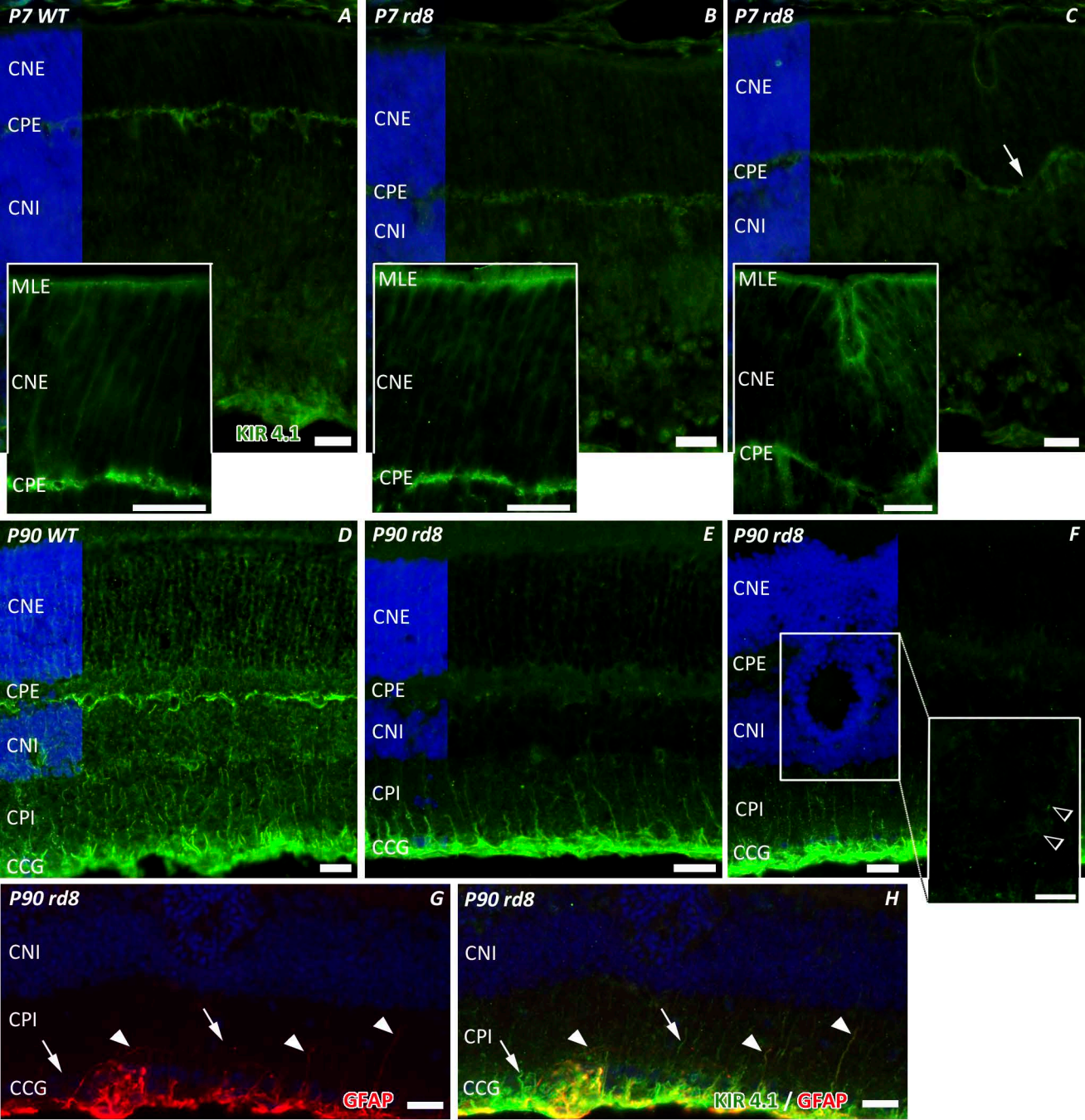
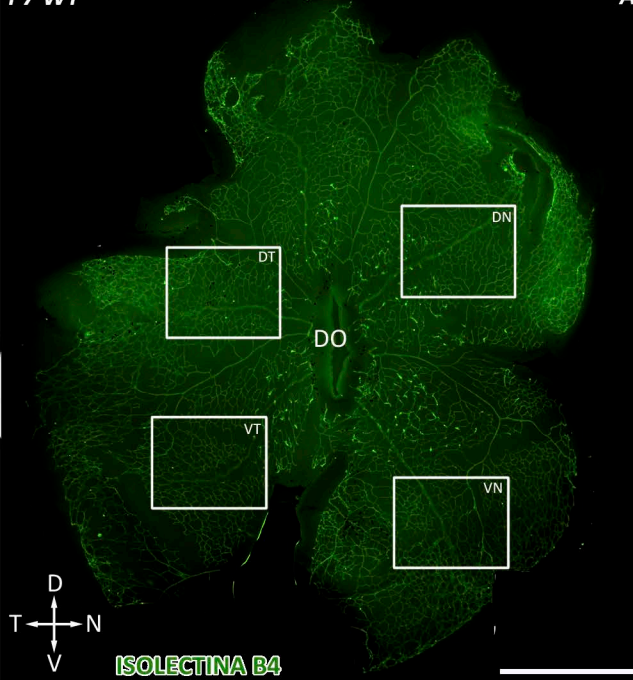
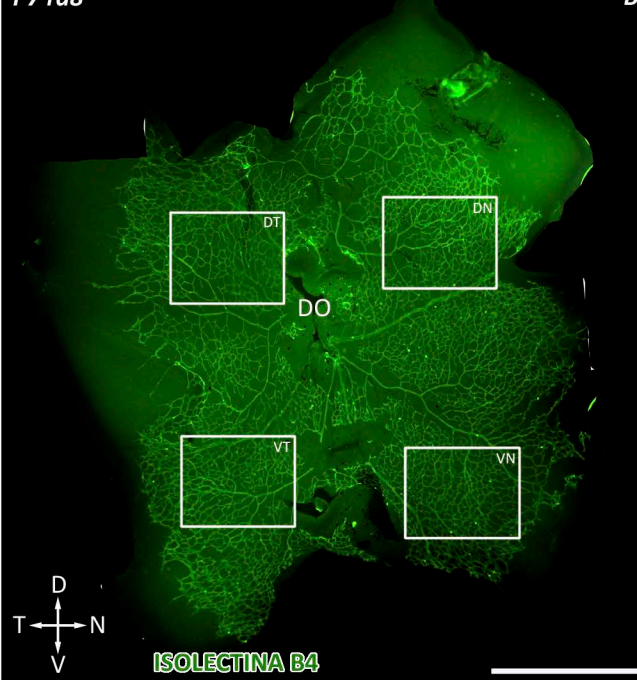


Figura 48: Vascularización de las retinas silvestres y mutantes a P7. A-B, marcaje *in toto* de los vasos sanguíneos con el marcador isolectina B4 (verde) en una retina control (A) y una mutante (B). C-D, insertos de los recuadros mostrados en A y B que muestran la red de vasos sanguíneos de las zonas DT, DN, VN y VT de la retina silvestre (C) y *Crb1^{rd8}* (D). E-G, cuantificación de la intensidad del marcador isolectina B4 (E), y de la densidad de vasos sanguíneos (F-G) (n=4, en todos los casos). Los resultados se representan gráficamente como la media de las intensidades de cada área en estudio \pm SEM. La intensidad de la tinción es superior en las retinas mutantes con respecto a los controles, con una diferencia significativa en las zonas DT y DN, y altamente significativa en las áreas VN y VT (E). La densidad de la vascularización en las retinas mutantes es superior en las regiones VN y VT, con diferencias altamente significativas en el primer caso, y significativas en el segundo (F). No hay diferencias en las otras dos áreas (F). La región NV de las retinas *Crb1^{rd8}* tiene mayor densidad de vasos sanguíneos, existiendo diferencias significativas con la zona NT, y altamente significativas con las áreas DT y DN (G). No existen diferencias significativas entre las otras tres regiones (G). D, dorsal; N, nasal; V, ventral; T, temporal; DN, dorsonasal; DT, dorsotemporal; VN, ventronasal; VT, ventrotemporal; DO, disco óptico. Barras de escala: 1 mm en A-B; 0,2 mm en insertos de C y D.

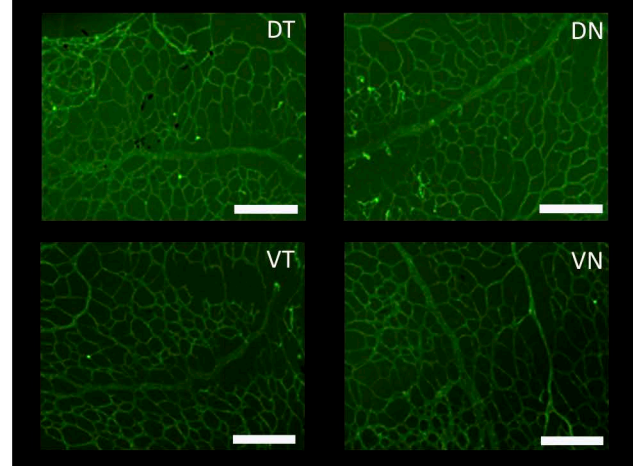
P7 WT



P7 rd8



P7 WT



P7 rd8

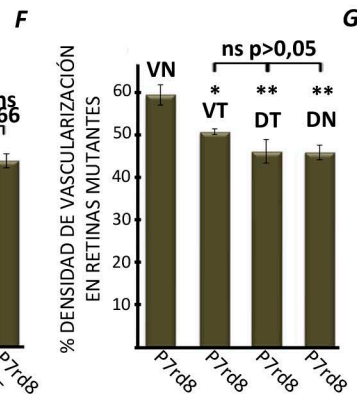
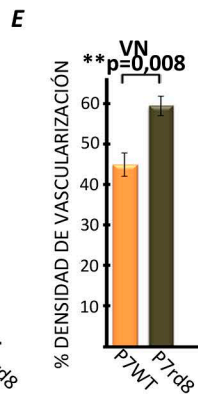
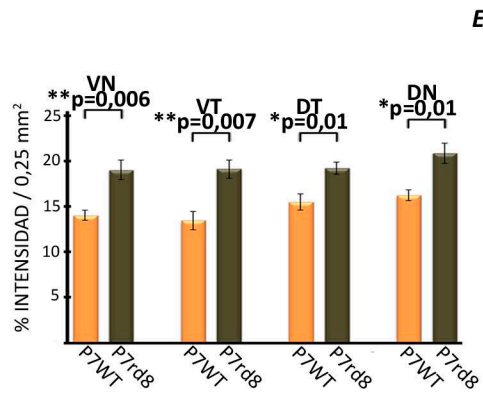
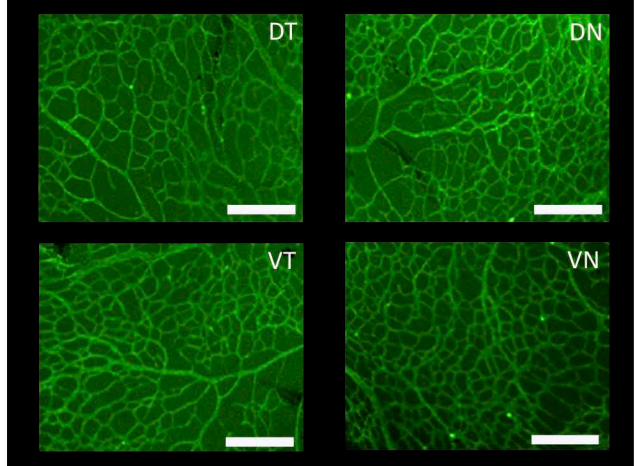


Figura 49: Caracterización de los cultivos primarios de las células de Müller. A-D, seguimiento del cultivo a diferentes días. A DIC5 existen muchos agregados celulares y algunas células aisladas (**A**); el número de células aumenta a DIC9 (**B**), presentando un aspecto más similar a glía radial (cabeza de flecha en **B**), aunque aún se observan agregados celulares (inserto **B**). A DIC15 (**C**) y DIC21 (**D**), hay una elevada diferenciación y confluencia celular. **E-H**, las células en cultivo expresan vimentina (**E**), GLAST (**F**), CD44 (**G**) y GFAP (**H**). La mayor intensidad del marcaje para vimentina se localiza rodeando al núcleo (cabeza de flecha en **E**), al igual que para GLAST (cabeza de flecha en **F**), que también está presente en los filopodios (cabeza de flecha hueca en **F**). CD44 se localiza principalmente en la membrana plasmática (cabeza de flecha en **G**), prolongaciones celulares (cabeza de flecha hueca en **G**) y en acúmulos citoplasmáticos (inserto en **G**). En los cultivos se encuentran células GFAP positivas (cabeza de flecha en **H**) y GFAP negativas (flecha en **H**). **I-J**, no hay marcaje para fibroblastos (**I**), ni para la proteína RPE65, típica de epitelio pigmentario (**J**). Núcleos marcados con DAPI (azul) en I-J. Barras de escala: 50 μm en A-D; 20 μm en E-J.

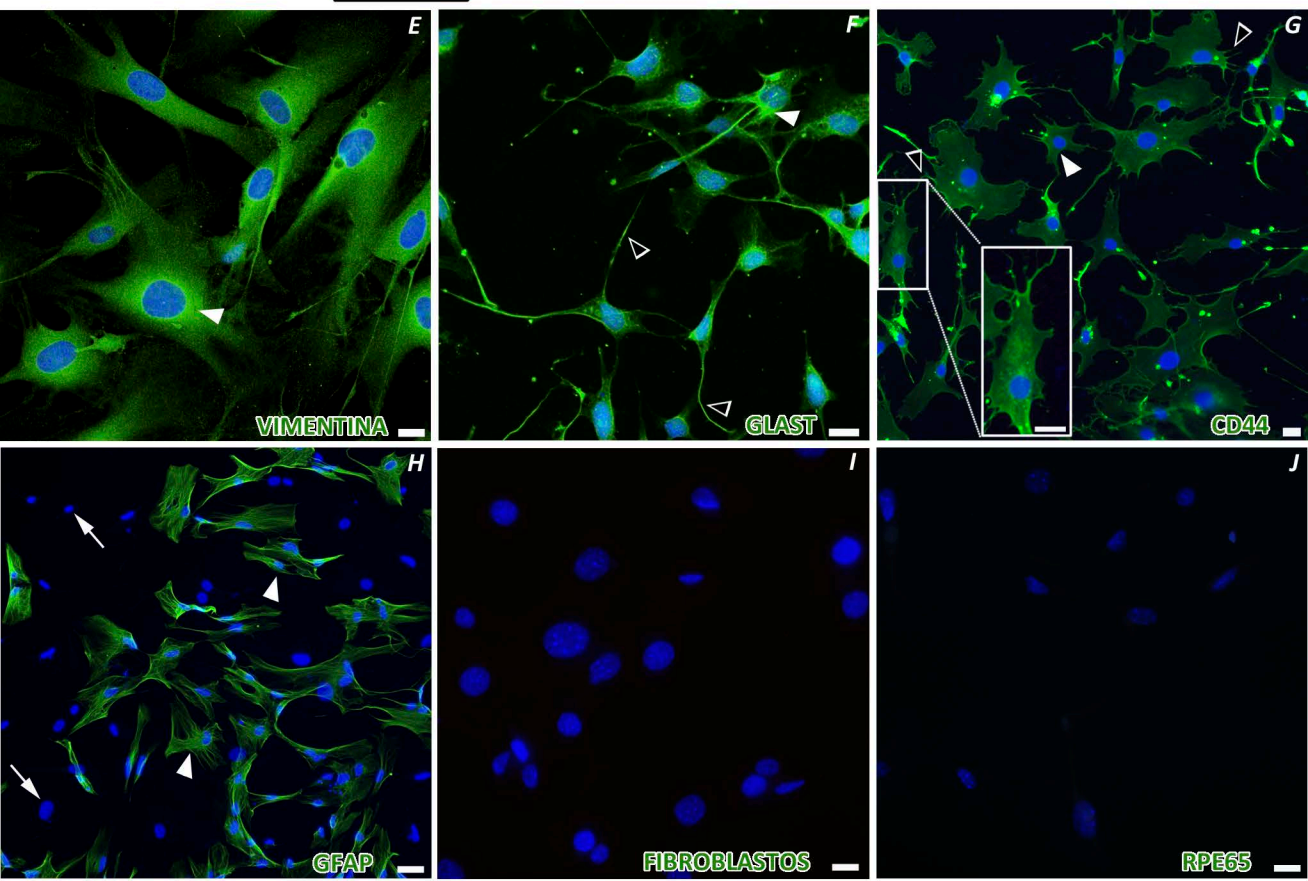
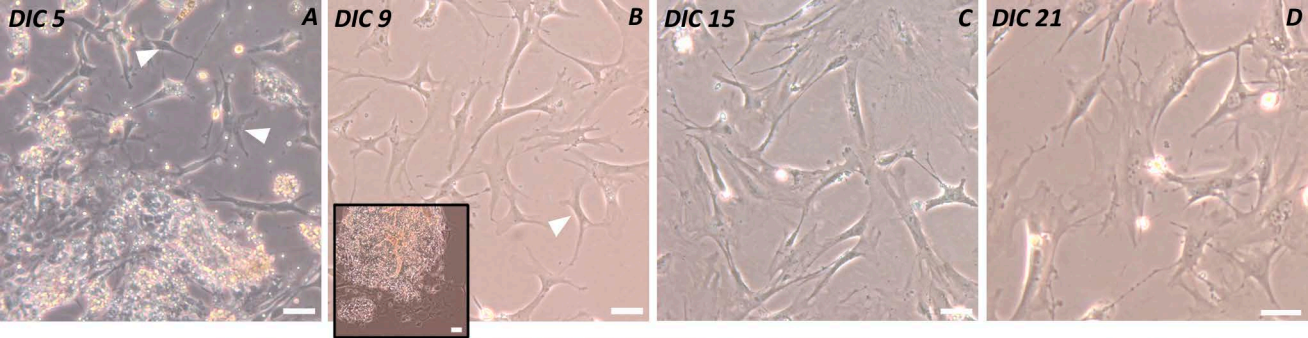


Figura 50: Análisis de la viabilidad y proliferación en los cultivos primarios de las células de Müller. Ensayo de MTT a DIC15 (A) y DIC21 (E) en cultivos de células de Müller ($n \geq 6$) procedentes de retinas mutantes y control. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. A DIC15 (A) existe mayor viabilidad de las células de Müller mutantes; sin embargo, a DIC21 (E) la viabilidad de las células silvestres es mayor. En ambos casos las diferencias son estadísticamente significativas. Análisis de la proliferación celular a DIC15 (B-D) y DIC21 (F-H) en cultivos de células de Müller ($n \geq 4$) procedentes de retinas mutantes y control. B-C y F-G, tinciones frente a la proteína Ki67 (rojo) en células de Müller silvestre (B, F) y mutantes (C, G) a DIC15 (B-C) y DIC21 (F-G). D y H, recuentos de células positivas frente a Ki67. Los resultados muestran el porcentaje medio \pm SEM del recuento de células Ki67⁺ respecto al número total de células del cultivo ($n \geq 4$). A DIC15 (D) el porcentaje de células en proliferación en células *Crbl*^{1^{rdS}} es mayor que en células control, mientras que a DIC21 (H) ese patrón se invierte. En ambos casos la diferencia es estadísticamente significativa. Núcleos marcados con DAPI (azul) en B-C y F-G. Barras de escala: 20 μ m.

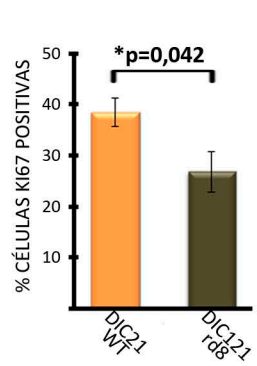
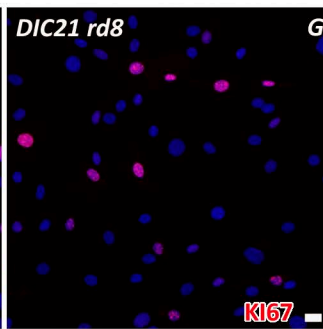
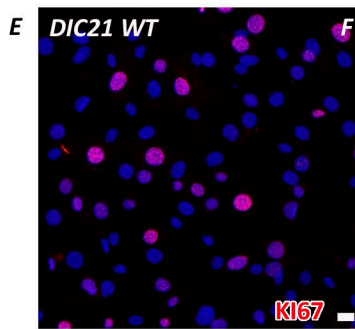
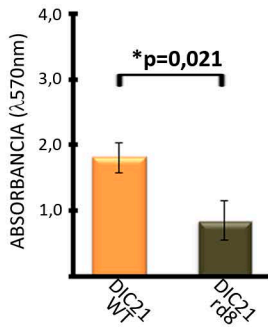
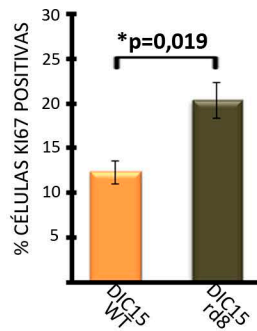
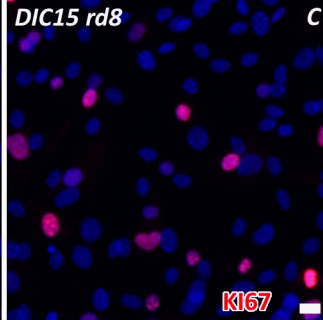
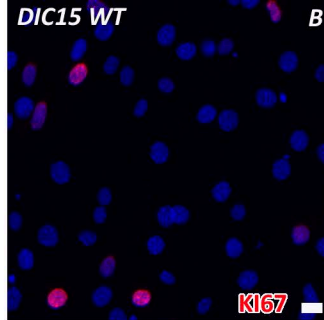
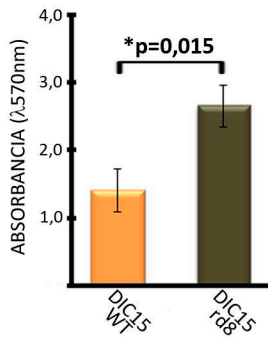


Figura 51: Marcaje para la proteína β -catenina en cultivos de células de Müller. **A-D**, la proteína β -catenina (verde) se localiza en la periferia de las células de Müller control (**A, C**) y mutante *Crb1^{rd8}* (**B, D**), a 15 (**A-B**) y 21 días de cultivo (**C-D**). Los insertos en **A-D** muestran que los sitios donde las células se asocian presentan mayor intensidad de marcaje para β -catenina. **E**, en el WB frente a β -catenina se observa una banda positiva a 92 kDa, con intensidad similar en todas las muestras. Se usa GAPDH como control de carga. **F**, cuantificación de los niveles relativos de β -catenina a DIC15 y DIC21 (n=5). Los resultados se representan gráficamente como la media \pm SEM. La cantidad de β -catenina es superior en las células de Müller mutantes en ambos estadios, pero las diferencias no son significativas. **G**, variación de los niveles de β -catenina entre los días de cultivo 15 y 21. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de proteína a DIC15 Y DIC21. En ambos casos existe un descenso similar en el nivel de proteína a DIC21. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-D. Barras de escala: 20 μ m.

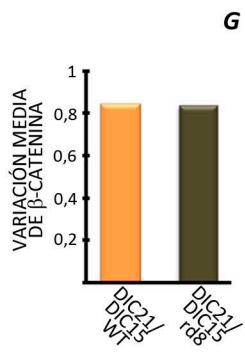
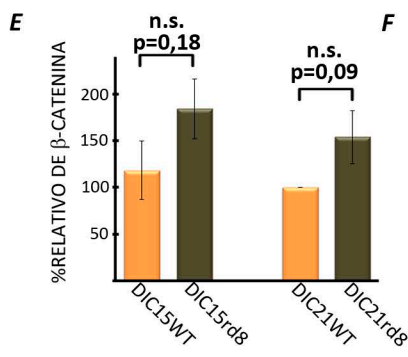
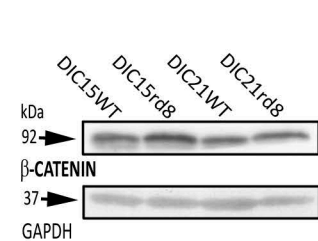
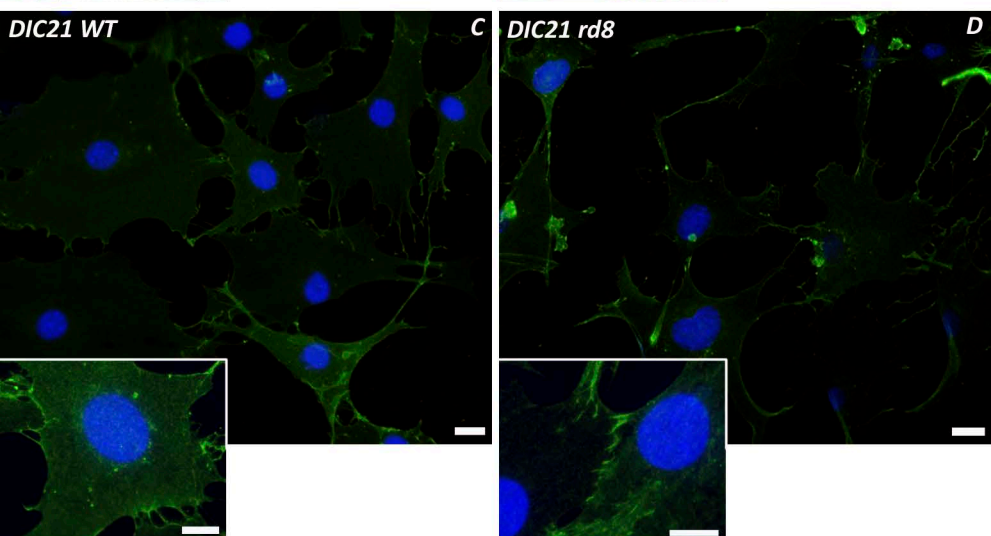
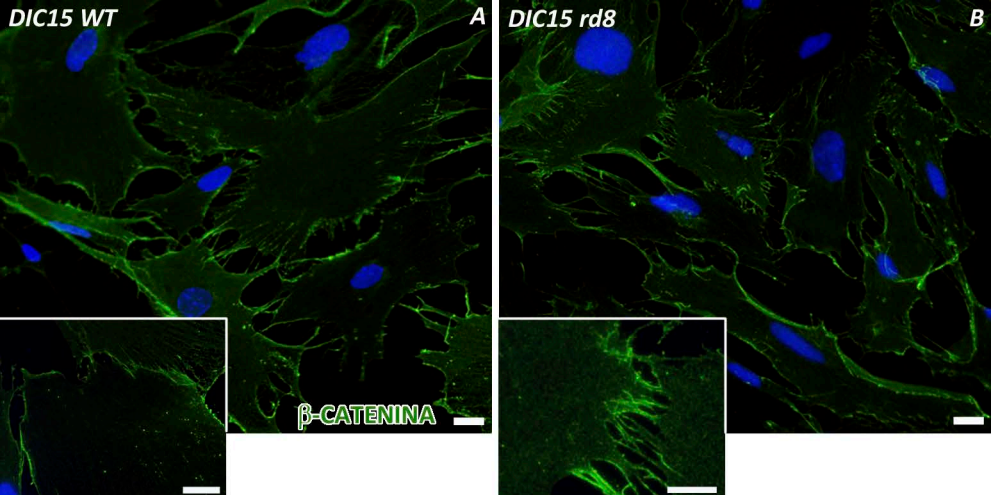


Figura 52: Marcaje para GFAP y SOX2 en células de Müller a 15 y 21 días de cultivo. **A-D**, GFAP (verde) sólo está presente en algunas de las células de Müller en cultivo en los estadios de DIC15 (**A-B**) y DIC21 (**C-D**), en células silvestres y mutantes *Crb1^{rd8}*. **E-L**, doble tinción para GFAP (verde) y SOX2 (rojo). SOX2 se localiza en todas las células de Müller en cultivo (**E-L**), y presenta una localización mayoritariamente nuclear en las células GFAP⁺ (cabezas de flecha en **E-L**), mientras que aparece principalmente en el citoplasma de las células GFAP⁻ (flechas en **E-L**). **M**, el WB para SOX2 muestra una banda positiva correspondiente a la fracción sumoilizada entre los 50 y 75 kDa, con intensidad similar en todos los casos analizados (flecha en **M**), y diferentes bandas extra de un peso inferior a 50 kDa. GAPDH se usa como control de carga. **N**, cuantificación de los niveles relativos de SOX2 sumoilizado a DIC15 y DIC21 (n=5). Los resultados se representan gráficamente como la media ± SEM. Se observa una cantidad mayor de proteína en células mutantes con respecto a las controles; sin embargo, no existen diferencias significativas en ninguno de los estadios. **O**, variación de los niveles de SOX2 sumoilizado entre DIC21 y DIC15. Los resultados se representan gráficamente como el cociente de las medias de los valores relativos de proteína a 15 y 21 días de cultivo. El descenso en los niveles de SOX2 es algo superior en las células silvestres respecto a las mutantes. Núcleos marcados con DAPI (azul) en A-L. Barras de escala: 20 µm.

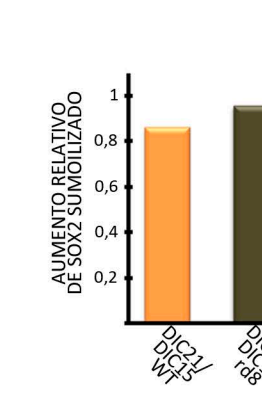
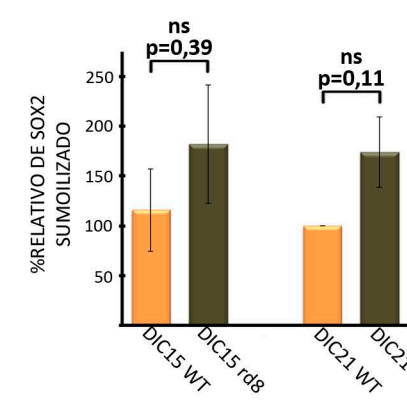
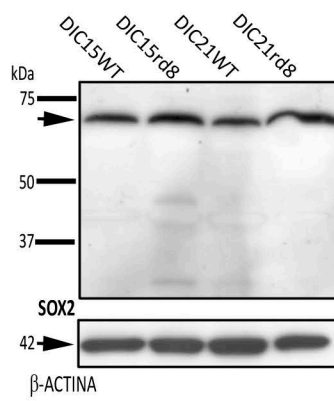
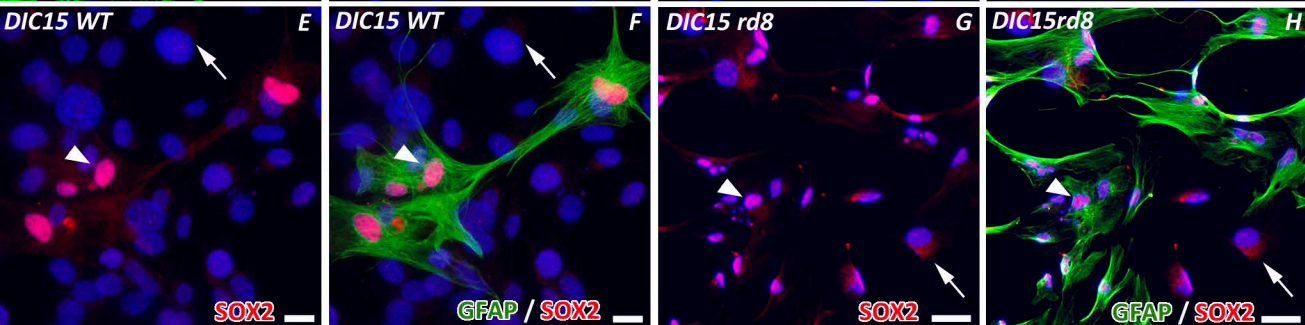
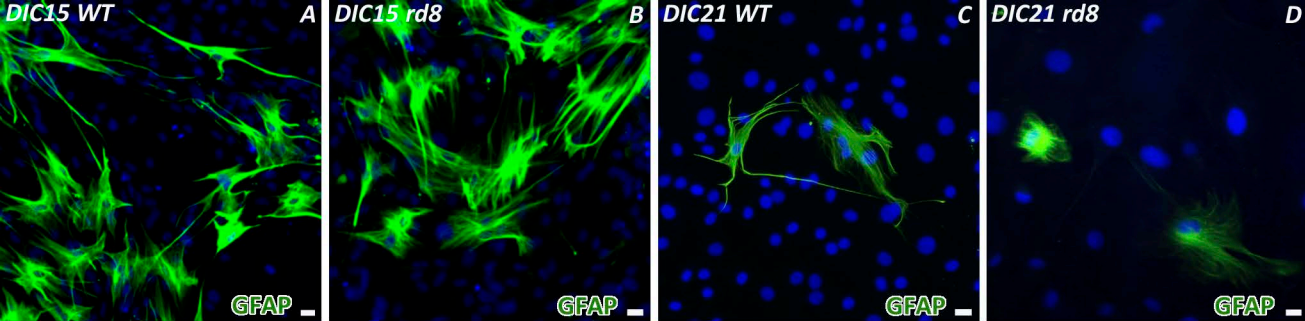
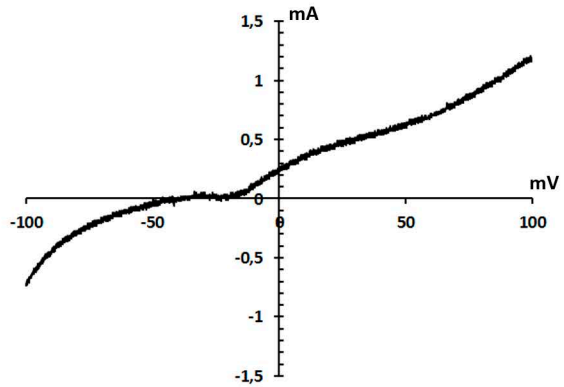


Figura 53: Análisis de la relación corriente–voltaje de las células de Müller de 21 días de cultivo, registradas mediante la técnica de *patch-clamp*. **A**, registro de una célula de Müller control en cultivo. **B**, registro de una célula de Müller *Crb1^{rd8}* en cultivo. En ambos casos, las células se despolarizaron desde un potencial negativo ($V_h = -100$ mV) mediante rampa despolarizante (5 mV/ms). No se aprecian diferencias significativas entre ambos genotipos en la relación corriente-voltaje.

DIC21WT



DIC21rd8

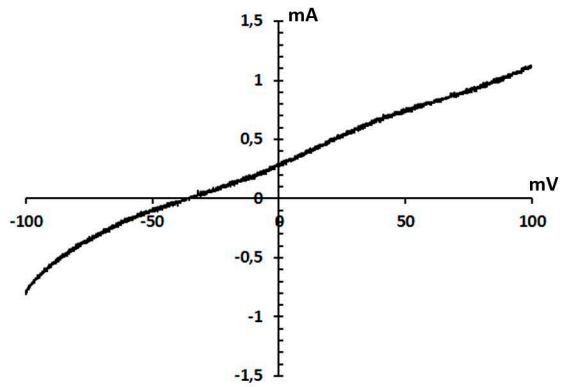


Figura 54: Tinción histoquímica frente a la actividad de β -galactosidasa tras su transfección *in vitro* e *in vivo*. A-B, en azul, marcaje para la actividad de la enzima β -galactosidasa (cabezas de flecha en A y B) en células de Müller en cultivo silvestres (A) y mutantes (B) tras su transfección mediante el agente Chariot. C, tinción histoquímica para la enzima β -galactosidasa en células de Müller en cultivo sin transfectar (C) o sin usar el agente de transfección (C'). D-G, tinciones para detectar la actividad enzimática de β -galactosidasa (azul) tras su transfección mediante inyecciones intravitreales (D) o subretinales (E-G) con el agente Chariot. El inserto en D muestra el marcaje a nivel de la zona más interna de la retina. Las cabezas de flecha en E-F señalan el marcaje repartido por todo el espesor de la retina. Las flechas en G muestran la tinción en las partes internas de la retina cercanas al punto de inyección. SF, segmentos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μm en A-G; 50 μm en C'.

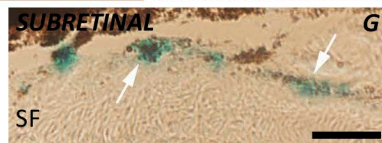
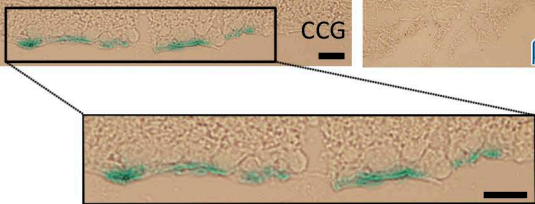
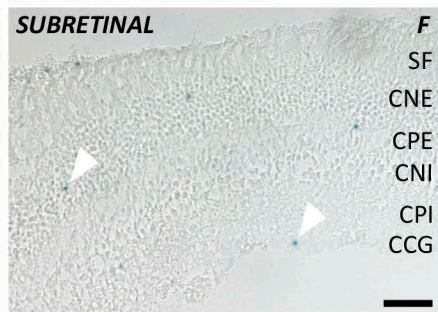
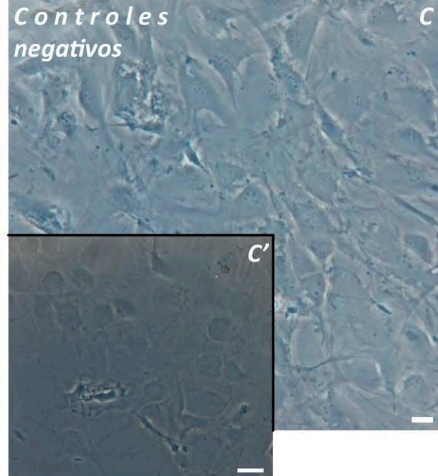
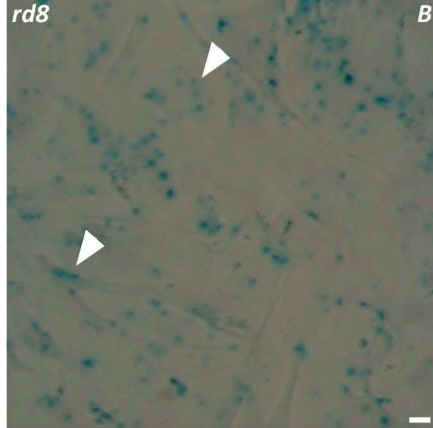
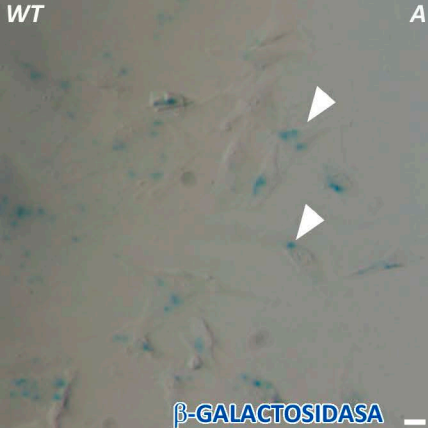


Figura 55: Detección y localización de CRB3 en la retina adulta y en desarrollo. **A y D,** WB con dos anticuerpos diferentes frente a CRB3, gCRB3 (**A**) y rCRB3 (**D**) que muestran la expresión de CRB3 en lisados de retina silvestre. Se detectan dos bandas para la proteína (flechas en **A** y **D**) entre 20 y 28 KDa. En los ensayos de competitividad desaparece todo el marcaje específico para CRB3. β -actina y GAPDH se usan como control de carga. **B** y **E** marcaje para CRB3 usando los anticuerpos gCRB3 (verde en **B**) y rCRB3 (verde en **E**) en secciones de retina de ratón adulto. La proteína se localiza en los segmentos de los fotorreceptores, CPE y CPI (cabezas de flecha en **B**). **C** y **F** ensayos de competitividad para gCRB3 (**C**) y rCRB3 (**F**) donde desaparece todo el marcaje específico. **G-H,** en la retina en desarrollo, CRB3 (anticuerpo gCRB3) se localiza en la CPI y en las zonas esclerales de la retina (cabezas de flecha en **G-H**). **I-J,** ensayo de competitividad para CRB3 en secciones de retina a P0 y P4. Todo el marcaje desaparece en ambos estadios. SE, segmentos externos de los fotorreceptores; SI, segmentos internos de los fotorreceptores; RSA, región subapical; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

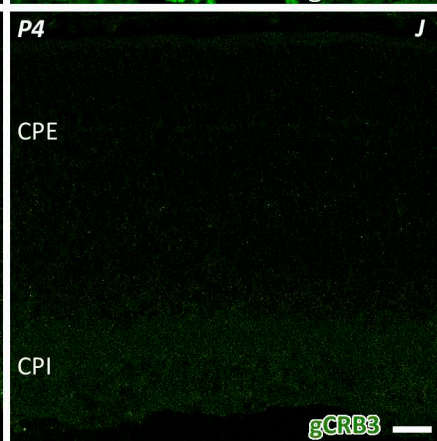
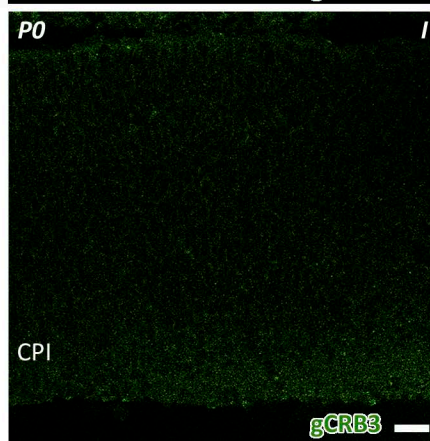
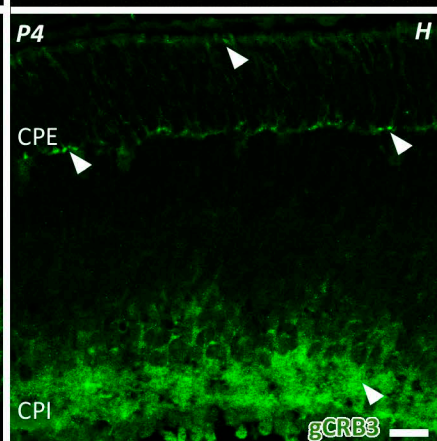
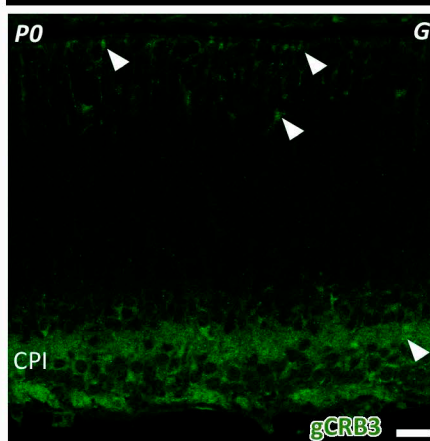
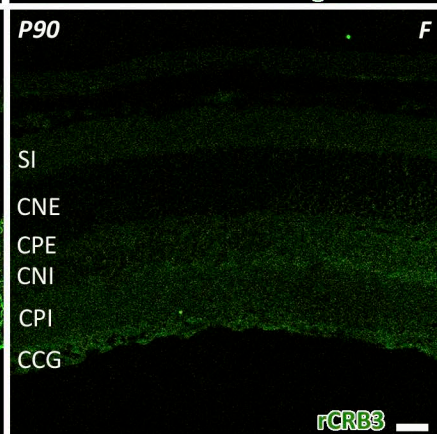
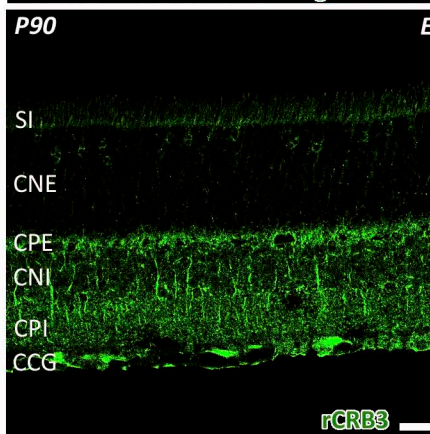
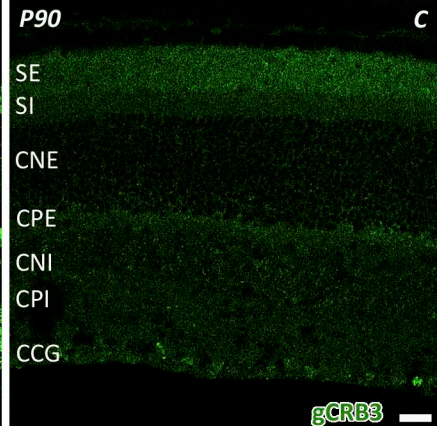
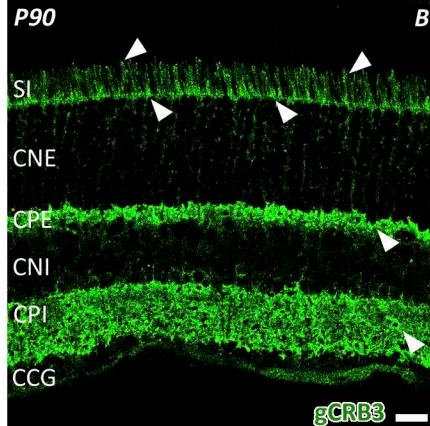
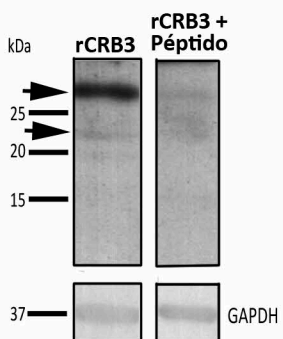
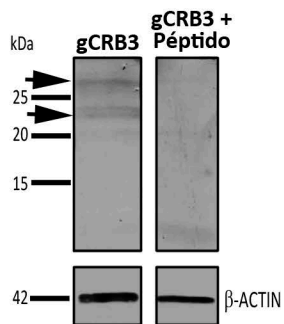


Figura 56: Localización de CRB3 en los SI de los fotorreceptores. Inmunofluorescencia doble para CRB3 (verde en **A, C, G, H** e **I**; rojo en **D** y **F**) y recoverina (rojo en **B-C**), PNA (verde en **E-F**), M-opsina (rojo en **H**) o S-opsina (rojo en **I**). CRB3 colocaliza parcialmente con todos estos marcadores en los SI de los fotorreceptores. Las cabezas de flecha en **A-I** señalan puntos de colocalización para estas proteínas. Las flechas en **D-I** muestran puntos carentes de colocalización. SI, segmentos internos de los fotorreceptores. Barras de escala: 20µm.

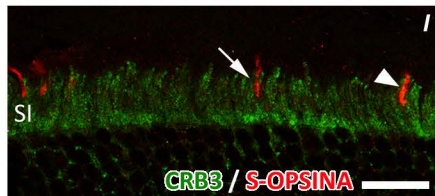
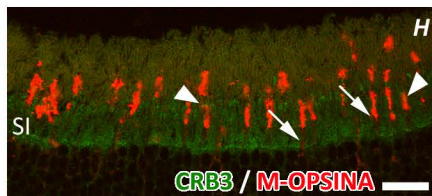
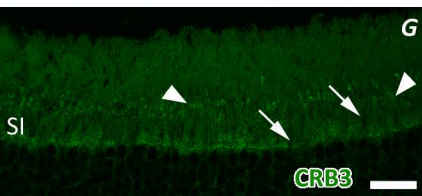
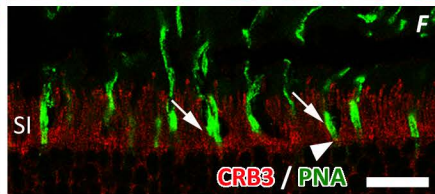
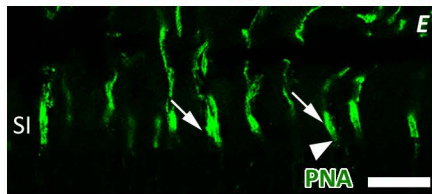
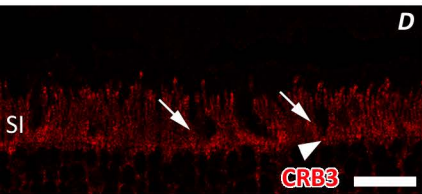
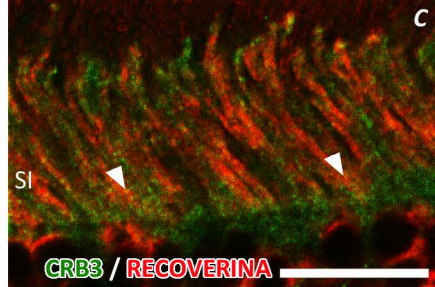
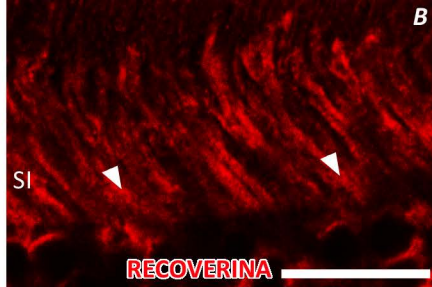
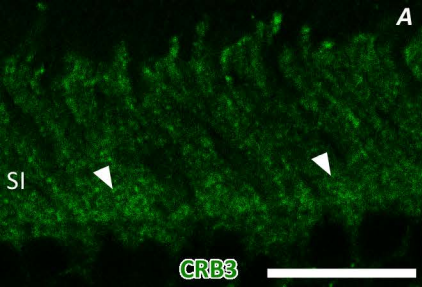


Figura 57: Localización de CRB3 en el área de los SI de los fotorreceptores. Doble IHQ para CRB3 (verde) y β -catenina (rojo en **B-C**), MPP4 (rojo en **E-F**), giantin (rojo en **H-I**), tubulina acetilada (AT, rojo en **K-L**), rodopsina (rojo en **N-O**) y CRALBP (rojo en **Q-R**). **A-C**, CRB3 no está presente en las uniones adherentes de la MLE marcadas para β -catenina. **D-F**, MPP4 y CRB3 colocalizan en los SI de los fotorreceptores (cabezas de flecha en **D-F**). **G-I**, en determinadas zonas de los segmentos internos, CRB3 colocaliza con giantin, que marca membranas del complejo de Golgi (cabezas de flecha en **G-I**); aunque hay algunos perfiles positivos para giantin donde CRB3 no está presente (flechas en **G-I**). **J-L**, CRB3 parece rodear muchos de los cilios de conexión positivos para AT y, en otros casos, ambas proteínas colocalizan (cabezas de flecha en **J-L**). **M-O**, CRB3 colocaliza con la proteína rodopsina sólo en la zona más escleral de los SI de los fotorreceptores (cabezas de flecha en **M-O**). **P-R**, CRALBP colocaliza parcialmente con CRB3 en las células de Müller a nivel de la MLE (cabezas de flecha en **P-R**). SE, segmentos externos de los fotorreceptores; SI, segmentos internos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa. Barras de escala: 20 μ m.

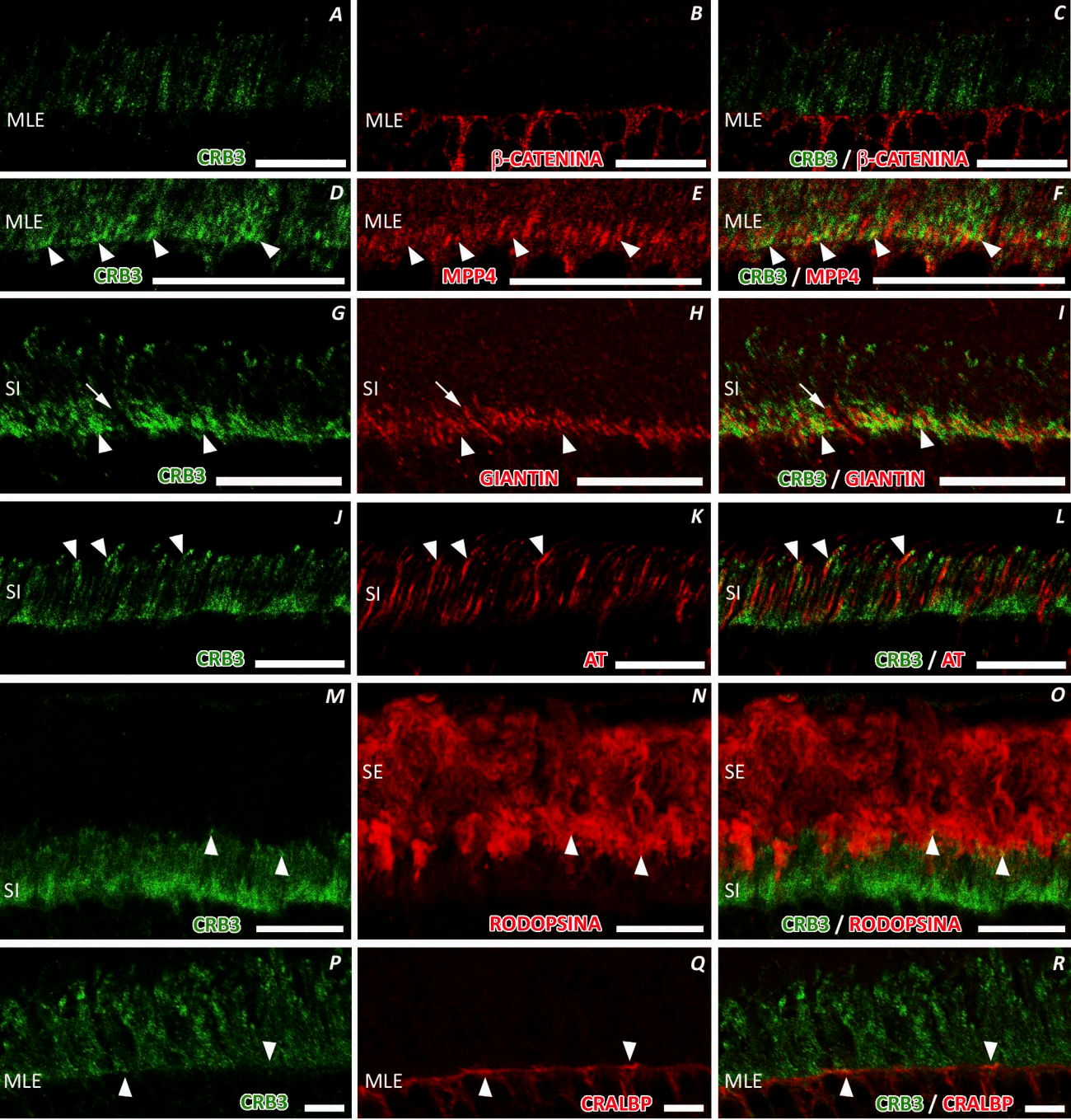


Figura 58: Marcaje para CRB3 en la CPE del ratón adulto. Doble IHQ para CRB3 (verde) y bassoon (rojo en **B-C**), sinaptofisina (SYP, rojo en **E-F**), VGLUT1 (rojo en **H-I**) y β -catenina (rojo en **K-L**). **A-F**, CRB3 parece rodear el marcaje para bassoon (flechas en **A-C**) y colocaliza con SYP (cabezas de flecha **D-F**). **G-I**, VGLUT1 se sitúa en los terminales presinápticos de los fotorreceptores (**H-I**), donde colocaliza con CRB3 (cabezas de flecha en **G-I**). **J-L**, β -catenina no colocaliza con CRB3 en la CPE (ampliaciones en **J-L**). CPE, capa plexiforme externa. Barras de escala: 20 μ m; 5 μ m en ampliaciones.

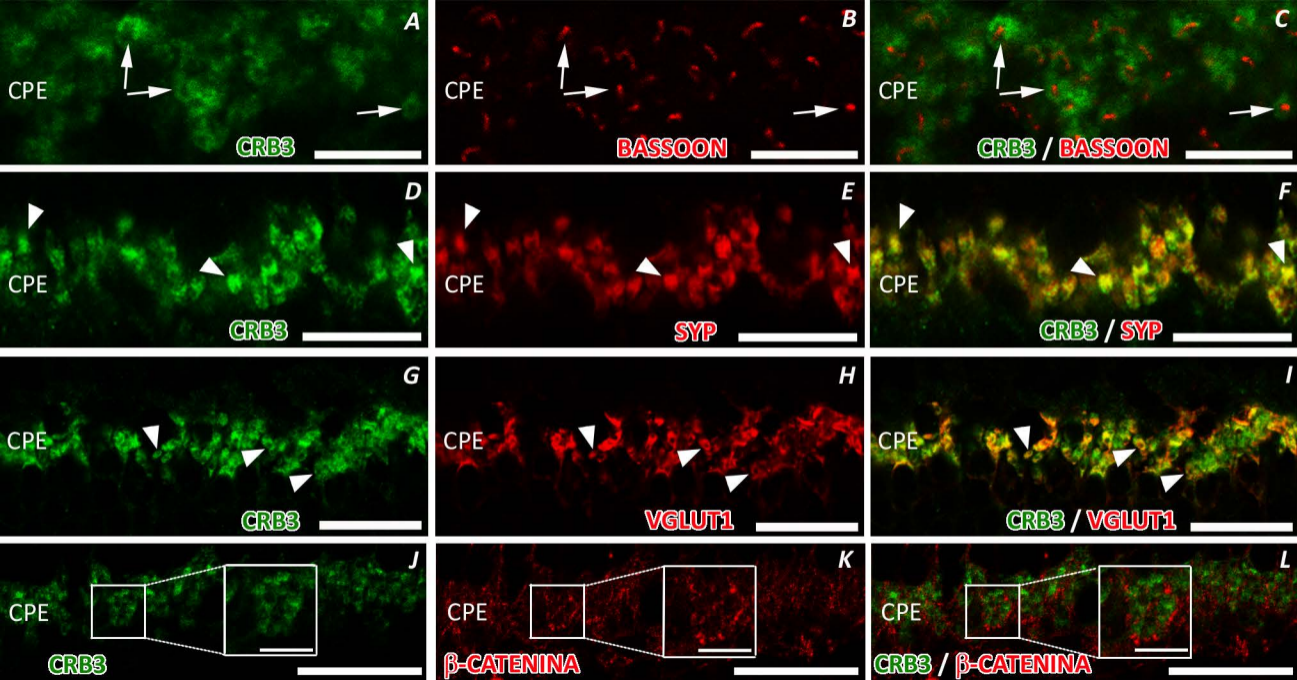


Figura 59: Marcaje para CRB3 en la CPE del ratón adulto (II). Doble IHQ para CRB3 (rojo en **A, C**; verde en **D, F, G, I, J, L, M, N, O, P** y **R**) y marcadores para diferentes tipos celulares presentes en la CPE. **A-C**, CRB3 parece estar presente en la base de los terminales de los conos positivos para PNA (verde) (asteriscos en **A-C**). **D-F**, CRB3 colocaliza con marcadores para M-opsina (rojo en **E-F**) (inserto en **D-F**). **G-I**, recoverina (rojo en **H-I**) está presente en los terminales sinápticos de los conos y bastones, y colocaliza con CRB3 en ambos tipos celulares (cabezas de flecha en **G-I**). **J-L**, MPP4 (rojo en **K-L**) también se localiza en los terminales de ambos tipos de fotorreceptores, donde colocaliza con CRB3 (cabezas de flecha en **J-L**). **M**, CRB3 no colocaliza con CB (rojo en **M**) en las células horizontales de la CPE. **N-O**, anti-PKC α tiñe las células bipolares de bastón (rojo en **N**) y anti-GNB3 una subpoblación de células bipolares de conos (rojo en **O**). En la CPE, las dendritas de las células bipolares no presentan CRB3 (ampliación en **N** y flechas en **N-O**). **P-R**, CRALBP y CRB3 no colocalizan en la CPE. Los procesos de las células de Müller ocupan los huecos dejados por los perfiles positivos para CRB3 (flechas en **P-R**). CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20 μ m; 2 μ m en insertos.

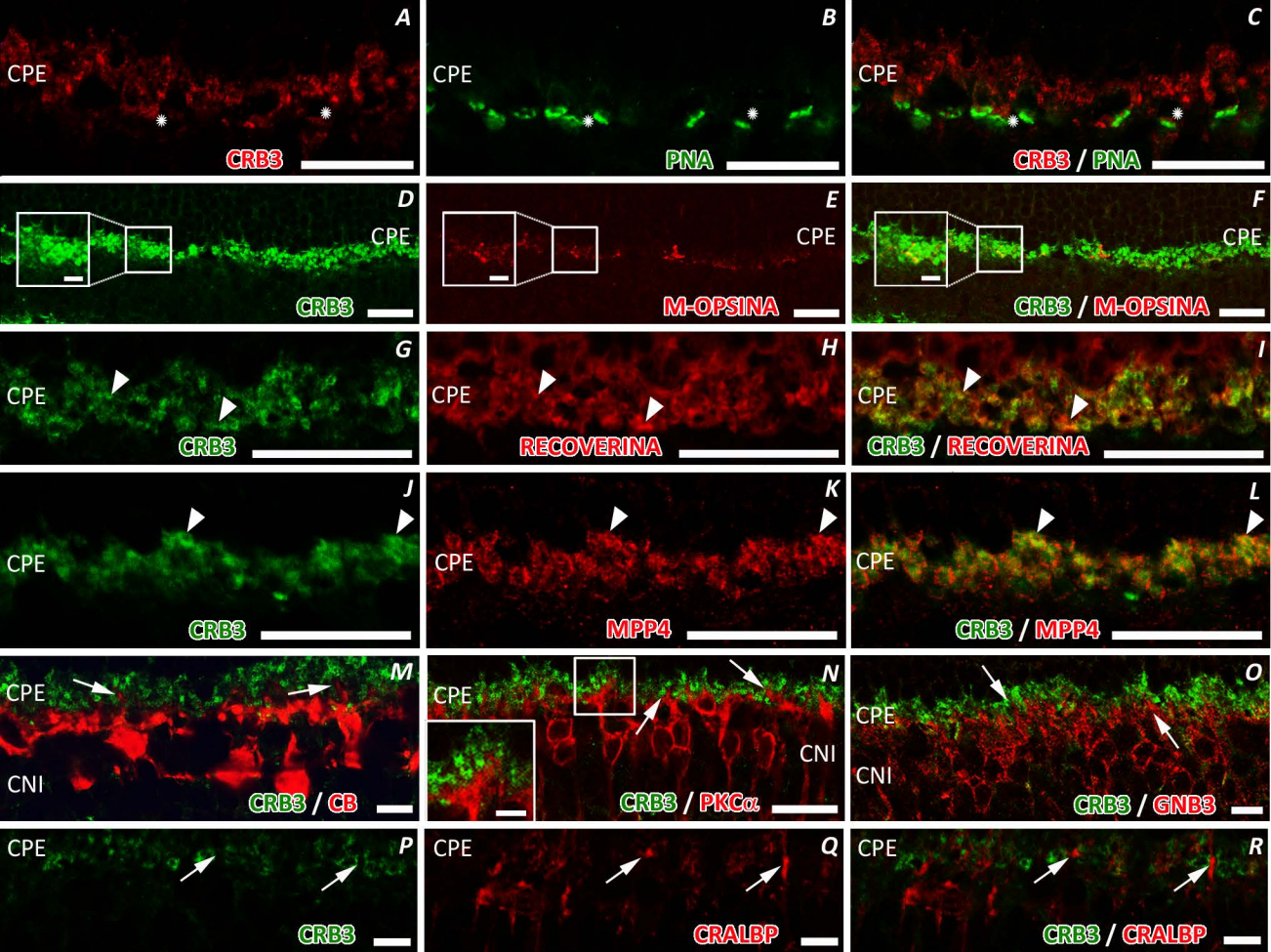


Figura 60: Localización de CRB3 en la CPI del ratón adulto. Doble inmunofluorescencia para CRB3 (verde) y bassoon (rojo en **B-C**), sinaptofisina (SYP, rojo en **E-F**), PKC α (rojo en **H-I**), GNB3 (rojo en **K-L**) y VGLUT1 (rojo en **N-O**). **A-F**, CRB3 en la CPI rodea el marcaje para bassoon (inserto en **A-C**) y colocaliza con SYP (ampliación en **D-F**), aunque se observan algunos perfiles SYP⁺ que no presentan CRB3 (flechas en **D-F**). **G-L**, en la CPI, PKC α está presente en los axones de las células bipolares de bastón (**H-I**), y GNB3 en los axones de una subpoblación de células bipolares de conos (**K-L**). CRB3 colocaliza con ambas proteínas en la parte más interna de la CPI (ampliaciones en **G-I** y cabezas de flecha en **J-L**). **M-O**, VGLUT1 también se sitúa en los terminales presinápticos de las células bipolares (**N-O**). CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Barras de escala: 20 μ m; 5 μ m en ampliaciones. A-F; 2 μ m en ampliaciones G-I.

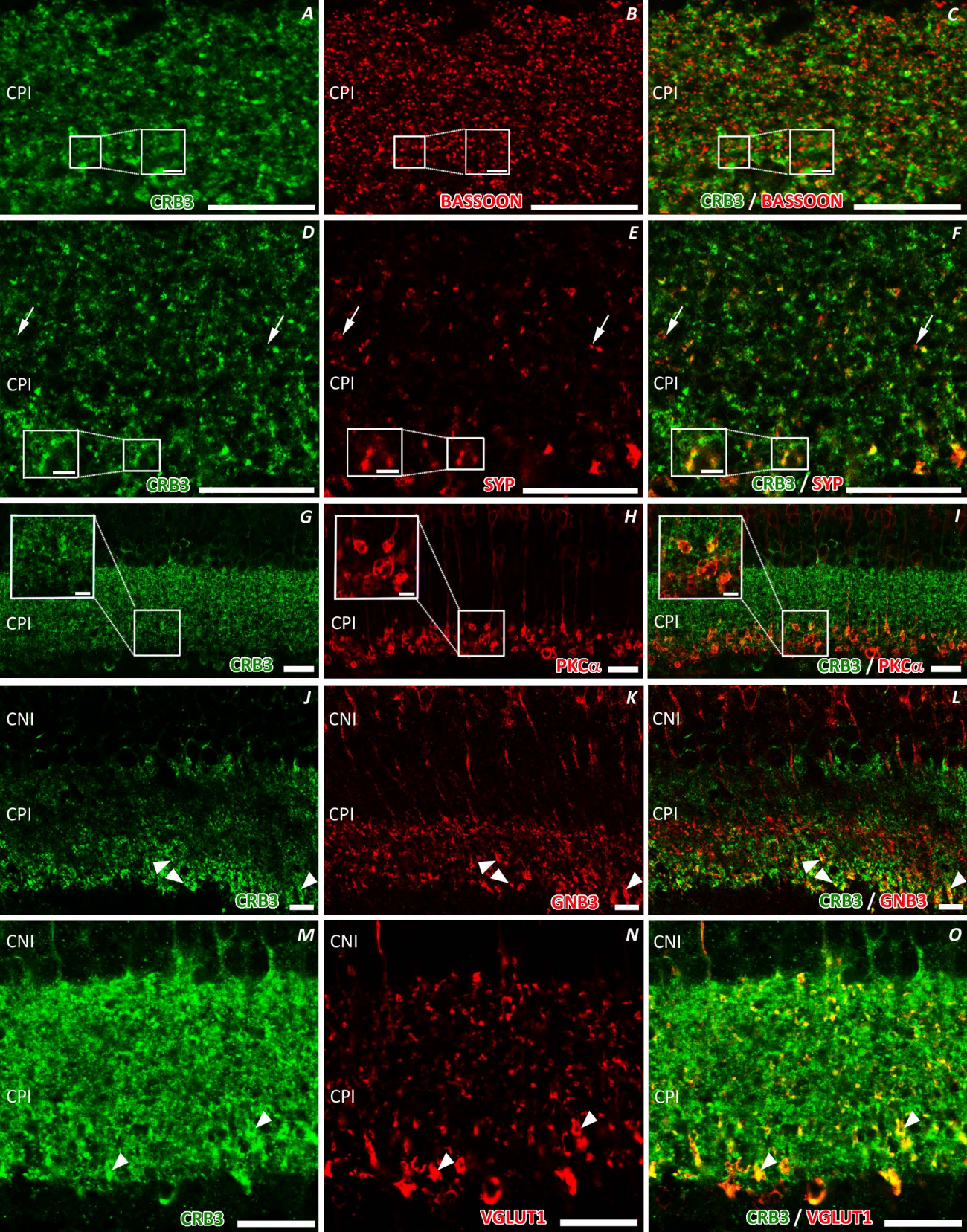


Figura 61: Localización de CRB3 en la CPI del ratón adulto (II). Doble IHQ para CRB3 (verde) y marcadores para diferentes tipos celulares presentes en la IPL (rojo). **A-C**, GAD 65/67 se localiza en las células amacrinas GABAérgicas (**B-C**); CRB3 colocaliza parcialmente con los perfiles positivos para GAD 65/67 (cabezas de flecha en **A-C**). **D-F**, CRB3 no está presente en las células amacrinas positivas para CB (flechas en **D**), en los perfiles positivos para CR en las células amacrinas o ganglionares (flechas en **E**) ni en los procesos TH positivos de las células amacrinas (flechas en **F**). **G-I**, CRB3 no colocaliza con β -catenina en las uniones adherentes de la CPI (insertos en **G-I**). **J-L**, CRB3 no está presente en los procesos de las células de Müller positivas para CRALBP, a nivel de la CPI (flechas en **J-L**). CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m; 5 μ m en insertos.

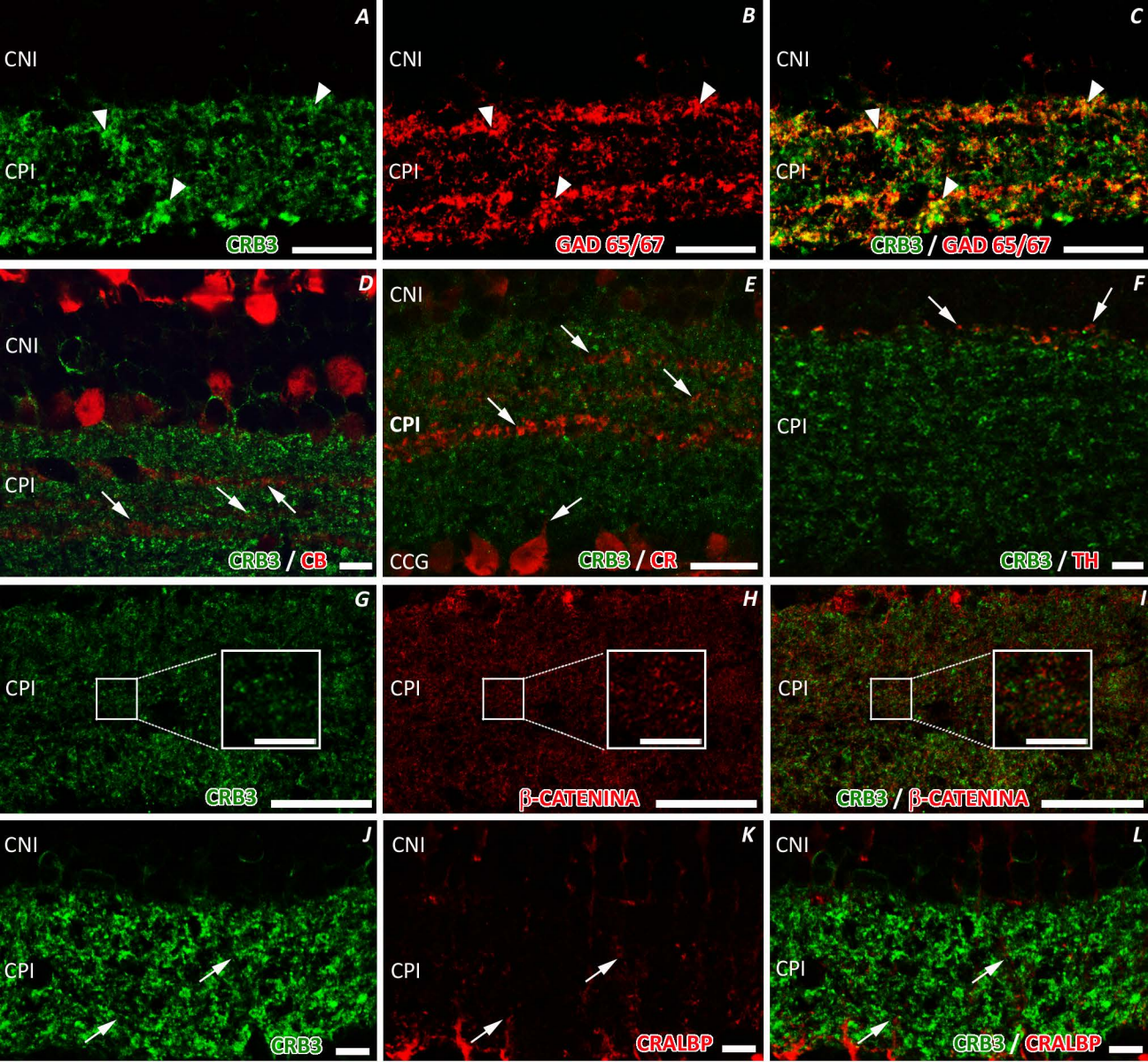


Figura 62: Caracterización de la expresión de la proteína CRB3 en la retina del ratón en los estadios P0 y P4. **A**, a P0, CRB3 (verde) se localiza en la retina externa, así como en la CPI. **A-C** y **F**, la doble inmunofluorescencia para CRB3 (verde) y sinaptofisina (SYP, rojo) muestra que CRB3 colocaliza parcialmente con SYP en la CPI (**A-C**) y en la retina externa (cabezas de flecha en **A-C** e inserto de **C** en **F**). **D-E**, a P0 en la retina externa, PNA (verde en **D**) y recoverina (rojo en **E**) ya se expresan en los fotorreceptores en desarrollo. La colocalización de CRB3 (rojo en **D**) y PNA no está muy definida (flechas en **D**); sin embargo, recoverina y CRB3 (verde en **E**) colocalizan parcialmente (cabezas de flecha en **E**). **G**, a P4, CRB3 (verde) se sitúa en la CPI, en la CPE en desarrollo y en los fotorreceptores. **G-I** y **M**, el doble marcaje de CRB3 (verde) y SYP (rojo) muestra que en la IPL ambas proteínas colocalizan (**I**). En la CPE en formación, todos los perfiles positivos para SYP son CRB3⁺ (cabezas de flecha en **G-I** y **M**), pero otros son CRB3⁺/SYP⁻ (flechas en **G-I** y **M**). **J**, en los fotorreceptores en desarrollo a P4, recoverina (rojo) está presente a lo largo de los cuerpos celulares. CRB3 (verde en **J**) colocaliza con recoverina en el área donde se están formando los SI de los fotorreceptores y en la CPE en desarrollo (cabezas de flecha en **J**). **K-L**, a P4 β -catenina (rojo) no colocaliza con CRB3 (verde) a nivel de la MLE (flechas en **H**), pero ambas proteínas colocalizan en la CPE (cabezas de flecha en **K**) y en la CPI (**L**). SI, segmentos internos de los fotorreceptores; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna. Barras de escala: 20 μ m.

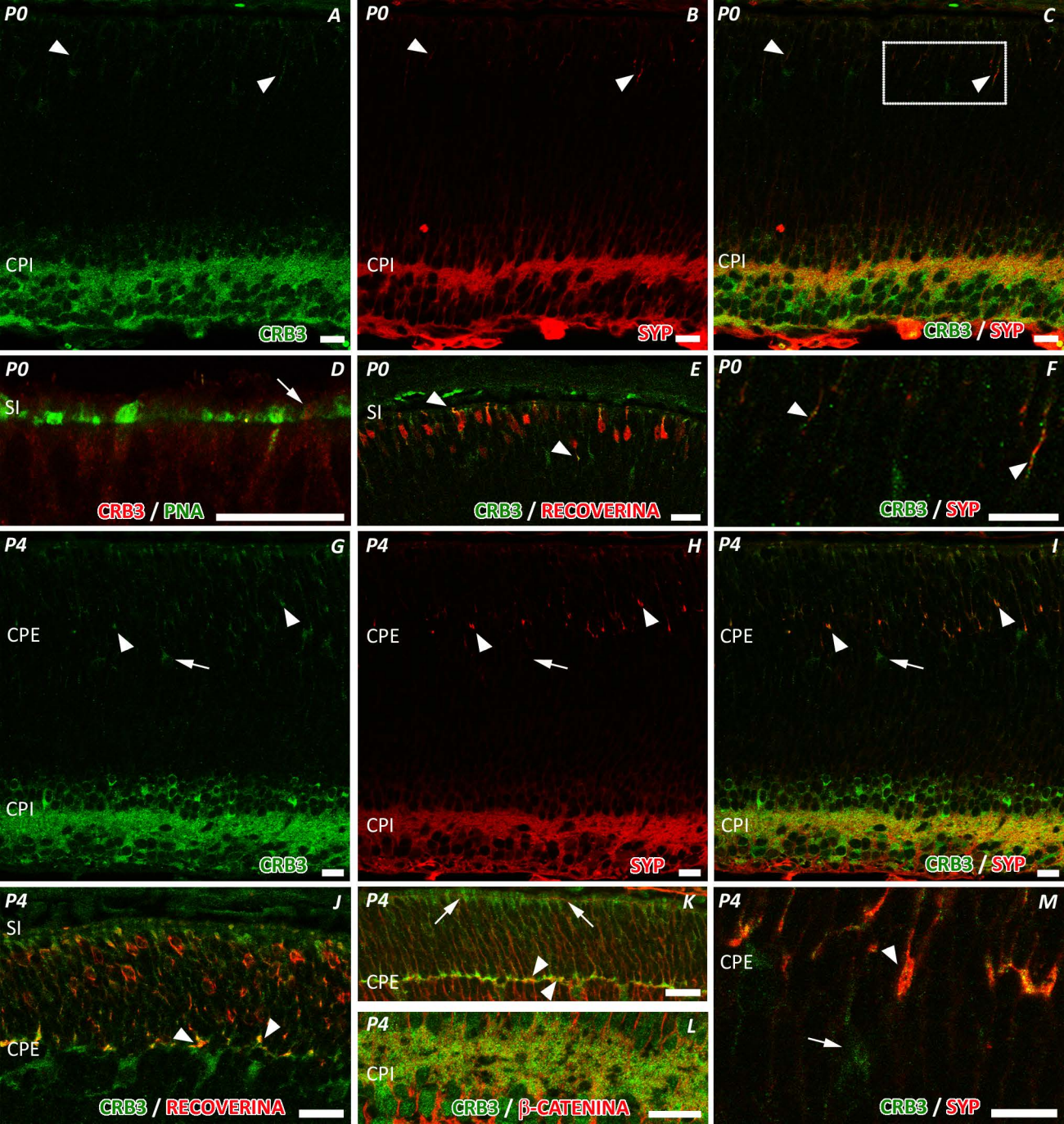
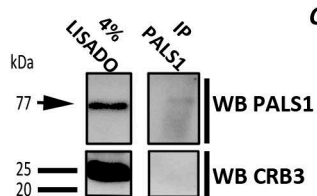
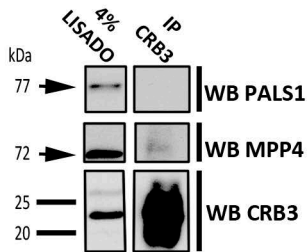
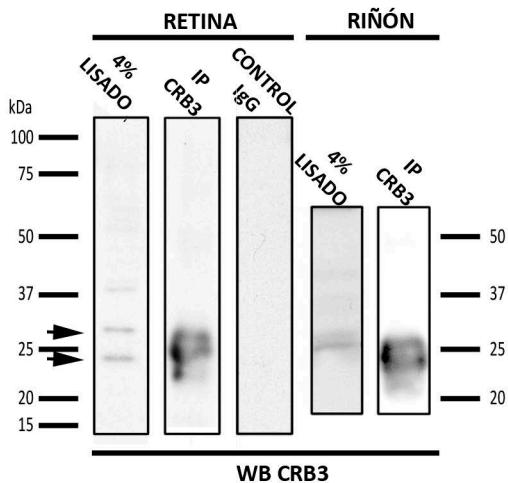


Figura 63: Patrón de interacción de CRB3 con las proteínas MAGUK, MPP4 y PALS1. **A**, experimentos de IP para CRB3. Observamos dos bandas (flechas) de pesos cercanos a los 25 kDa en el fragmento inmunoprecipitado por el anticuerpo anti-CRB3, así como en el lisado proteico inicial y en el control positivo hecho a partir de tejido de riñón. En el control, las bandas desaparecen al inmunoprecipitar con IgG procedentes de conejo (Control IgG). **B**, IP de CRB3 y WB frente a PALS1, MPP4 y CRB3. CRB3 inmunoprecipitado provoca la co-inmunoprecipitación de MPP4, pero no de PALS1. Todas las proteínas se localizan en el lisado inicial. **C**, IP de PALS1 y WB frente a CRB3 y PALS1. PALS1 inmunoprecipitado no co-inmunoprecipita a CRB3. Ambas proteínas aparecen en el lisado proteico inicial (**C**).



Discusión

En el año 1990 se describió que el gen *crumbs* codifica para una proteína transmembrana que se localiza únicamente en el dominio apical de las células epiteliales de *Drosophila melanogaster* (Tepass et al., 1990). Desde esa primera publicación, las proteínas Crumbs se han identificado en múltiples organismos, tanto vertebrados como invertebrados (Richard et al., 2006), descubriéndose sus propiedades en el establecimiento de la polaridad ápico-basal celular en diferentes modelos animales, así como en múltiples líneas celulares.

Todos los miembros de la familia CRB, ortólogos de Crumbs, que se han descrito en mamíferos son proteínas transmembrana con un dominio intracelular muy similar, a partir del cual ensamblan un complejo proteico clave para el mantenimiento de la polaridad ápico basal (Bazellieres et al., 2009). Todas las proteínas CRB se localizan en la retina del ratón (Gosens et al., 2008; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Se conoce que mutaciones en el gen que codifica para CRB1 son la causa de diferentes distrofias retinianas en humano, como Amaurosis congénita de Leber o ciertos tipos de retinosis pigmentaria (den Hollander et al., 2008; den Hollander et al., 1999; Lotery et al., 2001). Asimismo, recientemente se publicó que ratones mutantes para CRB2 mimetizan diversos aspectos de la retinosis pigmentaria humana (Alves et al., 2012). Hasta la fecha, no hay constancia de degeneraciones retinianas provocadas por mutaciones en el gen que codifica para CRB3.

Existen diferentes modelos murinos mutantes para CRB1 que simulan las distrofias retinianas desarrolladas por humanos (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007a). En nuestro estudio hemos empleado como modelo experimental el ratón *Crb1^{rd8}*, que sufre una mutación espontánea a consecuencia de la cual se sintetiza una proteína CRB1 carente de los dominios transmembrana e intracelular (Mehalow et al., 2003). En esta Tesis Doctoral demostramos cómo el defecto en la proteína CRB1 conlleva la pérdida de proteínas MAGUK asociadas a CRB en la retina del ratón y provoca daños y alteraciones celulares, especialmente en fotorreceptores y células de Müller, así como en la vascularización de la retina. Además hemos observado cambios en la conformación de la MLE desde estadios tempranos del desarrollo previos a lo publicado hasta la fecha (Mehalow et al., 2003).

Recientemente se ha descrito que ratones control de la línea C57BL/6N están contaminados por la mutación *Crb1^{rd8}* (Mattapallil et al., 2012). De hecho, algunos trabajos han asegurado que parte del fenotipo observado en la retina de los ratones empleados para sus correspondiente estudios se debía a la presencia de esta contaminación genética (Luhmann et al., 2012). Los animales usados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral pertenecen a la línea C57BL/6J, y tras el análisis genotípico de los mismos no hemos observado rastros de la mutación en los ratones control (**Fig. 26**).

Discusión

Con respecto a la localización de las proteínas CRB en la retina del ratón, hasta hace poco sólo se había detectado su presencia a nivel de la RSA de la MLE (Alves et al., 2012; Pellikka et al., 2002; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Sin embargo, debido al empleo de anticuerpos pan-CRB que reconocen sin distinguir entre sí a las tres proteínas, se ha postulado que la localización de CRB2 y/o CRB3, no debía ser exclusiva de la RSA de la MLE dentro de la retina (Gosens et al., 2008). De esta forma, en esta Tesis Doctoral demostramos por primera vez, que CRB3 no sólo se ubica a nivel de la RSA de la MLE, sino que también lo hace en ambas capas plexiformes de la retina, así como en el área donde se dispone el cilio de conexión, donde está presente desde estadios tempranos del desarrollo postnatal (Herranz-Martin et al., 2012). Además, estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio ponen de manifiesto la presencia de CRB2 no sólo en la RSA de la MLE, sino también a lo largo de los procesos gliales de las células de Müller, y en el epitelio pigmentario (Paniagua et al., 2013, en preparación).

1. LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

1.1. LA DESORGANIZACIÓN DE LA MLE DE LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Los diferentes modelos murinos con mutaciones para CRB1 (*Crb1^{-/-}*, *Crb1^{C249W}* y *Crb1^{rd8}*) cursan con un fenotipo y degeneración de la retina diferente, y la temporalidad de aparición de los cambios morfológicos también varía (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007a; van de Pavert et al., 2007b). La mutación en los ratones *Crb1^{-/-}* provoca la pérdida total de la síntesis de la proteína CRB1 (van de Pavert et al., 2004). Las primeras consecuencias de esta alteración comienzan a ser visibles en la retina del ratón en el estadio postnatal de P14, y se manifiestan con la pérdida de integridad de la MLE y el desplazamiento de algunos núcleos de fotorreceptores a estratos más internos y externos de la retina (van de Pavert et al., 2007b). El ratón *Crb1^{C249W}* sintetiza una proteína CRB1 en la que se sustituye el aminoácido cisteína en posición 249 por un aminoácido triptófano, simulando la mutación sufrida por muchos pacientes humanos para retinosis pigmentaria tipo 12. En la degeneración de los ratones *Crb1^{C249W}* no se comienzan a perder las células fotorreceptoras hasta los 18 meses de edad (van de Pavert et al., 2007a). Mehalow y colaboradores en 2003 mostraron que los primeros defectos fenotípicos en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* aparecen a las 2 semanas de edad, y se manifiestan con la pérdida de la continuidad de la MLE en la región ventral de la retina (Mehalow et al., 2003). Posteriormente a este trabajo, diferentes grupos han usado como modelo de estudio el ratón *Crb1^{rd8}* (Aleman et al., 2011; Barber et al., 2013;

Lakowski et al., 2010; Pearson et al., 2010) pero en ninguno de ellos se analizan los primeros estadios del desarrollo postnatal de la retina. Nosotros demostramos que las primeras alteraciones morfológicas en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* son evidentes a edades más tempranas que las descritas hasta el momento.

1.1.1. MODIFICACIONES DE LA MLE DE LA RETINA DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Las diferentes proteínas implicadas en la formación de las uniones adherentes, como son los complejos de polaridad o las proteínas de la familia de las cateninas, se posicionan en la zona donde se localiza la MLE pronto durante el desarrollo embrionario (Cho et al., 2012; Fu et al., 2006), de forma que durante los primeros estadios de edad postnatal del ratón, la MLE ya es perfectamente visible. Mediante estudios de microscopía electrónica observamos degeneración de la MLE a la edad de P7, focalizada en las zonas nasovenetrales de la retina. Aunque muchas de las uniones adherentes que se establecen en este estrato continúan presentes a esa edad, desaparecen algunas uniones puntuales, que suele corresponder a regiones donde los núcleos de los fotorreceptores se desplazan hacia el espacio subretinal. Esta sucesión de procesos también han sido descritos en otros modelos de degeneración que presentan pérdida temprana de la integridad de la MLE, como el ratón mutante para la proteína p27^{KIP1}, el ratón *nr1^{-/-}* o el mutante para CRB2 (Alves et al., 2012; Dyer and Cepko, 2000; Stuck et al., 2012). A microscopía electrónica observamos, en ratones *Crb1^{rd8}* a P30, en áreas de la retina donde la degeneración está más avanzada, que continúan desapareciendo o reduciéndose las uniones adherentes de la MLE, lo que coincide con lo descrito en trabajos previos (Mehalow et al., 2003). Así pues, en las retinas de los ratones mutantes *Crb1^{rd8}*, las uniones adherentes que se sitúan en la MLE parecen formarse, aunque nuestros estudios a microscopía electrónica desvelan que hay una drástica reducción en la densidad de proteínas que forman parte de estas uniones en zonas puntuales, incluso llegando a desaparecer en áreas concretas. Esta observación está en consonancia con una de las funciones descritas para CRB1 ya que se ha visto que esta proteína no es necesaria para el establecimiento de las uniones adherentes, pero sí para su mantenimiento (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004). No obstante, la temprana pérdida de dichas uniones que hemos observado a P7, estadio en el que aún está madurando la retina, nos hace pensar que la mutación en CRB1 puede provocar algún defecto más durante el desarrollo de esas uniones.

Como mostramos en los resultados y como ha sido publicado previamente, las mutaciones en CRB1 conducen a una degeneración de la retina en animales adultos, focalizada en las zonas ventrales de la misma (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b). Hasta la fecha se desconoce el sentido de esta degeneración local, pero

Discusión

se postula que sea debido a la diferente naturaleza de las interacciones entre células de Müller y los diferentes tipos de fotorreceptores a lo largo de la MLE, ya que el cuadrante inferior de la retina es rica en conos tipo S, mientras que en la parte superior prevalecen los conos tipo M (Rohlich et al., 1994; van de Pavert et al., 2007b). Esto estaría de acuerdo con lo publicado por Van Rossum y colaboradores (2006), en cuyos cultivos de explantes de retinas de ratones *knock-out* para CRB1 ricos en conos tipo S y carentes de tipo M, detectan degeneración en todas las regiones de la retina (Soderpalm et al., 1994; van Rossum et al., 2006).

1.1.2. FALLOS DE LA MLE Y ESTABLECIMIENTO DE ROSETAS

Existen diferentes modelos murinos usados para el estudio de la degeneración de la retina que cursan con formación de rosetas de fotorreceptores, una de las consecuencias clásicas de la degeneración de la retina en muchos modelos animales (Mears et al., 2001; Stuck et al., 2012; van Rossum et al., 2006), y que es frecuente en aquellas distrofias que comienzan con una pérdida de la configuración de la MLE (Alves et al., 2012; Stuck et al., 2012).

El mecanismo por el cual se desarrollan las rosetas parece variar en función de la degeneración, pero cuando la primera estructura afectada se corresponde con la MLE, parece que la formación de las rosetas es consecuencia de que la MLE no se desarrolla correctamente (Mehalow et al., 2003; Stuck et al., 2012; van de Pavert et al., 2004). Las mutaciones en los genes que codifican para CRB1, CRB2 o PALS1 también provocan la formación de rosetas de fotorreceptores (Alves et al., 2012; Cho et al., 2012; Mehalow et al., 2003; Park et al., 2011; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b; van Rossum et al., 2006). En el ratón mutante *Crb1^{rd8}* la mayoría de las rosetas se localizan hacia la zona ventral de la retina (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003). A partir de los estudios de microscopía electrónica y de secciones semifinas podemos establecer la edad de inicio de la formación de rosetas de fotorreceptores en el ratón mutante *Crb1^{rd8}* en un estadio de al menos P7. Pensamos que los fallos en la adhesión celular provocados por la mutación en CRB1 a nivel de la MLE pueden provocar dos situaciones. O bien conducen a la pérdida de polaridad, a la invaginación de la MLE y al comienzo del desarrollo de la roseta, o bien que ocurra lo contrario, y sea la pérdida de polaridad celular provocada por mutaciones en CRB1 la que desencadene los fallos en la adhesión celular y la formación de las rosetas de fotorreceptores (**Fig. 64B**). Además, y tal y como hemos observado en nuestros resultados, la invaginación de la MLE arrastra a los SF hacia la CNE (**Fig. 64B**). En estadios adultos, apreciamos que el tamaño de las rosetas varía y, a veces, mantienen o reestablecen una MLE residual (**Fig. 64B**), probablemente debido a la presencia de otros miembros del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB. También en ocasiones observamos que las rosetas se localizan aisladas dentro de la CNE, o incluso en la

CNI (**Fig. 64B**). Se ha propuesto que los procesos de reparación que pueden ocurrir para la re-adhesión de células de Müller y fotorreceptores son los responsables de la presencia de esas rosetas aisladas embebidas en la CNE y CNI (Aleman et al., 2011; van de Pavert et al., 2004). En la **figura 64** detallamos cómo es la estructura de la MLE en una retina silvestre y el proceso de formación de una roseta de fotorreceptores en retinas *Crab1^{rd8}*.

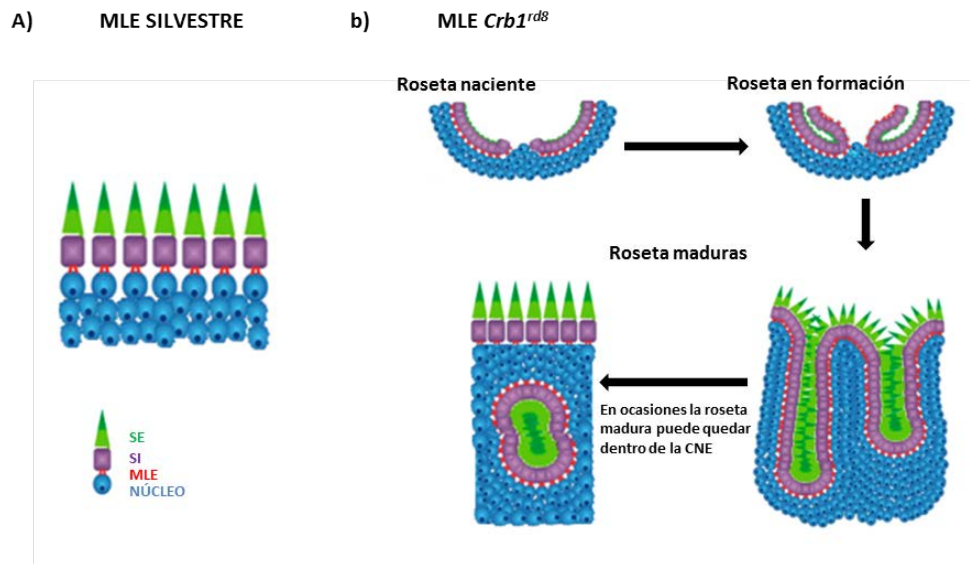


Figura 64: A) Esquema de la estructura de la MLE en una retina control. B) Esquema de la pérdida de configuración de la MLE en las retinas del ratón mutante *Crab1^{rd8}* y del desarrollo de una roseta de fotorreceptores. SE, segmentos externos de los fotorreceptores; SI, segmentos internos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa. Modificado de Stuck et al., 2012

1.2. CRB1 Y PROTEÍNAS MAGUK ASOCIADAS

La mayoría de los anticuerpos anti-CRB1 existentes en el mercado son específicos para reconocer la proteína humana. Para la realización de esta Tesis Doctoral diseñamos un anticuerpo policlonal anti-CRB1 específico para reconocer la proteína murina. Este anticuerpo presenta una homología del 100% frente a la proteína CRB1 del ratón, siendo esa homología inferior respecto a la proteína CRB1 humana. Para comprobar que la secuencia es única para CRB1 y que no reconoce secuencias de CRB2 o CRB3, alineamos la secuencia del anticuerpo anti-CRB1 con la secuencia peptídica de CRB2, y también de CRB3. En ninguno de los dos casos el anticuerpo reconoce a estas proteínas. Nuestro anticuerpo ha demostrado ser igual de eficiente que los anticuerpos comerciales y detecta específicamente la proteína CRB1 en la RSA de la MLE.

El ratón *Crab1^{rd8}* codifica una proteína CRB1 truncada que pierde los dominios transmembrana e intracelular, y en la que únicamente se sintetizan, desde el extremo N-terminal, los 15 primeros dominios EGF, 2 dominios laminina A globular y 47 aminoácidos

Discusión

adicionales de función desconocida, haciendo un total de 1207 aminoácidos (Mehalow et al., 2003). El anticuerpo diseñado por nuestro grupo de trabajo reconoce la secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 390 y 403 y por tanto, es válido para reconocer tanto a la proteína CRB1 silvestre, como a la truncada. Es especialmente interesante el hecho de que en las tinciones frente a CRB1 llevadas a cabo en retinas mutantes, existan áreas con presencia de proteína, y zonas donde este marcaje desaparece. En el trabajo publicado por Mehalow y colaboradores en 2003, presentan un marcaje residual para CRB1 en la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}* a nivel de los SI de los fotorreceptores, lo que les llevó a la búsqueda de formas alternativas para CRB1. A partir de productos de PCR procedentes de cDNA retiniano describen la presencia de esas formas alternativas en la retina del ratón. Esas formas son capaces de codificar el exón 9, lugar donde se encuentra la mutación *Crb1^{rd8}* y al menos una de ellas presenta un dominio transmembrana; sin embargo, no existen pruebas de la localización inmunohistoquímica de estas proteínas (Mehalow et al., 2003). Por otro lado, en el año 2010, el grupo de R.R. Ali publicó un estudio en cual no observan marcaje para CRB1 en retinas *Crb1^{rd8}* (Pearson et al., 2010). Para llevar a cabo las tinciones frente a CRB1, Pearson y colaboradores usaron un anticuerpo hecho frente al extremo C-terminal de la proteína, extremo ausente en la proteína CRB1 truncada. Así pues, para explicar el marcaje frente a CRB1 observado en las retinas mutantes realizadas en nuestro trabajo, planteamos varias hipótesis:

- ✓ Que el anticuerpo reconozca alguna de las formas alternativas para CRB1. Esto podría ser totalmente factible dado que la secuencia frente a la que está hecha el anticuerpo permanecería en esas formas alternativas. Además, se postula que una de esas isoformas pudiera ser intracelular (Mehalow et al., 2003), lo que apoyaría la colocalización CRB1 con GFAP en algunos de los procesos gliales que rodean las rosetas de fotorreceptores observados en nuestro trabajo.
- ✓ Que los aminoácidos adicionales para la proteína CRB1 truncada sean capaces de anclar la proteína a la membrana, o bien, que esa proteína permanezca en las inmediaciones de la RSA de la MLE sin anclarse a la membrana.
- ✓ Que exista una función o síntesis residual de la proteína CRB1 sin mutar aún desconocida.

El desarrollo de anticuerpos que pudieran reconocer específicamente algunas de las isoformas alternativas de CRB1, o parte de los 47 aminoácidos adicionales de la proteína CRB1 truncada, ayudarían a dilucidar la localización precisa de la proteína CRB1 remanente en la retina mutante.

En nuestro trabajo, y como ha sido publicado por otros grupos de investigación, detectamos CRB1 en una localización apical al marcaje de β -catenina de la MLE, proteína presente en las uniones adherentes (Kantardzhieva et al., 2005; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Una de las funciones de CRB1 es el mantenimiento de las uniones adherentes de la MLE en la retina adulta (van de Pavert et al., 2004). En los dobles marcajes CRB1/ β -catenina realizados en nuestro trabajo se observa que la pérdida de CRB1 en determinadas zonas podría provocar que desaparezca la tinción para β -catenina. Esto indica que, efectivamente, la ausencia de CRB1 puede causar alteraciones en las uniones adherentes que conforman la MLE.

Aunque no hemos realizado estudios de IHQ para CRB1 durante estadios postnatales en la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}*, datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Herranz-Martín, 2009) muestran que esta proteína se localiza fundamentalmente a nivel de la MLE desde estadios tempranos del desarrollo en retinas silvestres, y al menos hasta una edad de P4. Dado que los cambios más acusados en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* ocurren en estadios adultos, decidimos analizar el patrón de marcaje para CRB1 sólo durante la edad adulta. No obstante, las modificaciones en la MLE, la presencia de las primeras rosetas de fotorreceptores y la reactividad glial observada desde P7, indican que la mutación en CRB1 está provocando modificaciones en estas retinas ya desde estos estadios del desarrollo postnatal.

1.2.1. PALS1 Y MPP4 EN LA RETINA *Crb1^{rd8}*

A pesar de que la proteína CRB1 codificada en el ratón mutante pierde el dominio intracelular, observamos que parte de las proteínas MAGUK asociadas a CRB permanecen en la RSA de la MLE. Es particularmente importante el caso de PALS1, proteína clave en el complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB, ya que su ausencia provoca una deslocalización y/o ausencia del complejo (Cho et al., 2012; Park et al., 2011; van Rossum et al., 2006). En nuestro estudio analizamos el caso contrario, es decir, cómo la ausencia o alteración de CRB1 provoca fallos en PALS1, así como en MPP4. Mediante el empleo de animales mutantes para PALS1, se ha demostrado que durante el desarrollo PALS1 tiene un papel fundamental en la correcta laminación de la retina (Cho et al., 2012; Park et al., 2011). En la retina del ratón *Crb1^{rd8}* encontramos alteraciones desde el estadio de P7, que en el caso de PALS1 se traducen en modificaciones en el marcaje de las áreas más afectadas por la degeneración. En ratones mutantes adultos se observa un marcaje parcheado para PALS1 a nivel de la MLE, similar al observado en otros estudios con ratones mutantes para CRB1 y/o CRB2 (Alves et al., 2012; Mehalow et al., 2003). Además, PALS1 persiste en algunas de las rosetas maduras, en las cuales la MLE aún permanece, como se ha mostrado en trabajos en los que se ha analizado la

Discusión

estructura de las rosetas en otros modelos animales (Stuck et al., 2012; van de Pavert et al., 2004). El patrón de marcaje de CRB1 y PALS1 indica que ambas proteínas colocalizan en la RSA de la MLE en retinas silvestres y mutantes adultas, y ambas desaparecen en las mismas zonas de la retina mutante, al igual que ocurre en el caso contrario, en el que el silenciamiento de PALS1 provoca la ausencia de ambas proteínas en los mismos puntos (Park et al., 2011).

Sin embargo, hemos apreciado que existen zonas donde permanece PALS1 pero no CRB1, y al contrario. Aparte de unirse a CRB1, PALS1 también colocaliza e interacciona con CRB2 y CRB3 en retinas control (a pesar de que a partir de los niveles basales de PALS1 y CRB3 no hemos podido demostrar su interacción en nuestro trabajo). Además, se ha demostrado previamente que también interacciona con el complejo de polaridad formado a partir de PAR3/PAR6, proteínas todas ellas presentes a nivel de la RSA de la MLE del ratón (Bazellieres et al., 2009; Cho et al., 2012; Gosens et al., 2008; Heynen et al., 2013; Hurd et al., 2003; Makarova et al., 2003; Park et al., 2011; Roh et al., 2003; Roh et al., 2002; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Por tanto, pensamos que en las retinas del ratón mutante *Crb1^{rd8}*, PALS1 puede estar interaccionando también con estas proteínas y con CRB1 truncada formando o reestableciendo un complejo proteico intracelular residual a nivel de la MLE. En cualquier caso, y según las cuantificaciones de WB, creemos que PALS1 debe estar fuertemente condicionado por la mutación de CRB1, ya que encontramos que hay una elevada disminución en la cantidad de PALS1 en la retina del ratón mutante a P90, siendo esta cantidad de proteína incluso inferior a la cuantificada durante el desarrollo.

Finalmente, cabe destacar que hemos detectado marcaje para PALS1 en ratones adultos mutantes para CRB1 a nivel de la CPE, que no se observa en retinas control. En 2004, Van de Pavert y colaboradores muestran marcaje ectópico para PATJ1 y MUPP1, componentes del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB a nivel de la CPE (van de Pavert et al., 2004). Además, Cho y colaboradores observan marcaje ectópico para PALS1 durante el desarrollo, postulando que ese marcaje debe pertenecer a las rosetas que se están desarrollando (Cho et al., 2012), algo que podría estar ocurriendo también en las retinas *Crb1^{rd8}*.

Para analizar la distribución de otra de las proteínas MAGUK, como es MPP4, desarrollamos un anticuerpo específico para la detección de la proteína murina, detectando la proteína en la RSA de la MLE, en la CPE y con menos intensidad a nivel del cilio de conexión de los fotorreceptores, donde se ha descrito con anterioridad (Kantardzhieva et al., 2005; Stohr et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; Yang et al., 2007). Al igual que en anteriores estudios, también hemos observado que la intensidad de marcaje para MPP4 a nivel de la CPE es mucho mayor en comparación con el marcaje en la RSA (Aartsen et al., 2006; Kantardzhieva et al.,

2005; Yang et al., 2007). En ambas áreas, MPP4 se localiza en vesículas intracelulares (Kantardzhieva et al., 2005) así como en la membrana plasmática del terminal sináptico del fotorreceptor (Yang et al., 2007).

En el estudio comparativo entre retinas control y *Crb1^{rd8}*, hemos observado que los niveles totales de MPP4 se encuentran fuertemente reducidos en retinas mutantes y este descenso parece más evidente en las áreas con mayor degeneración. A nivel de la RSA de la MLE, la desaparición de MPP4 es más acusada y en ocasiones la ausencia es total. Hasta la fecha se han descrito o propuesto interacciones de MPP4 con PALS1, MUPP1 o CRB1, todas ellas localizadas en la RSA de la MLE (Gosens et al., 2008; Kantardzhieva et al., 2005; van de Pavert et al., 2004). En ausencia de CRB1, PALS1 y MPP4 pueden interactuar (Kantardzhieva et al., 2005), por lo que creemos que la desaparición de MPP4 a ese nivel se debe directamente al defecto en CRB1. Sin embargo, en estudios con ratones *knock-out* para MPP4, la ausencia de esta proteína no provoca alteraciones en la distribución de CRB1 ni en la de otros miembros del complejo CRB en la RSA de la MLE (Aartsen et al., 2006). Esto implicaría que MPP4 no es clave en esa región y probablemente su función pueda ser suplida por otros miembros de la familia MAGUK. Resulta más sorprendente la reducción de los niveles de MPP4 a nivel de la CPE, sobre todo en las áreas más afectadas. A este nivel, la ausencia de MPP4 provoca perturbación de la homeostasis de Ca^{2+} y de la transmisión de la señal entre bastones y células bipolares (Aartsen et al., 2006; Stohr et al., 2009; Yang et al., 2007). Nuestros resultados han puesto de manifiesto que en tejido silvestre, MPP4 interactúa con otra de las proteínas CRB, que es CRB3. Tal y como discutiremos posteriormente, pensamos que esta interacción se produce mayoritariamente a nivel de la CPE, donde hay una mayor expresión de MPP4 y no se encuentra CRB1 (Gosens et al., 2008). Por tanto, la degeneración sufrida por los fotorreceptores en nuestro modelo mutante podría provocar modificaciones en el complejo ensamblado en la CPE quizá afectando a algunas de las funciones de MPP4. Estudios de Co-IP con tejido *Crb1^{rd8}* serían claves para conocer el estado y la naturaleza de las interacciones de MPP4 en la retina del ratón mutante.

1.3. LOS FOTORRECEPTORES EN DEGENERACIÓN DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

La mayoría de los modelos animales de degeneración retiniana presentan pérdida de células fotorreceptoras más o menos rápida. Algunos de estos animales son los ratones *PDE6 β ^{rd1}*, *PRPH2^{rd2}*, *PCD/PCD*, *GNTA1^{-/-}* o *PDE6 β ^{rd10}* entre otros muchos. En todos estos animales existe una pérdida progresiva de fotorreceptores, más rápida y acusada en el ratón *PDE6 β ^{rd1}* y más lenta en el *GNTA1^{-/-}* (Barber et al., 2013; Calvert et al., 2000; Chang et al., 2002; Maeda et al., 2005; Marchena et al., 2011; Paquet-Durand et al., 2006). La degeneración que

Discusión

experimenta el ratón mutante *Crb1^{rd8}* también cursa con un descenso progresivo en el número de células fotorreceptoras, que se hace evidente con la pérdida de hileras de células fotorreceptoras a nivel de la CNE (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003). En nuestro trabajo hemos medido el espesor de la CNE en el ratón adulto y hemos comprobado que las áreas más afectadas por la degeneración presentan un grosor de la CNE reducido a la mitad.

1.3.1. ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES EN CONOS Y BASTONES

En este trabajo mostramos que la degeneración de la MLE comienza, al menos a un estadio P7, y esa degeneración afecta directamente a la localización y apariencia de ambos tipos de células fotorreceptoras. Así pues, a esa edad se aprecia desorganización de los cuerpos celulares que se ubican en la CNE, sinapsis ectópicas, alteraciones en la morfología y ubicación de los SF, así como una menor longitud de los SI. Como mencionamos anteriormente, Mehalow y colaboradores (2003) observan las primeras alteraciones en la MLE a las 2 semanas de edad y además, observan cambios evidentes en la conformación y longitud de los SF a las 4 semanas. Por tanto, en nuestro estudio detectamos modificaciones en células fotorreceptoras en estadios previos a lo publicado hasta la fecha.

Resulta interesante el análisis de la expresión de la proteína recoverina en la retina adulta del ratón mutante. Se trata de una proteína ligante de Ca^{2+} cuya función es regular la fosforilación de la rodopsina, y en función de los ciclos de luz oscuridad puede cambiar su ubicación en la célula (Chen et al., 1995; Hurley et al., 1998; Strissel et al., 2005). Ha sido ampliamente usada para conocer el estado de los fotorreceptores en múltiples modelos de degeneración retiniana (Barhoum et al., 2008; Marc et al., 2003; Martinez-Navarrete et al., 2011). Sin embargo, no existen datos en la literatura acerca del papel de esta proteína en los modelos de degeneración causados por mutaciones en CRB1. En estudios con la retina de bovinos se ha comprobado que la proteína recoverina forma parte del mismo complejo proteico que MPP4, sugiriendo que MPP4 podría secuestrar a recoverina en el terminal sináptico del fotorreceptor (Forster et al., 2009). Además, en modelos murinos mutantes para MPP4 existe un descenso en los niveles relativos de recoverina (Yang et al., 2007). Mediante análisis de WB hemos cuantificado en nuestro estudio un descenso en los niveles relativos de recoverina en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* adulto, descenso que también hemos detectado en las IHQ en tejido. Pensamos que probablemente la pérdida de la proteína recoverina sea causa directa de la degeneración sufrida por las células fotorreceptoras, aunque debido a su relación con MPP4 no podemos descartar que a nivel de la CPE, ese descenso también esté condicionado por las alteraciones que sufre MPP4 en la retina del ratón *Crb1^{rd8}*.

En la retina de los ratones predominan los bastones, suponiendo el 97,2% del total de las células fotorreceptoras (Jeon et al., 1998). En la retina del ratón *Crb1^{rd8}* hemos detectado que ambos tipos de fotorreceptores se encuentran afectados. A P90, el marcaje para la proteína rodopsina se traslada de los segmentos a la CNE. Esto sugiere un fallo en la función de la célula que implica una degeneración de los segmentos de los bastones, al igual que ocurre en el ratón *rd10* (Barhoum et al., 2008). Además, los segmentos y terminales sinápticos de los conos pierden su configuración como en el ratón *knock-out* para CRB1 (van de Pavert et al., 2004).

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, tanto en modelos animales de degeneración (el ratón *rd10* o la rata *P23H*) como en la RP ocurre una pérdida primaria de bastones (Barhoum et al., 2008; Cuenca et al., 2004). Dado que encontramos modificaciones para ambos tipos celulares desde estadios tempranos del desarrollo, hemos analizado cómo afecta la mutación en CRB1 al número de conos en edades más avanzadas de la degeneración. Así, a P30, cuando la pérdida de uniones adherentes es notoria y existen algunos núcleos de fotorreceptores apoptóticos, el número de conos teñidos con PNA se reduce con respecto a los animales control e incluso con animales mutantes más jóvenes. Podemos concluir que el defecto en CRB1 provoca un descenso en la cantidad de conos, lo que evidencia el daño que experimenta este tipo celular.

1.3.2. LA FUNCIÓN VISUAL DEL RATÓN *Crb1^{rd8}*

A pesar de la degeneración observada en las retinas del ratón mutante *Crb1^{rd8}* a la edad de P30, los registros electrorretinográficos de campo completo no muestran modificaciones importantes con respecto a animales control. En el trabajo publicado por Van de Pavert y colaboradores en 2004, en el que llevaron a cabo ERG en el ratón *knock-out* para CRB1, tampoco observaron diferencias con respecto a los animales control (van de Pavert et al., 2004). Como mencionamos anteriormente, la falta de proteína CRB1 provoca una degeneración de fotorreceptores en zonas muy concretas de la retina mientras que los registros de ERG se realizan teniendo en cuenta toda la retina. Por tanto, no parece sorprendente el no encontrar modificaciones en este tipo de ERG ya que, probablemente, las áreas con ausencia de degeneración compensarán el registro de las zonas de la retina más afectadas por la mutación.

1.3.3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SINAPSIS

Aunque no se han encontrado alteraciones en el ERG de los ratones *Crb1^{rd8}* ni a P30 ni en estadios más avanzados de la degeneración (no mostrado), nuestros estudios demuestran variaciones en la expresión y distribución de algunas de las proteínas asociadas e implicadas en

Discusión

procesos de sinapsis en este modelo de degeneración. Hasta la fecha no existen trabajos que hayan estudiado la localización de proteínas sinápticas en los modelos de degeneración murinos causados por mutaciones en alguna de las proteínas CRB. Nosotros observamos que, en animales adultos, los niveles de expresión de SYP están significativamente reducidos en comparación con el control y apreciamos que es la CPE el estrato más afectado, con frecuentes sinapsis ectópicas incluso a P7. En las áreas con rosetas de fotorreceptores la tinción para SYP prácticamente desaparece y en cuanto a otros marcadores sinápticos, como VGLUT1, su expresión también se encuentra drásticamente reducida. La presencia de sinapsis ectópicas a nivel de la CPE es común en otros modelos de degeneración, como el ratón *Nrl* o la rata *RCS* en los cuales se produce una degeneración progresiva de las células fotorreceptoras (Cuenca et al., 2005; Stuck et al., 2012). Por tanto, parece probable que en el ratón *Crb1^{rd8}*, la pérdida prolongada de fotorreceptores y la remodelación celular que ocurre a nivel de la CNE y CPE sea la responsable de la reducción de la expresión de proteínas cruciales para la sinapsis, así como de la formación de nuevas sinapsis o de su reordenamiento ectópico.

1.4. LA GLIA REACTIVA EN EL RATÓN *Crb1^{rd8}*: CÉLULAS DE MÜLLER

En el sistema nervioso, las células gliales reaccionan tras un daño (Kandel, 2000). En la retina, cuando se produce una lesión o en procesos degenerativos, las células de Müller se comportan como glía reactiva. Se piensa que la reacción glial representa un intento de la célula de Müller para proteger a la retina del daño y promover la reparación del tejido, limitando su remodelación, especialmente en los primeros estadios tras la lesión (Bringmann et al., 2009a; Bringmann and Wiedemann, 2012). Esta gliosis presenta tanto efectos neuroprotectores como efectos negativos (Bringmann et al., 2009b; Bringmann and Wiedemann, 2012; Cao et al., 1997; Harada et al., 2000; Lewis et al., 1989).

Típicamente, la reacción glial se divide en dos tipos, conservativa y proliferativa. (Bringmann et al., 2009a; Bringmann and Wiedemann, 2012). La primera se caracteriza por sobreexpresión de GFAP, hipertrofia celular, moderado o leve descenso de la corriente al K^+ , baja o indetectable tasa de proliferación, así como descenso en la expresión de proteínas asociadas a las funciones normales de la célula de Müller, como CRALBP o GS. Muchos de estos efectos se repiten en la gliosis proliferativa, pero con mayor intensidad, de forma que en las células de Müller con este tipo de gliosis la conductancia al K^+ se reduce hasta ser aproximadamente el 5% del control, la expresión de proteínas asociadas al soporte neuronal prácticamente cesa y se produce una elevada proliferación celular y expresión de GFAP, contribuyendo a la formación de la cicatriz glial (Bringmann et al., 2009a).

A continuación analizamos la respuesta de las células de Müller ante la degeneración provocada por la síntesis de la proteína CRB1 truncada. Es importante señalar que en los diferentes modelos murinos mutantes para CRB1, sólo se ha analizado la expresión de GFAP así como algunas alteraciones para la enzima GS (Aartsen et al., 2010; Barber et al., 2013; Pearson et al., 2010; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007a; van de Pavert et al., 2007b; van Rossum et al., 2006), no existiendo datos acerca de otras variaciones en este tipo celular.

1.4.1. PRIMEROS ESTADIOS DE LA RESPUESTA GLIAL EN EL RATÓN *Crb1^{rd8}*

Las células de Müller culminan su desarrollo a la edad postnatal de P9 (Marquardt and Gruss, 2002). A P7, estas células ya presentan expresión de marcadores típicos de este tipo celular, como CRALBP o GLAST (Bringmann et al., 2009b; Johnson et al., 1997; Lee et al., 2010). En nuestro estudio hemos detectado ambas proteínas en el estadio de P7 sin encontrar diferencias importantes entre ambos genotipos, excepto cierta desorganización de los procesos gliales a nivel de la CNE en las retinas mutantes.

A pesar de que la localización de algunas de las proteínas cruciales de las células de Müller apenas se encuentra alterada en las retinas *Crb1^{rd8}* en el estadio de P7, estas células ya se encuentran en estado de glía reactiva debido a que observamos sobreexpresión de la proteína GFAP, que es un indicador temprano y muy sensible del estrés que ocurre en la retina (Bringmann and Wiedemann, 2012). En los diferentes modelos mutantes para CRB1 también existe sobreexpresión de esta proteína (Barber et al., 2013; Pearson et al., 2010; van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007a; van de Pavert et al., 2007b), lo que evidencia la degeneración que sufre la retina ante la falta o el defecto de CRB1. Sin embargo, en ninguno de esos trabajos se detecta una sobreexpresión de GFAP tan temprana como la que mostramos en nuestro estudio, desde el estadio de P7. Además, el hecho de encontrar perfiles GFAP positivos a nivel de la CFNO no asociados a núcleos SOX2 positivos (marcador de astrocitos a ese nivel), indica que son efectivamente las células de Müller las que están reaccionando ante el daño y no los astrocitos.

No sólo encontramos sobreexpresión de GFAP en los primeros estadios del desarrollo en retinas *Crb1^{rd8}*, sino que la respuesta glial va acompañada de otras modificaciones, como alteraciones en el marcaje para los canales de K⁺ Kir4.1. así como un aumento de la vascularización. A diferencia de lo que ocurre en las retinas de los animales silvestres adultos, donde los canales Kir4.1 se localizan principalmente a nivel de ambas membranas limitantes, y rodeando a los vasos sanguíneos (Bringmann and Wiedemann, 2012; Kofuji et al., 2002), a P7,

Discusión

sólo detectamos Kir 4.1 en las áreas más esclerales de la retina y observamos variaciones en la localización del marcaje a nivel de la CPE de la retina del ratón *Crb1^{rd8}*.

Aunque la vascularización de las capas internas de la retina no se completa hasta las 3 semanas de edad del ratón (Edwards et al., 2011) demostramos un aumento de la vascularización en la superficie vitreal de las retinas mutantes a P7 mediante el marcador endotelial isolectina B4. Ese aumento se produce principalmente en el área ventronasal de la retina donde se inicia la degeneración en ratón mutante *Crb1^{rd8}* (Mehalow et al., 2003), manifestándose con un aumento en la densidad de la red capilar en esas regiones. Parece que el desarrollo de la vascularización en la cara vitreal de la retina guarda relación con la sobreexpresión de GFAP en las células de Müller. De esta forma, el aumento de los niveles de esta proteína provoca una mayor rigidez de los procesos gliales por lo que no son un soporte ideal para el crecimiento de otras células sobre ellos, lo que implica que la vascularización se extienda a través de la cara vitreal de la retina (Bringmann and Wiedemann, 2012; Lundkvist et al., 2004). Dobles tinciones *in toto* GFAP–isolectina B4 ayudarían a un mejor conocimiento de la respuesta glial en estas retinas mutantes.

La mayor vascularización de la retina ante un daño o lesión es una respuesta común en algunas patologías, como la retinopatía diabética (Bringmann et al., 2006; Dyer and Cepko, 2000). Alteraciones en la red de capilares de la retina también han sido asociadas a mutaciones en CRB1, en concreto en el ratón *knock-out* para esta proteína (Aartsen et al., 2010; van de Pavert et al., 2007b). Van de Pavert y colaboradores en 2007 observaron neovascularización en retinas de 18 meses de edad, si bien, esos capilares proceden de la red vascular coroidea (van de Pavert et al., 2007b); y en 2010, Aartsen y colaboradores publicaron que los procesos gliales GFAP positivos se organizan principalmente alrededor de los vasos sanguíneos más vitreales (Aartsen et al., 2010). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero en mostrar una mayor vascularización de la red de capilares de la cara vitreal de retinas mutantes para CRB1 durante el desarrollo. Existen otros modelos murinos que presentan un patrón de desarrollo de la vascularización similar, como el ratón mutante para *p27^{KIP1}*, cuya degeneración también cursa con una temprana desorganización de la MLE y un aumento en la vascularización de la cara vitreal de la retina a partir del estadio P10,5 (Dyer and Cepko, 2000). En este trabajo de Dyer and Cepko (2000) demuestran que la activación de las células de Müller es la responsable de los cambios de la vascularización en la retina. Además, se sabe que este tipo celular en estado reactivo es capaz de liberar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Bringmann et al., 2006). La liberación de VEGF en bajas concentraciones tiene efectos neuroprotectores; sin embargo, altas concentraciones de VEGF contribuyen a la progresión de la degeneración en

la retina (Bringmann et al., 2009a). Así pues, los niveles de VEGF serían un indicativo del sentido que tiene el aumento de la vascularización en las retinas *Crb1^{rd8}* durante el desarrollo.

1.4.2. LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN EL RATÓN ADULTO *Crb1^{rd8}*

En la retina del ratón adulto mutante, las respuestas gliales son mucho más exacerbadas y al aumento en la sobreexpresión de GFAP le acompañan hipertrofia celular, importantes modificaciones en proteínas cruciales para la función de la retina, como CRALBP, GS, GLAST o Kir 4.1. y presencia de núcleos ectópicos de las células de Müller.

En este trabajo hemos observado y cuantificado un aumento en la expresión de GFAP en las retinas mutantes *Crb1^{rd8}* adultas. Así, mediante IHQ se aprecian procesos gliales GFAP positivos que ocupan todo el espesor de la retina en áreas en degeneración. Además, los análisis de WB indican un aumento notable de GFAP en retinas mutantes adultas con a animales silvestres y a ratones *Crb1^{rd8}* más jóvenes. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros grupos usando este mismo modelo de ratón (Barber et al., 2013; Pearson et al., 2010). También hemos estudiado el comportamiento y la posible translocación de los núcleos de las células de Müller en las retinas mutantes *Crb1^{rd8}*, centrándonos en averiguar si la migración nuclear se asocia con procesos GFAP positivos. En múltiples modelos murinos de degeneración retiniana se ha observado que los núcleos de las células de Müller pueden desplazarse hacia la zona de lesión (Fisher et al., 2005; Joly et al., 2011; Phillips et al., 2010). El sentido de esta translocación puede ser la división celular, un proceso que como hemos explicado anteriormente, define el fenotipo de glía proliferativa, y que ha sido demostrado previamente en procesos de degeneración de la retina del ratón (Bringmann et al., 2009a; Bringmann and Wiedemann, 2012; Das et al., 2006; Del Debbio et al., 2010; Dyer and Cepko, 2000; Ooto et al., 2004; Tackenberg et al., 2009; Vazquez-Chona et al., 2011). Nosotros hemos identificado los núcleos de las células de Müller con anticuerpos frente al factor de transcripción SOX2, un marcador que en la CNI está presente en este tipo celular y en células amacrinas colinérgicas (Fischer et al., 2010). En retinas mutantes *Crb1^{rd8}* observamos núcleos SOX2 positivos asociados a procesos teñidos para GFAP, algunos de ellos localizados de manera ectópica y rodeando rosetas de fotorreceptores. Así pues, detectamos translocación de los núcleos de las células de Müller hacia las zonas donde existe mayor degeneración. Sin embargo, no hemos observado proliferación de este tipo celular tras teñir secciones de la retina mutante con el marcador Ki67 (no mostrado), lo que implicaría que, al menos en estadios de P90, la gliosis asociada a los ratones *Crb1^{rd8}* es de tipo conservativo.

En relación con esta gliosis conservativa, en nuestro trabajo también detectamos modificaciones en proteínas implicadas en la correcta función de la célula de Müller, como

Discusión

CRALBP, GS, GLAST y Kir 4.1. En todos los casos, las tinciones específicas para estas proteínas señalan una disminución de la intensidad del marcaje en las retinas *Crb1^{rd8}* y alteraciones a nivel de la MLE.

Usando anticuerpos frente a CRALBP y GS detectamos hipertrofia en muchos de los procesos de las células de Müller. De esta forma, las prolongaciones gliales hipertróficas rodean y se intercalan entre las rosetas de fotorreceptores. Sin embargo, en las regiones más vitreales de la retina, la tinción para GS y CRALBP está disminuida con respecto al control. Trabajos en otros modelos de degeneración como el ratón *rds*, muestra un patrón de marcaje similar para CRALBP (Wunderlich et al., 2010). La expresión de GS está regulada por el glutamato, y los fotorreceptores son el tipo celular que liberan la mayor proporción de glutamato en la retina (Bringmann et al., 2009b; Shen et al., 2004), por lo que parece lógico que en distrofias con degeneración de fotorreceptores, la expresión de GS se reduzca (Bringmann et al., 2009b; Hartig et al., 1995). Corroboramos el descenso en los niveles de GS mediante análisis de WB. Sin embargo, la diferencia entre retinas mutantes y control no es significativa, y la pérdida de GS en retinas *Crb1^{rd8}* apenas alcanza el 15% con respecto al control. Este leve descenso en los niveles de GS puede tener varias explicaciones no excluyentes entre sí:

- ✓ El modelo *Crb1^{rd8}* presenta una degeneración de fotorreceptores prolongada en el tiempo. A la edad de P90 aún persisten células fotorreceptoras, por lo que es posible que sigan liberando glutamato, que es captado y convertido a glutamina por las células de Müller. Además, como discutiremos más adelante, es posible que exista una elevada concentración de glutamato extracelular.
- ✓ Se ha observado una relación inversa entre GS y proliferación, de forma que durante el desarrollo o en procesos de degeneración que implican división de células de Müller, la expresión de GS se reduce. (Bringmann et al., 2009b; Kruchkova et al., 2001). Como mencionamos anteriormente, en las retinas *Crb1^{rd8}* no hemos observado proliferación de este tipo celular.

Existen diferentes transportadores de glutamato en las células de Müller, algunos de ellos dependientes de voltaje como GLAST y otros electroneutros, como el transportador de cisteína–glutamato (Bringmann et al., 2009b). GLAST transporta aproximadamente el 50% del glutamato, y está presente en este tipo celular, al menos, desde P0 (Bringmann et al., 2009b; Bringmann and Wiedemann, 2012; Pow and Barnett, 1999). En muchos procesos de degeneración se produce un descenso en los niveles de GLAST, lo que provoca el aumento en los niveles de glutamato extracelulares contribuyendo a su vez, a una mayor pérdida neuronal

(Fig.65) (Bringmann and Wiedemann, 2012). De acuerdo con esto, en retinas *Crb1^{rd8}* adultas también observamos una tinción menos intensa para la enzima GLAST, que podría ser indicativo de un descenso en su actividad y de un aumento en la concentración de glutamato extracelular.

Como hemos descrito a lo largo de este trabajo, las células de Müller son altamente permeables al K^+ , presentando canales kir 4.1 en su membrana plasmática de forma polarizada (Bringmann et al., 2006). La gliosis de tipo conservativo produce un moderado descenso de la conductancia al K^+ , mientras que en la proliferativa ese descenso es mucho mayor y va acompañado de una fuerte reducción en la expresión de kir 4.1, que conlleva un aumento de la concentración de K^+ extracelular y la despolarización de la membrana plasmática de la célula de Müller (Fig.65). Una de las consecuencias de la despolarización de la membrana plasmática es impedir la correcta función del GLAST, provocando, como ya hemos mencionado, el aumento en la concentración de

glutamato extracelular y de la pérdida neuronal (Fig.65) (Bringmann and Wiedemann, 2012), efectos observados en números modelos animales de degeneración retiniana, como en la retinopatía diabética o la isquemia (Bringmann and Wiedemann, 2012; landiev et al., 2006; Li and Puro, 2002; Pannicke et al., 2005). En el ratón mutante *Crb1^{rd8}* existe una fuerte

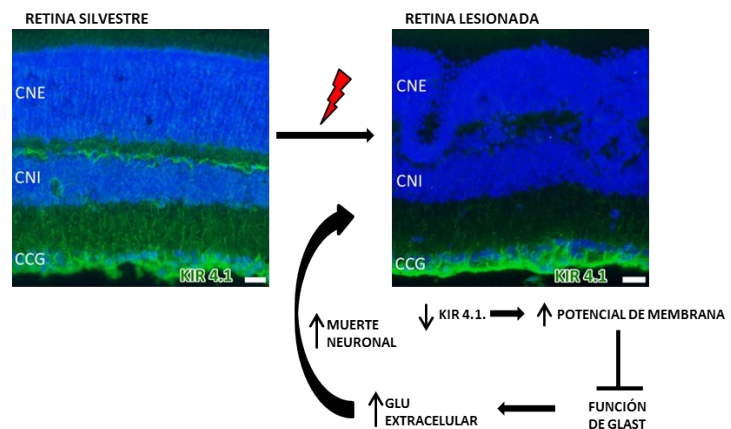


Figura 65: Resumen de los fallos que puede sufrir la retina tras la pérdida de canales Kir 4.1 y el descenso en la conductancia al K^+ de las células de Müller. CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de las células ganglionares; GLU, glutamato. Barras de escala: 20 μ m.

reducción del marcaje para Kir 4.1., lo que probablemente implique una pérdida del canal o de su localización, y esto a su vez debería modificar el potencial de membrana, contribuyendo a la degeneración de la retina. Por tanto, estudios de *patch-clamp* sobre células de Müller aisladas serían cruciales para conocer la conductancia al K^+ en las células de Müller del ratón *Crb1^{rd8}*, y en función de esos resultados, determinar o analizar las posibles alteraciones en los niveles de glutamato extracelular.

1.4.3. LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO

Hemos realizado estudios en cultivos primarios de células de Müller del ratón *Crb1^{rd8}* a partir de una modificación del protocolo establecido por D.Hicks y Y.Courtois (1990) por dos motivos fundamentales:

- ✓ Es importante conocer el fenotipo y el comportamiento de este tipo celular ante el defecto en CRB1, ya que hasta la fecha no existen datos en la literatura que analicen el comportamiento de las células de Müller cuando el complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB se ve afectado.
- ✓ Para ensayar terapias que ayuden a restaurar en el futuro el fenotipo *Crb1^{rd8}* mutante, debido a que las células de Müller son el tipo celular con mayor cantidad de proteína CRB1 en la retina del ratón.

Las células de Müller en cultivo primario, tanto control como mutantes *Crb1^{rd8}*, son positivas para una serie de marcadores característicos de este tipo celular como la proteína vimentina que observamos con una localización citoplasmática perinuclear en consonancia con lo descrito en la literatura (Harada et al., 2003; Picard et al., 2008). Otras proteínas presentes en las células de Müller son GLAST y CD44. En nuestro trabajo hemos usado el primero de ellos sobre secciones de tejido, observando que se localiza a lo largo de todo este tipo celular, coincidiendo con lo observado en los cultivos primarios, y con lo descrito por otros grupos de trabajo (Imasawa et al., 2005). CD44 es un antígeno de superficie que durante el desarrollo es expresado específicamente por los precursores de células de Müller (Shinoe et al., 2010), y en retinas adultas únicamente se localiza en las microvellosidades apicales de este tipo celular (Chaitin et al., 1994). Por tanto, no es infrecuente que en cultivo esta proteína se localice principalmente a nivel de los filopodios de las células de Müller.

Por otro lado, comprobamos que no todas las células son GFAP positivas bajo nuestras condiciones de cultivo. La tinción para esta proteína muestra un patrón de marcaje típico de proteínas del citoesqueleto. Existe en la literatura cierta controversia acerca de la presencia o no de GFAP en células de Müller en cultivo primario, de forma que algunos autores confirman su expresión en cultivo (Wang et al., 2012), mientras que en otros aseguran lo contrario (Hicks and Courtois, 1990; Monnin et al., 2007). Además, en algunos estudios se estimula la reactividad de las células de Müller en cultivo, de forma que éstas sobreexpresan GFAP (Takeda et al., 2008). Pensamos que la presencia de GFAP en las células de Müller en cultivo, tanto control como mutante, va a ser indicativo de que, bajo diferentes condiciones del cultivo, muchas de las células presentan reactividad. Al resembrar las células, éstas se

estabilizan, de forma que el número de células GFAP positivas tras el primer pase del cultivo parece disminuir, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis planteada.

No hemos observado una clara tinción para otros marcadores clásicos de células de Müller como CRALBP y GS, ambos usados en otros trabajos para la caracterización de este tipo celular (Monnin et al., 2007; Nickerson et al., 2008; Wang et al., 2011). Pensamos que el uso de diferentes anticuerpos puede ser determinante a la hora de identificar este tipo celular. Además, con respecto a la enzima GS existe una relación inversa entre condiciones de cultivo y proliferación (Bringmann et al., 2009b), por lo que, probablemente, el estado proliferativo en muchas de las células de Müller nos impide ver con claridad la expresión de esta enzima.

Por tanto, tomando juntos estos resultados, consideramos que las condiciones en las que hemos realizado los cultivos primarios pueden ser un buen modelo para estudiar las propiedades de las células de Müller de los ratones *Crb1^{rd8}*.

1.4.3.1. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller en cultivo procedentes de ratones *Crb1^{rd8}* presentan una mayor viabilidad, medida con MTT, que las células control a DIC15, lo que está en consonancia con el mayor número de células en proliferación cuantificadas en ese estadio. Sin embargo, en el estadio DIC21 ocurre lo contrario, y las células de Müller control presentan mayor viabilidad y proliferación con respecto a las mutantes. Dado que los miembros de la familia CRB están implicados en el mantenimiento de polaridad celular y de las uniones celulares (Assemat et al., 2008; Lemmers et al., 2004; Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006), y que alteraciones en esas propiedades de la célula suelen tener como consecuencia el aumento en la proliferación celular (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012), no es extraño que encontremos diferencias en los eventos proliferativos entre las células de Müller control y mutante. De hecho, mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB2 provocan que aumente la proliferación en la retina del ratón durante el desarrollo (Alves et al., 2012). La mutación en otro de los miembros del complejo ensamblado a partir de CRB, PALS1, modifica la proliferación en la retina del ratón durante el desarrollo de forma dual, aumenta en unos estadios y la disminuye en otros (Cho et al., 2012).

Con nuestro estudio queremos elucidar cómo afecta la mutación en CRB1 a la proliferación en las células de Müller en cultivo. Las células en cultivo, a través de mecanismos de adhesión focal se anclan al sustrato (Kim et al., 2010), permitiendo el crecimiento y supervivencia de la célula. En cultivos primarios de queratinocitos se ha demostrado la presencia de una de las isoformas de la proteína CRB1, CRB1s, en sus adhesiones focales y en las uniones intercelulares (Watanabe et al., 2004). Las células de Müller en cultivo no llegan a

Discusión

polarizarse, como lo hacen en condiciones normales en la retina, y en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio (no mostrados), observamos que la mayor parte del marcaje para CRB1 se distribuye por el citoplasma de la célula. En esas tinciones sólo es posible apreciar CRB1 en zonas puntuales de la membrana celular o en los filopodios, estructuras que presentan múltiples complejos de adhesión focal. Además, el entramado proteico intracelular ensamblado a partir de las proteínas CRB regula negativamente los mecanismos de proliferación celular a través de la cascada de señalización *Hippo*, una ruta que actúa como supresor de tumores promoviendo la salida del ciclo del celular (Chen et al., 2010; Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012). Nuestros resultados parecen indicar que la síntesis defectuosa de CRB1 provoca defectos en la adhesión, lo que contribuirá al aumento de la proliferación celular en las células mutantes en el estadio DIC15.

A día de cultivo 21, el descenso en la viabilidad y proliferación en las células de Müller puede ser debido a un aumento en la muerte celular, similar a lo que puede estar ocurriendo en retinas mutantes para PALS1 (Cho et al., 2012). Probablemente, tras la resiembra, las células de Müller procedentes de retinas mutantes pierdan buena parte de su capacidad de adhesión al sustrato, lo que provocaría la muerte de la célula y el descenso en la viabilidad celular en el estadio de DIC21. Así pues, para confirmar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo un exhaustivo análisis de los procesos de muerte celular.

1.4.3.2. SOX2 Y β -CATENINA EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Tanto en las células de Müller en cultivo procedentes de animales control, como en las de animales mutantes *Crb1^{ds}* se observa tinción para el factor de transcripción SOX2 en el núcleo y en el citoplasma, si bien el patrón de localización está muy definido: las células de Müller GFAP positivas presentan el marcaje para SOX2 principalmente en el núcleo; mientras que en la GFAP negativas, la mayor parte del marcaje se localiza en el citoplasma. SOX2 es un factor de transcripción implicado entre otras cosas, en el control de la capacidad de proliferación y diferenciación (Surzenko et al., 2013; Taranova et al., 2006). Se trata de una proteína muy regulada y susceptible de sufrir numerosas modificaciones postraduccionales, como sumoilación y acetilación, ambas regulando negativamente la actividad transcripcional de SOX2. Se sabe que al menos, la acetilación de SOX2 promueve su translocación al citoplasma (Baltus et al., 2009; Tsuruzoe et al., 2006). Las células de Müller GFAP positivas indican un estado reactivo de la célula, y por tanto, bajo estas condiciones son susceptibles de proliferar. Además, en los últimos meses se ha publicado que SOX2 es necesario para mantener la capacidad proliferativa de las células de Müller durante el desarrollo postnatal, de forma que mutaciones para este factor de transcripción disminuyen el número de células de Müller

(Surzenko et al., 2013). En los análisis de WB llevados a cabo en nuestro trabajo hemos encontrado que SOX2 está presente entre dos pesos moleculares, 50 y 70 kDa, que corresponde a la forma sumoilizada de la proteína (Tsuruzoe et al., 2006). Por tanto, pensamos que en las células de Müller en cultivo, SOX2 se debe encontrar sumoilizada y, dada su localización celular, también podría estar acetilada. Estas modificaciones, debido a lo que ya se conoce de su papel en el ciclo celular de las células de Müller, podrían estar evitando una proliferación celular incontrolada.

Es reseñable que los niveles de SOX2 son superiores en las células de Müller en cultivo procedentes de retinas *Crb1^{rd8}*, al igual que lo observado en tejido; si bien, en ninguno de los dos casos es significativo. Recientemente se ha publicado que la proteína p27^{KIP1} regula negativamente los niveles de SOX2 (Li et al., 2012). Además, durante la sobreexpresión de la proteína GFAP se produce el descenso de la cantidad de p27^{KIP1} (Dyer and Cepko, 2000; Vazquez-Chona et al., 2011). Por tanto, es probable que ante la sobreexpresión de GFAP provocada por la mutación en CRB1, se reduzcan los niveles de p27^{KIP1}, y esto tenga como efecto el aumento en la cantidad de SOX2 que hemos encontrado tanto en células de Müller en cultivo como en retinas *Crb1^{rd8}*. Además, estas respuestas ante la mutación de CRB1 podrían estar mediadas por PTTG1 (factor transformador de tumores pituitarios 1), proteína que se sabe está regulada por el dominio extracelular de CRB1 (van de Pavert et al., 2007a), y la cual a su vez regula a la proteína ciclina D3 (Tong and Eigler, 2009), que interacciona y colocaliza en el núcleo de las células de Müller con p27^{KIP1} (Dyer and Cepko, 2000).

Por otro lado, y en relación al papel de la proteína β -catenina, resulta sorprendente que en un modelo en el cual está afectada CRB1, y que por tanto debería presentar una pérdida de uniones adherentes, los niveles de la proteína β -catenina estén ligeramente aumentados en las células de Müller en cultivo mutantes. Sin embargo recordemos que, β -catenina, aparte de intervenir en las uniones celulares, también juega un papel clave en la vía de señalización canónica *Wnt- β -catenina*, una ruta que en algunas degeneraciones retinianas media la supervivencia de los fotorreceptores provocando la activación y proliferación glial (Hackam, 2005). Por tanto, es probable que los elevados niveles de β -catenina cuantificados en células de Müller en cultivo mutantes, sean causados por una activación de la vía *Wnt- β -catenina*. Serían necesarios estudios de otros componentes de la ruta para verificar esta hipótesis.

1.5. CHARIOT, ¿UN BUEN MÉTODO DE TRANSFECCIÓN?

Numerosos tipos de terapias han sido probados para intentar paliar o frenar los procesos que desembocan en distrofias retinianas. Uno de los tratamientos que más éxito ha tenido hasta el momento es la terapia génica, la cual se puede dividir en varias categorías,

Discusión

encontrándose entre ellas la liberación terapéutica de proteínas (Stone, 2009), usada en este trabajo. Para ello hemos utilizado un método de transfección denominado Chariot™, distribuido por la empresa Active Motif®. Esta técnica usa como vector de transfección un péptido de naturaleza anfipática, Pep1, el cual facilita el paso a través de la membrana plasmática de la proteína a transfectar en su estado nativo. Acorde con nuestros resultados, el rendimiento en la transfección de la enzima β -galactosidasa en estado activo en células de Müller en cultivo procedentes de retinas control es muy alto, lo que está de acuerdo con lo obtenido anteriormente por otros grupos de investigación (Wang et al., 2009). Además, cuando las células de Müller que se transfectan son mutantes *Crb1^{rd8}*, el rendimiento en la transfección también parece elevado.

Para la transfección de las retinas *in vivo* usamos dos aproximaciones diferentes, inyecciones subretinales e intravitreales del complejo Chariot™- β -galactosidasa. Hasta la fecha, la elección mayoritaria para la transfección *in vivo* usando el método Chariot, había sido el uso de inyecciones intravitreales (Raz-Prag et al., 2010; Wang et al., 2009). En nuestro estudio comparamos las dos aproximaciones, y según nuestros resultados, el rendimiento de la transfección con la inyección subretinal parece superior al observado con la inyección intravitreal, ya que con el primer abordaje conseguimos transfectar la mayor parte de los estratos retinianos. En ambos casos la enzima transfectada mantiene su actividad en las células. A partir de las histoquímicas mostradas en esta Tesis Doctoral no podemos determinar qué tipos celulares de la retina se transfectan con mayor eficacia, aunque por su localización podrían ser las células de Müller (Wang et al., 2009).

Por el momento no hemos realizado inyecciones con este sistema en retinas de ratones mutantes *Crb1^{rd8}*. Las retinas de estos ratones están siendo ampliamente utilizadas como receptoras para ensayos de trasplantes de fotorreceptores (Barber et al., 2013; Lakowski et al., 2010; Lakowski et al., 2011; Pearson et al., 2010). La fragmentación de la MLE de las retinas *Crb1^{rd8}* es un factor positivo para el éxito de estos trasplantes, sin embargo, la sobreexpresión de GFAP es un hándicap limitando el tiempo en que el trasplante es más efectivo (Barber et al., 2013; Pearson et al., 2010). Pensamos que debido a la fragmentación de la MLE, y al mayor rendimiento obtenido en la transfección mediante inyecciones subretinales, el método Chariot™ puede resultar exitoso en retinas *Crb1^{rd8}*, al menos hasta estadios de P45, cuando el trasplante de fotorreceptores es óptimo (Barber et al., 2013; Pearson et al., 2010).

Para finalizar esta primera parte de la discusión destacamos que no se conoce la localización de las otras proteínas de la familia CRB, CRB2 y CRB3 en las retinas *Crb1^{rd8}*. De hecho estas proteínas han sido poco estudiadas en retinas silvestres, y únicamente se han

detectado a nivel de la RSA de la MLE (van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). En la segunda parte de la discusión nos centramos en analizar la localización de la proteína CRB3 en la retina silvestre durante el desarrollo y en estado adulto. Elegimos el estudio de esta proteína por varios motivos:

- ✓ Se ha demostrado que CRB3 interviene en la ciliogénesis de células epiteliales (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004), y se ha postulado su presencia a nivel del cilio primario de conexión de los fotorreceptores, (Gosens et al., 2008), estructura clave para el correcto desarrollo de los fotorreceptores y de la función visual.
- ✓ Miembros del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB, como MPP4, se han detectado en la CPE, (Kantardzhieva et al., 2005; Yang et al., 2007). Se sabe que CRB1 no se sitúa en esa capa, y se postula que podría ser CRB3 el miembro de la familia CRB que se sitúe a ese nivel (Gosens et al., 2008).

2. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LA RETINA DEL RATÓN

2.1. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA CRB3 EN LOS SEGMENTOS INTERNOS DE LOS FOTORRECEPTORES

Mediante el uso de los anticuerpos descritos en dos publicaciones (Lemmers et al., 2004; Makarova et al., 2003), algunos autores habían localizado a la proteína CRB3 en la retina del ratón, pero sólo a nivel de la MLE, tanto en fotorreceptores como en células de Müller (van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). En el presente trabajo, tras hacer una doble tinción CRALBP/CRB3, también detectamos CRB3 en las células de Müller en la MLE si bien en esta zona, la mayoría del marcaje parece estar localizado en los fotorreceptores.

A diferencia de lo mostrado en estudios previos, detectamos CRB3 en la parte más escleral de los SI obteniendo un marcaje punteado en los primeros estadios de su desarrollo, a P0 y P4, que se solapa con el crecimiento del cilio de conexión de los fotorreceptores (Liu and Williams, 2001). Además, en la retina adulta detectamos CRB3 en el área del cilio de conexión, donde esta proteína rodea la tinción para tubulina acetilada, que está presente en el cilio (Polevoda and Sherman, 2002). Hasta la fecha, algunos artículos han analizado el papel de CRB3 en la ciliogénesis en células epiteliales de mamíferos, mostrando que esta proteína es necesaria para este proceso (Bazellieres et al., 2009; Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Sfakianos et al., 2007). En el trabajo publicado por Fan y colaboradores en 2007, tras la transfección de células con ARN pequeño de interferencia específico para la isoforma de CRB3

Discusión

terminada en la secuencia CLPI (CRB3-CLPI), demostraron que el cilio no se formaba, con lo que la participación de esa isoforma parece crucial en la ciliogénesis (Fan et al., 2007). Sfakianos y colaboradores en el 2007 publicaron un artículo donde demuestran que la isoforma CRB3-ERLI, a través de su motivo de unión a PDZ, ausente en la isoforma CRB3-CLPI, es necesaria para el correcto desarrollo del cilio primario de las células MDCK (Sfakianos et al., 2007). Debido a todas estas observaciones ya se había sugerido la presencia de CRB3 en el cilio de conexión de los fotorreceptores, y el papel de esta proteína en su desarrollo (Gosens et al., 2008). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero en demostrar esta posibilidad. Así pues, nuestros resultados muestran por primera vez la presencia de la proteína CRB3 en el área del cilio de conexión desde su desarrollo.

El cilio de conexión de los fotorreceptores carece de la maquinaria biosintética para formar sus propios elementos, por lo que éstos han de ser sintetizados en los orgánulos localizados en los SI y ser transportados al cilio. De hecho, en el aparato de Golgi se produce una importante distribución y tráfico de vesículas de los elementos del cilio de conexión. En los últimos años, se ha demostrado que muchos de los componentes necesarios para que este cilio se forme y funcione correctamente se localizan en el aparato de Golgi. Entre esos componentes destacan proteínas del transporte intraflagelar y la proteína de retinosis pigmentaria RP2 entre otras (Evans et al., 2010; Sedmak and Wolfrum, 2010). Se ha demostrado también que algunas de las proteínas del complejo intracelular organizado por las proteínas CRB, como es MPP4, se sitúan en el área donde se ubica el aparato de Golgi en los SI de los fotorreceptores (Kantardzhieva et al., 2005). Además, la isoforma CRB3-CLPI localizada en la membrana del cilio de células epiteliales en cultivo ha sido también identificada en su complejo de Golgi durante la interfase (Fan et al., 2007). Por tanto, a partir de nuestros resultados y de la literatura publicada, pensamos que ambas isoformas de CRB3 se ubican en el cilio de conexión de fotorreceptores, y que además, al menos la isoforma CRB3-CLPI se localiza también en el complejo de Golgi de los SI, junto con con giantin y MPP4. Esto apoyaría la idea de que CRB3 es otro componente del cilio que necesita ser transportado en vesículas desde el aparato de Golgi hacia el cilio de conexión.

En este trabajo hemos usado marcadores para diferenciar los SI de cada uno de los dos tipos de fotorreceptores: opsinas y PNA para teñir los conos, rodopsina para los bastones y recoverina y giantin para ambos. Las dobles inmunohistoquímicas de CRB3 con estos marcadores indican que esta proteína está claramente presente en los SI de los bastones. Además, teniendo en cuenta los dobles marcajes de CRB3 con los marcadores de conos, no podemos concluir definitivamente que CRB3 se localice en los SI de este tipo celular. Sin

embargo, el patrón de marcaje obtenido para MPP4 apoyaría la idea de que CRB3 debe estar localizada en los SI de ambos tipos de fotorreceptores.

Además, a partir de los trabajos previos que demuestran que CRB3 tiene una función clave en el desarrollo del cilio primario de diversas células epiteliales (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Sfakianos et al., 2007), y tras lo observado en nuestro trabajo, creemos que CRB3 participa activamente durante el desarrollo del cilio de conexión de los fotorreceptores y en el crecimiento de los SI.

2.2. CRB3 EN LAS UNIONES ADHERENTES

Se ha descrito que el complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB, que incluye a CRB3, está asociado a las uniones adherentes que organizan la MLE de la retina (Richard et al., 2006). Diferentes estudios ponen de manifiesto que dos de sus miembros, CRB1 y CRB2, y β -catenina, que está presente en estas uniones (Ozawa et al., 1989), no colocalizan en la MLE, ya que ambas proteínas CRB se localizan apicalmente a β -catenina en la RSA a la MLE (van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b; van Rossum et al., 2006). En el presente trabajo mostramos que el otro miembro de la familia CRB en mamíferos, CRB3, tampoco colocaliza con β -catenina. Además, las proteínas de la familia de las cateninas, están presentes en las sinapsis desde que estas empiezan a desarrollarse (Fu et al., 2006; Goda, 2002). En el presente trabajo hemos mostrado que a P4, CRB3 colocaliza parcialmente con β -catenina en la CPE y en la CPI. Además, a P0, cuando la CPI ha empezado a desarrollarse, ambas proteínas también colocalizan en esa capa. Considerando esto, y teniendo en cuenta la importancia de CRB3 en la regulación de las uniones intercelulares en células de tipo epitelial (Lemmers et al., 2004; Roh et al., 2003) parece factible que CRB3 colabore con β -catenina en el establecimiento de las uniones adherentes de las capas plexiformes de la retina; si bien, CRB3 no sería necesaria para el mantenimiento de estas uniones cuando ya estén establecidas.

2.3. CRB3 EN LAS CAPAS PLEXIFORMES

En el presente estudio mostramos que la mayoría de la señal positiva para CRB3 se localiza a nivel de las capas plexiformes de la retina, algo desconocido hasta la fecha (van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Trabajos previos usando anticuerpos anti-Pan-CRB, que reconocen las tres proteínas CRB, sugerían la presencia de CRB3 y/o CRB2 en la CPE, descartando a CRB1, cuya ausencia en esta capa es conocida (Gosens et al., 2008; Kantardzhieva et al., 2005). Pensamos que es posible que no se haya demostrado previamente la localización de CRB3 en las capas plexiformes de la retina por el uso de anticuerpos hechos frente a diferentes regiones de la secuencia de CRB3. Los análisis de WB efectuados en este

Discusión

trabajo muestran que los anticuerpos usados en nuestro estudio son capaces de reconocer a las dos isoformas glicosiladas de la proteína CRB3 en la retina del ratón (Fan et al., 2007; Fan et al., 2004; Lemmers et al., 2002; Lemmers et al., 2004; Makarova et al., 2003).

El marcaje para CRB3 en ambas capas plexiformes indica que esta proteína rodea el marcaje positivo para la proteína citoplasmática bassoon, que se localiza en las sinapsis “en cintilla” establecidas por los conos y bastones en la CPE y por las células bipolares en la CPI, así como en la zona activa de las sinapsis convencionales formadas por las células amacrinas dentro de la CPI (Brandstatter et al., 1999). La proteína sinaptofisina (SYP) se ubica en la membrana de las vesículas sinápticas de los fotorreceptores en la CPE, así como de las células bipolares y amacrinas en la CPI, en ambos tipos de sinapsis, convencional y “en cintilla” (Brandstatter et al., 1996). En función de esto, probablemente detectamos a CRB3 junto a SYP en la membrana de las vesículas sinápticas; sin embargo, encontramos algunos terminales sinápticos únicamente teñidos para la proteína SYP a nivel de la CPI, lo que sugiere que la presencia de CRB3 en esta capa no es ubicua. De acuerdo con esta última afirmación, CRB3 ya ha sido localizada en vesículas intracelulares, como son los endosomas tempranos de células Caco2, una línea celular procedente de células epiteliales de un adenocarcinoma colorectal (Michel et al., 2005). En la retina es necesario un transporte correcto de las vesículas sinápticas para asegurar la transmisión de la señal nerviosa de manera adecuada. Algunos miembros del complejo ensamblado a partir de las proteínas CRB han sido detectados en las vesículas presinápticas, como es MPP4 (Kantardzhieva et al., 2005). Otros autores han descrito la localización de MPP4 en la membrana plasmática de los terminales sináptica de conos y bastones (Yang et al., 2007). En nuestro trabajo mostramos que CRB3 y MPP4 no sólo colocalizan completamente en la CPE, sino que también interaccionan directamente. En estos terminales presinápticos de los fotorreceptores, CRB3 colocaliza con la proteína recoverina y presenta una colocalización parcial con diferentes marcadores de conos, entre otros con la PNA, cuyo doble marcaje con CRB3 sugiere que esta proteína debe estar presente a lo largo de la base de los terminales de los conos. A partir de nuestros resultados y de los trabajos previos publicados, creemos que CRB3 se localiza en los terminales sinápticos de conos y bastones, tanto en su membrana plasmática, como en la membrana de las vesículas presinápticas, lugares donde junto a MPP4, debería ayudar a la organización del complejo presináptico. Además de contener CRB3, los sinapsis establecidas por ambos tipos de fotorreceptores en la CPE presentan VGLUT1, el transportador vesicular de glutamato, principal neurotransmisor excitatorio de la retina (Johnson et al., 2003; Sherry et al., 2003). A pesar de que CRB3 y VGLUT1 coexisten en los terminales sinápticos de conos y bastones, su colocalización no es completa, lo que indicaría que CRB3 no está uniformemente distribuido en las vesículas

sinápticas, y/o que ambas moléculas ocupan diferentes compartimentos del terminal presináptico.

Las células fotorreceptores crecen durante diferentes estadios del desarrollo embrionario (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Marquardt and Gruss, 2002), y ya a P0 expresan la proteína recoverina (Sharma et al., 2003). La doble tinción CRB3/recoverina señala que CRB3 se localiza en los terminales sinápticos en desarrollo que comienzan a organizar la CPE, y en el incipiente SI. A P4, cuando sólo los terminales de los conos se localizan a nivel de la CPE, ya que los bastones la invaden más tarde (Rich et al., 1997), encontramos procesos CRB3 positivos en la CPE. Este dato apoya la idea de que los terminales de los conos presentan CRB3; sin embargo, el doble marcaje opsina o PNA/CRB3 en los SI de los conos, no es concluyente a la hora de clarificar la presencia de CRB3 en los mismos. Además, a P4, encontramos algunas células positivas para CRB3 y negativas para recoverina localizadas vitrealmente a la CPE en formación. Esto sugiere que CRB3 podría estar presente en un tipo celular diferente a los fotorreceptores durante el desarrollo de la retina, o que CRB3 se ubicaría en los terminales sinápticos de los fotorreceptores antes de que en ellos se localice la proteína recoverina. Tomando juntos estos resultados, y dado que se ha demostrado previamente la importancia de CRB3 en la adhesión de diferentes tejidos epiteliales (Bazellieres et al., 2009; Lemmers et al., 2004; Richard et al., 2006; Roh et al., 2003), es posible que CRB3 pueda intervenir en el establecimiento de los contactos sinápticos de los fotorreceptores dentro de la CPE.

En el presente trabajo también hemos analizado la presencia de CRB3 en los procesos que organizan la CPI. Dentro de esta capa, las células bipolares establecen contactos sinápticos por medio de sinapsis “en cintilla”, que como en el caso de CPE, también expresan bassoon, SYP y VGLUT1 (Brandstatter et al., 1999; Brandstatter et al., 1996; Sherry et al., 2003). Los dobles marcajes de CRB3 con bassoon o SYP dentro de la CPI ya han sido discutidos previamente en esta sección. Por otro lado, y similar a lo observado en la CPE, el patrón de colocalización en la doble tinción VGLUT1/CRB3 podría indicar que CRB3 no está uniformemente distribuido en las vesículas sinápticas, y/o que ambas proteínas se distribuyen en diferentes compartimentos del terminal sináptico. Se aprecia también una débil colocalización de CRB3 con la enzima TH en la parte más externa de la CPI, sugiriendo que CRB3 está presente en dominios específicos, probablemente en sinapsis, dentro de los procesos de las células amacrinas dopaminérgicas. Una clasificación típica de la CPI es aquella que la subdivide en láminas en función de los contactos sinápticos establecidos por los diferentes tipos de células bipolares (Kolb, 2000; Pignatelli and Strettoi, 2004). De esta forma, en la sublámina 5 se ubican procesos de células bipolares de bastón que expresan la proteína PKC α (Pignatelli and Strettoi, 2004). Las células bipolares de conos tipo ON se tiñen con anticuerpos frente a GNB3 (Ritchey et al., 2010). A

Discusión

partir de nuestros resultados observamos que existe colocalización de CRB3 con VGLUT1, PKC α y GNB3, pero no con CR, CB y colocaliza débilmente con TH, por lo que, a nivel de la CPI, CRB3 debe situarse en las células bipolares de conos y de bastones. Además, en algunas áreas de esta capa encontramos el marcaje para CRB3 en forma de anillo asociado a los terminales sinápticos de las células bipolares de bastón PKC α positivas. Esta observación podría implicar la presencia de CRB3 en el propio terminal presináptico de las célula bipolar, o bien su localización a nivel de los terminales de las células amacrinas que alcanzan a las células bipolares.

Dentro de la CPI, la mayoría de las sinapsis convencionales liberan el neurotransmisor inhibitorio GABA (Sherry et al., 2003). GAD65 y GAD67 son las dos isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), la cual cataliza la descarboxilación de glutamato a GABA en la retina (Erlander et al., 1991; Haverkamp and Wassle, 2000; Vardi and Auerbach, 1995). Se ha descrito que en la retina de mamíferos las células amacrinas GABAérgicas pueden expresar una o ambas isoformas de GAD (Andrade da Costa and Hokoc, 2003; Vardi and Auerbach, 1995). Mediante el uso de un anticuerpo que reconoce ambas formas de GAD, mostramos en este trabajo que CRB3 colocaliza con la mayoría de los procesos GAD65/67 positivos.

Así pues, en relación a la CPI, proponemos que la proteína CRB3 debe estar principalmente presente en las células amacrinas GABAérgicas, así como en las células bipolares glutamatérgicas.

2.4. CRB3 EN EL COMPLEJO ENSAMBLADO A PARTIR DE LA FAMILIA CRB

La proteína CRB3, junto con los otros miembros de la familia CRB (CRB1 y CRB2) organiza un complejo proteico intracelular involucrado en el mantenimiento de las uniones adherentes de la RSA de la MLE y en la polarización de las células fotorreceptoras (Mehalow et al., 2003; Richard et al., 2006; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006). Como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, en este complejo participan otras proteínas, como algunos miembros de la familia MAGUK, entre ellos MPP4 (Gosens et al., 2008; Kantardzhieva et al., 2005). En la estructura de MPP4 existen varios dominios capaces de mediar interacciones proteína–proteína, como son los motivos L27 o PDZ (Stohr et al., 2003; Stohr and Weber, 2001). Se ha descrito que en la CPE, MPP4 es capaz de interactuar con diferentes proteínas, como PSD95 o VELI3, formando un entramado proteico al que se le pueden unir otras proteínas como son ATPasas de Ca²⁺ de las membranas (PMCA) o a la proteína TMEM16B, que también está implicada en el control de la homeostasis del Ca²⁺ (**Fig. 66**) (Aartsen et al., 2006; Forster et al., 2009; Yang et al., 2007). Nuestro trabajo es el primero en describir la interacción CRB3–MPP4 en retina de ratón silvestre. Pensamos que esta

interacción ocurre vía el dominio PBM de la isoforma de CRB3 terminada en la secuencia -ERLI con el motivo PDZ de MPP4. Creemos que la interacción entre ambas proteínas ocurre principalmente en la CPE, ya que a ese nivel es mayoritaria la presencia de MPP4 (Kantardzhieva et al., 2005), y además, según nuestros resultados, en ese lugar colocaliza con CRB3. Creemos que esta interacción es especialmente relevante, ya que CRB3 podría actuar como el elemento que permita que el

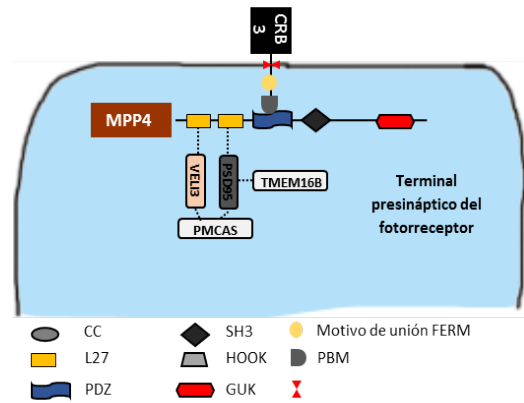


Figura 66: Modelo propuesto para el complejo proteico intracelular ensamblado a partir de CRB3 en el terminal presináptico del fotorreceptor.

complejo proteico se ancle a las membranas celulares en el terminal presináptico del fotorreceptor (**Fig. 66**). Aun así, no podemos descartar que la interacción CRB3-MPP4 ocurra también en la RSA de la MLE, otra región donde ambas proteínas colocalizan.

3. RESUMEN

La retina del ratón *Crb1^{rd8}* presenta una mutación en el gen que codifica para la proteína CRB1, provocando una degeneración que simula la retinosis pigmentaria y la amaurosis congénita de Leber. En esta Tesis Doctoral hemos analizado como la mutación en esta proteína afecta a la retina a diferentes niveles. Hemos detectado que la MLE de la retina del ratón *Crb1^{rd8}* presenta alteraciones desde el estadio de P7, edad anterior a lo que estaba descrito hasta la fecha (Mehalow et al., 2003). Estas modificaciones se focalizan en las regiones nasovertrales de la retina y se manifiestan con pérdida de continuidad de la MLE y ausencia de algunas de las uniones adherentes que conforman dicha capa. La pérdida de configuración de la MLE provoca la aparición de las primeras rosetas de fotorreceptores, al menos desde P7. La proteína CRB1 truncada sintetizada en este ratón tiene efectos directos en las proteínas MAGUK, PALS1 y MPP4, que forman parte del complejo proteico intracelular ensamblado por CRB1. Así, los niveles de ambas proteínas se encuentran reducidos, y su localización pierde en muchas de las zonas en degeneración. Los fotorreceptores de los ratones *Crb1^{rd8}* se encuentran ya modificados desde el estadio P7, perdiendo parte de la polaridad celular y estableciendo rosetas. A P30, la degeneración de este tipo celular es más grave: las rosetas continúan madurando, se observan núcleos apoptóticos y se reduce el número de conos. En estadios de P90 es frecuente la presencia de rosetas de fotorreceptores embebidas en capas internas de las retinas, y de sinapsis ectópicas de este tipo celular. Las células de Müller

Discusión

reaccionan ante la mutación de CRB1 desde al menos P7, con sobreexpresión de GFAP y aumento en la vascularización. En retinas adultas la reactividad glial es más notoria. Al aumento en los niveles de GFAP y la translocación de los núcleos de las células de Müller, le acompañan cambios en proteínas típicas de este tipo celular como CRALBP, GS y GLAST, así como en los canales Kir 4.1. La pérdida de localización de estos canales podría provocar un descenso en la conductancia al K^+ , que podría acelerar la degeneración. Finalmente, el estudio *in vitro* de las células de Müller controles y mutantes muestra cambios en la proliferación de este tipo celular, así como en la localización de proteínas clave como SOX2, que sólo se localiza en el núcleo de las células de Müller cuando éstas se encuentran en estado de glía reactiva.

Las terapias de transfección proteica ensayadas ponen de manifiesto que tanto las células de Müller control y mutantes *in vitro*, así como las retinas *in vivo*, son susceptibles de ser transfectadas con agentes de liberación de proteínas.

Respecto a los otros miembros de la familia CRB, CRB2 y CRB3, no está muy clara su localización en la retina silvestre. Por tanto, es necesario un mejor conocimiento de estas proteínas en condiciones control, antes de analizar su presencia en retinas mutantes para CRB1. En este trabajo nos centramos en el estudio de CRB3 ya que se conoce su papel en el desarrollo de complejos de adhesión celular, en la ciliogénesis y en la determinación de la polaridad ápico–basal de muchos tipos celulares. En la presente Tesis Doctoral, mostramos evidencias de que CRB3 está presente en estadios adultos y durante el desarrollo en:

- ✓ Los segmentos internos de los fotorreceptores: está especialmente concentrado en el área donde se sitúa el cilio de conexión y en el aparato de Golgi en la RSA de la MLE.
- ✓ Ambas capas plexiformes de la retina: en la CPE, CRB3 se sitúa en el terminal presináptico del fotorreceptor; mientras que en la CPI se ubica en células bipolares glutamatérgicas y en células amacrinas GABAérgicas.

La localización espacial y temporal de CRB3 en la retina del ratón, junto con el conocimiento de la función de CRB3 en el establecimiento de los complejos de adhesión y de la ciliogénesis en diferentes tipos celulares, nos sugiere que esta proteína, aparte de ser crucial en el mantenimiento de las uniones adherentes de la MLE, podría tener un papel importante en el desarrollo del cilio de conexión de los fotorreceptores, así como en el establecimiento y mantenimiento de las capas plexiformes de la retina. CRB3, al menos en la CPE, interacciona con MPP4 y podría cooperar con ella en el mantenimiento de las proteínas ATPasas de Ca^{2+} , en la homeostasis de ese ion y en llevar a cabo una correcta transmisión de la señal. Son necesarios estudios futuros para demostrar la función de CRB3 que hipotetizamos durante el desarrollo y en estado adulto en la retina del ratón.

Conclusiones

1. Los anticuerpos diseñados por nuestro grupo de trabajo para reconocer las proteínas CRB1, CRB3 y MPP4 resultan eficaces para el estudio de su localización y expresión en la retina del ratón.

2. La membrana limitante externa de la retina del ratón mutante *Crb1^{rd8}* presenta alteraciones desde el estadio de P7 en regiones ventro-nasales, iniciándose con la pérdida de uniones adherentes. La edad de inicio de esta degeneración es previa a lo descrito para este modelo mutante y para el resto de modelos generados por mutaciones en *Crb1*.

3. La generación de una proteína CRB1 truncada en la retina del ratón *Crb1^{rd8}* provoca cambios evidentes en la localización y en los niveles de expresión de las proteínas MAGUK asociadas a CRB, PALS1 y MPP4, provocando alteraciones en el complejo proteico intracelular ensamblado a partir de las proteínas CRB.

4. La pérdida de las uniones adherentes de la membrana limitante externa de la retina del ratón *Crb1^{rd8}* tiene graves efectos sobre los fotorreceptores, tipo celular que al perder su polaridad forma rosetas ya desde el estadio P7. Con el transcurso de la degeneración, las rosetas maduran, aparecen fotorreceptores apoptóticos, se reduce el número de conos y se producen alteraciones en proteínas clave para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores, evidenciando la degeneración de este tipo celular y su probable pérdida de función en las zonas más afectadas.

5. Las células de Müller activan la respuesta glial desde el estadio de P7 en la retina del ratón *Crb1^{rd8}*, con aumento en la expresión de GFAP y de su vascularización. En estado adulto, la reactividad glial es más notoria, desencadenándose una gliosis de tipo conservativo con elevada sobreexpresión de GFAP, translocación de los núcleos de las células de Müller, modificaciones en proteínas implicadas en el metabolismo celular y en los canales Kir 4.1, lo que ocasionaría un descenso en la conductancia al K⁺ y una mayor degeneración.

6. En cultivo, las células de Müller procedentes de retinas *Crb1^{rd8}* presentan cambios en la viabilidad y proliferación celular en comparación con las células de Müller de animales silvestres, lo que puede estar relacionado con la participación de CRB1 en mecanismos de adhesión celular.

7. El factor de transcripción SOX2 que se sitúa en el núcleo de las células de Müller en cultivo en estado reactivo y en su citoplasma en ausencia de reactividad glial, parece frenar la proliferación de este tipo celular al encontrarse sumoilizado y probablemente acetilado.

8. El método Chariot[®] para la liberación de proteínas nativas en el citoplasma es una herramienta apropiada para trabajar con células de Müller en cultivo silvestres y mutantes *Crb1^{rd8}*. La liberación de proteínas *in vivo* en la retina resulta más efectiva cuando su aproximación experimental es mediante inyecciones subretinales.

Conclusiones

9. Durante el desarrollo postnatal y en estado adulto, CRB3 se localiza en el segmento interno de los fotorreceptores, especialmente a nivel del cilio de conexión, y en ambas capas plexiformes de la retina, localizaciones desconocidas para la proteína hasta la fecha.

10. CRB3 podría intervenir en el desarrollo del cilio de conexión de los fotorreceptores, así como en el establecimiento y mantenimiento de las capas plexiformes de la retina. Al menos en la capa plexiforme externa, CRB3 interacciona con MPP4, estableciendo un complejo proteico que podría mediar, entre otras funciones, el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} y de la correcta transmisión de la señal nerviosa, misiones asociadas a MPP4.

Bibliografía

- Aartsen, W.M., Kantardzhieva, A., Klooster, J., van Rossum, A.G., van de Pavert, S.A., Versteeg, I., Cardozo, B.N., Tonagel, F., Beck, S.C., Tanimoto, N., *et al.* (2006). Mpp4 recruits Psd95 and Veli3 towards the photoreceptor synapse. *Hum Mol Genet* 15, 1291-1302.
- Aartsen, W.M., van Cleef, K.W., Pellissier, L.P., Hoek, R.M., Vos, R.M., Blits, B., Ehlert, E.M., Balaggan, K.S., Ali, R.R., Verhaagen, J., *et al.* (2010). GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors. *PLoS One* 5, e12387.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-95.
- Ahmad, I. (1995). Mash-1 is expressed during ROD photoreceptor differentiation and binds an E-box, E(opsin)-1 in the rat opsin gene. *Brain Res Dev Brain Res* 90, 184-189.
- Ahmad, I., Del Debbio, C.B., Das, A.V., and Parameswaran, S. (2011). Muller glia: a promising target for therapeutic regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 5758-5764.
- Akagi, T., Inoue, T., Miyoshi, G., Bessho, Y., Takahashi, M., Lee, J.E., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004). Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neuronal subtype specification. *J Biol Chem* 279, 28492-28498.
- Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Aguirre, G.K., Huang, W.C., Mullins, C.L., Roman, A.J., Sumaroka, A., Olivares, M.B., Tsai, F.F., Schwartz, S.B., *et al.* (2011). Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 6898-6910.
- Alves, C.H., Sanz, A.S., Park, B., Pellissier, L.P., Tanimoto, N., Beck, S.C., Huber, G., Murtaza, M., Richard, F., Gurubaran, I.S., *et al.* (2012). Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human Retinitis Pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet*.
- Andrade da Costa, B.L., and Hokoc, J.N. (2003). Coexistence of GAD-65 and GAD-67 with tyrosine hydroxylase and nitric oxide synthase in amacrine and interplexiform cells of the primate, *Cebus apella*. *Vis Neurosci* 20, 153-163.
- Andreu-Agullo, C., Maurin, T., Thompson, C.B., and Lai, E.C. (2012). *Ars2* maintains neural stem-cell identity through direct transcriptional activation of *Sox2*. *Nature* 481, 195-198.
- Applebury, M.L., Antoch, M.P., Baxter, L.C., Chun, L.L., Falk, J.D., Farhangfar, F., Kage, K., Krzystolik, M.G., Lyass, L.A., and Robbins, J.T. (2000). The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27, 513-523.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14, 5559-5569.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Asayama, K. (1976). [In vivo study on the absorption of the subretial fluid. 2. Studies on an absorption of tracers (I125.human serum albumin and lanthanum nitrate) injected between the sensory retina and the pigment epithelium layer (author's transl)]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 80, 598-607.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 614-630.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., and Knust, E. (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 414, 638-643.
- Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., *et al.* (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-2239.

Bibliografía

- Baltus, G.A., Kowalski, M.P., Zhai, H., Tutter, A.V., Quinn, D., Wall, D., and Kadam, S. (2009). Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 2175-2184.
- Barber, A.C., Hippert, C., Duran, Y., West, E.L., Bainbridge, J.W., Warre-Cornish, K., Luhmann, U.F., Lakowski, J., Sowden, J.C., Ali, R.R., *et al.* (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 354-359.
- Barhoum, R. (2006). Caracterización estructural y electrofisiológica de la degeneración retiniana en ratones RD. Tesis doctoral Universidad de Alcalá de Henares.
- Barhoum, R., Martinez-Navarrete, G., Corrochano, S., Germain, F., Fernandez-Sanchez, L., de la Rosa, E.J., de la Villa, P., and Cuenca, N. (2008). Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience* 155, 698-713.
- Barnett, E.M., Elangovan, B., Bullok, K.E., and Piwnica-Worms, D. (2006). Selective cell uptake of modified Tat peptide-fluorophore conjugates in rat retina in ex vivo and in vivo models. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 2589-2595.
- Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* 14, 2149-2169.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (1998). *Neurociencia. Explorando el cerebro.* Masson-Williams y Wikins, Barcelona.
- Bellocchio, E.E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V.M., and Edwards, R.H. (1998). The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18, 8648-8659.
- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Jr., and Edwards, R.H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960.
- Bhatia, B., Singhal, S., Tadman, D.N., Khaw, P.T., and Limb, G.A. (2011). SOX2 is required for adult human muller stem cell survival and maintenance of progenicity in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 136-145.
- Bignami, A., and Dahl, D. (1979). The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28, 63-69.
- Blanks, J.C., and Johnson, L.V. (1984). Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 546-557.
- Boiani, M., and Scholer, H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 872-884.
- Brandstatter, J.H., Fletcher, E.L., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D., and Wassle, H. (1999). Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11, 3683-3693.
- Brandstatter, J.H., Lohrke, S., Morgans, C.W., and Wassle, H. (1996). Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 370, 1-10.
- Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Osborne, N.N., and Reichenbach, A. (2009a). Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28, 423-451.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., and Reichenbach, A. (2009b). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54, 143-160.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., and Reichenbach, A. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25, 397-424.
- Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 6, E72-92.
- Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2012). Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227, 1-19.

- Bulgakova, N.A., and Knust, E. (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* 122, 2587-2596.
- Bumsted-O'Brien, K.M., Hendrickson, A., Haverkamp, S., Ashery-Padan, R., and Schulte, D. (2007). Expression of the homeodomain transcription factor Meis2 in the embryonic and postnatal retina. *J Comp Neurol* 505, 58-72.
- Bunt-Milam, A.H., and Saari, J.C. (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* 97, 703-712.
- Cajal, S.R.y. (1893). La retine des vertébrés. *Cellule* 9, 17-255.
- Calvert, P.D., Krasnoperova, N.V., Lyubarsky, A.L., Isayama, T., Nicolo, M., Kosaras, B., Wong, G., Gannon, K.S., Margolskee, R.F., Sidman, R.L., *et al.* (2000). Phototransduction in transgenic mice after targeted deletion of the rod transducin alpha -subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13913-13918.
- Campbell, M., Humphries, M., Kenna, P., Humphries, P., and Brankin, B. (2007). Altered expression and interaction of adherens junction proteins in the developing OLM of the Rho(-/-) mouse. *Exp Eye Res* 85, 714-720.
- Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M.M., and Steinberg, R.H. (1997). Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res* 65, 241-248.
- Cao, X., Ding, X., Guo, Z., Zhou, R., Wang, F., Long, F., Wu, F., Bi, F., Wang, Q., Fan, D., *et al.* (2005). PALS1 specifies the localization of ezrin to the apical membrane of gastric parietal cells. *J Biol Chem* 280, 13584-13592.
- Conte, I., Lestingi, M., den Hollander, A., Miano, M.G., Alfano, G., Circolo, D., Pugliese, M., Testa, F., Simonelli, F., Rinaldi, E., *et al.* (2002). Characterization of MPP4, a gene highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Gene* 297, 33-38.
- Cuenca, N., Pinilla, I., Sauve, Y., Lu, B., Wang, S., and Lund, R.D. (2004). Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience* 127, 301-317.
- Cuenca, N., Pinilla, I., Sauve, Y., and Lund, R. (2005). Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *Eur J Neurosci* 22, 1057-1072.
- Chaitin, M.H., Wortham, H.S., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1994). Immunocytochemical localization of CD44 in the mouse retina. *Exp Eye Res* 58, 359-365.
- Chan-Ling, T. (1994). Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. *Prog Ret Eye Res* 13, 357-389.
- Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., and Heckenlively, J.R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42, 517-525.
- Chen, C.K., Inglese, J., Lefkowitz, R.J., and Hurley, J.B. (1995). Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 270, 18060-18066.
- Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15810-15815.
- Chen, J., Rattner, A., and Nathans, J. (2005). The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J Neurosci* 25, 118-129.
- Cheng, H., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Khanna, R., Jacobson, S.G., and Swaroop, A. (2006). In vivo function of the orphan nuclear receptor NR2E3 in establishing photoreceptor identity during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet* 15, 2588-2602.
- Cheng, H., Khanna, H., Oh, E.C., Hicks, D., Mitton, K.P., and Swaroop, A. (2004). Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 13, 1563-1575.
- Cho, J.H., Hwang, I.K., Yoo, K.Y., Kim, S.Y., Kim, D.W., Kwon, Y.G., Choi, S.Y., and Won, M.H. (2008). Effective delivery of Pep-1-cargo protein into ischemic neurons and long-term

Bibliografia

- neuroprotection of Pep-1-SOD1 against ischemic injury in the gerbil hippocampus. *Neurochem Int* 52, 659-668.
- Cho, S.H., Kim, J.Y., Simons, D.L., Song, J.Y., Le, J.H., Swindell, E.C., Jamrich, M., Wu, S.M., and Kim, S. (2012). Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet* 21, 2663-2676.
- Chow, R.L., and Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 255-296.
- Das, A.V., Mallya, K.B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W.B., Hegde, G.V., and Ahmad, I. (2006). Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299, 283-302.
- Del Debbio, C.B., Balasubramanian, S., Parameswaran, S., Chaudhuri, A., Qiu, F., and Ahmad, I. (2010). Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Muller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* 5, e12425.
- den Hollander, A.I., Ghiani, M., de Kok, Y.J., Wijnholds, J., Ballabio, A., Cremers, F.P., and Broccoli, V. (2002). Isolation of Crb1, a mouse homologue of Drosophila crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mech Dev* 110, 203-207.
- den Hollander, A.I., Johnson, K., de Kok, Y.J., Klebes, A., Brunner, H.G., Knust, E., and Cremers, F.P. (2001). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and Drosophila. *Hum Mol Genet* 10, 2767-2773.
- den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.
- den Hollander, A.I., ten Brink, J.B., de Kok, Y.J., van Soest, S., van den Born, L.I., van Driel, M.A., van de Pol, D.J., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Kellner, U., *et al.* (1999). Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23, 217-221.
- Doi, M., Uji, Y., and Yamamura, H. (1995). Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J Comp Neurol* 356, 368-386.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3500-3510.
- Dryja, T.P. (1992). Rhodopsin and autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Doyle Lecture Eye* 6, 1-10.
- Dyer, M.A., and Cepko, C.L. (2000). Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 3, 873-880.
- Edwards, M.M., McLeod, D.S., Li, R., Grebe, R., Bhutto, I., Mu, X., and Luty, G.A. (2011). The deletion of Math5 disrupts retinal blood vessel and glial development in mice. *Exp Eye Res* 96, 147-156.
- Edwards, R.B. (1994). Biosynthesis of retinoic acid by Müller glial cells: a model for the central nervous system? *Prog Ret Eye Res* 13, 231-242.
- Eger, A., Stockinger, A., Schaffhauser, B., Beug, H., and Foisner, R. (2000). Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* 148, 173-188.
- Ekstrom, P., Sanyal, S., Narfstrom, K., Chader, G.J., and van Veen, T. (1988). Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1363-1371.
- Eley, L., Yates, L.M., and Goodship, J.A. (2005). Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15, 308-314.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351-354.
- Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N., and Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91-100.

- Evans, R.J., Schwarz, N., Nagel-Wolfrum, K., Wolfrum, U., Hardcastle, A.J., and Cheetham, M.E. (2010). The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum Mol Genet* 19, 1358-1367.
- Fan, S., Fogg, V., Wang, Q., Chen, X.W., Liu, C.J., and Margolis, B. (2007). A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* 178, 387-398.
- Fan, S., Hurd, T.W., Liu, C.J., Straight, S.W., Weimbs, T., Hurd, E.A., Domino, S.E., and Margolis, B. (2004). Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol* 14, 1451-1461.
- Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Pinilla, I., Martin-Nieto, J., and Cuenca, N. (2011). Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 4998-5008.
- Fischer, A.J., Zelinka, C., and Scott, M.A. (2010). Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PLoS One* 5, e10774.
- Fisher, L.J. (1979a). Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina. *J Comp Neurol* 187, 359-372.
- Fisher, L.J. (1979b). Interplexiform cell of the mouse retina: a Golgi demonstration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 521-523.
- Fisher, S.K., and Lewis, G.P. (2003). Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res* 43, 887-897.
- Fisher, S.K., Lewis, G.P., Linberg, K.A., and Verardo, M.R. (2005). Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Prog Retin Eye Res* 24, 395-431.
- Forster, J.R., Lochnit, G., and Stohr, H. (2009). Proteomic analysis of the membrane palmitoylated protein-4 (MPP4)-associated protein complex in the retina. *Exp Eye Res* 88, 39-48.
- Fu, X., Sun, H., Klein, W.H., and Mu, X. (2006). Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* 299, 424-437.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z.Z., Morrow, E.M., and Cepko, C.L. (2000). *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394.
- Gallego, A. (1971). Células interplexiformes de la retina del gato. *Arch Soc Esp de Oftalmol* 31.
- Galli-Resta, L., Leone, P., Bottari, D., Ensini, M., Rigosi, E., and Novelli, E. (2008). The genesis of retinal architecture: an emerging role for mechanical interactions? *Prog Retin Eye Res* 27, 260-283.
- Geneser, F. (2000). El ojo. En *Histología*.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20.
- Ghosh, K.K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A., and Wassle, H. (2004). Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469, 70-82.
- Goda, Y. (2002). Cadherins communicate structural plasticity of presynaptic and postsynaptic terminals. *Neuron* 35, 1-3.
- Goldstein, I.J., Blake, D.A., Ebisu, S., Williams, T.J., and Murphy, L.A. (1981). Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* I isolectins. Lectins which are mono-, di-, tri-, and tetravalent for N-acetyl-D-galactosamine. *J Biol Chem* 256, 3890-3893.
- Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52, 189-196.
- Gorbatyuk, M., Justilien, V., Liu, J., Hauswirth, W.W., and Lewin, A.S. (2007). Preservation of photoreceptor morphology and function in P23H rats using an allele independent ribozyme. *Exp Eye Res* 84, 44-52.

Bibliografía

- Gosens, I., den Hollander, A.I., Cremers, F.P., and Roepman, R. (2008). Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 86, 713-726.
- Gosens, I., Sessa, A., den Hollander, A.I., Letteboer, S.J., Belloni, V., Arends, M.L., Le Bivic, A., Cremers, F.P., Broccoli, V., and Roepman, R. (2007a). FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. *Exp Cell Res* 313, 3959-3970.
- Gosens, I., van Wijk, E., Kersten, F.F., Krieger, E., van der Zwaag, B., Marker, T., Letteboer, S.J., Dusseljee, S., Peters, T., Spierenburg, H.A., *et al.* (2007b). MPP1 links the Usher protein network and the Crumbs protein complex in the retina. *Hum Mol Genet* 16, 1993-2003.
- Grossmann, R., Stence, N., Carr, J., Fuller, L., Waite, M., and Dailey, M.E. (2002). Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 37, 229-240.
- Grunert, U., and Martin, P.R. (1991). Rod bipolar cells in the macaque monkey retina: immunoreactivity and connectivity. *J Neurosci* 11, 2742-2758.
- Guerin, C.J., Anderson, D.H., and Fisher, S.K. (1990). Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1474-1482.
- Guillemot, F. (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* 253, 357-364.
- Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76, 463-471.
- Gutiérrez-Torre, S.M. (1995). Retinosis pigmentaria. Clasificación y tratamiento. Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo.
- Hackam, A.S. (2005). The Wnt signaling pathway in retinal degenerations. *IUBMB Life* 57, 381-388.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- Harada, C., Harada, T., Quah, H.M., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L.F., and Tanaka, K. (2003). Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 122, 229-235.
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H., and Wada, K. (2000). Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26, 533-541.
- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., *et al.* (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4663-4666.
- Hartig, W., Grosche, J., Distler, C., Grimm, D., el-Hifnawi, E., and Reichenbach, A. (1995). Alterations of Muller (glial) cells in dystrophic retinæ of RCS rats. *J Neurocytol* 24, 507-517.
- Hashimoto, T., Gibbs, D., Lillo, C., Azarian, S.M., Legacki, E., Zhang, X.M., Yang, X.J., and Williams, D.S. (2007). Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther* 14, 584-594.
- Hatakeyama, J., and Kageyama, R. (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15, 83-89.
- Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., *et al.* (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19, 979-990.
- Haverkamp, S., and Wassle, H. (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424, 1-23.
- Henkind, P., Hansen, R.I., Szalay, J. (1979). Ocular circulation. . In: Records RE, editor *Physiology of the human eye and visual system* New York: Harper & Row, 98-155.

- Herranz-Martin, S., Jimeno, D., Paniagua, A.E., Velasco, A., Lara, J.M., Aijon, J., and Lillo, C. (2012). Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina. *PLoS One* 7, e50511.
- Heynen, S.R., Meneau, I., Caprara, C., Samardzija, M., Imsand, C., Levine, E.M., and Grimm, C. (2013). CDC42 Is Required for Tissue Lamination and Cell Survival in the Mouse Retina. *PLoS One* 8, e53806.
- Hicks, D., and Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res* 51, 119-129.
- Hirrlinger, P.G., Pannicke, T., Winkler, U., Claudepierre, T., Varshney, S., Schulze, C., Reichenbach, A., Brunken, W.J., and Hirrlinger, J. (2011). Genetic deletion of laminin isoforms beta2 and gamma3 induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina. *PLoS One* 6, e16106.
- Hollander, H., Makarov, F., Dreher, Z., van Driel, D., Chan-Ling, T.L., and Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *J Comp Neurol* 313, 587-603.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2001). Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* 414, 634-638.
- Hood, D.C., and Birch, D.G. (1990). The A-wave of the human electroretinogram and rod receptor function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 2070-2081.
- Hsu, Y.C., and Jensen, A.M. (2010). Multiple domains in the Crumbs Homolog 2a (Crb2a) protein are required for regulating rod photoreceptor size. *BMC Cell Biol* 11, 60.
- Hsu, Y.C., Willoughby, J.J., Christensen, A.K., and Jensen, A.M. (2006). Mosaic Eyes is a novel component of the Crumbs complex and negatively regulates photoreceptor apical size. *Development* 133, 4849-4859.
- Hurd, T.W., Gao, L., Roh, M.H., Macara, I.G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142.
- Hurley, J.B., Spencer, M., and Niemi, G.A. (1998). Rhodopsin phosphorylation and its role in photoreceptor function. *Vision Res* 38, 1341-1352.
- Iandiev, I., Tenckhoff, S., Pannicke, T., Biedermann, B., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2006). Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 396, 97-101.
- Imasawa, M., Kashiwagi, K., Iizuka, Y., Tanaka, M., and Tsukahara, S. (2005). Different expression role among glutamate transporters in rat retinal glial cells under various culture conditions. *Brain Res Mol Brain Res* 142, 1-8.
- Inagaki, H., Tanaka, K., Takada, M., Maeda, S., Ichihara, S., and Saito, T. (2002). Spatial distribution of mDLG6 mRNA in embryonic and adult mouse brain. *Cell Biol Int* 26, 635-640.
- Ishii, M., Horio, Y., Tada, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., and Kurachi, Y. (1997). Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KIR4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17, 7725-7735.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138, 181-192.
- Izaddoost, S., Nam, S.C., Bhat, M.A., Bellen, H.J., and Choi, K.W. (2002). Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* 416, 178-183.
- Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Pianta, M.J., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Smilko, E.E., Milam, A.H., Sheffield, V.C., and Stone, E.M. (2003). Crumbs homolog 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet* 12, 1073-1078.

Bibliografía

- Janz, R., Sudhof, T.C., Hammer, R.E., Unni, V., Siegelbaum, S.A., and Bolshakov, V.Y. (1999). Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24, 687-700.
- Jeon, C.J., Strettoi, E., and Masland, R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18, 8936-8946.
- Jeong, C.H., Cho, Y.Y., Kim, M.O., Kim, S.H., Cho, E.J., Lee, S.Y., Jeon, Y.J., Lee, K.Y., Yao, K., Keum, Y.S., *et al.* (2010). Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28, 2141-2150.
- Jimeno, D., Velasco, A., Lillo, C., Lara, J.M., and Aijon, J. (1999). Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of tench. *Brain Res* 816, 175-189.
- Johnson, J., Tian, N., Caywood, M.S., Reimer, R.J., Edwards, R.H., and Copenhagen, D.R. (2003). Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci* 23, 518-529.
- Johnson, L.N., Cashman, S.M., and Kumar-Singh, R. (2008). Cell-penetrating peptide for enhanced delivery of nucleic acids and drugs to ocular tissues including retina and cornea. *Mol Ther* 16, 107-114.
- Johnson, P.T., Geller, S.F., Lewis, G.P., and Reese, B.E. (1997). Cellular retinaldehyde binding protein in developing retinal astrocytes. *Exp Eye Res* 64, 759-766.
- Joly, S., Pernet, V., Samardzija, M., and Grimm, C. (2011). Pax6-positive Muller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina. *Glia* 59, 1033-1046.
- Jürgens, G., W., E., Niisslein-Volhard, C., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 283-295.
- Kamberov, E., Makarova, O., Roh, M., Liu, A., Karnak, D., Straight, S., and Margolis, B. (2000). Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7. *J Biol Chem* 275, 11425-11431.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M (2000). Principles of neural science. . McGraw Hill 4th Edition, 20-21.
- Kantardzhieva, A., Alexeeva, S., Versteeg, I., and Wijnholds, J. (2006). MPP3 is recruited to the MPP5 protein scaffold at the retinal outer limiting membrane. *FEBS J* 273, 1152-1165.
- Kantardzhieva, A., Gosens, I., Alexeeva, S., Punte, I.M., Versteeg, I., Krieger, E., Neefjes-Mol, C.A., den Hollander, A.I., Letteboer, S.J., Klooster, J., *et al.* (2005). MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2192-2201.
- Kaplan, J., Bonneau, D., Frezal, J., Munnich, A., and Dufier, J.L. (1990). Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 85, 635-642.
- Karwoski, C.J., Lu, H.K., and Newman, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Muller (glial) cells. *Science* 244, 578-580.
- Kaufman, P.L.y.A., A. (2004). Fisiología del ojo. Aplicación clínica. Mosby Elsevier Madrid.
- Keady, B.T., Le, Y.Z., and Pazour, G.J. (2011). IFT20 is required for opsin trafficking and photoreceptor outer segment development. *Mol Biol Cell* 22, 921-930.
- Kim, M.H., Kino-oka, M., and Taya, M. (2010). Designing culture surfaces based on cell anchoring mechanisms to regulate cell morphologies and functions. *Biotechnol Adv* 28, 7-16.
- Kirkeby, S., and Moe, D. (2001). Binding of Griffonia simplicifolia 1 isolectin B4 (GS1 B4) to alpha-galactose antigens. *Immunol Cell Biol* 79, 121-127.
- Koenekoop, R.K. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49, 379-398.
- Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R.W., Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2002). Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39, 292-303.

- Koike, C., Nishida, A., Akimoto, K., Nakaya, M.A., Noda, T., Ohno, S., and Furukawa, T. (2005). Function of atypical protein kinase C lambda in differentiating photoreceptors is required for proper lamination of mouse retina. *J Neurosci* 25, 10290-10298.
- Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1994). Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J Comp Neurol* 343, 370-386.
- Kolb, H., Fernández, E., Nelson, R. (2000). Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Kolb, H., Fernández, E., Nelson, R. (2003). How the retina works. *American Scientist* 91, 28-35.
- Kolb, H., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol* 318, 147-187.
- Kondoh, H., and Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 391-399.
- Kruchkova, Y., Ben-Dror, I., Herschkovitz, A., David, M., Yayon, A., and Vardimon, L. (2001). Basic fibroblast growth factor: a potential inhibitor of glutamine synthetase expression in injured neural tissue. *J Neurochem* 77, 1641-1649.
- Laitinen, L. (1987). Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J* 19, 225-234.
- Lakowski, J., Baron, M., Bainbridge, J., Barber, A.C., Pearson, R.A., Ali, R.R., and Sowden, J.C. (2010). Cone and rod photoreceptor transplantation in models of the childhood retinopathy Leber congenital amaurosis using flow-sorted Crx-positive donor cells. *Hum Mol Genet* 19, 4545-4559.
- Lakowski, J., Han, Y.T., Pearson, R.A., Gonzalez-Cordero, A., West, E.L., Gualdoni, S., Barber, A.C., Hubank, M., Ali, R.R., and Sowden, J.C. (2011). Effective transplantation of photoreceptor precursor cells selected via cell surface antigen expression. *Stem Cells* 29, 1391-1404.
- Lam, B.L. (2005). Full-field electroretinogram. En: *Electrophysiology of vision Clinical testing and applications. Taylor & Francis, Boca Raton (FL)*, 1-64.
- Leber, T. (1869). Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Archiv Für Ophthalmologie* 15, 1-25.
- Lee, H.S., Han, J., Lee, S.H., Park, J.A., and Kim, K.W. (2010). Meteorin promotes the formation of GFAP-positive glia via activation of the Jak-STAT3 pathway. *J Cell Sci* 123, 1959-1968.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M.H., Michel, D., Arsanto, J.P., and Le Bivic, A. (2002). hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 25408-25415.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M.H., Medina, E., Arsanto, J.P., and Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15, 1324-1333.
- Lewis, G.P., Erickson, P.A., Guerin, C.J., Anderson, D.H., and Fisher, S.K. (1989). Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res* 49, 93-111.
- Lewis, G.P., and Fisher, S.K. (2003). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230, 263-290.
- Lewis, G.P., Kaska, D.D., Vaughan, D.K., and Fisher, S.K. (1988). An immunocytochemical study of cat retinal Muller cells in culture. *Exp Eye Res* 47, 855-868.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C.J., Canamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martinez, G., Vidal, A., *et al.* (2012). p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 845-852.
- Li, M., Zhang, S.S., and Barnstable, C.J. (2003). Developmental and tissue expression patterns of mouse Mpp4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 229-235.
- Li, Q., and Puro, D.G. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3109-3116.

Bibliografía

- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Lara, J.M., and Aijon, J. (2002). The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem* 50, 1289-1302.
- Linser, P., and Moscona, A.A. (1979). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Muller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6476-6480.
- Linstedt, A.D., and Hauri, H.P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* 4, 679-693.
- Liu, X., and Williams, D.S. (2001). Coincident onset of expression of myosin VIIa and opsin in the cilium of the developing photoreceptor cell. *Exp Eye Res* 72, 351-355.
- Lodish, H.B., A., Matsudaira, P. Kaiser, C.A. Krieger, M. Scott, M.P, Lawrence Zipursky, S. Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires.
- Lotery, A.J., Jacobson, S.G., Fishman, G.A., Weleber, R.G., Fulton, A.B., Namperumalsamy, P., Heon, E., Levin, A.V., Grover, S., Rosenow, J.R., *et al.* (2001). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 119, 415-420.
- Luhmann, U.F., Lange, C.A., Robbie, S., Munro, P.M., Cowing, J.A., Armer, H.E., Luong, V., Carvalho, L.S., MacLaren, R.E., Fitzke, F.W., *et al.* (2012). Differential modulation of retinal degeneration by Ccl2 and Cx3cr1 chemokine signalling. *PLoS One* 7, e35551.
- Lundkvist, A., Reichenbach, A., Betsholtz, C., Carmeliet, P., Wolburg, H., and Pekny, M. (2004). Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci* 117, 3481-3488.
- Maddatu, T., and Naggert, J.K. (1997). Allele-specific PCR assays for the tub and cpefat mutations. *Mamm Genome* 8, 857-858.
- Maeda, T., Lem, J., Palczewski, K., and Haeseleer, F. (2005). A critical role of CaBP4 in the cone synapse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4320-4327.
- Magnuson, S.R., and Young, A.P. (1988). Murine glutamine synthetase: cloning, developmental regulation, and glucocorticoid inducibility. *Dev Biol* 130, 536-542.
- Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bencicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., *et al.* (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-2248.
- Makarova, O., Roh, M.H., Liu, C.J., Laurinec, S., and Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302, 21-29.
- Marc, R.E., Jones, B.W., Watt, C.B., and Strettoi, E. (2003). Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 22, 607-655.
- Marchena, M., Lara, J., Aijon, J., Germain, F., de la Villa, P., and Velasco, A. (2011). The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res* 93, 607-617.
- Mariani, A.P. (1990). Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol* 301, 382-400.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, 43-55.
- Marquardt, T., and Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* 25, 32-38.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 23-38.
- Martinez-Navarrete, G., Seiler, M.J., Aramant, R.B., Fernandez-Sanchez, L., Pinilla, I., and Cuenca, N. (2011). Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats. *Exp Eye Res* 92, 227-237.
- Matsunaga, M., Hatta, K., and Takeichi, M. (1988). Role of N-cadherin cell adhesion molecules in the histogenesis of neural retina. *Neuron* 1, 289-295.

- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). The Rd8 Mutation of the *Crb1* Gene Is Present in Vendor Lines of C57BL/6N Mice and Embryonic Stem Cells, and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 2921-2927.
- McCormick, D.A. (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* 62, 1018-1027.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., and Jorgensen, E.M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-876.
- Mears, A.J., Kondo, M., Swain, P.K., Takada, Y., Bush, R.A., Saunders, T.L., Sieving, P.A., and Swaroop, A. (2001). *Nrl* is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29, 447-452.
- Mehalow, A.K., Kameya, S., Smith, R.S., Hawes, N.L., Denegre, J.M., Young, J.A., Bechtold, L., Haider, N.B., Tepass, U., Heckenlively, J.R., *et al.* (2003). CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12, 2179-2189.
- Michel, D., Arsanto, J.P., Massey-Harroche, D., Beclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci* 118, 4049-4057.
- Milam, A.H., Li, Z.Y., and Fariss, R.N. (1998). Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17, 175-205.
- Miller, R.F., and Dowling, J.E. (1970). Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 33, 323-341.
- Monnin, J., Morand-Villeneuve, N., Michel, G., Hicks, D., and Versaux-Botteri, C. (2007). Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. *Neurosci Lett* 421, 22-26.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19, 1173-1176.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Müller, H. (1952). Bau und wachstum der netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*). *Zool Jb Abt Allg Zool Physiol* 63, 275-324.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Nelson, B.R., Ueki, Y., Reardon, S., Karl, M.O., Georgi, S., Hartman, B.H., Lamba, D.A., and Reh, T.A. (2011). Genome-wide analysis of Muller glial differentiation reveals a requirement for Notch signaling in postmitotic cells to maintain the glial fate. *PLoS One* 6, e22817.
- Newman, E.A. (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian Muller (glial) cells: a comparative study. *J Neurosci* 7, 2423-2432.
- Newman, E.A. (1989). Electrophysiology of retinal glial cells. *Prog Ret Res* 8, 153-172.
- Newman, E.A. (1993). Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13, 3333-3345.
- Newman, E.A., Frambach, D.A., and Odette, L.L. (1984). Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225, 1174-1175.
- Newman, E.A., and Odette, L.L. (1984). Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *J Neurophysiol* 51, 164-182.
- Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., and Savy, C. (1997). Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals. *Microsc Res Tech* 36, 26-42.

Bibliografia

- Nickerson, P.E., Da Silva, N., Myers, T., Stevens, K., and Clarke, D.B. (2008). Neural progenitor potential in cultured Muller glia: effects of passaging and exogenous growth factor exposure. *Brain Res* 1230, 1-12.
- Niemeyer, G. (2002). Selective rod and cone ERG responses in retinal degenerations. *Digital Journal of Ophthalmology* www.djoharvard.edu.
- Norenberg, M.D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161, 303-310.
- Oakley, B., 2nd (1977). Potassium and the photoreceptor-dependent pigment epithelial hyperpolarization. *J Gen Physiol* 70, 405-425.
- Oakley, B., 2nd, and Green, D.G. (1976). Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 39, 1117-1133.
- Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* 1192, 90-98.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18, 2196-2207.
- Okada, M., Matsumura, M., Ogino, N., and Honda, Y. (1990). Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 28, 467-474.
- Olney, J.W. (1968). An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol* 7, 250-268.
- Omori, Y., Chaya, T., Katoh, K., Kajimura, N., Sato, S., Muraoka, K., Ueno, S., Koyasu, T., Kondo, M., and Furukawa, T. (2010). Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22671-22676.
- Omri, S., Omri, B., Savoldelli, M., Jonet, L., Thillaye-Goldenberg, B., Thuret, G., Gain, P., Jeanny, J.C., Crisanti, P., and Behar-Cohen, F. (2010). The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol* 4, 183-195.
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., and Takahashi, M. (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13654-13659.
- Ozawa, M., Baribault, H., and 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, 1711-1717.
- Pacal, M., and Bremner, R. (2012). Mapping differentiation kinetics in the mouse retina reveals an extensive period of cell cycle protein expression in post-mitotic newborn neurons. *Dev Dyn*.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S., and Franke, W.W. (1999). The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp Cell Res* 250, 452-464.
- Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Biedermann, B., Wiedemann, P., Perlman, I., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2005). Altered membrane physiology in Muller glial cells after transient ischemia of the rat retina. *Glia* 50, 1-11.
- Paquet-Durand, F., Azadi, S., Hauck, S.M., Ueffing, M., van Veen, T., and Ekstrom, P. (2006). Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *J Neurochem* 96, 802-814.
- Park, B., Alves, C.H., Lundvig, D.M., Tanimoto, N., Beck, S.C., Huber, G., Richard, F., Klooster, J., Andlauer, T.F., Swindell, E.C., *et al.* (2011). PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci* 31, 17230-17241.

- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrion, M.J., Arevalo, R., Aijon, J., Lara, J.M., and Velasco, A. (2012a). Characterization of Pax2 expression in the goldfish optic nerve head during retina regeneration. *PLoS One* 7, e32348.
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrion, M.J., Arevalo, R., Aijon, J., Lara, J.M., and Velasco, A. (2012b). Pax2(+) astrocytes in the fish optic nerve head after optic nerve crush. *Brain Res.*
- Pearson, R.A., Barber, A.C., West, E.L., MacLaren, R.E., Duran, Y., Bainbridge, J.W., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2010). Targeted disruption of outer limiting membrane junctional proteins (Crb1 and ZO-1) increases integration of transplanted photoreceptor precursors into the adult wild-type and degenerating retina. *Cell Transplant* 19, 487-503.
- Peichl, L., and Gonzalez-Soriano, J. (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11, 501-517.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C.J., Ready, D.F., and Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 416, 143-149.
- Peng, G.H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J., and Chen, S. (2005). The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet* 14, 747-764.
- Perron, M., and Harris, W.A. (2000). Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 57, 215-223.
- Phillips, M.J., Otteson, D.C., and Sherry, D.M. (2010). Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *J Comp Neurol* 518, 2071-2089.
- Phillips, M.J., Walker, T.A., Choi, H.Y., Faulkner, A.E., Kim, M.K., Sidney, S.S., Boyd, A.P., Nickerson, J.M., Boatright, J.H., and Pardue, M.T. (2008). Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 2148-2155.
- Picard, E., Fontaine, I., Jonet, L., Guillou, F., Behar-Cohen, F., Courtois, Y., and Jeanny, J.C. (2008). The protective role of transferrin in Muller glial cells after iron-induced toxicity. *Mol Vis* 14, 928-941.
- Pignatelli, V., and Strettoi, E. (2004). Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol* 476, 254-266.
- Pochet, R., Pasteels, B., Seto-Ohshima, A., Bastianelli, E., Kitajima, S., and Van Eldik, L.J. (1991). Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. *J Comp Neurol* 314, 750-762.
- Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S., and Tsacopoulos, M. (1995). Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15, 5179-5191.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 3, reviews0006.
- Pow, D.V., and Barnett, N.L. (1999). Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Muller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res* 297, 57-66.
- Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R., and Ramirez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* 3, 559-569.
- Ramirez, J.M., Ramirez, A.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., and Trivino, A. (2001). Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 73, 601-615.
- Raz-Prag, D., Grimes, W.N., Fariss, R.N., Vijayasarathy, C., Campos, M.M., Bush, R.A., Diamond, J.S., and Sieving, P.A. (2010). Probing potassium channel function in vivo by intracellular delivery of antibodies in a rat model of retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12710-12715.

Bibliografia

- Reichelt, W., Muller, T., Pastor, A., Pannicke, T., Orkand, P.M., Kettenmann, H., and Schnitzer, J. (1993). Patch-clamp recording from Muller (glial) cell endfeet in the intact isolated retina and acutely isolated Muller cells of mouse and guinea-pig. *Neuroscience* 57, 599-613.
- Reichenbach, A., Henke, A., Eberhardt, W., Reichelt, W., and Dettmer, D. (1992). K⁺ ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol* 70 *Suppl*, S239-247.
- Rich, K.A., Zhan, Y., and Blanks, J.C. (1997). Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388, 47-63.
- Richard, M., Roepman, R., Aartsen, W.M., van Rossum, A.G., den Hollander, A.I., Knust, E., Wijnholds, J., and Cremers, F.P. (2006). Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* 15 *Spec No 2*, R235-243.
- Riepe, R.E., and Norenburg, M.D. (1977). Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654-655.
- Ritchey, E.R., Bongini, R.E., Code, K.A., Zelinka, C., Petersen-Jones, S., and Fischer, A.J. (2010). The pattern of expression of guanine nucleotide-binding protein beta3 in the retina is conserved across vertebrate species. *Neuroscience* 169, 1376-1391.
- Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M.M., and Dryja, T.P. (2002). Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 11, 1219-1227.
- Rogers, J.H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 105, 1343-1353.
- Roh, M.H., Fan, S., Liu, C.J., and Margolis, B. (2003). The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116, 2895-2906.
- Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157, 161-172.
- Rohlich, P., van Veen, T., and Szel, A. (1994). Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron* 13, 1159-1166.
- Roth, J., Thorens, B., Hunziker, W., Norman, A.W., and Orci, L. (1981). Vitamin D-dependent calcium binding protein: immunocytochemical localization in chick kidney. *Science* 214, 197-200.
- Saari, J.C., Bredberg, D.L., and Noy, N. (1994). Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* 33, 3106-3112.
- Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48, 1045-1058.
- Sancho-Pelluz, J., Wunderlich, K.A., Rauch, U., Romero, F.J., van Veen, T., Limb, G.A., Crocker, P.R., and Perez, M.T. (2008). Sialoadhesin expression in intact degenerating retinas and following transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 5602-5610.
- Sarlos, S., and Wilkinson-Berka, J.L. (2005). The renin-angiotensin system and the developing retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1069-1077.
- Sarthy, P.V., and Fu, M. (1990). Localization of laminin B1 mRNA in retinal ganglion cells by in situ hybridization. *J Cell Biol* 110, 2099-2108.
- Sarthy, V. (1993). Collagen IV mRNA expression during development of the mouse retina: an in situ hybridization study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 145-152.
- Saszik, S.M., Robson, J.G., and Frishman, L.J. (2002). The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J Physiol* 543, 899-916.
- Schnitzer, J. (1988). Astrocytes in mammalian retina. *Prog Ret Res* 7, 209-232.
- Schnitzer, J., Franke, W.W., and Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90, 435-447.
- Schutte, M., and Werner, P. (1998). Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 246, 53-56.

- Sedmak, T., and Wolfrum, U. (2010). Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J Cell Biol* 189, 171-186.
- Selim, A.A., Abdelmagid, S.M., Kanaan, R.A., Smock, S.L., Owen, T.A., Popoff, S.N., and Safadi, F.F. (2003). Anti-osteoactivin antibody inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13, 265-275.
- Sfakianos, J., Togawa, A., Maday, S., Hull, M., Pypaert, M., Cantley, L., Toomre, D., and Mellman, I. (2007). Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 179, 1133-1140.
- Sharma, R.K., and Johnson, D.A. (2000). Molecular signals for development of neuronal circuitry in the retina. *Neurochem Res* 25, 1257-1263.
- Sharma, R.K., O'Leary, T.E., Fields, C.M., and Johnson, D.A. (2003). Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 145, 93-105.
- Shen, F., Chen, B., Danias, J., Lee, K.C., Lee, H., Su, Y., Podos, S.M., and Mittag, T.W. (2004). Glutamate-induced glutamine synthetase expression in retinal Muller cells after short-term ocular hypertension in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 3107-3112.
- Sherry, D.M., Wang, M.M., Bates, J., and Frishman, L.J. (2003). Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 465, 480-498.
- Shinoe, T., Kuribayashi, H., Saya, H., Seiki, M., Aburatani, H., and Watanabe, S. (2010). Identification of CD44 as a cell surface marker for Muller glia precursor cells. *J Neurochem* 115, 1633-1642.
- Sieving, P.A., Murayama, K., and Naarendorp, F. (1994). Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis Neurosci* 11, 519-532.
- Smirnov, E.B., and Puchkov, V.F. (2004). Characteristics of cellular proliferation in the developing human retina. *Neurosci Behav Physiol* 34, 643-648.
- Smith, A.J., Bainbridge, J.W., and Ali, R.R. (2009). Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet* 25, 156-165.
- Soderpalm, A., Szel, A., Caffè, A.R., and van Veen, T. (1994). Selective development of one cone photoreceptor type in retinal organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3910-3921.
- Sparrow, J.R., Hicks, D., and Hamel, C.P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10, 802-823.
- Spring, F.A., Dalchau, R., Daniels, G.L., Mallinson, G., Judson, P.A., Parsons, S.F., Fabre, J.W., and Anstee, D.J. (1988). The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 64, 37-43.
- Stohr, H., Heisig, J.B., Benz, P.M., Schoberl, S., Milenkovic, V.M., Strauss, O., Aartsen, W.M., Wijnholds, J., Weber, B.H., and Schulz, H.L. (2009). TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals. *J Neurosci* 29, 6809-6818.
- Stohr, H., Molday, L.L., Molday, R.S., Weber, B.H., Biedermann, B., Reichenbach, A., and Kramer, F. (2005). Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina. *J Comp Neurol* 481, 31-41.
- Stohr, H., Stojic, J., and Weber, B.H. (2003). Cellular localization of the MPP4 protein in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 5067-5074.
- Stohr, H., and Weber, B.H. (2001). Cloning and characterization of the human retina-specific gene MPP4, a novel member of the p55 subfamily of MAGUK proteins. *Genomics* 74, 377-384.
- Stone, E.M. (2007). Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 144, 791-811.

Bibliografia

- Stone, E.M. (2009). Progress toward effective treatments for human photoreceptor degenerations. *Curr Opin Genet Dev* 19, 283-289.
- Stone, J., and Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255, 35-49.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881.
- Strettoi, E., and Pignatelli, V. (2000). Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11020-11025.
- Strettoi, E., and Volpini, M. (2002). Retinal organization in the bcl-2-overexpressing transgenic mouse. *J Comp Neurol* 446, 1-10.
- Strissel, K.J., Lishko, P.V., Trieu, L.H., Kennedy, M.J., Hurley, J.B., and Arshavsky, V.Y. (2005). Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 280, 29250-29255.
- Stuck, M.W., Conley, S.M., and Naash, M.I. (2012). Defects in the outer limiting membrane are associated with rosette development in the Nrl^{-/-} retina. *PLoS One* 7, e32484.
- Surzenko, N., Crawl, T., Bachleda, A., Langer, L., and Pevny, L. (2013). SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development*.
- Szel, A., and Rohlich, P. (1992). Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res* 55, 47-52.
- Szel, A., Rohlich, P., Mieziowska, K., Aguirre, G., and van Veen, T. (1993). Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina: a developmental study. *J Comp Neurol* 331, 564-577.
- Tackenberg, M.A., Tucker, B.A., Swift, J.S., Jiang, C., Redenti, S., Greenberg, K.P., Flannery, J.G., Reichenbach, A., and Young, M.J. (2009). Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Mol Vis* 15, 1886-1896.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194.
- Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J.W., Cho, K.S., Trevino, S.G., Matsuda, T., and Chen, D.F. (2008). alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Muller glia in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1142-1150.
- Tanaka, K. (1993). Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. *Neurosci Lett* 159, 183-186.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* 20, 1187-1202.
- Tepass, U. (2002). Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* 24, 690-695.
- Tepass, U., and Knust, E. (1993). Crumbs and Stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 159, 311-326.
- Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799.
- Tomita, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1996). Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* 1, 765-774.
- Tong, Y., and Eigler, T. (2009). Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol* 43, 179-185.
- Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., *et al.* (2006). Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 920-926.
- Turner, D.L., and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.

- Uga, S., and Smelser, G.K. (1973). Electron microscopic study of the development of retinal Mullerian cells. *Invest Ophthalmol* 12, 295-307.
- Usher, C. (1935). Bowman lecture: On a few hereditary eye affection. *Trans Ophthalmol Soc UK* 55, 164.
- Valverde, D. (2001). Las bases genéticas de la retinosis pigmentaria. En: La retinosis pigmentaria en España; estudio clínico y genético. Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE).
- Vallespin, E. (2008). Amaurosis congenital de Leber y Retinosis Pigmentaria de Inicio Precoz: estudio clínico y genético. . Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid.
- Vallespin, E., Cantalapiedra, D., Riveiro-Alvarez, R., Wilke, R., Aguirre-Lamban, J., Avila-Fernandez, A., Lopez-Martinez, M.A., Gimenez, A., Trujillo-Tiebas, M.J., Ramos, C., *et al.* (2007). Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5653-5661.
- van de Pavert, S.A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M.W., Rashbass, P., *et al.* (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117, 4169-4177.
- van de Pavert, S.A., Meuleman, J., Malysheva, A., Aartsen, W.M., Versteeg, I., Tonagel, F., Kamphuis, W., McCabe, C.J., Seeliger, M.W., and Wijnholds, J. (2007a). A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1. *J Neurosci* 27, 564-573.
- van de Pavert, S.A., Sanz, A.S., Aartsen, W.M., Vos, R.M., Versteeg, I., Beck, S.C., Klooster, J., Seeliger, M.W., and Wijnholds, J. (2007b). Crb1 is a determinant of retinal apical Muller glia cell features. *Glia* 55, 1486-1497.
- van den Hurk, J.A., Rashbass, P., Roepman, R., Davis, J., Voesenek, K.E., Arends, M.L., Zonneveld, M.N., van Roekel, M.H., Cameron, K., Rohrschneider, K., *et al.* (2005). Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* 11, 263-273.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731, 237-245.
- van Rossum, A.G., Aartsen, W.M., Meuleman, J., Klooster, J., Malysheva, A., Versteeg, I., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., and Wijnholds, J. (2006). Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet* 15, 2659-2672.
- Vardi, N., and Auerbach, P. (1995). Specific cell types in cat retina express different forms of glutamic acid decarboxylase. *J Comp Neurol* 351, 374-384.
- Varela, C., Rivera, L., Blanco, R., and De la Villa, P. (2005). Depolarizing effect of GABA in horizontal cells of the rabbit retina. *Neurosci Res* 53, 257-264.
- Vazquez-Chona, F.R., Swan, A., Ferrell, W.D., Jiang, L., Baehr, W., Chien, W.M., Fero, M., Marc, R.E., and Levine, E.M. (2011). Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. *BMC Neurosci* 12, 98.
- Vernon, M. (1969). Usher's syndrome--deafness and progressive blindness. Clinical cases, prevention, theory and literature survey. *J Chronic Dis* 22, 133-151.
- Vilela, C.C., V. Vallet, M. (1998). Electrorretinograma: técnica y aplicaciones clínicas. *Revista de Neurología* 26 (151), 444-447.
- Vineros, S.A., Derevjani, N.L., Ozaki, H., Okamoto, N., and Campochiaro, P.A. (1999). Cellular mechanisms of blood-retinal barrier dysfunction in macular edema. *Doc Ophthalmol* 97, 217-228.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 1-19.
- von Gräfe, A. (1858). Exceptionelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei Pigmententartung der Netzhaut. *Archiv für Ophthalmologie* 4, 250-253.

Bibliografia

- Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2011). Adaptive Muller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J Neuroinflammation* 8, 173.
- Wang, M.H., Frishman, L.J., and Otteson, D.C. (2009). Intracellular delivery of proteins into mouse Muller glia cells in vitro and in vivo using Pep-1 transfection reagent. *J Neurosci Methods* 177, 403-419.
- Wang, X.L., Tao, Y., Lu, Q., and Jiang, Y.R. (2012). Apelin supports primary rat retinal Muller cells under chemical hypoxia and glucose deprivation. *Peptides* 33, 298-306.
- Wasserman, R.H., and Taylor, A.N. (1966). Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152, 791-793.
- Wassle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5, 747-757.
- Watanabe, T., Miyatani, S., Katoh, I., Kobayashi, S., and Ikawa, Y. (2004). Expression of a novel secretory form (Crb1s) of mouse Crumbs homologue Crb1 in skin development. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 263-270.
- Werblin, F. (1991). Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 459-483.
- Werblin, F.S., and Dowling, J.E. (1969). Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J Neurophysiol* 32, 339-355.
- Wilson, J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 1149-1163.
- Williams, D.S. (2008). Usher syndrome: animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy. *Vision Res* 48, 433-441.
- Wulle, I., and Schnitzer, J. (1989). Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res* 48, 59-72.
- Wunderlich, K.A., Leveillard, T., Penkowa, M., Zrenner, E., and Perez, M.T. (2010). Altered expression of metallothionein-I and -II and their receptor megalin in inherited photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 4809-4820.
- Yamashita, S. (2007). Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 41, 141-200.
- Yan, X.X., and Wiechmann, A.F. (1997). Early expression of recoverin in a unique population of neurons in the human retina. *Anat Embryol (Berl)* 195, 51-63.
- Yang, J., Pawlyk, B., Wen, X.H., Adamian, M., Soloviev, M., Michaud, N., Zhao, Y., Sandberg, M.A., Makino, C.L., and Li, T. (2007). Mpp4 is required for proper localization of plasma membrane calcium ATPases and maintenance of calcium homeostasis at the rod photoreceptor synaptic terminals. *Hum Mol Genet* 16, 1017-1029.
- Young, R.W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205.
- Yzer, S., Leroy, B.P., De Baere, E., de Ravel, T.J., Zonneveld, M.N., Voeselek, K., Kellner, U., Ciriano, J.P., de Faber, J.T., Rohrschneider, K., *et al.* (2006). Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 1167-1176.
- Zacchetti, A., van Garderen, E., Teske, E., Nederbragt, H., Dierendonck, J.H., and Rutteman, G.R. (2003). Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS* 111, 430-438.
- Zernant, J., Kulm, M., Dharmaraj, S., den Hollander, A.I., Perrault, I., Preising, M.N., Lorenz, B., Kaplan, J., Cremers, F.P., Maumenee, I., *et al.* (2005). Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3052-3059.

- Zhang, H.R. (1994). Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog Ret Eye Res* 13, 243–270.
- Zhao, H.Y., Zhang, Y.J., Dai, H., Zhang, Y., and Shen, Y.F. (2011). CARM1 mediates modulation of Sox2. *PLoS One* 6, e27026.
- Zou, J., Wang, X., and Wei, X. (2012). Crb Apical Polarity Proteins Maintain Zebrafish Retinal Cone Mosaics via Intercellular Binding of Their Extracellular Domains. *Dev Cell*.

English summary



LUNDS UNIVERSITET

ÖGONKLINIKEN
Universitetssjukhuset i Lund, 221 85 LUND



March 12

2013

TO WHOM IT MAY CONCERN

Dear Sir/Madam,

I hereby certify that Saúl Herranz Martín joined the Department of Ophthalmology at Lund University from April 25 to July 25, 2010 as part of his research training and in the context of collaborative work between the Dept. of Cellular Biology and Pathology (Salamanca, Spain) and the Dept. of Ophthalmology (Lund, Sweden).

During his stay, Saúl Herranz Martín was introduced to new techniques and subsequently designed and conducted experiments related to the topic of his PhD work. The work involved intraocular injections, retinal cell transplantation, cell culture, protein transfection, and tissue processing and analysis. He has also attended and actively participated in scientific journal clubs and attended three thesis defenses at the Department.

Saúl Herranz Martín is a very skilled and dedicated research student and a valuable addition to any research environment.

Sincerely,



Maria Thereza Perez
Associate Professor
Dept. of Ophthalmology, Department of Ophthalmology
Lund University
BMC, B11
Klinikgatan 26
SE-221 85 LUND
Sweden

Tel.: +46-46-2220772

Fax.: +46-46-2220774

E-mail: maria_thereza.perez@med.lu.se

Medizinische Fakultät
Anatomisches Institut
Österbergstr. 3

72074 Tübingen

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



Anatomisches Institut Österbergstr. 3 · 72074 Tübingen

Dr. Andreas F. Mack, Ph.D.

Telefon: 0 70 71 · 29 75925

Telefax: 0 70 71 · 29 4014

E-Mail: mack@anatu.uni-tuebingen.de

To whom it may concern

March 6, 2013

Report on Doctoral Thesis of Mr. Saúl Herranz Martín

It is a pleasure for me to write the report on the thesis of Mr. Saúl Herranz Martín. He carried out a research project leading to the thesis entitled:

"Role of CRB and MAGUK proteins during retinal development and in retinal degenerative diseases".

This work was conducted at the Institute of Neurosciences of Castilla y León, Department of Cell Biology and Pathology, in the University of Salamanca, Spain, under the supervision of Prof. Dr. M^a Concepción Lillo Delgado and Prof. Dr. Almudena Velasco Arranz.

The studies sought to elucidate the role of members of the CRB (Crumbs homologues) protein family during retinal development and in retinal function. For this, Mr. Herranz investigated the phenotype of a mouse mutant for the CRB1 protein, and the impact of the mutation on the expression of several proteins crucial for the correct functioning of the retina during and after postnatal development. Furthermore, these studies have determined the precise localization of another member of the CRB protein family, CRB3, in the mouse retina from its postnatal development to adulthood.

The strategies presented by Mr. Herranz are straightforward. The experimental design was done in a logical and careful way. His work is the major contribution to a publications on which he is the first author in the highly ranked, international journal "Plos One" entitled: "Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina" He is now in the process of submitting a second manuscript summarizing another part of the results obtained in his doctorate thesis.

Mr. Herranz acquired excellent technical expertise to address these questions. He has employed cell culture strategies and subretinal injections to introduce native proteins into Müller cells, among other approaches. He has become an expert in different cellular and molecular techniques, as diverse as fluorescence microscopy, various in vivo techniques, primary cell culture approaches, immunoprecipitations, or PCRs. Hence, Mr. Herranz came to

relevant conclusions that add interesting and novel information to the understanding of the role of the CRB and associated proteins in the function of the retina.

The relevance of the results is underlined by the known consequences in mutations of the CRB genes: Mutations in CRB1 have been shown to produce several types of retinal dystrophies, such as retinitis pigmentosa and Leber Congenital Amaurosis, Therefore this thesis work on the observations of a CRB1 mutant mice, adds to the knowledge of the early cellular and molecular processes underlying these complex dystrophies. Furthermore, the presented data on the spatial and temporal localization of CRB3 in the mouse retina, together with previous knowledge on the role of CRB3 in the establishment of adhesion complexes and in ciliogenesis of different cell types suggest that CRB3 could play an important role in the development and cell differentiation in the retina. This is even more interesting since CRB3 expression is not restricted to the retina but occurs in many epithelial-derived tissues. The localization of CRB3 to the cilium of photoreceptors might also help to shed light on still not well understood ciliopathies.

The thesis concentrates on these very important topics in the visual system as it highlights the early modifications that both Müller cells and the photoreceptors experience under the mutation of CRB1. Mr. Herranz demonstrates that defects in CRB1 cause an enormous effect in the behavior and expression of typical proteins of Müller cells, and that these modifications are present earlier than expected and previously known. Also, his finding, that Müller cells of the mutant mouse “in vitro” and “in vivo” are susceptible to be easily transfected with native proteins is important for future therapy trials in this cell type. In addition, the data offer some explanations about the specific role of differential expression of CRB and associated proteins in various biological functions.

In summary, the doctoral thesis of Mr. Herranz is a well-done work which contains original and interesting results. Methodologies are diverse, well developed, and performed with high accuracy. The English version of the thesis and the mentioned publication which have been the basis of my evaluation, demonstrate that he is a talented young researcher deeply committed to science.

I am pleased to recommend this excellent work to the Doctorate Committee of the University of Salamanca to obtain the “International mention”. I would recommend the work to be considered as excellent.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Andreas Mack', is written in a cursive style.

Andreas F. Mack, PhD



DAVID S. WILLIAMS PH.D.
PROFESSOR OF OPHTHALMOLOGY &
NEUROBIOLOGY
JULES STEIN EYE INSTITUTE
200 STEIN PLAZA
DAVID GEFKEN SCHOOL OF MEDICINE AT UCLA
LOS ANGELES, CA 90095-7008

March 12, 2013

To whom it may concern

Doctorate Thesis Report

It is a pleasure for me to write the report on the thesis of Mr. Saúl Herranz Martín, entitled "*Role of CRB and MAGUK proteins during retinal development and in retinal degenerative diseases*". The studies were performed in the Institute of Neurosciences of Castilla y León, Department of Cell Biology and Pathology, in the University of Salamanca, Spain, under the supervision of Prof. Dr. M^a Concepción Lillo Delgado and Prof. Dr. Almudena Velasco Arranz.

The studies sought to: 1. Elucidate retinal function of the CRB1 protein by studying the phenotype of a mutant mouse, including modifications in the expression of several proteins crucial for the correct functioning of the retina. 2. Conduct experiments to introduce native proteins into mutant Müller cells. 3. Demonstration of the precise localization of another member of the CRB protein family, CRB3, in the mouse retina from its postnatal development to adulthood.

Since mutations in the *CRB1* gene have been shown to produce several types of retinal dystrophies, such as retinitis pigmentosa and Leber Congenital Amaurosis, this work sheds light on early cellular and molecular processes underlying these complex dystrophies. Furthermore, the reported spatial and temporal localization of CRB3 in the mouse retina, together with what is known of the role of CRB3 in the establishment of adhesion complexes and in ciliogenesis in different types of cells, suggest that CRB3 could play an important role in the development of several cell types in the retina.

Therefore, the doctoral thesis of Mr. Herranz concentrates on some very important topics in the visual system, highlighting early modifications that both the Müller and photoreceptor cells experience due to mutations in *Crb1*. He demonstrated that defects in CRB1 protein cause a major effect on the behavior and expression of Müller cell proteins, and that these modifications are present earlier than what was previously expected. Also, he has demonstrated "in vitro" and "in vivo", that Müller cells of the mutant mouse can be readily transfected with native proteins; this observation is important with regard to future gene therapy trials.

Mr. Herranz developed excellent strategies to address the questions. He has learned and appears now to be an expert in different cellular and molecular techniques, such as fluorescence microscopy, primary cell culture, subretinal injection, immunoprecipitation, and PCR. Hence, Mr. Herranz was able to arrive at relevant conclusions that add interesting and

novel information to the understanding of the role of CRB and associated proteins in retinal function.

The strategies presented by Mr. Herranz are straightforward. The experimental design was performed in a logical and apparently careful way. This is reflected in the publications to which he contributed. He is the first author on the paper, entitled "Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina", which was published in the well-respected, international journal "Plos One". Now, he is in the process of submitting a different manuscript, on another set of the results he obtained during his doctoral studies.

In summary, the doctoral thesis of Mr. Herranz reports an excellent series of studies, which contain original and interesting results. Methodologies are well developed, varied and appear to have been carried out with care and accuracy. The English version of the thesis, which was the basis of my evaluation, demonstrates that he is a talented young researcher deeply committed to science.

I am pleased to recommend this excellent work to the Doctorate Committee of the University of Salamanca in order to obtain "International mention". I would recommend the work to be considered as excellent, with a ranking of 1.5 (in a scale of 1 to 5, with 5 the lowest).

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "David Williams". The signature is written in a cursive, flowing style.

David S. Williams PhD
RPB Jules and Doris Stein Professor of Ophthalmology

In the present report we have summarized the main achievements of the Doctoral Thesis entitled: “Role of CRB and MAGUK proteins during retinal development and in retinal degenerative diseases”.

The summary is divided in two main topics:

- ✓ In the first part we analyze the main modifications of the retina of a mouse model, *Crb1^{rd8}*, which has a mutation in the *Crb1* gene, leading to retinal degeneration (Mehalow et al., 2003). Since CRB proteins are supposed to intervene in the determination of the polarity of many cell types, we have investigated with *in vitro* and *in vivo* experiments the involvement of CRB1 in the correct functioning of different cell types of the retina during its postnatal development and in adulthood, by using this mouse model.
- ✓ On the other hand, since little is known about the distribution of CRB3 protein in the retina of the wild-type mouse, we have characterized its location during the postnatal development and in adulthood. This part of the work has been recently published in the scientific journal PLOS ONE (impact factor 4.092), with the title “Immunocytochemical evidence of the localization of the crumbs homologue 3 protein (CRB3) in the developing and mature mouse retina” (Herranz-Martin et al., 2012). To illustrate this part of our work, this publication has been added to the end of the present summary.

The degeneration in the retina of the
Crb1^{rd8} mouse

INTRODUCTION

The outer limiting membrane (OLM) is a retinal layer established by the adherens junctions among Müller cells and photoreceptors (Kolb, 2000). Apically to these junctions is located the subapical region (SAR) of the OLM, the area where the polarity cell complexes PAR3/PAR6 and CRB are present (**Fig. 1**). In human, mutations in the gene that codifies for one of the CRB proteins, CRB1, cause retinal degenerations, such as retinitis pigmentosa type 12 and Leber Congenital Amaurosis (den Hollander et al., 2001; den Hollander et al., 1999; Richard et al., 2006).

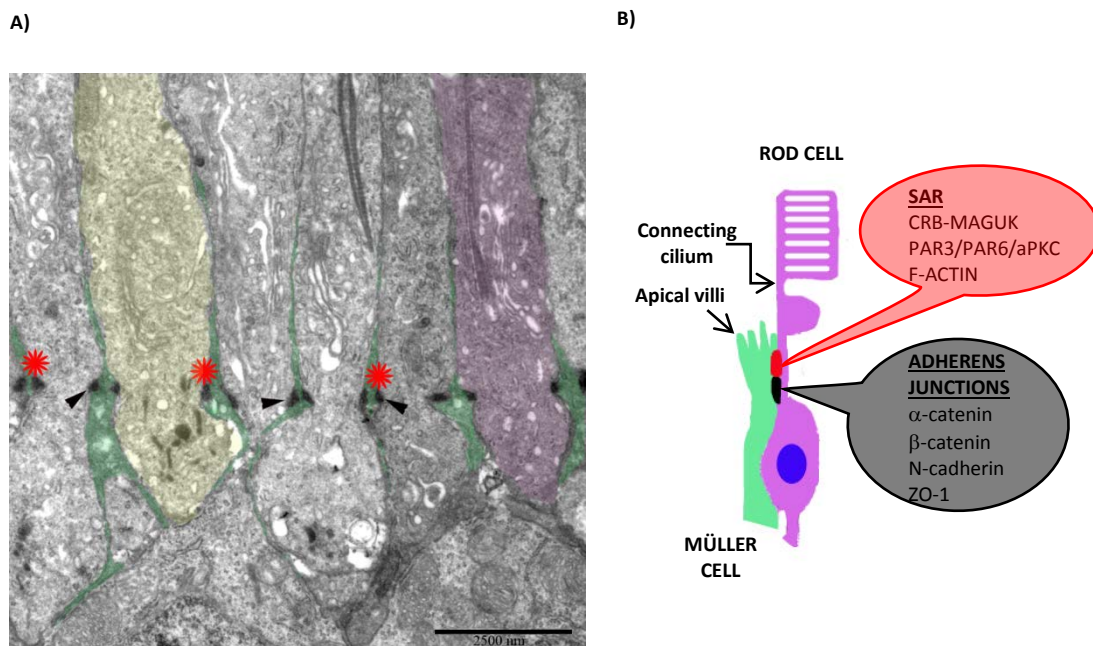


Figure 1: **A)** Electron microscopy micrograph. The arrowheads show the Müller cells and photoreceptors adherens junctions established in the OLM. The SAR of the OLM is located apically to these junctions (red asterisks). Müller cell processes have been colored in green, a cone cell in yellow and a rod photoreceptor in purple. **B)** Diagram showing the proteins expressed in the Müller cell and a photoreceptor cells adherens junctions and SAR of the OLM. The adherens junction and the SAR are depicted with a black and a red line respectively. OLM, outer limiting membrane, SAR, subapical region of the outer limiting membrane. Scale bar: 2500 nm.

CRB1 is a member of the CRB transmembrane protein family (homologues to *Drosophila Crumbs*) (Richard et al., 2006). It has been localized in several epithelial-derived tissues, as in the retina (den Hollander et al., 2002; den Hollander et al., 1999; Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002; van de Pavert et al., 2004). In this tissue, CRB1 is mainly expressed in Müller cells (Pellikka et al., 2002; van Rossum et al., 2006), and it is only located in the SAR of the OLM. At this level, CRB1 arranges a highly organized intracellular protein scaffold, involving members of MAGUK protein family, such as PALS1 and MPP4, among other proteins

(Bazellieres et al., 2009; Kantardzhieva et al., 2005; Park et al., 2011; Roh et al., 2002; van de Pavert et al., 2004). The roles of this complex are:

- ✓ The maintenance of the adherens junctions in the OLM (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004).
- ✓ To establish and control the photoreceptor and Müller cells' polarity, as well as the structure for both cell types (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004; van Rossum et al., 2006).
- ✓ To participate in the photoreceptor morphogenesis (Mehalow et al., 2003).
- ✓ To control the Müller glia apical villi size (van de Pavert et al., 2007b).

Different mouse models have been employed to study the role of CRB1 in the retina: a knock-out mouse, *Crb1*^{-/-} (van de Pavert et al., 2004; van de Pavert et al., 2007b; van Rossum et al., 2006) a knock-in model, *Crb1*^{C249W} (van de Pavert et al., 2007a) and the *Crb1*^{rd8} mouse (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010). The development of the retinal degeneration that each model experiments is different, as well as the progress and timing of the main cell modifications. For the purposes of the present Doctoral Thesis, we have chosen the *Crb1*^{rd8} mouse, which spontaneous mutation is more similar to the mutation in humans, compare with the rest of the mouse models mentioned above.

The *Crb1*^{rd8} mouse is affected by a natural mutation in a single base in the *Crb1* gene, which then codifies a truncated protein. This protein lacks the intracellular and transmembrane domains (Fig. 2). The *Crb1*^{rd8} retina degenerates with time, showing gaps in the OLM, photoreceptor rosettes, Müller cells' abnormal morphology and progressive photoreceptor death (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010).

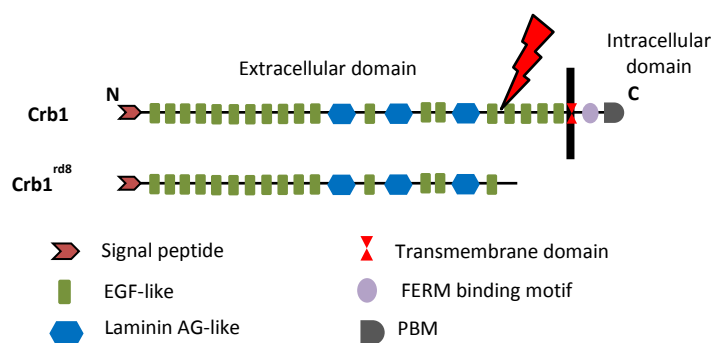


Figure 2: Diagram showing the different protein domains present in the CRB1 protein in a wild-type mouse (upper sequence) and *Crb1*^{rd8} mutant mouse (lower sequence). The *Crb1*^{rd8} truncated protein loses the intracellular and transmembrane domains as a result of the mutation (red beam). N, amino-terminus; C, carboxy-terminus.

The degeneration starts and it is focused in the ventral region of the retina, especially in the nasal area (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010).

Although CRB1 seems to be implicated in the development of the retina, and some laboratories have

used this mouse model in their studies (Barber et al., 2013; Lakowski et al., 2010; Lakowski et al., 2011; Mehalow et al., 2003; Pearson et al., 2010), there is insufficient information about the retinal modifications during the first stages of the degeneration. Besides, it is unknown the behavior of the Müller cells during the early postnatal development of the *Crb1^{rd8}* mutant retinas and the possible morphological changes in other cells types, such as photoreceptors cells during the course of the degeneration. In order to be able to perform future retinal therapies for this disease, it is important to know the earliest structural and functional modifications in photoreceptor cells to try to restore their phenotype in the future.

To elaborate this first purpose, we have divided this report in different sections. First, we analyze the degeneration in the OLM in the first stages of the degeneration, as well in the outermost part of the retina. Then, we study the location of CRB1 and the presence and levels of MPP4 and PALS1, two MAGUK proteins associated to CRB1, in mutant and wild-type retinas. Next, we examine the modifications of the photoreceptor cells and the phenotype and behavior of the Müller cells in the *Crb1^{rd8}* retina. Finally, we analyze the ability of the Müller cells to be transfected *in vitro* and *in vivo* with a method to deliver native proteins into cells.

MATERIAL AND METHODS

All procedures used in this work were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/606/EEC and 2003/65/EC) and Spanish legislation for the use and care of animals (RD 1201/2005). All the details of the study were approved by the Bioethics Committee of Salamanca University (CBE/30/07/08).

Mouse genotyping: We have employed P7, P30 and P90 wild type (C57BL/6J) and mutant *Crb1^{rd8}* mice (C57BL/6J *Crb1^{rd8}*). Animal genotyping was performed by PCR amplification of DNA samples of each mouse, using specific oligonucleotides to detect the *Crb1* mutation.

Primary Müller cell cultures: We performed this technique using a modification of the protocol established by D. Hicks and Y. Courtois (Hicks and Courtois, 1990). Briefly, P7 wild-type and *Crb1^{rd8}* mouse were sacrificed and the retinas were isolated, dissected and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza®), supplemented by 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco®) and 1% penicillin/streptomycin antibiotic (Gibco®). The first change of medium was at day 5 in culture (DIC5), and after that, the medium was refreshed each two days. We used two different stages of the culture, which were DIC15, previous to the first cell passaging and DIC21, to perform immunofluorescence, western blotting and MTT assays to analyze cells viability.

MTT assay: 100 μ l of a 5 mg/ml solution of MTT (Sigma-Aldrich™) were diluted in 1 ml of DMEM containing 10% BSA and 1% penicillin/streptomycin antibiotic. The cells in culture were incubated with this mixture for 75 min. After that, the solution was removed and the cells were incubated with 400 μ l of DMSO for 10 min. Finally we measured the absorbance at 570 nm with a LT-4000 Microplate Reader (LabTech™).

Immunofluorescence (IF): Mouse were anesthetized and the eyes were enucleated and fixed overnight at 4°C by immersion with a solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4. After this, the eyes were washed in PB and the lens was removed. The eyeballs were cryoprotected in sucrose and embedded in Tissue-Tek™ O.C.T. After that we obtained 14 μ m transverse sections with a cryostat. The sections autofluorescence was quenched with a solution of 0.25 g/l of sodium borohydride in 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS). To fix the cultured Müller cells we used the same mixture for 10 min and then, the cells were rinsed in PBS and post-fixed for 5 min in methanol at -20°C. Afterwards, both sections and cultured cells were rinsed in PBS with 0.02% Triton Tx-100 (Sigma-Aldrich™) (PBS-Tx) and blocked for 1 h in a solution with 1% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal serum (NS) in PBS-Tx. Then, sections or cultured cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (**Table 1**) diluted in a solution with 1% BSA and 2% NS. Finally, both cells and sections were washed with PBS and incubated 45 min at room temperature with 1:750 secondary antibody (Alexa 488 or Alexa 555, Life Technologies™) in a solution containing a nuclear marker (DAPI or TO-PRO3) and PBS. Sections and cells were mounted using Prolong® Gold antifading reagent (Life Technologies™).

Imaging: All images were obtained with a laser scanning spectral confocal microscope (Leica TCS SP2) or with an epifluorescence Olympus PROVIS AX70 microscope. The brightness and contrast in all original images were further processed with Adobe Photoshop CS5 software and Leica Confocal Software.

Western Blotting (WB): The whole retina or the cells in culture were lysed with a solution containing RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology®) supplemented with 1:100 proteases inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich™). The amount of protein obtained was measured with a Bradford's assay mixed with 20% Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad laboratories™) and absorbance at 595 nm was measured with a LT4000 Microplate reader (Labtech™). Following this, we boiled 30 mg of protein dissolved in sample buffer (2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% glycerol, 700 mM β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% bromophenol blue), and then the samples were loaded on a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes, and then, blocked with 5% nonfat dry milk diluted in tris-buffered saline (TBS)

with 0.1% Tween detergent (Sigma-Aldrich™) (TBS-T). Following, the membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (**Table 2**) in TBS-T. After several washes with TBS-T, the membranes were incubated for 45 min with 1:10000 anti-mouse or anti-rabbit-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP). Finally, the signals were visualized with the Pierce* ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

Electron microscopy: The animals were anesthetized and the eyes were enucleated and fixed overnight at 4°C by immersion with a solution containing 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4. After that, the eyes were washed in 0.1 M cacodylate buffer and the lens was removed. The eyeballs were post-fixed for 2 h in darkness with 1% OsO₄ and 1% K₃Fe(CN)₆ diluted in distilled water. After that, the eyeballs were washed with distilled water and dehydrated using a graded series of ethanol and propylene oxide as the last dehydrating agent. Following, the samples were embedded in Epon resin (Embed 812: 20 ml Epon 812, 16 ml DDSA, 8 ml MNA, 0.66 ml DMP-30). Semithin sections were stained with toluidine blue and the images were obtained with an Olympus PROVIS AX70 microscope. Ultrathin sections were mounted on grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and analyzed using a ZEISS EM-900 electron microscope.

Chariot® cell transfection: This method uses PEP-1 (Active Motif®) as the transfection agent to deliver proteins into cells. PEP-1 diluted in distilled water was incubated for 30 min with the native protein to transfect, β-galactosidase, for both *in vivo* and *in vitro* transfections. Müller cells in culture were incubated with PEP-1 + β-galactosidase diluted in DMEM with 1% antibiotic for 1 h, followed by 3 more h after the addition of 10% FBS. Finally, Müller cells were fixed with a “Fixing solution” (Active Motif®) for 10 min. To transfect retinas *in vivo*, the animals were anesthetized with a solution of 1/10 10xRompun (Bayer®) in 0.09% NaCl and with 40μl of ketamine (Pfizer®) with 60 μl of 0.09% NaCl 2 min after this treatment. We use two different approaches to deliver the PEP-1 + β-galactosidase solution in retinas: subretinal and intravitreal injections. Mouse were sacrificed 5 h after the transfection and the eyes were fixed for 2 hours with the “Fixing solution”. The eyeballs were further processed as we have described previously to obtain 14μm cryostat sections. To detect the β-galactosidase activity in Müller cells in culture, as well as in cryostat sections, we carried out a histochemistry analysis.

Statistical analysis: All statistical analysis were performed with the SPSS software version 20.0, and the significance was evaluated by parametric Student’s t-test or non-parametric Mann-Whitney U test for comparisons between two groups. The difference was considered significant with a *p<0.05 and highly significant if **p<0.01.

Primary antibody	Source, reference number	Concentration		Type
		Tissue	Cultures	
α - β -catenin	BD Transduction Laboratories™, 610153	1:500	-	Mouse monoclonal
α - CD44	BD Pharmingen™, 550538	-	1:500	Rat monoclonal
α - CRB1	Genosphere Biotechnologies	1:50	-	Rabbit policlonal
α - GFAP	Sigma-Aldrich®, G6171	1:500	1:500	Mouse monoclonal
α - GLAST	Lifespan Biosciences, LS-C94136	-	1:100	Rabbit policlonal
α - Ki67	Abcam®, ab15580	-	1:1000	Rabbit policlonal
α - Kir 4.1	Alomone Labs, APC-035	1:400	-	Rabbit policlonal
α - MPP4	Genosphere Biotechnologies	1:1000	-	Rabbit policlonal
α - PALS1	Abnova, H00064398-A01	1:250	-	Mouse policlonal
α - Recoverin	Millipore™, AB5585	1:2000	-	Rabbit policlonal
α - SOX2	Abcam®, ab97959	1:1000	1:500	Rabbit policlonal
α - SYP	Sigma-Aldrich®, S5768	1:5000	-	Mouse policlonal
α - Vimentin	Sigma-Aldrich®, V6630	1:400	1:100	Mouse monoclonal

Table 1: Primary antibodies used in the present Doctoral Thesis to perform IF experiments.

Primary antibody	Source, reference number	Concentration		Type
		Tissue	Cultures	
α - GFAP	Sigma-Aldrich®, G6171	1:1000	-	Mouse monoclonal
α - MPP4	Genosphere Biotechnologies	1:2500	-	Rabbit policlonal
α - PALS1	Abnova, H00064398-A01	1:1000	-	Rabbit policlonal
α - Recoverin	Millipore™, AB5585	1:3000	-	Rabbit policlonal
α - SOX2	Abcam®, ab97959	1:1000	1:500	Rabbit policlonal
α - SYP	Sigma-Aldrich®, S5768	1:5000	-	Mouse monoclonal

Table 2: Primary antibodies used in the present Doctoral Thesis to perform WB experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

THE OLM IN THE RETINA OF THE *Crb1*^{rd8} MOUSE AT P7

In the first part of these results, we analyze the degeneration of the OLM, as well of the rest of the outer layers of the retina, at the postnatal stage of P7.

By analyzing semithin and ultrathin sections, we have found that the first early modifications at the level of the outermost part of the retina are evident at P7 (**Fig. 3**). In the wild-type mice, the retinal lamination has finished at this stage (**Fig. 3A**) and the OLM is a continuous structure showing no gaps in its organization (**Fig. 3B**). Furthermore, the outer nuclear layer (ONL) and the outer plexiform layer (OPL) are well defined and established (**Fig. 3A-A'**). At P7, the mutant retina has also concluded its lamination (**Fig. 3C**); however, at this age, it is possible to observe early signs of degeneration, such as some incipient rosettes of photoreceptor cells, which are geographically limited to the inferior nasal quadrant (**Fig. 3C**). We have also found modifications in the structure of the ONL and OPL in the areas showing degeneration of the OLM (**Fig. 3C-C'**). The precise analysis of the OLM in the *Crb1*^{rd8} retinas shows that there are some specific areas where the OLM loses its particular arrangement, showing gaps, and in these places, the photoreceptor nuclei move towards the subretinal space (**Fig. 3D**). The gaps at the level of the OLM are focused to the ventro-nasal region. In other areas of the mutant retina, the OLM does not present signs of degeneration (**Fig. 3E**).

The electron microscopy analysis allowed us to investigate the adherens junctions of the OLM at P7. In normal and mutant retinas, these junctions are structures with a strong electron density (**Fig. 3F-H**). Although the majority of adherens junctions are present in *Crb1*^{rd8} retinas, some of them have disappeared (**Fig. 3G**) and then, the OLM gets disrupted at this stage, at a much earlier stage than it had been reported (Mehalow et al., 2003). Consequently, and according to what other authors had suggested, we think that CRB1 could not be necessary to establish the OLM adherens junctions (Mehalow et al., 2003; van de Pavert et al., 2004). However, since some of these junctions are missing at P7, a stage in which the retina has not finished its maturation, we believe that the mutation in *Crb1* could lead some yet unknown defects during the development of these junctions.

CRB1 AND MAGUK PROTEINS IN THE RETINA OF THE *Crb1*^{rd8} MOUSE

To study the location of the CRB1 protein in the mature retina, we have designed a custom made antibody, which was generated by Genosphere Biotechnologies®. This antibody is specific to recognize the murine protein, and it detects CRB1 at the level of the OLM in normal retinas (**Fig. 4A**), as well as the truncated CRB1 protein in mutant retinas, although the

protein expression disappears in some points along the OLM (**Fig. 4B**). We tested the specificity of the custom made CRB1 antibody with a peptide competitive assay. The positive labeling for CRB1 in both, normal and mutant retinas disappears, showing the specificity of the antibody (**Fig. 4C-D**).

To unravel the location of CRB1 in the OLM, we did double IF with β -catenin, a protein present in the adherens junctions of the OLM (Fu et al., 2006). CRB1 is located apically to the staining for β -catenin, in the SAR of the OLM (**Fig. 4E-F**), a location already reported by other authors (Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002; van de Pavert et al., 2004). It is important to notice that CRB1 and β -catenin disappear in the same areas in mutant retinas (**Fig. 4F**), which it is in accordance with the role of CRB1 in the maintenance of the adherens junctions of the OLM (van de Pavert et al., 2004).

Regarding the location and the levels of the MAGUK proteins PALS1 and MPP4, we found modifications in the location and expression of both in mutant retinas. In comparison to wild-type retinas, the labeling for PALS1 is altered in some points along the RSA of the OLM (**Fig. 5A-B**) and WB quantifications show a decrease in the expression of PALS1 protein in *Crb1^{rd8}* retinas (* $p < 0.05$, **Fig. 5C**). In wild type retinas, MPP4 is present at the level of the RSA of the OLM, as well as in OPL (**Fig. 5D**). In areas in degeneration in the mutant retinas, such as zones with rosettes of photoreceptors, the labeling for MPP4 in the RSA almost disappears and in the OPL is strongly reduced (**Fig. 5E**). The MPP4 protein levels measured by WB showed that in wild-type retinas, the amount of MPP4 is higher than in *Crb1^{rd8}* retinas, with a highly significant difference (**Fig. 5E**). So, we have demonstrated that the *Crb1* mutation definitively affects not only to the localization of PALS1 and MPP4, but also their expression levels, two of the proteins that take part in the intracellular protein scaffold established by CRB1 in the mouse retina.

Moreover, in the present Doctoral Thesis we have studied the pattern of interaction of MPP4 with some of the CRB proteins. By performing Co-Immunoprecipitation experiments, we have observed that MPP4 and CRB3 directly interact in adult wild-type retinas (not shown in the English version). Having in mind the abundant expression of MPP4 in the OPL (Kantardzhieva et al., 2005, Herranz-Martin et al., 2012), a retinal layer where CRB3 and MPP4 colocalize (Herranz-Martin et al., 2012), we propose that these two proteins establish a complex in the OPL, which could intervene in the maintenance of the Ca^{2+} homeostasis and in the correct signal transmission, functions already associated to MPP4 (Yang et al., 2007).

PHOTORECEPTOR CELLS IN THE RETINA OF THE *Crb1^{rd8}* MOUSE

Photoreceptors are the most affected cell type in several retinal degenerations. In the present work we have analyzed the phenotype of these cells in the *Crb1^{rd8}* retina using different markers to recognize their morphological modifications and functions.

One of these markers is recoverin, which is present in both, cones and rods photoreceptor cells. This protein is located in the photoreceptors' inner segments (IS), as well as in their cell bodies in the outer nuclear layer (ONL) and in their synaptic terminals in the OPL, in both normal and mutant retinas (**Fig. 6A-D**). We found the first modifications in the morphology of photoreceptor cells in mutant retinas at P7, with some cell remodeling in the areas in degeneration (**Fig. 6A-B**). However, the most important changes are shown in *Crb1^{rd8}* retinas at P90. In contrast to the wild-type retinas, the labeling for recoverin is strongly reduced (**Fig. 6C-D**), and we detect different photoreceptor rosettes along the mutant retinas (**Fig. 6D**). Some of these rosettes are even located at the level of the inner nuclear layer (INL) (**Fig. 6D**). Finally, we quantified the amount of recoverin using WB quantification. As we expected, the relative levels for recoverin are significantly reduced in *Crb1^{rd8}* retinas at P90 (*p= 0.017, **Fig. 6E**), but we did not detect differences in the amount of protein at P7 (p>0.05, **Fig. 6E**). So, both, cones and rods photoreceptor cells loss their polarity as well as the levels of several key proteins for their function, as recoverin, showing the degeneration for this cell type in the *Crb1^{rd8}* mouse.

To analyze the modification of other proteins involved in the correct functioning of the photoreceptor cells, we studied the presence of some proteins present in the photoreceptor synaptic terminals, such as synaptophysin (SYP), which is also present at the level of inner plexiform layer (IPL) presynaptic terminals. At P7, we did not find important differences in the labeling for this protein among mutant and normal retinas (**Fig. 7A-B**), although some ectopic synapses can be found in the OPL in *Crb1^{rd8}* retinas (**Fig. 7B**). At P90, the differences are more evident. The staining for SYP is much less intense in mutant retinas in both retinal plexiform layers (**Fig. 7C-D**). In the photoreceptors' rosettes, the labeling for SYP almost disappears (**Fig. 7D**). By performing WB experiments, we compared the SYP relative levels in mutant and normal retinas at P7 and P90 (**Fig. 7E-F**). There are no statistical differences in the amount of SYP at P7 (p> 0.05, **Fig. 7E-F**), but in the adult stage the levels of the protein are higher in wild-type retinas, showing a significant difference (*p= 0.023, **Fig. 7E-F**). Therefore, although we did not find differences in the total function of the mutant retina by electroretinogram assays among normal and mutant retinas (not shown in the English version), some of the protein crucial for the correct functioning of the synapses are defective in the *Crb1^{rd8}* retinas.

MÜLLER CELLS IN THE RETINA OF THE *Crb1^{rd8}* MOUSE

Müller cells are the radial glial element of the retina (Kolb, 2000). After an injury or in degenerative processes, these cells become reactive (Ekstrom et al., 1988). By performing IF and WB experiments, we have analyzed the modifications of this cell type in the *Crb1^{rd8}* mutant retina. On the other hand, since the majority of CRB1 protein is present in the Müller cells (Gosens et al., 2008; van Rossum et al., 2006), we have performed primary cultures of this cell type to study in detail the behavior of the isolated *Crb1^{rd8}* Müller cells. This approach allowed us to better detect the differences among the mutant and the wild type Müller cells without the influence of the rest of the retinal cells. Since one of our future goals is to try to restore the wild type phenotype by using different transfection techniques, this knowledge becomes highly important for our study.

GFAP is an early indicator of reactive glia (Bringmann and Wiedemann, 2012; Ekstrom et al., 1988) and SOX2 is a transcription factor present in the nuclei of Müller cells, astrocytes and a subpopulation of amacrine cells (Fischer et al., 2010). In a wild-type retina at P7 or P90, GFAP is only present at the level of the ganglion cell layer (GCL) and in the nerve fiber layer (NFL), associated to Müller cells end-feet, as well as surrounding the labeling for SOX2 in astrocytes (**Fig. 8A, C**). The staining for GFAP at P7 in mutant retinas is located in the same cell populations in both layers, GCL and NFL, but the pattern of labeling is much more intense and broader in the *Crb1^{rd8}* retinas (**Fig. 8B**). Moreover, it is possible to find some Müller cell processes positive for GFAP at the level of the IPL (**Fig. 8B**). In the adult stage, these glia modifications are more evident, and Müller cells show a higher up-regulation of GFAP than at P7. The IF for this protein shows Müller cells processes positive for GFAP crossing the whole layers of the mutant retinas, and surrounding the rosettes of photoreceptor cells (**Fig. 8D**). The staining for SOX2 reveals some ectopic nuclei at the level of the inner nuclear layer (**Fig. 8D**). Double IF GFAP/SOX2 shows that some of the SOX2 ectopic nuclei in the INL are associated to GFAP positive processes, which it means that in the *Crb1^{rd8}* retinas, the Müller cell nuclei translocate to the areas in degeneration (**Fig. 8D**). To confirm the up-regulation for GFAP, we performed WB analysis. In both stages in study, the levels of GFAP are highly increased in mutant retinas in comparison to normal retinas (**p<0,01, **Fig. 8E**). So, when the OLM start to lose its integrity at P7, Müller cells also present reactivity, which it is enhanced during the later degeneration.

Müller cells are permeable to K⁺ ions through different types of inwardly rectifying potassium (KIR) channels, such as Kir 4.1, which are precisely located in their plasma membrane. One of the features of Müller cells reactivity is a low conductivity to K⁺, showing a Kir 4.1 downregulation (Bringmann and Wiedemann, 2012). At P7, the bulk of staining for these channels is in the scleral-most Müller cell processes, in both normal and mutant retinas

(**Fig. 9A-B**). The labeling seems to be similar in both phenotypes, except that at the level of the OPL in *Crb1^{rd8}* retinas the staining is much fainter (**Fig. 9B**). In wild-type adult retinas, Kir 4.1 channels are present mainly in the inner limiting membrane (ILM), as well as in both plexiform layers and in the outermost part of the retina (**Fig. 9C**). But in the *Crb1^{rd8}* retinas at P90, this only remains in the IPL and in the ILM, and completely disappears in the OPL, in the photoreceptors' rosettes and in the scleral regions (**Fig. 9D**). This decrease in the staining for Kir 4.1 in adult mutant retinas may lead to a lower conductivity for K⁺. It would be necessary patch clamp recordings in dissociated Müller cells to confirm this hypothesis.

To analyze the modifications that the Müller cells may experiment during the *Crb1^{rd8}* degeneration *in vitro*, we performed primary Müller cell cultures.

First, we characterized the nature of these cell cultures. For that, we carried out some immunofluorescence analysis with well-known markers for Müller cells, such as vimentin, GLAST or CD44. In primary cell cultures, 100% of Müller cells express these proteins, demonstrating the purity of the cell culture procedure (**Fig. 10A-C**). The labeling for vimentin stains the whole cytoplasm of Müller cell in culture (**Fig. 10A**). GLAST is also present in the cytoplasm, as well as in the cell filopodia (**Fig. 10B**), as CD44, which is present in these cell processes and in the cell periphery (**Fig. 10C**).

The MTT assay measures the cell viability based on cell survival and proliferation (van Meerloo et al., 2011). We used this test to analyze the cell viability in wild-type and mutant cells. At DIC15, Müller cells obtained from the *Crb1^{rd8}* mutant mouse showed a higher viability than normal cells (*p=0.015, **Fig. 10D**). As we mentioned earlier, the MTT assay is based on proliferation, so to confirm these results, we quantified the number of proliferative cells of each genotype. For that, cells were stained for the Ki67 protein (**Fig. 10E-F**), which highlights proliferative events (von Bohlen und Halbach, 2011). As we expected, *Crb1^{rd8}* Müller cells showed a higher proliferation rate compared to the wild-type cells, and that difference was significant (*p = 0.019, **Fig. 10E-G**). However, the viability of the Müller cells differed after the first cell passage. We observed a decrease in the viability of mutant Müller cells at DIC21, in contrast to the wild type Müller cells, that at this point showed a higher proliferation rate, being this a significant difference (*p=0.021, **Fig. 10H**). After the quantification of the number of Ki67 positive cells, we concluded that mutant Müller cells have a lower rate of proliferation rate than wild-type cells at DIC21, with a significant difference (*p= 0.042, **Fig. 10I-K**). We think that the differences in the rate of proliferation and viability are related with the role of CRB1 in the maintenance of the adhesion complexes (van de Pavert et al., 2004). Moreover, CRB proteins down-regulate the proliferative events in the "Hippo pathway", which it

functions as tumors suppressor promoting the exit of the cell cycle (Chen et al., 2010; Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012).

Finally, we have also compared the behavior of the Müller cells with the two different genotypes in culture by investigating their immunoreactivity against two typical Müller cell proteins: GFAP and SOX2. As we have already mentioned, GFAP is present in Müller cells under stress conditions. In the *in vitro* environment, GFAP is only present in some Müller cells. We did not detect important differences among mutant and wild type cells, but we noticed that at DIC15, in both genotypes, the number of GFAP positive cells seem to be higher in comparison to the DIC21 culture (**Fig. 11A-D**). To analyze the nature of GFAP positive cells, we performed double IF experiments with SOX2, a transcription factor with a role in glial proliferation and differentiation (Surzenko et al., 2013; Taranova et al., 2006). In all stages that we analyzed, SOX2 is localized in the nucleus of the reactive Müller cells expressing GFAP; while in the non-reactive cells, SOX2 is mainly cytoplasmic (**Fig. 11E-L**). It is known that SOX2 can be modified with different post-traductional modifications, among others, sumoylation or acetylation (Baltus et al., 2009; Tsuruzoe et al., 2006). Also, the presence of SOX2 in the cytoplasm corresponds to the acetylated protein and this isoform cannot bind to DNA (Baltus et al., 2009). The sumoylation modification also prevents the binding SOX2-DNA (Tsuruzoe et al., 2006). To study some of these modifications in the Müller cells in cultures, we performed SOX2 WB experiments (**Fig. 11M**). We detected bands in a molecular weight between 50 and 70 KDa (**Fig. 11M**), which it is the reported molecular weight for the sumoylated protein (Tsuruzoe et al., 2006). Therefore, in primary Müller cell cultures, SOX2 is mainly sumoylated and probably acetylated, which will then avoid that these cells proliferate at a high rate.

CELL TRANSFECTION

We have also investigated the competence of the Müller cells *in vitro* and in retinas *in vivo* to be transfected using a commercial transfection agent, named Chariot[®] (Active Motif[®]). The objective of this purpose is to use this method in the future to deliver native proteins into these cells, as an approach for future retinal therapies. In the present Doctoral Thesis, and as a first attempt, we have introduced the β -galactosidase enzyme into Müller cells by means of PEP-1, the amphipathic peptide that the Chariot transfection system employs as the carrier of the proteins to introduce into cells.

Both, mutant and wild-type Müller cells in culture are suitable to be transfected by this method (**Fig. 12A-B**). In panel **12A-B** we show that the majority of the cells in culture present the β -galactosidase activity in the cytoplasm. As a negative control, we performed the same transfection assay although without the β -galactosidase (**Fig. 12C**) or PEP-1 (**Fig. 12C'**) proteins.

By doing this, we could not detect any labeling for the activity of the enzyme (**Fig. 12C-C'**), showing the efficacy of the method.

We employed two different approaches to transfect retinas *in vivo*: intravitreal and subretinal injections in wild-type mice. Using intravitreal injections, the β -galactosidase activity was only detected at the level of the GCL (**Fig. 12D**). However, when we performed subretinal injections, this enzyme activity is observed across the whole thickness of the retina (**Fig. 12E-G**). Also, the staining for β -galactosidase is detected in the nearest areas to the point of the injection, at the level of the photoreceptor segments (**Fig. 12G**), and also in the innermost part of the retina (**Fig. 12E-F**). Taken together, it seems that the efficiency of the subretinal injection is higher than the intravitreal one. Up to date, the majority of the approaches to transfect retinas *in vivo* with this method had used intravitreal injections (Raz-Prag et al., 2010; Wang et al., 2009). Our work shows for the first time that subretinal injection could be a more efficient assay to deliver proteins into the retina. Moreover, it seems Müller cells are the cell type more suitable to be transfected in the retina by using this Chariot method (Wang et al., 2009).

Images

Figure 3: Retinal semithin sections and electron microscopy analysis at P7. **A-A'**, semithin sections of a wild-type retina show the lamination of the retina at P7. **B**, the OLM is a continuous structure in wild-type retinas (arrowheads in the insert of **B**). **C-C'**, semithin sections of a *Crb1^{rd8}* retina shows the lamination of the retina. We detect the onset of few rosettes of photoreceptors (arrows in **C** and **C'**). **D-E**, the OLM loses its integrity in some points (arrows in the insert of **D**), but the majority of the layer shows a normal morphology (arrowheads in insert of **D** and **E**). **F-H**, electron microscopy micrographs of the OLM at P7 in wild-type (**F**) and *Crb1^{rd8}* retinas (**G-H**). The adherens junctions (arrowheads in **F-H**) in the OLM are formed among photoreceptors (IS surrounded by red in **F-G**) and Müller cells (asterisks in **F-G**). The arrow in **G** shows a misplaced photoreceptor nucleus in the area where the adherens junctions are missing. **H**, a rosette of photoreceptor cells where all adherens junctions are still present. RPE, retinal pigmented epithelium; IOS, inner and outer segments of photoreceptors; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer. Scale bar: 100µm in A and C; 20µm in A' and C'; 10µm in B, D-E; 5 µm in inserts of B and D; 1000 nm in F-H.

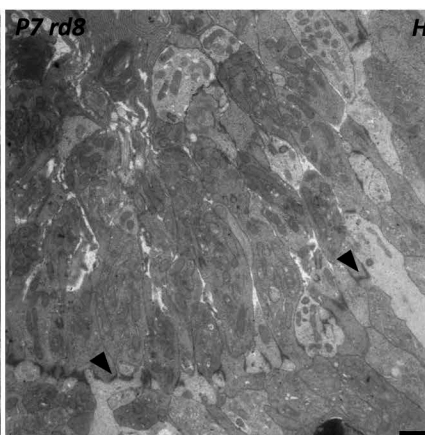
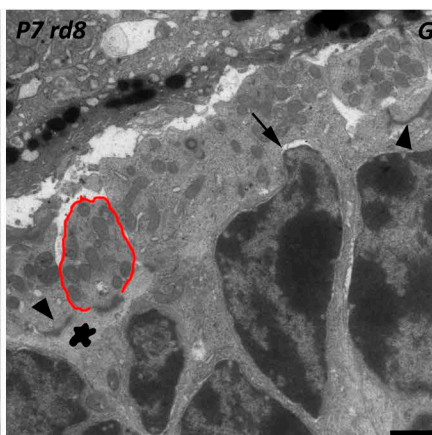
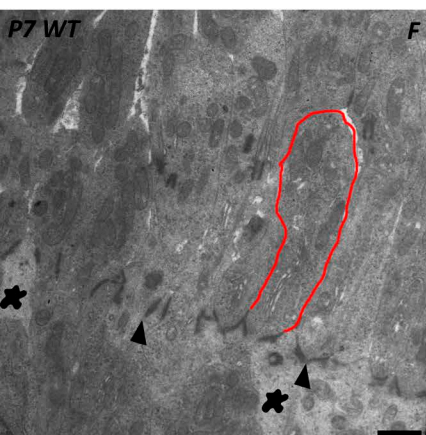
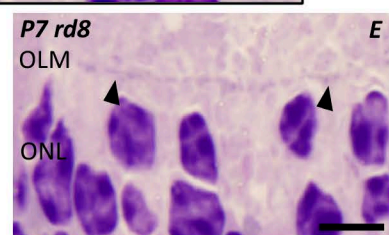
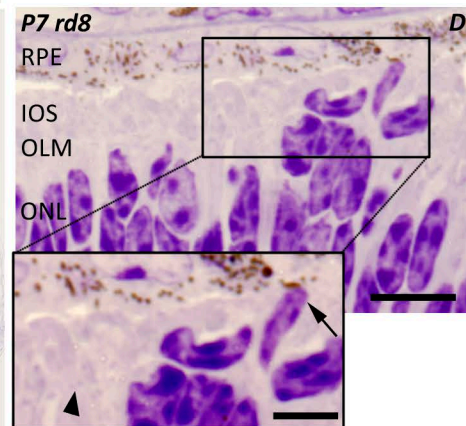
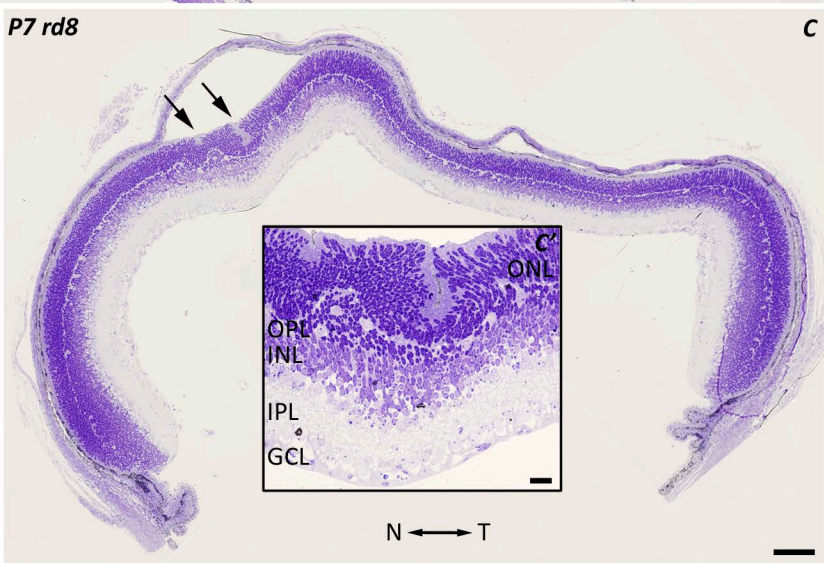
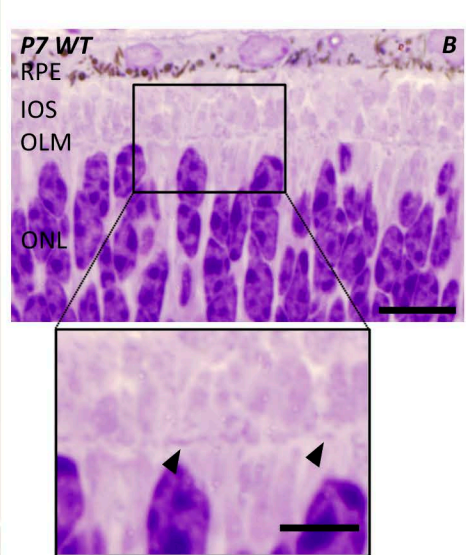
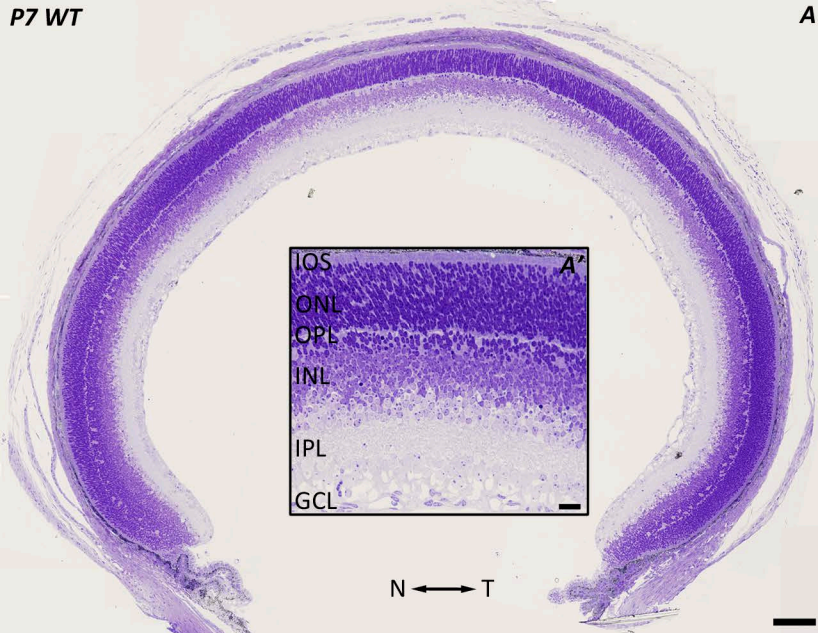


Figure 4: Presence of CRB1 in wild-type and mutant retinas in adult stage. **A-B**, the custom made α -CRB1 antibody detects CRB1 (green) in the OLM of wild type (**A**) and *Crb1^{rd8}* retinas (**B**). The staining for CRB1 shows several gaps in different areas of the mutant retinas (arrows in **B**). **C-D**, peptide competitive assays for CRB1 where all the labeling disappears. **E-F**, double immunofluorescence for CRB1 (green) and β -catenin (red). In both genotypes, CRB1 is present at the SAR, apically to the labeling for β -catenin (inserts in **E-F**). CRB1 and β -catenin disappear in the same points in mutant retinas (arrows in **F**). Nuclear marker: TO-PRO-3 (blue). SAR, subapical region of the OLM; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μ m; 5 μ m in inserts of E-F.

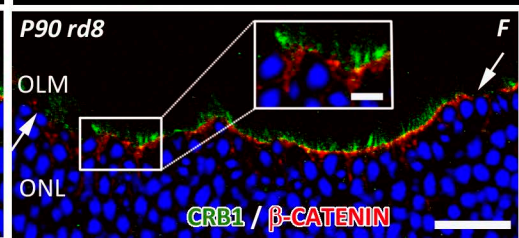
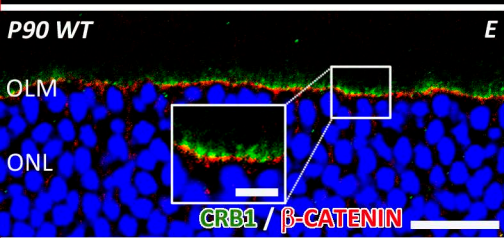
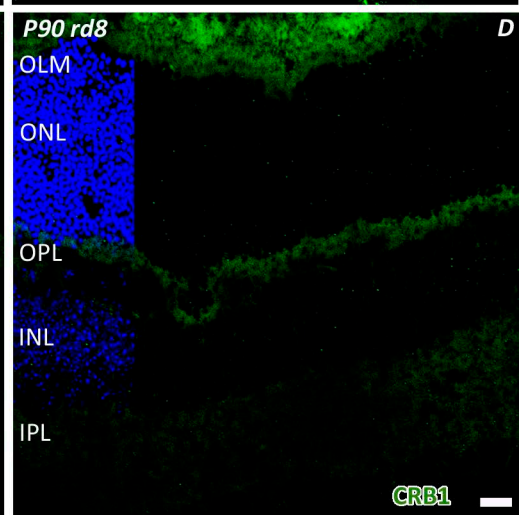
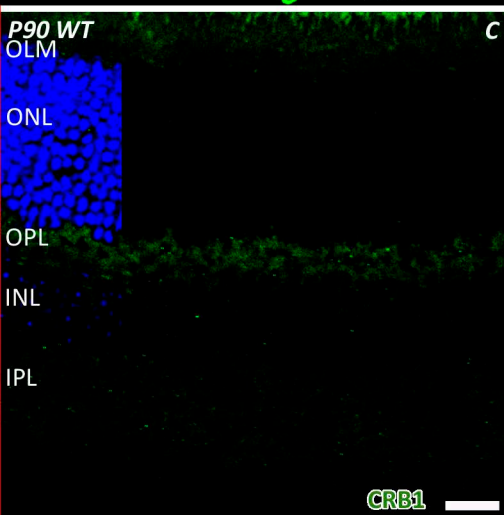
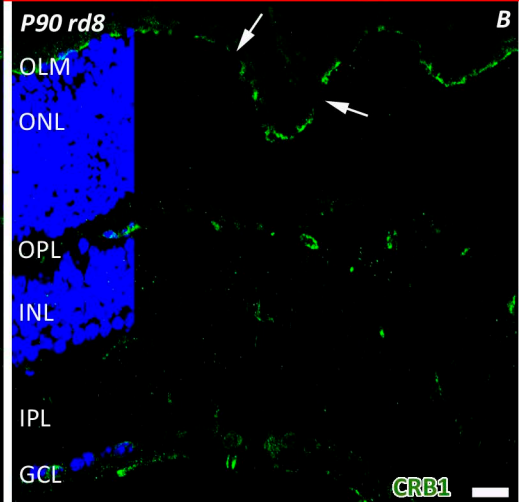
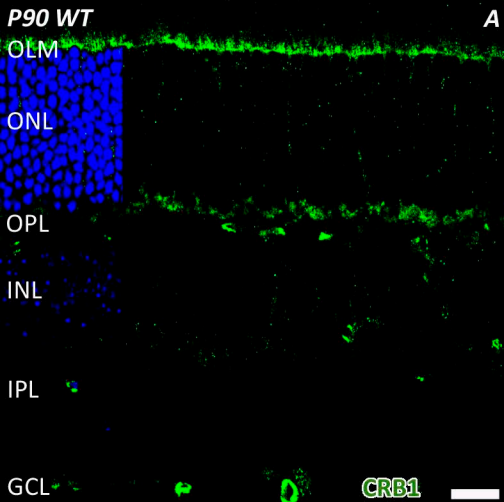


Figure 5: Location and levels of PALS1 and MPP4 in wild-type and *Crb1*^{rd8} retinas at P90. A-B, PALS1 is present at the SAR of the OLM in wild type (A) and mutant retinas (B). The labeling for PALS1 disappears in some regions of the SAR (arrows in B). C, WB for PALS1 showing a band at 77 kDa in both genotypes. GAPDH was used as loading control. D, WB quantification for PALS1 (n=6). The results are expressed as means \pm SEM. The levels of PALS1 in mutant retinas are significantly lower than in normal retinas (* $p < 0.05$, Student's *t*-test). E, in the adult wild-type retina, MPP4 is located in the OPL and in the OLM (inserts in E), as well as in the connecting cilia area (arrowheads in E). F, in mutant retinas, all the labeling disappears, only remaining the labeling at the level of the OPL, although it is reduced compared with the control (arrows in F). G, WB for MPP4, showing a band at 72 kDa in wild-type and mutant retinas. GAPDH was used as loading control. H, WB quantification for MPP4 (n=6). The results are expressed as means \pm SEM. The relative amount of MPP4 in mutant retinas is lower than in wild type retinas, with a highly significant difference (* $p < 0.01$, Student's *t*-test). Nuclear marker: TO-PRO-3 (blue) in A-B and E-F. OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer. Scale bar: 20 μ m.

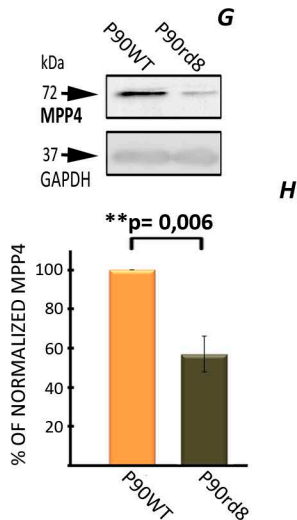
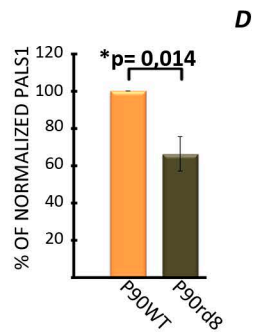
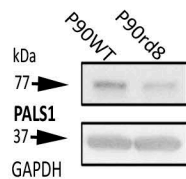
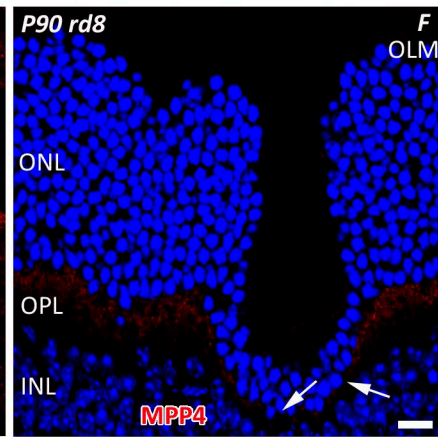
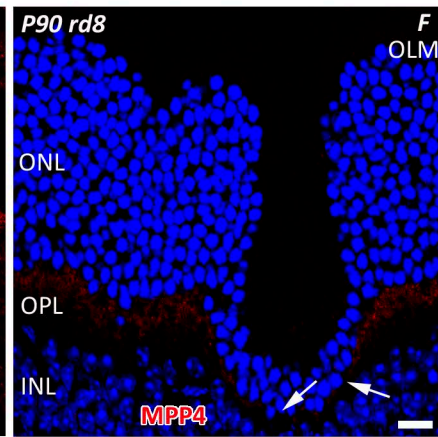
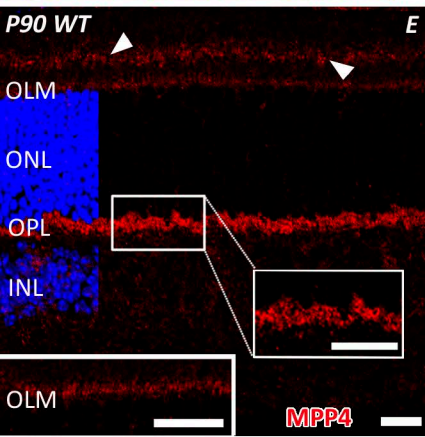
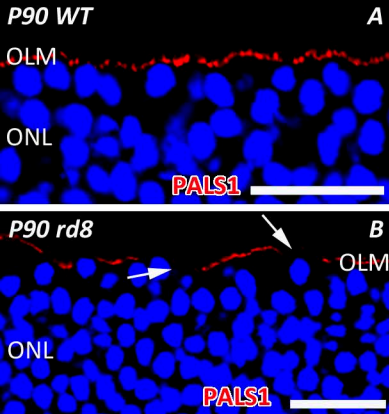


Figure 6: Immunofluorescence and WB analysis for recoverin (red) in wild-type and *Crb1^{rd8}* retinas. **A-B**, at P7, recoverin is expressed in developing photoreceptor cells in both wild-type (**A**) and mutant retinas (**B**). In comparison to normal retinas, the nuclei of photoreceptor cells in *Crb1^{rd8}* retinas lose their regular arrangement (arrowheads in **A-B**), as well as the organization of the IS and the presynaptic terminals in the most affected areas (arrows in **A-B**). **C-D**, at P90, recoverin is present in photoreceptors' cell bodies, IS and presynaptic terminals in wild type (insert in **C**) and mutant retinas (**D**). In the disorganized areas, there are rosettes of photoreceptors at different levels in the mutant retinas (arrowheads and insert in **D**). **E**, WB for recoverin, showing a band at 23 kDa in mutant and wild type retinas at P7 and P90. GAPDH was used as loading control. **F**, WB quantification for recoverin (n=7). The results are expressed as means \pm SEM. There are no statistical differences in the amount of recoverin among wild type and mutant retinas at P7 ($p > 0.05$, Student's *t*-test); but at P90 the levels of recoverin in wild-type retinas are higher than in *Crb1^{rd8}* retinas, showing a significant difference ($*p < 0.05$, Student's *t*-test). Nuclear marker: DAPI (blue) in A-D. IS, photoreceptor inner segments; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μ m.

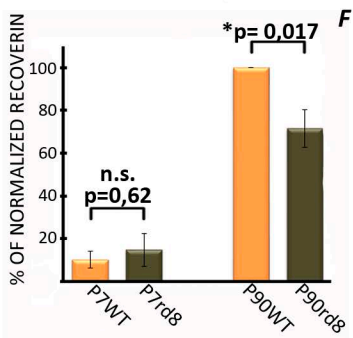
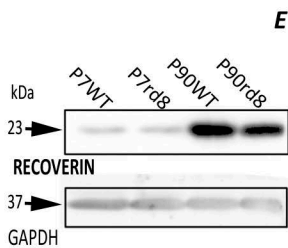
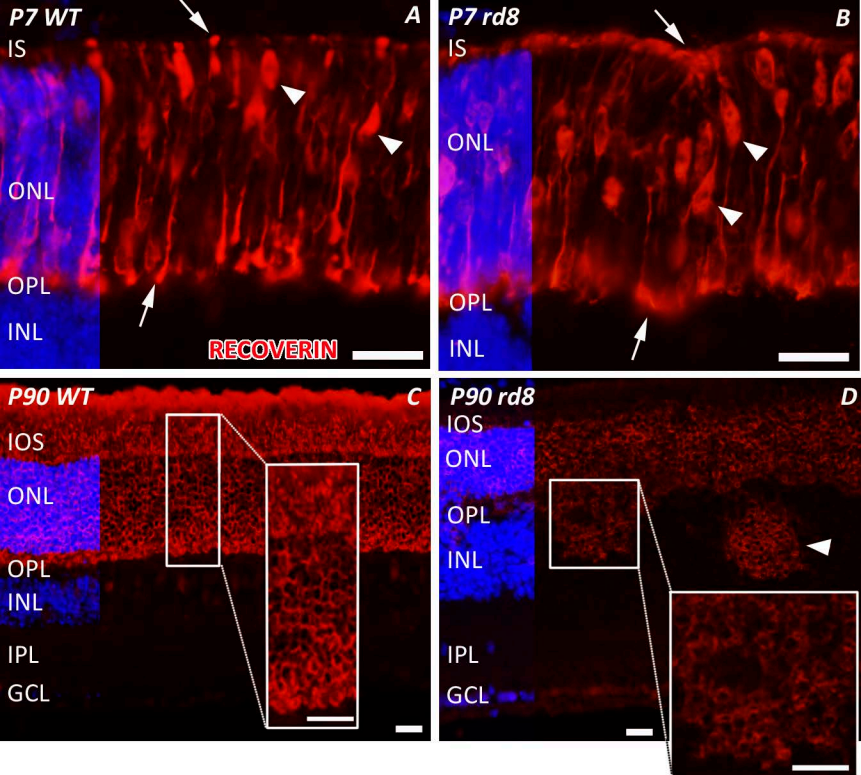


Figure 7: Synaptophysin (SYP, green) in wild-type and *Crb1^{rd8}* retinas. A-D, SYP is present in both retinal plexiform layers at P7 (A-B) and at P90 (C-D) in wild type (A, C) and mutant retinas (B, D). The arrow in B shows the OPL disruption in *Crb1^{rd8}* retinas at P7. D, in comparison to the P90 retina wild-type (C), the staining for SYP is reduced in mutant retinas, and the labeling almost disappears in the rosettes of photoreceptors (insert in D). E, WB analysis for SYP showing a band at 38 kDa in both genotypes and ages. β -actin was used as loading control. F, WB quantification for SYP (n=4). The results are expressed as means \pm SEM. The SYP relative levels at P7 are similar in *Crb1^{rd8}* and normal retinas. In the adult stage, the amount of SYP in mutant retinas is lower than in wild-type retinas, with a significant difference (*p<0.05, Student's *t*-test). Nuclear marker: DAPI (blue) in A-D. OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μ m.

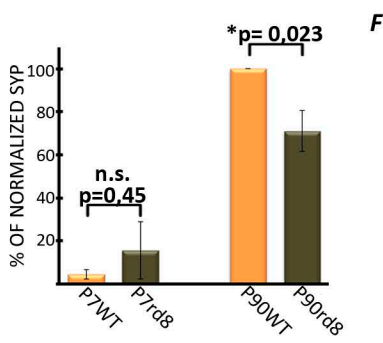
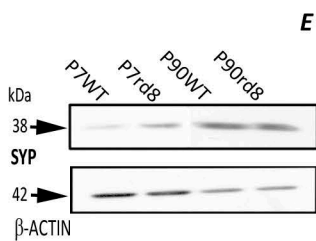
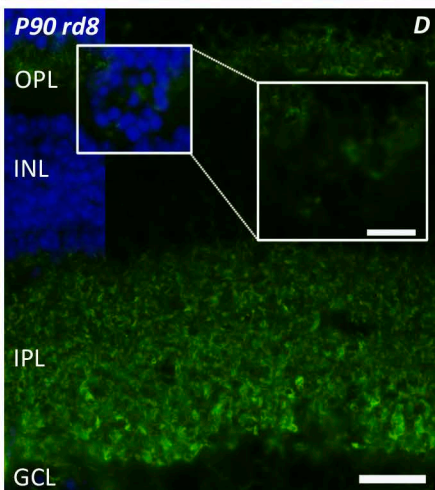
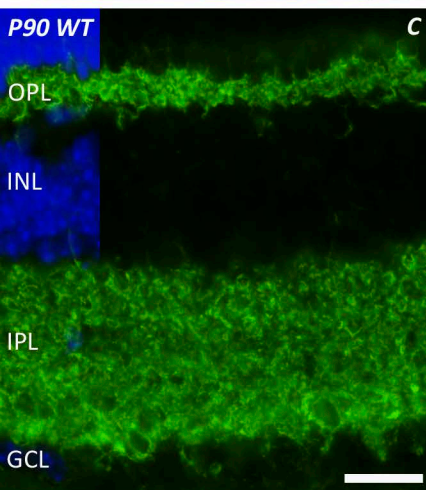
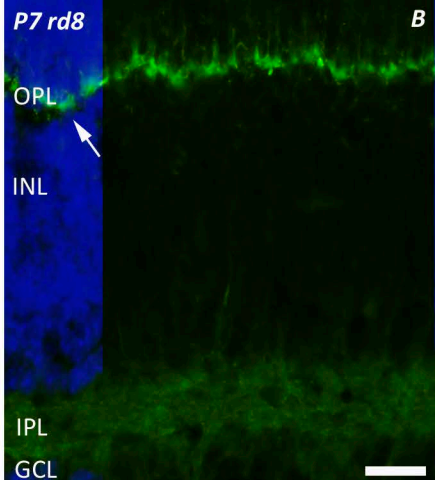
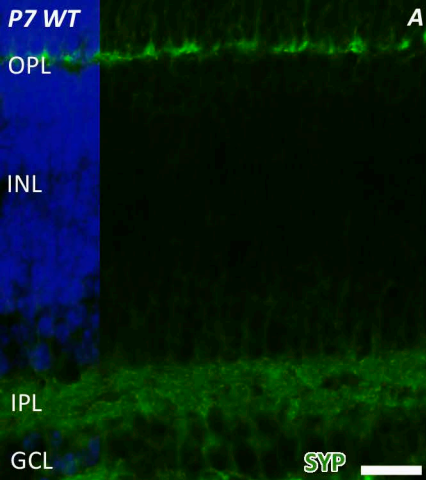
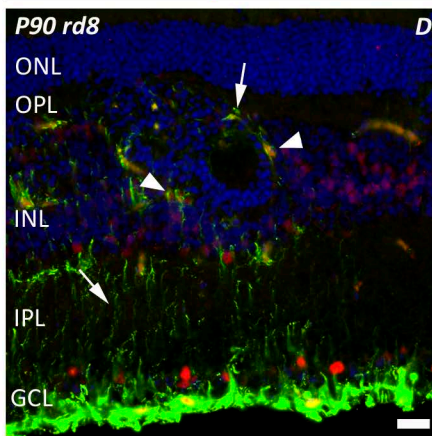
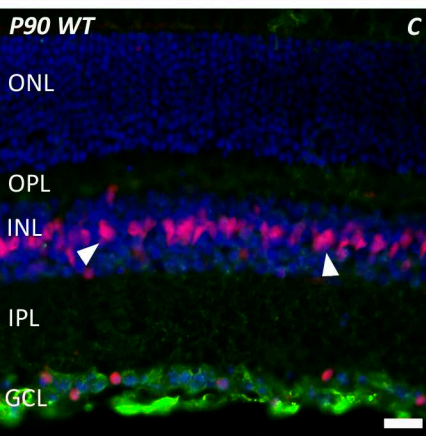
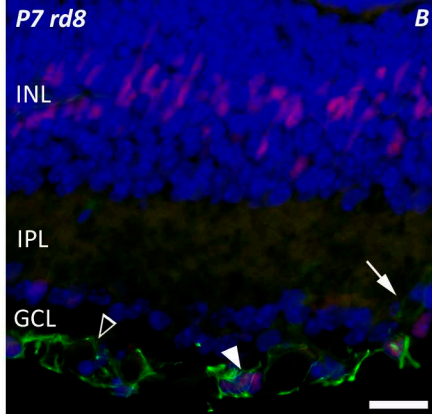
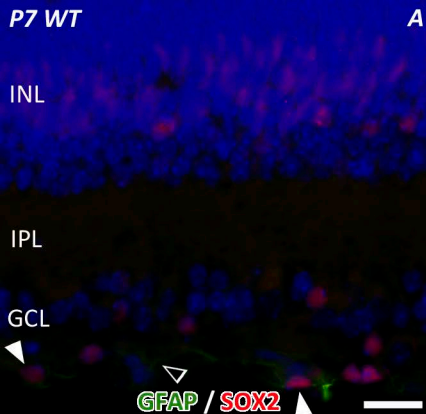


Figure 8: GFAP and SOX2 in wild-type and *Crb1^{rd8}* retinas. A-D, immunolabeling for GFAP (green) and SOX (red) at P7 (A-B) and P90 (C-D) in wild type (A, C) and mutant retinas (B, D). SOX2 is located in the nuclei of the astrocytes, Müller cells and a subpopulation of amacrine cells (A-D). A-B, in comparison with wild-type retinas, the labeling for GFAP is more intense in the innermost part of the mutant retinas at P7. In the GCL of mutant and wild type retinas, astrocytes express SOX2 and GFAP (arrowheads in A-B), and there are GFAP+ processes not related with SOX2+ nuclei (empty arrowheads in A-B). In the most affected areas of the mutant retina, some GFAP+ processes reach the IPL (arrows in B). C, at P90, the staining for GFAP in wild-type retinas is only present at the level of the GCL. The arrowheads in C show the arrangement of SOX2+ nuclei in the INL. D, in adult *Crb1^{rd8}* retinas, the GFAP+ processes cross the thickness of the retina and surround the rosettes of photoreceptors (arrows in D). There are some ectopic SOX2+ nuclei at the level of the INL associated with GFAP+ processes (arrowheads in D). E, WB for GFAP showing the increase of protein level at 49 kDa in P7 wild type lysates compared to P90 mutant lysates. GAPDH was used as loading control. F, WB quantification for GFAP (n=7). The results are expressed as means \pm SEM. The relative amount for GFAP in mutant retinas is higher than in wild type retinas in both ages, showing a highly significant difference ($p < 0.01$, Student's *t*-test). Nuclear marker: DAPI (blue) in A-D. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μ m.**



E

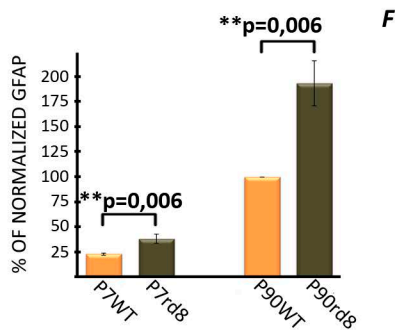
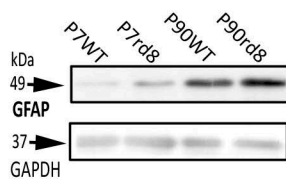


Figure 9: Presence of Kir 4.1 (green) in wild-type and *Crb1^{rd8}* retinas. **A-B**, at P7, the majority of the labeling for Kir 4.1 is located in the most scleral Müller cell processes in wild type (insert in **A**) and mutant retinas (insert in **B**). The arrow in **B** shows a region in the *Crb1^{rd8}* OPL where the staining for the channel disappears. **C**, location of Kir 4.1 in the adult wild-type retina. **D**, the labeling for 4.1 is reduced in *Crb1^{rd8}* at P90, and it is restricted to the inner parts of the retina. The insert in **D** shows a rosette of photoreceptor cells with a faint staining for Kir 4.1 (empty arrowheads in insert in **D**). Nuclear marker: DAPI (blue). ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μ m.

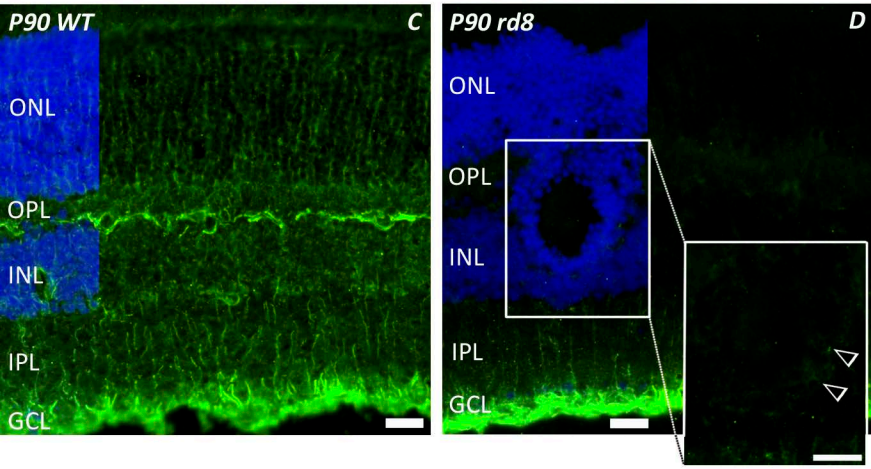
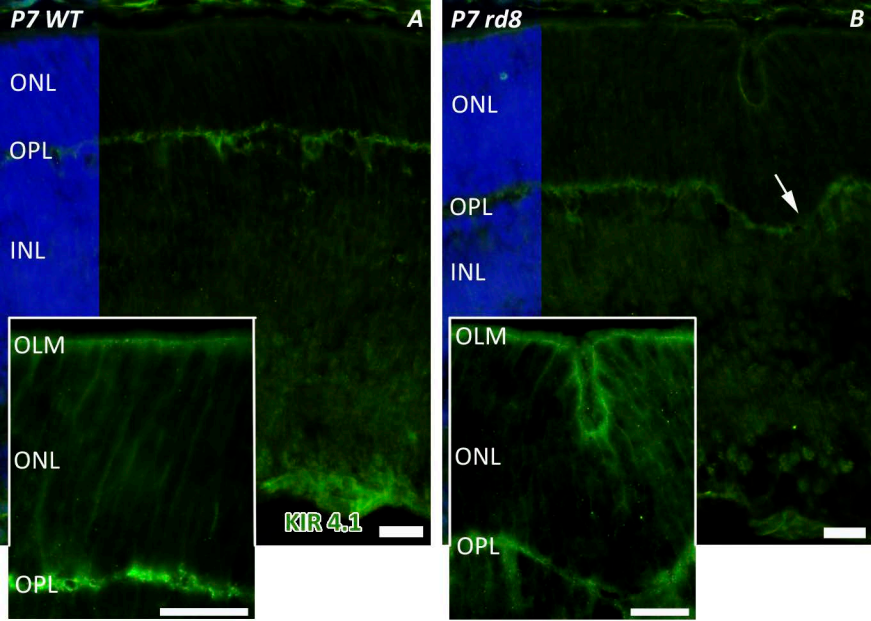


Figure 10: Characterization and analysis of the cell viability and proliferation in Müller cells in culture. A-C, Müller cells in culture express vimentin (A), GLAST (B) and CD44 (C). The labeling for vimentin (arrowhead in A) or GLAST (arrowhead in B) is more intense near the nuclei. B, GLAST is also present in the cell filopodia (empty arrowheads in B). CD44 is located in the plasma membrane (arrowhead in C), in cytoplasmic aggregates (insert in C) and in cell processes (empty arrowheads in C). D, MTT assay at DIC15 (D) and DIC21 (H) in mutant and wild type Müller cells in culture (n≥6). The results are expressed as means ± SEM. At DIC15 (D) the viability of the *Crb1^{rd8}* cells is higher than in wild-type cells, with a significant difference (*p<0.05, Student's *t*-test). At DIC21 (H), the viability in wild type cells is higher than in mutant ones (*p<0.05, Student's *t*-test). E-F and I-J, the images show the labeling for Ki67 (red) at DIC15 (E-F) and at DIC21 (I-J) in wild-type (E, I) and *Crb1^{rd8}* Müller cells (F, J). G and K, quantification of Ki67+ cells at DIC15 (G) and at DIC21 (K). At DIC15, the number of proliferative events in mutant cells is higher than in wild type ones (G); but at DIC21, wild-type cells present more proliferation than *Crb1^{rd8}* cells. In both cases the differences are significant (*p<0.05, Student's *t*-test). Nuclear marker: DAPI (blue) in A-C, E-F and I-J. Scale bar: 20µm.

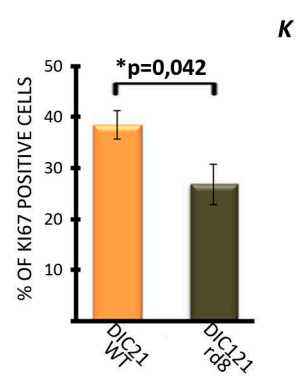
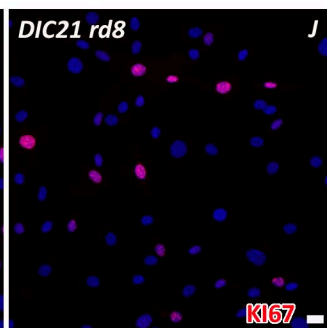
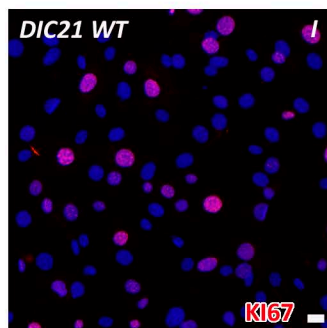
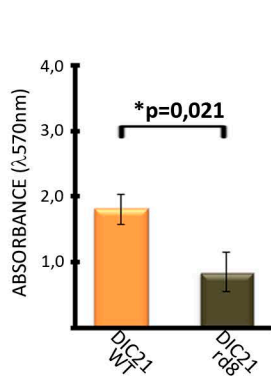
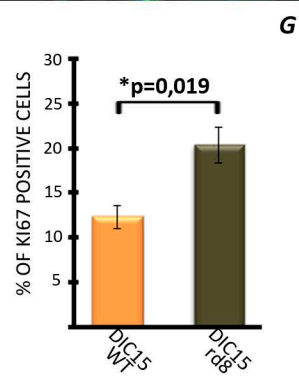
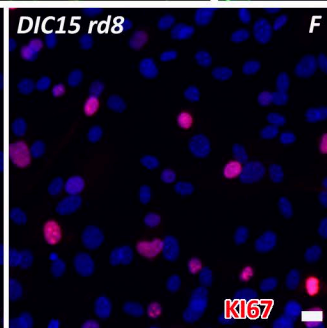
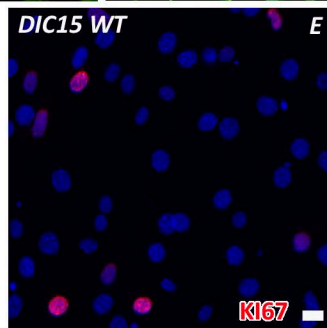
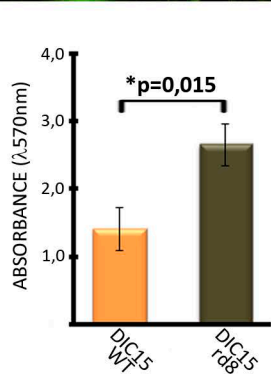
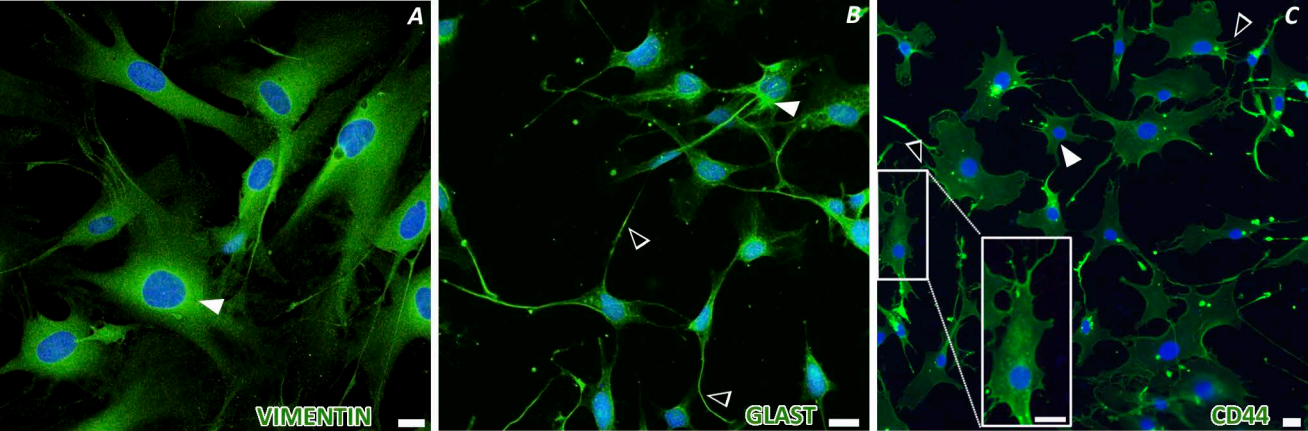


Figure 11: GFAP and SOX2 in wild-type and *Crb1*^{rd8} Müller cells in culture. **A-D**, the GFAP protein (green) is only present in some Müller cells in culture at DIC15 (**A-B**) and at DIC21 (**C-D**) in control (**A, C**) and mutant cells (**B, D**). **E-L**, double immunofluorescence for GFAP (green) and SOX2 (red). SOX2 is present in all Müller cells in culture (**E-L**) and it is mainly located in the nuclei of GFAP+ cells (arrowheads in **E-L**) and in the cytoplasm of GFAP- cells (arrows in **E-L**). **M**, the WB for SOX2 shows a band around 50 and 75 kDa corresponding to the sumoilated protein with a similar intensity in all stages analyzed (arrow in **M**), and some extra bands with a molecular weight under 50 kDa. GAPDH was used as loading control. Nuclear marker: DAPI (blue) in **A-L**. Scale bar: 20µm.

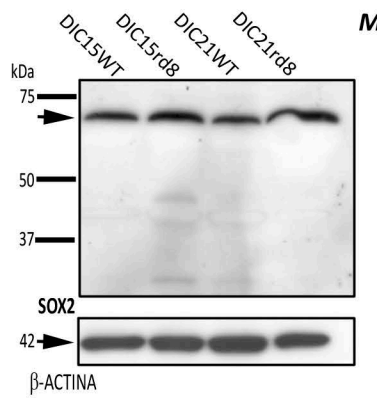
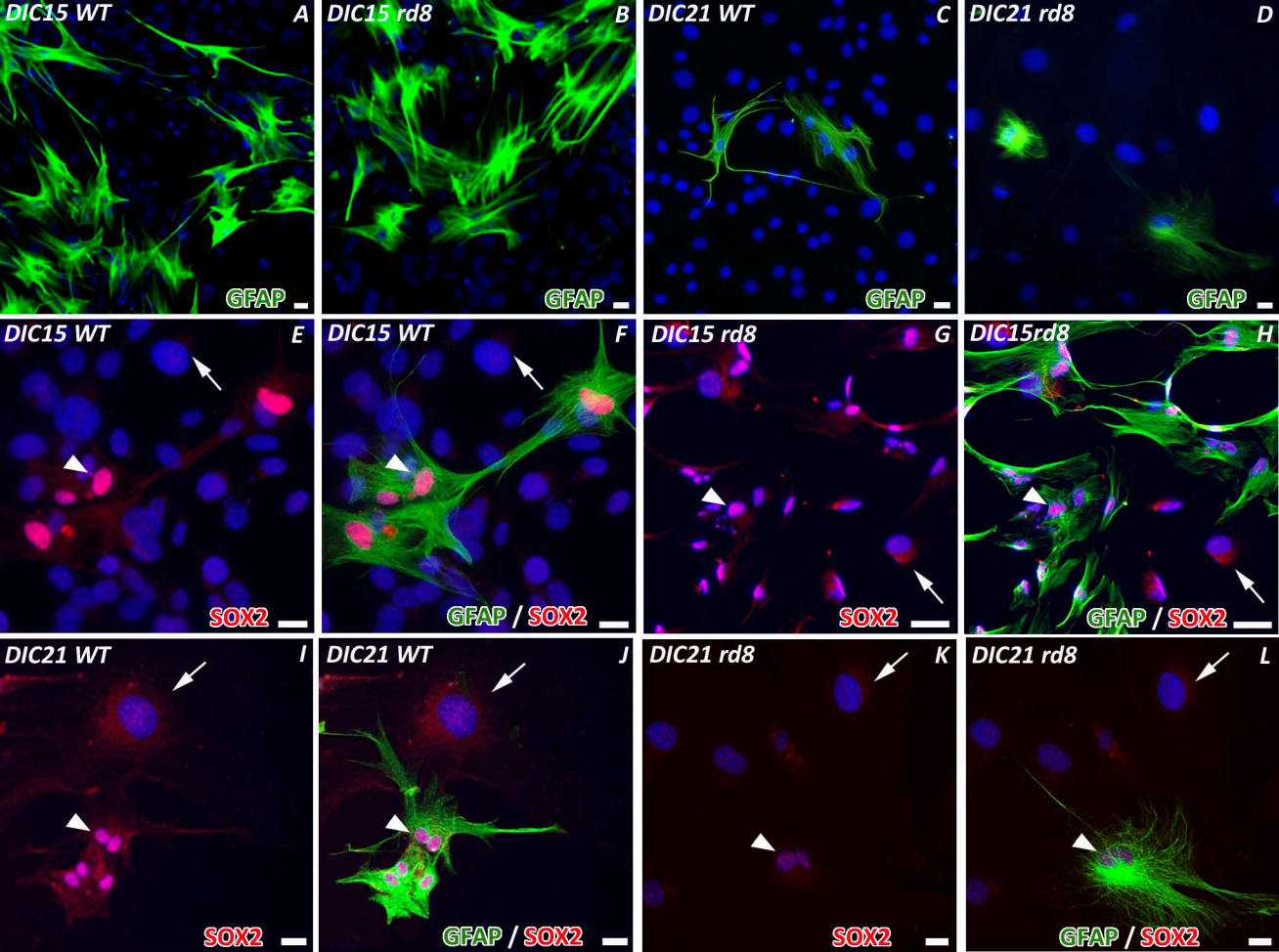
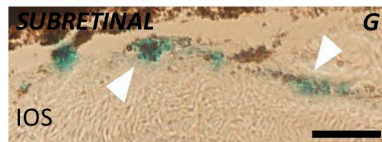
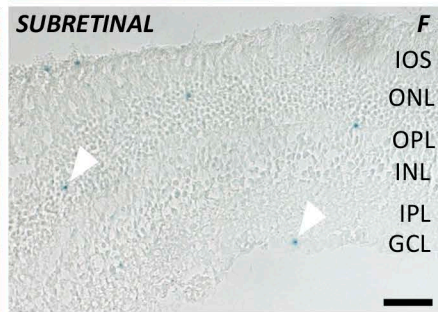
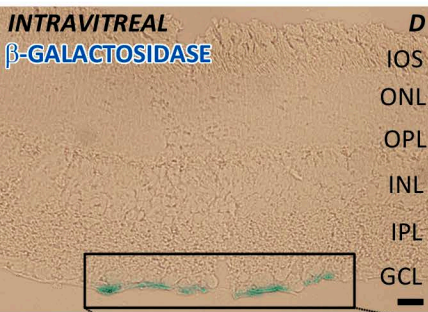
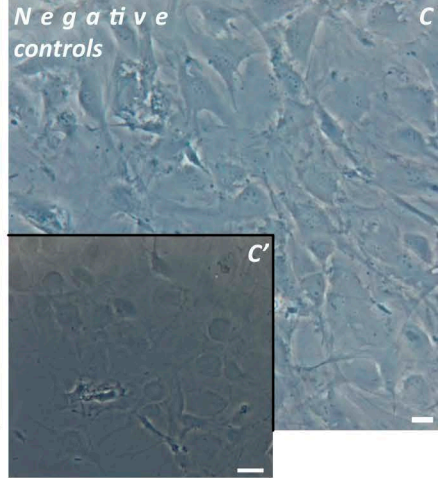
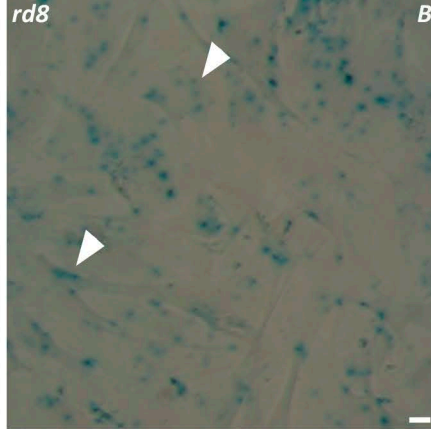
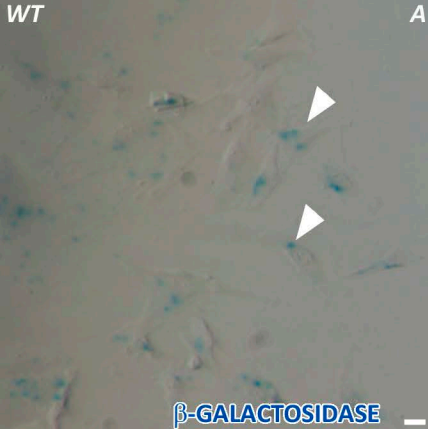


Figure 12: β -galactosidase histochemistry (blue) in cells transfected *in vitro* and *in vivo* with the Chariot® method. A-B, Labeling of the β -galactosidase activity in wild-type (A) and *Crb1^{td8}* Müller cells in culture (B). C-C', negative controls without β -galactosidase (C) or PEP-1 (C'). D-G, histochemistry analysis in wild-type retinal sections after the delivery of the Pep-1- β -galactosidase complex by intravitreal (insert in D) or subretinal injections (E-G). The arrowheads in E-G show the β -galactosidase enzyme activity at different levels in the retina. IOS, inner and outer segments of photoreceptors; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. S. Scale bar: 20 μ m in A-G; 50 μ m in C'.



REFERENCES

- Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Aguirre, G.K., Huang, W.C., Mullins, C.L., Roman, A.J., Sumaroka, A., Olivares, M.B., Tsai, F.F., Schwartz, S.B., *et al.* (2011). Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 6898-6910.
- Baltus, G.A., Kowalski, M.P., Zhai, H., Tutter, A.V., Quinn, D., Wall, D., and Kadam, S. (2009). Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 2175-2184.
- Barber, A.C., Hippert, C., Duran, Y., West, E.L., Bainbridge, J.W., Warre-Cornish, K., Luhmann, U.F., Lakowski, J., Sowden, J.C., Ali, R.R., *et al.* (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 354-359.
- Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* 14, 2149-2169.
- Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2012). Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227, 1-19.
- Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15810-15815.
- den Hollander, A.I., Ghiani, M., de Kok, Y.J., Wijnholds, J., Ballabio, A., Cremers, F.P., and Broccoli, V. (2002). Isolation of Crb1, a mouse homologue of *Drosophila* crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mech Dev* 110, 203-207.
- den Hollander, A.I., Heckenlively, J.R., van den Born, L.I., de Kok, Y.J., van der Velde-Visser, S.D., Kellner, U., Jurklies, B., van Schooneveld, M.J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., *et al.* (2001). Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* 69, 198-203.
- den Hollander, A.I., ten Brink, J.B., de Kok, Y.J., van Soest, S., van den Born, L.I., van Driel, M.A., van de Pol, D.J., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Kellner, U., *et al.* (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23, 217-221.
- Ekstrom, P., Sanyal, S., Narfstrom, K., Chader, G.J., and van Veen, T. (1988). Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1363-1371.
- Fischer, A.J., Zelinka, C., and Scott, M.A. (2010). Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PLoS One* 5, e10774.
- Fu, X., Sun, H., Klein, W.H., and Mu, X. (2006). Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* 299, 424-437.
- Gosens, I., den Hollander, A.I., Cremers, F.P., and Roepman, R. (2008). Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 86, 713-726.
- Herranz-Martin, S., Jimeno, D., Paniagua, A.E., Velasco, A., Lara, J.M., Aijon, J., and Lillo, C. (2012). Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina. *PLoS One* 7, e50511.
- Hicks, D., and Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res* 51, 119-129.
- Kantardzhieva, A., Gosens, I., Alexeeva, S., Punte, I.M., Versteeg, I., Krieger, E., Neefjes-Mol, C.A., den Hollander, A.I., Letteboer, S.J., Klooster, J., *et al.* (2005). MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2192-2201.
- Kolb, H., Fernández, E., Nelson, R. (2000). Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Lakowski, J., Baron, M., Bainbridge, J., Barber, A.C., Pearson, R.A., Ali, R.R., and Sowden, J.C. (2010). Cone and rod photoreceptor transplantation in models of the childhood retinopathy

- Leber congenital amaurosis using flow-sorted Crx-positive donor cells. *Hum Mol Genet* 19, 4545-4559.
- Lakowski, J., Han, Y.T., Pearson, R.A., Gonzalez-Cordero, A., West, E.L., Gualdoni, S., Barber, A.C., Hubank, M., Ali, R.R., and Sowden, J.C. (2011). Effective transplantation of photoreceptor precursor cells selected via cell surface antigen expression. *Stem Cells* 29, 1391-1404.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 23-38.
- Mehalow, A.K., Kameya, S., Smith, R.S., Hawes, N.L., Denegre, J.M., Young, J.A., Bechtold, L., Haider, N.B., Tepass, U., Heckenlively, J.R., *et al.* (2003). CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12, 2179-2189.
- Park, B., Alves, C.H., Lundvig, D.M., Tanimoto, N., Beck, S.C., Huber, G., Richard, F., Klooster, J., Andlauer, T.F., Swindell, E.C., *et al.* (2011). PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci* 31, 17230-17241.
- Pearson, R.A., Barber, A.C., West, E.L., MacLaren, R.E., Duran, Y., Bainbridge, J.W., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2010). Targeted disruption of outer limiting membrane junctional proteins (Crb1 and ZO-1) increases integration of transplanted photoreceptor precursors into the adult wild-type and degenerating retina. *Cell Transplant* 19, 487-503.
- Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C.J., Ready, D.F., and Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 416, 143-149.
- Raz-Prag, D., Grimes, W.N., Fariss, R.N., Vijayarathy, C., Campos, M.M., Bush, R.A., Diamond, J.S., and Sieving, P.A. (2010). Probing potassium channel function in vivo by intracellular delivery of antibodies in a rat model of retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12710-12715.
- Richard, M., Roepman, R., Aartsen, W.M., van Rossum, A.G., den Hollander, A.I., Knust, E., Wijnholds, J., and Cremers, F.P. (2006). Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R235-243.
- Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157, 161-172.
- Surzenko, N., Crawl, T., Bachleda, A., Langer, L., and Pevny, L. (2013). SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development*.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* 20, 1187-1202.
- Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., *et al.* (2006). Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 920-926.
- van de Pavert, S.A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M.W., Rashbass, P., *et al.* (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117, 4169-4177.
- van de Pavert, S.A., Meuleman, J., Malysheva, A., Aartsen, W.M., Versteeg, I., Tonagel, F., Kamphuis, W., McCabe, C.J., Seeliger, M.W., and Wijnholds, J. (2007a). A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1. *J Neurosci* 27, 564-573.
- van de Pavert, S.A., Sanz, A.S., Aartsen, W.M., Vos, R.M., Versteeg, I., Beck, S.C., Klooster, J., Seeliger, M.W., and Wijnholds, J. (2007b). Crb1 is a determinant of retinal apical Muller glia cell features. *Glia* 55, 1486-1497.

- van Meerloo, J., Kaspers, G.J., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731, 237-245.
- van Rossum, A.G., Aartsen, W.M., Meuleman, J., Klooster, J., Malysheva, A., Versteeg, I., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., and Wijnholds, J. (2006). Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet* 15, 2659-2672.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 1-19.
- Wang, M.H., Frishman, L.J., and Otteson, D.C. (2009). Intracellular delivery of proteins into mouse Muller glia cells in vitro and in vivo using Pep-1 transfection reagent. *J Neurosci Methods* 177, 403-419.
- Yang, J., Pawlyk, B., Wen, X.H., Adamian, M., Soloviev, M., Michaud, N., Zhao, Y., Sandberg, M.A., Makino, C.L., and Li, T. (2007). Mpp4 is required for proper localization of plasma membrane calcium ATPases and maintenance of calcium homeostasis at the rod photoreceptor synaptic terminals. *Hum Mol Genet* 16, 1017-1029.

Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina

Saúl Herranz-Martín¹, David Jimeno², Antonio E. Paniagua¹, Almudena Velasco¹, Juan M. Lara¹, José Aijón¹, Concepción Lillo^{1*}

1 Institute of Neurosciences of Castilla y León (INCYL), Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Cell Biology and Pathology, University of Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (CSIC-USAL), University of Salamanca, Campus Unamuno, Salamanca, Spain

Abstract

CRB3 (Crumbs homologue 3), a member of the CRB protein family (homologous to the *Drosophila* Crumbs), is expressed in different epithelium-derived cell types in mammals, where it seems to be involved in regulating the establishment and stability of tight junctions and in ciliogenesis. This protein has been also detected in the retina, but little is known about its localization and function in this tissue. Our goal here was to perform an in-depth study of the presence of CRB3 protein in the mouse retina and to analyze its expression during photoreceptor ciliogenesis and the establishment of the plexiform retinal layers. Double immunofluorescence experiments for CRB3 and well-known markers for the different retinal cell types were performed to study the localization of the CRB3 protein. According to our results, CRB3 is present from postnatal day 0 (P0) until adulthood in the mouse retina. It is localized in the inner segments (IS) of photoreceptor cells, especially concentrated in the area where the connecting cilium is located, in their synaptic terminals in the outer plexiform layer (OPL), and in sub-populations of amacrine and bipolar cells in the inner plexiform layer (IPL).

Citation: Herranz-Martín S, Jimeno D, Paniagua AE, Velasco A, Lara JM, et al. (2012) Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina. PLoS ONE 7(11): e50511. doi:10.1371/journal.pone.0050511

Editor: Laura Frishman, University of Houston, United States of America

Received: July 4, 2012; **Accepted:** October 22, 2012; **Published:** November 30, 2012

Copyright: © 2012 Herranz-Martín et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-04490/BFI), Grupos de excelencia de la Junta de Castilla y León (GR183), Fundación Alicia Koplowitz, Fundación de lucha contra la ceguera (FUNDALUCE) and Fundación Eugenio Rodríguez Pascual. S.H.M received support from the Junta de Castilla y León PhD Program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: conlillo@usal.es

Introduction

Mutations in the *CRB1* gene (Crumbs homologue 1) have been linked to several human retinal dystrophies, including type 12 retinitis pigmentosa (RP12) and Leber congenital amaurosis (LCA) [1,2]. RP12 is a specific form of retinitis pigmentosa that causes night blindness and loss of visual field in the first ten years of the duration of the disease [1,3]. LCA is a rare inherited eye disease that appears at birth or early in life, affecting sight and showing other related clinical signs within the first few years of life [4].

Crumbs is a transmembrane protein that was initially identified in *Drosophila*. In this organism, Crumbs plays a crucial role in the establishment and maintenance of cell polarity during the development of several types of epithelial cells [5]. Also, in the *Drosophila* photosensitive organ, the rhabdomere, Crumbs controls the integrity of adherens junctions [6]. To date, three CRB proteins have been identified in mammals: CRB1, CRB2 and CRB3 [7]. In the mouse, CRB1 is only present in the retina and brain [8]; CRB2 mRNA has been found in the retina, RPE/choroid, brain and in other tissues at very low levels [9]; whereas CRB3 is expressed in different epithelium-derived cell types, including the retina [10,11,12].

The three CRB proteins share similar short intracellular domains whose role is to organize a highly structured protein scaffold, involving members of the MAGUK family. CRB1 and

CRB2 have different and very long extracellular domains, whereas the one in CRB3 is practically non-existent [7]. The localization of the CRB1 protein in the retina of mammals has been extensively studied and is known to be located in the subapical region (SAR) of the outer limiting membrane (OLM) [13,14], playing an important role in the maintenance of adherens junctions in the OLM, in the polarization of photoreceptor cells, and in the prevention of retinal disorganization after damage due to exposure to excessive light [7,14,15]. However, the roles of CRB2 and CRB3 in the retina have received little attention, and it remains unknown whether there is any retinal disease related to mutations in the *CRB2* and/or *CRB3* genes, although it does seem that mutations in the CRB2 protein would not be responsible for any of these retinal dystrophies [9]. Additionally, the localization of CRB2 and CRB3 proteins in the retina remains unclear. Regarding CRB2, some studies have demonstrated its mRNA expression in different layers of the retina [9], but the protein has been only localized in the OLM, in both Müller and photoreceptor cells [14,16].

It has been reported the presence of CRB3 in the OLM as well, in both photoreceptors and in Müller cells [14,16]. Other authors have suggested that this protein could also be present in the OPL of the retina [17], although little is known about the cells where this protein might be expressed. As mentioned above, CRB3 is also expressed in different epithelium-derived cell types, where

some investigators have reported that CRB3 is involved in regulating the establishment and stability of the tight junctions [11,18,19], a function that still needs to be investigated in the mammalian retina. Moreover, an alternative CRB3 protein isoform with a sequence ending in CLPI has been described [20]. This isoform seems to play an important role in the ciliogenesis of primary cilium kidney epithelial cells, and the lack of CRB3 protein leads to the absence of cilia in these cells [20,21]. Photoreceptor cells have a non-motile primary cilium joining the IS with the outer segment (OS), this being necessary for the intracellular protein transport that occurs among both segments. It has been proposed, but not demonstrated, that the CRB3 protein might be localized in the connecting cilium of these cells, where it could also be involved in ciliogenesis [17]. Nevertheless, this possibility remains to be explored.

In the present study we attempted to gain further insight into the localization of CRB3 in the mouse retina by means of double immunofluorescence and Western blot analyses. We re-evaluated its expression in the retina by exploring its presence in this tissue from the stage of P0 until adulthood, since both the OPL and the connecting cilium start to form around these stages of post-natal growth: the connecting cilium develops at P0, being approximately 0.5 μm in length at P1 [22], and the OPL at P4–P5 [23,24]. Here we show evidences that CRB3 is present all along the inner segment of the photoreceptor cells, where especially concentrates in the connecting cilium area. Also, we found this protein in the OPL and in the IPL, a data that had never been reported before.

Materials and Methods

All procedures used in this work were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC and 2003/65/EC) and Spanish legislation for the use and care of animals (RD 1201/2005). All the details of the study were approved by the Bioethics Committee of Salamanca University (CBE/30/07/08).

Animals and Fixation

We used 10 P0 and P4 animals and 30 adult (P90) wild-type mice (C57BL/6J) that were anesthetized with ketamine (100 mg/kg). Adult mice were perfused transcardially with a solution containing 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4, and post-fixed by immersion for 2 h at room temperature (RT) in the same solution. Then, the eyes were washed in PB and the lens was removed. P0 and P4 mouse eyes were enucleated and fixed overnight (ON) at 4°C by immersion in the same fixative solution, and then washed in PB.

Western Blot Analyses (WB)

The whole mouse retina was lysed in 1 ml of RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnologies®), which was supplemented with a proteases inhibitor cocktail (1:100, Sigma-Aldrich®). The amount of protein was measured with a Bradford's assay mixed with 20% Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad laboratories™) and absorbance at 595 nm was measured with a LT4000 Microplate reader (Labtech™). Following this, we boiled 50 μg of proteins dissolved in sample buffer (2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% glycerol, 700 mM β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% bromophenol blue), which were later chilled in ice and loaded on a 14% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes, and immunolabeled overnight at 4°C with 1:500 anti-CRB3 antibodies. After several washes with tris-buffered saline (TBS), the membranes were

incubated with 1:5000 anti-goat IgG conjugated with alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch™) for 60 min at RT, washed with TBS, and stained with NBT (Nitro-blue-tetrazolium, Roche Applied Science™) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche Applied Science™). As loading control we used β -actin (1:5000 dilution). We also carried out a peptide competitive assay as a negative control, where the anti-CRB3 antibody was incubated with 0.2 mg/ml of the antigen fusion protein for 60 min, and this mixture was used instead of the primary antibody dilution.

Immunofluorescence

The eyeballs were cryoprotected using a graded series of sucrose (10%, 20% and 30%), embedded in Tissue-Tek™ O.C.T., and 14- μm transverse sections were obtained in a cryostat. Autofluorescence was quenched with 0.25 g/l sodium borohydride in 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS). Sections were then rinsed in PBS with 0.02% Triton Tx-100 (Sigma-Aldrich™) (PBS-Tx) and blocked for 1 h in a solution with 1% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal serum in PBS-Tx. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies and/or peanut agglutinin marker (Table 1) in a solution containing 1% BSA and 2% normal serum in PBS-Tx. Following this, sections were washed with PBS and incubated for 1 h at RT with 1:250 Cy2 (and Cy3 for the double labeling) fluorescent secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch™) in PBS. Sections were mounted using Prolong® Gold antifading reagent (Invitrogen™). Negative controls without primary or secondary antibody were also performed. We also carried out a peptide competition assay by incubating some sections with 0.1 mg/ml of the original antigen fusion protein together with the CRB3 antibody to discriminate any possible background labeling.

Antibody Production

The NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to choose a unique antigenic amino acid sequence of the mouse MAGUK p55 subfamily member 4 protein (MPP4) to design an antibody. The sequence, which included amino acids 586–599, identical to the same region of the MPP4 human protein, was sent to Genosphere Biotechnologies to generate and purify the polyclonal antibodies.

Imaging

All images were obtained with a laser scanning spectral confocal microscope (Leica TCS SP2) with the pinhole set at 1.0 Airy Units and 40 \times (numerical aperture:1.25) and 63 \times (numerical aperture:1.32) immersion oil objectives. The laser lines 488 nm and 543 nm were used to excite Cy2 and Cy3 fluorochromes respectively. Both channels were captured in sequential mode and all images are single optical sections. The brightness and contrast in all original images were further processed and adjusted with Adobe Photoshop CS5 software and Leica Confocal Software.

Results

We employed Western Blot (WB) analysis to test the specificity of the antibody used in the present work for the recognition of the CRB3 protein in the mouse retina. In retina lysates we detected two bands with an approximate molecular weight between 20–28 kDa (Fig. 1A), which are the reported molecular weights for the two different glycosylated protein isoforms; the isoform a, with an ERLI-ending (CRB3-ERLI), and the isoform b, with a CLPI-ending (CRB3-CLPI) [12,20,21].

Table 1. Primary antibodies.

Antigen	Antiserum	Source, catalog number	Working dilution	Labeling
Acetylated tubulin (AT)	Mouse anti-AT	Sigma-Aldrich, T7451	1:2500	Müller cells
Bassoon	Mouse anti-bassoon	Stressgen, VAM-PS003	1:5000	Presynaptic terminals
β -catenin	Mouse anti- β -catenin	BD Transduction Laboratories, 610153	1:300	Adherens junctions
Blue opsin	Rabbit anti-blue opsin	Millipore, AB5407	1:1000	Blue cones (S cones)
Calbindin (CB)	Rabbit anti-CB	Swant, CB-38a	1:2000	Horizontal, amacrine and ganglion cells
Calretinin (CR)	Rabbit anti-CR	Swant, 7699/3H	1:10000	Amacrine and ganglion cells
Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP)	Mouse anti-CRALBP	Abcam, ab15051	1:400	Müller cells
CRB3	Goat anti-CRB3	Santa Cruz Biotechnologies, sc-29706	1:500	
Glutamate decarboxylase 65/67 (GAD 65/67)	Rabbit anti-GAD65/67	Millipore, AB1511	1:100	Amacrine cells
Giantin	Rabbit anti-giantin	Abcam, ab24586	1:1500	Golgi complex
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta-3 (GNB3)	Rabbit anti-GNB3	Sigma-Aldrich, HPA005645	1:50	Cone bipolar cells
MAGUK p55 subfamily member 4 (MPP4)	Rabbit anti-MPP4	Designed in our laboratory and produced by Genosphere Biotechnologies	1:1000	Photoreceptor synaptic terminals and SAR of the OLM
Protein kinase C α (PKC α)	Rabbit anti-PKC α	Sigma-Aldrich, P4334	1:5000	Rod bipolar cells
Recoverin	Rabbit anti-recoverin	Millipore, AB5585	1:2000	Photoreceptor cells
Red/Green opsin	Rabbit anti-red/green opsin	Millipore, AB5405	1:2000	Red-green cones (L and M cones)
Rhodopsin	Mouse anti-rhodopsin	Abcam, ab54717	1:1000	Rods
Synaptophysin	Mouse anti-synaptophysin	Sigma-Aldrich, S5768	1:5000	Synaptic vesicles
Tyrosine hydroxylase (TH)	Rabbit anti-TH	Jacques Roy Institute	1:5000	Amacrine cells
Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)	Rabbit anti-VGLUT1	Synaptic Systems, 135302	1:500	Bipolar and photoreceptor synaptic terminals

doi:10.1371/journal.pone.0050511.t001

According to the immunofluorescence assays, the staining pattern shows that CRB3 is localized in both synaptic layers of the retina: the OPL and throughout the entire IPL, although the IPL is not labeled homogeneously (Fig. 1B). We also found labeling for CRB3 in the inner photoreceptor segments, where it is especially intense in the region between the inner and outer segments and close to the OLM (Fig. 1B). The specificity of the anti-CRB3 antibody was assessed with a peptide competitive assay (Fig. 1C, Fig. S1A–B).

CRB3 Expression in Rod and Cone Outer and Inner Segments

To further analyze the localization of CRB3 in photoreceptor cells we used antibodies to detect recoverin (present in all photoreceptor cells), two different antibodies to distinguish M from S cones in mouse and PNA (to label all cones). Recoverin is a cytoplasmic protein located in both types of photoreceptor cells, in their IS, cell bodies in the ONL and in their synaptic terminals in the OPL (Fig. 1E). The double labeling recoverin/CRB3 shows uniform staining of the rod and cone IS for the two markers (Fig. 1D–F). PNA binds to carbohydrates in the external surface of the plasma membrane of cones at the level of their IS, in some of the OS and at the base of the cone pedicles in the OPL (Fig. 1H). The antibody against the red/green opsin labels the M cones in the mouse retina, being present throughout both segments, in the ONL surrounding the nuclei and in some of their synaptic terminals (Fig. 1K). The blue opsin labeling showed that this protein is only present along the S cone outer segments (Fig. 1L).

The double labeling for these markers and CRB3 revealed a limited overlap of these proteins in the cone sheaths (arrowheads in Fig. 1G–L), although generally, the labeling for the CRB3 protein showed some gaps at the level of the IS of the photoreceptor cells in which the PNA or opsin staining was distinguishable (arrows in Fig. 1G–L).

To further investigate the presence of CRB3 in the area close to the OLM and at the tip of the IS, we used different antibodies against proteins known to be present in these regions, such as MPP4, β -catenin, acetylated tubulin, rhodopsin and giantin, which is expressed in the Golgi apparatus (Fig. 2B, E, H, K; Fig. S1C, E).

MPP4 is a protein present in the OPL and in the SAR of the OLM, where it has been identified as a member of the protein scaffold complex formed by members of the CRB and the MAGUK protein families [25,26,27]. In the OLM, our antibody shows a weak labeling for MPP4 (Fig. 2B; Fig. S1C), and the peptide competitive assay demonstrated its specificity (Fig. S1D). Double labeling for CRB3 and MPP4 showed that these two proteins partially colocalized at the level of the OLM (Fig. 2A–C).

The OLM is formed by the adherens junctions established between Müller and the photoreceptor cells, where β -catenin is present (Fig. 2E). The CRB3/ β -catenin double labeling revealed that there was no colocalization of these two proteins in this area, since CRB3 seemed to be located in the SAR, apically to β -catenin (Fig. 2D–F).

The outer and inner segments of the photoreceptor cells are associated through a connecting cilium, which is situated at the tip

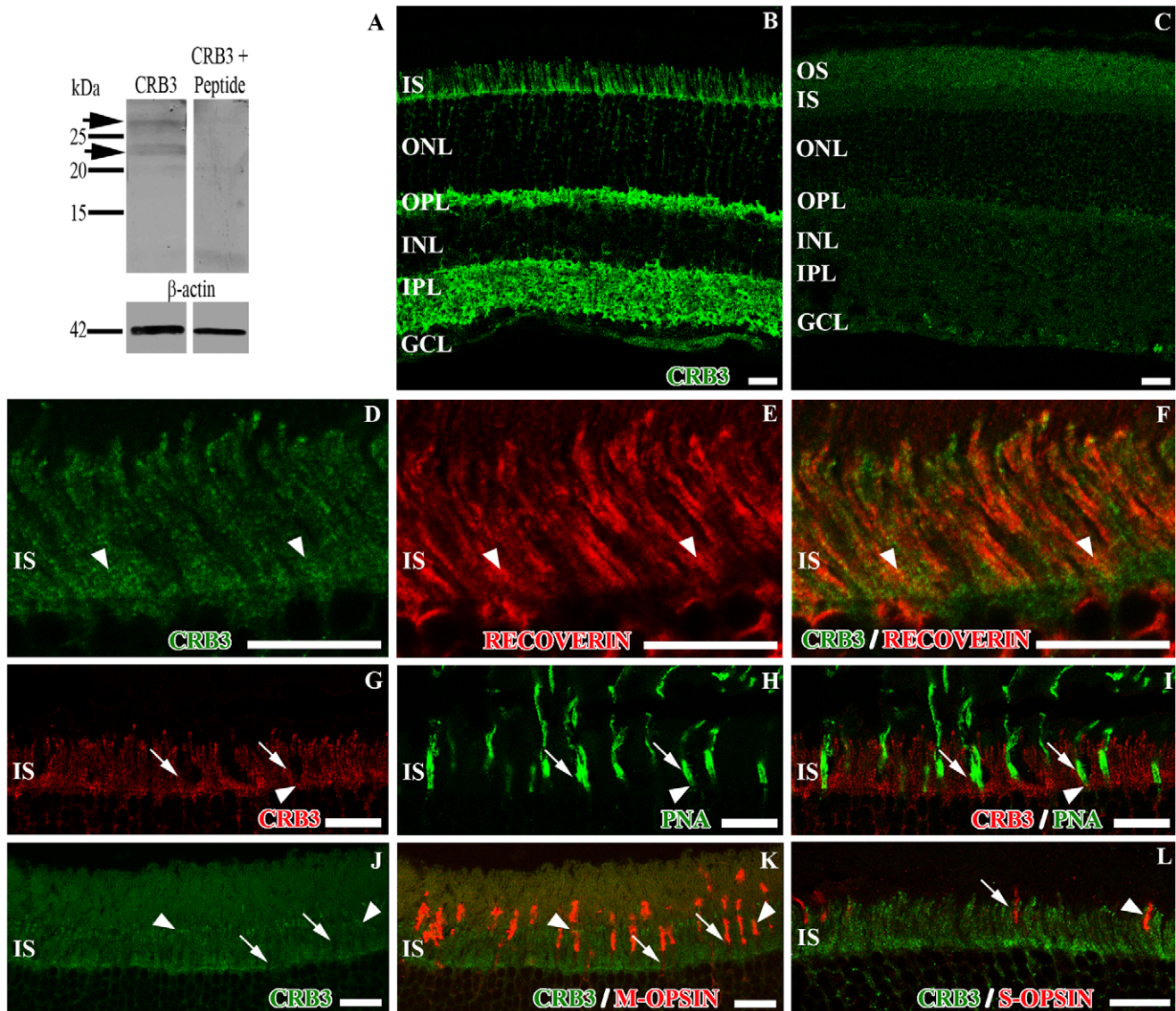


Figure 1. Detection of CRB3 in the mouse adult retina and localization in photoreceptors IS. **A**, western blot analysis showing the expression of CRB3 in retina lysates. The CRB3 protein is detected as two bands (arrows) between 20–28 kDa. In the peptide competitive assay, the specific labeling disappears. β -actin was used as loading control. **B**, CRB3 immunoreactivity in the mouse retina. **C**, peptide competition assay for CRB3 where all the labeling disappears. **D–L**, double immunofluorescence for CRB3 (green in **D**, **F**, **J**, **K** and **L**; red in **G**, **I**) and recoverin (red in **E–F**), PNA (green in **H–I**), M-opsin (red in **K**) or S-opsin (red in **L**). CRB3 partially colocalizes with all of these markers in the IS. The arrowheads in **D–L** point out to some areas of colocalization. The arrows in **G–L** point out to regions where these markers do not colocalize. OS, photoreceptor outer segments; IS, photoreceptor inner segments; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0050511.g001

of the IS, where the CRB3 staining seemed to be more intense (Fig. 2G). The acetylated tubulin protein was present in the cytoskeletal structure that formed the cilium in this area (Fig. 2H). The CRB3/AT double immunolabeling showed that both proteins were located in the cilium area, and although there were some points of colocalization, most of the CRB3 labeling seemed to be adjacent the AT-labeled connecting cilia (Fig. 2G–I). Besides, since the rhodopsin molecule is only located in the rods OS, the double labeling CRB3/rhodopsin showed colocalization at the tip of the IS (Fig. S1E–F).

In the region close to the OLM, since CRB3 did not colocalize with β -catenin, we attempted to identify the cell compartment where CRB3 could be present. The giantin labeling revealed that

the Golgi complex of the photoreceptor cells is restricted to this area of the IS (Fig. 2K), and the double labeling CRB3/giantin demonstrated that these two proteins entirely colocalized in this area except for some restricted giantin positive profiles that were negative for CRB3 (Fig. 2J–L). Besides, we have shown that CRB3 partially colocalizes in this area with MPP4 (Fig. 2C), which is present in membranous compartments in the Golgi area of the photoreceptors IS.

CRB3 Protein Distribution in the OPL

To analyze the localization of CRB3 in the plexiform layers, we performed double labeling experiments for CRB3 and different proteins which are expressed in the synaptic terminals. Bassoon is

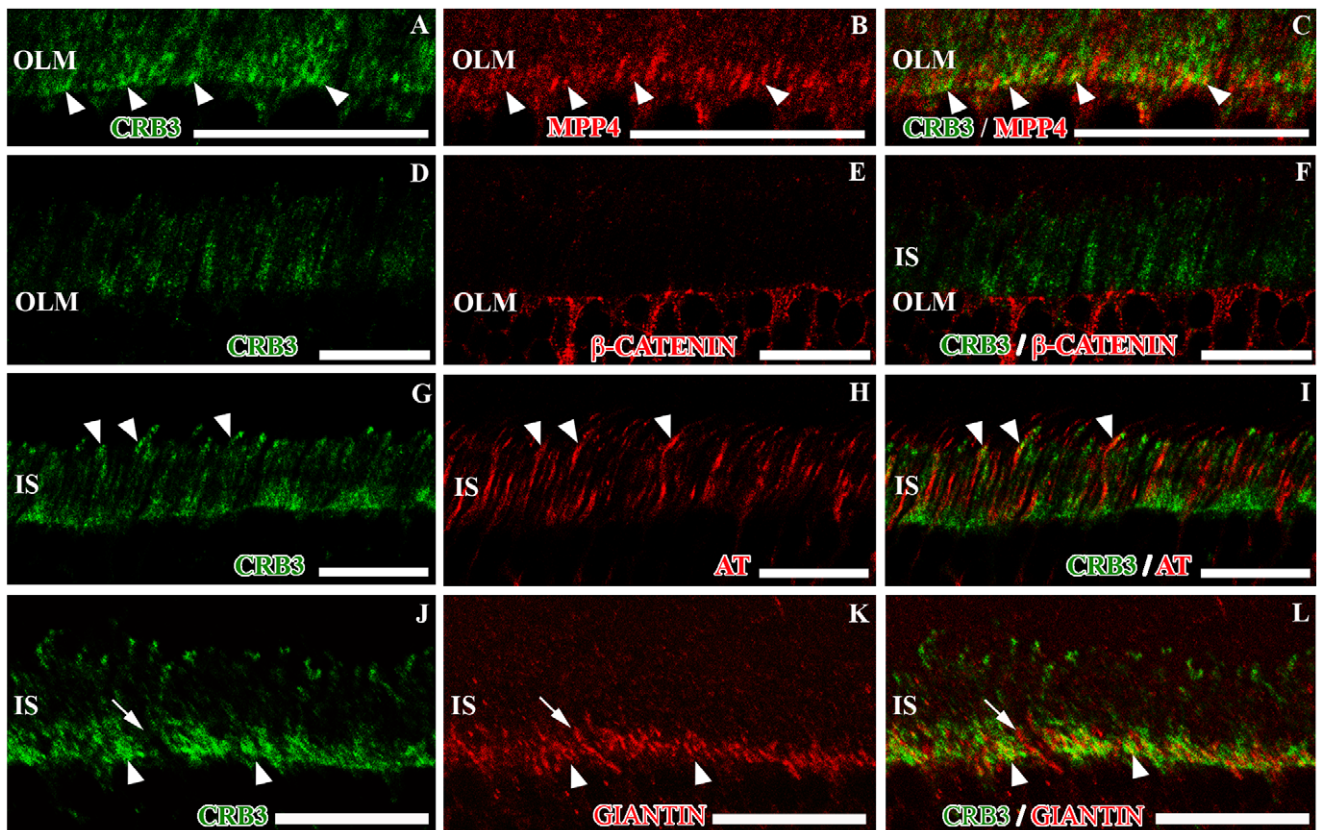


Figure 2. CRB3 in the photoreceptor IS area of the adult mouse. Double immunolabeling for CRB3 (green) and MPP4 (red in **B–C**), β -catenin (red in **E–F**), acetylated tubulin (AT, red in **H–I**) or giantin (red in **K–L**). CRB3 colocalizes with MPP4 in the photoreceptor inner segments (arrowheads in **A–C**); nevertheless CRB3 is not present in the OLM adherens junctions, which are labeled for β -catenin (**D–F**). **G–I**, CRB3 seems to surround most of the AT positive connecting cilia, and in some cases, both proteins colocalize (arrowheads in **G–I**). **J–L**, CRB3 colocalizes with the Golgi complex marker giantin in the photoreceptor cells IS (arrowheads), but there are some giantin positive profiles where CRB3 is not present (arrows). IS, photoreceptor inner segments; OLM, outer limiting membrane. Scale bars: 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0050511.g002

a protein associated with synaptic ribbons in photoreceptors and bipolar cell terminals and the presynaptic active zone in conventional synapses made by amacrine cells. Synaptophysin is located in the pre-synaptic vesicles. The double labeling CRB3/bassoon demonstrated that in the OPL, CRB3 did not colocalize with bassoon, since it surrounded the bassoon positive photoreceptors synaptic ribbons (Fig. 3A–C). On the other hand, CRB3 and synaptophysin fully colocalized in the synaptic terminals (Fig. 3D–F). VGLUT1 is a vesicular glutamate transporter which in the OPL is located in photoreceptors presynaptic terminals. The CRB3/VGLUT1 double labeling showed that all VGLUT1-positive processes express CRB3, but although both proteins were present in the same terminals, the colocalization was not complete (Fig. 3G–I).

The protein β -catenin is localized in the adherens junctions formed in the synaptic contacts. Since the labeling for CRB3 showed the presence of this protein in the plexiform layers, we analyzed the possible colocalization of these two proteins in the OPL. We found that they did not colocalize, since β -catenin seemed to be located in the gaps left by the CRB3 staining (Fig. 3J–L).

Photoreceptor cells establish synaptic contacts with the dendrites of the bipolar and horizontal cells in the OPL. To identify the profiles that express CRB3, we used markers to distinguish the photoreceptor pre-synaptic terminals (PNA, different opsins, recoverin and MPP4) from the dendrites of the horizontal cells (calbindin or CB) or those of the bipolar cells

(PKC α and GNB3). At the level of the OPL, some cone specific markers such as PNA or M-opsin stain the base of the cone pedicles. The double labeling with CRB3 and these markers appears to show that CRB3 may be present along the base of the cone terminals (Fig. 4A–F). As mentioned earlier, recoverin is present in the presynaptic terminals of all photoreceptor cells in the OPL, where the double immunofluorescence labeling showed a complete colocalization of these two proteins (Fig. 4G–I). The CRB3/MPP4 double immunolabeling also showed colocalization of these two proteins in the OPL, although some single-labeled profiles were found (Fig. 4J–L). Since recoverin, MPP4 and VGLUT1 are known to be present in rods and cones [27,28,29,30,31,32], these observations support the idea that CRB3 might be present in the pre-synaptic terminals of both, cone and rod photoreceptor cells.

We explored the possibility that CRB3 could be also present in the dendrites of bipolar and horizontal cells in the OPL. The double immunolabeling CRB3/CB showed no colocalization of the two proteins in the horizontal cells, since the CB staining, although very close to the CRB3 positive profiles, seems to surround them (Fig. 4M). Anti-PKC α is a well-known antibody for rod bipolar cells, and Guanine nucleotide-binding protein 3 (GNB3) is present in the cone-ON bipolar cells. PKC α and GNB3 are distributed throughout the cell body of these cells, extending from the OPL to the IPL (Figs. 4N, O; 5H, K). Double immunolabeling with CRB3 revealed that this protein is not

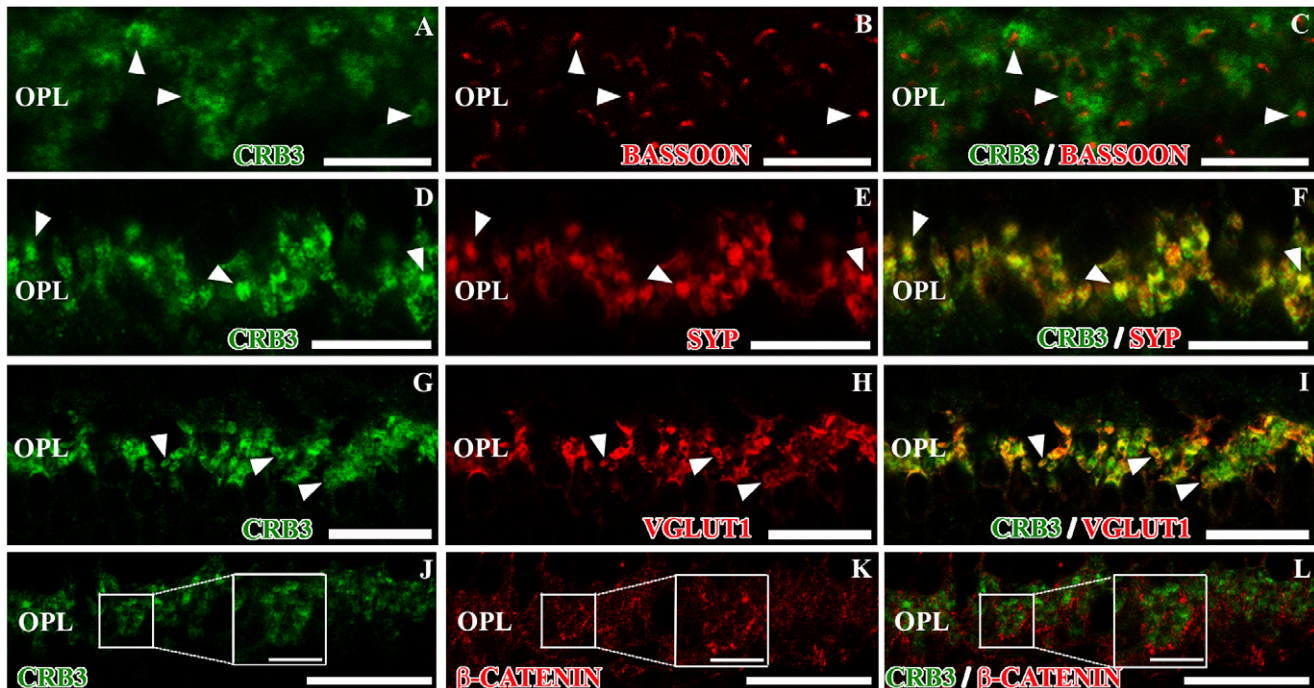


Figure 3. CRB3 positive profiles in the outer plexiform layer of the adult mouse. Double immunofluorescence for CRB3 (green) and bassoon (red in B–C), synaptophysin (SYP, red in E–F), VGLUT1 (red in H–I) and β -catenin (red in K–L). A–F, CRB3 seems to surround the bassoon labeling (arrowheads in A–C) and colocalizes with SYP (arrowheads in D–F). G–I, VGLUT1 is present in the photoreceptors' presynaptic terminals (H–I), where it colocalizes with CRB3 (arrowheads in G–I). J–L, β -catenin does not colocalize with CRB3 in the OPL (insets in J–L). Insets in J–L: Higher magnifications of the small squares. OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 20 μ m, 5 μ m in inset. doi:10.1371/journal.pone.0050511.g003

present in the dendrites of the bipolar cells at the level of the OPL (Fig. 4N, O).

CRB3 Protein Distribution in the IPL

CRB3 immunostaining pattern showed that this protein is also present in the IPL. In this retinal layer, bipolar cells establish synaptic contacts with different subpopulations of amacrine and ganglion cells. Double immunofluorescence experiments for CRB3 and the presynaptic markers used to label the OPL as well, such as bassoon and synaptophysin, showed that CRB3 outlined all the profiles labeled for bassoon (Fig. 5A–C) and colocalized with most of the synaptophysin positive profiles, although some single-labeled elements were found (Fig. 5D–F).

In order to identify whether the different subpopulations of amacrine, ganglion and bipolar cells present in this layer contained the CRB3 protein, we performed double immunolabeling for CRB3 and antibodies against proteins known to be present in these cells, such as PKC α , GNB3, VGLUT1, Glutamate decarboxylase 65 and 67 (GAD 65/67), CB, calretinin (CR) and tyrosine hydroxylase (TH).

All the rod bipolar cell synaptic terminals, as well as their processes in the IPL, were positive for PKC α (Fig. 5H). These synaptic terminals are distributed in the innermost layer of the IPL and, at this level, the PKC α positive terminals colocalized with CRB3 (Fig. 5G–I), where in some profiles, the CRB3 labeling pattern is present as a ring associated with the rod bipolar cell terminals. Likewise, the GNB3 protein was distributed through the entire cell body of the cone-ON bipolar cells, and the double labeling CRB3/GNB3 showed that these two proteins only colocalized in the innermost area of the IPL (Fig. 5J–L). Furthermore, in the IPL, VGLUT1 is located in the

bipolar cells synaptic terminals (Fig. 5N), and the double labeling CRB3/VGLUT1 showed that in this layer, all VGLUT1-stained processes were CRB3-positive, but not the opposite (Fig. 5M–O).

GABAergic amacrine cells account for 25–55% of all amacrine cells, depending on the species [33]. These cells were labeled with antibodies against the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase GAD 65/67 (Fig. 6B). The double labeling CRB3/GAD 65/67 showed a high degree of colocalization of the two proteins, although we found some GAD positive processes that did not show CRB3 labeling, and vice versa (Fig. 6A–C).

The calcium-binding proteins CB and CR are present in a subpopulation of amacrine cells located in three strata in the IPL. Besides, CR is a specific marker for starburst amacrine cells [34]. CRB3 seems to be absent from all these populations of cells (Fig. 6D, E). In fact, the CB and CR proteins were present in the gaps left by the CRB3 staining (Fig. 6D, E). CB (not shown) and CR were also present in a subpopulation of ganglion cells, in their cell bodies, and in their processes; where CRB3 was not present (Fig. 6E). TH is present in the large dopaminergic amacrine cells, whose TH-positive processes are distributed in the outermost layer of the IPL (Fig. 6F). The TH/CRB3 double labeling did not reveal colocalization of these two proteins except for some discrete profiles (Fig. 6F).

As in the OPL, β -catenin is present in the adherens junctions established in the synaptic contacts of the IPL. In this layer, and similarly to what we found in the OPL, β -catenin and CRB3 do not colocalize (Fig. 6G–I).

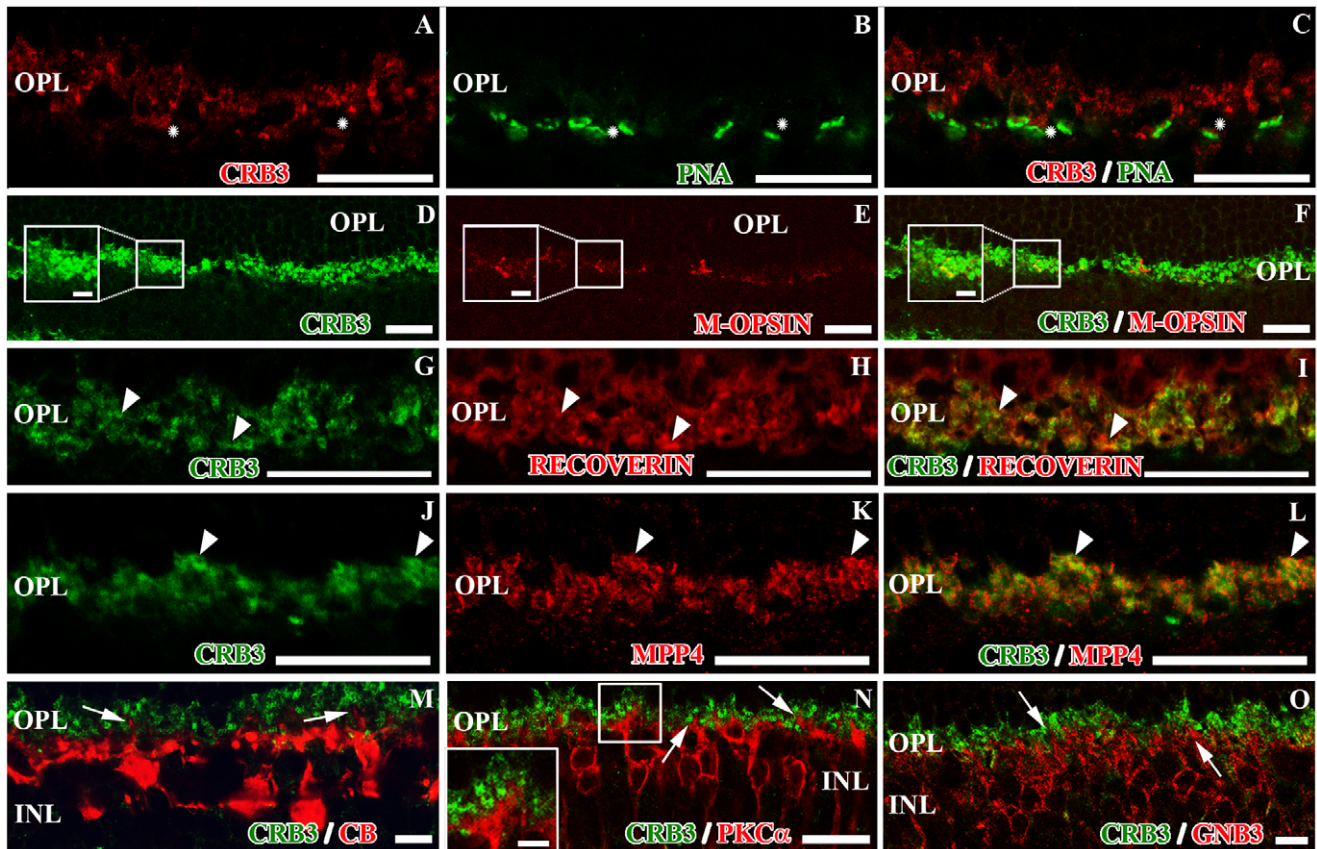


Figure 4. CRB3 positive profiles in the outer plexiform layer of the adult mouse (II). Double immunofluorescence for CRB3 (red in **A, C**; green in **D, F, G, I, J, L, M, N** and **O**) and markers for different cell types present in the OPL. **A–C**, CRB3 seems to be present at the base of cone terminals (asterisks), positive for PNA (green in **B, C**). **D–F**, CRB3 colocalizes with markers for M-opsin (red in **E, F**) (inset in **D–F**). **G–I**, recoverin (red in **H, I**) labels photoreceptors' presynaptic terminals, in both cones and rods and colocalizes with CRB3 (arrowheads). **J–L**, MPP4 (red in **K, L**) is also localized in both types of photoreceptor presynaptic terminals, where it colocalizes with CRB3 (arrowheads). **M**, CRB3 does not colocalize with CB (red) positive horizontal cells in the OPL (arrows in **M**). **N–O**, anti-PKC α labels the rod bipolar cells (red in **N**), and anti-GNB3 stains a subset of cone bipolar cells (red in **O**). In the OPL, none of the bipolar cells dendrites contain CRB3. The inset in **N** and the arrows in **N–O** show bipolar cell processes outlined by the CRB3 staining. Insets in **D–F** and **N**: Higher magnifications of the small squares. OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer. Scale bars: 20 μ m, 2 μ m in inset.

doi:10.1371/journal.pone.0050511.g004

CRB3 is Present in the IPL and in the Outer Retina at P0 and P4

To analyze CRB3 protein expression during the development of the elements where we detect this protein, we performed double immunolabeling for CRB3 and several proteins known to be present in the mouse retina at P0, when the photoreceptor connecting cilium starts to develop, and at P4, prior to the complete establishment of the OPL.

At P0, some layers of the retina are starting to develop, such as the GCL or the IPL. At this age, synaptophysin was extensively found in the IPL and, with less intensity, in the outer retina (Fig. 7B). CRB3 was also present at P0 at the level of the IPL, and some scattered labeling was also detected in the outer retina (Fig. 7A). In the IPL, synaptophysin and CRB3 colocalized, although all processes positive for synaptophysin were labeled with CRB3, but not the opposite (Fig. 7C). Additionally, in the outer retina, a partial colocalization of these two proteins was observed (Fig. 7C, F). PNA labeled the cones IS during their development at this age (Fig. 7D), and the PNA/CRB3 double labeling revealed that presence of CRB3 in these IS was not definite (Fig. 7D). At P0, recoverin was present in the developing photoreceptor cells (Fig. 7E), as well as in some ganglion cells, as seen in the adult

retina (not shown). Double immunolabeling with CRB3 showed a partial colocalization with recoverin in the area where the photoreceptor IS are developing and in some of the photoreceptor cell bodies (Fig. 7E). At P4, the double immunolabeling showed that CRB3 maintained its colocalization with synaptic proteins at the level of the IPL, such as synaptophysin (Fig. 7G–I). At this age, the synaptophysin labeling in the outer retina was stronger than at P0, and there was a partial colocalization with CRB3, since all synaptophysin processes were CRB3-positive, but not the opposite (Fig. 7G–I, M). At P4, recoverin is present throughout the developing photoreceptor cells and in the area where the OPL starts to form (Fig. 7J). As mentioned earlier, CRB3 was present in the area where the photoreceptor IS were growing and in the developing OPL (Fig. 7J). In the incipient OPL, all the processes positive for recoverin were also labeled for CRB3, but not the opposite (Fig. 7J). Moreover, CRB3 was also located in some cells just below the OPL (Fig. 7G, I, J, M). The adherens junctions start to form early during development, so the β -catenin protein is present throughout the retina at these stages. At P4, and unlike in adult mice, we found a partial colocalization of β -catenin and CRB3 in the developing OPL (Fig. 7K), and also in the IPL (Fig. 7L). At this stage, we also observed the distribution of the

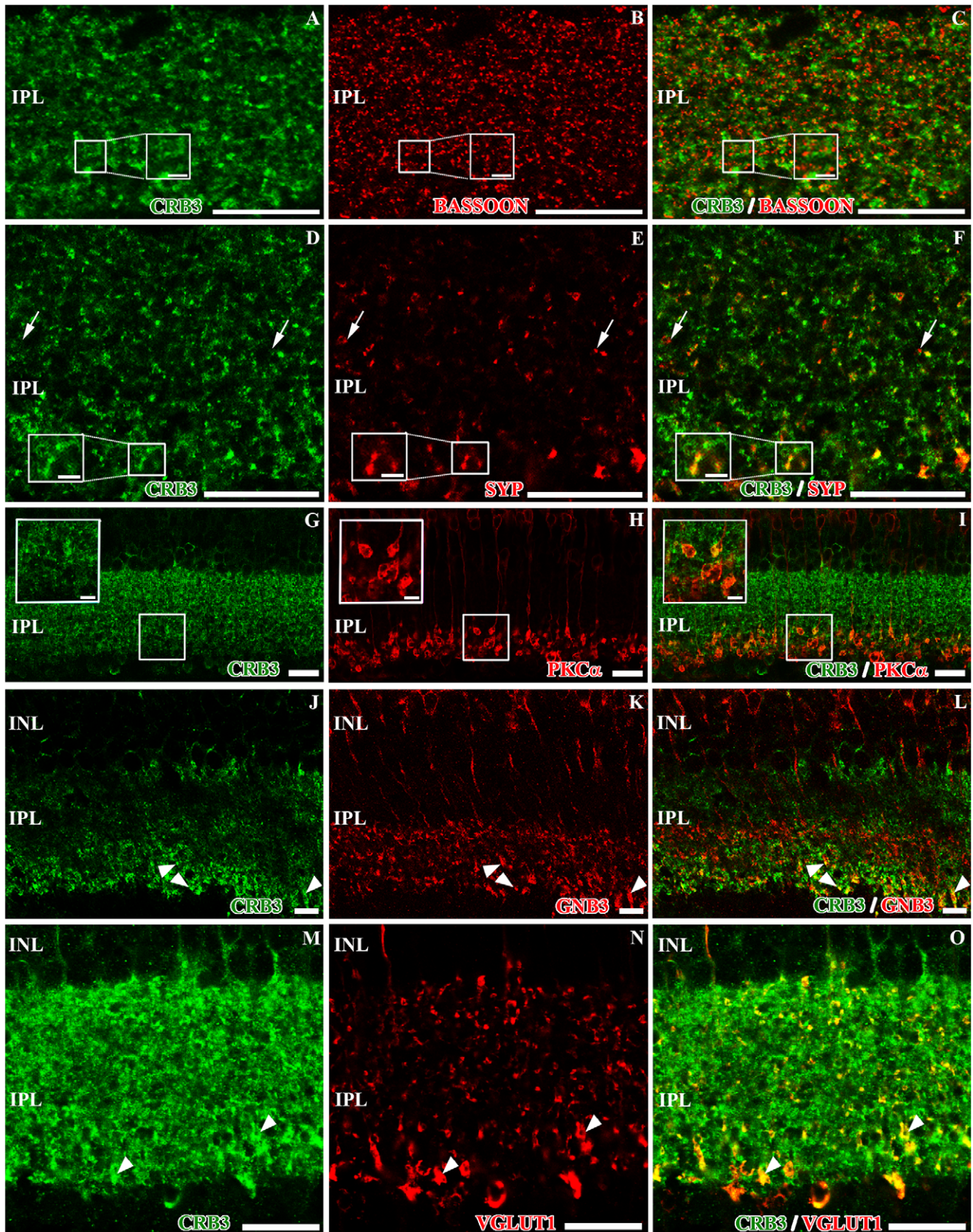


Figure 5. Localization of CRB3 in the inner plexiform layer of the adult mouse. Double immunofluorescence for CRB3 (green) and bassoon (red in B–C), synaptophysin (SYP, red in E–F), PKC α (red in H–I), GNB3 (red in K–L) and VGLUT1 (red in N–O). A–F, CRB3 in the IPL surrounds the bassoon labeling (inset in A–C) and colocalizes with synaptophysin (inset in E–F), although some single labeled SYP positive profiles are found

(arrows in D–F). **G–L**, in the IPL, PKC α is present in the axons of the rod bipolar cells (**H–I**), and GNB3 is present in the axons of a sub-population of cone bipolar cells (**K–L**). CRB3 colocalizes with both proteins in the innermost part of the IPL (insets in **G–I** and arrowheads in **J–L**). **M–O**, VGLUT1 is also present in the bipolar cells' presynaptic terminals (**N–O**). All VGLUT1 positive processes colocalize with CRB3 (arrowheads in **M–O**), but not the opposite. Insets in A–I: Higher magnifications of the small squares. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 20 μ m, 5 μ m in inset (D–F) and 2 μ m in inset (G–I).
doi:10.1371/journal.pone.0050511.g005

CRB3 protein in the OLM, where, as in the adult, CRB3 and β -catenin did not colocalize (Figs. 7K; 2F).

Discussion

CRB3 Protein Distribution in the Photoreceptors Inner Segments

Using the antibodies described in two publications [11,12], the few authors who have addressed the distribution of CRB3 in the mouse retina have only located the protein at the level of the OLM, in photoreceptors, and in Müller cells [14,16]. In the present study, we detected CRB3 in Müller cells after performing double immunolabeling with anti-CRALBP, a Müller cell marker (Fig. S2), although we have observed that the majority of the localization is in photoreceptor cells.

Regarding the localization of CRB3 at the tip of the IS, we obtained a punctate staining in the budding IS at P0 and at P4, overlapping with the development of the photoreceptor connecting cilium, which is approximately 0.5 μ m in length at P1 [22]. Furthermore, in adult mice we detected CRB3 in the connecting cilium area, where this protein surrounds the staining obtained for the acetylated tubulin protein, which is present in the cilium [35]. To date, few studies have analyzed the role of CRB3 in the ciliogenesis of some epithelial cells in mammals, showing that this protein is required for ciliogenesis [20,21]. In the work published by Fan et al. in 2007, MDCK cells transfected with shRNA specifically directed towards the CRB3-CLPI isoform did not form the cilia, demonstrating that the CRB3-CLPI isoform is the one implicated in ciliogenesis [20]. However, although the presence of CRB3 in the photoreceptor connecting cilium and

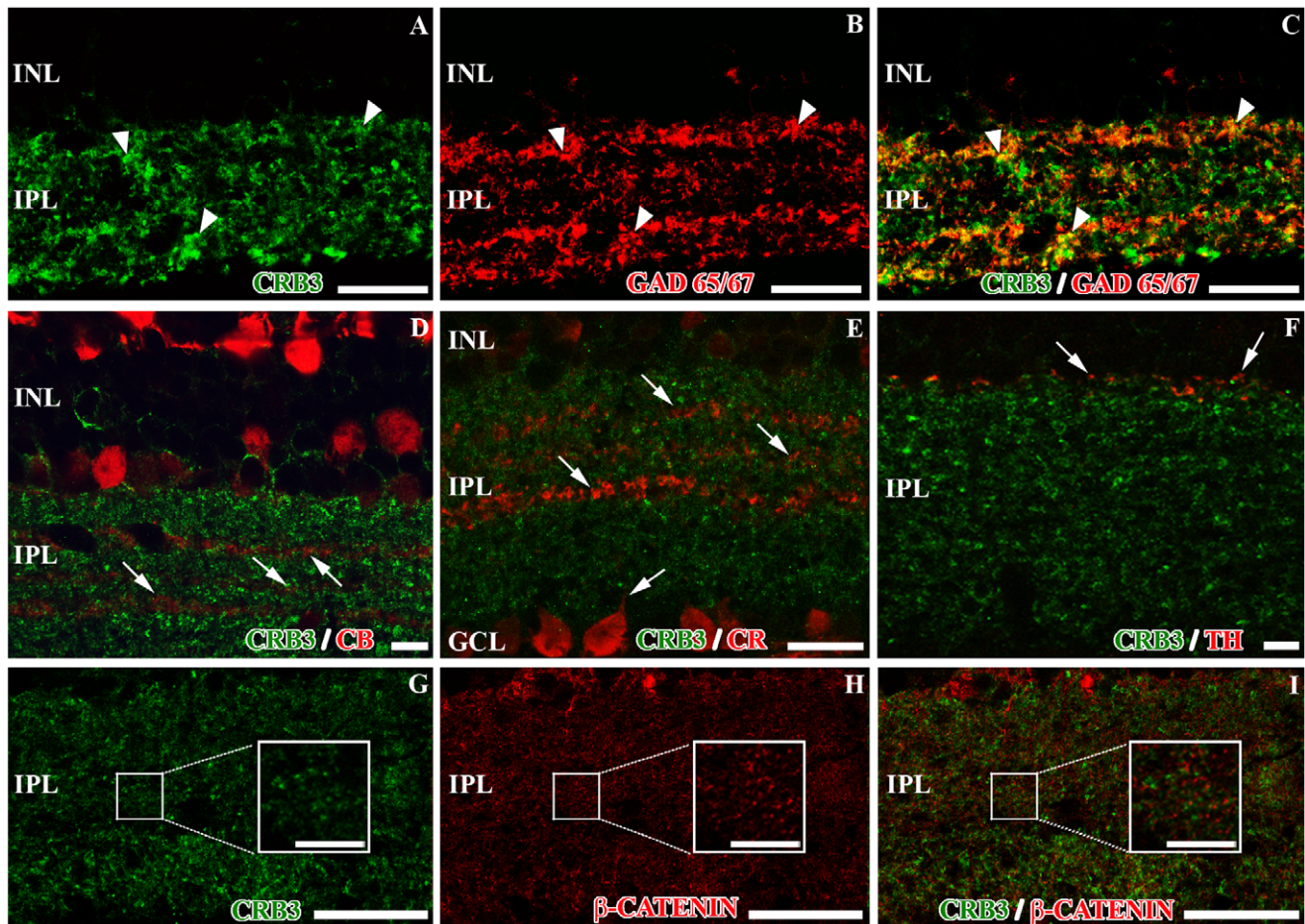


Figure 6. Presence of CRB3 in the inner plexiform layer of the adult mouse (II). Double immunofluorescence for CRB3 (green) and markers for different IPL cell types (red). **A–C**, GAD 65/67 is present in GABAergic amacrine cells (**B–C**). There is a partial colocalization of GAD 65/67 positive profiles and CRB3 (arrowheads). **D–F**, CRB3 does not colocalize with amacrine CB positive profiles in the IPL (arrows in **D**), with the amacrine or ganglion cells CR positive profiles (arrows in **E**) or with the amacrine TH positive processes (arrows in **F**). **G–I**, CRB3 does not colocalize with β -catenin in the IPL (insets in **G–I**). Insets in G–I: Higher magnifications of the small squares. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0050511.g006

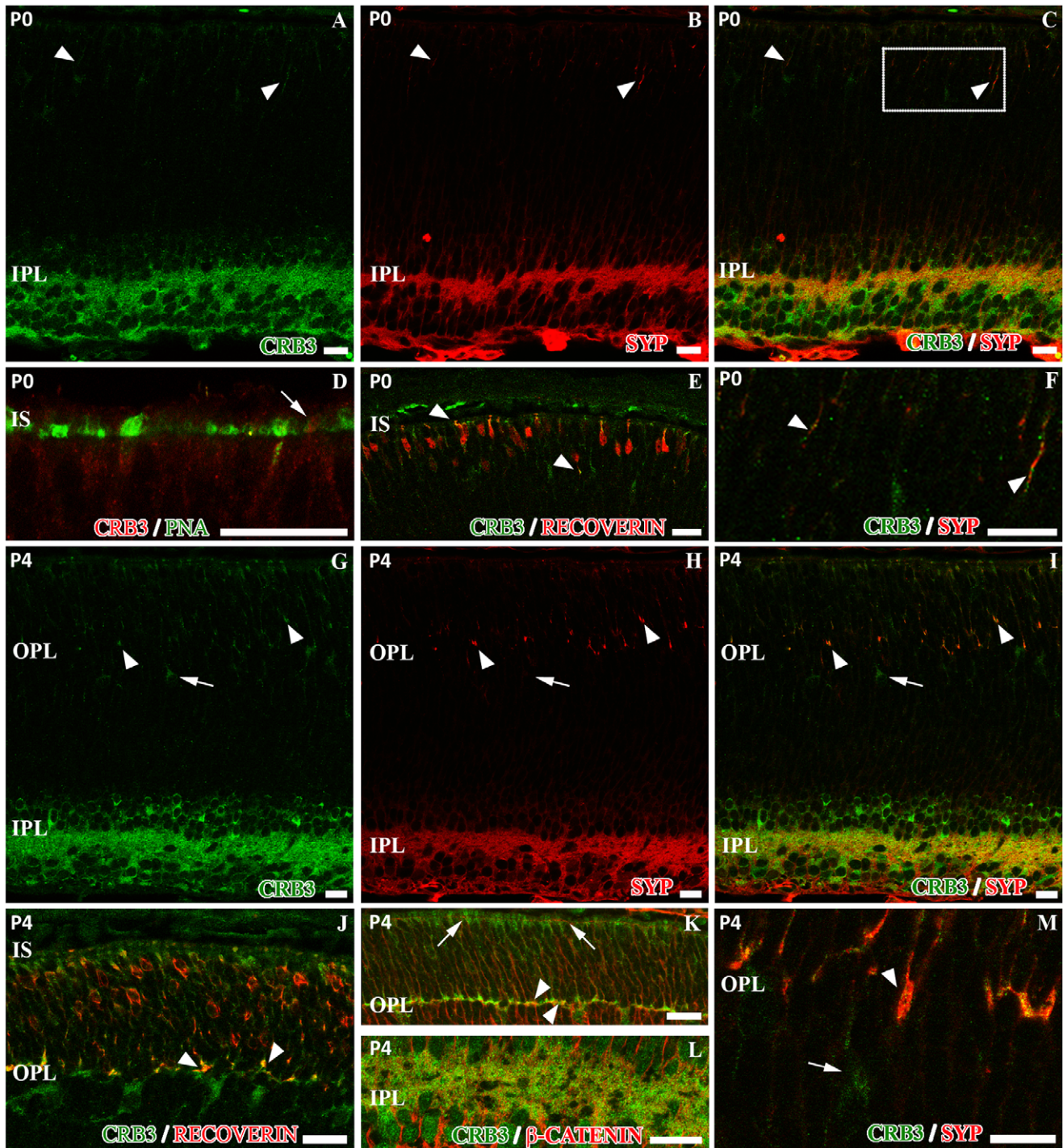


Figure 7. Characterization of the CRB3 protein expression in the mouse retina at P0 and P4 stages. **A**, at P0, CRB3 (green) is present in the outer retina as well as in the IPL. Double immunolabeling for CRB3 and synaptophysin (SYP, red in **B–C** and **F**) showed that CRB3 partially colocalizes with this protein in the IPL (**A–C**), and is also present in the incipient outer retina (arrowheads in **A–C** and inset of **C** in **F**). **D–E**, in the outer retina, PNA (green in **D**) and recoverin (red in **E**) are already being expressed by the developing photoreceptor cells. The colocalization of PNA and CRB3 (red in **D**) is not clear (arrow in **D**); however, recoverin and CRB3 (green in **E**) partially colocalize (arrowheads in **E**). **G**, at P4, CRB3 (green) is present in the IPL, in the developing OPL and in photoreceptors. The double immunolabeling for CRB3 (green in **G**, **I** and **M**) and synaptophysin (SYP, red in **H**, **I** and **M**) shows that in the IPL, CRB3 colocalizes with synaptophysin (**I**). Also, in the incipient OPL, all synaptophysin positive profiles are CRB3 positive (arrowheads in **G–I** and **M**) but others are CRB3 positive and synaptophysin negative (arrows in **G–I** and **M**). **J**, in the developing photoreceptor cells, recoverin (red) is present all along the cell bodies. CRB3 (green in **J**) colocalizes with recoverin in the area where the inner segments are forming and in the developing OPL (arrowheads in **J**). **K–L**, β -catenin (red) does not colocalize with CRB3 (green) at the level of the OLM during development (arrows in **K**). Both proteins partially colocalize in the OPL (arrowheads in **K**) and in the IPL (**L**). IS: photoreceptor inner segments; OPL, outer plexiform layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bars: 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0050511.g007

the involvement of this protein in its development had been suggested [17], the present work is the first one to demonstrate this possibility. Thus, our results show for the first time the presence of CRB3 protein in the connecting cilium area early from the development of this element.

In the photoreceptor cells there is an important Golgi-based sorting and vesicle trafficking of cilia elements, since the biosynthetic machinery is absent from cilia, so all their molecular components must be synthesized in the organelles located in the IS and transported to the cilium. Recently, it has been demonstrated that many of the components necessary for the correct formation or functioning of the photoreceptor cilium are also located in the Golgi complex, such as some of the intraflagellar transport proteins [36], and the retinitis pigmentosa protein RP2 [37] among others. It has been also reported that some proteins from the scaffolding complex organized by the CRB proteins, such as MPP4, are detected in membranous compartments in the Golgi area of the photoreceptors IS [26]. Additionally, the CRB3-CLPI that has been identified to be located in the cilia membrane in epithelial cells in culture has been also detected in the Golgi complex of these cells during interphase [20]. Therefore, it is not surprising that we detected CRB3 not only in the connecting cilium of the photoreceptor cells, since we seem to detect the cilia-related CRB3-CLPI isoform in the mouse retina, but also in the Golgi complex, where it colocalized with giantin and MPP4, supporting the idea that CRB3 is another component of the cilium that needs to be vesicle-transported to this compartment. The data obtained from the double labeling to distinguish the IS from the two types of photoreceptor cells (opsins and PNA for cones, rhodopsin for rods and recoverin and giantin for both) and CRB3 show that this protein is clearly expressed in the IS of rods, and although we found some colocalization of cone markers and CRB3, the presence in the inner segments of cones is not conclusive. Nevertheless, the staining pattern obtained for MPP4 strongly support the idea that CRB3 may be present in both cone and rod IS.

Since previous studies have shown that CRB3 has a determinant role in the development of the primary cilia in several epithelial tissues [20,21], and after our own findings, we believe that CRB3 might play an active role during the development of the photoreceptors' connecting cilium and in IS growth.

CRB3 Protein in the Adherens Junctions

The Crumbs complex, which includes CRB3, has been described to be associated with the adherens junctions that organize the OLM in the retina [7]. Different studies have shown that one of its members, CRB1, and β -catenin, which is present in these junctions [38], do not colocalize in the OLM, since CRB1 is located in the SAR apically to β -catenin. In the present study, we show that CRB3 did not colocalize with β -catenin either. Furthermore, the initial step in synapse development is the formation of an adherens-like junction [39,40], where it is known that CRB1 is not present [26], but at P4, CRB3 did show a partial colocalization with β -catenin in the OPL and in the IPL. Also, at P0, when the IPL has started to develop, CRB3 and β -catenin partially colocalized in these layers. Considering this, and bearing in mind the importance of CRB3 in the regulation of cell-cell junctions in several cell types [7], it seems feasible that CRB3 might collaborate with β -catenin in the establishment of adherens junctions in the retinal plexiform layers. Nevertheless, CRB3 might not be necessary for the maintenance of these junctions when they are already established.

CRB3 in the Plexiform Layers

In the present work we show that the bulk of the CRB3 signal is present in both plexiform layers, a hitherto unreported observation [14,16]. Previous studies using a Pan-CRB antibody that recognizes all three CRB proteins have suggested the presence of CRB3 and/or CRB2 in the OPL, since CRB1 was undetected in this layer [17,26]. It is possible that the presence of CRB3 in the plexiform layers had not been reported before due to the use of antibodies raised against different regions of the CRB3 sequence, which probably did not recognize all isoforms. Our WB experiments showed that the antibody used in the present work effectively recognized the two known glycosylated isoforms of CRB3 in the mouse retina [10,11,12,20,21]. The labeling for CRB3 in the OPL showed that this protein outlines the staining obtained for bassoon, which is localized in the synaptic ribbons in cones and rods in this layer, as well as in bipolar cells and in the active zone of the conventional synapses of amacrine cells in the IPL [41]. Synaptophysin is a protein localized in the membrane of the synaptic vesicles of photoreceptor cells in the OPL, as well as in bipolar and amacrine cell presynaptic terminals in the IPL, in both ribbon and conventional synapses [42]. According to this, we probably detected CRB3 together with synaptophysin in the synaptic vesicles, although since we found some synaptophysin single-labeled profiles in the IPL, CRB3 might not be ubiquitous in this layer. In agreement with this latter notion, CRB3 has already been described in vesicles, such in early endosomes in Caco2 cells, a cell line from epithelial colorectal adenocarcinoma cells [43]. In the retina, the correct transport of synaptic vesicles is needed to ensure correct signal transmission, and some members of the Crumbs complex have been described to be present in presynaptic vesicles, such as MPP4 [26]. Other authors have also described the presence of MPP4 in the plasma membrane of the photoreceptors synaptic terminals, in both cones and rods [27]. In the present work, we show that the colocalization of CRB3 and MPP4 is complete in the OPL. In these photoreceptors presynaptic terminals, CRB3 colocalized with recoverin and it showed partial colocalization with cones markers. Furthermore, the double labeling PNA/CRB3 showed that CRB3 might be present along the base of the cone terminals. Taken together, our findings and previous works, it seems that CRB3 is located in the membrane of presynaptic vesicles, as well as in the plasma membrane of both types of photoreceptors synaptic terminals, where, together with MPP4, it may help in the organization of the presynaptic complex. In addition, the synapses made by both types of photoreceptor cells in the OPL contain VGLUT1, the vesicular transporter of glutamate, which is the major excitatory neurotransmitter in the retina [28,29] and CRB3. Nevertheless, in the large terminals of photoreceptors and rod bipolar cells, CRB3/VGLUT1 did not show a complete colocalization, which suggests that CRB3 may not be uniformly distributed in synaptic vesicles or may be present in different compartments of the synaptic terminals.

Photoreceptor cells grow during the different stages of embryo development [44,45], and at P0 both types express recoverin. The recoverin/CRB3 double immunolabeling located the CRB3 protein precisely in the developing synaptic terminals that were organizing the incipient OPL and in the budding IS, where it has been described that recoverin is first expressed [24]. At P4, when only cone terminals are present, since rod terminals invade later [23] we found CRB3 positive processes in the OPL. This developmental data strongly suggest that the cone terminal expresses CRB3, but the PNA or opsin/CRB3 double labeling of the cone IS does not clearly resolve whether this protein is present in the cones IS. Besides, at P4, we found some CRB3 positive cells, but not for recoverin, vitreally to the developing

OPL. This suggests that CRB3 could be present in a type of cell other than photoreceptors during the maturation of the retina and/or that CRB3 could be located in photoreceptors synaptic terminals before they express recoverin. Taking all these results together and since it has been previously demonstrated the importance of the CRB3 protein in the adhesion properties of several epithelial tissues [7], it is possible that CRB3 could play a role in the establishment of the photoreceptor cells synaptic contacts in the OPL.

We have also analyzed the presence of CRB3 in the processes that organize the IPL. In this layer the processes of the bipolar cells establish synaptic contacts by mean of ribbon synapses, which also express synaptophysin, bassoon and VGLUT1 [29]. The colocalization of CRB3 and synaptophysin labeling would be consistent with CRB3 localization in synaptic vesicles. In contrast, and similarly to what we observed in the OPL, the VGLUT/CRB3 colocalization pattern suggests that CRB3 may not be uniformly distributed in the synaptic vesicles or may be present in different compartments of these terminals. There is also a discrete colocalization of TH and CRB3 in the outermost portion of the IPL, suggesting that CRB3 is present in specific domains, likely synapses, within the processes of the large dopaminergic amacrine cells. In sublamina 5 of the IPL there are processes of the rod bipolar cells that express PKC α [46]. Besides, GNB3 is located in the axon terminals of the cone-ON bipolar cells [47]. Since we found colocalization of CRB3 with VGLUT1, PKC α and GNB3, but not with CR, CB or TH, this therefore suggests that in the IPL, CRB3 is present in rod and in cone bipolar cells. In addition, in some areas of the IPL we found CRB3 labeling to form a ring pattern associated with PKC α rod bipolar cell terminals that could reflect the presence of CRB3 either in the bipolar cell terminal itself or in presynaptic terminals of amacrine cells that provide input to the bipolar cell terminal. Also, most conventional synapses made in the IPL release the inhibitory neurotransmitter GABA [29]. GAD65 and 67 are the two isoforms of the enzyme glutamate decarboxylase, which catalyzes the decarboxylation of glutamate to GABA in the retina [32,48,49]. It has been reported that in mammalian retinas, the GABAergic amacrine cells can express either or both GAD isoforms [49,50]. Using an antibody that recognizes both GAD isoforms, we have shown in the present work that CRB3 colocalizes with most GAD65/67 processes. Hence, taken all this results together, we propose that in the IPL, the CRB3 protein may be broadly and mainly present in GABAergic amacrine cells, as well as in glutamatergic bipolar cells.

CRB3 and the Crumbs Complex

The members of the CRB family (CRB1, CRB2 and CRB3) organize a protein scaffold involved in the maintenance of adherens junctions in the SAR of the OLM and in the polarization of photoreceptor cells [7,14,15]. This protein scaffold is formed by the so-called Crumbs complex, which comprises a group of proteins, including several members of the CRB and the MAGUK protein families.

MPP4, a MAGUK protein, and also a member of the Crumbs complex in the retina, has been detected in the SAR, but its expression is greater in the OPL, in the cones and rod synaptic terminals [25,26,27]. In both areas, MPP4 has been located in vesicles [26], as well as in the plasma membrane of the photoreceptors presynaptic terminals [27]. Moreover, in a different study the authors also detected this protein at the level of the photoreceptor connecting cilium and in the IPL in bovine and pig retina [51]. The MPP4 protein is formed by several domains able to mediate protein-protein interactions, such as the L27 or the PDZ domains [51,52]. Although the role of MPP4 in the

mammalian retina is still not clear, a study using Mpp4 knockout mice has shown a loss in the signal of plasma membrane Ca²⁺ ATPases (PMCAs) associated with photoreceptor presynaptic membranes, a perturbation in Ca²⁺ homeostasis and in signal transmission between rods and bipolar cells [27]. The CRB3 protein has a PBM domain in its intracellular portion, which is amenable to binding to the MPP4 PDZ domain.

In summary, although CRB3, as a member of the CRB protein family is known to be involved in the development of adhesion complexes and in the apico-basal determination of several cell types, the distribution and role of this protein in the development of the retina is still poorly understood. In the present work we report evidences that CRB3 is present throughout the inner segment of the photoreceptor cells, where it is especially concentrated in the connecting cilium area in adulthood, as well as during their development. Also, we found this protein in the OPL and in the IPL, during development and in the mature mouse retina, an observation hitherto unreported. The spatial and temporal localization of CRB3 in the mouse retina, together with what is known of the role of CRB3 in the establishment of adhesion complexes and in the ciliogenesis in different types of cells make us suggest that CRB3, apart from being crucial in the maintenance of adhesions in the OLM region, could play a role in the development of the connecting cilium and the plexiform retinal layers. It is possible that at least in the OPL, CRB3 might cooperate with MPP4 in the maintenance of PMCAs, Ca²⁺ homeostasis, and in correct signal transmission. Accordingly, we suspect that CRB3 and MPP4 could be associated to establish the Crumbs complex in both plexiform layers: i.e., in the SAR and in the photoreceptor connecting cilium. However, it would be necessary a more detailed study of the localization of MPP4 in these layers to verify such hypothesis. Also, further studies are needed to demonstrate the functional role of this protein during the development and maintenance of all these elements in the mouse retina.

Supporting Information

Figure S1 Peptide competition assay for CRB3 and double immunolabeling CRB3/MPP4 and CRB3/rhodopsin. **A–B**, peptide competition assay for CRB3 where all the labeling disappears in retina cryosections at P0 (**A**) and at P4 (**B**). **C–D**, Immunofluorescence (**C**) and peptide competition assay (**D**) for the anti-MPP4 antibody in the adult mouse retina. **C**, MPP4 is present in the photoreceptor synaptic terminals and in the SAR of the OLM (arrowheads and inset). **D**, the MPP4 staining disappears in the peptide competition assay. **E–F**, CRB3 colocalizes with rhodopsin only at the tips of the rods' IS (arrowheads). OS, photoreceptors' outer segments; IS, photoreceptors' inner segments; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bars: 20 μ m, 5 μ m in inset. (TIF)

Figure S2 CRB3 in the Müller glial cells. Double immunofluorescence for CRB3 (green) and CRALBP (red). **A–C**, CRALBP partially colocalizes with CRB3 in the Müller cells at the level of the OLM (arrowheads). **D–F**, CRALBP and CRB3 do not colocalize in any of the retinal plexiform layers, and the Müller cells processes seem to surround the CRB3 positive profiles (arrows). OLM, outer limiting membrane; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bars: 20 μ m. (TIF)

Acknowledgments

The authors thank Nicholas Skinner for revising the English version of the original manuscript and Ángela Jimeno for her assistance in the characterization of the anti-MPP4 antibody.

References

- den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, van der Velde-Visser SD, et al. (2001) Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* 69: 198–203.
- den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, et al. (1999) Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23: 217–221.
- Heckenlively JR (1982) Preserved para-arteriole retinal pigment epithelium (PPRPE) in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 66: 26–30.
- den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP (2008) Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27: 391–419.
- Tepass U, Theres C, Knust E (1990) crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61: 787–799.
- Izaddoost S, Nam SC, Bhat MA, Bellen HJ, Choi KW (2002) *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* 416: 178–183.
- Richard M, Roepman R, Aartsen WM, van Rossum AG, den Hollander AI, et al. (2006) Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* 15 Spec No2: R235–243.
- den Hollander AI, Ghiani M, de Kok YJ, Wijnholds J, Ballabio A, et al. (2002) Isolation of *Crb1*, a mouse homologue of *Drosophila* crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mech Dev* 110: 203–207.
- van den Hurk JA, Rashbass P, Roepman R, Davis J, Voeseck KE, et al. (2005) Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* 11: 263–273.
- Lemmers C, Medina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, et al. (2002) hNADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 25408–25415.
- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Medina E, et al. (2004) CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15: 1324–1333.
- Makarova O, Roh MH, Liu CJ, Laurinac S, Margolis B (2003) Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302: 21–29.
- Pellikka M, Tanentzapf G, Pinto M, Smith C, McGlade CJ, et al. (2002) Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 416: 143–149.
- van de Pavert SA, Kantardzhieva A, Malysheva A, Meuleman J, Versteeg I, et al. (2004) Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117: 4169–4177.
- Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, et al. (2003) CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12: 2179–2189.
- van Rossum AG, Aartsen WM, Meuleman J, Klooster J, Malysheva A, et al. (2006) Pals1/Mpp5 is required for correct localization of *Crb1* at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet* 15: 2659–2672.
- Gosens I, den Hollander AI, Cremers FP, Roepman R (2008) Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 86: 713–726.
- Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008) Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778: 614–630.
- Bazellieres E, Assemat E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2009) Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* 14: 2149–2169.
- Fan S, Fogg V, Wang Q, Chen XW, Liu CJ, et al. (2007) A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* 178: 387–398.
- Fan S, Hurd TW, Liu CJ, Straight SW, Weimbs T, et al. (2004) Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol* 14: 1451–1461.
- Liu X, Williams DS (2001) Coincident onset of expression of myosin VIIa and opsin in the cilium of the developing photoreceptor cell. *Exp Eye Res* 72: 351–355.
- Rich KA, Zhan Y, Blanks JC (1997) Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388: 47–63.
- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM, Johnson DA (2003) Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 145: 93–105.
- Aartsen WM, Kantardzhieva A, Klooster J, van Rossum AG, van de Pavert SA, et al. (2006) Mpp4 recruits Pcd95 and Vcl3 towards the photoreceptor synapse. *Hum Mol Genet* 15: 1291–1302.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CL. Performed the experiments: SHM AEP. Analyzed the data: AV JML JA CL. Contributed reagents/materials/analysis tools: DJ AV JA. Wrote the paper: SHM CL.

- Kantardzhieva A, Gosens I, Alexeeva S, Punte IM, Versteeg I, et al. (2005) MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2192–2201.
- Yang J, Pawlyk B, Wen XH, Adamian M, Soloviev M, et al. (2007) Mpp4 is required for proper localization of plasma membrane calcium ATPases and maintenance of calcium homeostasis at the rod photoreceptor synaptic terminals. *Hum Mol Genet* 16: 1017–1029.
- Johnson J, Tian N, Caywood MS, Reimer RJ, Edwards RH, et al. (2003) Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci* 23: 518–529.
- Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ (2003) Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 465: 480–498.
- McGinnis JF, Stepanik PL, Bachr W, Subbaraya I, Lerious V (1992) Cloning and sequencing of the 23 kDa mouse photoreceptor cell-specific protein. *FEBS Lett* 302: 172–176.
- Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, et al. (1991) Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251: 915–918.
- Haverkamp S, Wassle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424: 1–23.
- Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Savy C (1997) Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals. *Microsc Res Tech* 36: 26–42.
- Haverkamp S, Inta D, Monyer H, Wassle H (2009) Expression analysis of green fluorescent protein in retinal neurons of four transgenic mouse lines. *Neuroscience* 160: 126–139.
- Polevoda B, Sherman F (2002) The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 3: reviews0006.
- Sedmak T, Wolfrum U (2010) Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J Cell Biol* 189: 171–186.
- Evans RJ, Schwarz N, Nagel-Wolfrum K, Wolfrum U, Hardcastle AJ, et al. (2010) The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum Mol Genet* 19: 1358–1367.
- 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: 1711–1717.
- Goda Y (2002) Cadherins communicate structural plasticity of presynaptic and postsynaptic terminals. *Neuron* 35: 1–3.
- Fu X, Sun H, Klein WH, Mu X (2006) Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* 299: 424–437.
- Brandstatter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wassle H (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11: 3683–3693.
- Brandstatter JH, Lohrke S, Morgans CW, Wassle H (1996) Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptopodin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 370: 1–10.
- Michel D, Arsanto JP, Massey-Harroche D, Beclin C, Wijnholds J, et al. (2005) PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci* 118: 4049–4057.
- Marquardt T, Gruss P (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* 25: 32–38.
- Hatakeyama J, Kageyama R (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15: 83–89.
- Pignatelli V, Strettoi E (2004) Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol* 476: 254–266.
- Ritchey ER, Bongini RE, Code KA, Zelinka C, Petersen-Jones S, et al. (2010) The pattern of expression of guanine nucleotide-binding protein beta3 in the retina is conserved across vertebrate species. *Neuroscience* 169: 1376–1391.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91–100.
- Vardi N, Auerbach P (1995) Specific cell types in cat retina express different forms of glutamic acid decarboxylase. *J Comp Neurol* 351: 374–384.
- Andrade da Costa BL, Hokoc JN (2003) Coexistence of GAD-65 and GAD-67 with tyrosine hydroxylase and nitric oxide synthase in amacrine and interplexiform cells of the primate, *Cebus apella*. *Vis Neurosci* 20: 153–163.
- Stohr H, Stojic J, Weber BH (2003) Cellular localization of the MPP4 protein in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 5067–5074.
- Stohr H, Weber BH (2001) Cloning and characterization of the human retina-specific gene MPP4, a novel member of the p55 subfamily of MAGUK proteins. *Genomics* 74: 377–384.

Conclusions

1. The antibodies designed at our laboratory to recognize the CRB1, CRB3 and MPP4 proteins are suitable and effective to study their location and expression in the mouse retina.
2. The outer limiting membrane of the *Crb1^{rd8}* mouse retina shows modifications starting at the stage of P7 in the ventro-nasal region, showing the loss of certain adherens junctions. The beginning of the degeneration in the *Crb1^{rd8}* retina is then earlier to what it had been reported for this animal and for the rest of the *Crb1* mouse mutant models.
3. The expression of the CRB1 truncated protein synthesized in the *Crb1^{rd8}* retina leads to changes in the location and levels of the MAGUK proteins associated to CRB, such as PALS1 and MPP4, which will then modify the intracellular protein scaffold established by CRB1 in the mouse retina.
4. Defects of the adherens junctions of the outer limiting membrane in the *Crb1^{rd8}* mouse retina cause severe modifications in the photoreceptors' cells, which will lose their polarity and will establish rosettes starting at P7. In the course of degeneration, the rosettes mature, some apoptotic photoreceptors appear, the number of cones cells is reduced and there are some modifications in proteins with an important role in the correct function of the photoreceptor cells.
5. Müller cells become reactive at P7 in the retina of the *Crb1^{rd8}* mouse, with an increase of the GFAP expression and in the retinal vascularization. In the adult retina, the glial reactivity is stronger showing a conservative type response, which it means overexpression of GFAP, ectopic Müller cells nuclei and some modifications in proteins involved in the metabolism of these cell as well as in the Kir 4.1 channels, which it may lead to a lower conductivity for K⁺ and a more severe degeneration.
6. In primary cultures, Müller cells obtained from the *Crb1^{rd8}* mutant mouse show changes in the cell viability and proliferation in comparison to wild-type Müller cells, which it can be related with the role of CRB1 in cell adhesion.
7. SOX2 is a transcription factor located in the nuclei of reactive Müller cells in culture and in the cytoplasm in non-reactive Müller cells. This protein is mainly sumoylated and probably acetylated in these cells, which it could prevent these cells from becoming more proliferative.
8. The method to deliver native proteins into the cytoplasm named Chariot[®], is suitable to transfect wild-type and *Crb1^{rd8}* Müller cells in culture. Subretinal injections are the most effective approach to deliver proteins by using this method into the retina *in vivo*.
9. During postnatal development and in adulthood, CRB3 is present throughout the inner segment of the photoreceptor cells, where it is especially concentrated in the connecting cilium area, and in the outer and inner plexiform layers, an observation hitherto unreported.
10. CRB3 could play a role in the development of the connecting cilium as well as in the establishment and in the maintenance of the plexiform retinal layers. At least in the outer plexiform layer, CRB3 interacts with MPP4 to assemble a protein complex which could participate in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis and in correct signal transmissions, functions associated with MPP4.

Mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1 provocan Retinosis pigmentaria y Amaurosis congénita de Leber. El ratón mutante *Crb1^{rd8}* sufre una mutación en *Crb1* que se asemeja a la que ocurre en humanos. En este trabajo de Tesis Doctoral demostramos que las alteraciones en la retina de este ratón se manifiestan desde el estadio postnatal de P7 con modificaciones en la membrana limitante externa, fallos en el complejo intracelular ensamblado por CRB1, formación de rosetas de fotorreceptores, degeneración de ese tipo celular y una temprana activación de la respuesta glial.

Se desconoce que mutaciones en CRB3 sean causas de distrofias retinianas. De hecho su localización en la retina silvestre está poco estudiado. Nosotros hemos demostrado que esta proteína se localiza desde estadios tempranos del desarrollo postnatal en los segmentos internos de los fotorreceptores, especialmente en el cilio de conexión, así como en ambas capas plexiformes de la retina.

