



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Sal

800 AÑOS

1218 - 2018

Caracterización de la expresión, localización y funciones de la proteína de polaridad celular CRB2 en cerebro murino y humano



Tesis doctoral

Jorge Fernández Dolón
Salamanca, 2018





Caracterización de la expresión, localización y funciones de la proteína de polaridad celular CRB2 en cerebro murino y humano

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Jorge Fernández Dolón
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Salamanca

Jorge Fernández Dolón

Salamanca, septiembre 2018



Departamento de Biología Celular y Patología
Instituto de Neurociencias de Castilla y León

**Caracterización de la expresión,
localización y funciones de la proteína de
polaridad celular CRB2 en cerebro murino
y humano**

Memoria de tesis doctoral

dirigida por la Prof. Dra. D^a María Concepción Lillo Delgado



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
M^a CONCEPCIÓN LILLO DELGADO
INCyL – C/ Pintor Fernando Delgado, 1
E-37007 Salamanca (España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 5334 · Fax: +34 923 294750

Salamanca, 31 de julio de 2018

D^a María Concepción Lillo Delgado, Profesora Titular de Biología Celular

HACE CONSTAR:

QUE la Tesis Doctoral titulada “Caracterización de la expresión, localización y funciones de la proteína de polaridad celular CRB2 en cerebro murino y humano”, ha sido realizada por el licenciado en Biología D. Jorge Fernández Dolón en el departamento de Biología Celular y Patología y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

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

QUE, en mi opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales, y por tanto, autorizo la defensa de la Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmo en Salamanca, a 31 de julio de 2018

La directora

Fdo.: M^a Concepción Lillo Delgado

A mis biólogos, porque sin ellos, biología no hubiera tenido el mismo sentido, y porque son el claro ejemplo de que hay personas maravillosas en el mundo.

A todos mis compañeros del laboratorio 3 del INCyl. A Saúl, por iniciarme en este camino; a Begoña, por sus sabios consejos; a Laurita, por tan buenos momentos entre horóscopos y potitos; a Saray y su más que disponibilidad en cualquier aspecto de la vida; Antonio, gracias por todo y por tanto, por guiarme y enseñarme todo lo que sé. A Juan Carlos y sus chicos (Laura, Cristina, Julia, Carlos y María) por la compañía y los buenos consejos todos estos años.

Por supuesto a mis compañeros inseparables Vicente y Alicia, porque creo que formamos los vértices de un perfecto triángulo equilátero; por compartir los buenos, los malos momentos, y porque nos han hecho ser expertos en eso de nadar a contracorriente.

A Conchi, por confiar en mí y ofrecerme esta oportunidad. Por permitirme formar parte del #CRBteam y enseñarme a ser científico.

Al repositorio Sci-hub y al papel que desempeña en el acceso abierto a la ciencia, sin el cual la mitad de este trabajo no hubiera sido lo mismo.

A toda esa generación que nunca hemos entendido ni de puertas ni de salidas y hemos creído en nosotros mismos para ir creando nuestro propio camino, la generación de lo hacemos y ya vemos.

Por supuesto a mi familia, sin la que todo esto no hubiera sido posible

Gritémonos bien fuerte los defectos,
todos aquellos malos momentos,
que nos fueron desgastando.
Hagamos caso, al pretérito imperfecto,
que de todos aquellos recuerdos,
solo salvamos los buenos

Conclusión do para ukelele – Izal
Magia y efectos especiales 2012

Índice

<i>Abreviaturas</i>	17
<i>Introducción</i>	19
1._ Desarrollo del sistema nervioso central.....	21
1.1._ Inducción Neural	23
1.1.1._ Ácido retinoico	25
1.1.2._ Factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	26
1.1.3._ Sonic Hedgehog (shh).....	26
1.1.4._ Wnt.....	26
1.1.5._ Notch.....	26
1.1.6._ Mecanismos de inducción neural	27
1.2._ Diferenciación inicial entre las neuronas y la glía	27
1.3._ Morfogénesis de la corteza cerebral.....	29
1.4._ Nueva formación de neuronas en el sistema nervioso central de adultos.....	31
2._ Polaridad celular	34
2.1._ Establecimiento de la polaridad celular	34
2.1.1._ Complejo de polaridad Par.....	35
2.1.1.1._ Proteína Par3.....	36
2.1.1.2._ Proteína Par6.....	37
2.1.1.3._ Proteína aPKC.....	38
2.1.2._ Complejo de polaridad Crb	38
2.1.2.1._ Proteínas CRB	39
Proteína CRB1	41
Proteína CRB2	41
Proteína CRB3	42
2.1.2.2._ Proteína Pals1	43
2.1.2.3._ Proteína PatJ	44
2.1.3._ Complejo de polaridad Scrib	44
2.1.3.1._ Proteína SCRIB.....	44
2.1.3.2._ Proteína DLG	46
2.1.3.3._ Proteína LGL.....	46
2.2._ La célula y la polaridad	47
3._ Modelos animales para el estudio de CRB.....	50
3.1._ Modelos animales con defectos en CRB2	50
3.2._ Ratón mutante CRB1 ^{rd8}	51

4._ CRB2 y enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer	52
<i>Justificación, hipótesis y objetivos</i>	57
<i>Materiales y métodos</i>	63
Material	65
1._ Animales de experimentación	65
2._ Muestras humanas	65
Métodos	66
3._ Genotipado de animales de experimentación	66
3.1._ Extracción de ADN	66
3.2._ Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	67
3.3._ Electroforesis	67
4._ Cultivos celulares	68
4.1._ Cultivos primarios de corteza e hipocampo de ratón	68
4.1.1._ Disección, disgregado del tejido y siembra de neuronas	69
4.2._ Cultivos de células Human Embryonic Kidney (HEK) 293 y HEK293-FT	70
5._ Producción y amplificación de plásmidos	71
6._ Transfección de cultivos celulares por el método del fosfato cálcico	73
7._ Generación de partículas lentivirales e infección de neuronas corticales y de hipocampo de ratón	74
7.1._ Producción de factores lentivirales en células HEK293-FT	74
7.2._ Infección de neuronas con partículas lentivirales	75
8._ Producción de anticuerpos	75
9._ Inmunofluorescencia	76
9.1._ Procesamiento de secciones	76
9.2._ Procesamiento de cultivos celulares	77
10._ Inmunohistoquímica con el método Avidina-Biotina-Peroxidasa	78
11._ Western Blot	81
12._ Marcaje de β -amiloide en secciones de cerebro humano	83
13._ Estudio de polimorfismos de un único nucleótido	84
14._ Imágenes de fluorescencia	85
15._ Análisis estadístico	86
<i>Resultados</i>	89
1._ Expresión y distribución de CRB2 en tejidos de ratón adulto	91
1.1._ Presencia de CRB2 distintos tejidos de derivados epiteliales	92
1.2._ Localización y distribución de la proteína CRB2 en cerebro de ratón	95

2._ CRB2 está presente en neuronas	96
3._ Análisis comparativo de la expresión de CRB2 en ratón control y mutante para CRB1 ...	104
4._ Caracterización de CRB2 en un modelo <i>in vitro</i>	110
4.1._ Caracterización de del proceso de diferenciación de los cultivos primarios	111
4.2._ CRB2 se expresa en los cultivos neuronales	112
4.3._ CRB2 en cultivo de neuronas de hipocampo	119
4.4._ CRB2 presenta una expresión temprana en el mutante CRB1 ^{rd8}	120
5._ CRB2 y silenciamiento	122
6._ Análisis de la expresión de CRB2 en muestras humanas	126
6.1._ CRB2 y enfermedad de Alzheimer	126
6.2._ CRB2 y degeneración de retina	128
<i>Discusión</i>	131
1._ Expresión de CRB2 en el ratón adulto.....	133
1.1._ Expresión de CRB2 en cerebro y derivados epiteliales	133
1.1.1._ Expresión y localización de CRB2 en cerebro de ratón adulto.....	134
1.1.2._ CRB2 en el cerebro del ratón mutante CRB1 ^{rd8} : estudio comparativo	140
2._ CRB2 en neuronas: cultivos primarios neuronales	141
2.1._ Formación de los complejos de polaridad	142
2.2._ Relación temporal de la expresión de proteínas neuronales, vesiculares y de uniones celulares	143
2.3._ Expresión de las proteínas de los complejos de polaridad en el ratón mutante CRB1 ^{rd8}	147
2.4._ Consecuencias del silenciamiento <i>in vitro</i> de la proteína CRB2	147
3._ CRB2 y enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer.....	150
4._ CRB2 y su posible relación con retinopatías	152
<i>Conclusiones</i>	155
<i>Bibliografía</i>	159
<i>Anexo</i>	181

Abreviaturas

Aβ = β -Amiloide	HEK293 = Células embrionarias de riñón humano (Human Embryonic Kidney)
APP = Proteína Precursora de β -amiloide	Iba1 = Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1
ArchL = Núcleo Arcuato Lateral	iNOS = Óxido Nítrico Sintasa inducible
bHLH = Factor de transcripción Hélice-Bucle-Hélice	IPC = Precursores Celulares Intermediarios
BMP = Proteína morfogénica del hueso	LB = Luria Broth (medio de cultivo)
BSA = Albúmina de Suero Bovino	MAP2 = Proteína tipo 2 asociada a microtúbulos
BO = Bulbo Olfativo	MAGUK = Proteína Guanilato Quinasa Asociada a Membrana.
Cb = Cerebelo	Me5 = Núcleo mesencefálico del trigémino
CMR = Corriente Migratoria Rostral	MPP4 = Proteína de membrana palmitoilada tipo 4
CMVM = Corriente Migratoria Ventromedial	MNI = Migración Nuclear Intercinética
CMVC = Corriente Migratoria Ventrocaudal	NCP = Células Progenitoras Neuronales
CX = Corteza	NeuroD1 = Factor de diferenciación neuronal tipo 1
CxFr = Corteza frontal	Olig1 = Factor de transcripción tipo I de oligodendrocitos.
DA = Área Dorsal del hipotálamo	opt = Tracto óptico
DCX = Doblecortina	P = Edad postnatal
DIC = Días de cultivo	Pals1 = Proteína asociada con LIN7
DMH = Núcleo Dorsomedial del hipotálamo	pb = Pares de bases
E = Estado embrionario	PBS = Tampón fosfato salino
EA = Enfermedad de Alzheimer	PBS-Tx = Tampón fosfato salino con tritón al 0,02%
EP = Epitelio Pigmentario	PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa
FGF = Factor de Crecimiento Fibroblástico	PFA = Paraformaldehído
GD = Giro Dentado	PSD95 = Proteína de densidad postsináptica 95
GFAP = Proteína Ácida Fibrilar de la Glía	
GLAST = Transportador Específico Aspartato-Glutamato	
H = Hipotálamo	
Hc = Hipocampo	

PVN = Núcleo Periventricular del hipotálamo dorsal

Rab = Subfamilia de proteínas Ras GTPasas

Rchl = Área supraóptica retroquiasmática

Shh = Sonic hedgehog

sh = shRNA, ARN de horquilla pequeña

SNC = Sistema Nervioso Central

SOR = Núcleo Supraóptico Retroquiasmático

SYP = Sinaptofisina

TA = Temperatura ambiente

TBE = Tampón Tris-Borato EDTA

TBS = Tampón Tris-Base Salino

TBST = TBS con Tween-20

TBST-BSA = TBST con BSA

TEM = Transición Epitelio Mesénquima

Tuj1 = β -Tubulina III específica de neuronas

VL = Ventrículo Lateral

VMH = Núcleo Ventromedial del hipotálamo

VPS35 = Proteína vacuolar 35

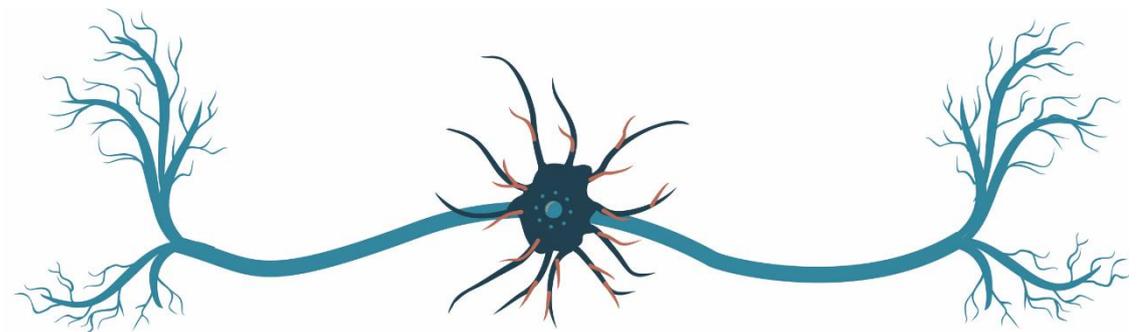
WNT = Proteína que activa las rutas de señalización WNT

ZSV = Zona Subventricular

ZV = Zona Ventricular

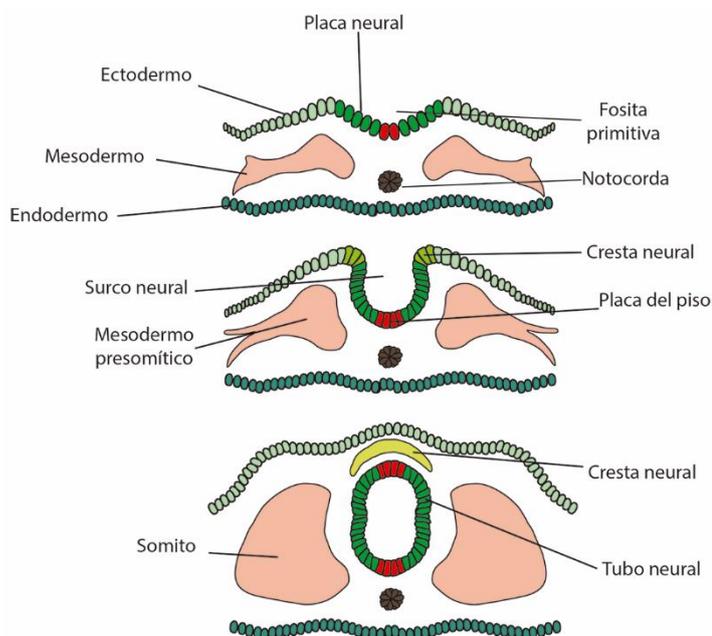
ZSG = Zona Subgranular del giro dentado

Introducción



1._ Desarrollo del sistema nervioso central

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC), está regido por una serie de acontecimientos perfectamente orquestados y ordenados en el tiempo que se producen antes de que se establezcan los contactos sinápticos, es decir previo a la actividad neural. De modo que procesos como el establecimiento inicial del sistema nervioso primordial, la diferenciación de los distintos tipos celulares a partir de sus precursores indiferenciados, la formación de regiones cefálicas principales y la posterior migración de neuronas desde los sitios de generación hasta sus posiciones finales, son procesos que determinan el desarrollo del SNC (Purves. et al., 2004). Es por ello que este desarrollo se divide en varios acontecimientos entre los que se encuentran: migración celular, establecimiento de la polaridad celular, formación de



Esquema 1. Proceso de gastrulación y neurulación en un embrión de mamífero. Modificado de Dale, J et al. 2004.

neuritas y axones, maduración, establecimiento y eliminación de sinapsis o poda neural (Valtorta, Pozzi, Benfenati, & Fornasiero, 2011).

El primer proceso que tiene lugar es el establecimiento de la polaridad del embrión, constituyéndose un eje antero-posterior y otro latero-medial, y las capas de células primordiales que, en última instancia, acabarán formando el sistema nervioso.

En embriones de vertebrados, para que tenga lugar todos estos procesos es esencial la fase de gastrulación, proceso por el cual, a partir de una única lámina de células, se producirá una invaginación que acabará originando las tres capas germinativas: el ectodermo o capa más externa, el mesodermo o intermedia y el endodermo o la más interna (**Esquema 1**). Es en la parte superior del endodermo y del mesodermo que se invaginan en este proceso, donde se establece la línea media definiendo en todos los embriones de vertebrados los ejes antero-posterior y dorso-ventral.

La consecuencia directa del proceso de la gastrulación es la formación de una estructura constituida por células mesodérmicas conocida como notocorda (**Esquema 1**) que se va a extender a lo largo del embrión, desde la parte medio-anterior hasta la parte posterior. La formación de la notocorda consiste en una invaginación de una agregación mesodérmica que se extiende desde una parte superficial conocida como fosita primitiva, que acabará alargándose y produciendo la línea primitiva. Tras todos estos movimientos celulares complejos, la notocorda acaba definiendo un eje total de asimetría, y por encima de él, se encuentra el ectodermo que pasa a ser conocido como neuroepitelio o neuroectodermo, pues dará origen a la totalidad del sistema nervioso. Además de establecer la simetría del organismo, la notocorda presenta un importante papel en la producción de señales inductivas en el ectodermo suprayacente permitiendo que un conjunto de células neuroectodérmicas se diferencien en células precursoras nerviosas, iniciando el proceso que se conoce como neurulación (Purves. et al., 2004).

Las células ectodérmicas precursoras nerviosas se ensanchan constituyendo la placa neural que se pliega y constituye el tubo neural que dará origen al encéfalo y a la médula espinal (**Esquema 1**). El tubo neural consiste en un neuroepitelio que en aves y mamíferos, se trata de un epitelio simple estratificado columnar, cuyas células presentan núcleos en posiciones ápico-basales como consecuencia de movimientos nucleares concretos, migración nuclear intercinética (MNI), en función del estadio del ciclo celular en el que se encuentren (Nikolopoulou, Galea, Rolo, Greene, & Copp, 2017; Paridaen & Huttner, 2014). Se sabe que al menos en vertebrados, el proceso de la neurulación es un mecanismo complejo en el que intervienen complejos procesos morfogénéticos necesarios para coordinar tanto acontecimientos celulares como moleculares, y en el caso de mamíferos, se encuentra regulado por al menos 300 genes diferentes (Nikolopoulou et al., 2017). De manera general, la neurulación se divide en primaria, en la que los bordes de la placa neural forman los pliegues neurales que se aproximarán entre ellos formando un surco en forma de U que acabará cerrándose constituyendo el tubo neural y neurulación secundaria donde las células de la placa neural migrarán hacia el interior del embrión formando el tubo neural a lo largo de todo el individuo.

Las células progenitoras del tubo neural son también conocidas como células precursoras neurales; son células madre neurales en división con la capacidad de producir más precursores que tendrán la misma capacidad de originar tanto neuronas como células gliales, astrocitos o la oligodendroglía. Algunos subgrupos de éstas originarán neuroblastos que pierden la capacidad de división y se diferencian a neuronas. Las únicas con capacidad de dar

neuroblastos provienen de la diferenciación de un conjunto de células del tubo neural muy próximas a la notocorda que constituyen lo que se conoce como placa del piso. Las señales inductoras de la notocorda actúan sobre las células del piso, de forma que las situadas más ventralmente acabarán produciendo neuronas motoras de la médula espinal y del encéfalo posterior; mientras que las más alejadas de las posiciones ventrales, acabarán produciendo las neuronas de relevo sensitivo de la médula espinal y el encéfalo posterior (Purves. et al., 2004).

Fue de la mano del embriólogo suizo Whilhem cuando en 1968 se identificó por primera vez un conjunto de células comprendidas entre el tubo embrionario y la epidermis embrionaria, es decir, la parte más dorsal del tubo neural. Posteriormente, a esta población de células especializadas pasó a conocerse como células de la cresta neural (**Esquema 1**) (Shyamala, Yanduri, Girish, & Murgod, 2015), células embrionarias multipotentes únicas en vertebrados (Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012), originadas a partir de los bordes donde se unen la placa neural plegada. La progenie de estas poblaciones origina tanto estructuras neurales como no neurales como es caso del hueso, el cartílago o células pigmentarias (Purves. et al., 2004; Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012).

1.1._ Inducción Neural

Como consecuencia del proceso de gastrulación y neurulación se forman un conjunto de precursores neuronales derivados de células ectodérmicas que son esenciales para el desarrollo del SNC. Además, se ha comprobado que existen diversas señales tanto endógenas como exógenas, que van a conseguir una modulación espacial y temporal de la expresión de distintos genes esenciales en la caracterización de la identidad celular de estos precursores, siendo el proceso de la inducción celular, uno de los mecanismos para realizarlo (Purves. et al., 2004).

Con el proceso de inducción se consigue que se separe el tubo neural del ectodermo, haciendo que las células localizadas a ambos lados del tubo neural experimenten una transición epitelio-mesénquima hacia células de la cresta neural (Shyamala et al., 2015). Entre las distintas señales que fomentan la inducción neural y en definitiva la formación de las células de la cresta neural, es de destacar la proteína morfogenética del hueso (BMP), Wnt y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), entre muchas otras. Como fin último de la inducción se producirá la regulación de la expresión de genes de las células diana que provocan cambios en la diferenciación celular mediante un gradiente de difusión, o por una actividad graduada en función de la distribución de sus receptores.

La inducción de las células de la cresta neural se produce en varias fases. En una primera fase será el FGF el que ayude en la inducción, bien directamente o bien a través de la señalización de Wnt; para ello, el BMP tiene que ser inhibido, por lo que el FGF actúa como antagonista del mismo. En una segunda fase se inhibe el FGF, activando BMP, que junto con la señalización Wnt, convergen para actuar como una ruta de señalización (Shyamala et al., 2015). Como resultado de la activación de estas rutas de señalización se consigue la expresión de diversos factores de transcripción reguladores que determinan la correcta inducción de las células de la cresta neural (Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012). La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un conjunto de procesos moleculares que producen un cambio en el patrón de expresión de una célula con fenotipo epitelial a otra con fenotipo mesenquimático (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Junto al concepto de TEM, es importante introducir el concepto de delaminación, con el fin de no confundirlos, pues este último consiste en la división de un tejido independientemente de sus mecanismos celulares (Theveneau & Mayor, 2012). Se sabe que todas las células del SNC sufren durante su proceso de desarrollo una transición epitelio-mesénquima, proceso especialmente marcado por cambios en la arquitectura y en la adhesión celular (Shyamala et al., 2015), pero su inicio y su fin no tiene por qué coincidir con el proceso de la delaminación. Se ha comprobado cómo durante el proceso de la TEM la mayoría de las células pierden primero la adhesión celular y la polaridad ápico-basal, aunque no tiene por qué producirse así, pues pueden emigrar con la adhesión celular intacta y la pérdida de polaridad ápico-basal puede ocurrir antes o después de la migración (Theveneau & Mayor, 2012). La TEM tiene lugar especialmente durante el periodo de desarrollo embrionario donde, células epiteliales con ejes de polaridad ápico-basales perfectamente establecidos, comunicadas con células vecinas por uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas y separadas de tejidos adyacentes por la lámina basal, sufren una serie de cambios fenotípicos que consisten en la pérdida de uniones celulares, de la polaridad celular, así como la adquisición de propiedades nuevas como la capacidad de migración, transformándose en definitiva en un fenotipo mesenquimático (Thiery et al., 2009). La TEM es un proceso que no tiene por qué ser irreversible, es decir, se podría pasar de una transición epitelio-mesénquima a una transición mesénquimo-epitelial tras varias rondas de transiciones epitelio-mesenquimales; de modo que se puede hablar de una transición epitelio-mesénquima primaria (que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y culmina con la formación de las células de la cresta neural), secundaria (que se produce en estructuras epiteliales como la notocorda, los somitos, la somatopleura y la esplancopleura, formando células mesenquimáticas que se diferencian en distintos tejidos endodérmicos como las glándulas pancreáticas o los

divertículos hepáticos) y terciaria (como es el caso de la formación de las almohadillas mesenquimáticas que acabarán produciendo las válvulas cardíacas) (Thiery et al., 2009).

Como se indica en la revisión bibliográfica de Theveneau (Theveneau & Mayor, 2012), al menos en embriones de pollo (aunque se piensa que la cascada de señalización es similar en el desarrollo de las crestas neurales de todas las especies debido al alto nivel de conservación observada), son BMP y la ruta canónica de señalización Wnt los desencadenantes de la delaminación en las crestas neurales del tronco del embrión promoviendo la TEM al activar los factores de transcripción Snail2 y Foxd3 que junto con Sox9 y Sox10 producen un cambio de N-Cadherina a Cadherinas de tipo II (Cadherina6B, 7 y 11), que activa a integrina B1 y que a su vez estimula la síntesis de laminina y la degradación de la lámina basal, promoviendo la supervivencia celular y la integridad de la identidad de las células de la cresta neural (Cheung et al., 2005; Dottori, Gross, Labosky, & Goulding, 2001; Theveneau & Mayor, 2012). Del mismo modo, se cree que es la regulación de la actividad y/o expresión de las cadherinas las dianas de los distintos factores de transcripción responsables no solo de promover la delaminación, sino también de delimitar el territorio migratorio de las células de la cresta neural (Theveneau & Mayor, 2012).

Entre las principales características de las células de la cresta neural destaca su capacidad de migración, que dependerá de una serie de moléculas que actúan como moduladores positivos o negativos en función del efecto que realicen en la migración (Shyamala et al., 2015). El proceso de migración de las células de la zona cefálica se encuentra muy conservado entre especies y se realiza como en ondas continuas de migración alejándose del neuroepitelio; sin embargo, la migración de las células del tronco se realiza con patrones y temporalizaciones muy diversas entre las especies (Theveneau & Mayor, 2012).

1.1.1._ Ácido retinoico

El ácido retinoico es una de las primeras señales inductoras que se identificó. Pertenece a un miembro de la superfamilia de hormonas esteroideas/tiroideas derivado de la vitamina A, con la capacidad de activar distintos factores de transcripción conocidos como receptores retinoides que modulan la expresión de distintos genes. En el sistema nervioso, junto con otras señales inductivas como Wnt o el Factor de crecimiento de Fibroblastos (FGF), se encarga del correcto cierre de la placa y del tubo neural; además, tiene un importante papel en la maduración de las neuronas induciendo la diferenciación de distintos tipos neuronales y de glía (Maden, 2007).

1.1.2._ Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El Factor del Crecimiento Fibroblástico (FGF) es un derivado de las hormonas peptídicas, grupo al que también pertenece el Factor de Crecimiento Transformador (TGF), familia donde se encuentra a las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP), esenciales como se ha explicado anteriormente, en el proceso de la inducción neuronal. Presenta un importante papel en el desarrollo temprano del embrión participando en la formación del mesodermo y ectodermo, en movimientos que tienen lugar durante la gastrulación, en el establecimiento de los ejes antero-posterior y dorso-ventral y en la inducción neural, por medio de la señalización mediadas por MAP quinasas (Erk1 y 2), Proteína quinasa C y PLC- γ (Maden, 2007; Purves. et al., 2004).

1.1.3._ Sonic Hedgehog (shh)

Sonic Hedgehog (Shh), es una hormona peptídica esencial en el proceso de la diferenciación de las neuronas (Bhatt, Diaz, & Trainor, 2013; Purves. et al., 2004). Presenta un importante papel en la maduración del neuroepitelio, así como en el proceso de caracterización tanto de neuronas como de células gliales, por influencia ventral a partir de la notocorda (Nikolopoulou et al., 2017).

1.1.4._ Wnt

Diversos miembros de la familia del gen homólogo en los vertebrados de Wingless de *Drosophila*, Wnt, presentan un papel fundamental en los procesos de inducción y diferenciación de la cresta neural (Burstyn-Cohen, Stanleigh, Sela-Donofeld, & Kalcheim, 2004; Purves. et al., 2004). Se trata de proteínas secretadas que pueden actuar a partir de varias vías distinguiendo por lo tanto dos tipos de rutas de cascadas de señalización Wnt: ruta canónica, donde las proteínas Wnt juegan un papel esencial en la estabilización de β -Catenina, inhiben a la Quinasa GSK3, APC y axina, evitando que β -Catenina sea fosforilada y llevada a degradación, consiguiendo así que β -Catenina se transloque al núcleo donde modulará la expresión de diversos factores de transcripción, modificando la expresión de genes y la ruta no canónica de Wnt, asociada a cambios en el citoesqueleto de la célula por medio de la proteína Rho, asociado a quinasas en la ruta de polaridad planar de la célula, o a cambios en los niveles de calcio intracelulares (Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012).

1.1.5._ Notch

La ruta de señalización Notch tiene una relación directa con el proceso de diferenciación del sistema nervioso. Se ha comprobado que activadores de neurogénesis como pueden ser los factores de transcripción Ascl1 o Neurog1/2, producen también una sobreexpresión de ligandos de la ruta Notch como la proteína Delta Dll1, produciendo la

activación de Notch en células vecinas y desencadenado lo que se conoce como inhibición lateral: al activarse Notch, la parte citoplasmática se desprende de la membrana y viaja al núcleo donde activará la expresión de represores de la neurogénesis como por ejemplo Hes, produciendo una inhibición de la neurogénesis y con ello el mantenimiento en fase de precursor. De esta manera y gracias a la inhibición lateral, se consigue que la diferenciación de una neurona bloquee la diferenciación de las células vecinas, asegurándose la no simultaneidad del proceso de diferenciación de los precursores (Imayoshi & Kageyama, 2014).

1.1.6._ Mecanismos de inducción neural

Las distintas señales inductivas y los diversos efectos que produzcan van a depender de la cantidad de receptores, su localización, así como del mecanismo de acción de los mismos. En el caso de la familia FGF, se trata de receptores protein-quinasa que activan cascadas de señalización vía Ras/MAP quinasa, produciendo, bien cambios en el citoesqueleto que alteran la motilidad celular, bien regulando la expresión de genes que regulan la proliferación celular. Por su parte, los receptores de BMP son serina-treonina quinasa que son capaces de fosforilar al complejo de proteínas citoplasmáticas SMAD, las cuales, al ser fosforiladas, se desplazan al núcleo donde modulan la expresión de genes, entre ellos, los que mantienen la célula en fase G0/G1 disminuyendo la proliferación. Existen distintas moléculas que actúan como antagonistas de la señalización mediada por Factor de Crecimiento Transformante β , en donde se encuentra las BMP. Antagonistas de esta ruta como Nogina o Cordina se unían directamente a las BMP, impidiendo su interacción con el receptor. De este modo, se consigue que el neuroepitelio no pierda su identidad como tal, y que no revierta a epidermis de nuevo a BMP, proceso esencial en la delaminación y en la transición epitelio-mesénquima de las células de la cresta neural (Purves. et al., 2004).

En el caso de Shh, la cascada de señalización requiere de una fijación cooperativa entre Shh y sus receptores que serán internalizados una vez establecida la unión, siendo éstos los complejos que determinen la expresión de diversos factores de transcripción como Gli1, modificando la expresión génica (Purves. et al., 2004).

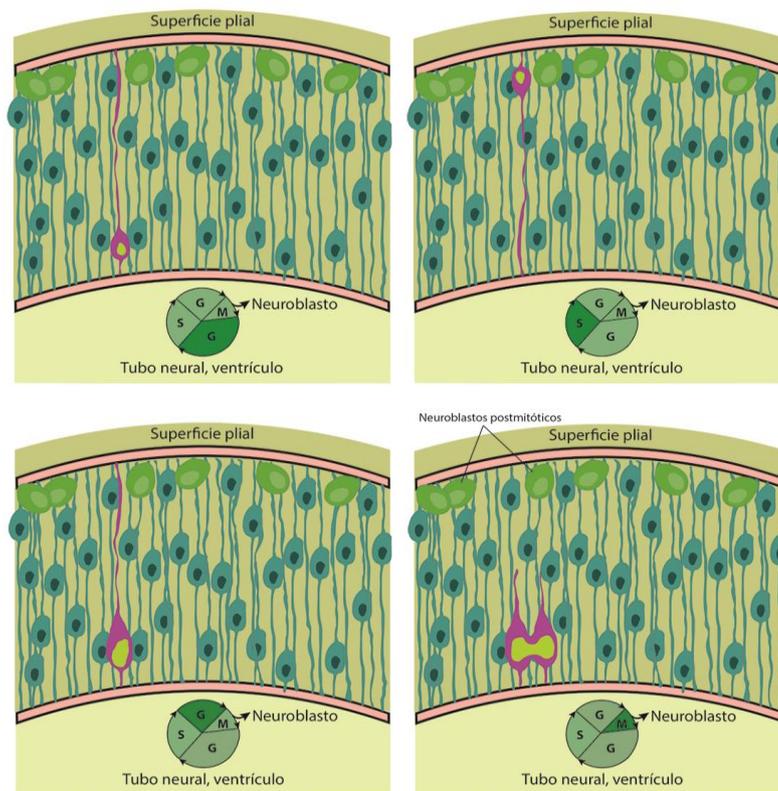
1.2._ Diferenciación inicial entre las neuronas y la glía

Establecidos el encéfalo y la médula espinal primitivos, se produce la diferenciación de los principales tipos celulares del encéfalo: las neuronas y la glía (entre las que se encuentran astrocitos y oligodendrocitos). A la transición de células proliferativas y multipotentes a neuronas y glía se conocen como neurogénesis y gliogénesis respectivamente (Urban & Guillemot, 2014). El proceso de diferenciación de las neuronas tiene lugar en una pequeña

ventana temporal que desaparece antes del nacimiento. A partir de este momento, la formación de neuronas nuevas queda relegada a una pequeña población de células precursoras encargadas de la formación de neuronas en el SNC de adultos.

Es en la zona ventricular donde las células precursoras sufrirán una serie de movimientos celulares a medida que tiene lugar las distintas fases del ciclo mitótico, produciendo la formación de neuroblastos (o células madres neurales) postmitóticos que se diferenciarán en neuronas (**Esquema 2**). A medida que este proceso tiene lugar, las células postmitóticas comienzan a abandonar la zona ventricular para migrar a su posición definitiva en el encéfalo (Nikolopoulou et al., 2017; Purves. et al., 2004). Las células madre neurales proliferan mediante divisiones simétricas originando siempre células precursoras en el palio de la zona ventricular, que posteriormente sufrirán divisiones asimétricas formando una célula madre neural y una célula precursora neuronal, célula inmadura o célula progenitora basal que acabará expresando distintos factores de transcripción y migrando fuera de la zona del ventrículo para llegar

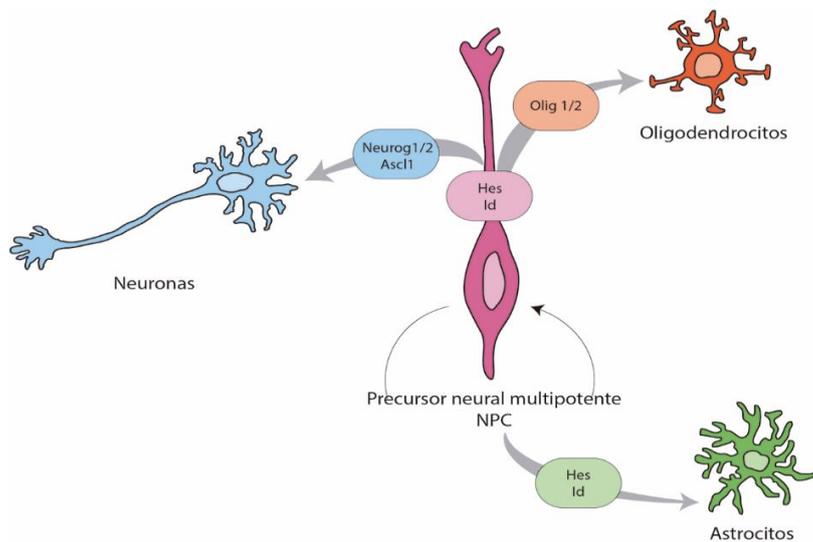
a su posición definitiva y madurar como neurona (Yamaguchi et al., 2016). A este comportamiento que experimenta el complejo mitótico de las células epiteliales, se conoce como migración nuclear intercinética (MNI), que se mantiene en las células de glía radial, y consiste en el movimiento de la posición del núcleo en diferentes estadios del ciclo



Esquema 2. División de las células precursoras del neuroepitelio. Representación del movimiento nuclear intercinético que experimenta el neuroepitelio. En la fase G1 el núcleo se encuentra en la base del ventrículo; en S, migra hacia la superficie plial; en G2, vuelve a la superficie del ventrículo y se prepara para M; por último en M, se originan dos células hijas que pueden reiniciar el ciclo, o formar neuroblastos postmitóticos, que expresarán distintos factores de transcripción y migrarán a otras zonas formando las diferentes células del SNC. Modificado de Dale, J et al. 2004.

celular. De esta manera, los núcleos en fase S se encuentran en la zona apical de la zona subventricular, en fase M en la zona subventricular y en fase G1 y G2 entre las dos anteriores. No se conoce muy bien cuál es su finalidad, pero se piensa que la MNI sirve para mantener la progresión de la división celular, y no está presente en células con una capacidad proliferativa más limitada como puede ser los precursores celulares intermediarios o IPC, que presenta la capacidad de originar tanto neuronas, oligodendrocitos como astrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

Pese a que los precursores neurales originados en la zona ventricular embrionaria actúan casi del mismo modo, las células posmitóticas que finalmente se forman presentan una gran diversidad tanto en su forma como en su función. En este proceso de diferenciación neuronal, parece ser que son esenciales las interacciones célula a célula así como la presencia de diversas



moléculas como Notch, Delta o la expresión pivotante de factores de transcripción bHLH (Esquema 3) que presentan un importante papel en la determinación de neuronas (Ascl1 o Neurog1/2), astrocitos (Hes1) y oligodendrocitos (Olig2) (Imayoshi & Kageyama, 2014; Yamaguchi et al., 2016).

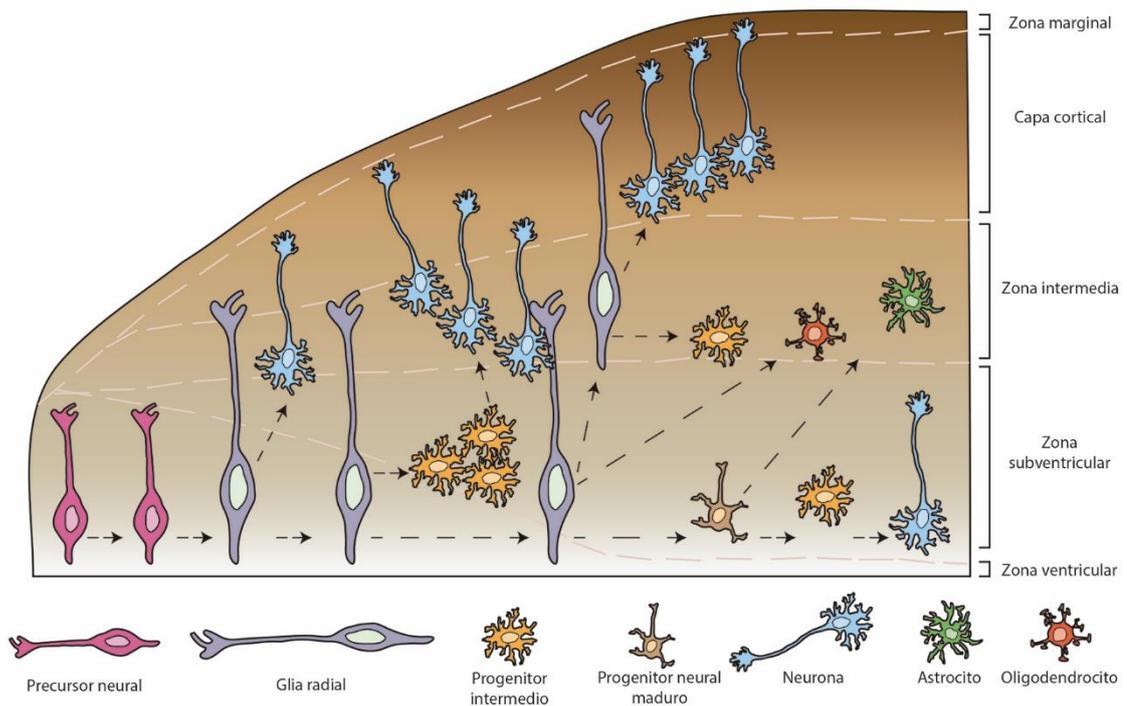
Esquema 3. Expresión de los factores de transcripción bHLH. La expresión de los factores de transcripción Neurog1/2 o Aacl permite la diferenciación del precursor NPC a neuronas. Por su parte, el factor de transcripción Olig 1/2 determina la diferenciación a oligodendrocito y la diferenciación a astrocitos se debe a la expresión del factor de transcripción Hes. Modificado de Imayoshi and Kageyama 2014.

1.3._ Morfogénesis de la corteza cerebral

La corteza cerebral, conocida como neocórtex en mamíferos, es donde residen la mayor parte de las funciones cognitivas del encéfalo y se caracteriza por una compleja disposición celular, donde se encuentran neuronas que nacen en este mismo área, así como interneuronas originadas en regiones del telencéfalo ventral (Molyneaux, Arlotta, Menezes, & Macklis, 2007). El neocórtex, se encuentra organizado en seis capas que se distinguen entre ellas por la expresión combinada de distintos marcadores moleculares, así como de diferentes

proyecciones axonales (Jiang 2015). Las capas más profundas, V y VI, están formadas por neuronas corticofugales, es decir, por neuronas que proyectan hacia áreas subcorticales como el tálamo, tronco del encéfalo o médula espinal. Las capas de II a IV están formadas por interneuronas que proyectan al hemisferio contralateral (Greig, Woodworth, Galazo, Padmanabhan, & Macklis, 2013). Como característica común, es que todas estas neuronas son neuronas excitatorias glutamatérgicas que derivan de las áreas germinales del desarrollo del neocórtex: la zona subventricular (ZSV) y la zona ventricular (ZV) (Jiang & Nardelli, 2016) **(Esquema 4)**. Desde los primeros estudios sobre la neurogénesis, se pensó que la zona ventricular era la zona por excelencia de neurogénesis y que la zona subventricular la de gliogénesis, pero desde las últimas décadas del siglo pasado, se ha sugerido que la zona subventricular también puede presentar una importante función en el proceso de neurogénesis cortical, pues derivan de las células de la glía radial y originarán neuronas, aunque últimas investigaciones sugieren que originan un precursor neural intermediario nIPC, que nunca entra en contacto con la el ventrículo o la lámina pial (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009) **(Esquema 4)**.

La neurogénesis en el neocórtex, a diferencia de la que sucede en el hipocampo, que se produce en el palio medial, tiene lugar en el palio lateral y empieza en el estadio del desarrollo embrionario alrededor de E9 o E10, momento en el que las células neuroepiteliales pseudoestratificadas de la pared de la zona ventricular adquieren características de células gliales, pasando a conocerse como células de la glía radial y que mantendrán el contacto con la parte pial y la zona del ventrículo, zona donde mantiene su cuerpo celular (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Yamaguchi et al., 2016) **(Esquema 4)**. A medida que se va produciendo la neurogénesis cortical, esta zona empieza a aumentar en grosor al incrementar el número de procesos de la glía radial, que empieza a expresar marcadores típicos como GLAST (Transportador específico de Glutamato-Aspartato), a perder complejos de uniones estrechas característicos de las células epiteliales y a establecer contacto con vasos sanguíneos, produciéndose en definitiva una transición entre célula epitelial y glía radial. Esta glía radial, presenta polaridad ápico-basal, caracterizada por la presencia de uniones adherentes entre ellas en la parte basal, donde están en contacto con las meninges capaz de realizar una división asimétrica para renovarse y formar una célula IPC (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).



Esquema 4. Proceso de neurogénesis en el desarrollo cortical. Representación esquemática de la diferenciación de los distintos tipos celulares durante la formación del neocórtex. Modificado de Kriegstein 2009 y Imayoshi 2014

Siempre se ha pensado que la característica morfológica neuronal dependía del ambiente en el que se desarrollaba, pero últimas investigaciones sugieren que viene determinada por características propias intrínsecas que se establecen en el momento en que se originan. Así, tanto las células neuroepiteliales como las de la glía radial deben de interpretar la gran variedad de inductores neurales que participan en los procesos de desarrollo y desarrollar programas únicos de expresión de factores originando la gran variedad de tipos neuronales que existen, así como para oligodendrocitos y astrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

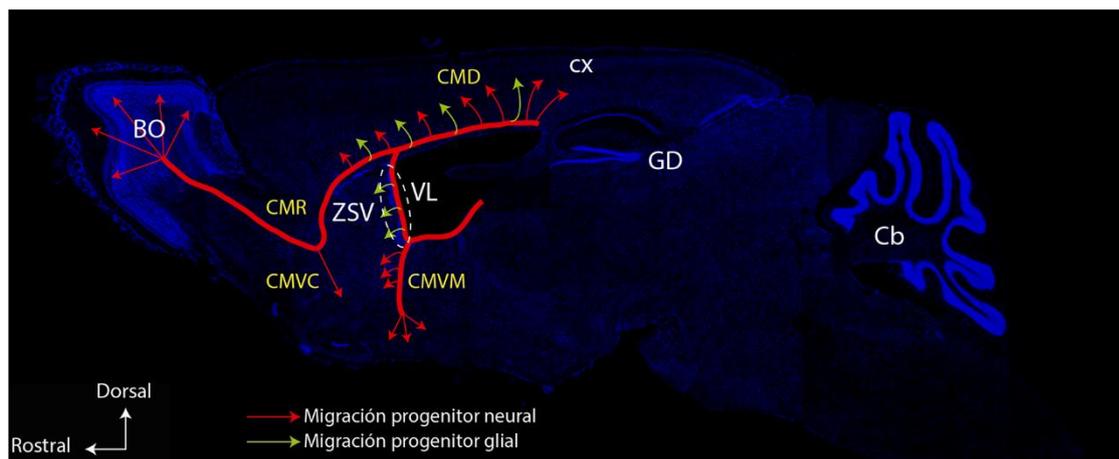
Tras finalizar el proceso de neurogénesis, la mayoría de las células de la glía radial se desprenden del contacto con el ventrículo y migran hacia la zona pial, donde al menos en mamíferos formarán astrocitos, pero sigue sin conocerse bien si sufren una migración o su posición final está relacionada con su posición de origen.

1.4._ Nueva formación de neuronas en el sistema nervioso central de adultos

En los últimos años y tras numerosos estudios relacionados, se empieza a describir el cerebro adulto de mamíferos como un cerebro no tan estático como se pensaba, con la posibilidad de originar tanto nuevas neuronas como células gliales a lo largo de la vida adulta de mamíferos. De esta manera se postula la zona subventricular del ventrículo lateral (ZSV) y

la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG), como las principales zonas neurogénicas en cerebro adulto; cuyos nichos neurogénicos se mantienen gracias a las clásicas señales de morfogénesis y desarrollo como son Notch, Efrinas o Shh, las cuales parecen que tiene un papel esencial en el transcurrir de dichos procesos (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). Se sabe que los mismos factores bHLH que se expresan en estadios embrionarios y que son esenciales para la determinación celular de las células precursoras neurales en el proceso de desarrollo, se expresan en el cerebro adulto (Imayoshi & Kageyama, 2014).

Desde los primeros estudios realizados en este campo, se propuso la zona subventricular (ZSV) como la principal zona neurogénica adulta, y cómo a partir de la corriente migratoria rostral (CMR o del inglés RMS), los neuroblastos migran hacia el bulbo olfativo (Inta, Meyer-Lindenberg, & Gass, 2011) (**Esquema 5**). Gracias a estas corrientes de migración, se establecen el bulbo olfativo (BO) y el giro dentado del hipocampo (GD) como principales zonas de formación de neuronas en estado adulto, aunque otros estudios también proponen otras zonas como el hipotálamo o la amígdala (Feierstein, 2012). De manera que en torno a la zona ventricular se establece varias corrientes migratorias entre las que destacan la CMR con la migración de neuroblastos y astrocitos al bulbo olfativo; las corrientes migratorias ventromediales (CMVM o del inglés VMMS) y ventrocaudales (CMVC o del inglés VCMS) con la migración de neuroblastos y astrocitos a las áreas del caudado-putamen y tracto óptico; y por último la zona del giro dentado del hipocampo en el que la migración no sale del giro dentado (Cayre, Canoll, & Goldman, 2009; Inta et al., 2011; Suzuki & Goldman, 2003) (**Esquema 5**).



Esquema 5. Representación esquemática de la neurogénesis secundaria y las principales corrientes migratorias en cerebro adulto de mamíferos. Se representa en color rojo la migración de progenitores neurales y en verde la de progenitores gliales. CX, corteza; Cb, cerebelo; GD, giro dentado; BO, bulbo olfativo; VL, ventrículo lateral; ZSV, zona subventricular; CMD, corriente migratoria dorsal; CMR, corriente migratoria rostral; CMVC, corriente migratoria ventrocaudal; CMVM, corriente migratoria ventromedial. Modificado de Inta 2011 y Cayre 2010.

La zona subventricular tiene células madres neurales que se conocen como células B y que tienen características astrogiales (expresión de GLAST y GFAP por lo que podrán también originar astrocitos), que originan células o IPC de adultos, que son las que generan neuroblastos inmaduros, o células A. Éstas migran al bulbo olfativo y diferencian a interneuronas gracias a la glía radial, que se ha visto cómo en adultos, también actúan como guía durante la migración de las neuronas formadas en la zona subventricular a su posición final (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Los precursores que migran por la corriente migratoria rostral entran en el bulbo olfativo donde se diferencian a distintos tipos de interneuronas (como las células granulares y las periglomerulares) en función de la actividad olfativa. La neurogénesis del hipocampo queda relegada al mismo hipocampo, siendo casi insignificantes los procesos de migración y se intensifica con procesos de tareas de enriquecimiento o interacciones sociales. La neurogénesis que se propone ocurre en la amígdala e hipocampo parece ser que tiene que ver con el mantenimiento de la homeostasis, regulación endocrina, desarrollo reproductivo y en el caso del hipotálamo además, con procesos sociales al estar estrechamente vinculado con la migración de nuevas neuronas al bulbo olfativo y procesos de reconocimiento de otros individuos en ratones (Feierstein, 2012; Fowler, Liu, & Wang, 2008). Son varias las proteínas utilizadas como marcadores con la finalidad de poder investigar la neurogénesis. Así, la proteína de los filamentos intermedios de tipo VI, Nestina, se expresa durante los primeros estadios de desarrollo cerebral en la glía radial y comienza a desaparecer a P11 en corteza de rata (Kalman & Ajtai, 2001). La proteína HLH o NeuroD1 es un factor de transcripción descrito como esencial en los últimos estadios de diferenciación de los precursores neurales a neuronas durante la neurogénesis (Tamimi et al., 1996). La proteína Doblecortina (DCX) promueve la polimerización de los microtúbulos de neuroblastos y neuronas jóvenes, por lo que se ha identificado como un buen marcador de la neurogénesis tanto embrionaria como adulta (Francis et al., 1999; Gleeson, Lin, Flanagan, & Walsh, 1999). La proteína β -III tubulina (Tuj1) se ha utilizado como marcador de neuronas inmaduras en el telencéfalo de ratón encontrándose inmunorreactividad en neuronas positivas para DCX (Easter, Ross, & Frankfurter, 1993; Menezes & Luskin, 1994; H. K. Yang et al., 2004).

Así, parece ser que las dos zonas neurogénicas por excelencia son el giro dentado del hipocampo que crea células granulares continuamente y que no salen del hipocampo, estando relacionadas con la memoria; y células granulares de la zona ventricular que migrarán a circuitos olfativos; por lo que en ninguna de las dos maneras se generan neuronas para los circuitos del neocórtex (Yamaguchi et al., 2016). La neurogénesis en el GD se puede dividir en varias fases. En

una primera fase, las células precursoras que presentan características similares a la glía radial que actúan como progenitores neurales en el desarrollo del cerebro embrionario, expresan marcadores típicos como GFAP y Nestina. En una segunda fase, en la zona subgranular del hipocampo, células que expresan Nestina pero carecen de GFAP que definen el linaje neuronal, dejan de presentar Nestina para expresar DCX y moléculas de adhesión, hecho que les permite migrar del hipocampo al GD. A continuación, las neuronas inmaduras se transforman en postmitóticas y empiezan a expresar Calbindina o NeuN, y a estabilizar los contactos sinápticos (von Bohlen Und Halbach, 2007). La neurogénesis del neocórtex ocurre solo durante los estadios iniciales del desarrollo del sistema nervioso (E9 y E10).

Se ha comprobado que existen neuronas nuevas en zonas corticales, pero no se ha establecido el origen de las mismas, aunque investigaciones recientes sugieren que la regeneración de neuronas en la corteza puede deberse a circuitos de proyecciones con el área subventricular donde existen precursores, o gracias a las leptomeninges, pía madre y aracnoides, donde se ha demostrado la existencia de precursores neurales que bajo determinadas señales podrían migrar al neocórtex y diferenciarse (Yamaguchi et al., 2016).

Por su parte, se sabe que el hipocampo presenta un desarrollo tardío, en los últimos estadios embrionarios (aproximadamente sobre E14) y primeros postnatales, por lo que la formación del GD se solapa con la del mantenimiento de precursores neurales, donde, al igual que en la diferenciación de precursores en el estadio embrionario, la presencia de moléculas inductoras es esencial, siendo el BMP fundamental para el mantenimiento de los precursores neurales en estado quiescente. Wnt es secretado por los atrociitos y presenta una importante función en la formación de sinapsis y maduración de neuronas adultas, sugiriendo la ruta canónica de Wnt como una ruta que regula la neurogénesis adulta y la proliferación de progenitores (Urban & Guillemot, 2014).

2._ Polaridad celular

2.1._ Establecimiento de la polaridad celular

Estudios sobre el establecimiento de la polaridad en distintos modelos y análisis genéticos completos de los mismos demuestran la presencia de complejos de polaridad altamente conservados en la evolución formados por una gran cantidad de proteínas y que se

encargan de regular el establecimiento de la polaridad celular (Assemat, Bazellieres, Pallesi-Pocachard, Le Bivic, & Massey-Harroche, 2008) (Tabla 1).

Hasta el momento se han descrito tres complejos de polaridad celular: el complejo Par, Crb y Scrib. Han sido estudiados en distintos modelos además de ser descubiertos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (el complejo Par) y en *Drosophila melanogaster* (complejo Crb y Scrib). Los tres complejos desempeñan un papel esencial también en células epiteliales de mamíferos, donde no solo

controlan procesos como la expresión de genes, diferenciación y crecimiento gracias a su interacción con otras moléculas, sino que además parecen tener un importante papel controlando el metabolismo y la proliferación celular (Assemat et al., 2008).

2.1.1._ Complejo de polaridad Par

Los primeros genes implicados en los procesos de establecimiento de la polaridad celular fueron descubiertos en 1998 de la mano de Kemphues y sus colaboradores al estudiar los procesos de división celular y sus alteraciones debidas a las mutaciones de estos genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que presenta polaridad antero-posterior. Estas mutaciones fueron identificadas en 4 genes distintos que denominaron “par” (*par1-par2-par3-*

		Mamíferos				Peso molecular kDa	
		Gen	Nombre	Localización	Isoformas		
Complejo Par6/Par3/aPkc	DmPar6	-	PAR6, PAR6A, TIP40, PAR6a, PAR6C	16q22	2	37	
		-	PAR6B	20q13	1	41	
		Par-6	PAR6G, Par6y, PAR6D	18q23	1	41	
Complejo Par6/Par3/aPkc	Bazooka	-	PAR3A, PAR3, PAR3a, ASIP, CTCL antígeno tumoral 2-5	10p11	10	180	
		Par-3	PAR3β, PAR3L, ALS 2CR 19	2q33	5	140	
Complejo Par6/Par3/aPkc	DmaPkc	PKC-3	PRKCi, PKCi, nPKCi, aPKCi/λ, PRKCi/λ	3q26	1	67	
		-	PKC2, LCA8	1p36	1	68	
Complejo Crb/Pals/Patj	Crb	Crb1	CRB1	RP12, LCA8	1q31-q32	4	154
		Eat-20	CRB2		9p33	3	135
		-	CRB3		19p13	2	13
		-	MPP1	EMP55	Xq28	1	52
		-	MPP2	DLG2	17q12-q21	3	65
		-	MPP3	DLG3	17q12-q21	1	66
	Sdt	TAG-117	MPP5	Pals1	14q23	2	77
		C50F2.8	MPP6	Pals2, VAM-1, p55T	7p15	1	61
		Y55B1BR.4	MPP7		10p12	1	65
		Dpatj (dlt)	-	INADL, PATJ	1p31	5	196
Complejo Scrib/Dlg/Lgl	SCRIB	LET-413	SCRIB, SCRIB1, CRIB1, Vartul, LAP4	8q24	4	175	
		dlg-1	DLG1	SAP97, hDlg	3q29	7	100
	Dlg	-	DLG2	PSD-93, Chapsyn110	11q21	4	97
		-	DLG3	SAP102, NE-DLG	Xq13	1	90
		-	DLG4	PSD95, SAP90	17p13	2	80
		F44D12.1	DLG5	P-DLG	10q23	2	202
	Dldl	-	LLGL1	L2GL1, DLG4, HUGL1, LGL1	17p11	1	115
		-	LLGL2	L2GL2, HGL, LGL2	17q24-q25	3	113

Tabla 1. Esquema de las distintas proteínas que conforman los complejos de polaridad. En la tabla se indican las distintas proteínas que conforman los complejos de polaridad en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* así como en humanos junto a sus nombres alternativos, pesos moleculares y localización en cromosomas. Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008.

par-4) [del inglés “partitioning defective”]) al observar alteraciones en los patrones de división, en el tiempo y en la distribución de partículas ribonucleoproteicas (gránulos P) (K. J. Kemphues, Priess, Morton, & Cheng, 1988).

Se predijo que tanto la proteína Par1 como Par4 debían de ser quinasas, mientras que Par6 y Par3 presentan un dominio de unión PDZ. Par5 es una proteína 14.3.3, y Par2 es una proteína de unión con dominios de dedo de zinc. En *C. elegans*, estos genes presentan la información de polaridad necesaria para la primera división celular. Posteriormente, se comprobó que una proteína quinasa C3 (que codifica para una proteína quinasa atípica aPKC), interactuaba con Par3 siendo esencial para el establecimiento de la polaridad. Así, quedaba establecido el primer complejo de polaridad celular: Par6/Par3 (Assemat et al., 2008; K. J. Kemphues et al., 1988; Macara, 2004; Tabuse et al., 1998).

Las proteínas Par3 y Par6, como muchas otras proteínas Par, se encuentran muy distribuidas por toda la escala evolutiva, expresándose en una gran variedad de tejidos y tipos celulares, y junto con la proteína aPKC, constituyen proteínas de andamiaje esenciales en la polaridad celular (Assemat et al., 2008; K. Kemphues, 2000; Watts et al., 1996). El complejo Par (Par3, Par6 y aPKC) es esencial para el control y establecimiento de la membrana apical de las células epiteliales, la maduración de las uniones ocluyentes (Horikoshi et al., 2009), así como la polaridad axo-dendrítica de las neuronas (Shi, Jan, & Jan, 2003).

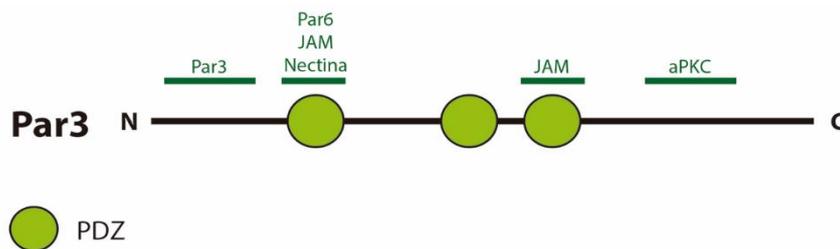
2.1.1.1. Proteína Par3

La proteína Par3 es conocida como proteína Bazooka en *D. melanogaster* y en mamíferos como PARD3 y ASIP, en los que se han identificado al menos dos genes parálogos conocidos como *Par3a* y *Par3b* (Assemat et al., 2008). *Par3a* codifica para una proteína con isoformas de distintos tamaños moleculares 180, 150 y 100kDa. Las isoformas de 180 y 100 kDa, pero no la de 150 kDa, han sido detectadas durante el desarrollo embrionario de ratón (entre E9.5 y E14.5). Sin embargo, las tres isoformas están presentes en adulto, aunque depende del tejido, ya que por ejemplo, en cerebro predomina la isoforma de mayor peso molecular (Lin et al., 2000). *Par3b* por su parte, codifica para una proteína de 132.5kDa y se expresa en distintos tejidos como el cerebro, aunque es especialmente abundante en riñón (Kohjima et al., 2002).

Las proteínas del complejo Par están formadas por tres dominios PDZ (PSD95/DiscLarge/Zo-1) que median la unión de Par6 (Lin et al., 2000) a moléculas de adhesión JAM (Ebnet et al., 2003; Itoh et al., 2001) y a Nectina (Takekuni et al., 2003). Además, presentan

otros dominios de unión a varias proteínas entre las que destacan aPKC (menos la isoforma de menor tamaño molecular) (Lin et al., 2000) y Par3 (Mizuno et al., 2003). También presentan un dominio de oligomerización N-terminal (NTD) que es importante para la localización de la proteína en la zona subapical para el desempeño de sus funciones (Feng, Wu, Chan, & Zhang, 2007) (**Esquema 6**).

Las proteínas Par desempeñan un papel esencial en el establecimiento de las uniones celulares gracias a sus interacciones con Nectinas y Jam, que son las que las reclutan en la



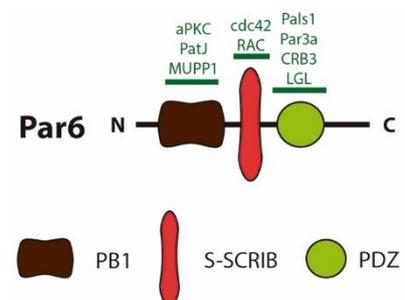
Esquema 6. Diseño esquemático de Par3, proteína del complejo de polaridad Par. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

membrana subapical, así como para la regulación de otras proteínas de polaridad (Feng et al., 2007; Itoh et al., 2001; Takekuni et al., 2003).

2.1.1.2. Proteína Par6

La proteína Par6, DmPar6 en *D. melanogaster* y denominada ParD6 en mamíferos, está codificada por distintos genes parálogos que generan distintas isoformas de Par6. Todas estas proteínas presentan tamaños moleculares muy parecidos, de aproximadamente 37kDa (Assemat et al., 2008).

Son proteínas de andamiaje con distintos dominios con los que interactúan con otras proteínas para desempeñar sus funciones. Presentan un dominio Phox/Bem o PB1 de unión a proteínas como aPKC (Lin et al., 2000), PATJ y MUPP1 (Adachi et al., 2009). También presenta un dominio de unión a Cdc42/Rac, motivo que permite la unión con Cdc42 o las proteínas GTPasas RAC y un dominio PDZ de unión a otras proteínas como por ejemplo Pals1 (Hurd, Gao, Roh, Macara, & Margolis, 2003; Wang, Hurd, & Margolis, 2004), Par3A (Lin et al., 2000), CRB3 (Lemmers et al., 2004) o LGL (Plant et al., 2003) (**Esquema 7**).



Esquema 7. Diseño esquemático de PAR6, proteína del complejo de polaridad PAR. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

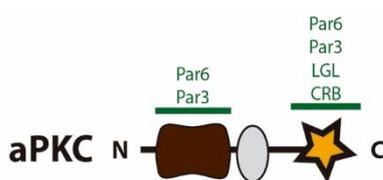
Las distintas isoformas de Par6, pese a tener una estructura muy parecida, presentan una expresión espacio temporal muy distinta por lo que quizás

desempeñen diversas funciones. Parece ser que entre sus funciones, destaca la de poner en contacto distintas proteínas como aPKC, Pals1 o CRB3, para que sean fosforiladas por Cdc42/Rac y desempeñen distintas funciones esenciales en la polaridad celular (Assemat et al., 2008; Hurd et al., 2003).

2.1.1.3._ Proteína aPKC

La proteína aPKC, conocida en *C. elegans* como PKC3 o DmaPkc en *D. melanogaster*, en mamíferos ha sido identificada como dos proteínas distintas aPKC λ/ι y aPKC ζ , que son consecuencia de la expresión de dos genes parálogos, y ambas presentan un peso molecular de 75kDa (Assemat et al., 2008; H. Xiao & Liu, 2013).

Tienen un dominio con actividad serina-treonina quinasa con capacidad para fosforilar a proteínas como LGL (Plant et al., 2003) o CRB (Sotillos, Diaz-Meco, Caminero, Moscat, & Campuzano, 2004), Par3 y Par6 (Lin et al., 2000), proteínas a las que se une mediante un



Esquema 8. Diseño esquemático de aPKC, proteína del complejo de polaridad PAR. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

dominio PB1 (**Esquema 8**). Presentan un dominio C1 no funcional, que permite activarse sin la necesidad de Ca²⁺ o fosfolípidos, hecho que las diferencia de las PKC (Hirano et al., 2004).

Es la única proteína de los complejos de polaridad que presenta actividad catalítica propia, esencial para el control de la polaridad celular y la

formación de las uniones celulares pues desencadena interacciones proteína-proteína esenciales entre el complejo Par y el complejo Crb, para el desempeño sus funciones (Assemat et al., 2008; Plant et al., 2003; Sotillos et al., 2004).

2.1.2._ Complejo de polaridad Crb

El complejo de polaridad Crb está constituido por un conjunto de proteínas altamente conservadas en la evolución, que se integran en las uniones celulares y que tienen un papel esencial en el establecimiento de la polaridad ápico-basal de las células epiteliales al definir el dominio apical de la misma. Está constituido por las proteínas CRB (Crumbs homologue) que son proteínas transmembranarias y proteínas de andamiaje citoplasmático como son Pals1 (Protein Associated with Lin-7) y PatJ (Pals1 associated tight junction protein) constituyendo el

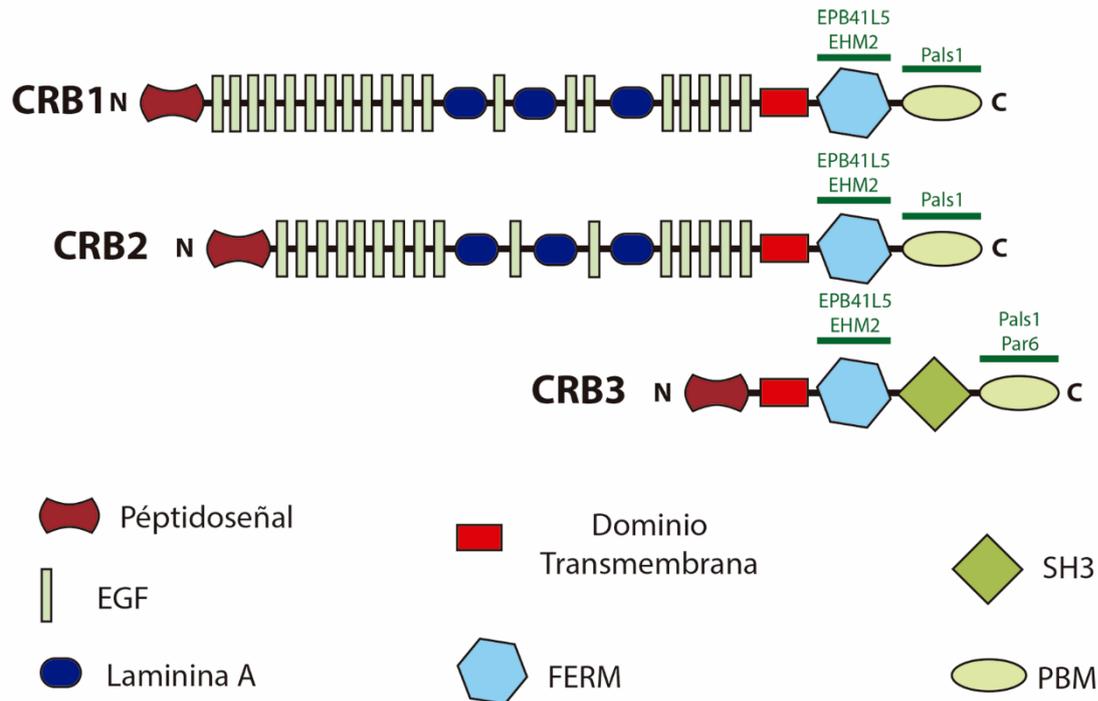
complejo de polaridad Crumbs-Pals1-PatJ (Assemat et al., 2008; Bazellieres, Assemat, Arsanto, Le Bivic, & Massey-Harroche, 2009; Macara, 2004).

2.1.2.1. _ Proteínas CRB

El gen *Crumbs* inicialmente fue identificado en *D. melanogaster* como un único gen que codifica para la proteína Crumbs, una larga proteína transmembranaria que define la membrana apical en las células epiteliales (Tepass, Theres, & Knust, 1990) y hasta el momento se han identificado proteínas Crumbs desde invertebrados hasta mamíferos (Richard et al., 2006). En mamíferos existen tres genes parálogos que codifican para tres proteínas distintas: CRB1 (Anneke I. den Hollander et al., 1999), CRB2 (Lemmers et al., 2002) y CRB3 (Lemmers et al., 2002; Makarova, Roh, Liu, Laurinec, & Margolis, 2003), de 154, aproximadamente 135 y 13 kDa de peso molecular respectivamente (Assemat et al., 2008).

El dominio intracelular es el que sirve de anclaje con el resto de los componentes del complejo Crb y otros complejos y parece ser el encargado del mantenimiento de las uniones celulares (Klebes & Knust, 2000). Este dominio intracelular está constituido por un sitio FDB o FERM (band G ezrin-radixin-moesin homology domain) donde interactúa y se une a proteínas como EPB41L5, EHM2 (Gosens et al., 2007; Laprise et al., 2006) o Expanded (Ling et al., 2010) y un sitio PDZ (PSD95-DLGA-ZO1) o PBM, localizado en el extremo C-terminal, con una secuencia muy conservada en todas las proteínas CRB de cuatro aminoácidos conocida como secuencia ERLI, que es indispensable para la interacción con otras proteínas del mismo complejo proteico como Pals1 (Makarova et al., 2003) o del complejo Par, como Par6 (Lemmers et al., 2004). El dominio extracelular es muy parecido entre CRB1 y CRB2 mientras que CRB3 prácticamente carece de él (Makarova et al., 2003) por lo que no posee sitios de reconocimiento para otras proteínas, aunque como en el caso de las proteínas CRB1 y CRB2, las tres presentan sitios de N y O glucosilaciones (Assemat et al., 2008; Ramkumar et al., 2015). Este dominio extracelular está constituido por 3 repeticiones Laminina A/G y 19 repeticiones de EGF-like para CRB1 y 14 para CRB2 (Anneke I. den Hollander et al., 1999; Katoh, 2004) (**Esquema 9**).

Como es sabido, en las células epiteliales, la separación de los componentes ápico-basales es crítica para su correcto funcionamiento, para la señalización celular, así como para los diferentes procesos de secreción de moléculas. Muchos de estos procesos son dependientes de funciones concretas de las proteínas CRB en las que parece ser que su dominio citoplasmático es esencial como formador de un complejo macromolecular de andamiaje para poder realizar todas estas funciones (Bulgakova & Knust, 2009; Martin-Belmonte, 2012).



Esquema 9. Diseño esquemático de las proteínas del complejo de polaridad CRB; CRB1, CRB2 y CRB3. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

Con relación a la expresión de los genes *Crb* y la localización de las proteínas, se sabe que todas las isoformas presentan una expresión generalmente en tejidos epiteliales y derivados. CRB1 se encuentra en retina y en cerebro (A. I. den Hollander et al., 2002; Anneke I. den Hollander et al., 1999), CRB2 está presente en retina, riñón y epitelio pigmentario de la retina; habiendo sido identificado el ARN mensajero en cerebro adulto, coroides y en menor proporción en pulmón, placenta y corazón (Dudok, Murtaza, Henrique Alves, Rashbass, & Wijnholds, 2016; A. E. Paniagua et al., 2015; Ramkumar et al., 2015; Z. Xiao et al., 2011). Por último, la proteína CRB3 es la que presenta una mayor distribución por diferentes tejidos epiteliales, entre los que se incluye la retina (Herranz-Martin et al., 2012; Makarova et al., 2003).

En lo que respecta a la función de las proteínas CRB, la mayoría de los estudios se han realizado en *D. melanogaster* donde se ha visto que presentan un importante papel en el establecimiento de la polaridad ápico-basal, en el mantenimiento de las uniones adherentes en el epitelio embrionario (Izaddoost, Nam, Bhat, Bellen, & Choi, 2002), así como en la formación de uniones celulares y la formación de la zona apical (Tepass et al., 1990). Se ha comprobado que las isoformas de mamíferos realizan funciones similares, regulando la interacción con otros complejos de polaridad, al igual que interactúan con distintas rutas de señalización como Hippo (Ling et al., 2010) o Notch (Herranz & Milan, 2006).

Proteína CRB1

Por estudios de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR), se ha comprobado que la expresión génica de *Crb1* durante el desarrollo se encuentra relegada al cerebro (donde *Crb1* empieza a detectarse a E10.5) y a la retina de ratón (donde empieza a expresarse a E11.5). En los primeros estadios embrionarios, la expresión de *Crb1* se observa en la zona ventral del tubo neural, la zona ventral del mesencéfalo o tegmentum, y en áreas hipotalámicas y ópticas, no siendo detectada en corteza cerebral. En últimos estadios embrionarios, la presencia de *Crb1* queda relegada a la región tuberal del hipocampo y al área preóptica. Por último, en adulto, la expresión de *Crb1* se ha comprobado en la capa granular del cerebelo y en el giro dentado del hipocampo, bulbo olfativo y la corriente migratoria rostral, áreas relacionadas con la neurogénesis en adultos (A. I. den Hollander et al., 2002; A. I. den Hollander et al., 2001). El gen *CRB1* humano ha sido detectado en cerebro y retina (van den Hurk et al., 2005). La expresión de la proteína CRB1 en retina de mamíferos ha sido extensamente estudiada y se sabe que se localiza en la región subapical de la membrana limitante externa donde juega un papel esencial en la polarización de los fotorreceptores (Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002; van de Pavert et al., 2004). Se sabe que mutaciones en el gen que codifica para la proteína CRB1 produce en humanos distintas patologías como la retinosis pigmentaria de tipo 12 (forma específica de retinosis pigmentaria que produce ceguera nocturna y pérdida del campo visual) y Amaurosis Congénita de Leber (enfermedad rara caracterizada por la pérdida de fotorreceptores durante los primeros años de vida) (A. I. den Hollander et al., 2002; A. I. den Hollander et al., 2001; Lotery, Jacobson, et al., 2001; Lotery, Malik, et al., 2001; Meuleman, van de Pavert, & Wijnholds, 2004).

Proteína CRB2

Mediante análisis de RT-PCR y estudios de hibridación *in situ* se ha comprobado que el gen *CRB2* humano se expresa en riñón, en epitelio pigmentario y coroides, en cerebro, y en menor proporción en placenta, corazón y pulmón (van den Hurk et al., 2005; Z. Xiao et al., 2011). La presencia de la proteína CRB2 se ha demostrado en epitelio pigmentario de la retina (A. E. Paniagua et al., 2015) y en cerebro de ratón embrionario (Dudok et al., 2016; Ramkumar et al., 2015) no habiéndose estudiado hasta la fecha su presencia, distribución y funciones en cerebro de ratón adulto.

Se ha descrito que en pacientes con retinosis pigmentaria y Amaurosis Congénita de Leber existen mutaciones para el gen *CRB2*, aunque no se han encontrado evidencias alélicas que relacionen estas mutaciones de *CRB2* con las patologías (van den Hurk et al., 2005). Sin embargo,

investigaciones recientes demuestran que la degeneración observada en un ratón mutante para CRB2 simula los procesos observados durante la retinosis pigmentaria humana debidos a la degeneración producida por mutaciones en *CRB1* (Alves et al., 2013). En la retina, CRB2 presenta un papel importante en el mantenimiento de la adhesión, integridad estructural, polaridad celular, expresión y/o localización del complejo apical de las proteínas de las uniones adherentes y en la laminación de la capa de los fotorreceptores (Alves et al., 2013).

CRB2 en el cerebro

En comparación en el resto de proteínas CRB, CRB2 presenta una mayor distribución por el organismo y de todas las zonas donde se expresa, destaca el cerebro, donde el gen *Crb2* es esencial como regulador de la diferenciación celular con un importante papel en el proceso de la neurogénesis (Boroviak & Rashbass, 2010). Se ha demostrado que CRB2, es esencial para el correcto desarrollo embrionario temprano del ratón, más concretamente en el proceso de gastrulación, donde parece ser que tiene un papel fundamental en el reordenamiento drástico celular que tiene lugar en el neuroepitelio en esta fase del desarrollo embrionario (Z. Xiao et al., 2011). Deficiencias en CRB2 producen importantes modificaciones en el proceso de gastrulación, alterando la somitogénesis y organogénesis que conlleva la muerte del embrión a E12.5 y además, se ha visto que en humanos produce alteraciones congénitas neurológicas (ventriculomegalia) y renales (Slavotinek et al., 2015).

Otras de las funciones que parece realizar CRB2 es la interacción y regulación de proteasas de membrana. Mediante estudios realizados en cultivos de líneas neuronales se ha descrito que CRB2 interactúa con γ -secretasa, que media la escisión de diversas proteínas transmembranarias, entre las que se encuentra la proteína precursora de β -amiloide (APP). El acúmulo de péptidos β -amiloide es una de los signos clínicos demostrados de la enfermedad de Alzheimer (Crews & Masliah, 2010; Reitz, Brayne, & Mayeux, 2011; Selkoe, 1989). Los estudios realizados en líneas celulares en cultivo muestran que CRB2, al secuestrar el complejo γ -secretasa, inhibe la escisión de APP, y que al sobreexpresar CRB2 en estas neuronas, se consigue reducir hasta un 70-80% la producción de proteína β -amiloide, sugiriendo con ello un papel modulador negativo de CRB2 en la actividad de γ -secretasa (Mitsuishi et al., 2010).

Proteína CRB3

La proteína CRB3 es la que más difiere de entre las tres proteínas CRB, pues carece casi por completo del dominio extracelular (Makarova et al., 2003). Se encuentra en numerosos tipos

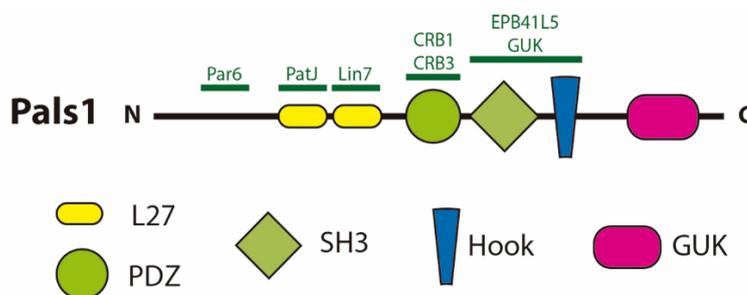
celulares (Makarova et al., 2003) y en retina (Herranz-Martin et al., 2012). En la retina, CRB3 se localiza en la membrana limitante externa tanto en fotorreceptores como en células de Müller, y tanto en edad adulta y en desarrollo en los segmentos de los fotorreceptores, siendo especialmente abundante en el área del cilio de conexión. Está también presente tanto en la capa plexiforme interna como externa durante el desarrollo de estas capas, sugiriendo un importante papel, no solo en el desarrollo del cilio de conexión, sino también de las sinapsis que se forman en las capas plexiformes externa e interna de la retina (Herranz-Martin et al., 2012).

CRB3 es esencial para completo desarrollo del embrión, pues el ratón *knockout* para *CRB3* es letal a los pocos días de nacer como consecuencia de problemas respiratorios y alteraciones en otros órganos, como riñones e intestino (Whiteman et al., 2014). Al parecer, CRB3, mediante la movilización de Pals1, regularía por medio de la ruta Hippo, la inhibición celular por contacto. Por el momento se desconoce si mutaciones en esta proteína podrían estar involucradas en enfermedades retinianas (Bazellieres et al., 2009).

2.1.2.2._ Proteína Pals1

La proteína Pals1 es miembro de la familia de proteínas MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase), que tienen funciones en señalización celular, andamiaje de proteínas y como receptores de unión célula a célula, así como en procesos de formación y mantenimiento de sinapsis (Funke, Dakoji, & Brecht, 2005). Se conoce en *D. melanogaster* como Stardust o Std (Assemat et al., 2008).

Se trata de una proteína de 77 kDa de peso molecular, constituida por varios dominios de unión a distintas proteínas (Assemat et al., 2008): dominios L27, uno que interactúa con la proteína PATJ, y otro con Lin7 (Straight et al., 2004); un dominio PDZ, con el que interactúa directamente con el dominio ERL1 de CRB1 y CRB3 (Makarova et al., 2003; Roh et al., 2002); y



dominios SH3 y HOOK que interactúan con las proteínas EPB41L5 (Gosens et al., 2007) y GUK (Y. Li et al., 2014) (Esquema 10). Además, presenta una región ECR1 que interactúa y sirve de unión con la proteína PAR6 (Wang et al., 2004).

Esquema 10. Diseño esquemático de PALS1, proteína del complejo de polaridad CRB. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

La expresión del gen *Pals1* se ha detectado en placenta y riñón, presentando unos niveles de expresión más bajos en cerebro, corazón y músculo esquelético (Kamberov et al., 2000). Se ha demostrado que la proteína Pals1 es esencial para el proceso de polaridad y el establecimiento de uniones celulares (Straight et al., 2004), comportándose como un adaptador entre las proteínas CRB y PATJ (Roh et al., 2002).

2.1.2.3._ Proteína PatJ

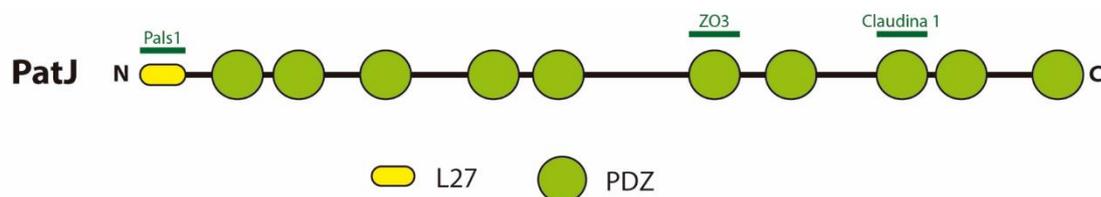
La proteína de *D. melanogaster* DpatJ (o también conocida como Dlt o Disc lost), presenta dos genes ortólogos en mamíferos que codifican para la proteína PatJ (Pals Associated Tight Junction protein) y MUPP1 (Multi-PDZ domain Protein) (Assemat et al., 2008).

La proteína PatJ, está formada por un dominio L27 en N-terminal que interactúa con Pals1 (ROH 2002), seguido de varios dominios PDZ (diez para PALS1 y trece para MUPP1) que interactuarán con muy diversas proteínas como claudina1, ZO3, Par6, Nectina o JAM (Adachi et al., 2009; Watts et al., 1996) (**Esquema 11**).

PatJ parece estar involucrada en el establecimiento de las uniones (Lemmers et al., 2002; Shin, Wang, & Margolis, 2007), realizando su principal función en células epiteliales en la activación de los complejos Par6-aPKC (Adachi et al., 2009).

2.1.3._ Complejo de polaridad Scrib

El complejo de polaridad SCRIB define el dominio basolateral de las células epiteliales y se encuentra constituido en mamíferos por tres proteínas citoplasmáticas: SCRIB (Scribble homolog), DLG (Disks Large Homologue) y LGL (Large Giant Larvae homologue) con las mismas funciones y secuencias que sus homólogos de *D. melanogaster* (Assemat et al., 2008).



Esquema 11. Diseño esquemático de PatJ, proteína del complejo de polaridad CRB. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

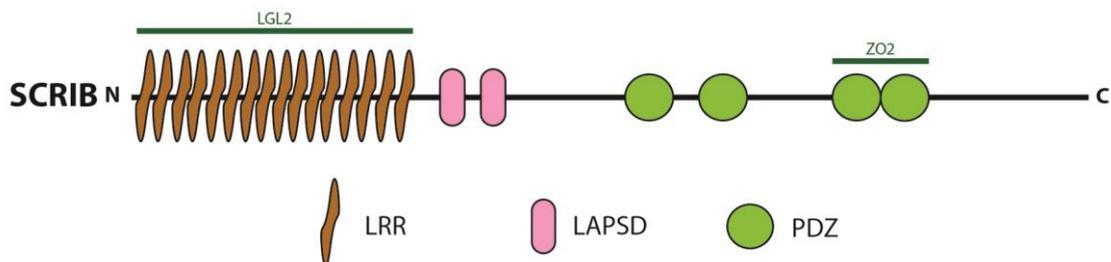
2.1.3.1._ Proteína SCRIB

La proteína SCRIB se conoce desde hace tiempo como la única proteína homóloga de Scribble de *D. melanogaster* (Assemat et al., 2008). Esta proteína está presente con niveles de

expresión bajos en riñón, músculo esquelético, hígado, placenta, piel y ojo de ratón (Navarro et al., 2005).

Se trata de una proteína de 175 kDa (Assemat et al., 2008) con dieciséis repeticiones de leucina o LRR en su extremo N-terminar, dos dominios LAPSD (LAP Specific Domain) y cuatro dominios PDZ. Se ha visto que LRR permite interactuar con LGL2 (Kallay, McNickle, Brennwald, Hubbard, & Braiterman, 2006), proponiendo los dominios LRR y PDZ como esenciales para la localización basolateral de la proteína SCRIB (Kallay et al., 2006; Navarro et al., 2005). Dos de los dominios PDZ, se unen a ZO2 que es capaz de interactuar con distintos componentes de uniones celulares como ZO1, ocludina o claudinas (Assemat et al., 2008) (**Esquema 12**).

En células epiteliales, el complejo Scrib regula directamente la formación de uniones celulares, así como el establecimiento del dominio basolateral al controlar la distribución proteica al dominio ápico-lateral (Bilder & Perrimon, 2000). La proteína SCRIB es esencial para el correcto establecimiento de las uniones celulares, al ser reclutada por medio de E-cadherinas. Se ha comprobado que en células cancerígenas, en las que la expresión de E-

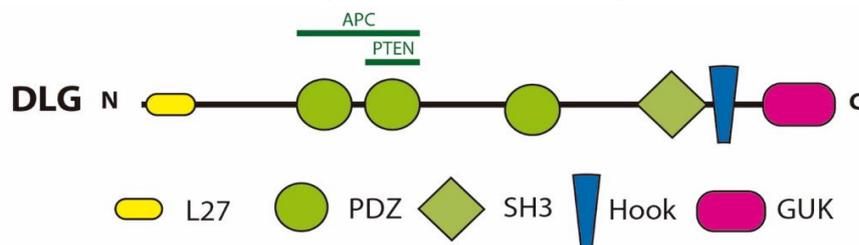


Esquema 12. Diseño esquemático de SCRIB, proteína del complejo de polaridad SCRIB. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

cadherinas está disminuida o en muchos casos es inexistente, SCRIB tampoco se expresa, aunque hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo por el que SCRIB, al menos en células epiteliales, desempeñaría un papel en la homeostasis y tumorigénesis (Kallay et al., 2006; Navarro et al., 2005). Entre una de las principales funciones de la proteína SCRIB durante el establecimiento del dominio basolateral, está la de excluir las proteínas apicales (como por ejemplo las del complejo Crb) del dominio basolateral (Assemat et al., 2008).

2.1.3.2._ Proteína DLG

La proteína DLG pertenece a la familia de proteínas MAGUK con sus característicos dominios estructurales: PDZ, SH3, HOOK y GUK. En mamíferos están presentes al menos cuatro genes ortólogos del gen Dlg de *D. melanogaster*, que codifica para cuatro proteínas DLG distintas (Assemat et al., 2008). Presentan un peso molecular comprendido entre los 80 y 200 kDa (Assemat et al., 2008). Parece ser que la interacción que se produce entre uno de los dominios de DLG con MPP7, es esencial para el establecimiento de las uniones celulares (Bohl, Brimer, Lyons, & Vande Pol, 2007). Además, la proteína puede interactuar con por medio de sus dominios PDZ con APC y PTEN, considerados supresores de tumores, teniendo al parecer



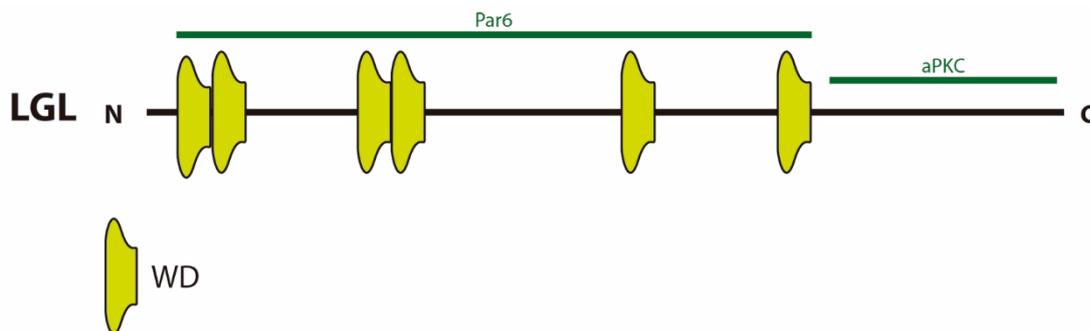
un papel en la tumorigénesis (Adey et al., 2000; Matsumine et al., 1996)

Esquema 13. Diseño esquemático de DLG, proteína del complejo de polaridad SCRIB. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008.

(Esquema 13).

2.1.3.3._ Proteína LGL

La proteína LGL de mamíferos está codificada por dos genes ortólogos de *D. melanogaster*, generando como resultado LGL1 (de 115 kDa de peso molecular) y LGL2 (de 113 kDa de peso molecular) (Assemat et al., 2008). Todas presentan dominios repetidos de WD40, 6 para LGL1 y 5 para LGL2 (Assemat et al., 2008) y son esenciales para interactuar con la proteína SCRIB, aunque solo se ha podido demostrar en LGL2 (Kallay et al., 2006) (Esquema 14).



Esquema 14. Diseño esquemático de LGL, proteína del complejo de polaridad SCRIB. Se indican los dominios funcionales y algunas de las proteínas con las que interactúa (verde). Modificado de Assemat, Bazellieres et al. 2008

En células epiteliales de mamíferos, tanto LGL1 como LGL2 se localizan en la membrana lateral (Yamanaka et al., 2003), pero para poder posicionarse en esa localización, tienen que

ser fosforiladas por aPKC y este proceso de fosforilación tiene lugar durante los primeros momentos del proceso de la polaridad celular (Musch et al., 2002; Yamanaka et al., 2003).

2.2._ La célula y la polaridad

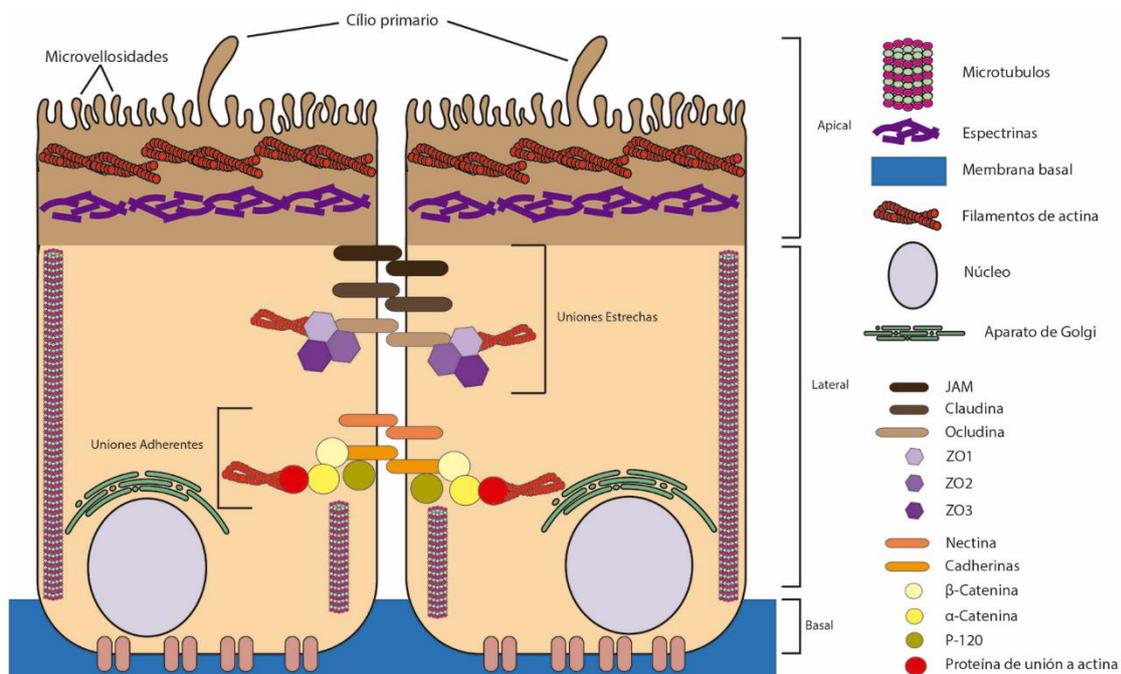
La polaridad celular es una propiedad que se caracteriza por una distribución asimétrica de componentes (proteínas, lípidos, moléculas y orgánulos) y funciones celulares que está presente en la mayoría de los organismos en aspectos esenciales del desarrollo y ciclo vital celular (Assemat et al., 2008; Margolis & Borg, 2005; Nelson, 2003; St Johnston & Ahringer, 2010). Es un proceso esencial para el correcto funcionamiento de multitud de procesos celulares entre los que destacan la gemación y crecimiento de levaduras (Pruyne, Legesse-Miller, Gao, Dong, & Bretscher, 2004), la división celular (Siegrist & Doe, 2007), la polaridad durante el desarrollo embrionario (Stern, 2006), el establecimiento de la polaridad neuronal, formación de axones y dendritas (Arimura & Kaibuchi, 2007), el transporte transepitelial (Delacour & Jacob, 2006), la migración celular (Watanabe, Noritake, & Kaibuchi, 2005), o la extravasación linfocitaria (Krummel & Macara, 2006).

Un claro ejemplo de la polaridad celular lo presenta el tejido epitelial (Nelson, 2003). Este tejido está formado por células altamente polarizadas que se ensamblan entre sí mediante diferentes tipos de uniones formadas entre las caras laterales. La célula epitelial presenta una estructura polarizada, es decir, un parte superior o apical, y una parte inferior o basal, la cual, limita con tejido conjuntivo mediante la membrana basal. Se pueden distinguir dos tipos básicos de epitelio: epitelio de revestimiento (cuya función es separar dos ambientes completamente distintos) y epitelios glandulares especializado en la secreción de diversas moléculas (Geneser, 2015).

De este modo, una célula epitelial está constituida al menos por un dominio apical que la separa del medio externo y otro baso-lateral asociado al el tejido conectivo mediante uniones adherentes (Nelson, 2003) (**Esquema 15**). Ambos dominios difieren en su composición lipídica y proteica, y en definitiva, en su funcionalidad, y se encuentran separados por uniones estrechas (Assemat et al., 2008; Nelson, 2003). En las células epiteliales, la separación del componente ápico-basal es esencial para su correcto funcionamiento, y depende de la actividad orquestada de tres complejos proteicos de polaridad muy conservados en la evolución (Assemat et al., 2008). Diversos estudios han demostrado que la pérdida de la

polaridad de las células epiteliales está relacionada con el desarrollo de importantes patologías como cáncer y tumorigénesis (Ling et al., 2010; Martin-Belmonte, 2012).

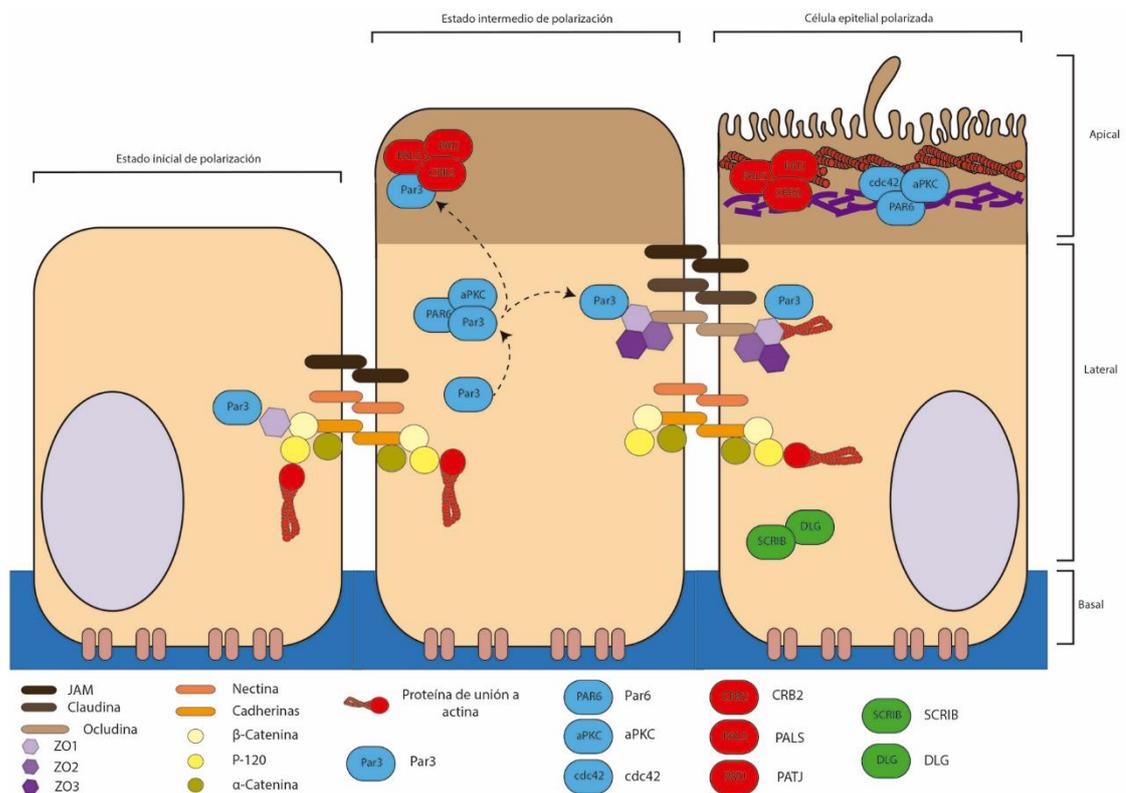
Como indica Martín-Belmonte en su revisión bibliográfica (Martin-Belmonte, 2012), los mecanismos por los que se establece la polaridad epitelial no se conocen con exactitud, e incluso puede ser diferente entre distintos tipos epiteliales y organismos. Los complejos de uniones adherentes y uniones estrechas que se establecen entre las células contribuyen a la formación y al mantenimiento de los dominios apicales y basolaterales. En estadios iniciales e inmaduros de una célula epitelial, la célula establece uniones con la matriz extracelular por medio de integrinas y emite filopodios con el fin de contactar con otras células e iniciar la formación de uniones celulares. En este primer momento, diversos complejos de adhesión como Nectinas, reclutan la proteína PAR3, que pertenece al complejo Par de polaridad celular, que permite que se continúe reclutando otras proteínas de adhesión como JAM o E-cadherina, constituyendo un primer cinturón de polarización celular en el que hay una mezcla tanto de uniones estrechas como adherentes (**Esquema 16**). Este complejo primordial puede interactuar con el citoesqueleto y con diversas Rho-GTPasas que permiten reorganizar las proteínas de adhesión a lo largo del dominio basolateral.



Esquema 15. Representación gráfica de una célula epitelial. Se muestran las uniones celulares, así como las principales proteínas que lo constituyen. Modificado de Martin-Belmonte 2012.

Par3 es disociado de este complejo gracias a la participación de aPKC y Par6, permitiendo la disgregación de las proteínas de uniones estrechas de las de uniones adherentes y de la proteína CRB, favoreciendo así la formación de uniones estrechas y la separación de los dominios apical y subapical. El complejo SCRIB promueve el establecimiento de la identidad basolateral antagonizando con los complejos Par y Crb. Para ello, LGL compete con Par3 secuestrando el complejo Par hacia la membrana apical (Esquema 16).

En el SNC, el correcto desarrollo del neuropitelio durante el desarrollo neural es esencial para la formación y proliferación de neuronas y células gliales (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009), y va a depender del correcto funcionamiento de los procesos de polaridad del mismo, pues tanto los fenómenos de neurogénesis y gliogénesis dependerán de la correcta formación de células posmitóticas como consecuencia de orquestados procesos de divisiones simétricas y asimétricas (Farkas & Huttner, 2008; Gotz & Huttner, 2005; Huttner & Kosodo, 2005).



Esquema 16. Representación gráfica del establecimiento de la polaridad celular en una célula epitelial. Se muestran los tres complejos de polaridad celular, así como sus principales proteínas y componentes que constituyen las uniones celulares. Modificado de Martin-Belmonte 2012.

3._ Modelos animales para el estudio de CRB

Son varios los modelos animales existentes para el estudio de las proteínas CRB y el resto de las proteínas de los complejos de polaridad en ratón (Gosens, den Hollander, Cremers, & Roepman, 2008) (Tabla 2).

Modelo	Mutación / Defecto	Fenotipo	Referencia
<i>Crb1</i> ^{-/-}	Knock-out, <i>Crb1</i> no funcional	Alteraciones en MLE y células de Müller	(van de Pavert, Kantardzhieva et al. 2004; van de Pavert, Sanz et al. 2007b)
<i>Crb</i> ^{C249W}	Knockin	Degeneración de fotorreceptores	(van de Pavert, Meuleman et al. 2007a)
CRB1 ^{rd8}	Mutación espontánea	Alteraciones retinianas con presencia de pseudorosetas	(Mehalow, Kameya et al. 2003; Lakowski, Baron et al. 2010; Pearson, Barber et al.)
EBP41I5 (<i>Limmulus</i>)	Knock-out, nula	Defectos en mesodermo, ectodermo y desarrollo de la placa neural. Letal a E.8.5	(Garcia-Garcia, Eggenschwiler et al. 2005; Lee, Silva-Gagliardi et al. 2007)
<i>MPP4</i> ^{-/-}	Knockout	Alteraciones en la homeostasis del Ca ²⁺	(Aartsen, Kantardzhieva et al. 2006; Yang, Pawlyk et al. 2007)
<i>CRB2</i> ^{CKO}	Knockout condicional	Desorganización retiniana desde el desarrollo	(Alves, Sanz et al. 2013)
<i>CRB2</i> ^{-/-}	Knockout	Alteraciones en la gastrulación	(Xiao, Patrakka et al. 2011)
<i>Pals1</i> (<i>shPals1-RxCre</i>)	knockdown condicional	Alteraciones retinianas. Rosetas en fotorreceptores.	(Park, Alves et al. 2011)

Tabla 2. Modelos animales utilizados para estudiar las proteínas de los distintos complejos de polaridad. Modificado de Gosens, den Hollander et al. 2008.

3.1._ Modelos animales con defectos en CRB2

El modelo murino *CRB2*^{CKO}, *knockout* condicional en retina, se generó para el estudio de las alteraciones retinianas, presenta una degeneración progresiva de los fotorreceptores

asociado con la pérdida de función retiniana similar a la descrita en el modelo de retinosis pigmentaria causada por la mutación en el gen CRB1 (Alves et al., 2013) y mimetiza los defectos observados en la mutación *Crb* de *Drosophila melanogaster* (Pellikka et al., 2002). Se produce una alteración en la laminación de la capa de los fotorreceptores (Alves et al., 2013) que coincide con los resultados observados al disminuir los niveles de Pals1 en la retina (Cho et al., 2012; Park et al., 2011). Estos resultados sugieren la necesidad de la presencia de CRB2 para que se produzca la correcta laminación de la capa de fotorreceptores (Alves et al., 2013).

Por otro lado, se generó un ratón mutante *knockout* CRB2^{-/-}, con el que se detectó que los embriones detienen su proceso de gestación aproximadamente a E9 debido a importantes defectos en el desarrollo del mesodermo y de la placa neural (Ramkumar et al., 2015; Z. Xiao et al., 2011).

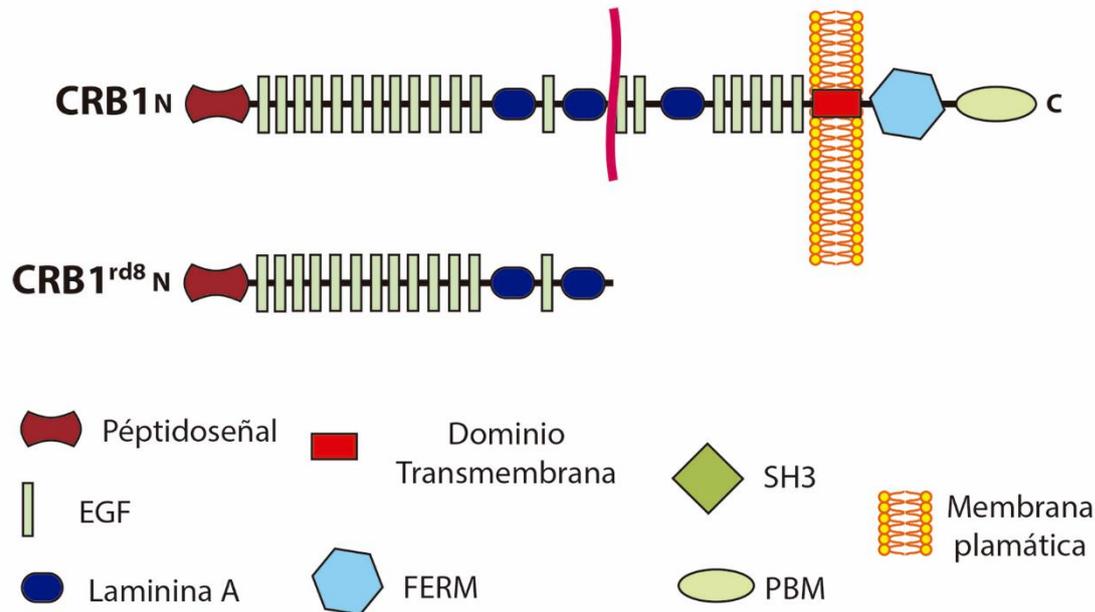
3.2._ Ratón mutante CRB1^{rd8}

El modelo murino CRB1^{rd8} presenta una mutación truncada identificada en el cromosoma 1 que consiste en la delección de herencia autosómica recesiva (Mehalow et al., 2003) de un par de bases en el nucleótido 3481 que produce un desplazamiento del marco de lectura originando un codón de parada prematuro. Como consecuencia, el gen codifica una proteína truncada, de 1207 aminoácidos, que pierde los dominios intracelulares y transmembrana, sintetizándose únicamente los quince primeros dominios EGF y 2 dominios laminina A globular desde el extremo N-terminal y 47 aminoácidos adicionales (Gosens et al., 2008) (**Esquema 17**). Esta proteína está formada sólo por la parte extracelular que se secreta (Pellikka et al., 2002) (**Esquema 17**).

Los efectos observados como consecuencia de la mutación CRB1^{rd8} presentan importantes similitudes con los observados en la mutación de CRB de *Drosophila melanogaster*. En ambos casos se aprecia una distribución discontinua y desordenada de las uniones adherentes de la membrana limitante externa de la retina (Gosens et al., 2008; Mehalow et al., 2003; Pellikka et al., 2002).

La degeneración retiniana consecuente consiste en la pérdida de fotorreceptores que se manifiesta con la presencia de manchas grandes e irregulares cuando se examina el fondo de ojo. Aproximadamente a la semana dos del nacimiento, la membrana limitante externa de la retina se encuentra fragmentada, a las cuatro semanas se observa un marcaje fragmentado para la proteína β -catenina, presente en las uniones adherentes como consecuencia de la pérdida de estas uniones y causando una alteración estructural tanto en los fotorreceptores

como en las células de Müller. A la décima semana, los segmentos externos de los fotorreceptores comienzan a fragmentarse, quedando a los cinco meses solo algunos de ellos (Gosens et al., 2008; Richard et al., 2006).



Esquema 17. Diseño comparativo de la disposición de los dominios proteicos entre proteínas CRB1 de un ratón control y uno mutante CRB1^{rd8}.

4._ CRB2 y enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer

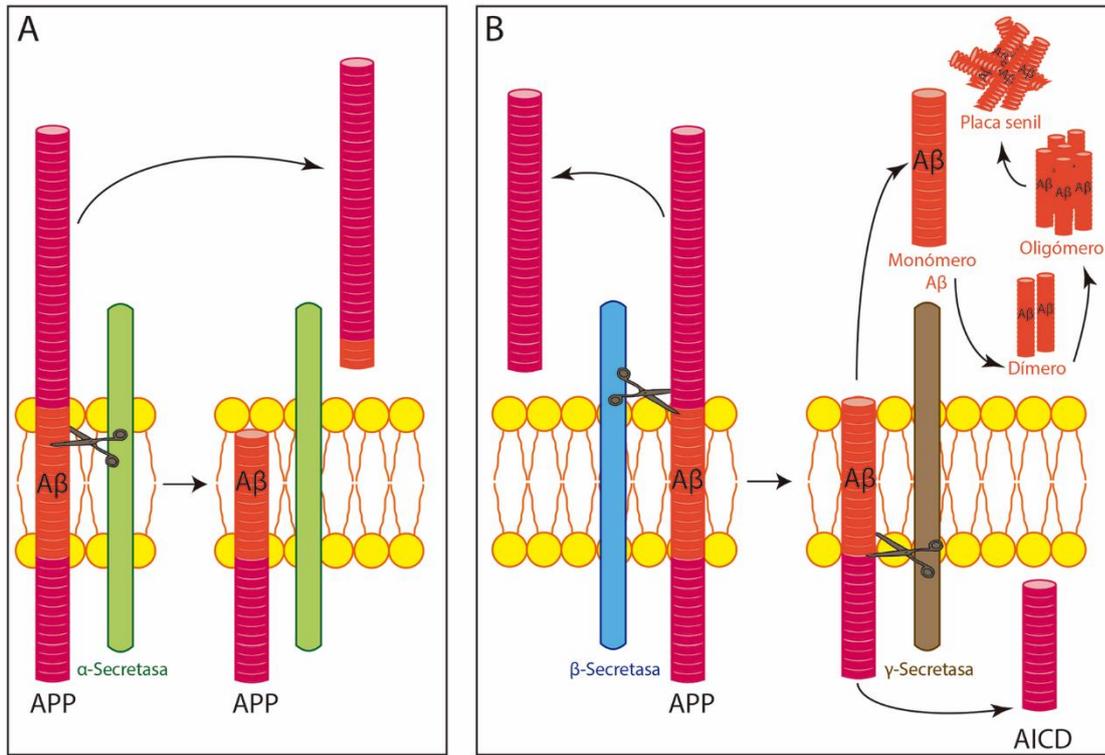
La enfermedad de Alzheimer (EA) consiste en un desorden degenerativo progresivo que se caracteriza por la pérdida neuronal y la acumulación extracelular de depósitos de distintos elementos conocidos como placas seniles, y de ovillos neurofibrilares intracelulares (Sakono & Zako, 2010; Selkoe, 2001). Esta patología, identificada inicialmente por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907), es una neurodegeneración caracterizada por un daño sináptico inicial y seguida de la pérdida neuronal, acompañada de astrogliosis y proliferación de células microgliales (Crews & Masliah, 2010; Serrano-Pozo, Frosch, Masliah, & Hyman, 2011). Son varias las líneas de investigación que sostienen como teoría principal para el desarrollo de la patología, una acumulación anormal de la proteína β -amiloide como consecuencia de la proteólisis de APP, el precursor de β -amiloide (Crews & Masliah, 2010; Selkoe, 1989), que se deposita en el espacio extracelular (Reitz et al., 2011). Además de la acumulación de péptidos β -amiloide, la proteína tau (proteína citoplasmática encargada de unir tubulina durante el proceso de polarización de microtúbulos) se encuentra hiperfosforilada en la enfermedad de Alzheimer,

produciendo acúmulos y ovillos de neurofilamentos intracelulares en las neuronas afectadas (Haass & Selkoe, 2007; Reitz et al., 2011).

La proteína APP pertenece a la familia de proteínas transmembranarias de tipo I, que se caracterizan por poseer un gran dominio extracelular y uno corto intracelular (Selkoe, 1989). APP se expresa en distintos organismos y en mamíferos se han descrito hasta tres miembros distintos: APP, APLP1 y APLP2 (Sprecher et al., 1993). APP se expresa indistintamente tanto en células neurales (donde es muy abundante) como no neurales (Haass & Selkoe, 2007; Zheng & Koo, 2006). El dominio extracelular está constituido por varios subdominios que parecen tener distintas funciones, como participar en adhesión celular, crecimiento de neuritas y sinaptogénesis; por su parte, el dominio intracelular está relacionado con procesos como fosforilación e interacción proteína-proteína, migración celular y remodelado sináptico y apoptosis (Zheng & Koo, 2006). La porción transmembranaria de APP se denomina β -amiloide ($A\beta$), y es una porción de 4 kD de peso molecular. El procesado que puede sufrir el precursor APP por parte de al menos tres proteinasas terminales transmembranarias, α , β y γ -secretasa, genera diferentes fragmentos proteicos a partir de APP (**Esquema 18**) (De Strooper & Annaert, 2000; Haass & Selkoe, 2007; Storey & Cappai, 1999; Zheng & Koo, 2006).

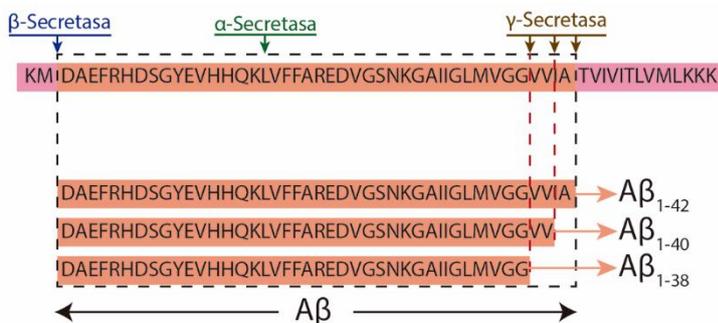
La proteína α -secretasa procesa distintas proteínas transmembranarias, como FNT- α , FNT- β o APP, como consecuencia de la activación de rutas dependientes de la proteína quinasa C (PKC) o de otros mensajeros, produciendo la escisión del APP entre residuos de lisina y valina (**Esquema 19**), y activa por tanto la ruta no amiloidea de APP al no formar tras su actividad la proteína $A\beta$ (**Esquema 18**) (De Strooper & Annaert, 2000; Kumar, Ganeshpurkar, Modi, Gupta, & Singh, 2018). β -secretasa se encarga de cortar a APP por el extremo N-terminal de $A\beta$ (entre una metionina y un aspartato), por lo que es considerado como el precursor de la generación de los péptidos $A\beta$ (**Esquema 18**) (De Strooper & Annaert, 2000; Kumar et al., 2018). Por último, γ -secretasa es una aspartil proteasa que consta de subunidades catalíticas como presenilina-1 o presenilina-2, y otras subunidades accesorias conformando y dando estabilidad al complejo catalítico encargado de procesar a APP, capaz de producirle un corte desde el extremo C-terminal hacía el final del péptido $A\beta$ (entre una alanina y una treonina), liberando por lo tanto $A\beta$ extracelularmente, y el dominio intracelular (ICD) que al provenir del APP se conoce como AICD, que migra al núcleo donde actúa como factor de transcripción (**Esquema 18**) (De

Strooper, 2003; De Strooper & Annaert, 2000; Kumar et al., 2018; Shih le & Wang, 2007; Zheng & Koo, 2006).



Esquema 18. Diseño esquemático de la actuación de las distintas secretasas sobre la proteína precursora de amiloide (APP).

El complejo proteico γ -secretasa, y en concreto sus subunidades catalíticas, pueden producir la escisión de APP a distintos niveles, originando por lo tanto distintos productos. Así, se han identificado distintas A β en función del procesamiento de APP por γ -secretasa, originando los fragmentos A β 38, 40 o 42, que se diferencian entre sí por la propia capacidad de formar agregados siendo el fragmento A β 42 el más abundante en las placas seniles (**Esquema 19**) (Haass & Selkoe, 2007; Serrano-Pozo et al., 2011). La formación de los monómeros A β 38, 40 o 42 se produce de manera natural por el mecanismo de γ -secretasa



Esquema 19. Representación gráfica de la edición que realiza γ -secretasa sobre APP, originando distintos péptidos A β . Modificado de Kumar, Ganeshpurkar et al. 2018.

que, en concentraciones fisiológicas, no produce ningún tipo de alteraciones patológicas (Glabe, 2008). De entre todos los A β , es el A β 42 el que mayor tendencia tiene a asociarse junto a otros monómeros y formar

oligómeros, precursores de las placas seniles que originarán el daño neurodegenerativo, que frecuentemente cursa con una degeneración retrógrada axonal, autofagia del árbol dendrítico y del soma, así como alteraciones en los niveles de la proteína de unión a calcio calbindina, de neuronas de regiones concretas del cerebro como son la corteza y el giro dentado del hipocampo relacionadas con el aprendizaje (Haass & Selkoe, 2007; Palop et al., 2003; Reiss, Arain, Stecker, Siegart, & Kasselmann, 2018; Serrano-Pozo et al., 2011).

La proteasa γ -secretasa no solo actúa sobre APP, sino que puede utilizar hasta 60 sustratos distintos, como por ejemplo la proteína Notch (Jorissen & De Strooper, 2010). Por ejemplo, en *D. melanogaster*, por un lado, el gen *Crb* tiene un importante papel en el desarrollo del disco marginal del ala y por otro lado, el procesamiento de Notch por parte de γ -secretasa es esencial para establecer los límites entre los componentes dorsales y ventrales del ala (Herranz & Milan, 2006). Se ha visto que el gen *Crb* atenúa la señalización de Notch, controlando la actividad de γ -secretasa (Herranz, Stamatakis, Feiguin, & Milan, 2006). A raíz de estos trabajos, se investigó la posibilidad de que la proteína CRB2 humana realizase algún tipo de regulación sobre γ -secretasa. Se ha demostrado que CRB2 interacciona e inhibe a γ -secretasa, y por lo tanto, controla su acción catalítica sobre diversas proteínas transmembrana como APP y Notch (Mitsuishi et al., 2010). Además, los trabajos realizados por Mitsuishi y colaboradores (Mitsuishi et al., 2010) han demostrado que, en líneas celulares neurales (neuroblastoma humano SY5Y) y no neurales (células epiteliales de riñón humano HEK-293), CRB2 parece inhibir a γ -secretasa y no a β -secretasa, regulando los niveles de A β . Parece ser que CRB2 realiza su regulación interactuando directamente con la subunidad catalítica presenilina-1, para lo cual es esencial la presencia del dominio transmembrana e intracelular de CRB2, no siendo necesarios los motivos FERM o PDZ. La sobreexpresión de CRB2 puede llegar a producir una disminución de entre el 70 – 80% los niveles de A β , y pese a ser una proteína transmembranaria, se ha comprobado que no actúa como sustrato de γ -secretasa, por lo que se comporta como un modulador negativo de la enzima en vez de un inhibidor. Así, se sugiere un posible papel de la proteína CRB2 como neuroprotector en la patología neurodegenerativa de Alzheimer (Mitsuishi et al., 2010).

Justificación, hipótesis y objetivos



Justificación, hipótesis y objetivos

La polaridad celular se debe a la función coordinada de tres complejos proteicos muy conservados a lo largo de la evolución: los complejos Crb y Par, que regulan la definición de la zona apical y el complejo Scrib que especifica la zona basal (Assemat et al., 2008; Bazellieres et al., 2009). La adquisición de la polaridad celular es esencial para el correcto funcionamiento de muchos tejidos, así como para el desempeño de ciertas funciones, como los procesos de señalización celular o secreción de moléculas. En neuronas, la adquisición de la polaridad es esencial para su desarrollo (Valtorta et al., 2011) y resulta imprescindible tanto para la determinación como para la maduración de las distintas comunicaciones sinápticas que se establecen entre ellas (Arimura & Kaibuchi, 2007; Ellenbroek, Iden, & Collard, 2012; Valtorta et al., 2011).

Esta disparidad de funciones depende del correcto funcionamiento y rigurosa coordinación de las proteínas que constituyen los tres complejos de polaridad celular. El complejo Crb, compuesto por las proteínas CRB, Pals1 y PatJ, realiza funciones importantes en el mantenimiento de la polaridad ápico-basal y en el establecimiento de las uniones adherentes durante el desarrollo de los epitelios en estadios embrionarios (Izaddoost et al., 2002). Los dominios intracelulares de las proteínas transmembranarias CRB, establecen un complejo andamiaje proteico que junto con otros miembros del complejo Crb y el resto de proteínas de los complejos Par y Scrib, son esenciales para el correcto desempeño de todas estas actividades (Bulgakova & Knust, 2009; Martin-Belmonte, 2012; Richard et al., 2006).

Tanto en humanos como en ratón, se han descrito tres isoformas de la proteína CRB: CRB1, CRB2 y CRB3, todas ellas presentes en la retina y cuyos genes *CRB/Crb* se han detectado en otros tejidos (A. I. den Hollander et al., 2002; Anneke I. den Hollander et al., 1999; Herranz-Martin et al., 2012; Makarova et al., 2003; van den Hurk et al., 2005; Z. Xiao et al., 2011).

Las alteraciones en las funciones de las proteínas CRB producen varios trastornos graves, tales como desórdenes en la organogénesis durante el desarrollo embrionario y el establecimiento de la polaridad celular (Katoh, 2004). Mutaciones en el gen *Crb1/CRB1* producen alteraciones retinianas (A. I. den Hollander et al., 2001; Anneke I. den Hollander et al., 1999), la pérdida del gen *Crb2* produce alteraciones letales en la gastrulación del ratón (Z. Xiao et al., 2011), y mutaciones en la proteína CRB2 producen alteraciones nefróticas (Ebarasi et al., 2015) y ventriculomegalia prenatal (Slavotinek et al., 2015). La eliminación completa de ambas proteínas, CRB1 y CRB2, en la retina de animales experimentales simula los acontecimientos que se producen en la Amaurosis Congénita de Leber humana y produce una

desregulación en la ruta de señalización Yap/Hippo en células progenitoras de retina (Pellissier et al., 2013).

En *Drosophila*, la proteína Crb influye en la señalización de Notch al modular la actividad de γ -secretasa, sugiriendo un posible papel en el desarrollo de patologías relacionadas con la actividad de γ -secretasa, como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer (Herranz & Milan, 2006; Herranz et al., 2006). En cultivos de células epiteliales humanas y líneas celulares neurales, CRB2 se postula como un modulador negativo de γ -secretasa y se ha sugerido que un posible factor de riesgo en el progreso de la patología podría ser la disminución de la expresión de esta proteína (Mitsuishi et al., 2010). De la misma forma, hay otras patologías en las que uno de los desencadenantes es la generación de β -amiloide que se acumula por ejemplo, en las drusas que se generan en la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) (Ambati & Fowler, 2012; Anderson et al., 2004; Luibl et al., 2006; Zweifel, Imamura, Spaide, Fujiwara, & Spaide, 2010). Asimismo, se ha sugerido una relación entre la DMAE y la enfermedad de Alzheimer (Kaarniranta, Salminen, Haapasalo, Soininen, & Hiltunen, 2011) ya que debido a la modulación que CRB2 ejerce sobre γ -secretasa en la patología de Alzheimer (Mitsuishi et al., 2010), se ha propuesto que en la DMAE, esta proteína podría estar realizando la misma función, controlando los niveles de β -amiloide que se acumulan en las drusas, aunque hasta la fecha esta hipótesis no ha sido explorada ni demostrada.

Se conoce desde hace tiempo que el ARNm para la transcripción de CBR2 está presente en el cerebro (Boroviak & Rashbass, 2010; Mitsuishi et al., 2010; Z. Xiao et al., 2011), pero la expresión de la proteína es un tema que no se ha explorado con profundidad. En trabajos previos de nuestro laboratorio pusimos de manifiesto que la proteína CRB2 se expresa en el epitelio pigmentario (A. E. Paniagua et al., 2015) y otros estudios demostraron su presencia en cerebro embrionario de ratón (Dudok et al., 2016; Ramkumar et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado la presencia de la proteína CRB2 en cerebro humano ni tampoco de ratón adulto. Este hecho podría explicarse por la carencia de herramientas adecuadas, como anticuerpos capaces de identificar de forma específica la proteína CRB2 discriminándola de las otras dos proteínas CRB.

Con todos estos datos planteados, la hipótesis de partida es:

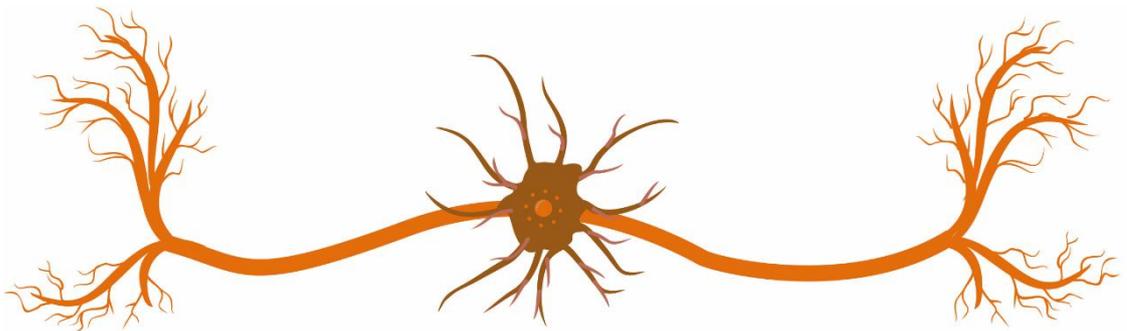
- ✓ Que la proteína CRB2 se expresa en cerebro adulto de forma específica en neuronas y que su expresión es fundamental para el correcto establecimiento de su polaridad y

desarrollo, de forma que su defecto podría producir alteraciones importantes en el correcto desempeño de las distintas funciones neuronales.

Para comprobar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar la expresión y localización de la proteína CRB2 en el cerebro de ratón adulto.
 - a) Determinar los tipos celulares en los que está presente la proteína CRB2.
 - b) Determinar en qué zonas o núcleos del cerebro de ratón es mayoritaria la expresión de la proteína CRB2.
2. Investigar las posibles alteraciones en la expresión y localización de la proteína CRB2 y proteínas relacionadas con su función en cerebro adulto del ratón mutante CRB1^{rd8}.
3. Caracterizar la expresión y localización de la proteína CRB2 y elementos asociados a su función durante el proceso de diferenciación y maduración neuronal *in vitro*.
4. Estudiar la expresión y localización de la proteína CRB2 en cerebro humano tanto de pacientes control como de pacientes con enfermedad de Alzheimer.
5. Estudiar variaciones alélicas para el gen *CRB2* en patologías retinianas como la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).

Materiales y métodos



Material

1._ Animales de experimentación

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral, como animales de experimentación se han empleado ratones (*Mus musculus*) tanto silvestres, procedentes de la estirpe C57BL/6J, como animales de la misma estirpe portadores de la mutación CRB1^{rd8} en homocigosis (C57BL/6J *Crb1^{rd8}/Crb1^{rd8}*). El mantenimiento y el manejo de los animales se han realizado conforme a la normativa europea 2010/63/UE y española RD 53/2013 vigentes. La eutanasia empleada para el sacrificio se ha realizado conforme a la normativa de manipulación de animales de experimentación: han sido anestesiados por hidrato de cloral al 5 % (p/v) en NaCl 0.9 % (p/v) y sacrificados por concentración creciente de CO₂.

Para los experimentos en los que se han realizado técnicas de inmunofluorescencia o de Western blot (WB) en tejidos de animales adultos, se seleccionaron estadios de edad postnatales (P) de entre P90 hasta P250 de ambos genotipos (control y mutante). Para los experimentos de cultivos primarios de neuronas obtenidas de corteza e hipocampo de ratón, el tejido se obtuvo del cerebro de animales en estadios embrionarios (E) comprendidos entre E16 y E18, por lo que se seleccionaron hembras de ambos genotipos en estos periodos de gestación.

2._ Muestras humanas

Se han realizado experimentos tanto de inmunohistoquímica como de WB en muestras de cerebro de pacientes fallecidos con y sin enfermedad de Alzheimer (EA). Las muestras control (sin patología asociada a Alzheimer) fueron cedidas por el Banco Nacional de tejidos (CIEN) y las muestras de pacientes con EA por Banco de Tejidos del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (BTN-INCYL). Estas muestras fueron procesadas para los distintos experimentos en nuestro laboratorio. Además, los experimentos de WB se completaron con muestras de cerebro humano con distintas patologías, como se muestra en la **Tabla 3**, entre ellas EA, cedidas por el Dr. Eugenio Santos de Dios (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca) procedente del Banco de Tejidos de Navarra. Las proteínas de estos tejidos procedían de Hipocampo (Hc) y Corteza Frontal (CxFr) y habían sido extraídas y conservadas en tampón de lisis hasta el momento de su cesión.

Caso	Patología	Región
BCN 251	Sistema nervioso central con diversos signos de hipoxia	Hc
BCN 224	Infarto lacunar en núcleo caudado derecho. Leucoaraiosis moderada.	Hc y CxFr
BCN 183	Cuerpos de Lewy incidentes en sistema nervioso. Arterio y arterioloesclerosis.	Hc y CxFr
BCN 169	Sistema nervioso central con signos de hipoxia. Degeneración del cerebelo por enolismo crónico.	Hc y CxFr
BCN 248	EA estadio V c, fase 5 de Thal. Angiopatía congófila tipo 2. Moderada leucoaraiosis. Arterio y arterioloesclerosis. Infarto lacunar en caudado izquierdo.	Hc y CxFr
BCN 321	EA estadio VI C de Braak, fase 4 de Thal. Esclerosis del hipotálamo. Infarto lacunar en putamen. Moderada leucoaraiosis. Angiopatía cerebral congófila leve.	Hc y CxFr
BCN 206	EA estadio V C. Infarto lacunar talámico derecho.	Hc y CxFr
BCN 197	EA estadio VI C. Leucoaraiosis moderada.	Hc y CxFr
BCN 190	EA estadio VI C. Ligera angiopatía congófila. Leucoaraiosis.	CxFr
BCN 173	EA estadio V B. Leucoaraiosis. Angiopatía congófila leve.	CxFr

Tabla 3. Relación de las muestras humanas cedidas. Muestras de cerebro humano con las patologías diagnosticadas en cada caso y áreas utilizadas en nuestro estudio. En color rojo se muestran las muestras consideradas control por no presentar sintomatología de EA

Métodos

3._ Genotipado de animales de experimentación

El ratón mutante CRB1^{rd8} tiene una mutación en el nucleótido 3481 identificada en el cromosoma 1. Para poder identificar esta mutación y diferenciar el genotipo mutante del control, analizamos su ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.1._ Extracción de ADN

La extracción de ADN se obtuvo a partir de fragmentos de tejido de colas de los ratones, que son resuspendidos en una solución de lisis constituida por Proteinasa K [6 U/ml (p/v) Sigma-Aldrich®], 0,02 % de duodecil sulfato sódico (SDS) (p/v), 5 mM de ácido etilenaminotetraacético (EDTA) pH 8,0, 0,2 mM de cloruro sódico 0,1 M a pH 8, en una dilución de agua destilada. El tejido en este tampón de lisis se mantiene en agitación a 55 °C en un termobloque (Mixing Block MB-102, Lan Technics) durante 12 h.

Trascurrido el tiempo de degradación del tejido se procede a la purificación del ADN:

1. El homogenado se mezcla bien y se centrifuga durante 2 min a 16000 g a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se recoge, desechando el sedimento y se añade el mismo volumen de 2-propanol (PanReac) que de sobrenadante. Se mezcla invirtiendo

las dos fases creadas con el fin de que precipite el ADN (ya que es muy poco soluble en este medio) comprobándolo al ver que se forma un hilo blanco.

2. La mezcla anterior se centrifuga a TA y 16000 g durante 10 min. El precipitado resultante contiene el ADN, se resuspende en alcohol al 70 % y se centrifuga a 16000 g durante 10 min. El sedimento que contiene el ADN se resuspende en agua mili-Q y se almacena a 4 °C o -20 °C.

3.2._ Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En proceso de detección mediante PCR se requiere la presencia de cebadores que amplificarán los fragmentos de DNA deseados. En este caso, los cebadores utilizados son los que nos permiten diferenciar entre el ADN de los animales silvestres y aquellos que portan la mutación CRB1^{rd8} que se muestran en el **Esquema 20**.

Para este análisis se añadieron 0,375 mM de cada uno de los oligonucleótidos que constituyen



Esquema 20. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la técnica de PCR.

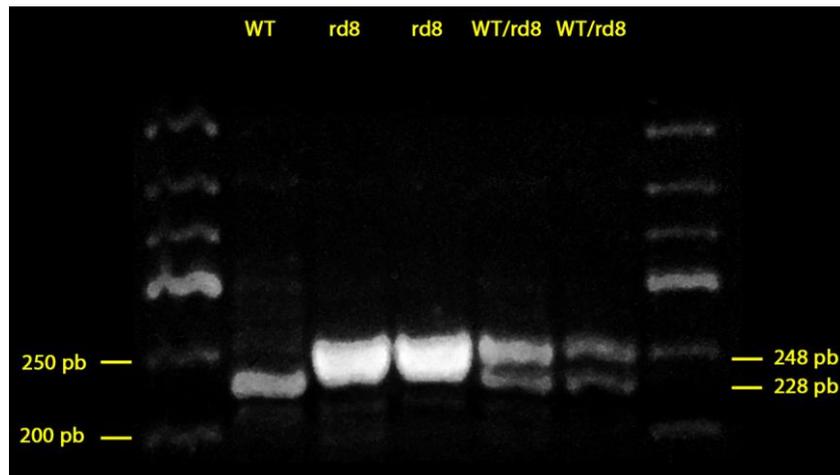
los cebadores, 20 % de tampón 1X para Taq Polimerasa (v/v) (Promega®), 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos (Promega®), 0,125 U/μl de Taq Polimerasa y entre 50 y 300 ng de DNA por muestra, todo ello disuelto en agua mili-Q. La mezcla se introdujo en un termociclador (AB Applied Biosystems™, Verity 96 Well Thermo Cycler) con el número de ciclos indicados en la **Tabla 4**.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1	94 °C	2 min	1
2	94 °C	20 seg	49
3	50 °C	30 seg	
4	72 °C	40 seg	
5	72 °C	7 min	1

Tabla 4. Temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la técnica de PCR.

3.3._ Electroforesis

Los productos obtenidos tras los pasos del termociclador se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) del tipo MS-8 (Pronadisa®) disuelto en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0,5 % junto con 0,4 μl de RedSafe™ (iNtRON biothechnology) para observar las bandas de ADN amplificado. Las muestras cargadas en el gel son corridas a una velocidad constante de 100 V con el medio TBE al 0,5 %. Tras la migración completa de los fragmentos de ADN, para su análisis y obtención de imágenes, se emplea una lámpara de luz



Esquema 21. Genotipado de animales de experimentación. Imagen en la que se muestran los fragmentos de ADN obtenidos tras el genotipado del tejido obtenido de los animales de experimentación. Así, se obtiene una única banda de 228 pb para el genotipo WT, una única banda de 248 pb del genotipo mutante (rd8) y dos bandas de 228 pb y 248 pb en la mezcla de ambos genotipos que permite discriminar mejor el peso de cada una de ellas.

ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories). Como marcador de pares de bases se empleó el reactivo 50 pb Ladder de 5Prime.

Los animales silvestres se identifican porque los fragmentos de su ADN pesan 218 pares

de base (pb) y los animales mutantes $CRB1^{rd8}$ quedan identificados porque sus fragmentos pesan 243 pb (**Esquema 21**).

4. _ Cultivos celulares

4.1. _ Cultivos primarios de corteza e hipocampo de ratón

En este trabajo se han realizado cultivos primarios de neuronas obtenidas tanto de corteza como de hipocampo de ratones control (WT) y únicamente de corteza en el caso del ratón mutante $CRB1^{rd8}$ a partir de animales en estadios embrionarios comprendidos entre E16 y E18.

Las placas o los pocillos en los que se van a realizar los cultivos se tratan previamente con una solución al 0,1 mg/ml (p/v) de Poli-lisina (Poli-L) en Tampón Fosfato Salino (PBS) para permitir la adherencia de las células. Este tratamiento con Poli-L debe realizarse al menos una hora antes del sembrado de las células, incubando las placas a 37 °C con un volumen de Poli-L determinado por placa o pocillo (indicado en la **Tabla 5**). Antes de sembrar las células, la poli-L es retirada de las placas que son lavadas con (PBS).

La solución que se emplea para la disgregación de las neuronas, cuya enzima principal es la papaína, debe prepararse el mismo día de la disección. La solución de papaína (**Tabla 5**) está compuesta por solución EBBS 10 % (Sigma®), 0,5 M de EDTA (p/v Sigma), suspensión de papaína (Worthington Biochemical Corporation®), cisteína (Sigma®). La solución tiene que ser

burbujeada con 5 % de CO₂ hasta que vire a amarillo para activar la papaína y se mantiene a 37 °C hasta su uso.

EBSS	Solución 10/10 50 ml de volumen	Solución EBSS + 10/10 5 ml por disección	Neurobasal 500 ml de medio	Neurobasal de mantenimiento 500 ml de medio
1 X de EBSS 10 X (Earle's Balanced Salts Sigma - Aldrich®)	25 ml de EBSS 1 X	4,5 ml de EBSS 1 X	500 ml medio Neurobasal (Gibco™)	500 ml de medio Neurobasal (Gibco™)
0,22 % (p/v) de bicarbonato sódico	500 mg de BSA (Sigma-Aldrich®)		1,25 ml Glutamina (Gibco™)	10 ml MACS NeuroBrew®-21 (MACS®)
Agua destilada hasta el volumen deseado	500 mg de Inhibidor de tripsina (Trypsin Inhibitor Chiken Egg White, Sigma-Aldrich®)	0,5 ml de Solución 10/10	10 ml MACS NeuroBrew®-21 (MACS®)	Glucosa al 4 % (Sigma-Aldrich®)
pH entre 7,3 y 7,5	EBSS hasta el volumen deseado		5 ml Pen/estrep (1 %)	5 ml Pen/estrep (1 %)
Esterilizar por filtrado (0,22 µm)	Esterilizar por filtrado (0,22 µm)		Esterilizar por filtrado (0,22 µm)	Esterilizar por filtrado (0,22 µm)

Tabla 5. Medios de cultivo. Tabla en la que se muestran la concentración y los componentes de los distintos medios utilizados en los cultivos primarios de neuronas de Cx e Hc de ratón.

4.1.1._ Disección, disgregado del tejido y siembra de neuronas

Las hembras gestantes son sacrificadas mediante CO₂ y dislocación cervical. Los embriones son extraídos por cesárea y mantenidos en PBS frío hasta el momento de su utilización. La disección de la corteza cerebral e hipocampo de cada embrión se realiza bajo campana a fin de evitar contaminaciones y con lupa con la finalidad de retirar las meninges. Para disgregar el tejido:

1. La solución de papaína se filtra (tamaño de poro 0,22 µm) y se transfiere tejido recién diseccionado a esta solución, que se mantiene a 37 °C durante 20 min, invirtiendo y moviendo el vial donde se encuentra el medio y el tejido cada 5 min.
2. Posteriormente se añade 1 mg/ml de DNasa (Sigma-Aldrich®) a la solución de papaína y de tejido diseccionado. Se mezcla y se deja incubando a 37 °C durante 3 min. A continuación, la suspensión se centrifuga durante 5 min a 1200 g.

3. Se aspira el sobrenadante y mantenemos el sedimento, donde se encuentran las células y se resuspende con la solución EBSS (**Tabla 5**). Se añade con cuidado la solución 10/10 con el fin de que se formen dos fases. Se centrifuga la solución durante 10 min a 1200 g.
4. Por último, se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en medio de cultivo Neurobasal (**Tabla 5**). Se filtra la suspensión de Neurobasal y células usando filtros de 70 μm de poro.

Las células se cuantifican utilizando Tripán Blue (Sigma-Aldrich®) y se siembran en medio de cultivo Neurobasal en las placas tratadas previamente con Poli-L y lavadas con PBS. El número de células sembradas dependerá del tamaño del pocillo, de la placa utilizada y de los días en cultivo que se requieren para cada experimento (**Tabla 6**). Para experimentos más largos que los indicados en la **Tabla 6**, se redujo el número de células sembradas.

Tamaño de placa	Superficie	Volumen	Nº de células por placa o pocillo
Cámara de cultivo (8 cámaras)	0,69 cm ² (por cámara)	100 μl (por cámara)	55.000-69.000 células
24 pocillos	2 cm ²	1 ml	295.000-365.000 células
12 pocillos	4 cm ²	2 ml	590.000-730.000 células
3,5 cm	10 cm ²	3 ml	800.000-1.000.000 células
6 cm	28 cm ²	7 ml	2.240.000-2.800.000 células

Tabla 6. Placas de cultivo utilizadas. Tabla en la que se muestran el tamaño y las placas y utilizadas, así como la superficie, el volumen y el número de células sembradas en cada una de ellas para experimentos de entre 8 y 10DIC.

4.2. _ Cultivos de células Human Embryonic Kidney (HEK) 293 y HEK293-FT

Debido a su rápido crecimiento a su fácil transfección y a su naturaleza de célula epitelial, se han empleado líneas celulares derivadas de células embrionarias de riñón humano HEK293 (ATCC®) que han sido cultivadas en Flash (Nunc™ de 75 cm²), con el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Gibco™ ThermoFisher) suplementado con el 10 % de Suero Fetal Bobino inactivado (SFBi Sigma-Aldrich®), 1 % de aminoácidos no esenciales (ThermoFisher Scientific), 1 % de Penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) y 2 mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich®). El medio se ha cambiado cada dos días y los experimentos se han realizado cuando las células estaban confluyentes.

Las células HEK293-FT son células derivadas de las HEK293 que han sido transfectadas establemente con el antígeno T del virus SV40 que consigue una mejor producción de partículas lentivirales. Esta línea celular expresa un gen de resistencia a geneticina por lo que además del medio y de los suplementos de las HEK293, se mantienen con 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibiótico G418 geneticina (ThermoFisher Scientific) como antibiótico selectivo.

5._ Producción y amplificación de plásmidos

La generación y amplificación de plásmidos fue realizada y diseñada en el laboratorio por el Dr. Antonio Escudero Paniagua durante el desarrollo de su tesis doctoral, según el protocolo que se indica a continuación. Los plásmidos han sido destinados para la elaboración de ARN de horquilla pequeña (shRNA) producidos mediante el injerto de las secuencias que se muestran en el **Esquema 22** en el vector pLVTHM (Addgene) (**Esquema 23**).

```
shCONTROL  5' -CGCGT GCGCGCTTTGTAGGATTCG TTCAAGAGA CGAATCCTACAAAGCGCGC TTTTGGAAAT- 3'
shCRB2#2   5' -CGCGT TGACTTCTACTGCACCTGC TTCAAGAGA GCAGGTGCAGTAGAAGTCA TTTTGGAAAT- 3'
shCRB2#3   5' -CGCGT CGAAGTGGATGAGGACGAA TTCAAGAGA TTCGTCCTCATCCACTCG TTTTGGAAAT- 3'
shCRB2#4   5' -CGCGT CCACCAGAGGAGAGACTTA TTCAAGAGA TAAGTCTCTCCTCTGGTGG TTTTGGAAAT- 3'
```

■	Nombre de los shRNAs.
■	Extremos cohesivos con las enzimas de restricción.
■	Secuencias bucles.
■	Secuencias complementarias al mRNA de CRB2.

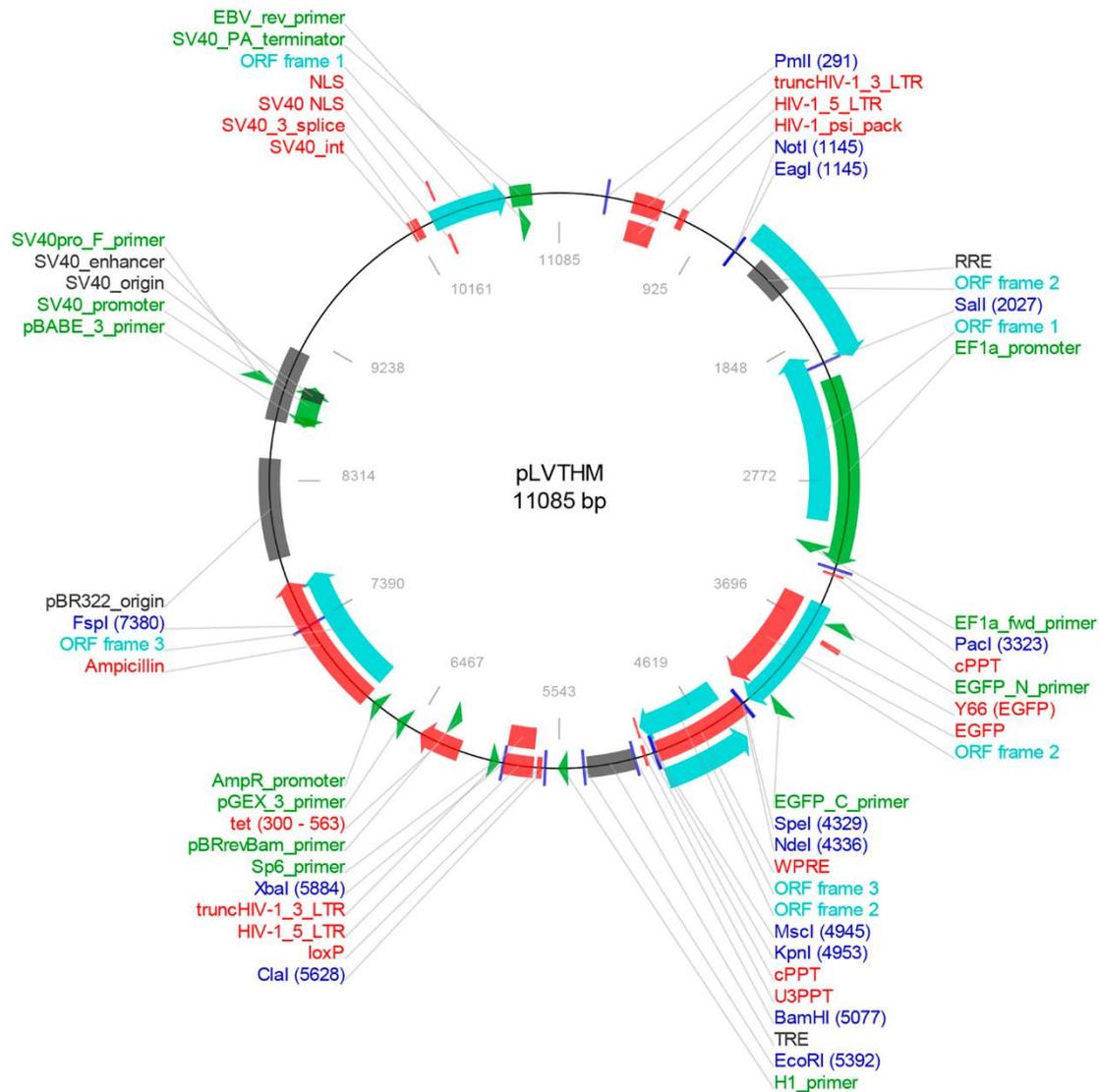
*Esquema 22. Listado y secuencias de los shRNAs producidos. Secuencias elegidas que son insertadas en el vector pLVTHM para la producción de los distintos shRNAs. En azul, se muestra la parte concreta de la secuencia en dirección 5'-3' complementaria al mRNA de CRB2. Los tres shCRB2 están dirigidos contra la especie *Mus musculus*, mientras que el shCONTROL contra *E. gracilis*.*

I. Anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos

Se anilló cada pareja de oligonucleótidos de las secuencias shRNAs con el tampón de anillamiento (100 mM de acetato potásico, 2 mM de acetato de magnesio y 30 mM de HEPES pH 7,4) durante 5 min a 95 °C. Se deja que alcancen la TA y los oligonucleótidos anillados se fosforilan con una solución que contiene una quinasa (Promega™), el tampón PNK buffer 10X (Promega™) y como fuente de pirofosfatos ATP (Promega™) durante 20 min a 37 °C y posteriormente a 75 °C durante 10 min.

II. Corte y fosforilación del plásmido

Una vez que las secuencias fueron anilladas, se clonaron en el vector pLVTHM, y para ello, el vector fue digerido por las enzimas de restricción ClaI y MluI (ThermoFisher Scientific) en una mezcla constituida por un 10 % de dithiothreitol (DTT) 10 mM, 10 % de espermidina 30 mM y 10 % de tampón Tris-Acético 330 mM pH 7,5, 100 mM de acetato de magnesio, 600 mM de acetato potásico y 1 mg/ml de suero de albúmina bovino (BSA, Sigma-Aldrich®). Se añadió la enzima fosfatasa alcalina FastAP (ThermoFisher Scientific) para desfosforilar el plásmido y evitar su reanillamiento. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y posteriormente a 80 °C durante 20 min para inactivar la enzima



Esquema 23. Esquema del vector pLVTHM. Vector utilizado para la clonación de las distintas secuencias shRNA empleadas en el presente trabajo. En el esquema se muestran los genes de interés, así como los marcos de lectura abierta (ORF) y algunos sitios de restricción.

III. Ligación

Por último, se produce la ligación de las secuencias de los shRNAs con el vector pLVTHM mediante la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs™).

IV. Secuenciación

Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para comprobar que las secuencias insertadas eran las correctas.

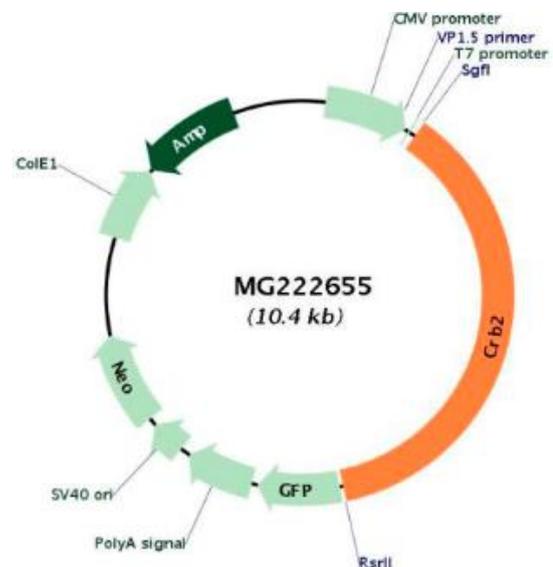
V. Amplificación

Para la amplificación de los plásmidos y a fin de obtener la mayor cantidad posible, se han utilizado bacterias competentes de *Escherichia coli* de la cepa DH5α. Los plásmidos a amplificar, con una concentración final de 0.1 µg/µl, se

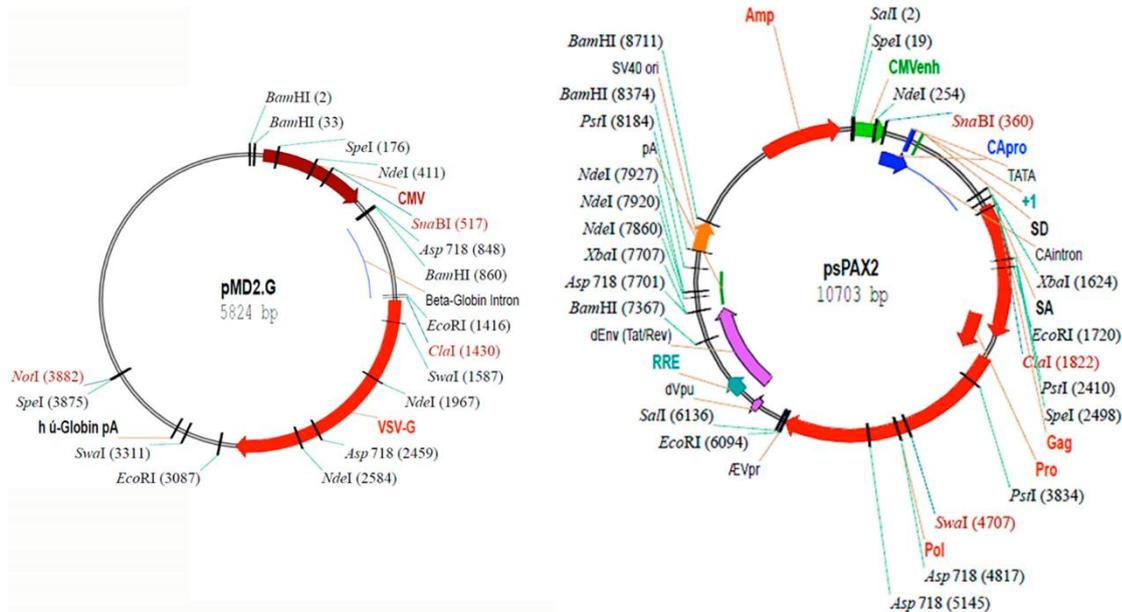
mezclan con las bacterias transformantes. La transformación se produce mediante un choque térmico: 90 segundos a 42 °C y a 4 °C durante 4 minutos, y se cultivan en el medio de cultivo Luria Broth (LB) con 100 µg/µl de ampicilina para realizar la selección positiva de las colonias transformantes. Se siembran en placas con medio de cultivo LB-agar con 100 µg/µl de ampicilina y tras 12 horas a 37 °C, colonias aisladas son sembradas en medio LB líquido con el mismo antibiótico y misma temperatura que las placas de agar, y en agitación para facilitar a oxigenación.

6._ Transfección de cultivos celulares por el método del fosfato cálcico

Este método se basa en la formación de precipitados de fosfato de calcio junto con el ADN que se desea transfectar, que se añaden al medio y son internalizados por las células de cultivo. Para ello se mezclan entre 2 y 4 ng de ADN con 100 µl de CaCl 1 M, 200 µl de agua ultrapura y una solución salina de fosfatos 2xHBSS (274 mM NaCl, 10 mM, 10 mM KCl, 1.4 mM Na₂HPO₄, 15 mM D-Glucosa, 42 mM HEPES). La solución tiene que ser mezclada lentamente por goteo en agitación con 300 µl del tampón salino HEPES 2X (Sigma-Aldrich®). Después se incubaba a TA durante 20 min y se añade a la placa de cultivo. Mediante este método se ha transfectado el plásmido Crb2 ORF Clone vector pCMV6-AC-GFP (OriGene Technologies) que codifica para la proteína CRB2 murina fusionada por el extremo C-terminal a tGFP (**Esquema 24**) en células HEK293-FT, así como los plásmidos necesarios para generar partículas lentivirales psPAX2 (Addgen) y pMD2.G (Addgen) (**Esquema 25**) junto con los correspondientes plásmidos generados de shRNAs en células HEK293-FT.



Esquema 24. Esquema de la secuencia y regiones de interés del vector MG 222655. Codifica para la proteína murina CRB2 unida a GFP.



Esquema 25. Esquema de la secuencia y regiones de interés de los plásmidos pMD2.G y psPAX2

7._ Generación de partículas lentivirales e infección de neuronas corticales y de hipocampo de ratón

7.1._ Producción de factores lentivirales en células HEK293-FT

La producción de partículas lentivirales se realiza en células HEK293-FT que han sido transfectadas en placas de 55 cm² (Corning®) sin tratar y tras varios pases, se encuentran en confluencia. Tras varios lavados con PBS, las células son tripsinizadas con una solución 0,05 % de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®) e incubadas durante 2 min a 37 °C. Posteriormente, la tripsinización se inactiva con suero, se centrifuga a 100 g durante 5 minutos y el sedimento obtenido se resuspende en el medio de cultivo DMEM (10 % de Suero Fetal Bobino inactivado, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % y L-Glutamina 2 mM) y se siembra en placas de 55 cm² tratadas previamente con Poli-L-lisina. Tras dos días, y tras comprobar que las células están confluyentes, se tripsinizan y se siembran 2.5 millones de células HEK293-FT para placas de 55 cm², junto con geneticina como antibiótico selectivo (Gibco™ Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 500 mg/ml en el medio de cultivo DMEM.

Transcurridas 24 h se procede a la producción de las partículas lentivirales en las células 293-FT. La mezcla de transfección contiene 20 µg de los plásmidos pLVTHM de interés, 15 µg del plásmido psPAX2 (Addgene) que codifica para las proteínas encargadas del empaquetamiento, así como 6 µg de plásmidos pMD2G (Addgene) que codifica para la

envuelta del virión. La transfección se realizará por medio del método del fosfato cálcico indicado previamente (apartado 6). Tras 8 h de transfección, se renueva el medio de cultivo y 48 h más tarde, momento en el que se obtiene el mayor pico de producción de partículas lentivirales, se recolecta el medio que es donde se encuentran estas partículas, eliminando posibles restos celulares por centrifugación a TA durante 5 min a 1000 g. Todo el material que ha estado en contacto con las células que producen las partículas lentivirales es tratado con hipoclorito de sodio y depositado en contenedores de bioseguridad.

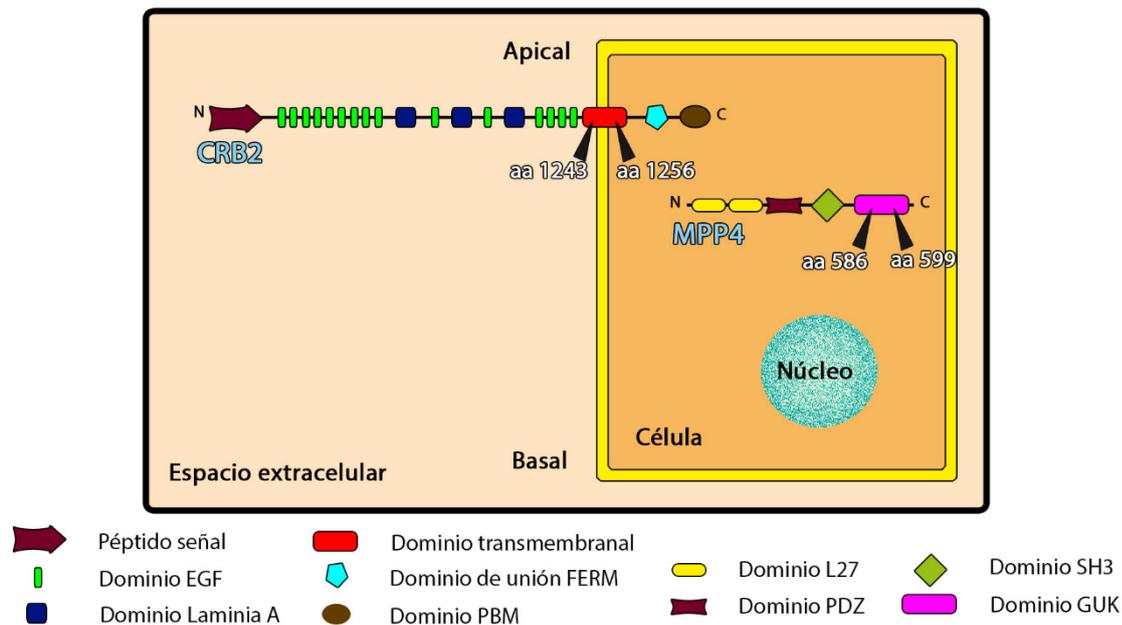
7.2._ Infección de neuronas con partículas lentivirales

Para la infección de neuronas en cultivo de ratón, se añade entre 100 y 200 µl de medio con las partículas lentivirales por cada 100.000 células de cultivo. La infección se realiza a las 24 h de la siembra, 1 día en cultivo (1DIC) y este medio de infección solo se retira cuando es necesario realizar un cambio de medio de las células, llegando a producirse en algún caso una segunda infección.

8._ Producción de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra las proteínas murinas CRB2 y MPP4 han sido diseñados por nuestro grupo de investigación. Las secuencias específicas elegidas para elaborar los anticuerpos se enviaron a GenScript Corporation™ e ImmunoStep SL para el caso del anticuerpo contra CRB2, y Genosphere Biotechnology® para MPP4, que se encargaron de la producción de los péptidos, la inyección de los mismos en conejos y la posterior purificación de los antisueros.

La secuencia completa de aminoácidos de ambas proteínas se obtuvo de las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y para la selección de las secuencias antigénicas de cada proteína para generar cada péptido se empleó la herramienta Antigenicity Plot de la página web www.bioinformatics.org. Como se muestra en el **Esquema 26**, el anticuerpo policlonal anti-CRB2, está dirigido frente a la secuencia de aminoácidos entre la posición 1243 y 1256 de la parte transmembranaria de la proteína. El anticuerpo policlonal anti-MPP4 está dirigido frente a la secuencia de aminoácidos entre la posición 586 y 589.



Esquema 26. Esquema de la localización de la secuencia de aminoácidos usada para la producción de los anticuerpos. Esquema en el que se muestra la estructura con los dominios que conforman las proteínas CRB2 y MPP4, así como la localización de la secuencia aminoacídica utilizada para la producción de anticuerpos.

9._ Inmunofluorescencia

Esta técnica se ha realizado en secciones de cerebro de ratón y en cultivos primarios de neuronas obtenidas de Cx y de Hc de ratón.

9.1._ Procesamiento de secciones

Los animales del genotipo y la edad determinada se anestesiaron con una solución de hidrato de cloral 5 % en solución salina 0.9 % (p/v) administrándose 10 μ l/g de peso del animal. El efecto del anestésico se comprueba por la ausencia del reflejo de la cola, de la pata y por último del reflejo palpebral.

La fijación de las muestras se llevó a cabo mediante perfusión cardíaca por inyección de 50 μ l de una solución de heparina sódica para evitar la formación de trombos. Se coloca una cánula en el ventrículo izquierdo donde, por medio de una bomba peristáltica se hace pasar durante un minuto solución salina al 0.9 % (p/v). Seguidamente se administra la solución fijadora compuesta por paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) diluido en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9. Tras 15 min de fijación se extrae el cerebro y se postfija durante 2 h en la misma solución. Posteriormente se elimina el exceso de fijador realizando varios lavados con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 24 h y a fin de evitar la formación de cristales al congelarse, las muestras son crioprotegidas en una solución de sacarosa al 30 % (p/v) y tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Después, las muestras se encastran en Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura) y se destinan,

bien para seccionamiento inmediato o bien se congelan en nitrógeno líquido y se preservan a -20 °C hasta su seccionamiento.

Las secciones se obtienen mediante criostato o microtomo de deslizamiento en función del grosor de las secciones que se pretende obtener.

- Microtomo de deslizamiento Leica® frigomobil, Jung SM 2000 Leica®, Nusscoch Germany: Microtomo acoplado a una fuente fría, con el que se han obtenido secciones de 30 µm de grosor. Las secciones se recogen en placas de 12 pocillos (NUNC™ 4 x 3) por orden de obtención en una solución de tampón fosfato 0.1 M pH 7,4. Tras varios lavados con tampón fosfato 0.1 M pH 7,4, éste se sustituye por solución congeladora (20 % de tampón fosfato 0,5 M, 30 % de glicerina (v/v) y 30 % de etilenglicol (v/v)) y los cortes se almacenan a 4 °C hasta su empleo.
- Criostato Microm HM560, Thermo Scientific: Para la obtención de secciones de 14 µm de grosor, que se recogen en portaobjetos Superfrost Ultra Plus® (ThermoFisher Scientific) y se han conservado a -20 °C hasta su utilización.

9.2._ Procesamiento de cultivos celulares

Para la detección inmunohistoquímica de proteínas en cultivos neuronales se emplearon células desde 1 hora hasta 25DIC. Para ello, primero se retira el medio de cultivo Neurobasal en el que han crecido las células y posteriormente, tras haber realizado diferentes pruebas de fijación, se eligió la que proporcionó mejores resultados inmunohistoquímicos, que fue la mezcla de PFA 4 % (p/v) en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9, a 4 °C durante 1 h.

I. Lavados y permeabilidad

Las secciones se lavan varias veces PBS 0.1 M pH7.4 a TA durante 10 min, seguido de dos lavados de 10 min con PBS con Triton™ X-100 (PBS-Tx, Sigma Aldrich®) a una concentración 0,2 % (v/v), detergente usado para favorecer la permeabilidad de la membrana plasmática frente a los reactivos.

II. Bloqueo

Tras los lavados, las secciones son preincubadas con una solución de bloqueo compuesta por PBS-Tx (0,02 %), BSA 1 % (v/v) y suero al 5 % (v/v) del animal en el que esté hecho el anticuerpo secundario que se utilice. El bloqueo se realiza durante 1 h a TA.

III. *Incubación con el anticuerpo primario*

Para la detección inmunohistoquímica de proteínas de interés, las muestras a continuación se incuban con el anticuerpo primario que detecta dicha proteína (tipos y concentraciones indicadas en **Tabla 7**) diluido en una mezcla de PBS-Tx (0,02 %), BSA 1 % (v/v) y suero al 2 % del animal del que se ha obtenido el anticuerpo secundario durante toda la noche a 4 °C.

IV. *Lavados*

Tras varios lavados con PBS y PBS-Tx de 10 min, se procede a la incubación de las muestras con los anticuerpos secundarios.

V. *Incubación con el anticuerpo secundario y marcadores nucleares*

Los anticuerpos secundarios Alexa[®]-555, Alexa-488 y/o Alexa-633 (ThermoFisher Scientific Invitrogen™) dirigidos contra la fracción constante del anticuerpo primario correspondiente se incuban con las muestras a una concentración 1:750 (v/v) durante 1 h a TA en una solución de PBS-Tx (0,02 %), BSA 1 % (v/v) y suero al 2 % del animal en el que esté hecho el anticuerpo secundario, junto con el marcador de núcleos DAPI (Sigma Aldrich[®]) o TO-PRO[®] 3-Iodide (Invitrogen™).

VI. *Lavado y montaje de las muestras*

Para finalizar, se realizan dos lavados con PBS-Tx de 10 min y un lavado de 10 min de PBS y las muestras se montan en portaobjetos con el medio Prolong[®] Gold Antifading reagent (ThermoFisher Scientific) y con cubreobjetos.

10. Inmunohistoquímica con el método Avidina-Biotina-Peroxidasa

Esta técnica se ha realizado en secciones de cerebro de ratón, en tejidos de origen epitelial y en secciones de CxFr de cerebro humano.

i. *Lavados*

Las secciones son sometidas a tres lavados de 10 min con PBS.

ii. *Eliminación de la peroxidasa endógena*

Después de varios lavados con PBS a TA y con el fin de eliminar la peroxidasa endógena del tejido, las secciones son sometidas a un baño de PBS, metanol y H₂O₂ al 30 % (v/v) durante 15 min. Seguidamente, las secciones son lavadas

con PBS-Tx (0,05 %) 0,4 M (v/v) pH 8 hasta eliminar por completo las burbujas formadas en el tejido en el paso anterior, señal de la detención de la reacción. Posteriormente, las secciones se someten a 3 lavados de 20 min en una solución PBS-Tx (0,05 %) 0,4 M (v/v) pH 8 a TA.

iii. Incubación con el anticuerpo primario

Las secciones son incubadas toda la noche a temperatura ambiente o 72 horas a 4 °C con el anticuerpo primario contra CRB2 (**Tabla 7**) disuelto en una solución de PBS-Tx (0,05 %).

iv. Lavados e incubación con el anticuerpo secundario

Se realizan tres lavados de 10 min cada uno de ellos de las secciones con PBS-Tx (0,05 %) a TA; las muestras se incuban con el anticuerpo secundario de rábano (Jackson ImmunoResearch™ 1:300) en el medio PBS-Tx (0,05 %) durante 2 h.

v. Lavados e incubación con el complejo ABC

El exceso de anticuerpo secundario se elimina con 3 lavados con PBS-Tx (0,05 %) de 10 min a TA y posteriormente, las muestras son incubadas durante 3 h a TA con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) en PBS-Tx (0,05 %) que tiene que ser preparado con una antelación de 30 min.

vi. Lavados y revelado

La reacción se detiene al realizar tres lavados de 10 min en PBS-Tx (0,05 %) y para poner de manifiesto el marcaje, las secciones se incuban con una mezcla de reacción compuesta por 3-3' diaminobencidina (DAB) y H₂O₂ al 30 % en PBS-Tx (0,05 %) a TA. La reacción enzimática consiste en que el complejo ABC reacciona con el H₂O₂ de forma que el DAB precipita en el lugar en el que se haya producido la reacción, dando lugar a un precipitado de color marrón, un cromógeno, que indicará la localización precisa de la proteína detectada con los anticuerpos.

vii. Lavados, deshidratación y montaje de las muestras

Finalmente se realizan dos lavados con PBS-Tx (0,05 %) durante 10 min a TA y se deshidratan en una batería de alcoholes de graduación creciente, se aclaran con Xilol y se coloca un cubreobjetos con Entellan (Merck®) como medio de montaje.

Anticuerpos primarios y moléculas fluorescentes	Casa comercial	Referencia	IF	WB
Calbindina	Swant®	300	1:1000	
Citoqueratina	Sigma-Aldrich®	C2562	1:100	
Claudina1	Santa Cruz Biotechnology®	sc-81976		1:200
CRB2	Diseño propio, producción GenScript Corporation™		2,25 µg/ml	2,25 µg/ml
CRB2	Diseño propio, producción ImmunoStep SL		2,25 µg/ml	2,25 µg/ml
CRB2	Santa Cruz Biotechnology®	sc-107192	1:200	
CRB2	Sigma-Aldrich®	HPA043674	1:200	1:100
CRB2	Thermo Fisher Scientific	PA5-25628	1:200	1:100
CRB3	Santa Cruz Biotechnology®	sc-27906		1:500
DAPI (4', 6-diamidino-6-fenilindol)	Sigma-Aldrich®	D9542	1:10000	
Doblecortina	Santa Cruz Biotechnology®	sc-8066	1:1000	1:200
Doblecortina (DCX)	CusaBio®	PA006576DA01HU	1:1000	
GAPDH	Sigma-Aldrich®	G8795		1:10000
GFAP	Sigma-Aldrich®	G6171	1:500	
GFP	Clontech	632381	1:1000	
Iba1	Santa Cruz Biotechnology®	sc-32725	1:250	1:100
iNOS	Abcam®	ab15323		1:200
MAP2	Sigma-Aldrich®	M 1406	1:1000	
MPP4	Diseño propio, producción Genosphere Biotechnology®		1:250	1:2500
Nestina	Santa Cruz Biotechnology®	sc-23927	1:200	
Nestina	Abcam®	ab27952	1:200	1:500
NeuroD1	Santa Cruz Biotechnology®	sc-46684	1:500	
NeuroD1	Abcam®	ab16508		1:100
Ocludina	Invitrogen™	71-1500		1:200
Olig1	Everest Biotech	EB07826	1:100	
Pals 1	Abnova	H00064398-A01	1:1000	
Pals1	Millipore	07-708		1:1000
Par3	Millipore™	07-330		1:250
Par6	Abcam®	ab6022	1:100	
PSD95	Thermo Fisher Scientific	MA1-045	1:5000	1:2000
Rab8A	Abcam®	ab128022	1:100	1:500
SCRIB	Santa Cruz Biotechnology®	sc-11048	1:50	
Sinapsina	Synaptic Systems	106001	1:500	1:1000
Sinapsina Ia/b	Santa Cruz Biotechnology®	sc-7379	1:200	
Sinaptofisina (SYP)	Sigma-Aldrich®	S 5728	1:5000	1:5000
TO-PRO 3-Iodide	ThermoFisher Scientific	T3605	1:1000	
TuJ1	Biologend®	801202	1:500	
V-Glut1	Synaptic Systems	135511	1:500	
VPS35	Santa Cruz Biotechnology®	sc-374372	1:50	1:100
β Actina	Sigma-Aldrich®	A5441		1:2500
β Catenina	Santa Cruz Biotechnology®	sc-1496		1:100
β Tubulina	Sigma-Aldrich®	T2200		1:10000

Tabla 7. Tabla en la que se muestran los anticuerpos primarios y moléculas fluorescentes utilizados. En la tabla se muestran los anticuerpos primarios y moléculas fluorescentes utilizados en el presente trabajo, así como la casa comercial, la referencia y las concentraciones utilizadas para cada una de las técnicas realizadas.

11._ Western Blot

I. Procesamiento de las muestras

Para analizar la expresión proteica tanto en tejido como en neuronas en cultivo hemos empleado la técnica de Western blot. Todas las muestras han sido recogidas en tampón de lisis RIPA [150 mM Cloruro Sódico, 1 % de Triton X-100 (v/v), 0.5 % de Deoxicolato Sódico (p/v), 0,1 % de Dodecil Sulfato Sódico (SDS), 50 mM de Tris pH 8 con inhibidores de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma-Aldrich™)]. La obtención de las muestras difiere en función de su origen:

- A partir de tejido fresco: Se obtienen fracciones de aproximadamente 1 mm² de corteza, hipocampo y cerebelo y el tejido se disgrega mecánicamente en el tampón de lisis RIPA durante 2 h a 4 °C en agitación. Después, las muestras se centrifugan a 12000 g durante 20 min a 4 °C, reservando el sobrenadante donde se encuentran las proteínas extraídas. Las muestras de tejido humano procedentes de los bancos de cerebro fueron homogeneizadas en fragmentos de 1 cm², tamaño original de cesión.
- A partir de células en cultivo: Se retira el medio de cultivo de los pocillos seleccionados y se añade tampón de lisis RIPA. Se produce una disgregación mecánica y se recoge el volumen total del pocillo donde se encuentran disueltas las proteínas.

La concentración de proteínas de cada muestra ha sido medida por el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Laboratories) en un espectrofotómetro LT 4000 microplate reader (Labtech). En el caso de las proteínas obtenidas a partir de células en cultivo, con el fin de obtener la mayor cantidad de proteínas posible, hemos saturado la extracción de proteínas con exceso de tampón RIPA siendo necesario un proceso de concentración de proteínas de las muestras. Para ello, las proteínas de las muestras se precipitan en una solución de etanol absoluto (5 partes de etanol por cada parte de solución de proteínas) durante una noche a -20 °C. Transcurrido el tiempo, y siempre sin perder la cadena de frío, se centrifugan a la máxima velocidad, durante 15 min y a 4 °C y se desecha el sobrenadante resuspendiendo el sedimento de nuevo con el volumen deseado de tampón RIPA.

Las proteínas extraídas se preparan para la electroforesis añadiendo tampón de carga Laemli pH 6,8 con 2 % SDS (v/v), 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 10 % glicerol (v/v), 0,002 % azul de bromofenol (p/v) y 62,5 mM Tris-HCL.

II. Electroforesis

La electroforesis de las proteínas se ha realizado en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (AMRESCO®). Las soluciones de proteínas junto con el tampón de carga se calentaron a 70 °C durante 10 min para producir su desnaturalización, y se mantuvieron en hielo hasta ser cargadas en el gel. El cambio brusco de temperatura nos asegura que no se produzca una renaturalización de la proteína, hecho que reforzamos con el tampón de carga, ya que tanto las cargas negativas que aporta el SDS a las proteínas como el 2-mercaptoetanol evita que se renaturalicen.

Las proteínas así obtenidas se cargan en el gel junto con un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories), aplicándose un voltaje constante de entre 90 y 150 V en un tampón de migración (25 mM de Tris-Base, 190 mM de glicina (p/v) y SDS al 1 % (p/v), pH 8,3 en agua) en una cubeta mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories) hasta que las proteínas de menos tamaño peso molecular han llegado hasta el final del gel.

III. Transferencia

Separadas las proteínas en los distintos pesos moleculares en función del porcentaje del poro del gel, se transfieren a una membrana de PVDF Immobilon™ (Millipore®) activada previamente con metanol. La transferencia se realiza con un amperaje constante de 300 mA durante 3 h a 4 °C en un tampón de transferencia (25 mM de Tris-Base, 190 mM de glicina y 10 % de metanol (v/v), pH 8,3 en agua) en un kit Mini Trans-Blot (Bio-Rad®).

Transcurrida la transferencia y a fin de comprobar que se ha realizado correctamente, se tiñe la membrana con el colorante rosa Ponceau al 0,1 % (p/v) diluido en ácido acético al 5 % (v/v) que tiñe las proteínas transferidas a las membranas. La membrana se lava con abundante agua hasta retirar por completo la presencia de colorante y se trata durante 1 h a TA y en agitación en una solución de tampón Tris-Base Salino (TBS).

IV. Preincubación

La membrana con las proteínas se preincuba durante 1 h a TA y en agitación en una solución de tampón Tris-Base Salino (TBS) con Tween-20 como detergente al 0,1 % (v/v) (TBST) y BSA al 2 % (TBST-BSA).

V. Incubación con los anticuerpos primario y secundario

Tras retirar esta solución de preincubación, la membrana se incuba con los correspondientes anticuerpos primarios (**Tabla 7**), en una solución de TBST-BSA 2 % durante toda la noche a 4 °C y en agitación.

VI. Lavados e incubación con el anticuerpo secundario

Posteriormente, la membrana se lava tres veces durante 10 min cada lavado a TA con TBST y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch™) a una concentración de 1:5000 (v/v) en TBST-BSA y 5 % de leche desnatada en polvo durante 1 h a temperatura ambiente.

VII. Revelado

Tras varios lavados con TBST se realiza el revelado de las membranas, para lo que se utilizó el kit de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories) que junto con la peroxidasa de rábano del anticuerpo HRP, produce una señal que se expone a una película radiográfica Super RX (Fujifilm) con el kit RP X-OMAT EX II (Kodak), se lava con agua y se fija con el kit RP X-OMAT LO (Kodak).

12._ Marcaje de β -amiloide en secciones de cerebro humano

Hemos marcado placas de amiloide en secciones de cerebro de pacientes con EA, con el fin de poder investigar la posibilidad de la localización de CRB2 en estas placas. Para ello se ha utilizado el kit comercial de marcaje de placas de amiloide “Kit de tinción Rojo Congo – Kit para identificación de amiloide según Highman” (Merck Millipore 1.01641.0001). El Rojo Congo es un colorante aniónico que se deposita entre las fibrillas de amiloide, que adquieren un color naranja-rojizo.

Para ello, las secciones de cerebro de 12 μ m mantenidas a -20 °C se descongelan a TA durante 15 min, se lavan con agua destilada durante 1 min y se incuban con el reactivo 1 (Rojo Congo) durante 40 min. El exceso de colorante se retira con un lavado con agua corriente durante 5 min y posteriormente se incuban con el reactivo 2 (solución de KOH) durante 40 seg. El exceso

de reactivo 2 se retira con un lavado de agua corriente de 5 min y se procede al montaje de las secciones como se ha indicado previamente (apartado 10 de materiales y métodos).

13._ Estudio de polimorfismos de un único nucleótido

Por medio del análisis de Polimorfismos de un Único Nucleótido (SNP) hemos estudiado un SNP de CRB2 que consiste en un cambio de una C por una G en poblaciones control y con Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Se han analizado un total de 89 muestras tanto de pacientes control como con DMAE.

I. Extracción de ADN

Las muestras de ADN empleadas fueron cedidas por el Dr. Rogelio González Sarmiento (departamento de Medicina, Universidad de Salamanca), y habían sido obtenidas a partir de 10 ml de sangre periférica extraída por los métodos habituales y previo consentimiento informado. La manipulación de las muestras se realizará siempre con puntas con filtro y todo será desechado en contenedores de restos biológicos.

- a. Se centrifugan las muestras a 850 g durante 15' a 4 °C, consiguiendo que se formen tres fases: la fase superior es el plasma (suero más factores de coagulación), en el fondo toda la fase eritrocitaria y entre ambas fases una estrecha capa blanquecina que constituye la fase de células blancas o nucleadas.
- b. Recogemos la capa de células blancas o nucleadas y la transferimos a un vial al que se añade 25 ml de agua destilada, se mezcla y se centrifuga a 850 g durante 15' a 4 °C. Con este paso se consigue la hidrólisis de los glóbulos rojos (hemolisis) por diferencia osmótica.
- c. El sobrenadante se descarta y se repite el paso "b" para asegurarnos de una completa hemolisis.
- d. Se resuspende el tapón celular obtenido en tampón de lisis (apartado 3.1) y se aplica el mismo protocolo de extracción de ADN que el realizado a partir de colas de ratón.

II. Análisis de la discriminación alélica

Para llevar a cabo la discriminación alélica del SNP de CRB2 (rs1105222) se han utilizado sondas TaqMan, sondas marcadas con fluorocromos que permiten

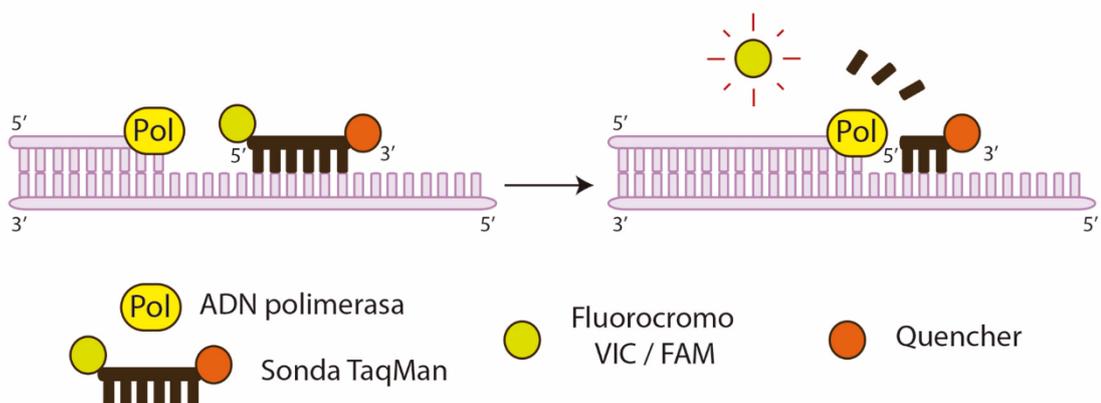
analizar los productos de PCR por PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) (termociclador a tiempo real Applied Boisystem) siguiendo los tiempos y ciclos que se indican en la

Pasos	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1	95 °C	3 min	1
2	95 °C	10 seg	35
3	58 °C	20 seg	
4	72 °C	40 seg	
5	72 °C	7 min	1

Tabla 8. Las sondas

Tabla 8. Temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la técnica de qPCR.

TaqMan presentan un fluoróforo en el extremo 5' y un represor de fluoróforo en el extremo 3' (conocido como quencher) ya que cuando ambos extremos están próximos, no emite fluorescencia. Estas sondas se unen a los productos de la PCR y a medida que la ADN polimerasa avanza, elimina el extremo 5' de la sonda mediante su actividad 5' exonucleasa, haciendo que se separe del extremo 3' y emita fluorescencia. La discriminación de ambos alelos se ha realizado por medio del uso de dos fluorocromos: VIC (que excita a 528 nm y emite a 546 nm) y FAN (que excita a 492 nm y emite a 515). De este modo, los resultados obtenidos de la amplificación del ADN y la medida de fluorescencia han servido en clasificar a la población en homocigota si se registra fluorescencia sólo del VIC o FAN o heterocigota si se registra fluorescencia de ambos (**Esquema 27**).



Esquema 27. Representación gráfica del mecanismo de acción de la PCR a tiempo real con sondas TaqMan

14._ Imágenes de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia realizadas en este trabajo se obtuvieron con un microscopio láser confocal (TCS SP2) con un valor de pinhole de 1,2 Airy Units y objetivo de inmersión de 40 y 63x. Los distintos fluorocromos utilizados (AlexaFluor®488 o Cy2 Sigma-

Aldrich®, AlexaFluor®555 o Cy3 Sigma-Aldrich®, AlexaFluor®633, y TO-PRO®3-Iodide) se excitaron con láseres de 488 nm, 543 nm y 633 nm. La captura de las imágenes de todos los canales se ha realizado de manera secuencial y se procesaron con el software Leica Confocal Software y los ajustes de brillo y contraste se realizaron con el programa informático Adobe® Photoshop® CS6 Extended.

Además, se ha utilizado el microscopio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy, UC, USA, Zeiss®) acoplado a una cámara Axio MRm Zeiss® para la obtención de las imágenes de pseudoconfocalidad y el estudio temporal de cultivos neuronales. Las imágenes han sido procesadas con el software ZEN 2011, y los ajustes de brillo y contraste se realizaron con el programa informático Adobe® Photoshop® CS6 Extended.

El conteo de células en las distintas capas de corteza, así como el conteo del número de células que expresan CRB2, que se infectan con los distintos shRNA utilizados como la relación que existen entre ambas, y el análisis de núcleos apoptóticos, se ha realizado gracias al programa informático ImageJ y su herramienta de conteo de células Image-based Tool for Counting Nuclei (ITCN).

15. _ Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado en este trabajo se ha realizado con el programa de análisis estadístico SPSS® Statistisc 20.0 (IBM®) y el programa Excel 2016 (Microsoft® Office) para la edición de los datos.

En primer lugar, se ha comprobado si las variables a estudiar tienen una distribución normal de sus datos, es decir, si sus datos son o no paramétricos. Para ello, se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov cuando la n es mayor de 50 y el test de Shapiro-Wilk para muestras de n menor de 50. En las muestras que presentan una distribución paramétrica se ha comprobado si presentan homogeneidad en sus varianzas, es decir si son homocedásticas o no. Para ello se ha hecho uso del test de homogeneidad de varianza o prueba de Levene. Llegados a este punto, a las muestras paramétricas y homocedásticas han sido sometidas a test paramétricos; mientras que aquellas muestras que o bien no son paramétricas o bien son paramétricas, pero no homocedásticas, han sido sometidas a test no paramétricos.

Para estudiar la existencia o no de diferencias entre muestras con distribución paramétrica y homocedásticas, se ha realizado la prueba T de Student para comparar dos

muestras independientes, o el test ANOVA para poder comparar más de dos muestras independientes y el test de Bonferroni como prueba post-hoc del ANOVA.

Para el resto de las muestras que no tienen una distribución paramétrica, no son homocedásticas o ambas posibilidades a la vez, se ha comprobado la existencia o no de diferencias por medio de la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, o la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos muestras independientes.

En el caso del análisis del polimorfismo SNP, se ha estudiado las frecuencias genotípicas y alélicas de ambas poblaciones por medio del test de Chi-Cuadrado (χ^2). Además, se ha calculado el factor de riesgo u Odd ratio (odd).

En todos los casos se ha considerado que existen diferencias significativas cuando el p-valor obtenido ha sido menor de 0,05 (abreviado como *), y diferencias altamente significativas cuando el p-valor obtenido ha sido menor de 0,01 (abreviado como **).

Resultados



1. Expresión y distribución de CRB2 en tejidos de ratón adulto

Para afrontar el primer objetivo de esta Tesis Doctoral, en primer lugar quisimos comprobar si el anticuerpo generado por nuestro grupo de trabajo (procedimiento descrito en el apartado de “materiales y métodos”) era eficaz para detectar de forma específica la presencia de CRB2 en cerebro de ratón, pues hasta la fecha, los anticuerpos comerciales descritos en otros trabajos no habían proporcionado esa información. En primer lugar, quisimos comprobar que este anticuerpo reconocía la proteína en lisados celulares a partir de tejidos en los que se conoce su presencia, como el epitelio pigmentario y la retina (**Figura 1 A**). Además, quisimos comprobar si nuestro anticuerpo reconocía la proteína en otros tejidos de origen epitelial en los que previamente se había demostrado la presencia del ARN mensajero para CRB2, como el riñón y el pulmón, por lo que se usaron estos lisados como control positivo, junto con un lisado celular a

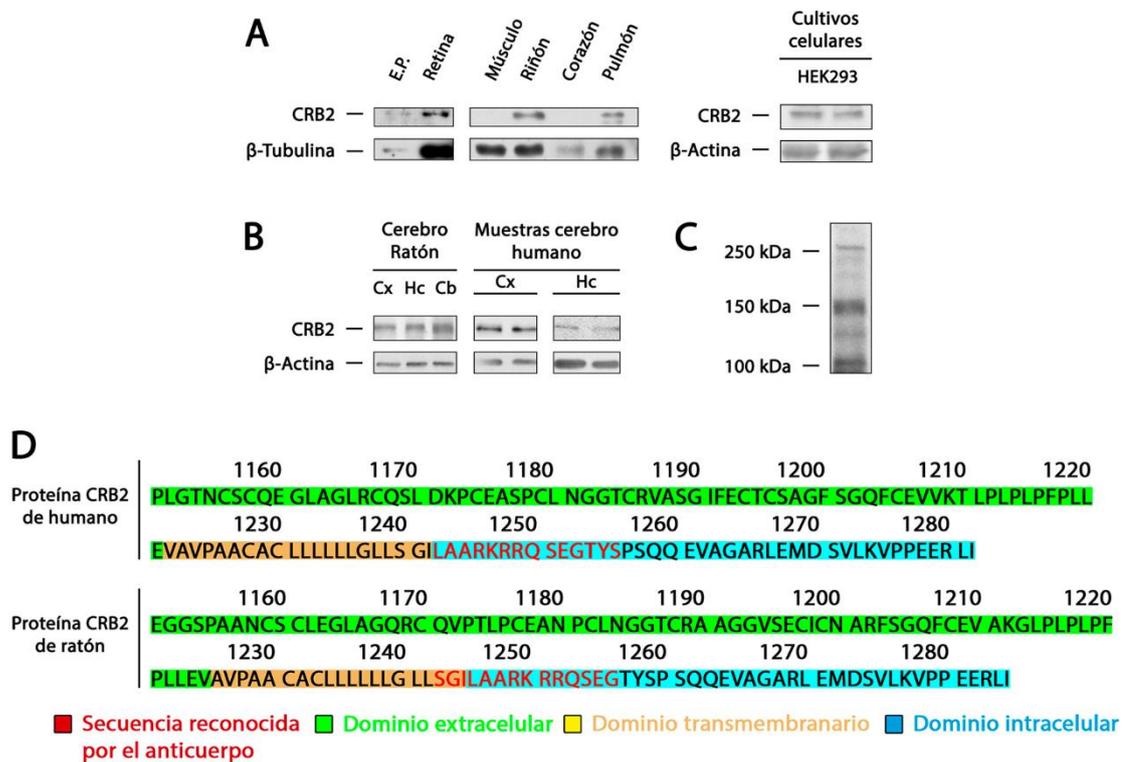


Figura 1. Estudio de la expresión de la proteína CRB2 en células epiteliales y cerebro murino y humano. A: Análisis por Western blot de la detección de CRB2 en lisados proteicos de tejidos en los que se ha demostrado la presencia de CRB2 como EP (Epitelio Pigmentario) y retina, así como en distintos derivados epiteliales como riñón y pulmón. Lisados proteicos de músculo y corazón se utilizaron como controles negativos. Lisados de células epiteliales en cultivo (HEK-293) fueron utilizados como control positivo. **B:** Detección por medio de Western blot, de la presencia de la proteína CRB2 en extractos proteicos de distintas áreas del cerebro de ratón adulto como corteza (Cx), hipocampo (Hc) y cerebelo (Cb), así como la detección en muestras de corteza e hipocampo humanas. β -tubulina y β -actina se han empleado como control de carga. **C:** Western blot de la detección de CRB2 en un lisado de Cb de ratón en el que se muestran distintas bandas a diferentes pesos moleculares correspondientes a las posibles modificaciones postraduccionales que puede sufrir la proteína. **D:** Esquema representativo de la secuencia aminoacídica de la proteína CRB2 humana y murina, así como sus dominios estructurales y la secuencia que reconoce el anticuerpo en cada caso en el que se observa hasta un 78,57 % de homología estructural entre ambas secuencias.

partir de un cultivo de células epiteliales de riñón humano HEK293, que también expresan esta proteína (**Figura 1 A**). A modo de control negativo, se ha utilizado lisado de proteínas de músculo, en los que no se ha detectado el mensajero, y corazón, donde apenas se identificó una mínima proporción del mensajero para CRB2 (van den Hurk et al., 2005). Con estas pruebas se comprobó que el anticuerpo generado en nuestro laboratorio reconoce específicamente una banda de aproximadamente 150 kDa en todos los órganos, tejidos y células en lo que se ha descrito la presencia de la proteína (epitelio pigmentario y retina), así como en tejidos derivados epiteliales, en los que se ha comprobado la presencia del mensajero para la proteína (riñón y pulmón), mientras que en lisados de tejidos de origen no epitelial como el músculo y corazón, el anticuerpo no detecta ninguna banda específica para CRB2.

Demostrada la eficacia de este anticuerpo para el reconocimiento de la proteína murina, quisimos comprobar si también es eficaz para reconocer la proteína en cerebro de ratón. Para ello, se realizaron análisis por Western blot a partir de lisados de proteínas de distintas zonas de cerebro de ratón adulto como corteza (Cx), hipocampo (Hc) y cerebelo (Cb). Se comprobó así que este anticuerpo efectivamente reconoce de forma específica la proteína CRB2 en cerebro, observándose una banda de 150 kDa en estos lisados (**Figura 1 B**). Del mismo modo, quisimos comprobar si el anticuerpo también era válido para detectar la proteína humana y para ello utilizamos lisados proteicos a partir de corteza frontal e hipocampo de pacientes humanos, observando una banda que equivale al peso de la proteína CRB2 (**Figura 1 B**). En la mayoría de los lisados proteicos analizados, como en las muestras de cerebelo, se ha detectado además una banda de aproximadamente 250 kDa (**Figura 1 C**), que podría corresponder a algún tipo de modificación postraducciona que sufra la proteína tal y como sucede en otros tejidos y se ha descrito en la bibliografía (Ramkumar et al., 2015). El análisis del porcentaje de homología entre la secuencia murina y humana que es reconocida por nuestro anticuerpo ha mostrado compartir una homología del 78,57 % (**Figura 1 D**). Todos estos análisis permiten concluir que el anticuerpo diseñado por nuestro grupo de investigación es por tanto efectivo no solo para detectar la proteína murina, sino también la proteína humana en lisados de cerebro, que presenta un peso molecular aproximado de 150 kDa.

1.1._ Presencia de CRB2 distintos tejidos de derivados epiteliales

Es conocido que las proteínas CRB en general se expresan en células epiteliales y estudios previos en nuestro laboratorio ya se había descrito la presencia de la proteína CRB2 concretamente en epitelio pigmentario de la retina. Una vez comprobada la efectividad y especificidad del anticuerpo para CRB2, quisimos aprovechar esta herramienta para investigar

la presencia de la proteína CRB2 en otros órganos de origen epitelial en ratón adulto. Para ello, se analizó la presencia de la proteína CRB2 en tejidos como riñón y pulmón, que se emplearon como control positivo, intestino delgado, testículo, vejiga y bazo, tanto por Western blot (**Figura 2 A**), como por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (**Figura 2 B-R**). Así, hemos podido comprobar que el nuevo anticuerpo es capaz de reconocer una banda del peso molecular estimado para CRB2 (150 kDa) en todos los tejidos derivados epiteliales, observándose la ausencia de proteína en el tejido adiposo, utilizado como control negativo al tratarse de un tejido de origen no epitelial. En secciones sagitales de intestino delgado (**Figura 2 B-D**) se aprecia de manera general, la presencia de CRB2 en el citoplasma del epitelio simple cilíndrico que recubre la mucosa (asteriscos **Figura 2 B-C**). Además, CRB2 también se expresa en los enterocitos, que se distinguen por su característico borde en cepillo (asterisco **Figura 2 B y D**) y en las células caliciformes (puntas de flecha amarillas **Figura 2 B**). Ambas células, enterocitos y células caliciformes, son variantes celulares del tejido epitelial que constituye el intestino delgado. En el riñón (**Figura 2 E-G**) CRB2 se localiza en la capa de células epiteliales que constituye la hoja parietal de la cápsula de Bowman (puntas de flecha amarillas **Figura 2 E**), y en las células epiteliales de los túbulos proximales renales que presentan un ancho borde en cepillo (asteriscos **Figura 2 E y G**). En el testículo (**Figura 2 H-J**) hemos detectado la presencia de CRB2 única y exclusivamente en los espermatoцитos (**Figura 2 H-J**), que junto con las espermatogonias y las células de Leydig (donde en ningún caso hemos observado marcaje para CRB2), constituyen lo que se conoce como epitelio seminífero que conforma los túbulos seminíferos contorneados. En pulmón (**Figura 2 K-M**), la proteína CRB2 se localiza en el epitelio de los bronquiolos formado por las células ciliadas y células de Clara, con su característico abultamiento convexo hacia la luz del bronquiolo. Por otro lado, podemos observar la presencia de CRB2 en el epitelio alveolar constituido por neumocitos de tipo I y II. En vejiga (**Figura 2 N-O**) podemos observar que CRB2 se extiende por toda la lámina epitelial o ureotelio que reviste toda la mucosa, que se caracteriza por una capa basal de células epiteliales proliferativas seguidas de varias capas de células epiteliales de transición (**Figura 2 N-O**). Por último, en el bazo (**Figura 2 P-R**) observamos la presencia de CRB2 en el epitelio reticular que constituye la pulpa roja y que deriva del ectodermo embrionario (**Figura 2 P**). Por otro lado, en ningún caso hemos detectado la presencia de CRB2 en las trabéculas de tejido conjuntivo que se extiende hacia el interior del bazo (ampliación **Figura 2 P**).

De este modo, hemos podido comprobar que la proteína CRB2 murina presenta una amplia distribución por diversos tejidos de origen epitelial y que nuestro anticuerpo es efectivo para detectar su presencia en estos tejidos, por lo que este estudio se convierte en el primero que describe la presencia y localización celular de CRB2 en estos derivados epiteliales.

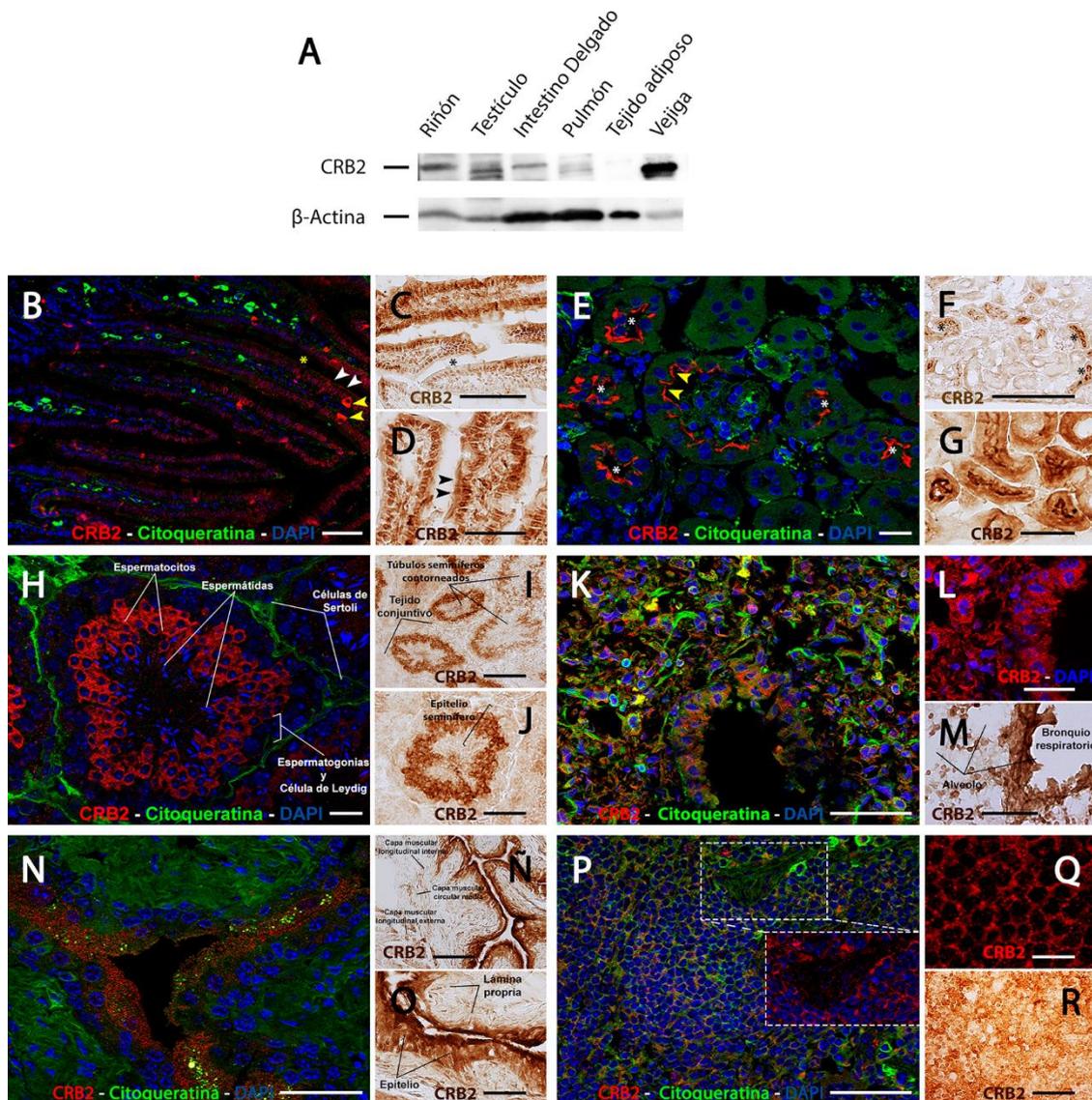


Figura 2. Caracterización de la expresión de la proteína CRB2 en distintos derivados epiteliales de ratón. **A:** Western blot de derivados epiteliales como riñón, intestino delgado, testículo, pulmón y vejiga en el que se observa la presencia de una banda a 150 kDa de peso molecular, correspondiente a la proteína CRB2. Se ha utilizado como control negativo tejido adiposo y se usó β -actina (42 kDa) como control de carga. **B-R:** Localización de CRB2 por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en secciones de distintos órganos de ratón. **B-D:** En secciones coronales de intestino de ratón, CRB2 se localiza en el epitelio simple cilíndrico de la mucosa, así como en los enterocitos y células caliciformes que constituyen el tejido epitelial del intestino delgado. **E-G:** En secciones coronales de riñón de ratón, CRB2 se localiza en la hoja parietal de la cápsula de Bowman y en las células epiteliales de los túbulos proximales renales. **H-J:** En secciones coronales de testículo de ratón, CRB2 está presente en los espermatoцитos, formando parte del epitelio seminífero de los túbulos seminíferos. **K-M:** En secciones coronales de pulmón de ratón, CRB2 se localiza en el epitelio alveolar, formado por neumocitos de tipo I y II. **N-O:** En secciones coronales de vejiga de ratón, se demuestra la presencia de CRB2 en el uroepitelio que reviste la mucosa. **P-R:** En secciones coronales de bazo de ratón, CRB2 se localiza en el epitelio reticular de la pulpa roja. DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barras de escala: 50 μ m (B, D, G, T, K, M, N, O, P, R); 100 μ m (C, I, Ñ, Q); 20 μ m (E, F, H); 25 μ m (L).

1.2._ Localización y distribución de la proteína CRB2 en cerebro de ratón

A continuación, quisimos conocer la localización de la proteína CRB2 en cerebro de ratón adulto. Para ello, realizamos técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en secciones tanto sagitales como coronales de cerebro de ratón. De este modo, hemos puesto de manifiesto cómo la proteína CRB2 está presente de manera generalizada y punteada por todo el cerebro (**Figura 3**) aunque en zonas concretas hemos encontrado un marcaje más intenso y abundante, como son áreas de corteza (CX), hipocampo (Hc), cerebelo (Cb), núcleo mesencefálico del trigémino (Me5) y especialmente en el hipotálamo (H) (**Figura 3 A**).

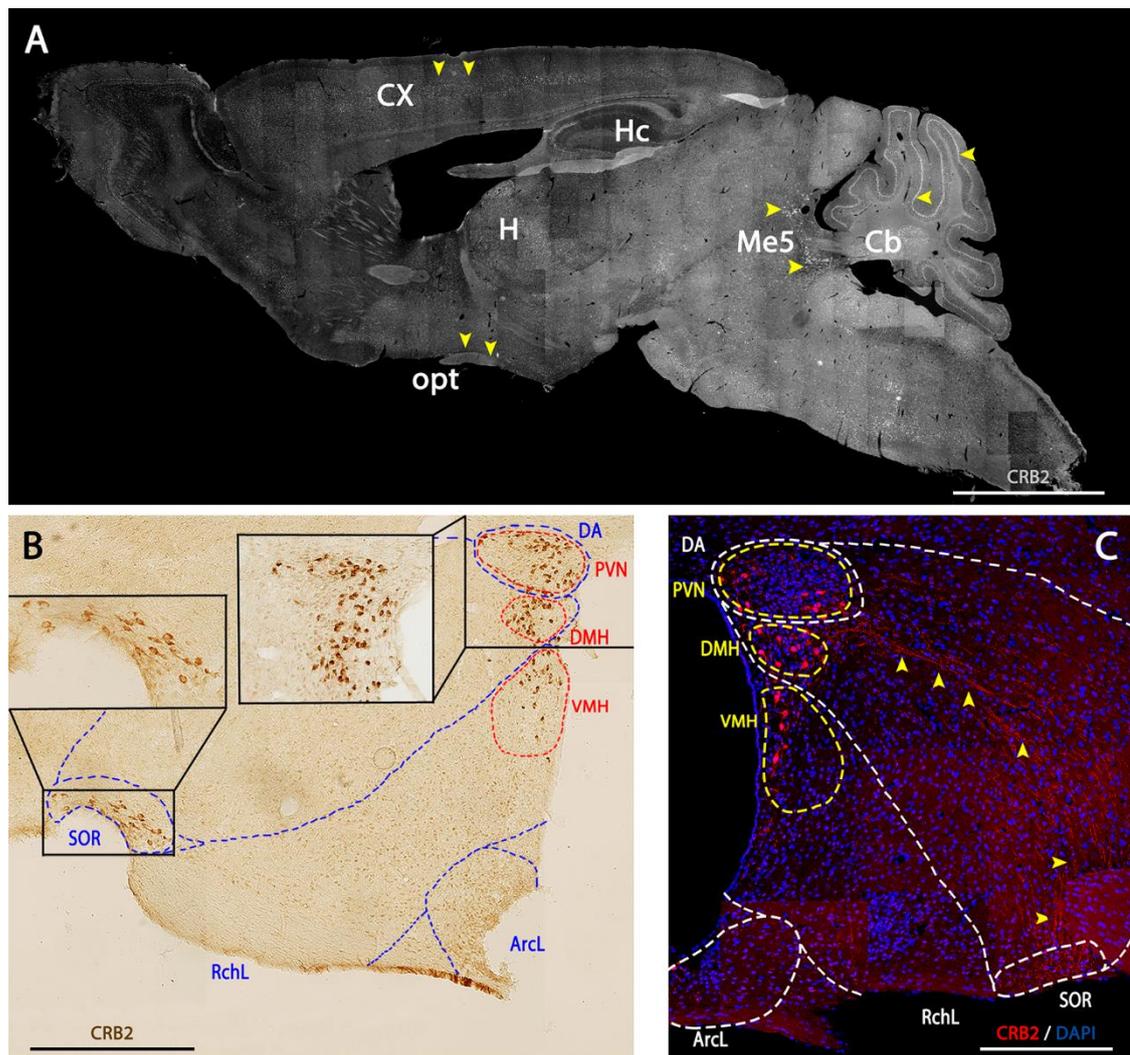


Figura 3. Localización de la proteína de CRB2, en cerebro de ratón adulto. **A:** Inmunofluorescencia para CRB2 en secciones sagitales de cerebro de ratón adulto donde se observa un marcaje punteado por todo el cerebro, siendo más evidente su presencia en zonas como la corteza (CX), el hipocampo (Hc), el cerebelo (Cb), el núcleo mesencefálico del trigémino (Me5), el tracto óptico (opt) y en hipotálamo (H) (flechas amarillas). **B:** Inmunohistoquímica para CRB2 en secciones coronales del hipotálamo de cerebro de ratón adulto. Se observa un marcaje de CRB2 más particular en núcleos del hipotálamo como el área dorsal (DA), el núcleo periventricular (PVN), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo ventromedial (VMH), el área supraóptica retroquiasmática (RchL), el núcleo arcuato lateral (ArcL) y el núcleo supraóptico retroquiasmático (SOR). **C:** Inmunofluorescencia para CRB2 en secciones coronales del hipotálamo de cerebro de ratón en el que se puede observar un marcaje punteado altamente ordenado desde el DA hasta la zona SOR (flechas amarillas). DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 200 μ m (A-C).

En concreto, es en la zona del hipotálamo donde hemos detectado un marcaje más particular de la proteína CRB2 (**Figura 3 B**). Además del marcaje punteado observado por todo el cerebro, en el hipotálamo se detecta la presencia de la proteína en cuerpos celulares que se encuentran organizados en núcleos concretos y delimitados. De este modo, hemos observado que CRB2 está presente en el Núcleo Periventricular del hipotálamo dorsal (PVN), Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo (DMH) y el Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH) (**Figura 3 B**). Además, encontramos un marcaje punteado particular, que se distribuye desde estas áreas hacia al área Supraóptica Retroquiasmática (SOR) (puntas de flecha amarillas en **Figura 3 C**), donde se detecta la presencia de la proteína CRB2 en cuerpos celulares concretos organizados en el núcleo SOR.

2._ CRB2 está presente en neuronas

Caracterizada la distribución de CRB2 en el cerebro de ratón adulto, nos propusimos determinar en qué tipo/s celular/es se expresa la proteína.

Las técnicas de inmunolocalización pusieron de manifiesto que el marcaje particular para CRB2 se encuentra en células con cuerpos celulares voluminosos y redondeados, características que indican que podrían ser neuronas. Para poder averiguarlo, diseñamos experimentos con dobles inmunofluorescencias para CRB2 y GFAP (Proteína Ácida Fibrilar de la Glía) (**Figura 4 A-D**) y para CRB2 y otros marcadores para otros tipos celulares presentes en el sistema nervioso central (SNC), como microglía (Iba1) (**Figura 4 E-G**) y oligodendrocitos (Olig1) (**Figura 4 H-J**). De este modo, hemos podido comprobar que tanto el marcaje punteado citoplasmático, como el marcaje para CRB2 que se observa en los procesos celulares, en ningún caso colocaliza con GFAP (**Figura 4 A-D**), por lo que podemos descartar que la proteína CRB2 se encuentre en astrocitos (**Figura 4 A-D**). Con respecto al resto de marcadores utilizados, se comprobó que en ningún caso hay colocalización ni con Iba1 ni con Olig1 (**Figura 4 E-J**), descartando por tanto su presencia en la glía del cerebro. Con la finalidad de confirmar estos resultados, y de asegurar que CRB2 está presente solo en neuronas, se diseñaron experimentos de doble marcaje para CRB2 (**Figura 4 K, M, N, O, P, R**) y distintos marcadores neuronales conocidos, como el marcador clásico neuronal Calbindina (proteína ligante de calcio), presente en la mayoría de las neuronas del hipotálamo (Baimbridge, Miller, & Parkes, 1982; Meszar, Girard, Saper, & Celio, 2012) (**Figura 4 L-M**), Tubulina III o Tuj1, específica de neuronas, (**Figura 4 Ñ-O**) o el marcador de microtúbulos asociados a proteína 2 (MAP2) (**Figura 4 P-R**).

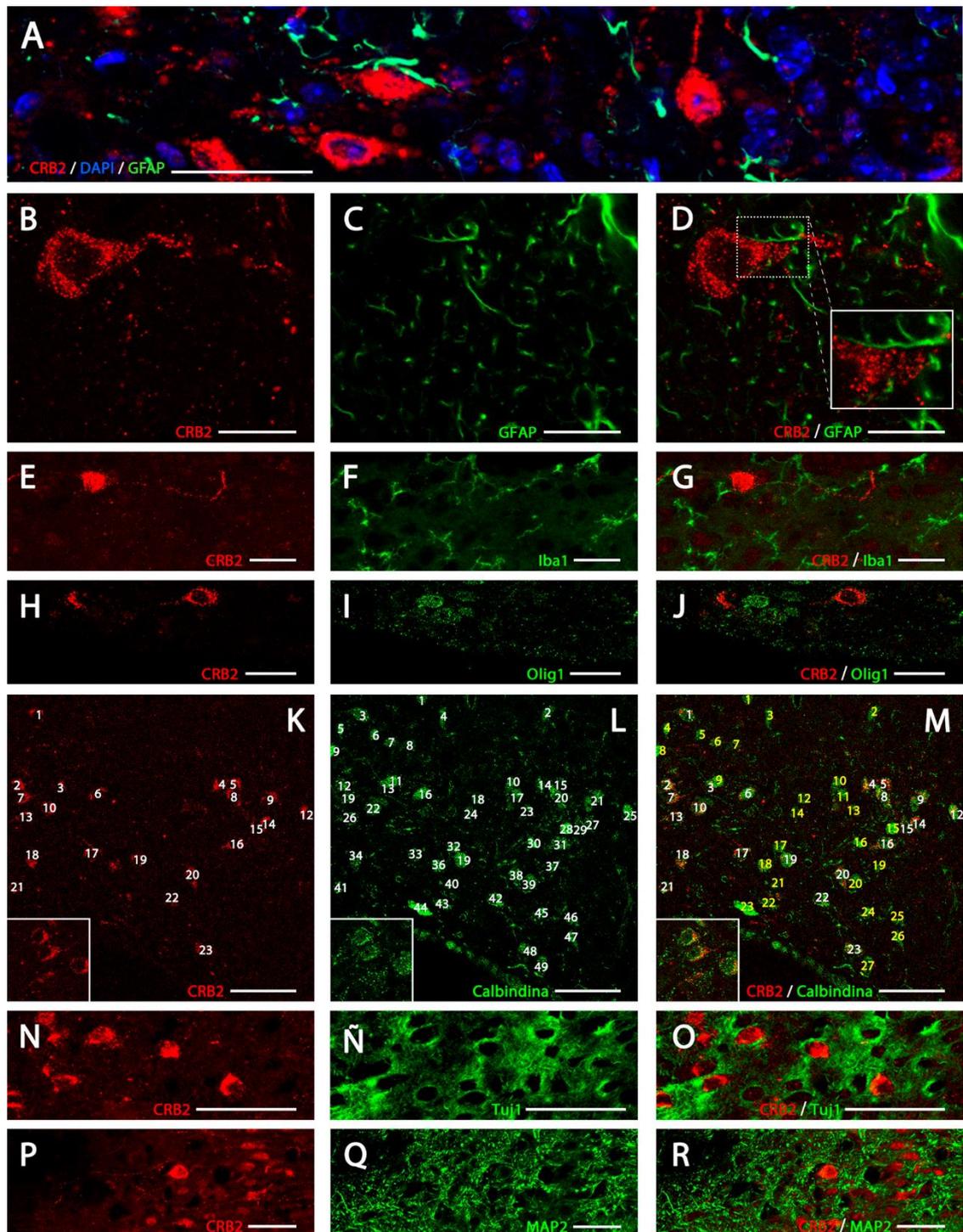


Figura 4. Localización celular de la proteína CRB2 en el PVN de cerebro adulto de ratón. Imágenes de microscopía de láser confocal del marcaje para CRB2 (A, B, D, E, G, H, J) y el marcador de astrocitos GFAP (A, C, D), de microglía Iba1 (F, G) y de oligodendrocitos Olig1 (I, J) en secciones coronales del PVN. CRB2 no colocaliza con ninguno de estos marcadores, por lo que no está presente en astrocitos, en microglía o en oligodendrocitos. Doble inmunofluorescencia para CRB2 (K, M, N, O, P, R) y marcadores neuronales como calbindina (L-M), Tuj1 (Ñ-O) o MAP2 (Q-R) en secciones coronales, en las que se observa que todas las neuronas marcadas para CRB2 contienen calbindina (numeración en blanco en K y M), pero no al contrario. Los marcadores del citoesqueleto neuronal Tuj1 (Ñ-O) y MAP2 (Q-R), demuestran que CRB2 está presente en los somas neuronales que se rodean de las proyecciones neuronales marcadas para Tuj1 y MAP2. DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 100 μ m (A), 15 μ m (B-D), 20 μ m (E-J), 50 μ m (K-R).

La doble inmunohistoquímica realizada para CRB2 y Calbindina demuestra la colocalización de estas dos proteínas en las mismas estructuras celulares, confirmando la hipótesis inicial de que CRB2 se expresa en neuronas (**Figura 4 K-M**). Además, al cuantificar el número de neuronas positivas para ambos marcadores, comprobamos que todas las neuronas positivas para CRB2 lo son también para Calbindina (numeración en blanco **Figura 4 K, M**), pero no al contrario, es decir, no todas las neuronas que contienen calbindina (numeración en amarillo en **Figura 4 M**), expresan la proteína CRB2 (**Figura 4 L-M**). Por otro lado, los resultados obtenidos con respecto al marcaje de CRB2 y los marcadores de citoesqueleto neuronal Tuj1 (**Figura 4 Ñ-O**) y MAP2 (**Figura 4 P-R**), corroboran la idea de que CRB2 se encuentra en neuronas, al observar el marcaje de CRB2 en los somas de las neuronas que están rodeados de las proyecciones del citoesqueleto, marcado para Tuj1 o MAP2.

Así, podemos concluir que la proteína CRB2 al no colocalizar con marcadores de astrocitos, microglía u oligodendrocitos, está única y exclusivamente presente en neuronas, hecho que hemos demostrado al comprobar la colocalización de CRB2 con otros marcadores de este tipo celular.

Debido a que CRB2 se encuentra distribuido por todo el cerebro de ratón y también a la importancia de las proteínas que constituyen los complejos de polaridad para el establecimiento y desarrollo de las células neurales en el desarrollo del SNC, nos propusimos comprobar si CRB2 está presente en las zonas descritas como neurogénicas en cerebro adulto de ratón. Para ello, se realizaron dobles marcajes para CRB2 y Doble cortina (DCX) (**Figura 5**), proteína que marca microtúbulos de precursores neurales. La identificación de neuronas jóvenes de nueva generación que expresan DCX en la zona subventricular (**Figura 5 A**), hipocampo (**Figura 5 B**) y bulbo olfativo (**Figura 5 C**) que además expresan la proteína CRB2 permitió determinar que en cerebro adulto, CRB2 está presente en algunas de estas neuronas

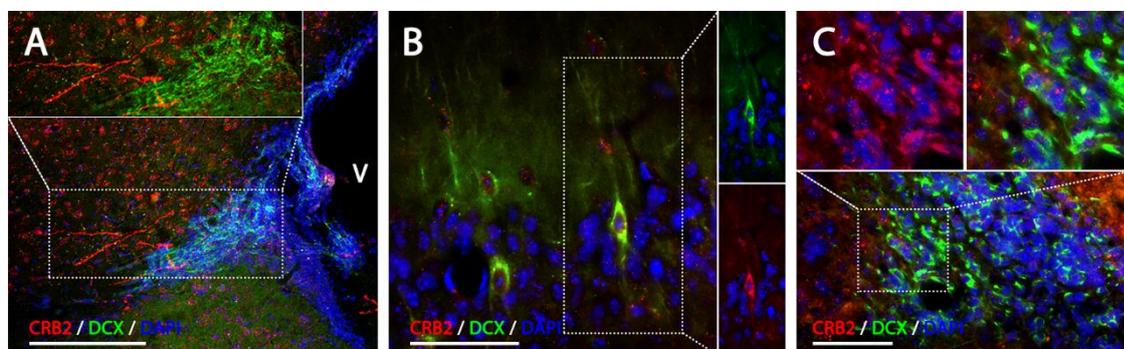


Figura 5. Localización de la proteína CRB2 en zonas de neurogénesis en cerebro de ratón adulto. Imágenes de epifluorescencia en las que se muestra la presencia de CRB2 en distintas zonas neurogénicas de cerebro adulto como zona subventricular (A), hipocampo (B) y bulbo olfativo (C). V: ventrículo. DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 100 μm (A), 50 μm (B-C).

de nueva formación. Pese a ello, como se ha indicado antes, la expresión de CRB2 no es exclusiva de estas zonas neurogénicas ni es donde más abundantemente se encuentra, siendo otras zonas del cerebro de ratón adulto como el hipotálamo, donde su expresión está más extendida.

Como se ha indicado previamente, CRB2 presenta una distribución general por todo el cerebro en somas neuronales, pero además de este patrón general de distribución de CRB2, se detectó un marcaje peculiar entre núcleos del hipotálamo en lo que parecen ser prolongaciones o proyecciones neuronales hacia distintos núcleos (puntas de flecha amarillas en **Figura 3 C**). Para comprobar si este marcaje puntuado se corresponde con terminales sinápticos o con vesículas se diseñaron experimentos de doble marcaje inmunohistoquímicos para CRB2 y distintos marcadores de terminales sinápticos (**Figura 6**), tanto postsinápticos, marcando la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD95) (**Figura 6 A-F**) como presinápticos, como la proteína sinaptofisina (SYP) (**Figura 6 G-L**). De este modo, hemos determinado que en ningún caso existe colocalización entre PSD95 y CRB2 (**Figura 6 A-C**), descartando por tanto que CRB2 se encuentre en terminales postsinápticos; pero no solamente eso, sino que en muchos casos se observa que algunos perfiles positivos para PSD95 (puntas de flecha en **Figura 6 B-C**) están enfrentados a perfiles positivos para CRB2 (puntas de flecha amarillas en **Figura 6 A y C**, ampliación en **Figura 6 C**).

Por su parte, el doble marcaje para SYP y CRB2 demuestra una clara colocalización entre estas dos proteínas (**Figura 6 G-I**), confirmando que CRB2 se encuentra en terminales presinápticos (ampliaciones en **Figura 6 I**). Sin embargo, no todo el marcaje observado para CRB2 (puntas de flecha amarillas **Figura 6 I**), lo es también para SYP (puntas de flechas blancas **Figura 6 I**) y además, no se aprecia colocalización de estos marcadores con CRB2 en el marcaje puntuado que se encuentra en los somas neuronales, ni para PSD95 (puntas de flecha **Figura 6 D-E**) ni para SYP (puntas de flecha **Figura 6 J-L**).

Para poder determinar con exactitud la presencia de CRB2 en los terminales presinápticos, y que efectivamente, estos terminales que contienen CRB2 están enfrentados a terminales postsinápticos, como parece indicar el doble marcaje CRB2/PSD95 (**Figura 6 A-C**), se realizaron experimentos de triple inmunofluorescencia para CRB2, el marcador postsináptico (PSD95) y el marcador presináptico (Sinapsina Ia/b) (**Figura 7**). Mediante el análisis de secciones ortogonales obtenidas por pseudoconfocalidad, se comprobó que CRB2 y el marcador del terminal postsináptico PSD95 no colocalizan y que ambos perfiles están claramente enfrentados (**Figura 7 A**).

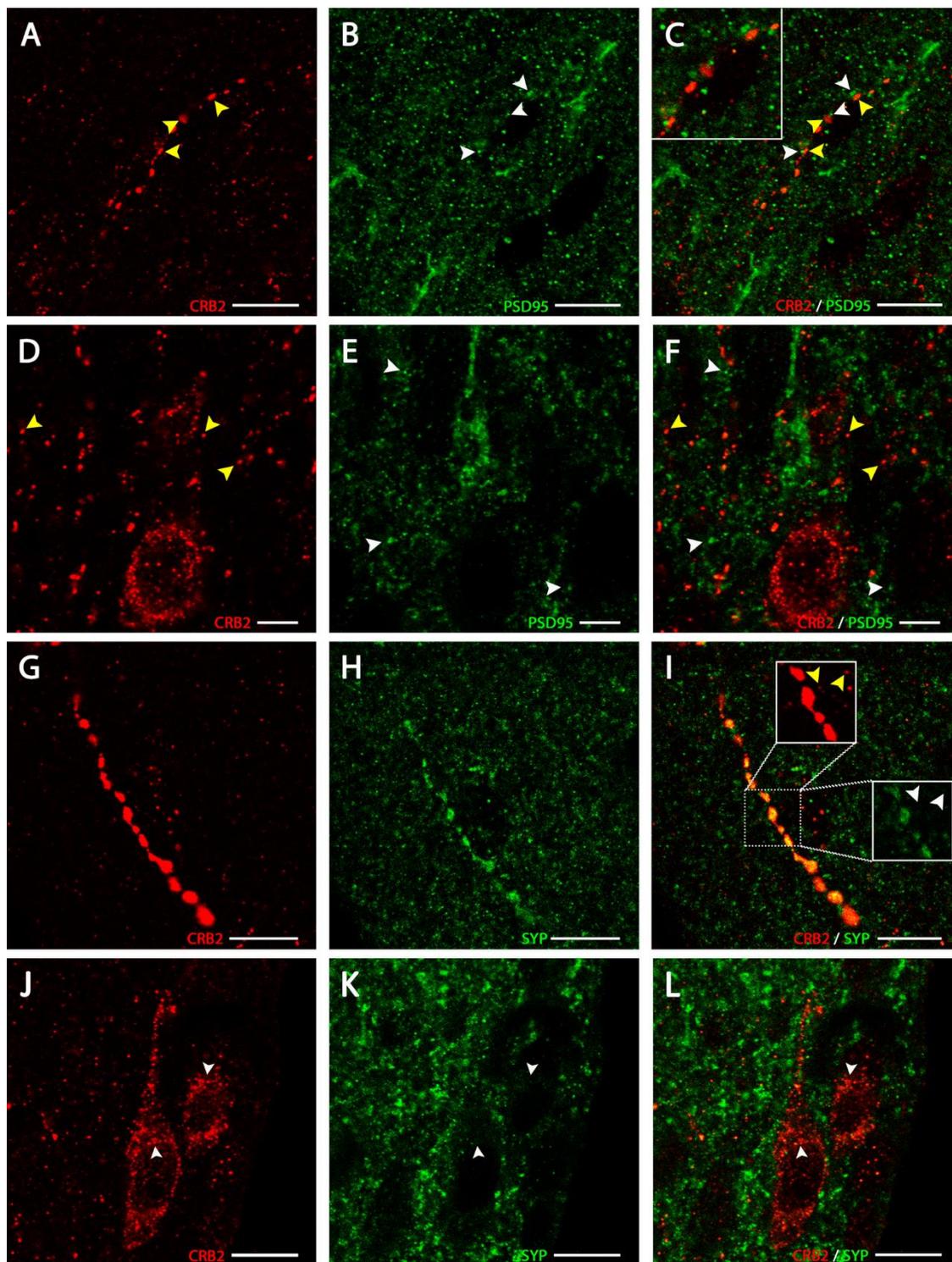


Figura 6. Análisis de la proteína CRB2 en elementos sinápticos. Imágenes de microscopía de laser confocal de CRB2 (A, C, D, F, G, I, J, L) y distintas proteínas sinápticas; tanto postsinápticas como PSD95 (B, C, E, F) como presinápticas como SYP (H, I, K, L) en secciones coronales del PVN. A-C: CRB2 (puntas de flecha amarillas) y PSD95 (puntas de flechas blancas), no colocalizan en los perfiles punteados para CRB2, pero sí que se puede observar que en muchos casos ambas proteínas se encuentran enfrentadas la una con la otra. G-I: Colocalización entre las proteínas CRB2 y SYP, aunque existen algunos perfiles positivos para SYP (puntas de flecha blancas) que son independientes de CRB2 (puntas de flecha amarillas) y al contrario. En los cuerpos celulares, no existe colocalización de CRB2 ni con PSD95 (D-F) ni con SYP (J-L). Barra de escala: 10 μm (A-C, G-I y J-L), 5 μm (D-F).

Al analizar el marcaje obtenido entre CRB2 y Sinapsina Ia/b, se apreció que hay una colocación parcial de estas dos proteínas en muchos de los perfiles (en color blanco en **Figura 7 B**). Al igual que ocurría con el doble marcaje CRB2/PSD95, el marcaje para Psd95 y Sinapsina Ia/b demuestra que estas dos proteínas no colocalizan y que además, los perfiles están enfrentados (**Figura 7 C**). Así, la triple inmunofluorescencia CRB2/PSD95/Sinapsina Ia/b demuestra que CRB2 se localiza de forma específica en el terminal presináptico (que se observa en blanco al colocalizar con Sinapsina Ia/b), y que está enfrentado a terminales postsinápticos positivos para PSD95 (**Figura 7 D**), confirmando las observaciones previas indicadas en la **Figura 6**.

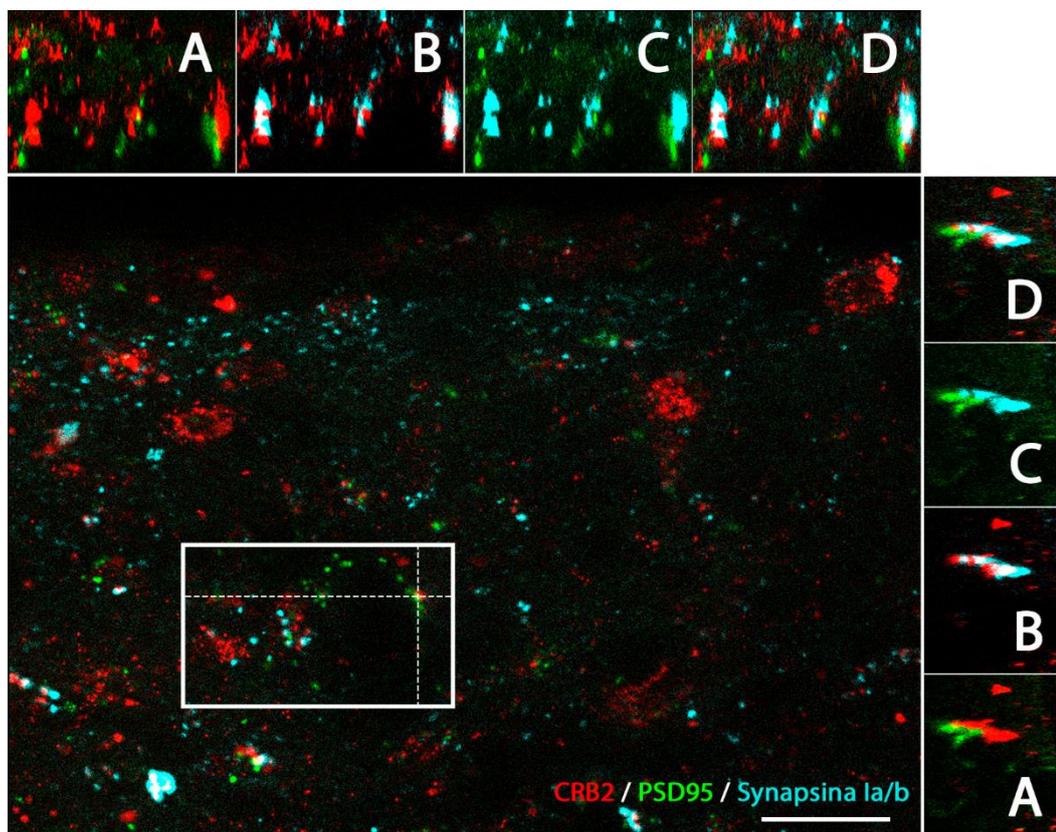


Figura 7. Estudio de la proteína CRB2 en los terminales sinápticos. Imagen en la que se muestra una proyección a lo largo del eje Z de pseudoconfocalidad para CRB2 (rojo), y terminales postsinápticos (PSD95 en verde) y presinápticos (Sinapsina Ia/b en azul) de secciones coronales del PVN de cerebro de ratón adulto. Las vistas ortogonales (eje XY imágenes en el lado superior y eje XZ imágenes en el lado derecho) muestran como no existe colocación entre CRB2 y PSD95 (terminal postsináptico), mientras que si existe con Sinapsina Ia/b (terminal presináptico), ambos enfrentados al marcaje de PSD95. Barra de escala: 20 μ m.

Por ello, podemos concluir que CRB2 está presente en los terminales presinápticos neuronales al colocalizar con marcadores presinápticos y al localizarse en contraposición a marcadores postsinápticos.

Con la finalidad de poder acotar y dilucidar a qué corresponde el marcaje vesicular de CRB2 observado en los somas neuronales, se realizaron dobles marcajes inmunohistoquímicos

para analizar la expresión de CRB2 junto con la de distintos marcadores vesiculares, como V-Glut1 (**Figura 8 A-C**), transportador de glutamato vesicular 1 que se expresa en vesículas sinápticas excitatorias. El doble marcaje permite discernir que existe una colocalización entre las dos proteínas en somas de neuronas del PVN (puntas de flecha blancas en **Figura 8 A-C**). También permite descartar la colocalización de estas dos proteínas en las proyecciones neuronales (puntas de flecha amarillas **Figura 8 A-C**).

La proteína CRB2 pertenece a un complejo de polaridad apical en el que participan otras proteínas, como por ejemplo Pals1. Es por ello que diseñamos una doble inmunotinción para analizar el marcaje punteado de CRB2 junto con Pals1, para además investigar si en el cerebro, CRB2 y Pals1 también forman parte del mismo complejo de polaridad (**Figura 8 D-F**). Observamos que existe una colocalización parcial entre ambas, tanto en los somas neuronales (puntas de flecha blancas **Figura 8 D-F**) como en sus proyecciones, aunque hay marcaje para Pals1 completamente independiente del de CRB2 (puntas de flecha amarillas **Figura 8 F**).

Por último, con el mismo fin de caracterizar el marcaje vesicular observado para CRB2 en los somas neuronales, quisimos comprobar la relación entre CRB2 y las distintas rutas de tráfico vesicular, ya que como todas las proteínas transmembranarias, ésta debe ser transportada en la célula mediante vesículas. Con esta finalidad se planteó el diseño de experimentos de doble marcaje para CRB2 y diversas proteínas que intervienen en el tráfico de vesículas tanto por endocitosis como por exocitosis. Estos experimentos demostraron que existe una colocalización parcial entre CRB2 y una proteína presente en vesículas de la vía exocítica, Rab8A (puntas de flecha blancas en **Figura 8 G-I**), sugiriendo que CRB2 y Rab8A en algunos casos se transportan en las mismas vesículas de exocitosis, aunque no siempre, ya que se observan puntos de marcaje independiente para ambas proteínas (puntas de flecha amarillas en **Figura 8 I**). Para analizar los procesos de endocitosis se analizó la distribución de la proteína VPS35, que forma parte del retrómero. Este complejo proteico es el encargado de dirigir el tráfico retrógrado de endosomas de la membrana plasmática hacia el complejo de Golgi para el reciclaje de proteínas. Los análisis muestran colocalización parcial entre CRB2 y VPS35 tanto en el soma como en proyecciones neuronales (puntas de flecha blancas en **Figura 8 K-L**), aunque se puede observar marcaje independiente para VPS35 y CRB2 (puntas de flecha amarillas en **Figura 8 L**). Por ello, se puede afirmar que CRB2 está presente en algunas vesículas que viajan desde membrana plasmática, vía endocítica, en asociación con el retrómero.

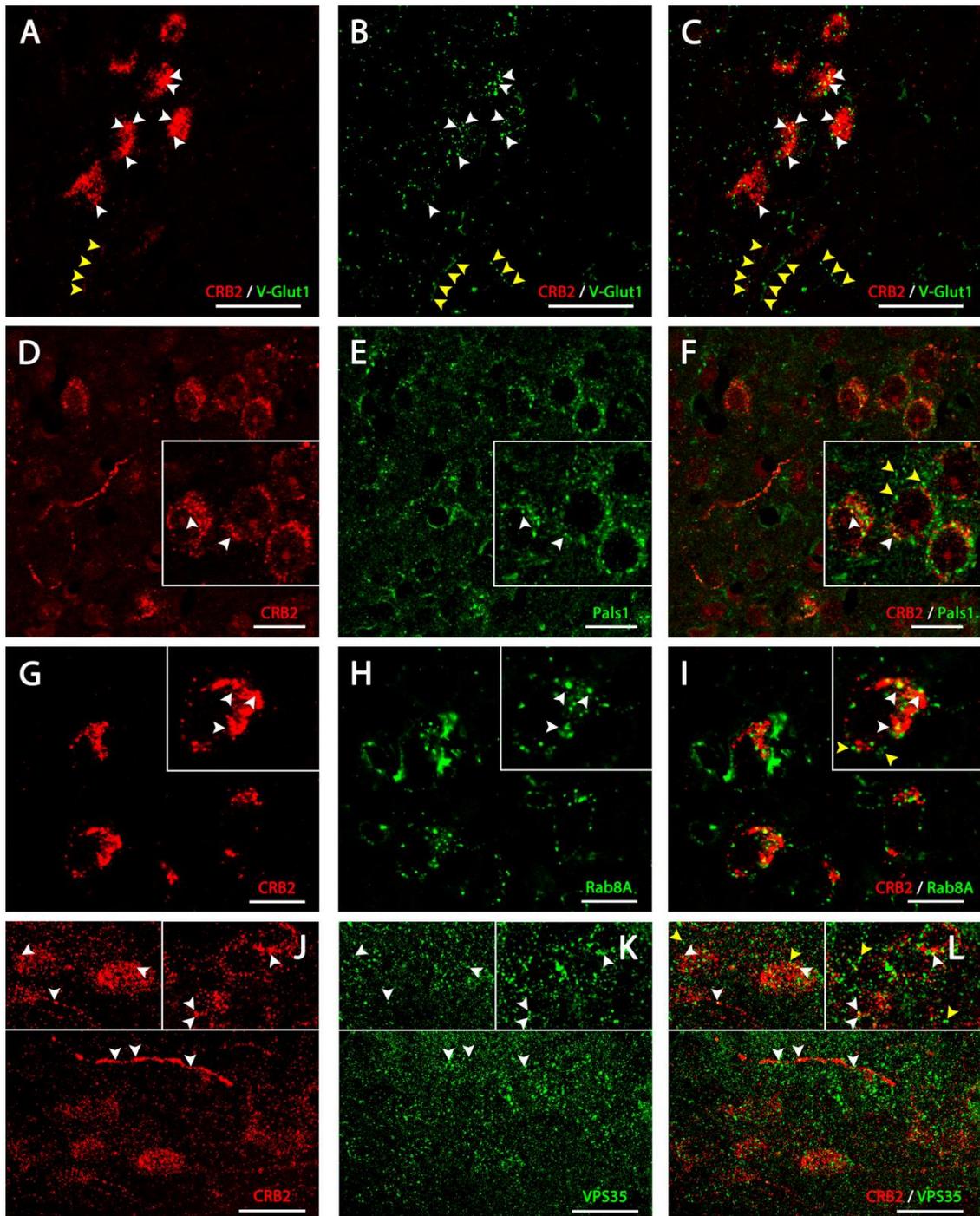


Figura 8. Estudio del marcaje vesicular de CRB2 en los somas neuronales. Imágenes de microscopía de láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia de la proteína CRB2 (A, C, D, F, G, I, J, L) y V-Glut1 (B, C), Pals1 (E, F), Rab8A (H, I) y VPS35 (K, L) en secciones coronales del PVN. A-C: el marcaje punteado de CRB2 de los somas neuronales colocaliza parcialmente con el transportador de glutamato vesicular 1 (puntas de flecha blancas). D-F: CRB2 y Pals1 frecuentemente colocalizan (puntas de flecha blancas en D-F) tanto en el soma como en los procesos neuronales, aunque hay marcaje tanto para Pals1 como para CRB2 independiente el uno del otro (puntas de flecha amarillas en F). G-I: CRB2 colocaliza parcialmente con Rab8A (puntas de flecha blancas en G-I), existiendo marcaje de Rab8A completamente independiente de CRB2 (puntas de flecha amarillas en I). J-L: Existe colocalización parcial entre CRB2 y VPS35 (puntas de flecha blancas en J-L), aunque hay marcaje de VPS35 independiente de CRB2 (puntas de flecha amarillas en L). Barra de escala: 10 μ m (A-C), 100 μ m (D-F), 10 μ m (G-I), 20 μ m (J-L).

Por lo tanto, como conclusión del primer objetivo planteado podemos decir que la proteína CRB2 presenta una distribución generalizada por todo el cerebro, existiendo zonas como la corteza, hipocampo, cerebelo o núcleo mesencefálico del trigémino donde la presencia es más evidente y abundante. Es en el hipotálamo donde se observa una distribución de CRB2 mucho más particular, apareciendo un marcaje punteado en cuerpos celulares de núcleos concretos, así como un patrón punteado de marcaje en hileras, que se extiende de unos núcleos a otros. CRB2 está presente única y exclusivamente en neuronas donde colocaliza con vesículas presinápticas y excitatorias. Además, comprobamos que en cerebro de ratón, CRB2 colocaliza parcialmente con Pals1, otro miembro del complejo de polaridad Crb, además de con proteínas encargadas del transporte vesicular tanto endocítico como exocítico demostrando así alguno de los componentes moleculares de ambas rutas con los que CRB2 viaja en su transporte hacia y desde la membrana plasmática, su localización final en la célula.

3._ Análisis comparativo de la expresión de CRB2 en ratón control y mutante para CRB1

Debido a las similitudes estructurales y funcionales de las proteínas CRB1 y CRB2, hemos querido comprobar si la disfuncionalidad de la proteína CRB1 en el ratón mutante CRB1^{rd8} pudiera producir alteraciones en la expresión de CRB2. Así, se ha realizado un estudio comparativo de la distribución de la proteína CRB2 entre el animal control y el ratón mutante CRB1^{rd8}, mediante técnicas de fluorescencia (**Figura 9**). Para ello, se ha analizado con más detalle la expresión de CRB2 en las principales zonas donde encontramos un marcaje más abundante de esta proteína, como son el hipocampo, cerebelo, hipotálamo o el núcleo supraóptico retroquiasmático (SOR). De este modo, se comprobó que en el hipocampo, el marcaje para CRB2 está presente en las capas CA1, CA3 o el giro dentado (DG), y es en la capa CA3 donde mayoritariamente está presente CRB2 (**Figura 9 A**). Al comparar la cantidad de marcaje entre el animal control y el mutante en estas tres áreas no se observaron diferencias entre los fenotipos (**Figura 9 A-B**). En cerebelo, CRB2 se encuentra principalmente en la capa de las células de Purkinje (**Figura 9 C**) y comparando la presencia de CRB2 entre el ratón control y el mutante, se comprobó que no había diferencias entre los dos fenotipos (**Figura 9 D**). En el hipotálamo, asimismo, la distribución e intensidad para el marcaje de CRB2 en el animal control (**Figura 9 E**) y el animal mutante resultó ser la misma (**Figura 9 F**); resultados que se repiten al comparar el marcaje de la proteína en el núcleo supraóptico retroquiasmático entre ambos genotipos (**Figura 9 G**).

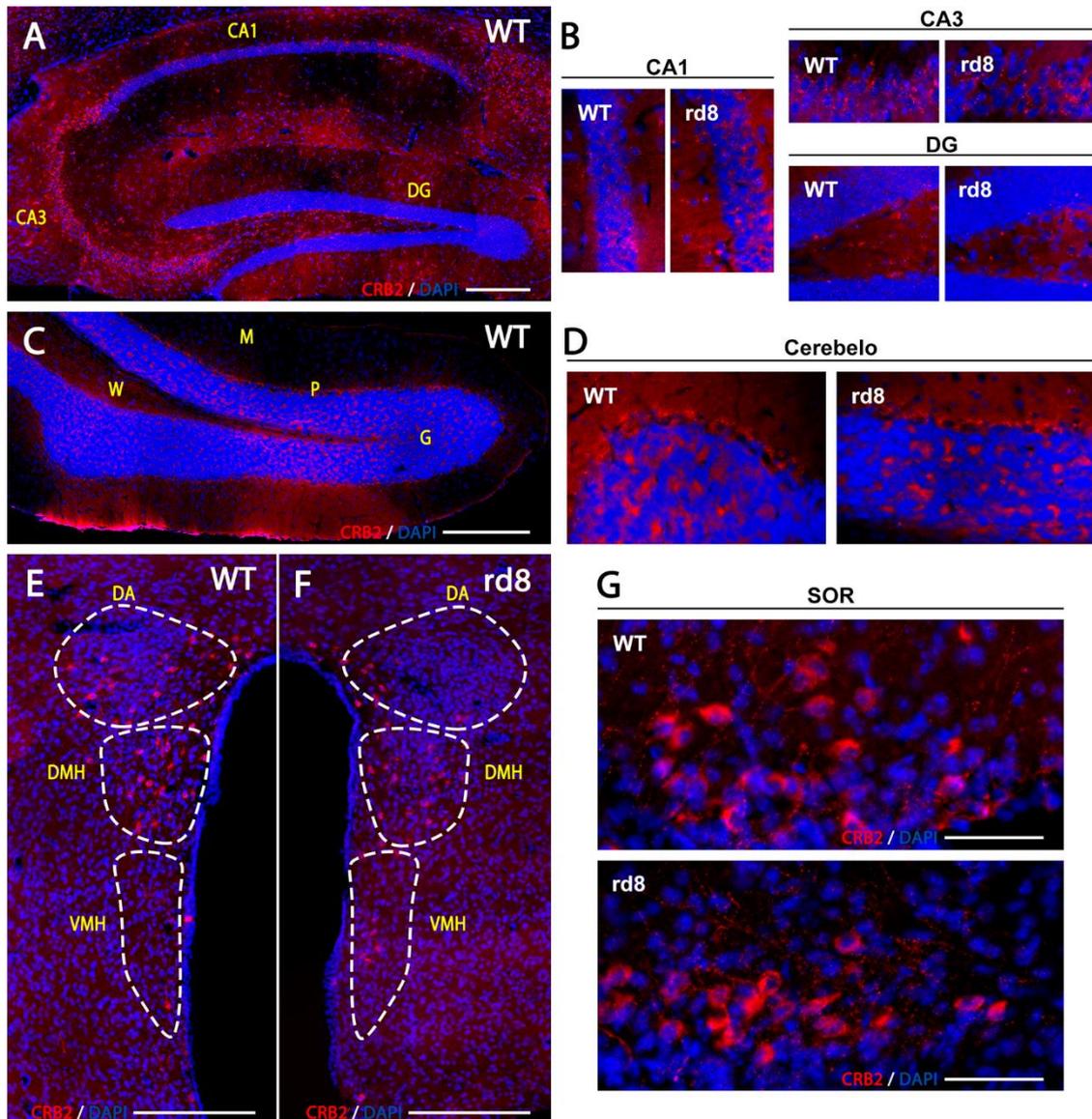


Figura 9. Estudio comparativo del marcaje para CRB2 entre cerebro de ratón adulto control y mutante $CRB1^{rd8}$. **A:** Imágenes de epifluorescencia en la que se muestra la distribución del marcaje para CRB2 en las distintas capas del hipocampo del cerebro adulto del ratón control: CA1, CA3 y DG. **B:** Imagen que muestra la comparativa del marcaje para CRB2 en las distintas áreas del hipocampo entre el animal control (WT) y el mutante ($CRB1^{rd8}$). **C:** Distribución del marcaje para CRB2 en el cerebelo del ratón adulto control. **D:** Imagen que muestra la comparativa del marcaje para CRB2 en las distintas áreas del cerebelo entre el animal control (WT) y el mutante ($CRB1^{rd8}$). **E-F:** Distribución y comparativa del marcaje obtenido para CRB2 en los diferentes núcleos del hipotálamo del cerebro el ratón control (E) y mutante (F). **G:** Marcaje comparativo para la proteína CRB2 en el núcleo SOR entre WT y ($CRB1^{rd8}$). DG (giro dentado), M (capa molecular), P (capa de células de Purkinje), G (capa granular), W (sustancia blanca), DA (área dorsal), DMH (Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo), VMH (Núcleo Ventromedial del Hipotálamo), SOR (Núcleo Supraóptico Retroquiasmático) DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 200 μ m (A-F), 50 μ m (G).

Continuando con este análisis comparativo de las distintas áreas encefálicas, analizamos la expresión de CRB2 en la corteza cerebral en animales control y mutantes para CRB1 (**Figura 10**). En un primer análisis del marcaje inmunofluorescencia se detectó que CRB2 no presenta una distribución generalizada como el observado en otras áreas encefálicas (**Figura 3 A-B**), sino que se localiza en varias capas corticales, como la capa II/III y V, tanto del ratón control como mutante, el marcaje para CRB2 es mucho más evidente y abundante (**Figura 10**).

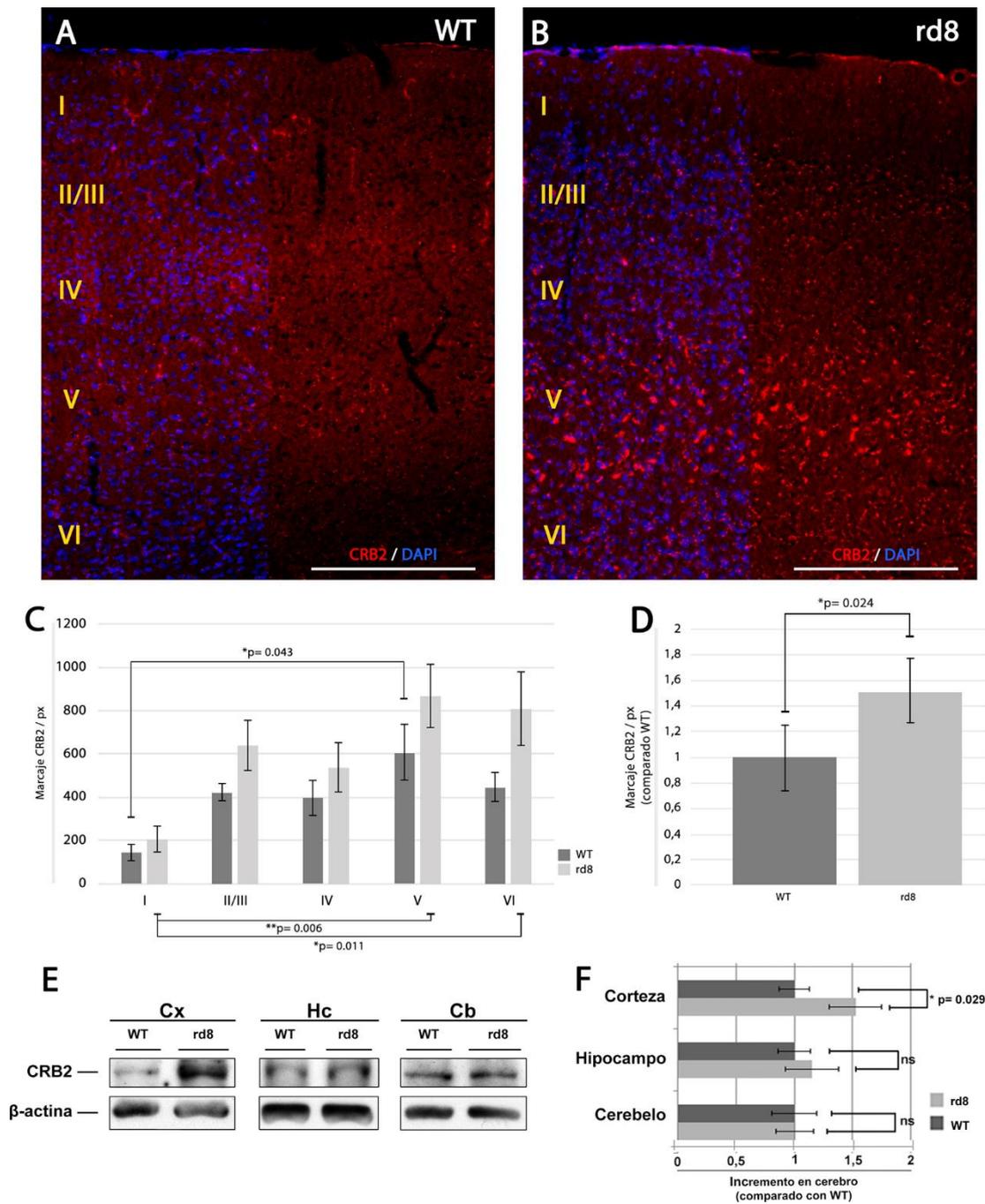


Figura 10. Distribución de la proteína CRB2 en la corteza de ratón adulto. Imágenes de epifluorescencia del marcaje para CRB2 en secciones sagitales de corteza de ratón adulto control (A) y mutante $CRB1^{rd8}$ (B). C: Gráfica de la cuantificación del marcaje para CRB2/píxel en las diferentes capas corticales de ambos genotipos. D: Cuantificación final del marcaje total para CRB2 por píxel, para ambos ratones sin distinguir entre las distintas capas. E-F: Análisis de la expresión de CRB2 por Western blot. E: Comparativa de la expresión de la proteína CRB2 (150 kDa) en corteza (Cx), hipocampo (Hc) y cerebelo (Cb) de ambos genotipos. F: Cuantificación y comparativa de los datos normalizados a partir de los resultados obtenidos por Western blot, de la expresión de CRB2 en distintas áreas de ambos genotipos. Se usó β -actina (42 kDa) como control de carga. DAPI (en azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 200 μ m. Los datos de las cuantificaciones se muestran como \pm s.e.m. Información estadística: Se usó el test de Kolmogorov-Smirnov para el análisis de la distribución normal. En C-WT, como estadígrafo de contraste paramétrico se usó el test ANOVA de una vía con el test Bonferroni como test post-hoc ($n = 3$). En C-rd8, como test no paramétrico se ha utilizado el test Kruskal Wallis ($n = 3$). En D, la comparativa entre grupos se ha realizado con el test paramétrico T-Student ($n = 3$). En F, en todos los casos se ha utilizado como estadígrafo de contraste el test no paramétrico U de Mann Whitney ($n = 3$). Un asterisco indica la presencia de diferencias estadísticas. Dos asteriscos indican la presencia de diferencias altamente significativas.

Un análisis cualitativo de este marcaje sugirió que en este área sí podrían existir diferencias en cuanto a la cantidad de marcaje para CRB2 en la corteza del animal control (**Figura 10 A**) y mutante (**Figura 10 B**). Para analizar las posibles diferencias se empleó el software informático ImageJ para cuantificar y analizar la cantidad de señal fluorescente.

Este análisis estadístico ha permitido determinar la cantidad de marcaje para CRB2 en las distintas capas de las cortezas encefálicas de ambos genotipos (**Figura 10 C**). Así, se evidenció que en general, el marcaje para CRB2 está predominantemente localizado en las capas II/III y V (confirmando la observación cualitativa inicial) y que en la corteza del ratón mutante hay una mayor cantidad de marcaje en estas zonas. Al analizar las diferencias entre capas, se observa que existen diferencias significativas entre la capa I y la capa V del ratón control (p-valor = 0,043; n = 3) (**Figura 10 C**), mientras que en el ratón mutante se observan diferencias altamente significativas entre las capas I y V (p-valor = 0,005; n = 3) y diferencias significativas entre las capas I y VI (p-valor = 0,011; n = 3) (**Figura 10 C**). En ningún caso, se han encontrado diferencias significativas al analizar la intensidad de CRB2 en las mismas capas entre genotipos distintos. Sin embargo, al analizar la cantidad de marcaje total para CRB2 en corteza entre ambos genotipos, sin discernir entre capas, observamos que sí existe un incremento significativo en la cantidad de marcaje para CRB2 en los animales mutantes en comparación con los controles (p-valor = 0,024; n = 3) (**Figura 10 D**). Debido a que la técnica de inmunofluorescencia y las cuantificaciones realizadas posteriormente pueden considerarse técnicas de tipo cualitativas, más que cuantitativas, quisimos comprobar estos resultados mediante el empleo de técnicas cuantitativas como Western blot, ampliando asimismo el número de muestras. De este modo, se analizaron mediante esta técnica la expresión de CRB2 en lisados de corteza, el área donde encontramos mayor cantidad de marcaje en el ratón mutante mediante fluorescencia y en hipocampo y cerebelo, donde no se apreció esta diferencia (**Figura 10 E**). La cuantificación de estos resultados pone de manifiesto que efectivamente, en la corteza del genotipo mutante hay una mayor cantidad de CRB2 que en control y esa diferencia es significativa (p-valor = 0,029; n = 15), algo que no ocurre en hipocampo o cerebelo (**Figura 10 F**).

Al observar diferencias significativas (al menos en corteza) con respecto a los niveles de CRB2 entre ambos animales, nos propusimos analizar la expresión del resto de proteínas que forman parte del complejo de polaridad Crb, así como proteínas encargadas del establecimiento de uniones celulares (**Figura 11**) para investigar si, además de un aumento en la expresión de CRB2, existen cambios o alteraciones en la expresión de moléculas

relacionadas. Para ello, hemos analizado la expresión por Western blot de Par3 como componente del complejo Par, distintas proteínas de adhesión celular como β -catenina (uniones adherentes) y ocludina (uniones ocluyentes) en zonas como corteza, hipocampo y cerebelo de ratón tanto control como mutante (**Figura 11 A**). Este análisis cuantitativo pone de manifiesto que no hay diferencias en cuanto a la expresión de ninguna de las proteínas analizadas entre los dos genotipos (**Figura 11 B**). Aunque sí se detecta un incremento en la tendencia de la expresión de β -catenina tanto en corteza como en cerebelo del genotipo mutante, la diferencia con el control no es significativa (**Figura 11 B**), por lo que podemos concluir que el genotipo mutante no presenta alteraciones en la expresión de proteínas de uniones celulares analizadas, o del complejo Par (Par3) con el control.

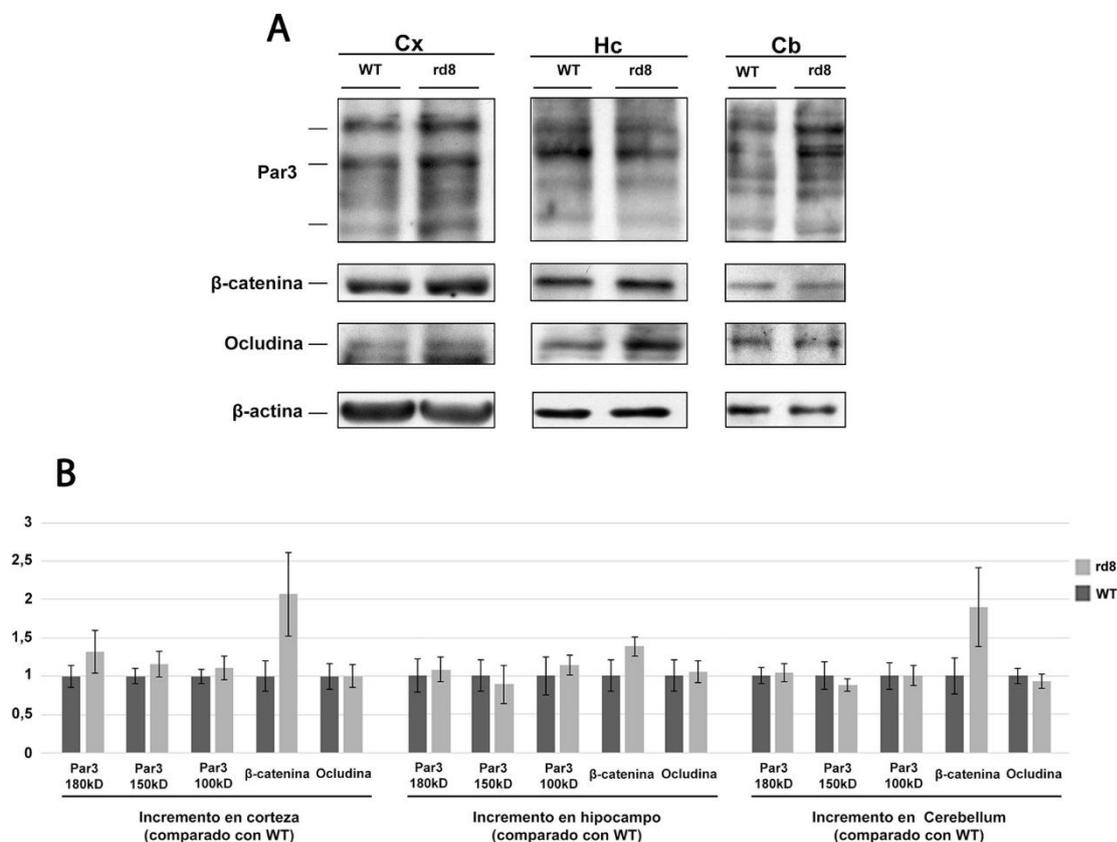


Figura 11. Análisis comparativo de la expresión de CRB2, Par3 y proteínas de unión celular en corteza, hipocampo y cerebelo de ratones control y mutante CRB1^{rd8}. **A:** Análisis comparativo por WB en el que se muestra la expresión de CRB2 (150 kDa), Par3 (isoformas de 180 kDa, de 150 kDa y de 100 kDa) y moléculas de adhesión celular (Ocludina de 65 kDa, y β -catenina de 92 kDa) tanto en Cx, Hc y Cb de ratones control y mutantes. **B:** Gráfica en la que se muestra la cuantificación comparativa de las proteínas analizadas en A. Se usó β -actina (42 kDa) como control de carga. Los datos se representan con la media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos de B, la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado por medio del test U de Mann Whitney ($n = 15$).

Por tanto, respecto al segundo objetivo podemos concluir que: CRB2 está presente en las capas CA1, CA3 y en el giro dentado del hipocampo; en la capa de las células de Purkinje en cerebelo; en el núcleo supraóptico retroquiasmático; en el núcleo mesencefálico del trigémino

y en el hipotálamo donde se concentra en el área dorsal, núcleo dorsomedial y ventromedial. En corteza encefálica, CRB2 presenta una distribución más abundante en las capas II/III y V y el análisis comparativo de la expresión de esta proteína entre el cerebro de ratón mutante y el control demuestra que, al menos en corteza, existe un incremento en sus niveles de expresión en el ratón mutante CRB1^{rd8}.

El modelo mutante CRB1^{rd8} se emplea para el estudio de patologías retinianas debido a que presenta alteraciones en la retina por los problemas derivados de la mutación de la proteína CRB1. Del mismo modo, se ha descrito que la retina de este modelo animal, como uno de los mecanismos de respuesta al daño, presenta un aumento en la expresión de la proteína glial GFAP en las células de Müller, la glía radial de la retina. Con el fin de determinar si en el cerebro de ratón mutante CRB1^{rd8} existe un mecanismo de gliosis similar como consecuencia de la mutación en *Crb1*, hemos realizado un estudio de la expresión por inmunofluorescencia de la proteína GFAP en distintas áreas del cerebro como corteza, hipocampo o cerebelo (**Figura**

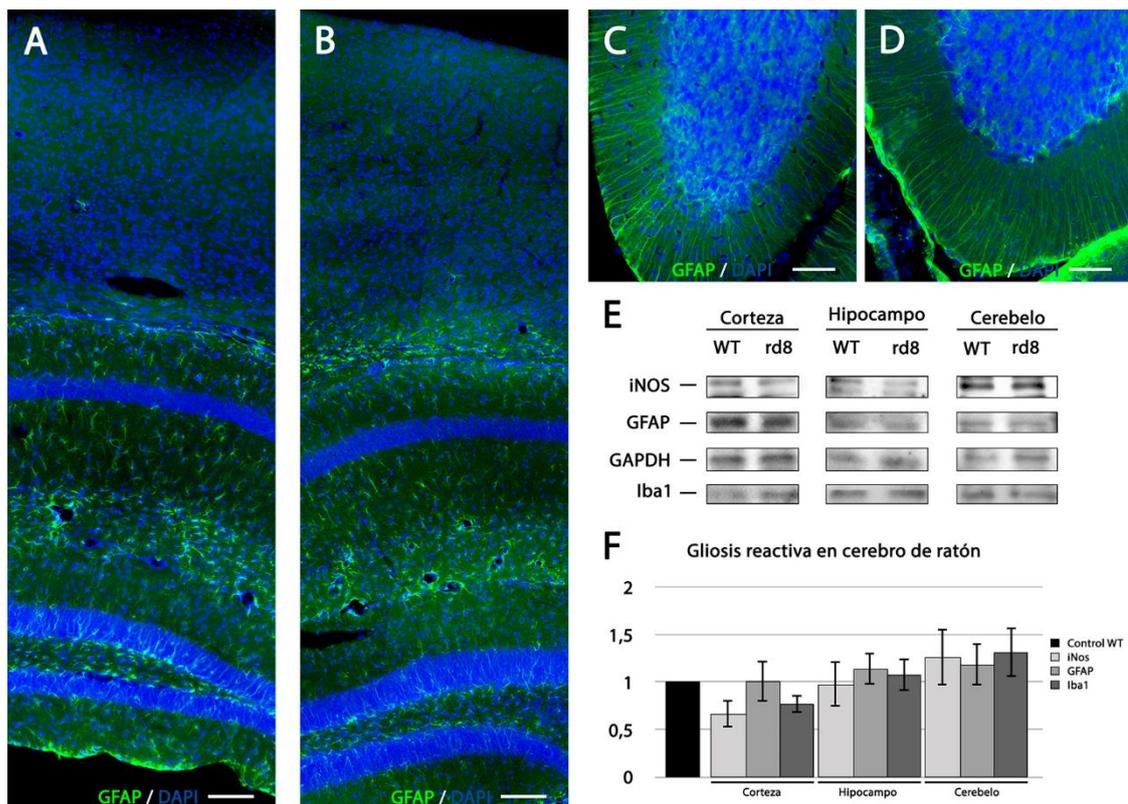


Figura 12. Estudio comparativo de la gliosis reactiva en cerebro adulto entre animales WT y CRB1^{rd8}. Imágenes de epifluorescencia de la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) en zonas de corteza e hipocampo (A) y cerebelo (C) del ratón control, y de corteza e hipocampo (B) y cerebelo (D) del ratón mutante CRB1^{rd8}. E: Cuantificación de los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la neuroinflamación como GFAP, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o Iba1. Se usó GAPDH (37 kDa) como control de carga. DAPI (azul): marcaje nuclear. Barra de escala: 100 μ m (A-B), 50 μ m (C-D). Los datos se representan como media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado por medio del test T de Student ($n = 3$).

12). Al analizar la expresión de GFAP en ambos genotipos, no hemos observado un incremento en su expresión (**Figura 12 A-D**), resultado que se confirma con el análisis de la expresión de GFAP en ambos modelos mediante Western blot (**Figura 12 E-F**). Con el fin de realizar un estudio más detallado de una posible reacción inflamatoria en el genotipo mutante como respuesta a la mutación de CRB1, se ha comparado la expresión de otras proteínas relacionadas con la gliosis reactiva en zonas de corteza, hipocampo y cerebelo, como las proteínas Iba1 e iNOS (estrechamente relacionadas con una respuesta microglial e inflamatoria) y en ningún caso hemos obtenido diferencias significativas entre ambos genotipos (**Figura 12 E-F**).

De este modo podemos concluir que el modelo murino CRB1^{rd8} presenta un aumento en los niveles de la proteína CRB2 en corteza, aunque no presenta ninguna alteración en la expresión de proteínas relacionadas con los complejos de polaridad o uniones celulares, ni en los niveles de proteínas relacionadas procesos inflamatorios en comparación con el animal control. Por tanto, este modelo no presenta alteraciones o daños neuronales evidentes más allá de los aumentos en la expresión de CRB2 en la corteza cerebral.

Por tanto, estos resultados muestran la presencia de la proteína CRB2 en cerebro adulto de ratón, donde se localiza única y exclusivamente en neuronas, principalmente en terminales y vesículas presinápticas excitatorias. Además, colocaliza con otras proteínas del complejo Crb y con proteínas del transporte vesicular endocítico y exocítico. En el ratón mutante CRB1^{rd8}, hemos detectado un incremento de los niveles de CRB2 en corteza cerebral, sin observar alteraciones en la expresión de la proteína en el resto de áreas analizadas o en la expresión de proteínas relacionadas con los complejos de polaridad o uniones celulares. Todos estos resultados han sido recogidos en un artículo científico publicado recientemente con el título "Expression and localization of the polarity protein CRB2 in adult mouse brain: a comparison with the CRB1^{rd8} mutant mouse model" en Scientific Reports (Dolon et al., 2018).

4._ Caracterización de CRB2 en un modelo *in vitro*

Una vez analizada la expresión de la proteína CRB2 y su localización en el cerebro de ratón, procedemos a abordar el siguiente objetivo, caracterizar la expresión y localización de CRB2 durante el proceso de diferenciación y maduración de neuronas *in vitro*. Para ello, desarrollamos un método de cultivo primario de neuronas a partir de corteza cerebral e hipocampo, dos de las áreas cerebrales que presentan niveles elevados de CRB2 y que son

perfectamente diferenciables y de fácil extracción, en los que investigamos la expresión de CRB2 de forma gradual durante el crecimiento y diferenciación de las neuronas.

4.1._ Caracterización de del proceso de diferenciación de los cultivos primarios

Para caracterizar el crecimiento de los cultivos primarios de neuronas (**Figura 13**) hemos extraído porciones de corteza e hipocampo de embriones de estadios embrionarios comprendidos entre E.16 y E.18 y se ha analizado el desarrollo temporal de ambos cultivos mediante imágenes realizadas cada diez minutos, durante un periodo máximo de 5 días de cultivo (5DIC) en un microscopio de célula viva. De esta forma se comprobó que en ambos tipos de cultivo, tanto corticales (**Figura 13 A**) como hipocampales (**Figura 13 B**), es entre las primeras 12 y 24 horas cuando las neuronas comienzan a formar los primeros procesos o extensiones celulares, entrando en contacto unas con otras. Es a partir del tercer día del cultivo (3DIC), cuando la mayoría de las neuronas empiezan a mostrar signos de diferenciación y establecen contactos estables entre ellas. Es de destacar la capacidad de migración que presentan las neuronas, principalmente aquellas obtenidas de hipocampo y la necesidad que muestran de crecimiento en conjunto, produciendo acúmulos de neuronas hipocampales necesarios para su supervivencia y diferenciación (**Figura 13 B**). Esta característica del crecimiento de los cultivos hipocampales no se ha observado en el caso de los cultivos de neuronas corticales, las

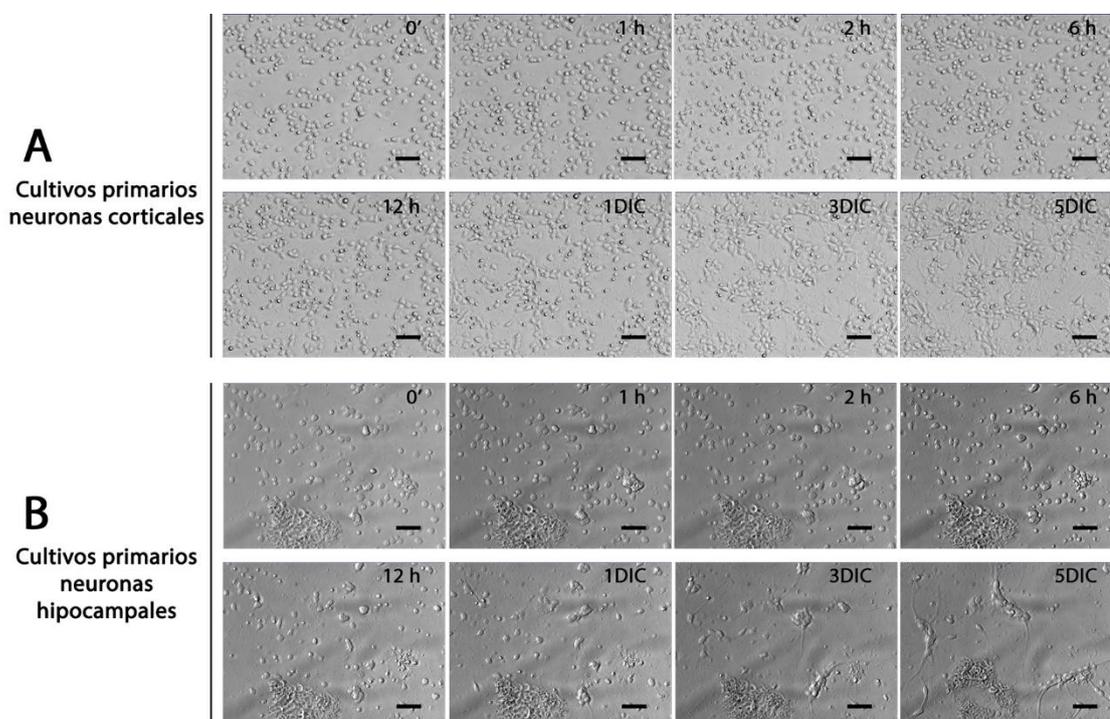


Figura 13. Análisis temporal del cultivo primario de neuronas de ratón control. Reconstrucción temporal de los cultivos primarios de neuronas aisladas de la corteza (A) e hipocampo (B) de embriones en estado de desarrollo comprendido entre E.16 y E.18 (días de gestación), obtenidas en un microscopio de célula viva. Barra de escala: 50 μ m.

cuales se distribuyen por toda la placa, ocupando la mayor superficie posible y establecen contacto unas con otras (**Figura 13 A**).

4.2._ CRB2 se expresa en los cultivos neuronales

Los estudios *in vivo* realizados en la presente Tesis Doctoral y presentados en los apartados anteriores demuestran que en cerebro de ratón adulto, la proteína CRB2 solo se expresa en neuronas. Para analizar el patrón de expresión temporal de CRB2 y su comportamiento durante el desarrollo de las neuronas se emplearon cultivos obtenidos mediante el protocolo indicado en la sección de material y métodos. Uno de los tipos celulares más abundante en las meninges son los astrocitos, de modo que retirar estas membranas es un paso limitante para la viabilidad del cultivo puro de neuronas. Además, el estadio embrionario del cual se extrae el tejido debe ser lo más exacto posible, ya que si se emplea tejido de estadios anteriores a los indicados, conlleva a una disminución considerable del número de células a obtener. Si se emplean estadios posteriores, esto conlleva a un aumento sobremanera del número de neuronas, especialmente en el caso de los cultivos de hipocampo donde el rendimiento siempre es más bajo, pero en estadios tardíos se produce un aumento de la cantidad y la internalización de las meninges en el tejido extraído, haciendo que en muchos casos sea casi imposible su manipulación y eliminación, y por lo tanto, un incremento en el número de células contaminantes, como astrocitos. Es necesario por tanto mantener un equilibrio entre el mayor rendimiento celular a obtener en cultivos de neuronas hipocampales y la menor cantidad posible de astrocitos y desarrollo de meninges que se consigue al emplear los estadios embrionarios descritos en este trabajo.

Con el fin de validar estos cultivos se efectuaron pruebas en las que se analizó la expresión de CRB2 junto con la de otros marcadores neuronales y de astrocitos en cultivos corticales (debido al mayor número de células que obtenemos por experimentos en comparación con los de hipocampo) (**Figura 14**). La proteína Doblecortina o DCX está asociada a los microtúbulos de neuronas inmaduras y se sabe que su expresión se conserva durante todo el proceso de maduración, tras el cual disminuye coincidiendo con el aumento de expresión del marcador de neuronas maduras NeuN (del inglés Núcleo Neuronal), cuya expresión se corresponde con la salida del ciclo celular y el inicio de la diferenciación neuronal. Con este análisis hemos comprobado que la expresión de DCX (**Figura 14 A**) comienza a las 24 h de establecer el cultivo, momento en el que se pueden apreciar proyecciones neuronales en elongación y precursores neurales (**Figura 14 A**). El marcaje para CRB2 también aparece a partir del 1DIC, de forma preferente en el soma de las células, siendo a partir de 3DIC cuando se

distribuye por toda la neurona (**Figura 14 A-E**). Como se ha indicado anteriormente, en el procedimiento de establecer los cultivos se retiran las meninges con el fin de disminuir la cantidad de astrocitos en los cultivos, pero en ningún momento se inhibe el crecimiento de los que están en el propio tejido. Para poder establecer cultivos puros neuronales y al mismo tiempo investigar si en estos cultivos, de la misma forma que en tejido, CRB2 se expresa exclusivamente en neuronas, se añade citosina β -D-arabinofuranósido (ARA) al cultivo. El ARA es un inhibidor del proceso de replicación, ya que se une al ADN y actúa sobre la topoisomerasa I formando fragmentos de ADN, de modo que cualquier célula que se divida será eliminada al no poder completar la división. El análisis por inmunofluorescencia para GFAP y CRB2 tras la adición de ARA a las 24 horas de establecer el cultivo demuestra la presencia de células

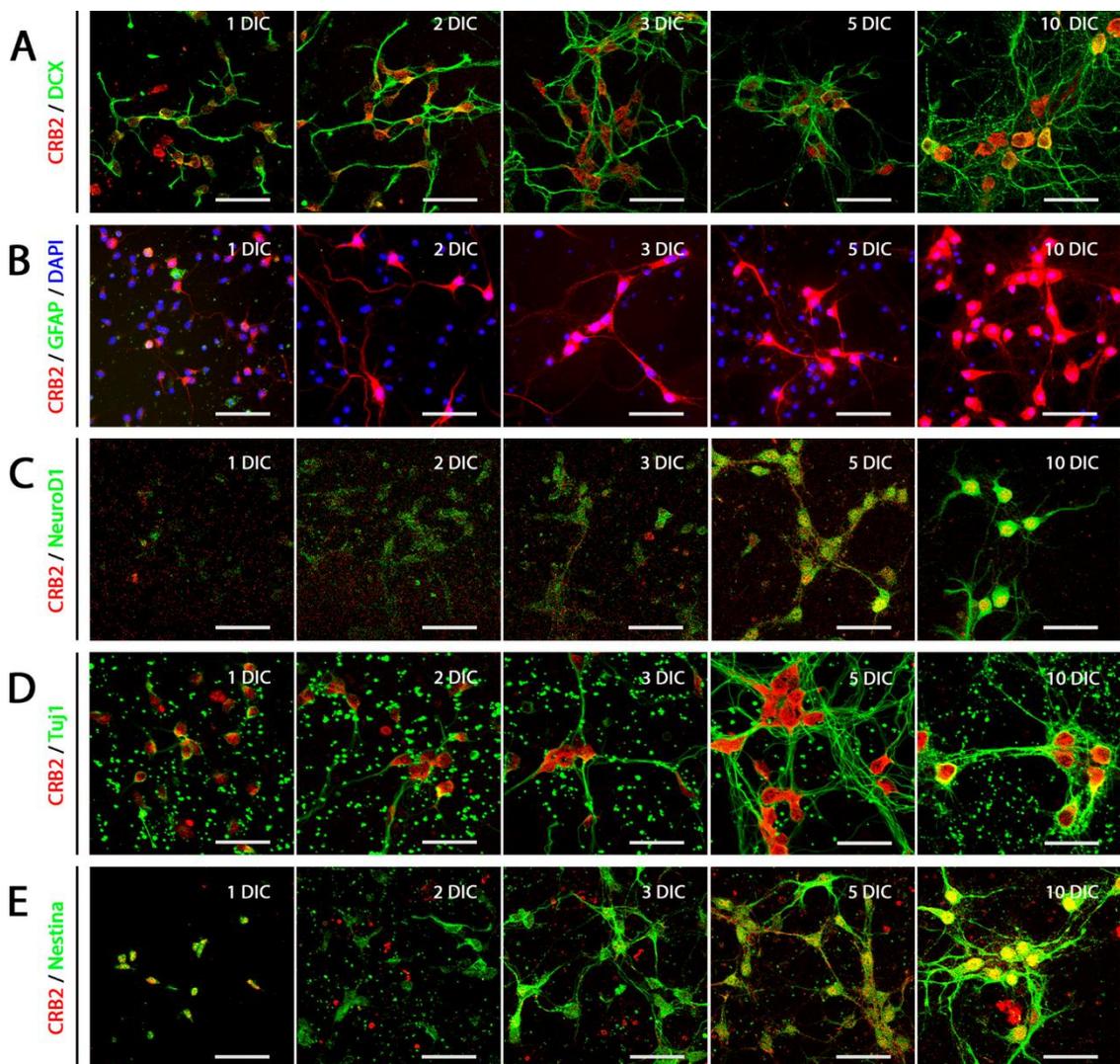


Figura 14. Análisis de la expresión temporal de CRB2 y distintos marcadores celulares en cultivos de neuronas corticales de ratón control. Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia para CRB2 y distintas proteínas de expresión neuronal (como DCX A, NeuroD1 C, Tuj1 D o Nestina E) y de epifluorescencia para CRB2 y astrocitos (como GFAP B) a distintos tiempos de cultivos. Barra de escala: 50 μ m.

positivas para GFAP a 1DIC (**Figura 14 B**). A días posteriores de cultivo, este marcaje para GFAP desaparece, pero no así el marcaje para CRB2 (**Figura 14 B**). De este modo, al desaparecer el marcaje para GFAP pero no para CRB2, confirmamos que conseguimos un cultivo puro de neuronas (que no se dividen y no se eliminan al añadir ARA) en las cuales se expresa CRB2. Es importante indicar que no se ha añadido ARA en todos los experimentos porque la viabilidad de los mismos disminuye considerablemente al eliminar el componente glial (Rita, Emily, & Rempe, 2012), de modo que se han mantenido astrocitos residuales en algunos cultivos para aumentar la supervivencia neuronal (**Figura 14 B**). El factor de diferenciación neuronal de tipo 1 (NeuroD1) es un factor de transcripción necesario para la maduración neuronal e interviene por ejemplo en el establecimiento de las dendritas. Empleando este marcador comprobamos que la expresión de NeuroD1 empieza a ser evidente en los somas y en algunas proyecciones neuronales entre 3 y 5DIC (**Figura 14 C**). El marcaje para la proteína Tubulina β III (Tuj1) permite identificar el principal componente del citoesqueleto de neuronas (**Figura 14 D**) y pone de manifiesto que es el principal componente de los cultivos primarios realizados en este estudio. Además, este marcaje permite discernir que el citoesqueleto neuronal se desarrolla a partir de las 24h de la siembra, siendo a 3DIC cuando se identifica por completo la morfología neuronal con soma y prolongaciones (**Figura 14 D**). Los resultados obtenidos con el marcaje para Tuj1 también sustentan la hipótesis de que CRB2 se encuentra en neuronas. Por último, los filamentos intermedios de tipo IV (Nestina), abundante en estadios iniciales del desarrollo neural, se localiza en el soma ya a las 24 horas de establecimiento del cultivo, y es a 2 y 3DIC cuando se extiende por toda la estructura de la neurona, colocalizando en las mismas estructuras con el marcaje para CRB2 (**Figura 14 E**).

Estos experimentos iniciales de caracterización de los cultivos primarios neuronales corticales de animales control permiten comprobar que CRB2 (coincidiendo con los resultados *in vivo*) se expresa únicamente en neuronas, al colocalizar en estructuras identificadas como tal por el empleo de distintos marcadores neuronales (como DCX, NeuroD1, Tuj1 o Nestina) y al no disminuir su expresión al añadir un inhibidor de proliferación celular que permite eliminar células en división y que provoca una disminución de GFAP que se expresa en células gliales.

Al mismo tiempo, para comprobar la expresión de todos los marcadores empleados en los experimentos de inmunofluorescencia en los cultivos neuronales, se realizaron análisis de Western blot de la expresión de DCX, Nestina y Neuro D1 (**Figura 15 A**); y también se analizó la expresión en estos cultivos de proteínas de los complejos de polaridad apical, con el fin de establecer una línea temporal de la expresión de las mismas (**Figura 15 B**).

Así, se comprobó que el marcador de neurogénesis DCX se expresa desde el primer momento de establecer el cultivo, observándose un pico de expresión entre 1DIC y 3DIC; momento en el que empieza a disminuir su expresión hasta 10DIC (**Figura 15 A**). Por su parte, Nestina comienza su expresión entre 2DIC y 6DIC, cuando se produce un aumento en su expresión que se mantiene hasta al menos 10DIC, al mismo tiempo que disminuye la expresión de DCX (**Figura 15 A**). De manera muy parecida, se puede observar cómo la proteína NeuroD1, esencial para la diferenciación neuronal, comienza a expresarse a 6DIC, cuando comienza a disminuir la de DCX y aumenta la de Nestina (**Figura 15 A**).

Con respecto a las proteínas de los complejos de polaridad apical (**Figura 15 B**), la proteína Par3, componente del complejo de polaridad Par se expresa a 1 hora del establecimiento del cultivo, aunque en ese momento solo se detecta la isoforma de mayor peso molecular (180 kDa). La isoforma de menor peso molecular (100 kDa) empieza a expresarse a las 3 horas de la siembra de las neuronas. Es de destacar que en ningún caso se ha detectado la isoforma de peso molecular intermedio (150 kDa) (**Figura 15 B**), que sí aparece en lisados proteicos de corteza de ratón adulto (**Figura 11**). Con respecto a proteínas del complejo Crb, se aprecia que Pals1 comienza a expresarse a las 3 horas del cultivo y sus niveles de expresión aumentan a días de cultivo más avanzados (**Figura 15 B**). La proteína MPP4 presenta un patrón de expresión muy parecido a Pals1, empezándose a detectar a las 3 horas del establecimiento del cultivo (**Figura 15 B**). Por último, se ha analizado la expresión de varias

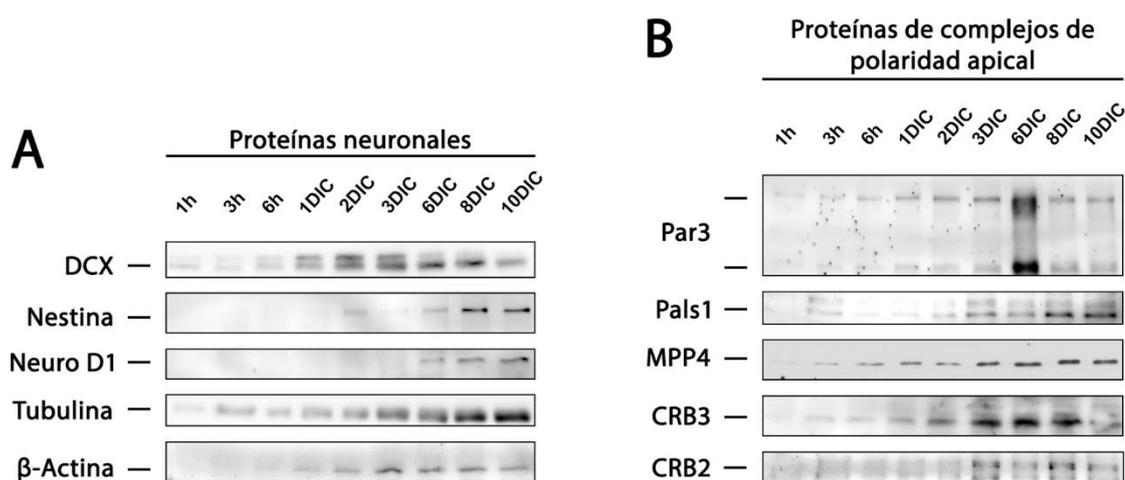


Figura 15. Expresión temporal de proteínas neuronales y de los complejos de polaridad apical en cultivos de neuronas corticales de animales control. Western blot de lisados proteicos a distintos días de cultivos primarios de neuronas corticales, en el que se analizan proteínas neuronales (A), y proteínas de los complejos de polaridad apical (B). **A:** El marcador de neurogénesis DCX, es el primero en aparecer, mostrando un incremento entre 1 y 3DIC, momento en el que empieza a disminuir y empieza a aumentar la expresión de Nestina y NeuroD1. **B:** Se detectan dos de las tres isoformas de PAR3, del complejo Par, siendo la de mayor peso molecular la que primero se expresa. Las proteínas del complejo de polaridad Crb, Pals1 y MPP4, presentan unos niveles de expresión muy parecidos, detectables a partir de las tres horas de establecimiento del cultivo. CRB2 se detecta a partir de 3DIC mientras que CRB3 se expresa a partir de las 3h de establecimiento del cultivo.

proteínas CRB, como CRB3, que comienza a detectarse desde el comienzo de la generación del cultivo, mientras que CRB2 se detecta a partir del 3DIC. Este retraso temporal en la detección de la proteína CRB2 por Western blot respecto a los resultados de inmunofluorescencia podrían deberse a una baja concentración de la cantidad total de proteína CRB2 presente en los primeros días de cultivos, que podría ser insuficiente para ser detectada por esta técnica.

Por ello, podemos concluir que de todas las proteínas analizadas del complejo de polaridad apical, la proteína Par3 es la primera en comenzar a expresarse, seguida de Pals1, MPP4 y CRB3, siendo CRB2 la última proteína de los complejos de polaridad en ser detectada en cultivos neuronales.

Del mismo modo, analizamos el patrón de expresión temporal de proteínas de distintos tipos de uniones celulares como Ocludina, Claudina1 y β -Catenina; proteínas presentes en vesículas como Rab8A o VPS35; y por último, proteínas sinápticas como PSD95, SYP o Sinapsina (**Figura 16**). Con respecto a las proteínas de unión analizadas, tanto Ocludina como Claudina1, ambas proteínas de uniones ocluyentes, se expresan desde el primer momento de establecer el cultivo, lo mismo que β -Catenina, proteína relacionada con las uniones adherentes (**Figura**

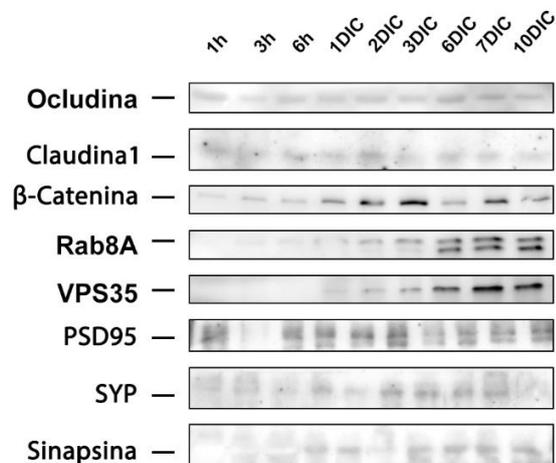


Figura 16. Expresión de proteínas de uniones celulares, asociadas a transporte vesicular y sinápticas en cultivos de neuronas corticales de animales control. Western blot de lisados proteicos a distintos días de cultivos primarios de neuronas corticales. Las proteínas de unión, tanto de uniones ocluyentes (Ocludina y Claudina1) como adherentes (β -Catenina), empiezan a detectarse desde el primer momento de establecer el cultivo. La proteína Rab8A se detecta a 1DIC y VPS35 a partir de 2DIC. Ambas presentan un pico máximo de expresión a 6DIC. Las proteínas sinápticas comienzan a detectarse entre las 3 y 24 horas.

16). Con respecto a las proteínas de vesículas analizadas, podemos concluir que Rab8A, relacionada con las vesículas de exocitosis, se empieza a expresar entre el primer y el segundo día de establecer el cultivo, mientras que la proteína VPS35, relacionada con la vía de endocitosis, empieza a detectarse posteriormente, a partir de 2DIC. Ambas proteínas experimentan un incremento de expresión a 6DIC que se mantiene en el tiempo (**Figura 16**). Con respecto a las proteínas sinápticas, podemos observar que, tanto la proteína postsináptica PSD95, como las presinápticas SYP y Sinapsina, empiezan a detectarse entre las 3 y las 24 h de establecimiento de los cultivos (**Figura 16**).

Conocida la expresión de las distintas proteínas sinápticas analizadas por medio de Western blot, se realizaron experimentos de dobles inmunomarcajes para investigar la localización de estas proteínas en los cultivos primarios de neuronas corticales de ratón. Para ello, hemos analizado tanto la distribución de proteínas presinápticas (**Figura 17 A-B**) como postsinápticas (**Figura 17 C**). Así, comprobamos que la proteína SYP está presente a 1DIC de realizar el cultivo, aunque su mayor expresión se produce partir de los 5DIC, momento en el que pasa de un marcaje punteado e inespecífico en el soma, a un marcaje punteado e intenso por toda la neurona (**Figura 17 A**). La proteína presináptica Sinapsina, que está descrita como una de las encargadas de la liberación de vesículas sinápticas, en los cultivos primarios que hemos establecido aparece desde 1DIC de cultivo y se distribuye por toda la neurona, modulándose su expresión con el paso del tiempo y colocalizando con CRB2 en estadios más avanzados (**Figura 17 B**). El marcaje para la proteína postsináptica PSD95, también empieza a ser detectado a 1DIC de establecer el cultivo, observándose una intensidad de marcaje mayor que en el caso de SYP. Es a partir de 5DIC cuando el marcaje obtenido tanto para SYP como PSD95 es mucho más definido y concreto por toda la neurona, existiendo puntos de colocalización con CRB2 tanto para SYP como para PSD95 (**Figura 17 A y C**). El marcaje observado en todas las dobles inmunofluorescencias realizadas demuestra una distribución punteada por toda la neurona, tanto en soma como en sus prolongaciones.

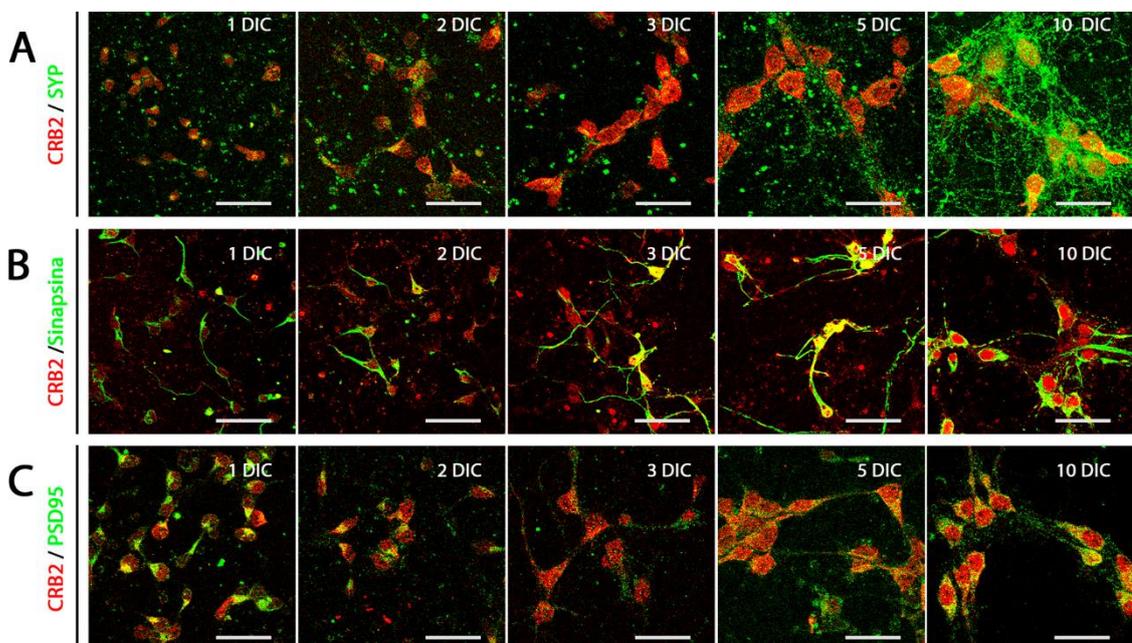


Figura 17. Análisis de la expresión temporal de CRB2 y distintos marcadores sinápticos en cultivos de neuronas corticales de ratón control. Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia para distintas proteínas presinápticas, Sinaptofisina o SYP (A) y Sinapsina (B) y postsinápticas, PSD95 (C) a distintos tiempos de cultivos. Barra de escala: 50 μ m.

Por tanto, estos experimentos de doble marcaje han permitido comprobar que estos cultivos neuronales expresan proteínas presinápticas y postsinápticas esenciales para el establecimiento de conexiones neuronales, es decir, para su funcionalidad, lo que demuestra la viabilidad de los cultivos.

Conocida la temporalidad en la expresión de las distintas proteínas del complejo de polaridad apical mediante los experimentos de Western blot, quisimos identificar por medio de inmunofluorescencia la presencia de varios componentes del complejo Crb, como CRB2, Pals1 y MPP4; del complejo Par, como Par6; y del complejo de polaridad basal Scrib, como la misma proteína SCRIB, a 10DIC (**Figura 18**), periodo en el que todas estas proteínas se expresan por Western blot en neuronas (**Figura 15** y **Figura 16**). También analizamos la expresión de diversas proteínas del transporte vesicular por exocitosis, como Rab8A y por endocitosis, como VPS35 (**Figura 18**). El doble marcaje CRB2/SCRIB pone de manifiesto que no existe colocalización entre ambas en las neuronas en cultivo, observándose que ambas presentan un patrón de marcaje muy similar, punteado y distribuido por toda la neurona, tanto en el soma como en las proyecciones (**Figura 18 A**). Este resultado concuerda con las funciones que éstas realizan *in vivo*, ya que la proteína SCRIB es uno de los elementos esenciales del complejo de polaridad basal Scrib, mientras que CRB2, que pertenece al complejo Crb, está involucrada en el establecimiento de la polaridad apical. También se ha analizado la localización de otras proteínas del complejo de polaridad Par (**Figura 18 B**) y del complejo Crb, tales como Pals1 y MPP4 (**Figura 18 C-D**). Los dobles marcajes ponen de manifiesto la colocalización entre Par6, Pals1 y MPP4 con CRB2 (puntas de flecha blancas), aunque es de destacar la diferencia de marcaje observada entre estas proteínas. El marcaje para Par6 es un marcaje punteado que se distribuye tanto en soma como en proyecciones (**Figura 18 B**) donde se observa una colocalización parcial con CRB2 (puntas de flecha blancas), aunque existen perfiles independientes para ambos marcajes (puntas de flecha amarillas). El marcaje detectado para Pals1 también está presente en el soma, pero es en las proyecciones neuronales donde se puede observar una detección más específica y selectiva (**Figura 18 C**). El marcaje hallado para la proteína MPP4, comparándolo con el otro componente del complejo Crb, Pals1, es un marcaje mucho más punteado presente en las proyecciones neuronales, pero sobre todo en el soma neuronal (**Figura 18 D**), donde se observa una colocalización parcial con CRB2 (puntas de flecha blancas) y puntos independientes de ambas proteínas (puntas de flecha amarillas). Por último, el análisis de la localización de CRB2 y distintas proteínas encargadas del tráfico vesicular muestra que existe una colocalización parcial entre CRB2 y el componente de la vía

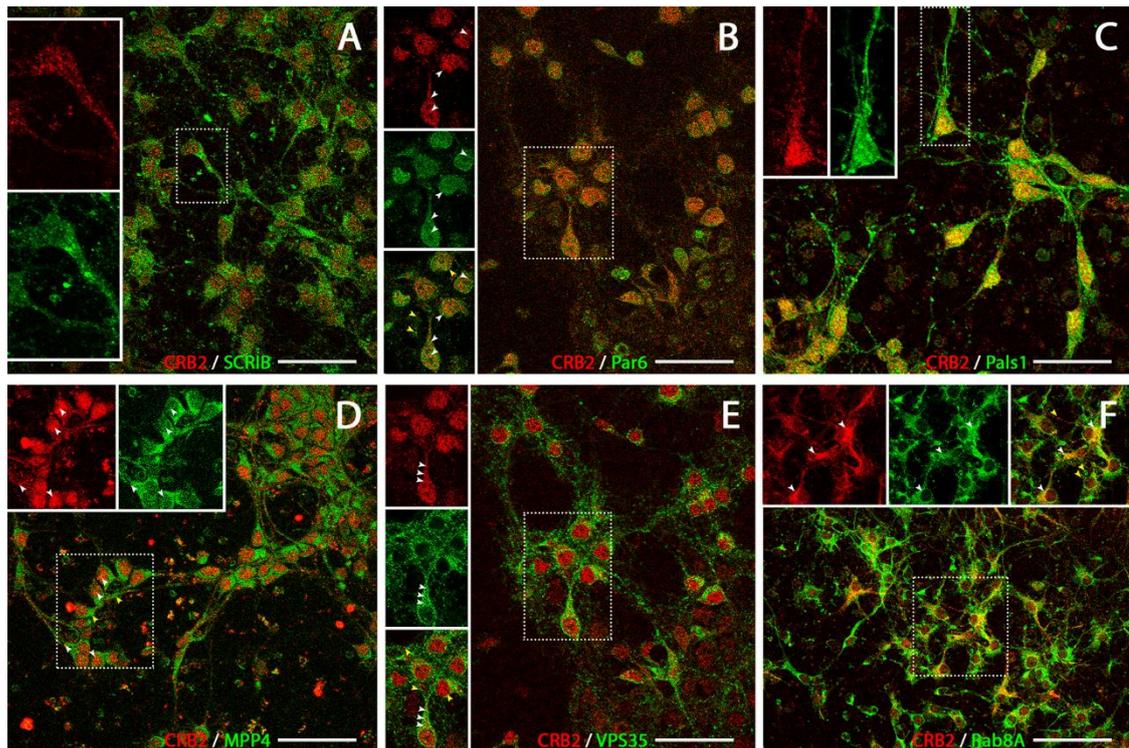


Figura 18. Estudio de la localización de CRB2 y distintas proteínas de complejos de polaridad y proteínas encargadas del tráfico vesicular en cultivos de neuronas corticales de ratón control a 10DIC. Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia para la proteína del complejo de polaridad basal Scrib, SCRIB (A, en verde) que no colocaliza con CRB2 (en rojo). La proteína del complejo de polaridad Par, Par6 (B, en verde), y del complejo Crb, Pals1 (C en verde) y MPP4 (D en verde) colocalizan con CRB2. CRB2 colocaliza parcialmente con la proteína VPS35 (componente del retrómero, vía endocítica) (E) mientras que con la proteína de la vía exocítica Rab8A (F) presenta una colocalización casi completa. Puntas de flecha blancas: puntos de colocalización. Puntas de flecha amarillas: puntos de marcaje independientes. Barra de escala 50 μ m.

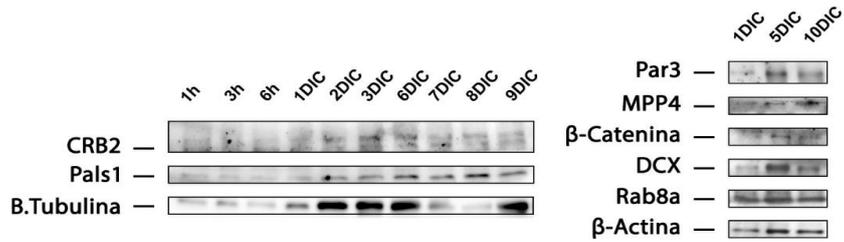
endocítica VPS35 (puntas de flecha blancas en **Figura 18 E**) y una colocalización casi completa entre CRB2 y Rab8A (puntas de flecha blancas en **Figura 18 F**) componente de la vía exocítica; observándose del mismo modo que habíamos visto en los experimentos *in vivo*, perfiles independientes entre CRB2 y las proteínas de tráfico vesículas VPS35 y Rab8A (puntas de flecha amarillas **Figura 18 E-F**).

Estos resultados nos permiten concluir que al igual que lo que ocurre en células epiteliales, CRB2 se expresa en conjunto con otros elementos de los complejos de polaridad apical también en neuronas, al colocalizar con diversas proteínas relacionadas con éste, y no con las del complejo basal. Del mismo modo, y tal y como hemos observado *in vivo*, CRB2 está relacionada con elementos de las dos principales vías de transporte vesicular: endocítica y exocítica.

4.3. CRB2 en cultivo de neuronas de hipocampo

Para comprobar si el patrón de expresión temporal de proteínas es el mismo en los dos tipos de cultivos neurales que hemos establecido, se realizó este mismo estudio en cultivos

primarios de neuronas de hipocampo de ratón control. Así, hemos analizado lisados proteicos



obtenidos a distintos tiempos de cultivo, observando que la

Figura 19. Expresión de proteínas neuronales, de uniones celulares y vesículas en cultivos de neuronas hipocampales de animales control. Western blot de lisados proteicos a distintos días de cultivos neuronales primarios de hipocampo. CRB2 se detecta entre las 6 horas y 2D y el resto de proteínas analizadas mantienen la misma expresión temporal que lo observado en cultivos neuronales corticales.

proteína CRB2 empieza a detectarse entre las 6 horas y los 2D (Figura 19), bastante antes que en el caso de neuronas corticales (Figura 15). El resto de proteínas analizadas presentan un patrón temporal de expresión bastante similar con respecto a los resultados obtenidos en los cultivos de neuronas corticales. Es de destacar que en el caso de la proteína Par3, sólo se ha detectado la isoforma de peso molecular intermedio (180 kDa).

De este modo, podemos concluir que al menos en neuronas de hipocampo *in vitro*, la proteína CRB2 empieza a expresarse antes que en los cultivos corticales.

4.4. CRB2 presenta una expresión temprana en el mutante CRB1^{rd8}

Para investigar si, del mismo modo que se detectó un incremento en la expresión de

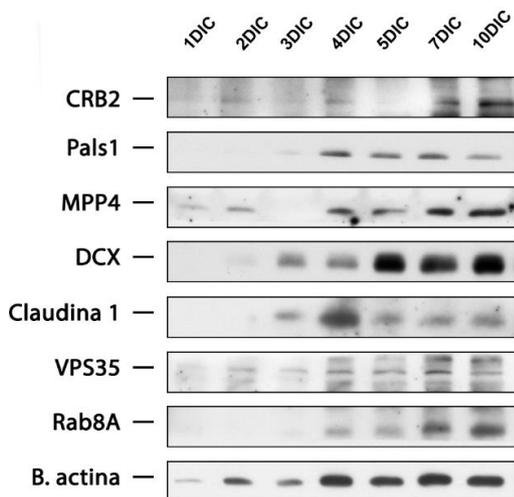


Figura 20. Caracterización de la expresión de proteínas del complejo de polaridad apical, neuronales y de vesículas en cultivo de neuronas corticales de animales mutantes CRB1^{rd8}. Western blot de lisados proteicos a distintos días de cultivos primarios de neuronas. CRB2 comienza su expresión desde 1D-2D. La proteína Pals1 empieza a expresarse entre 3D y 4D, mientras que MPP4 es detectada desde el principio del cultivo. Las proteínas DCX y Claudina1 son detectadas a 3D. VPS35 es detectada a 2D y Rab8A a partir de 4D.

CRB2 en áreas encefálicas del genotipo mutante CRB1^{rd8} tales como la corteza cerebral debido a defectos en la expresión de CRB1, sucede algo similar en los cultivos, quisimos analizar la expresión de CRB2 en cultivos neuronales obtenidos del modelo mutante CRB1^{rd8}.

Para ello, se analizaron por Western blot lisados proteicos obtenidos a distintos tiempos de cultivo (Figura 20) y se estudió la distribución de CRB2 mediante experimentos de inmunofluorescencia (Figura 21).

Los análisis de Western blot con los que hemos analizado el patrón de expresión temporal de distintas proteínas de los complejos de polaridad y vesiculares muestran que en el caso

de los cultivos primarios corticales de ratón mutante $CRB1^{rd8}$ (**Figura 20**), la proteína CRB2 empieza a detectarse entre 1DIC y 2DIC, aumentando su expresión con el paso del tiempo. Este resultado muestra que en las neuronas corticales del modelo mutante para CRB1, la proteína CRB2 adelanta su expresión en comparación con lo observado en las neuronas obtenidas del animal control (**Figura 15**). Por su parte, algunas proteínas del complejo Crb, como Pals1 y MPP4 empiezan a detectarse a partir de 3DIC y 1DIC respectivamente, observándose por tanto, un retraso en la expresión de Pals1 en comparación con los cultivos primarios de neuronas corticales del modelo control (**Figura 15**). El marcador de microtúbulos de precursores neurales DCX, empieza a detectarse a 2DIC, experimentando un incremento a 5DIC que permanece constante en el tiempo (**Figura 20**). La proteína de uniones ocluyentes Claudina1, empieza a ser detectada a 3DIC y sus niveles de expresión perduran con el paso del tiempo (**Figura 20**). Con respecto a las proteínas relacionadas con el transporte de vesículas, VPS35 empieza a detectarse entre 1 y 2DIC, mientras que Rab8A se detecta a 4DIC.

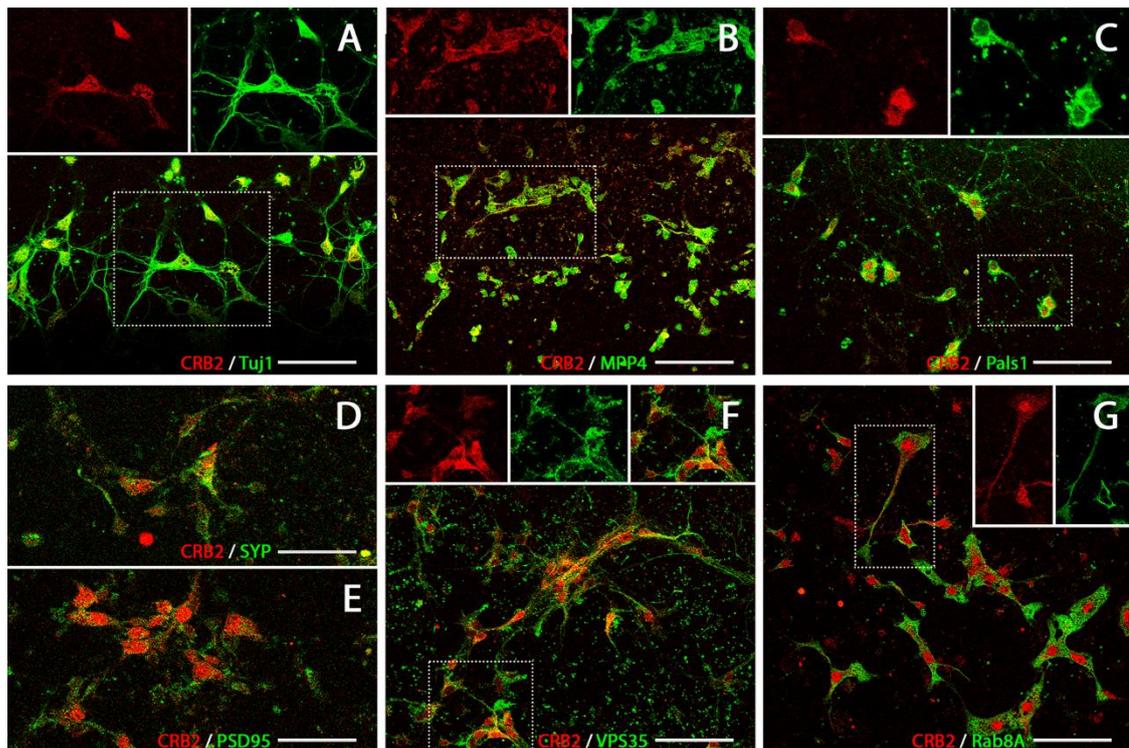


Figura 21. Localización de CRB2 y distintas proteínas neuronales, del complejo de polaridad apical, sinápticas y encargadas del tráfico vesicular en cultivo de neuronas corticales del genotipo mutante $Crb1^{rd8}$ a 10DIC. Imágenes de microscopía láser confocal de doble inmunofluorescencia para CRB2 y diversos marcadores. A, Tuj1 (verde) y CRB2 (rojo), colocalizan en las neuronas en cultivo. B y C, las proteínas del complejo Crb, MPP4 (verde en B) y Pals1 (verde en C) colocalizan con CRB2 (rojo en B y C). D y E, tanto la proteína sináptica SYP (verde en D) como postsináptica (verde en E) colocalizan con CRB2 (rojo en D y E). F y G, CRB2 (rojo en F y G) colocaliza parcialmente con la proteína VPS35 (verde en F), mientras que con la proteína de la vía exocítica Rab8A (verde en G) presenta una colocalización completa. Barra de escala 50 μ m.

Los experimentos de dobles inmunohistoquímicas a 10DIC de cultivos de neuronas primarias corticales de ratón mutante CRB1^{rd8} (**Figura 21**) ponen de manifiesto que, al igual que sucedía con la expresión de la proteína CRB2 en cultivos de animales control y como era de esperar, CRB2 se expresa en neuronas también en el genotipo mutante al colocalizar en células marcadas con Tuj1 (**Figura 21 A**); constituye parte del complejo de polaridad Crb al colocalizar con las proteínas MPP4 (**Figura 21 B**) y Pals1 (**Figura 21 C**); existe colocalización entre CRB2 y las proteínas sinápticas SYP (**Figura 21 D**) y PSD95 (**Figura 21 E**); y hay también colocalización entre VPS35 (**Figura 21 F**) y Rab8A (**Figura 21 G**).

De este modo, y en comparación con los resultados obtenidos en los cultivos del genotipo control, parece que en las neuronas corticales de los animales mutantes para CRB1, CRB2 comienza su expresión casi desde el primer momento de establecerse el cultivo. Por el contrario, al comparar la expresión de la proteína del complejo Crb, Pals1, se observa un retraso en relación con los cultivos control, igual que ocurre con las proteínas DCX y Claudina1.

5._ CRB2 y silenciamiento

Para investigar las funciones de CRB2 durante el desarrollo de las neuronas en cultivo se procedió al silenciamiento específico de la expresión de la proteína CRB2 en los cultivos primarios de neuronas obtenidas de corteza cerebral de animales control mediante el empleo de partículas lentivirales conteniendo las secuencias de silenciamiento seleccionadas e indicadas en el apartado de materiales y métodos. Tras realizar diversos experimentos en los que se añadió a los cultivos las partículas lentivirales a distintos tiempos con el fin de seleccionar el momento óptimo de adición e incubación de los lentivirus para conseguir cambios a nivel de expresión proteica de CRB2 adecuados, se determinó que este periodo óptimo es a 25 DIC (**Figura 22**). Siguiendo el protocolo indicado en el apartado de material y métodos, los cultivos se trataron de forma independiente con lentivirus con tres secuencias de shARN (ARN de horquilla pequeña) distintas (sh2-sh4) para el silenciamiento de CRB2 y una control shCTR y se recogieron muestras de lisados proteicos a 25DIC para su análisis mediante Western blot. Los resultados muestran una disminución significativa (p -valor = 0,014; n = 4) de los niveles de la proteína CRB2 con la secuencia sh4 en relación con los controles (**Figura 22 A**). Por tanto, a pesar de que todas secuencias elegidas estaban diseñadas para el reconocimiento de la secuencia del mensajero de CRB2, solo una de ellas, la secuencia denominada sh4, ha demostrado ser eficaz para su silenciamiento con respecto a los niveles de CRB2 control en

cultivos neuronales, y debido a este resultado, esta secuencia es la que se empleó en el resto de los experimentos mostrados en esta Tesis Doctoral.

Uno de los experimentos realizados para comprobar los efectos de la disminución de CRB2 en las neuronas fue analizar los niveles de expresión de distintas proteínas relacionadas con esta proteína y con la adquisición de polaridad y adhesión celular, como β -Catenina (**Figura 22 A**), CRB3, Pals1, MPP4 (**Figura 22 B**) o con distintas funciones neuronales como NeuroD1, PSD95, SYP, VPS35 o Rab8A (**Figura 22 C**). Así, hemos comprobado que solo se producen cambios importantes en los niveles de expresión de la proteína Pals1, ya que se ha obtenido una disminución significativa de su expresión en comparación con el experimento control (p -valor = 0,026; $n = 4$) (**Figura 22 B**). La cuantificación del resto de las proteínas analizadas no ha mostrado diferencias significativas en la expresión proteica entre los cultivos silenciados y los controles, aunque es de destacar una aparente disminución en los niveles proteicos de β -Catenina y MPP4 (**Figura 22 C**).

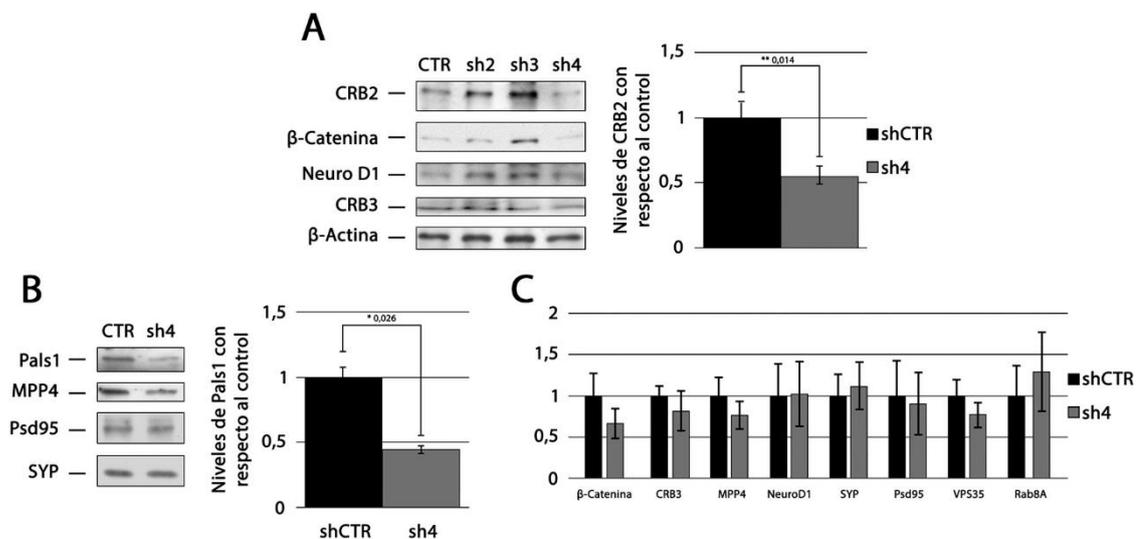


Figura 22. Caracterización del efecto del silenciamiento de CRB2 con partículas lentivirales en cultivo de neuronas corticales del ratón control. **A:** Western blot de lisados proteicos a 25DIC de cultivos de neuronas corticales de ratón control para comprobar la efectividad del silenciamiento de CRB2 de las distintas secuencias utilizadas. La secuencia sh4 muestra una disminución significativa de los niveles de la proteína CRB2 en comparación con el control (p -valor = 0,014). **B:** Estudio de los niveles de expresión de distintas proteínas del complejo de polaridad Crb y proteínas sinápticas. Los niveles de Pals1 muestran una disminución significativa (p -valor = 0,026) respecto a los niveles control. **C:** Cuantificación de los niveles de proteínas relacionadas con las uniones, las sinapsis y funciones neuronales analizadas en las que en ningún caso se han observado diferencias estadísticas entre los cultivos silenciados para CRB2 y los controles. Se usó β -actina (42 kDa) como control de carga. Los datos se representan como media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado mediante el test T de Student ($n = 4$). Un asterisco indica la presencia de diferencias estadísticas y dos asteriscos indican la presencia de diferencias altamente significativas.

Para analizar el efecto del silenciamiento de CRB2 en las neuronas en cultivo también se realizaron experimentos mediante técnicas de inmunofluorescencia en cultivos de neuronas

corticales de ratón control con silenciamiento para CRB2 y controles (**Figura 23**). En primer lugar realizamos un análisis de la cantidad de expresión de la proteína CRB2 mediante inmunofluorescencia en tres cultivos diferentes infectados con la secuencia control (**Figura 23 A**) y la secuencia sh4 (**Figura 23 B**). Para ello se obtuvieron 5 imágenes aleatorias de cada experimento y se cuantificó el número de neuronas CRB2 positivas, es decir, neuronas expresando la proteína CRB2. Así, observamos una disminución significativa (p -valor = 0,01; $n = 3$) del número de neuronas CRB2 positivas al comparar los cultivos infectados con la secuencia sh4 respecto a los controles (**Figura 23 C**). A modo de control también se realizaron experimentos empleando la secuencia sh2 (que en los resultados por Western blot no mostró una reducción efectiva de los niveles de CRB2), observándose que no existen diferencias significativas en el número de células positivas para CRB2 al compararse con el control (**Figura 23 C**). Es de destacar la presencia de marcaje para CRB2 en neuronas infectadas con las secuencias de silenciamiento (en verde), evidenciando que no se produce un silenciamiento total de la expresión de la proteína CRB2 en cultivo. Al comparar las neuronas infectadas con

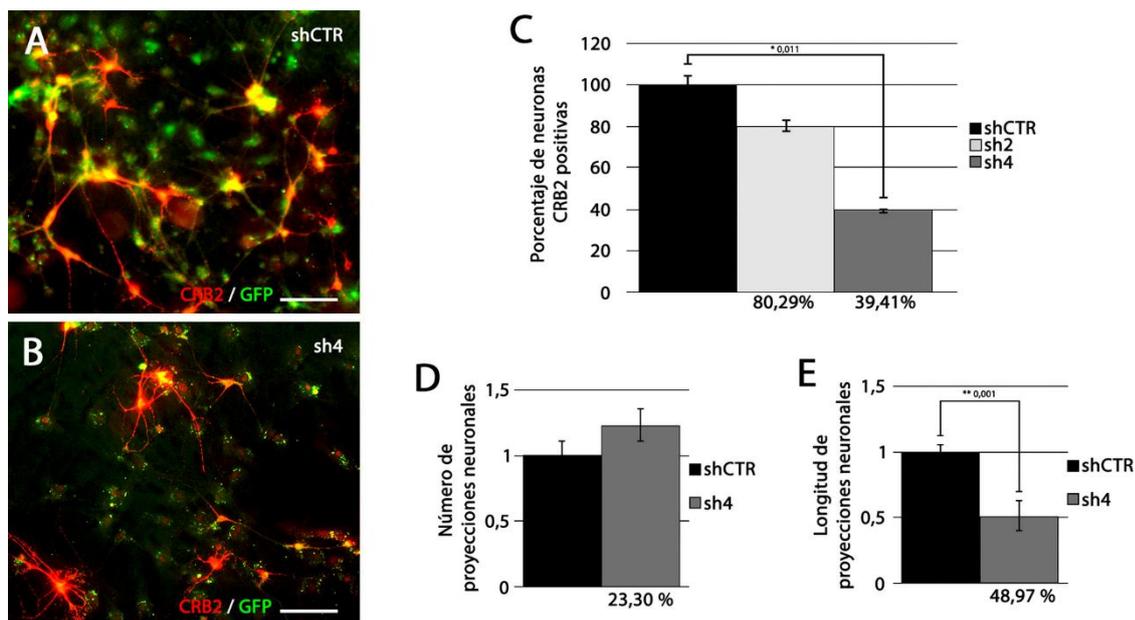


Figura 23. Caracterización del efecto del silenciamiento de la proteína CRB2 mediante partículas lentivirales en cultivos de neuronas corticales de ratón control. **A, B:** Imágenes de dobles inmunofluorescencia para CRB2 (rojo) y GFP (verde, células infectadas) de cultivos de neuronas corticales de ratón control a 25DIC infectados con la secuencia control (A) y la secuencia sh4 (B). **C:** Cuantificación del número de neuronas positivas para CRB2 en los cultivos silenciados para CRB2 (sh4) y control mostrando una disminución significativa de células expresando CRB2 en los cultivos infectados con sh4 (C). **D:** Cuantificación del número de proyecciones emitidas por neuronas CRB2 positivas en los cultivos silenciados para CRB2 y control, que no muestra diferencias significativas entre ambos. **E:** Cuantificación de la longitud de las proyecciones neurales en los cultivos silenciados para CRB2 y control, mostrando que las células infectadas con sh4 muestran proyecciones más cortas que las de los cultivos control. Los datos se representan como media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado por medio del test T de Student ($n = 3$). Barra de escala 100 μ m. Un asterisco indica la presencia de diferencias estadísticas y dos asteriscos indican diferencias altamente significativas.

la secuencia control y la secuencia sh4, se detectó que las infectadas con la secuencia sh4 presentaban una morfología diferente a las neuronas control, ya que mostraban una estructura más irregular, con mayor número de proyecciones, aunque más cortas que las que presentaban las neuronas control. Con la finalidad de comprobar estas diferencias cualitativas de una forma cuantitativa, se midió el número de proyecciones que emiten las neuronas CRB2 positivas en los cultivos control y los infectados con la secuencia sh4 (**Figura 23 A**). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en cuanto al número de proyecciones entre las neuronas control y las neuronas infectadas con la secuencia sh4 (**Figura 23 D**). Al analizar la longitud de las proyecciones neuronales se comprobó que en este caso, sí existe una disminución altamente significativa (p -valor = 0,001; $n = 3$) en la longitud de las proyecciones de las neuronas infectadas con la secuencia sh4 (**Figura 23 E**).

Por último, para comprobar si el silenciamiento de CRB2 produce un aumento en la muerte celular en los cultivos neuronales, se analizaron los núcleos de las neuronas infectadas con las secuencias control y sh4 (**Figura 24**). Para ello, hemos cuantificado el número de núcleos con morfología típicamente apoptótica (**Figura 24**). Hemos considerado como un núcleo normal aquel que presenta una morfología homogénea, redondeada, y con un marcaje uniforme con DAPI. Por otro lado, hemos considerado un núcleo apoptótico aquel que presenta un tamaño más pequeño (tamaño máximo 9,5 μm), mostrando mucha intensidad de marcaje para DAPI o cuando se encuentra fragmentado en varias partes. Así, hemos detectado un aumento significativo (p -valor = 0,039; $n = 3$) del número de núcleos apoptóticos al comparar las neuronas infectadas con la secuencia de silenciamiento sh4 y la secuencia control (**Figura 24**).

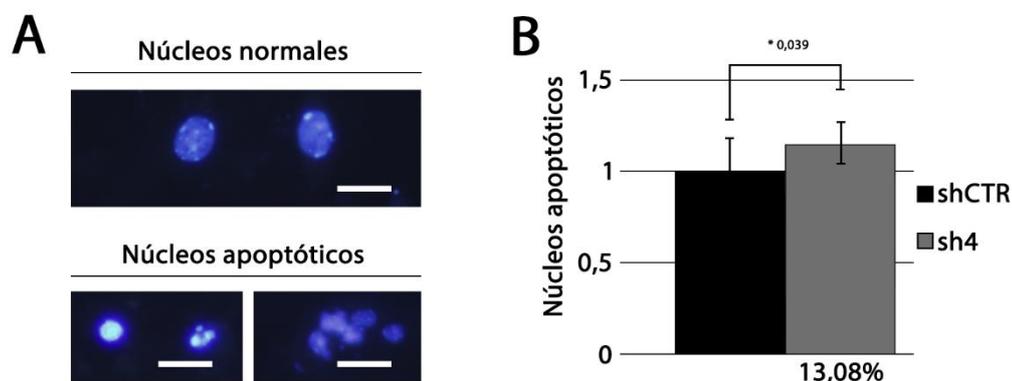


Figura 24. Análisis de apoptosis en cultivo de neuronas corticales de ratón control silenciadas para la proteína CRB2. **A:** Inmunofluorescencia para DAPI en neuronas corticales silenciadas para CRB2 y control a 25DIC, mostrando las diferencias morfológicas entre los núcleos normales y apoptóticos. **B:** En los cultivos silenciados para CRB2 se aprecia un aumento significativo en el número de núcleos apoptóticos. Los datos se representan como media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado por medio del test T de Student ($n = 3$). Barra de escala 25 μm . Un asterisco indica la presencia de diferencias estadísticas.

Con respecto al tercer objetivo propuesto en la presente Tesis Doctoral, podemos concluir que CRB2 se expresa únicamente en neuronas donde colocaliza con proteínas del complejo de polaridad apical, proteínas sinápticas y algunas proteínas relacionadas tanto con la vía exocítica como endocítica del transporte de vesículas. CRB2 comienza a expresarse a 3DIC, siendo la última de los complejos de polaridad apical Crb y Par que aparece. Su depleción en cultivos primarios de neuronas corticales produce una disminución significativa en los niveles de Pals1 y alteraciones estructurales caracterizadas por la disminución del tamaño de las proyecciones emitidas por las neuronas y un aumento de la apoptosis neuronal.

6._ Análisis de la expresión de CRB2 en muestras humanas

6.1._ CRB2 y enfermedad de Alzheimer

Estudios en *Drosophila* han demostrado que Crb realiza un importante papel modulando la actividad de γ -secretasa (Herranz & Milan, 2006; Herranz et al., 2006). La γ -secretasa es una proteasa que procesa la escisión de la proteína precursora de amiloide o APP a distintos niveles, formando péptidos de β -amiloide (A β), que participan en la formación de placas seniles detectadas en la patología de Alzheimer (Haass & Selkoe, 2007; Serrano-Pozo et al., 2011). En trabajos con células epiteliales humanas y de neuroblastoma se postuló a CRB2 como modulador negativo de γ -secretasa sugiriendo que defectos en esta proteína transmembranaria podría promover el desarrollo de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Mitsuishi et al., 2010).

Por todo ello, y para explorar la hipótesis formulada en trabajos previos, hemos querido comprobar si los niveles de la proteína CRB2 en cerebro humano difieren en pacientes control y pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) (**Figura 25**). Para ello, trabajamos con lisados proteicos de muestras de corteza frontal e hipocampo de pacientes humanos que han sido amablemente cedidas por el Dr. Eugenio Santos de Dios, del Centro de Investigación del Cáncer. Como se ha indicado previamente, los experimentos de Western blot demostraron que el anticuerpo diseñado por nuestro grupo de trabajo reconoce específicamente la proteína CRB2 humana (**Figura 1 B**). Por tanto, mediante Western blot analizamos la presencia de la proteína CRB2 en cerebro humano control y patológico (**Figura 25 A**) y los resultados mostraron que en pacientes con EA, hay una disminución altamente significativa de los niveles de la proteína CRB2 al menos en corteza frontal (p-valor = 0,010; pacientes control n = 3; paciente con EA n = 6) (**Figura 25 B**). En el caso del hipocampo, también se aprecia una expresión reducida en la cantidad de CRB2 en las muestras de pacientes con EA, que podría suponer una tendencia en la

disminución de estos niveles, pero no se encontraron diferencias significativas (**Figura 25 C**) con este número de muestras analizadas (pacientes control n = 4; pacientes con EA n = 4).

Para investigar la distribución y localización de CRB2 en cerebro humano se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para CRB2 en secciones de corteza frontal humana, tanto de pacientes control como de pacientes con EA. Las muestras control fueron cedidas por el Banco Nacional de tejidos (CIEN) y las muestras de pacientes con EA por el Banco de Tejidos del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (BTN-INCYL). Tras la tinción inmunohistoquímica para CRB2 se cuantificó el número de neuronas positivas para CRB2 en un paciente control (puntas de flecha en **Figura 25 D**) y para dos pacientes con EA (puntas de flecha en **Figura 25 E**). Estos resultados mostraron que hay un menor número de neuronas positivas para CRB2 en la corteza de pacientes con EA respecto a la corteza control y que esta diferencia es significativa (**Figura 25 F**). Además, no solo eso, sino que en pacientes con EA, las neuronas marcadas para CRB2 se agrupan principalmente formando densificaciones (puntas de flecha verdes en **Figura 25 E**). Para analizar estas áreas de enriquecimiento de CRB2 y conociendo que uno de los signos

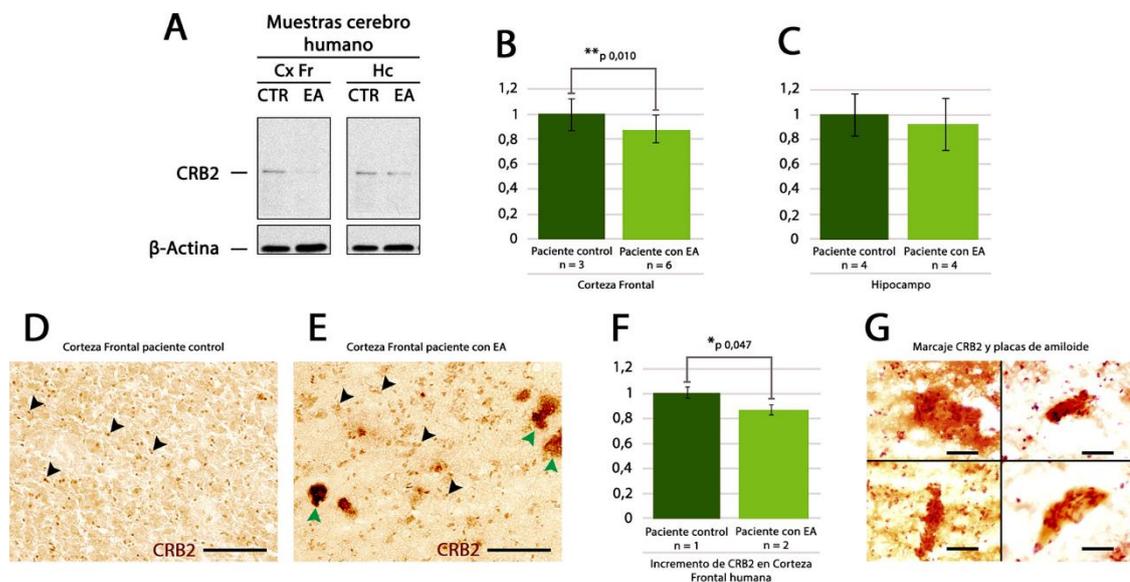


Figura 25. Estudio y cuantificación de los niveles y distribución de la proteína CRB2 en muestras de pacientes control y con enfermedad de Alzheimer. **A:** Western blot de los niveles de la proteína CRB2 en corteza frontal (Cx Fr) e hipocampo (Hc) en pacientes control (CTR) y con enfermedad de Alzheimer (EA). **B:** Cuantificación de los niveles de CRB2 en Cx Fr mostrando una disminución significativa en las muestras de EA. **C:** Cuantificación de los niveles de CRB2 en Hc donde no hay diferencias entre los grupos. **D-E:** Análisis inmunohistoquímico de secciones de corteza frontal de paciente control (D) y paciente con EA (E) mostrando acúmulos de marcaje para CRB2 en E. **F:** Cuantificación del número de neuronas positivas para CRB2, mostrando una disminución del número de neuronas CRB2 positivas en pacientes con EA. **G:** Tinción para Rojo Congo e inmunomarcaje para CRB2 en pacientes con EA mostrando que los acúmulos de marcaje para CRB2 se produce en las placas de amiloide teñidas con Rojo Congo. Se usó β -actina (42 kDa) como control de carga. Los datos se representan como media \pm s.e.m. Información estadística: Se ha utilizado el test de Kolmogorov Smirnov para el análisis de la normalidad de las muestras. En todos los casos la comparativa de los dos grupos experimentales se ha realizado por medio del test T de Student. Barra de escala 100 μ m (D-E), 50 μ m (G). Un asterisco indica la presencia de diferencias estadísticas. Dos asteriscos indican la presencia de diferencias altamente significativas.

patológicos más conocidos de los pacientes con EA es que en ciertas regiones encefálicas, como en la corteza frontal, se generan las conocidas placas de β -amiloide, nos propusimos analizar la distribución de estas placas en las muestras disponibles mediante la técnica del marcaje de Rojo Congo, que es específico para la identificación de los acúmulos de β -amiloide, estructuras que adquieren una tonalidad naranja rojiza al depositarse entre sus fibras el colorante. La doble tinción de Rojo Congo con la inmunohistoquímica para CRB2 nos permitió comprobar que las estructuras más densas observadas como consecuencia del acúmulo de marcaje para CRB2, son efectivamente placas de β -amiloide, al teñirse de un color rojizo con este método (**Figura 25 G**).

Podemos concluir con el cuarto objetivo del presente trabajo, que CRB2 está presente tanto en corteza frontal como en hipocampo humano y los niveles de la proteína se encuentran disminuidos en corteza de pacientes con EA donde se han observado acúmulos de CRB2 en estructuras densas identificadas como placas de amiloide, características de esta patología.

6.2._ CRB2 y degeneración de retina

Como se ha descrito en la introducción, se conoce que mutaciones en el gen *CRB1* producen degeneraciones retinianas como la Amaurosis Congénita de Leber y la retinosis pigmentaria (A. I. den Hollander et al., 2001; Anneke I. den Hollander et al., 1999). En ratón se ha comprobado que mutaciones en CRB2 ocasiona alteraciones que simulan las producidas en CRB1 y desencadenante de la retinopatías (Alves et al., 2013), pero en humanos, estas mutaciones de CRB2 no presentan evidencias alélicas que demuestren estas patologías (van den Hurk et al., 2005). La proteína CRB2 presenta una alta tasa de polimorfismo comparada con CRB1, por lo que no se puede descartar que cualquier variación alélica de la proteína o algún polimorfismo pudiera desencadenar retinopatías humanas (A. I. den Hollander et al., 2004). Estudios previos en nuestro laboratorio, en los que se identificó por primera vez la proteína CRB2 en epitelio pigmentario de la retina sugieren un importante papel de la proteína en el mantenimiento de la homeostasis de las células del epitelio pigmentario. Alteraciones en estas células pueden desencadenar la muerte de los fotorreceptores y la aparición de la retinopatía conocida como Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) caracterizada por la pérdida de visión en la zona de la mácula en edades adultas que se caracteriza por la formación de agregados heterogéneos en la lámina basal de las células del epitelio pigmentario, conocidos como drusas. Además, uno de los componentes tóxicos de esta patología y que se acumula en las drusas son acúmulos de β -amiloide, elemento común de esta patología con la enfermedad de Alzheimer y que cuya generación, como sugieren algunos

autores, podría depender en ambos casos de las funciones de CRB2 (Ambati & Fowler, 2012; Anderson et al., 2004; Luibl et al., 2006; Zweifel et al., 2010). Por ello, en esta Tesis Doctoral hemos querido explorar la posibilidad de que mutaciones o polimorfismos relacionados con el gen *CRB2* fueran causantes de alguna variante de este trastorno (Figura 26).

Tipo de Herencia	Grupo control	Grupo paciente DMAE	Odd ratio	p-valor
Codominancia				
C/C	41 (46 %)	37 (42 %)	1	0,504
C/G	35 (39,8 %)	40 (45 %)	1,018 (0,432 - 2,398)	
G/G	12 (13,6 %)	11 (12,5 %)	2,59 (0,641 - 10,489)	
Dominantes				
C/C	41 (46 %)	37 (42 %)	1	0,415
C/G - G/G	47 (53,4 %)	51 (57,5 %)	1,153 (0,494 - 2,694)	
Recesivos				
G/G - G/C	76 (85,5 %)	77 (87 %)	1	0,299
G/G	12 (13,6%)	11 (12,5%)	0,600 (0,070 - 5,164)	

Figura 26. Distribución genotípica del polimorfismo rs1105222 en el gen *CRB2* en grupos control y con DMAE. Estudio de la distribución genotípica del Polimorfismo de un Único Nucleótido (SNP) de un cambio de una C por una G por medio de la sonda rs1105222 en el que no se observa diferencias entre ambos grupos poblacionales. Información estadística: Se ha utilizado el análisis de Chi-Cuadrado (χ^2) para el estudio de las diferencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos poblacionales. Se ha calculado el factor de riesgo u Odd ratio.

Se define como polimorfismo a dos o más formas alternativas de un gen en una población, de modo que la variante menos frecuente no puede ser explicada por medio de una mutación patogénica al estar presente con al menos una incidencia del 1 % en la población de estudio. Existen distintos tipos de polimorfismos ya que pueden afectar a un número variable de bases, aunque lo más normal es que afecten a un cambio de un nucleótido en la secuencia de ADN, conocido como Polimorfismos de un Único Nucleótido (SNP). En el presente trabajo se ha procedido a estudiar el SNP rs1105222 que consiste en una sustitución de una citosina por una guanina, produciendo un cambio en el codón 932 del ARN mensajero de la parte extracelular de la proteína, que produce un cambio de una alanina (GCC) por una glicina (GGC) en la posición 94 de la proteína (NCBI, 2018), en poblaciones control y con Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).

Para este análisis preliminar hemos trabajado con un total de 89 muestras de ADN tanto de pacientes control como de pacientes con DMAE, que han sido amablemente cedidas por el Dr. Rogelio González Sarmiento del Dpto. de Medicina de la Universidad de Salamanca.

El análisis comparativo realizado sobre la distribución alélica y genotípica de este polimorfismo entre los dos grupos poblacionales mostró que no existen diferencias significativas entre ellos (**Figura 26**). Del mismo modo, ajustando el modelo de regresión al factor de riesgo, no hemos observado diferencias significativas. Por tanto, con respecto al quinto y último objetivo de la presente Tesis Doctoral podemos concluir que el cambio de una C por una G no produce ningún factor de riesgo o protección frente a la enfermedad.

Discusión



1._ Expresión de CRB2 en el ratón adulto.

En la presente Tesis Doctoral se ha analizado la presencia de la proteína CRB2 en distintos tejidos y nuestros resultados demuestran por primera vez la expresión selectiva de la proteína en determinados tejidos de origen epitelial. Del mismo modo, hemos descrito de forma novedosa la presencia de esta proteína de polaridad en cerebro adulto murino y humano donde podría desempeñar un importante papel neuroprotector frente a patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

1.1._ Expresión de CRB2 en cerebro y derivados epiteliales

Son varios los trabajos que han demostrado la expresión del ARN mensajero para *Crb* así como la presencia de las tres proteínas CRB en distintos tejidos, también en mamíferos (Assemat et al., 2008; Anneke I. den Hollander et al., 1999; Lemmers et al., 2002; Tepass et al., 1990). En concreto, aunque hay varios estudios que ponen de manifiesto la presencia del mensajero para *Crb2* en estos tejidos (van den Hurk et al., 2005), la presencia de la proteína CRB2 solo había sido detectada hasta la fecha en cerebro embrionario (Dudok et al., 2016; Ramkumar et al., 2015), en epitelio pigmentario de ratón (A. E. Paniagua et al., 2015), en la retina neural (Alves et al., 2013; van Rossum et al., 2006) y en riñón (Ebarasi et al., 2015). Aunque son varios los anticuerpos disponibles por distintas casas comerciales para poder identificar la proteína CRB2, la mayoría están dirigidos frente a la región extracelular de la proteína y los datos inconsistentes en cuanto a la determinación del peso molecular y distribución de CRB2 en diferentes tipos de muestras y tejidos pone de manifiesto la variabilidad e ineficacia de estos marcadores, que podría ser una de las razones por las que no existen datos constatables de la presencia de esta proteína en otros tejidos. Las pruebas preliminares realizadas con estos anticuerpos comerciales y tejido control en nuestro laboratorio no aportaron resultados satisfactorios. Por ello, en un trabajo previo del laboratorio se diseñaron, generaron y caracterizaron anticuerpos dirigidos frente a una secuencia única de la región citoplasmática de la proteína que demostraron su efectividad para detectar la proteína murina y humana (A. Paniagua et al., 2018 Under Review; A. E. Paniagua et al., 2015). Con el empleo de estos anticuerpos específicos, en la presente Tesis Doctoral hemos podido determinar por primera vez la expresión de la proteína CRB2 (tanto mediante Western blot como por inmunohistoquímica) y su caracterización en tejidos de origen epitelial distintos a los ya conocidos, así como en cerebro humano y de ratón adulto.

La técnica de Western blot ha permitido detectar en todos los tejidos y tipos celulares que se han empleado, la presencia de una banda de 150 kDa, cercana al peso molecular estimado de 134 kDa de la proteína CRB2 (UniProt, 2018). En muchos tejidos se ha detectado además una banda secundaria de aproximadamente 250 kDa. En la literatura se había descrito que CRB2 presenta un peso molecular estimado de entre 100 y 220 kDa en la línea celular de células pluripotentes de ratón CGR8 (Boroviak & Rashbass, 2010) y en las líneas celulares humanas HEK293 y SH-SY55 (Mitsuishi et al., 2010; Pardossi-Piquard et al., 2007). Del mismo modo, se había identificado que la proteína CRB2 puede sufrir modificaciones postraduccionales (Ramkumar et al., 2015). Esto explicaría que en la presente Tesis Doctoral se haya detectado que CRB2 se presenta con un peso molecular aproximado de 150 kDa en los distintos tejidos analizados y la presencia de bandas secundarias en algunos de ellos. Sería necesario realizar experimentos adicionales para investigar la posibilidad de que se produzcan modificaciones postraduccionales de CRB2 en los tejidos analizados.

Los análisis realizados para establecer la presencia de CRB2 en distintos tejidos de origen epitelial demuestran que esta proteína se expresa en intestino delgado, riñón, testículo, pulmón, vejiga y bazo, y que su peso molecular es similar al previamente establecido y descrito. Sin embargo, cabe destacar la necesidad de realizar estudios en profundidad sobre la presencia de posibles modificaciones postraduccionales que pueda sufrir la proteína, al tratarse de tejidos muy diversos con funciones muy distintas.

1.1.1._ Expresión y localización de CRB2 en cerebro de ratón adulto.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia en muestras de cerebro de ratón demuestran la presencia de la proteína CRB2 en este tejido. De entre las proteínas del complejo de polaridad Crb, en cerebro de ratón se conocía la existencia de las proteínas Pals1 (Funke et al., 2005; Kim et al., 2010) y CRB1 (A. I. den Hollander et al., 2002), pero hasta la fecha no había datos en relación a la proteína CRB2, aunque sí se conocía la expresión de su mensajero en neuronas (Boroviak & Rashbass, 2010). La especificidad del anticuerpo policlonal previamente diseñado por nuestro grupo de laboratorio (A. E. Paniagua et al., 2015) ha permitido identificar por primera vez la presencia de CRB2 en este tejido.

Los experimentos de dobles y triples inmunofluorescencias con marcadores neuronales y gliales han permitido demostrar que en el cerebro de ratón adulto, CRB2 se expresa exclusivamente en neuronas, en grupos de vesículas del soma y en las proyecciones, donde se localiza principalmente en vesículas sinápticas. Además, hemos podido comprobar que, aunque CRB2 presenta una distribución generalizada por todo el cerebro, su presencia es

más evidente en áreas concretas como en corteza, hipocampo, cerebelo e hipotálamo. En la retina se ha descrito que CRB2 es necesaria para la correcta laminación de la capa de los fotorreceptores ya que su defecto provoca una organización aberrante de esta zona (Alves et al., 2013). Las áreas cerebrales donde mayor presencia hemos observado de CRB2 se caracterizan por una alta organización en capas y núcleos, y debido a las funciones descritas en la retina, cabría esperar que pudiera estar involucrada en la organización estructural y laminar del cerebro durante el desarrollo. Sin embargo, sería necesario realizar estudios específicos de déficit de CRB2 durante el desarrollo neural para poder explorar esta posibilidad.

La formación de nuevas neuronas en cerebro adulto queda relegada a zonas restringidas del cerebro de mamíferos, donde se ha estudiado mediante distintas herramientas, como la incorporación de bromodesoxiuridina (BdrU) durante la división celular, o marcadores de distintas fases del ciclo celular, como Ki-67 o PCNA. También se ha propuesto el uso de la proteína Doblecortina (DCX) como marcador de neurogénesis (Couillard-Despres et al., 2005; Gotz & Huttner, 2005; Gotz, Nakafuku, & Petrik, 2016; Ming & Song, 2011), ya que se le supone un papel esencial en la estabilización de los microtúbulos durante la morfogénesis y migración neuronal (Gleeson et al., 1999; Horesh et al., 1999). También en el desarrollo neuronal, tanto los procesos de adquisición de polaridad como los de migración celular están altamente regulados por la actividad de los complejos de polaridad celular. Por ejemplo, los procesos de migración celular tanto en la neurogénesis embrionaria como en cerebro adulto dependen de la interrelación de varios elementos, entre los cuales se ha identificado al gen *Par6* (componente del complejo de polaridad apical Par) como uno de los componentes esenciales reguladores del proceso (Solecki, Govek, & Hatten, 2006). Nuestros resultados demuestran que, al menos en cerebro adulto, CRB2 se encuentra en algunas zonas neurogénicas, identificadas con el marcaje para Doblecortina (DCX). Debido a la relación que se ha demostrado entre las proteínas del complejo Par y las del complejo Crb, cabe la posibilidad de que CRB2, de la misma forma que se ha demostrado para Par6, pueda tener un papel importante en la neurogénesis adulta. Del mismo modo, los resultados de la presencia de CRB2 en zonas neurogénicas por excelencia en cerebro adulto como son el hipocampo y la zona subventricular (Yamaguchi et al., 2016) evidenciarían una posible relación entre CRB2 y la neurogénesis adulta, aunque sería necesario experimentos concretos que ayuden a esclarecer esta hipótesis.

Al analizar el marcaje obtenido por medio de técnicas de inmunofluorescencia para la proteína CRB2 en cerebro de ratón, hemos comprobado que se localiza de forma punteada tanto en el soma neuronal como en las proyecciones celulares que emiten. La proteína CRB2,

que es transmembranaria, tiene como destino final la membrana plasmática, pero al igual que otras proteínas de membrana, no se sitúa en ella de forma continuada, sino que se traslada en la célula mediante un constante trasiego vesicular (Zhou, Wu, & Lin, 2011). Por ello, consideramos que el marcaje punteado citoplasmático que hemos encontrado en nuestros estudios, muy probablemente se correspondería con este marcaje vesicular y por ello realizamos experimentos de doble marcaje con distintas proteínas involucradas en las vías de transporte por exocitosis y endocitosis. El transporte vesicular es un elemento esencial para el proceso de polaridad celular y otras características importantes de las células (Horton & Ehlers, 2003; Peranen, 2011). Los experimentos de colocalización de CRB2 con las proteínas Rab y VPS35 nos han permitido analizar con más detalle la relación entre esta proteína y el tráfico vesicular. Las Rab-GTPasas son proteínas que regulan el tráfico vesicular desde su formación hasta la membrana plasmática, es decir vía exocítica y presentan una alta expresión en neuronas, sugiriendo un importante papel en la actividad neuronal (Dunst et al., 2015; Hokanson & Bretscher, 2012; Parker, Cox, & Wilson, 2018; Stenmark, 2009). Rab8 regula el tráfico apical *de novo* en células epiteliales y en neuronas regula la extensión de las neuritas por medio del tráfico anterógrado (Parker et al., 2018; Roman-Fernandez & Bryant, 2016), aunque resulta precipitado establecer una funcionalidad concreta de estas dos proteínas, ya que Rab8A en neuronas y Rab8B en células epiteliales, aunque están muy relacionadas entre sí, están codificadas por genes distintos (Armstrong et al., 1996). Realizan un importante papel en el transporte proteico a la membrana así como en el establecimiento del citoesqueleto en la adquisición de la morfología celular (Hokanson & Bretscher, 2012; Peranen, 2011), siendo importantes en el desarrollo de neuritas en células PC12 durante la maduración neuronal (Kobayashi, Etoh, Ohbayashi, & Fukuda, 2014). Alteraciones en las rutas vesiculares mediadas por Rab se han relacionado con varias patologías como inmunodeficiencias, desórdenes neurológicos o cáncer (Stenmark, 2009). Se sabía que las proteínas Rab regulan directamente el transporte de las proteínas CRB hacia la membrana plasmática (Roman-Fernandez & Bryant, 2016; Stenmark, 2009), por lo que podrían controlar también los niveles de CRB2 y el resto de proteínas del complejo en el dominio apical en neuronas. La colocalización parcial observada en nuestros resultados entre Rab8A y CRB2 evidencia por tanto la existencia de vesículas de CRB2 que tras su síntesis y/o su reciclaje, viajan a la membrana mediante transporte exocítico junto con Rab8A.

Por otro lado, el retrómero es un complejo proteico involucrado en la ruta de endocitosis, transporte retrógrado o de reciclaje de vesículas en algunos tipos celulares

(Seaman, 2012; Seaman & Williams, 2002; Temkin et al., 2011). La proteína VPS35 es uno de los principales componentes del retrómero y que se encarga por tanto de clasificar el contenido del sistema endocítico (como por ejemplo las proteínas transmembranarias) y recuperar parte de estas proteínas de los endosomas a la red trans-Golgi (Harrison et al., 2014; Hierro et al., 2007) y al igual que sucedía con las proteínas Rab, se ha visto que alteraciones en la ruta retromérica mediada por VPS35 están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Dhungel et al., 2015; Miura et al., 2014; Tsika et al., 2014). En el establecimiento de la polaridad de las células epiteliales, el transporte retrógrado que experimentan las proteínas CRB es esencial para constituir el dominio apical celular, siendo esta vía la encargada del recambio de la proteína transmembranaria por medio de VPS35, que se sabe interactúa directamente con CRB regulando sus niveles y localización, en definitiva, controlando el complejo apical de polaridad (Pocha & Wassmer, 2011; Pocha, Wassmer, Niehage, Hoflack, & Knust, 2011; Roman-Fernandez & Bryant, 2016; Zhou et al., 2011). Nuestros resultados de colocalización entre las proteínas CRB2 y VPS35 han servido para caracterizar la vía vesicular retromérica y de renovación de la proteína CRB2 en las neuronas y la colocalización parcial observada entre ambas proteínas demuestra que hay vesículas con componentes del retrómero en las que CRB2 podría ser reciclada.

Por todo ello, los resultados del estudio vesicular, tanto para muestras control como para mutantes de CRB1, demuestran por primera vez que en cerebro de ratón adulto, CRB2 está presente en vesículas de las dos principales vías de transporte: endocítica y exocítica. De modo que en neuronas, CRB2 sería transportada desde su síntesis hacia su destino final, la membrana plasmática, por la vía exocítica identificada por Rab8A y por la vía retromérica, identificada por VPS35, encargada de su recambio. Ambas vías de transporte vesicular están compuestas por numerosas proteínas esenciales para el correcto funcionamiento de las mismas, entre las que se encuentran VPS35 y Rab8A (Seabra, Mules, & Hume, 2002; Seaman, 2012), y además en todos estos experimentos hemos encontrado marcaje para CRB2 independiente de VPS35 y/o Rab8A, por lo que sería necesario analizar otras proteínas de estas vías de transporte para poder desentrañar el mecanismo completo de las rutas de transporte vesicular de la proteína CRB2 en neuronas.

El análisis de otros componentes vesiculares como proteínas sinápticas, tales como V-Glut1, un transportador esencial en la transmisión sináptica (Herman, Ackermann, Trimbuch, & Rosenmund, 2014; Santos, Foss, Park, & Voglmaier, 2014) que regula el transporte vesicular del glutamato (Wilson et al., 2005) y que se localiza de forma específica en vesículas

glutamatérgicas, y nuestros resultados de colocalización con CRB2, demuestran que al menos en el soma neuronal, también existe colocalización entre estas proteínas. Estos resultados manifiestan por tanto la presencia de CRB2 en las mismas vesículas que V-Glut1 en la ruta exocítica. Los estudios de colocalización realizados con proteínas sinápticas nos han permitido analizar la relación de la proteína CRB2 con los distintos elementos proteicos de los terminales tanto pre como postsinápticos. Sinapsina y SYP, dos de las principales proteínas localizadas en vesículas presinápticas (Fletcher, Cameron, De Camilli, & Banker, 1991), están implicadas en distintos procesos como sinaptogénesis, plasticidad neuronal, modulación sináptica o liberación de neurotransmisores (Barbieri et al., 2018; Gordon & Cousin, 2014; Mirza & Zahid, 2018). PSD95 es miembro de la familia de proteínas MAGUK, y el principal componente de andamiaje en el elemento postsináptico donde ejerce un papel clave en la respuesta sináptica controlando el anclaje de receptores a las espinas dendríticas, la localización de canales iónicos, así como la interacción entre neurotransmisores y receptores (Coley & Gao, 2018; Savioz, Leuba, & Vallet, 2014). El análisis de la colocalización de CRB2 con estas proteínas puso de manifiesto que CRB2 solo colocaliza con las proteínas presinápticas, no así con PSD95 y solo lo hace en las proyecciones, en los terminales sinápticos, haciéndolo muy raramente en el soma. Estos resultados sugieren que el marcaje vesicular observado para CRB2 en el soma de la célula tenga como destino final el terminal presináptico, aunque el transporte hasta estos terminales no se realice en el mismo pool vesicular que lo hacen sinapsina y/o SYP. Sin embargo, los análisis de colocalización entre CRB2 y PSD95 en los cultivos primarios de neuronas mostraron discrepancias con los obtenidos en el cerebro adulto, ya que en cultivos neuronales sí encontramos colocalización parcial entre estas dos proteínas. Esta discordancia podría deberse a la propia limitación metodológica de las técnicas *in vitro* y la reproducibilidad de los datos *in vivo*, o a que en estadios adultos se produzca una maduración o remodelación sináptica completamente diferente a la observada en el desarrollo de los cultivos neuronales primarios.

La gran variedad morfológica, así como la gran complejidad de sus conexiones sinápticas, hace que las neuronas sean un claro ejemplo de polaridad extrema que puede adquirir una célula (Solecki, Govek, Tomoda, & Hatten, 2006). En células epiteliales, la proteína CRB2 forma parte del complejo apical gracias a la interacción con otras proteínas que conforman el complejo de polaridad Crb (Assemat et al., 2008; Bazellieres et al., 2009; Bulgakova & Knust, 2009; Martin-Belmonte, 2012) entre las que se encuentran Pals1 o MPP4. Pals1 es miembro de la familia de proteínas MAGUK o guanilato quinasas asociadas a membrana (Funke et al., 2005), que sirve de adaptador a la proteína CRB y a distintas proteínas

de unión para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular en células epiteliales (Roh et al., 2002; Sen, Sun, & Krahn, 2015) interactuando con el dominio citoplasmático de CRB1 (Roh et al., 2002) y con CRB2 (Kim et al., 2010). Se ha visto que Pals1 interactúa con Par3 y desempeña un papel esencial regulando las células de Schwann en el proceso de mielinización de axones (Zollinger, Chang, Baalman, Kim, & Rasband, 2015), que controla la localización de los miembros CRB en las células de Müller de la retina (van Rossum et al., 2006) o cómo la pérdida de Pals1 produce fallos en la polarización y establecimiento de uniones estrechas (Straight et al., 2004). Nuestros resultados de colocalización entre CRB2 y Pals1 demuestran que coinciden de manera parcial, de forma que al parecer, CRB2 también forma parte de este complejo de polaridad apical en cerebro de ratón adulto, aunque la ausencia de colocalización completa podría evidenciar la presencia de mecanismos de transporte distintos para ambas proteínas y su interacción de forma independiente con otras, como se ha descrito en la bibliografía en otros sistemas (Brinkmann et al., 2016; Kamberov et al., 2000; Wang, Chen, & Margolis, 2007). Además, esta falta de colocalización total entre las dos proteínas podría explicarse por el hecho de que Pals1 no es una proteína transmembranaria, por lo que su transporte hacia y desde la membrana plasmática podría ser independiente del transporte vesicular que debe experimentar la proteína CRB2. Por otro lado, algunos trabajos realizados con embriones han mostrado que CRB2 interactúa con Pals1 en el correcto desarrollo cortical (Kim et al., 2010), por lo que nuestros resultados refuerzan estos datos apoyando la idea de que CRB2 podría desempeñar un importante papel en el establecimiento de la polaridad neuronal y la interacción correcta con otras proteínas también en cerebro adulto.

Por último, estudios de microscopía confocal demuestran que las neuronas que presentan CRB2 también expresan calbindina, una proteína ligante de calcio que está presente en neuronas y que es especialmente abundante en el hipotálamo lateral (Baimbridge et al., 1982; Meszar et al., 2012). Diversos estudios han demostrado un aumento en los niveles de calcio durante la señalización y comunicación neuronal en neuronas calbindina positivas, sugiriendo un importante papel de esta molécula para tales procesos (Bastianelli, 2003; Kojetin et al., 2006). Sin embargo, no todas las neuronas que son positivas para calbindina lo son para CRB2, demostrando la presencia de una subpoblación de neuronas calbindina positivas del hipotálamo lateral que expresan CRB2. Además de con calbindina, CRB2 colocaliza parcialmente con Pals1 y VGlut1 en el soma neuronal y en vesículas presinápticas en los terminales presinápticos. Estas observaciones junto con lo descrito en trabajos previos

sugieren que CRB2 podría desempeñar una importante función en procesos de señalización y comunicación neuronal en cerebro de ratón adulto.

1.1.2. CRB2 en el cerebro del ratón mutante CRB1^{rd8}: estudio comparativo

El ratón mutante CRB1^{rd8} presenta alteraciones en la proteína CRB1, que se manifiestan con alteraciones retinianas caracterizadas por la desorganización y fragmentación de la membrana limitante externa en la zona nasal inferior y la formación de pseudorosetas de fotorreceptores que se hacen de mayor tamaño a medida que avanza la neurodegeneración (Aleman et al., 2011; Mehalow et al., 2003; Pang et al., 2005). Nuestros resultados del análisis de la expresión de la proteína CRB2 por inmunofluorescencia y técnicas de Western blot en el cerebro de este modelo demuestran que CRB2 presenta la misma distribución que en cerebro del animal control, salvo en el caso de la corteza cerebral, donde hemos encontrado un incremento significativo de su expresión.

Las proteínas CRB1 y CRB2 presentan una estructura molecular muy parecida y se sabe que al menos en retina, ambas se expresan en las mismas áreas e incluso son redundantes en algunos tipos celulares, como por ejemplo, en las células de Müller, donde su presencia coincide en la membrana limitante externa, en las zonas de unión con los fotorreceptores. Algunos autores han postulado, aunque no se haya demostrado, que esta redundancia en algunos tipos celulares se explicaría porque estas dos proteínas podrían estar realizando las mismas funciones, es decir, que habría también una redundancia funcional (van Rossum et al., 2006). El incremento en la expresión de CRB2 que hemos observado en corteza del ratón mutante CRB1^{rd8} también apoyaría esta hipótesis, y podría deberse a un efecto compensatorio como consecuencia de la pérdida funcional de la proteína CRB1, de la misma forma que se postula podría suceder en las células de Müller (Pellissier et al., 2013). Del mismo modo, este efecto compensatorio explicaría que no se haya observado aumento o alteración en los niveles de proteínas relacionadas con el complejo Crb, como por ejemplo Par3, β -Catenina u Ocludina. Estudios previos de nuestro laboratorio sobre el efecto de la proteína truncada CRB1 en este modelo mutante han demostrado que las alteraciones en la retina como consecuencia en la modificación de CRB1 producen un aumento de la expresión de GFAP y otros indicadores de reacción glial ya desde estadios postnatales tempranos (Herranz-Martin, 2013; Valle, 2014). Los experimentos que se han realizado para comprobar si también en cerebro del modelo mutante CRB1^{rd8} se produce un efecto de gliosis debido a la disfunción de esta proteína demuestran que en ningún caso existe tal mecanismo, desvinculando la posibilidad de producirse daño en el cerebro como consecuencia de defectos en la proteína CRB1 y aumento

de los niveles de CRB2. Estos datos concuerdan con estudios anteriores que han mostrado cómo los cambios y defectos en CRB1 conducen a retinopatías, pero en ningún caso se ha relacionado con alteraciones cerebrales (A. I. den Hollander et al., 2001; Anneke I. den Hollander et al., 1999; Hanein et al., 2004; Lotery, Jacobson, et al., 2001; Lotery, Malik, et al., 2001) y también apoyarían nuestra hipótesis del efecto compensatorio funcional de CRB2 en cerebro. Por otro lado, se ha descrito que la pérdida de CRB2 durante el desarrollo embrionario produce cambios importantes en la correcta formación de la corteza del ratón, caracterizados por una disminución en la expresión de las proteínas del complejo de polaridad Crb, Pals1 y CRB3 y proteínas de unión celular como β -Catenina (Dudok et al., 2016). Además, algunos estudios han evidenciado que la proteína β -Catenina interactúa con proteínas de los complejos de polaridad siendo esencial durante la gastrulación (Haegel et al., 1995; Martin-Belmonte, 2012; Pellissier et al., 2013). Nuestros resultados han mostrado que en cerebro de ratón adulto se produce un ligero aumento en los niveles de expresión de la proteína β -Catenina, aunque de forma no significativa, principalmente en corteza, que es la zona donde aumentan los niveles de CRB2 en el modelo con defectos en CRB1. Conociendo la relación descrita en la bibliografía entre defectos en CRB2 y los niveles de β -Catenina (Dudok et al., 2016), nuestros resultados reforzarían esta hipótesis de la interacción entre CRB2 y la regulación de la expresión de proteínas de las uniones adherentes.

Por lo tanto, nuestros resultados parecen confirmar por primera vez la existencia de mecanismos compensatorios en corteza del ratón mutante CRB1^{rd8}, al aumentar los niveles de CRB2 como consecuencia de la mutación en la proteína CRB1. Del mismo modo, este mecanismo compensatorio podría explicar la ausencia de cambios en los niveles de expresión del resto de proteínas analizadas, mostrando con ello la carencia de alteraciones importantes en el cerebro del ratón CRB1^{rd8}.

2._ CRB2 en neuronas: cultivos primarios neuronales

En vista de nuestros resultados, considerando la importancia de la polaridad celular en el desarrollo neuronal y cerebral (Solecki, Govek, Tomoda, et al., 2006) y del papel fundamental que desempeña la proteína CRB2 en el proceso de gastrulación (Boroviak & Rashbass, 2010), quisimos estudiar el papel de CRB2 en la maduración neuronal. Para ello caracterizamos la expresión gradual de la proteína CRB2 en cultivos neuronales, junto con la de otros miembros necesarios para la adquisición de polaridad y funcionalidad neural; así como los efectos del

silenciamiento de esta proteína y en neuronas del ratón mutante CRB1^{rd8}, con déficits en la expresión de CRB1.

2.1._ Formación de los complejos de polaridad

Los estudios mediante Western blot han permitido determinar el patrón de expresión de diversas proteínas de los complejos de polaridad apical Crb y Par durante el desarrollo y maduración de las neuronas en cultivo. En el establecimiento del dominio apical, además de las proteínas que conforman el complejo de polaridad Crb, se encuentran las proteínas Par3, Par6 y aPKC que interactúan entre ellas y componen el complejo de polaridad apical Par (Assemat et al., 2008; K. Kemphues, 2000; K. J. Kemphues et al., 1988; Martin-Belmonte, 2012; Watts et al., 1996). Además, el complejo Par se ha descrito como un regulador esencial en el establecimiento de la polaridad axo-dendrítica de las neuronas (Insolera, Chen, & Shi, 2011; Shi et al., 2003) y maduración de las uniones ocluyentes (Horikoshi et al., 2009). Entre sus funciones se ha descrito que Par6 pone en contacto diversas proteínas como Pals1 o CRB3 con quinasas, para el establecimiento de la polaridad celular (Assemat et al., 2008; Hurd et al., 2003). Par3 puede interactuar con otras proteínas del complejo como PatJ (Adachi et al., 2009) y es esencial en el establecimiento de las uniones celulares durante el desarrollo del neuroepitelio embrionario (Takekuni et al., 2003), donde se ha comprobado cómo las distintas proteínas de unión juegan un papel fundamental en el correcto desarrollo del neuroepitelio (Chenn, Zhang, Chang, & McConnell, 1998). Nuestros resultados en relación con la temporalidad de su expresión demuestran que ya está presente en las neuronas desde el comienzo del cultivo, adquiriendo una distribución por el soma neuronal y proyecciones en los cultivos más tardíos. Del mismo modo, los resultados de inmunofluorescencia en los que se demuestra la existencia de colocalización parcial entre CRB2 y Par6, pondrían de manifiesto la interacción entre ambas proteínas como se ha demostrado que sucede con otras proteínas CRB durante el establecimiento de la polaridad celular.

En cerebro, las proteínas MAGUK desempeñan un papel central en el establecimiento de la sinapsis, su transmisión y plasticidad (Funke et al., 2005). MPP4, al igual que Pals1, es miembro de la familia de proteínas MAGUK y su expresión génica fue identificada por primera vez en retina (Stohr & Weber, 2001), siendo el principal órgano donde está presente, aunque también se ha localizado en otros, entre ellos el cerebro (M. Li, Zhang, & Barnstable, 2003). En la retina, la proteína MPP4 ha sido identificada en vesículas presinápticas de la membrana plexiforme externa y en la región subapical de la membrana limitante externa, zona formada por uniones tanto adherentes como ocluyentes entre los fotorreceptores y las células de

Müller (Aartsen et al., 2006; Herranz-Martin et al., 2012; M. Li et al., 2003; Stohr & Weber, 2001). En la región subapical de la membrana limitante externa se ha identificado que la proteína CRB1 interactúa con Pals1 (Meuleman et al., 2004; Roh et al., 2002) y del mismo modo, se ha visto que las tres proteínas, MPP4, Pals1 y CRB1 colocalizan, por lo que parecen realizar un papel esencial conjunto en la correcta polarización de los fotorreceptores (Kantardzhieva et al., 2005). Además, se ha visto que MPP4 colocaliza con distintas proteínas presinápticas en conos y bastones, donde tendría un papel esencial en la organización del andamiaje sináptico, así como en la modulación de la homeostasis sináptica del calcio y la transmisión sináptica (Aartsen et al., 2006; J. Yang et al., 2007). Nuestros resultados sobre la temporalidad de la expresión de las proteínas MAGUK, Pals1 y MPP4, componentes del complejo Crb en cultivos neuronales demuestran que se expresan casi desde los primeros estadios del cultivo neuronal y de las proteínas CRB, componentes transmembranarios del complejo Crb, es la isoforma CRB3 la que se detecta casi desde el inicio, habiendo comprobado que CRB2 es la que más tarde se expresa en este patrón de expresión de los componentes este complejo, hecho que coincide con análisis previos de polarización en el epitelio pigmentario realizados por nuestro laboratorio (A. Paniagua et al., 2018 Under Review).

Estudios previos sobre el análisis de CRB2 en el desarrollo de precursores neurales a partir de células madre embrionarias habían analizado la expresión temporal de varias proteínas del complejo de polaridad apical en células pluripotentes de ratón, presentando a CRB2 como un regulador del desarrollo de estos progenitores neurales, donde se expresa en la zona apical de las rosetas neurales del neuroepitelio (Boroviak & Rashbass, 2010). Nuestros resultados en este sentido resultan novedosos al ser los primeros que analizan y demuestran la expresión temporal de las distintas proteínas que participan en el establecimiento de los complejos de polaridad celular apical en cultivos primarios de neuronas, aportando información detallada de la temporalidad en la expresión e interacción de estas proteínas.

2.2._ Relación temporal de la expresión de proteínas neuronales, vesiculares y de uniones celulares

El análisis temporal de la expresión de distintas proteínas neuronales, vesiculares y de uniones celulares nos ha permitido caracterizar el modelo *in vitro* de desarrollo neuronal y poderlo relacionar con los datos de expresión de las distintas proteínas de los complejos de polaridad, a fin de poder entender con más detalle la relación de cada una de estas proteínas con la diferenciación neuronal.

La expresión de proteínas encargadas de la diferenciación neuronal como DCX, Nestina o NeuroD1, presentaron un desfase temporal en su expresión. Estudios previos han identificado la proteína Doblecortina (DCX) como esencial en el proceso inicial de desarrollo y diferenciación neuronal (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999) y hemos podido comprobar que es la primera en expresarse en los cultivos realizados para este trabajo, coincidiendo con la expresión de varios miembros del complejo Par. Por su parte, la expresión del marcador de progenitores neurales, Nestina (Lendahl, Zimmerman, & McKay, 1990), que ha sido identificado como un mediador de la reorganización del citoesqueleto celular (Hendrickson, Rao, Demerdash, & Kalil, 2011), coincide con la expresión de las proteínas CRB en los cultivos neuronales. Por otro lado, el factor de transcripción NeuroD1 que presenta un papel esencial en la neurogénesis (Guillemot, 2007), regulando la supervivencia y desarrollo neuronal (Z. Gao et al., 2009) y que en el bulbo olfativo regula el final de la diferenciación neuronal (Boutin et al., 2010), coincide con la expresión temporal de CRB2 en estos cultivos. Por todo ello, y en función a los resultados obtenidos, podemos concluir que Par3 es la proteína de los complejos de polaridad analizados que comienza su expresión coincidiendo con unos estadios neuronales indiferenciados, al coincidir con la expresión de DCX. Seguidamente, empiezan a expresarse el resto de las proteínas del complejo de polaridad Crb, como Pals1, MPP4 y CRB3, que probablemente intervienen en el comienzo de la maduración y diferenciación neuronales, que identificamos por el aumento de Nestina y de proteínas vesiculares, Rab8A y VPS35, responsables de la movilización y reciclaje de las proteínas CRB.

Las uniones adherentes han sido identificadas como elementos indispensables tanto en la formación del neuroepitelio, como en la diferenciación del mismo a neuronas (Chenn et al., 1998; Imai et al., 2006; Lu, Roegiers, Jan, & Jan, 2001; Marthiens & ffrench-Constant, 2009; Takeichi, 2014). Por otro lado, en el desarrollo epitelial embrionario, el establecimiento de las uniones adherentes precede a las ocluyentes, identificándose en el neuroepitelio ambos tipos de uniones (Aaku-Saraste, Hellwig, & Huttner, 1996). Se ha identificado que en patologías neurodegenerativas, se observa una disminución de la proteína de uniones ocluyentes Ocludina, al afectar al correcto desarrollo de la barrera hematoencefálica, sugiriendo un papel esencial para Ocludina en el desarrollo y diferenciación del SNC (Romanitan, Popescu, Winblad, Bajenaru, & Bogdanovic, 2007; Tai, Holloway, Male, Loughlin, & Romero, 2010; Watters et al., 2015). Con respecto a la expresión temporal de las proteínas de uniones celulares, hemos observado que comienzan a hacerse evidentes desde los primeros estadios de diferenciación neuronal. En el desarrollo el SNC, el establecimiento de uniones estrechas es esencial para la

diferenciación neuronal (Watters et al., 2015), al igual que las uniones adherentes, cuyo papel en la diferenciación neuronal, remodelación y plasticidad sináptica es fundamental (Hirabayashi et al., 2004; Maguschak & Ressler, 2012; Zechner et al., 2003). Así, en nuestros experimentos hemos comprobado cómo la expresión de las proteínas Par analizadas y las del complejo Crb, como Pals1 y MPP4, podrían interactuar con las proteínas de uniones ocluyentes, Ocludina y Claudina 1, al coincidir en la temporalidad de su expresión, como se ha demostrado en estudios previos, donde se ha visto que CRB2 controla el mantenimiento de uniones ocluyentes del epitelio pigmentario (A. Paniagua et al., 2018 Under Review), o el complejo Par y la proteína Pals1 en la maduración y establecimiento de las uniones ocluyentes (Horikoshi et al., 2009; Straight et al., 2004). Por otro lado, la proteína MPP4 presenta un papel esencial en el correcto establecimiento del andamiaje sináptico de la retina (Aartsen et al., 2006; J. Yang et al., 2007) por lo que las proteínas Par analizadas, así como Pals1 y MPP4, podrían interactuar con las proteínas sinápticas SYP, Sinapsina o PSD95, controlando con ello la diferenciación neuronal y la localización y distribución de vesículas sinápticas.

Las cadherinas son un conjunto de proteínas adherentes entre las que se encuentra β -catenina, esencial en el SNC, tanto en el desarrollo como en adultos, donde ha sido implicada en la formación de la sinapsis, encargada de la localización de vesículas sinápticas en el elemento presináptico, de mecanismos de plasticidad sináptica, así como en la interacción con factores secretables como Wnt y el establecimiento de la ruta canónica Wnt/ β -catenina, esencial durante el desarrollo del SNC y en cerebro adulto (Bamji et al., 2003; Haegel et al., 1995; Hirabayashi et al., 2004; Maguschak & Ressler, 2012; Rosso & Inestrosa, 2013; Rudloff & Kemler, 2012). Nuestros resultados sobre la expresión de la proteína de uniones adherentes β -catenina coincide en el tiempo con la de las proteínas CRB, corroborando de nuevo los estudios previos en los que se había demostrado una relación directa entre los niveles de CRB2 y de otras proteínas del complejo con los niveles de β -catenina (Dudok et al., 2016). Por tanto, nuestros resultados podrían ayudar a evidenciar una posible relación de las CRB sobre la diferenciación neuronal por medio del control de la expresión de la proteína β -catenina. De este modo, el aumento en los niveles de expresión de las proteínas CRB iría acompañado del proceso de diferenciación neuronal y de mecanismos celulares que aseguren la correcta distribución proteica en la célula, hecho que corroboraría la coincidencia en el tiempo de expresión entre las proteínas vesiculares y las CRB.

CRB2 es la última proteína del complejo Crb que se expresa durante este desarrollo neuronal, coincidiendo con la detección de NeuroD1, indicando el fin de la diferenciación

neuronal y con el momento de mayor expresión de la proteína β -Catenina. Por ello, y en comparación con lo descrito en la bibliografía, en la que se muestra el papel esencial de CRB2 en la viabilidad neuronal (Dudok et al., 2016); del complejo Par en la maduración neuronal (Insolera et al., 2011; Shi et al., 2003); las proteínas MAGUK Pals1 y MPP4 en el establecimiento del andamiaje sináptico en fotorreceptores (Kantardzhieva et al., 2005); al establecimiento de las uniones celulares en la diferenciación neuronal (Watters et al., 2015), y a los resultados obtenidos, que ponen en relación de manera novedosa la expresión temporal de proteínas neuronales con las proteínas de los complejos de polaridad apical, podemos concluir que la proteína CRB2 podría presentar un rol fundamental en el control del resto de proteínas durante el proceso de diferenciación neuronal, siendo su expresión y localización lo que determinan las fases finales de la diferenciación neuronal. Es de destacar que pese a no haber sido analizado en el presente trabajo, el establecimiento de la polaridad celular realizada por los complejos de polaridad Crb y Par en neuronas, al igual que sucede en células epiteliales, también depende de las funciones del tercer complejo de polaridad, complejo Scrib, encargado de la diferenciación del dominio basal. El complejo de polaridad basal Scrib realizaría un papel esencial en el proceso de diferenciación neuronal así como en el establecimiento del andamiaje necesario para los procesos sinápticos (Horton & Ehlers, 2003; Richier et al., 2010; Sun, Aiga, Yoshida, Humbert, & Bamji, 2009).

En los cultivos de células obtenidas de hipocampo control se obtuvo un patrón de expresión muy parecido de todas las proteínas analizadas, salvo en el caso de CRB2, donde se detectó un adelanto en el momento de su expresión. Consideramos que este desfase en el periodo de su expresión podría deberse a que en el cerebro, hipocampo y corteza tienen también estadios de maduración diferentes, funciones diferentes y la proteína CRB2 también podría estar realizando roles diferentes en estas dos áreas del cerebro. Del mismo modo, de las isoformas descritas para la proteína Par3, solo ha sido posible la detección de la isoforma de peso molecular intermedio. Se sabe que puede haber una expresión selectiva de tejido de las isoformas de Par3 (Lin et al., 2000) hecho que justificaría las diferencias en temporalización de la expresión para Par3 y CRB2 observadas en neuronas de hipocampo, aunque será necesario la realización de otros experimentos para comprobar si estas diferencias son debidas a las diferencias de áreas cerebrales o a que realizan funciones diferentes en estas dos áreas.

2.3._ Expresión de las proteínas de los complejos de polaridad en el ratón mutante CRB1^{rd8}

Por medio del análisis de la expresión temporal de las distintas proteínas de los complejos de polaridad, hemos podido comprobar cómo las alteraciones en la proteína CRB1 que presenta el ratón mutante CRB1^{rd8}, ocasionan cierto retraso temporal en la expresión de varias de las proteínas analizadas, como Claudina1, Rab8A o Pals1, lo que podría resultar en importantes alteraciones en el desarrollo neuronal que implicaran alteraciones cerebrales. Sin embargo, como se ha indicado previamente, en ningún caso se ha podido relacionar tal mutación con alteraciones en el cerebro (A. I. den Hollander et al., 2001; Anneke I. den Hollander et al., 1999; Hanein et al., 2004; Lotery, Jacobson, et al., 2001), hecho que podría deberse al ligero adelanto observado en la expresión de CRB2 en los cultivos de neuronas obtenidas del mutante CRB1^{rd8} comparándolo con los cultivos control. Así, es posible que la mutación en *Crb1* pueda provocar un adelanto en la expresión de CRB2 a modo de mecanismo de compensación, con el fin de mantener bajo control la expresión del resto de componentes del complejo Crb y mantener una expresión normal o al menos suficiente del resto de proteínas analizadas, al no observarse cambios en la temporalización de su expresión. Sin embargo, es necesario la realización de otra serie de experimentos específicos para profundizar en este posible mecanismo compensatorio.

2.4._ Consecuencias del silenciamiento *in vitro* de la proteína CRB2

Caracterizado el proceso de diferenciación y la temporalización de la expresión de las distintas proteínas del complejo de polaridad, nos propusimos determinar las posibles consecuencias del silenciamiento de la proteína CRB2 durante el desarrollo de las neuronas en cultivo. Se conoce que la proteína CRB2 es esencial para el proceso de gastrulación y modificaciones en su expresión conlleva a alteraciones tanto del desarrollo embrionario, como cambios en el reordenamiento del neuroepitelio, en la neurogénesis o alteraciones congénitas neurológicas, como alteraciones renales en la etapa adulta (Boroviak & Rashbass, 2010; Ebarasi et al., 2015; Slavotinek et al., 2015; Z. Xiao et al., 2011).

Los resultados obtenidos tras el silenciamiento *in vitro* de la proteína CRB2 por medio de partículas lentivirales han demostrado que este defecto conlleva a cambios morfológicos y moleculares evidentes en las neuronas. Así, la disminución significativa de la expresión de CRB2 comporta una disminución también significativa de la proteína Pals1, por lo que la pérdida de CRB2 en neuronas produciría cambios importantes en el correcto establecimiento y ensamblaje del complejo de polaridad apical, ya que, como se ha descrito en trabajos previos,

la disminución en la expresión de la proteína Pals1 provoca alteraciones en la polaridad (Straight et al., 2004). Este mismo hecho se corroboraría al observar una tendencia a disminuir la cantidad del resto de proteínas del complejo de polaridad Crb analizadas, como MPP4 y CRB3. Se ha descrito la presencia del gen *Mpp4* en cerebro de ratón (M. Li et al., 2003), pero hasta la fecha se desconocía la presencia, patrón de expresión y localización de la proteína. En la retina, principal órgano donde se ha estudiado e investigado la expresión del gen *Mpp4*, se ha comprobado cómo modificaciones en sus niveles proteicos conllevan a importantes alteraciones en la sinapsis y homeostasis de los fotorreceptores (Aartsen et al., 2006; Conte et al., 2002; M. Li et al., 2003; J. Yang et al., 2007). El gen *Crb3* ha sido identificado en varios tejidos, entre ellos el cerebro (Mehalow et al., 2003; Yin, Sheng, Hu, Yang, & Qing, 2014), aunque es en la retina y en tejidos epiteliales donde se han realizado un mayor número de estudios (Charrier, Loie, & Laprise, 2015; Herranz-Martin et al., 2012; Makarova et al., 2003). La proteína CRB3 se encuentra directamente relacionada con tumores; así, la pérdida de CRB3 en cultivo de células epiteliales conlleva a un aumento de la tumorigénesis como consecuencia de la desestabilización de las uniones ocluyentes, del complejo apical, y de la inhibición por contacto (Charrier et al., 2015; Karp et al., 2008). Los resultados obtenidos sobre el silenciamiento *in vitro* de CRB2 pondrían de manifiesto cómo la pérdida de CRB2 y la tendencia a disminuir los niveles del resto de proteínas del complejo Crb analizadas, podría ocasionar alteraciones en todo el complejo de polaridad apical, no sólo en la proteína Pals1, sino también en MPP4 o CRB3, produciendo alteraciones en el complejo apical, así como en el correcto establecimiento y regulación de los procesos sinápticos. Del mismo modo, el silenciamiento de CRB2 también produce una tendencia en la disminución de la expresión de la proteína β -Catenina, principal componente de la ruta canónica Wnt (Wisniewska, 2013). Estos datos coinciden con resultados de algún trabajo previo en los que se observaba una disminución de β -Catenina al disminuir la expresión del gen *Crb2* (Dudok et al., 2016).

El silenciamiento de CRB2 no produjo cambios significativos en los niveles de expresión de las proteínas restantes analizadas lo que sugiere que, pese a alterar los niveles de las proteínas de complejo de polaridad Crb, los niveles del resto de proteínas son al menos aparentemente, normales. Sí se han detectado ciertas alteraciones en los niveles de algunas de las proteínas estudiadas, como por ejemplo, una tendencia en la disminución de los niveles de las proteínas Psd95 y VPS35 y en el aumento de los de SYP y Rab8A. Se sabe que en *Drosophila*, la proteína VPS35 regula los niveles de CRB (Zhou et al., 2011), hecho que podría justificar la disminución observada en los niveles de expresión de esta proteína al silenciar

CRB2; y el aumento en los niveles detectados de Rab8A podría deberse a un mecanismo compensatorio para movilizar mayor cantidad de CRB2 a la membrana, pero serían necesarias pruebas específicas que aclaren la naturaleza de estas tendencias, ya que en ningún caso han resultado ser significativas. En la retina se sabe que MPP4 controla el establecimiento del andamiaje sináptico de los fotorreceptores y que alteraciones en la síntesis de MPP4 provoca cambios en la distribución de CRB1 en la membrana limitante externa (Aartsen et al., 2006), aunque hasta la fecha no se han relacionado mutaciones en MPP4 con una de las principales retinopatías que sí está provocada por mutaciones en *CRB1*, como es la retinosis pigmentaria (Conte et al., 2002). Por ello, la pérdida de sinapsis que ocasiona la retinopatía puede deberse a alteraciones en CRB1 que por su relación con MPP4, bien de manera directa o indirecta pudiera regular los procesos sinápticos. Del mismo modo, es posible que la tendencia en la disminución de los niveles de MPP4 observada tras el silenciamiento de CRB2 en cultivos neuronales pudiera estar relacionado con esta hipótesis. Sin embargo, sería necesario realizar análisis específicos con el fin de poder comprobar la relación entre las proteínas CRB, MPP4 y las vesículas sinápticas.

Los estudios de localización de proteínas realizados mediante análisis de inmunofluorescencia en las células silenciadas para CRB2 pusieron de manifiesto que su defecto produce importantes alteraciones estructurales de los cultivos neuronales. De este modo, hemos podido comprobar cómo al disminuir los niveles de CRB2, se observa una disminución en el tamaño de sus prolongaciones y una tendencia a aumentar su número. Estudios *in vivo* sobre la neurogénesis adulta del giro dentado del hipocampo demostraron que la falta de la proteína β -Catenina produce alteraciones en la arborización dendrítica (X. Gao, Arlotta, Macklis, & Chen, 2007), de modo que los resultados obtenidos sobre el tamaño de las proyecciones neuronales al silenciar CRB2 podrían estar relacionados con los aparentes cambios que se observan en los niveles de β -Catenina, aunque sería necesario diseñar experimentos específicos con el fin de estudiar desde otros puntos de vista una posible relación de CRB2 y la ruta Wnt/ β -catenina. Se sabe que todas las células del SNC sufren una transición epitelio-mesénquima, especialmente en el neuroepitelio donde células epiteliales con ejes de polaridad perfectamente establecidos y comunicadas con células vecinas por uniones celulares, pierden estas propiedades adquiriendo otras nuevas como la capacidad de migración (Thiery et al., 2009). Alteraciones en este proceso, se han relacionados directamente con diversas patologías, como por ejemplo los gliomas donde rutas de señalización como Wnt o Notch se han relacionado el comienzo de la transición epitelio mesénquima (Du, Tang, Huang,

Xiang, & Lv, 2017). Por todo ello, y debido a los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se propone a CRB2 como un papel regulatorio en el establecimiento del resto de proteínas durante la diferenciación neuronal, pudiendo afectar a la ruta de señalización Wnt/ β -catenina, y a los resultados obtenidos tras el silenciamiento de la proteína *in vitro*, hace evidenciar que CRB2 pueda tener un papel importante en la regulación de la polaridad celular y reclutamiento de las proteínas de unión, características esenciales durante el proceso de la transición epitelio-mesénquima.

Es importante destacar que, en ningún caso, tanto para los resultados obtenidos por Western blot como para los obtenidos por inmunofluorescencia, hemos conseguido un silenciamiento total de CRB2. Esto podría explicar el hecho de no observar cambios drásticos en la expresión de otras proteínas relacionadas con CRB2, ya que se sabe que su déficit completo produce efectos dramáticos en viabilidad celular (Boroviak & Rashbass, 2010; Slavotinek et al., 2015; Z. Xiao et al., 2011), reforzando con ello los resultados obtenidos en los análisis de muerte celular por apoptosis, en los que hemos podido comprobar que el silenciamiento de esta proteína transmembranaria conlleva a un aumento de la apoptosis neuronal. Del mismo modo, los cambios observados en el análisis del silenciamiento de la proteína han sido observados solo a 25DIC, sugiriendo que la proteína CRB2 podría presentar una alta tasa de recambio (turnover), aunque esta hipótesis no ha sido analizada o comprobada en estudios previos donde se investiga el transporte y recambio de las proteínas CRB en otros tejidos, sobre todo epiteliales (Roman-Fernandez & Bryant, 2016; Stenmark, 2009).

3._ CRB2 y enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer

El acúmulo patológico de placas de β -amiloide, de ovillos neurofibrilares y la pérdida de neuronas y sinapsis caracterizan la patología de Alzheimer (Zheng & Koo, 2006). La formación de las placas de β -amiloide dependen directamente del procesamiento anómalo del precursor APP por parte de varios complejos de proteasas transmembranarias como β y γ -secretasa (De Strooper & Annaert, 2000; Selkoe, 1989). Hasta la fecha se han identificado al menos sesenta sustratos diferentes que son proteolizados por el complejo γ -secretasa, entre los que se encuentran las proteínas APP (precursora de amiloide) y Notch (Jorissen & De Strooper, 2010). Estudios sobre el papel de la proteína Crb en el patrón de expresión del disco marginal del ala de *Drosophila*, que es dependiente de la señalización de Notch, han demostrado que ésta

regula su señalización, modulando la actividad de γ -secretasa, y sugiriendo un posible papel en el desarrollo de patologías relacionadas con alteraciones de la actividad de γ -secretasa, como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer (Herranz & Milan, 2006; Herranz et al., 2006). Trabajos posteriores han demostrado que CRB2 interactúa con γ -secretasa en cultivos de células epiteliales humanas y líneas celulares neurales, donde se postula a CRB2 como un regulador negativo de la proteasa (Mitsuishi et al., 2010). También se ha comprobado cómo la actividad de γ -secretasa se encuentra alterada en cerebro envejecido pudiendo ser la causa de enfermedad de Alzheimer esporádica y causante asimismo de procesos neurodegenerativos en cerebro humano (Placanica, Zhu, & Li, 2009). En algunos de estos trabajos, de hecho, se ha sugerido que una posible disminución de CRB2, y por tanto una desregulación de γ -secretasa podría ser una potencial causa del desarrollo de la patología (Mitsuishi et al., 2010).

Basándonos en esos trabajos previos, realizamos análisis de la expresión de la proteína CRB2 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y control, con la idea de comprobar la hipótesis de que en enfermos de Alzheimer, los niveles de CRB2 pudieran estar alterados. Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de la proteína en corteza frontal de pacientes diagnosticados con la patología, datos que parecen coincidir con la idea de que los niveles de CRB2 podrían estar relacionados con la enfermedad (Mitsuishi et al., 2010). Además, los datos obtenidos con las tinciones de CRB2 y Rojo Congo demuestran una alteración en la distribución de CRB2 en cerebros de pacientes patológicos, ya que esta proteína aparece concentrada en las placas de β -amiloide de los enfermos de Alzheimer, sugiriendo una relación directa entre estos dos fenómenos, aunque sería necesario realizar experimentos concretos para comprender su formación y la posibilidad de la relación con la función de CRB2. Los experimentos de Western blot en los que se ha comparado la cantidad de CRB2 en muestras de hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer y control, muestran una tendencia en la disminución de los niveles de la proteína en esta área, pero en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas, hecho que podría deberse a un menor número de muestras analizadas, por lo que sería conveniente ampliar el número de las muestras con el fin de poder extraer datos más concluyentes sobre el posible papel de CRB2 en el hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Del mismo modo, en la patología del Alzheimer se han descrito cambios morfológicos neuronales, así como alteraciones en los niveles de calbindina, en neuronas de corteza y del giro dentado del hipocampo (Adachi et al., 2009; Haass & Selkoe, 2007; Palop et al., 2003; Reiss et al., 2018; Serrano-Pozo et al., 2011), áreas cerebrales y poblaciones neuronales donde

mayor presencia hemos observado de la proteína CRB2 murina, reflejando una posible relación entre la proteína y la patología. En consecuencia, nuestros resultados demuestran por primera vez una posible relación entre la proteína CRB2 y la enfermedad de Alzheimer que sugiere un potencial papel neuroprotector de la proteína; ya que según lo descrito en estudios previos y nuestros resultados, la hipótesis de su papel en cerebro es que, en situaciones no patológicas, CRB2 regularía la actividad de γ -secretasa, por lo que, cambios a nivel de su expresión o en la propia proteína ocasionaría el desbloqueo de la actividad de la proteasa, pudiendo desencadenar un aumento en la generación de β -amiloide y por tanto, la progresión de patologías neurodegenerativas.

4._ CRB2 y su posible relación con retinopatías

Las patologías retinianas son un grupo de patologías neurodegenerativas con una alta tasa de prevalencia mundial (Wert, Lin, & Tsang, 2014).

Hasta la fecha, de entre los genes *CRB*, es el gen *CRB1* el que se ha relacionado directamente en humanos con la Amaurosis Congénita de Leber y la retinosis pigmentaria (A. I. den Hollander et al., 2001; Anneke I. den Hollander et al., 1999). No se ha podido demostrar la relación entre CRB2 y ninguna retinopatía, aunque no se ha podido descartar tal hipótesis debido a la alta homología con CRB1, y a la alta tasa de polimorfismos que se ha propuesto para el gen *CRB2* comparado con *CRB1* (A. I. den Hollander et al., 2004; van den Hurk et al., 2005). Hoy en día aún existe entre un 30 y el 50 % de estos casos de retinopatías en los cuales se desconoce su causa genética (A. I. den Hollander, Roepman, Koenekoop, & Cremers, 2008; Hartong, Berson, & Dryja, 2006), quedando por ello un porcentaje muy elevado de genes desconocidos que estarían implicados en el desarrollo de la patología, donde quizás, podrían encontrarse el resto de los genes *CRB*. Del mismo modo, se ha sugerido que debido a la presencia de la proteína CRB2 en otros tejidos, su alteración en humanos podría encontrarse relacionada con patologías con fenotipos clínicos mucho más complejos, como son los síndromes cerebrooculorenales, proponiendo al gen *CRB2* como uno de los responsables del síndrome de Joubert, Dekabam-Arima, Senio-Löken o de COACH (van den Hurk et al., 2005).

Por otro lado, la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), es una enfermedad degenerativa de la retina que afecta principalmente a la región macular, produciendo la pérdida de la visión central en edad adulta, donde se forman agregados heterogéneos tanto en la parte interna como externa de las células del epitelio pigmentario, conocidos como drusas

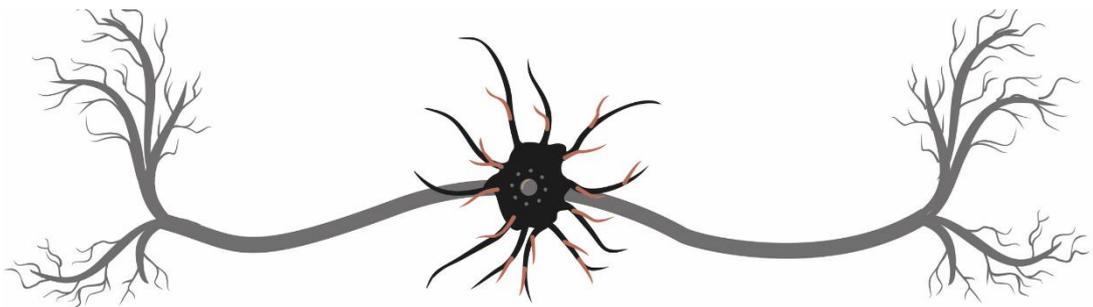
(Ambati & Fowler, 2012; Zweifel et al., 2010). Estudios recientes relacionan la formación de drusas con los depósitos de β -amiloide observados en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer: ambos depósitos se producen en edades avanzadas y sus componentes son muy similares (abundantes en β -amiloide, vitronectina o apolipoproteína-E) (Anderson et al., 2004; Luibl et al., 2006). Al igual que sucede en la enfermedad de Alzheimer, el β -amiloide que se genera en las drusas de la DMAE provienen de la proteólisis de su precursor, la proteína transmembranaria APP por la actividad de γ -secretasa en las propias células del epitelio pigmentario (Johnson et al., 2002) vinculando con ello la DMAE y la patología de Alzheimer (Kaarniranta et al., 2011). El epitelio pigmentario de la retina es una monocapa de células epiteliales altamente polarizadas, esencial para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores y el establecimiento de la barrera hematorretiniana; la pérdida de las células del epitelio pigmentario acaba produciendo la muerte de los fotorreceptores y la pérdida de sinapsis, produciendo la retinopatía (Pavan & Dalpiaz, 2018; Wert et al., 2014). Estudios previos en nuestro laboratorio habían identificado por primera vez la proteína CRB2 en epitelio pigmentario, donde desempeñaría un papel básico en el mantenimiento de la homeostasis de las células del epitelio pigmentario (A. E. Paniagua et al., 2015) y como ya se ha comentado con anterioridad, se postula que la actividad de CRB2 podría ser importante para el control de las funciones de γ -secretasa, tanto en la enfermedad de Alzheimer como posiblemente en la DMAE, controlando la síntesis de β -amiloide.

Por ello, decidimos estudiar el polimorfismo rs1105222 para la proteína CRB2, a fin de comprobar si está involucrado en el desarrollo de las características de la DMAE en grupos poblacionales de Salamanca. La elección del polimorfismo se ha realizado mediante el análisis en bases de datos y de varias secuencias teóricas que afecten a regiones codificantes y de las que haya análisis de las distribuciones poblacionales lo suficientemente fuertes como para poder observar dos posibles poblaciones distintas. Se han tenido en cuenta única y exclusivamente SNP funcionales localizados en estructuras de los ARNm precursores y maduros, lo que se conoce como SNP estructurales del ARN (rsSNP).

Nuestros resultados muestran que el polimorfismo rs1105222 no está asociado al desarrollo del carácter DMAE, por lo que será necesario realizar otros estudios sobre el posible factor de riesgo o protección en variaciones alélicas para el gen *CRB2*. Así, entre los posibles candidatos para análisis futuros podrían encontrarse los polimorfismos rs35454517 o rs1891632, que producen cambios en el extremo 5' UTR, pudiendo afectar a diversas secuencias cis que regulan la traducción, o rs73571404, en el que se propone tanto un cambio

de una C por una T en la posición 593 del mensajero como cambios en la secuencia 5' UTR, aunque el principal problema es la falta de estudios poblacionales en los que se describa la presencia de estas teóricas variaciones genéticas para CRB2.

Conclusiones



1. El anticuerpo dirigido contra la proteína CRB2 diseñado por nuestro grupo de investigación y que ha sido eficaz para la identificación de la proteína en retina, es una herramienta válida para la detección de la proteína tanto por técnicas de inmunofluorescencia como por Western blot en cerebro humano y murino, así como en tejidos de origen epitelial, siendo la única herramienta presente para ello hasta el momento.
2. La proteína CRB2 presenta una distribución generalizada por todo el cerebro de ratón. Es en corteza, hipocampo, cerebelo, núcleo mesencefálico del trigémino, núcleo supraóptico retroquiasmático e hipotálamo donde hay una mayor expresión de la proteína, pudiendo tener un papel esencial en la polarización neuronal e interacción con otras rutas de señalización para el correcto desarrollo de estas áreas.
3. CRB2 se localiza exclusivamente en neuronas, donde está presente tanto en asociación con proteínas que se encuentran tanto en vesículas de secreción o exocitosis como de reciclaje, y se localiza predominantemente en los terminales presinápticos.
4. La generación de una proteína CRB1 truncada en el ratón mutante *Crb1^{rd8}* parece provocar un mecanismo compensatorio en la corteza cerebral por el cual se aumentan los niveles de la proteína CRB2, y que no promueve una respuesta glial o inflamatoria como la que sí sucede en la retina bajo la misma mutación.
5. En neuronas en cultivo, la proteína CRB2 es uno de los últimos elementos de los complejos de polaridad apical en expresarse durante la maduración neuronal, por lo que podría completar la formación de estos complejos, sugiriendo un posible papel regulatorio en las fases finales de la diferenciación neuronal.
6. En neuronas en cultivo de ratón mutante para CRB1, la proteína CRB2 experimenta un adelanto temporal en su expresión, sugiriendo un posible mecanismo compensatorio para mantener la correcta expresión del resto de proteínas de los complejos.
7. CRB2 parece ser esencial para la correcta diferenciación morfológica neuronal *in vitro*, ya que su defecto ocasiona defectos morfológicos y moleculares que conlleva a una disminución del tamaño de las proyecciones neuronales, así como a un aumento de la muerte neuronal, posiblemente ocasionados por la disminución en la expresión del resto de proteínas del complejo de polaridad Crb.
8. La disminución en los niveles corticales de la proteína CRB2 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y su presencia en placas de β -amiloide reafirma la posible relación entre la función de CRB2 y la regulación del complejo gamma-secretasa,

reforzando la idea de un posible papel neuroprotector de esta proteína frente al desarrollo de patologías neurodegenerativas.

9. La sustitución de una alanina por una glicina en la posición 94 de la proteína CRB2 no parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de la DMAE en humanos.

Bibliografía



- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol*, 180(2), 664-679. doi: 10.1006/dbio.1996.0336.
- Aartsen, W. M., Kantardzhieva, A., Klooster, J., van Rossum, A. G., van de Pavert, S. A., Versteeg, I., ... Wijnholds, J. (2006). Mpp4 recruits Psd95 and Veli3 towards the photoreceptor synapse. *Hum Mol Genet*, 15(8), 1291-1302. doi: 10.1093/hmg/ddl047.
- Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., & Furuse, M. (2009). Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol Cell Biol*, 29(9), 2372-2389. doi: 10.1128/MCB.01505-08.
- Adey, N. B., Huang, L., Ormonde, P. A., Baumgard, M. L., Pero, R., Byreddy, D. V., ... Bartel, P. L. (2000). Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res*, 60(1), 35-37.
- Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Aguirre, G. K., Huang, W. C., Mullins, C. L., Roman, A. J., ... Jacobson, S. G. (2011). Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(9), 6898-6910. doi: 10.1167/iovs.11-7701.
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), 683-686.
- Alves, C. H., Sanz, A. S., Park, B., Pellissier, L. P., Tanimoto, N., Beck, S. C., ... Wijnholds, J. (2013). Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet*, 22(1), 35-50. doi: 10.1093/hmg/dds398.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-Gerichtliche Medizin, (Berlin)* 64, 146-148.
- Ambati, J., & Fowler, B. J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, 75(1), 26-39. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.018.
- Anderson, D. H., Talaga, K. C., Rivest, A. J., Barron, E., Hageman, G. S., & Johnson, L. V. (2004). Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 78(2), 243-256.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8(3), 194-205. doi: 10.1038/nrn2056
- Armstrong, J., Thompson, N., Squire, J. H., Smith, J., Hayes, B., & Solari, R. (1996). Identification of a novel member of the Rab8 family from the rat basophilic leukaemia cell line, RBL.2H3. *J Cell Sci*, 109 (Pt 6), 1265-1274.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 614-630. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.029.

- Baimbridge, K. G., Miller, J. J., & Parkes, C. O. (1982). Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res*, *239*(2), 519-525.
- Bamji, S. X., Shimazu, K., Kimes, N., Huelsken, J., Birchmeier, W., Lu, B., & Reichardt, L. F. (2003). Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron*, *40*(4), 719-731.
- Barbieri, R., Contestabile, A., Ciardo, M. G., Forte, N., Marte, A., Baldelli, P., ... Onofri, F. (2018). Synapsin I and Synapsin II regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Oncotarget*, *9*(27), 18760-18774. doi: 10.18632/oncotarget.24655.
- Bastianelli, E. (2003). Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*, *2*(4), 242-262. doi: 10.1080/14734220310022289.
- Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J. P., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *14*, 2149-2169.
- Bhatt, S., Diaz, R., & Trainor, P. A. (2013). Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *5*(2). doi: 10.1101/cshperspect.a008326.
- Bilder, D., & Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*, *403*(6770), 676-680. doi: 10.1038/35001108.
- Bohl, J., Brimer, N., Lyons, C., & Vande Pol, S. B. (2007). The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions. *J Biol Chem*, *282*(13), 9392-9400. doi: 10.1074/jbc.M610002200.
- Boroviak, T., & Rashbass, P. (2010). The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem Cells*, *29*(2), 193-205. doi: 10.1002/stem.567.
- Boutin, C., Hardt, O., de Chevigny, A., Core, N., Goebbels, S., Seidenfaden, R., ... Cremer, H. (2010). NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(3), 1201-1206. doi: 10.1073/pnas.0909015107.
- Brinkmann, B. F., Steinbacher, T., Hartmann, C., Kummer, D., Pajonczyk, D., Mirzapourshafiyi, F., ... Ebnet, K. (2016). VE-cadherin interacts with cell polarity protein Pals1 to regulate vascular lumen formation. *Mol Biol Cell*, *27*(18), 2811-2821. doi: 10.1091/mbc.E16-02-0127.
- Bulgakova, N. A., & Knust, E. (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci*, *122*(Pt 15), 2587-2596. doi: 10.1242/jcs.023648.
- Burstyn-Cohen, T., Stanleigh, J., Sela-Donenfeld, D., & Kalcheim, C. (2004). Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development*, *131*(21), 5327-5339. doi: 10.1242/dev.01424.
- Cayre, M., Canoll, P., & Goldman, J. E. (2009). Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, *88*(1), 41-63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.02.001

- Coley, A. A., & Gao, W. J. (2018). PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *82*, 187-194. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.11.016.
- Conte, I., Lestingi, M., den Hollander, A., Miano, M. G., Alfano, G., Circolo, D., ... Ciccodicola, A. (2002). Characterization of MPP4, a gene highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Gene*, *297*(1-2), 33-38.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., ... Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci*, *21*(1), 1-14. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x.
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, *19*(R1), R12-20. doi: 10.1093/hmg/ddq160.
- Charrier, L. E., Loie, E., & Laprise, P. (2015). Mouse Crumbs3 sustains epithelial tissue morphogenesis in vivo. *Sci Rep*, *5*, 17699. doi: 10.1038/srep17699.
- Chenn, A., Zhang, Y. A., Chang, B. T., & McConnell, S. K. (1998). Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Neurosci*, *11*(4), 183-193. doi: 10.1006/mcne.1998.0680.
- Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., & Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell*, *8*(2), 179-192. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.010.
- Cho, S. H., Kim, J. Y., Simons, D. L., Song, J. Y., Le, J. H., Swindell, E. C., ... Kim, S. (2012). Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*, *21*(12), 2663-2676. doi: 10.1093/hmg/ddc091.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, *38*(1), 9-12.
- De Strooper, B., & Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*, *113* (Pt 11), 1857-1870.
- Delacour, D., & Jacob, R. (2006). Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci*, *63*(21), 2491-2505. doi: 10.1007/s00018-006-6210-8.
- den Hollander, A. I., Davis, J., van der Velde-Visser, S. D., Zonneveld, M. N., Pierrottet, C. O., Koenekoop, R. K., ... Cremers, F. P. (2004). CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*, *24*(5), 355-369. doi: 10.1002/humu.20093.
- den Hollander, A. I., Ghiani, M., de Kok, Y. J., Wijnholds, J., Ballabio, A., Cremers, F. P., & 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*(1-2), 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., ... Cremers, F. P. (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*(1), 198-203.

- den Hollander, A. I., Roepman, R., Koenekoop, R. K., & Cremers, F. P. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res*, 27(4), 391-419. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.003.
- den Hollander, A. I., ten Brink, J. B., de Kok, Y. J. M., van Soest, S., van den Born, L. I., van Driel, M. A., ... Bergen, A. A. B. (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*, 23(2), 217-221. doi: 10.1038/13848.
- Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L. B., Kramer, N. J., Chartron, J. W., Spencer, B., ... Gitler, A. D. (2015). Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein. *Neuron*, 85(1), 76-87. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.027.
- Dolon, J. F., Paniagua, A. E., Valle, V., Segurado, A., Arevalo, R., Velasco, A., & Lillo, C. (2018). Expression and localization of the polarity protein CRB2 in adult mouse brain: a comparison with the CRB1^(rd8) mutant mouse model. *Sci Rep*, 8(1), 11652. doi: 10.1038/s41598-018-30210-5.
- Dottori, M., Gross, M. K., Labosky, P., & Goulding, M. (2001). The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development*, 128(21), 4127-4138.
- Du, L., Tang, J.-H., Huang, G.-H., Xiang, Y., & Lv, S.-Q. (2017). The progression of epithelial-mesenchymal transformation in gliomas. *Chinese Neurosurgical Journal*, 3(1), 23. doi: 10.1186/s41016-017-0086-3.
- Dudok, J. J., Murtaza, M., Henrique Alves, C., Rashbass, P., & Wijnholds, J. (2016). Crumbs 2 prevents cortical abnormalities in mouse dorsal telencephalon. *Neurosci Res*, 108, 12-23. doi: 10.1016/j.neures.2016.01.001.
- Dunst, S., Kazimiers, T., von Zadow, F., Jambor, H., Sagner, A., Brankatschk, B., ... Brankatschk, M. (2015). Endogenously tagged rab proteins: a resource to study membrane trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell*, 33(3), 351-365. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.022.
- Easter, S. S., Jr., Ross, L. S., & Frankfurter, A. (1993). Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci*, 13(1), 285-299.
- Ebarasi, L., Ashraf, S., Bierzynska, A., Gee, H. Y., McCarthy, H. J., Lovric, S., ... Majumdar, A. (2015). Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 96(1), 153-161. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.11.014.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., ... Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci*, 116(Pt 19), 3879-3891. doi: 10.1242/jcs.00704.
- Ellenbroek, S. I., Iden, S., & Collard, J. G. (2012). Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol*, 22(3), 208-215. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.012.

- Farkas, L. M., & Huttner, W. B. (2008). The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol*, 20(6), 707-715. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.008.
- Feierstein, C. E. (2012). Linking adult olfactory neurogenesis to social behavior. *Front Neurosci*, 6, 173. doi: 10.3389/fnins.2012.00173.
- Feng, W., Wu, H., Chan, L. N., & Zhang, M. (2007). The Par-3 NTD adopts a PB1-like structure required for Par-3 oligomerization and membrane localization. *EMBO J*, 26(11), 2786-2796. doi: 10.1038/sj.emboj.7601702.
- Fletcher, T. L., Cameron, P., De Camilli, P., & Banker, G. (1991). The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci*, 11(6), 1617-1626.
- Fowler, C. D., Liu, Y., & Wang, Z. (2008). Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev*, 57(2), 342-351. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.011.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., ... Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247-256.
- Funke, L., Dakoji, S., & Brecht, D. S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*, 74, 219-245. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133339.
- Gao, X., Arlotta, P., Macklis, J. D., & Chen, J. (2007). Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci*, 27(52), 14317-14325. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3206-07.2007.
- Gao, Z., Ure, K., Ables, J. L., Lagace, D. C., Nave, K. A., Goebbels, S., ... Hsieh, J. (2009). Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci*, 12(9), 1090-1092. doi: 10.1038/nn.2385.
- Geneser, F. (2015). *Histología 4ª edición*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S. A. (4 ed.).
- Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 283(44), 29639-29643. doi: 10.1074/jbc.R800016200.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., & Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257-271.
- Gordon, S. L., & Cousin, M. A. (2014). The Sybtraps: control of synaptobrevin traffic by synaptophysin, alpha-synuclein and AP-180. *Traffic*, 15(3), 245-254. doi: 10.1111/tra.12140.
- Gosens, I., den Hollander, A. I., Cremers, F. P., & Roepman, R. (2008). Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res*, 86(5), 713-726. doi: 10.1016/j.exer.2008.02.005.

- Gosens, I., Sessa, A., den Hollander, A. I., Letteboer, S. J., Belloni, V., Arends, M. L., ... Roepman, R. (2007). FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. *Exp Cell Res*, *313*(19), 3959-3970. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.08.025.
- Gotz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(10), 777-788. doi: 10.1038/nrm1739.
- Gotz, M., Nakafuku, M., & Petrik, D. (2016). Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *8*(7). doi: 10.1101/cshperspect.a018853.
- Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*, *14*(11), 755-769. doi: 10.1038/nrn3586.
- Guillemot, F. (2007). Cell fate specification in the mammalian telencephalon. [Review]. *Prog Neurobiol*, *83*(1), 37-52. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.009.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(2), 101-112. doi: 10.1038/nrm2101.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., & Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, *121*(11), 3529-3537.
- Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Barbet, F., Ducroq, D., ... Kaplan, J. (2004). Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*, *23*(4), 306-317. doi: 10.1002/humu.20010.
- Harrison, M. S., Hung, C. S., Liu, T. T., Christiano, R., Walther, T. C., & Burd, C. G. (2014). A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(1), 267-272. doi: 10.1073/pnas.1316482111.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, *368*(9549), 1795-1809. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- Hendrickson, M. L., Rao, A. J., Demerdash, O. N., & Kalil, R. E. (2011). Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *PLoS One*, *6*(4), e18535. doi: 10.1371/journal.pone.0018535.
- Herman, M. A., Ackermann, F., Trimbuch, T., & Rosenmund, C. (2014). Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci*, *34*(35), 11781-11791. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014.
- Herranz-Martin, S. (2013). "Participación de las proteínas CRB y proteínas asociadas en el desarrollo de la retina y en distrofias retinianas". (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca, Salamanca.

- Herranz-Martin, S., Jimeno, D., Paniagua, A. E., Velasco, A., Lara, J. M., Aijon, J., & 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*(11), e50511. doi: 10.1371/journal.pone.0050511.
- Herranz, H., & Milan, M. (2006). Notch and affinity boundaries in *Drosophila*. *Bioessays*, *28*(2), 113-116. doi: 10.1002/bies.20366.
- Herranz, H., Stamatakis, E., Feiguin, F., & Milan, M. (2006). Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-secretase activity. *EMBO Rep*, *7*(3), 297-302. doi: 10.1038/sj.embor.7400617.
- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., ... Hurley, J. H. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*, *449*(7165), 1063-1067. doi: 10.1038/nature06216.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, *131*(12), 2791-2801. doi: 10.1242/dev.01165.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., & Inagaki, F. (2004). Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J Biol Chem*, *279*(30), 31883-31890. doi: 10.1074/jbc.M403092200.
- Hokanson, D. E., & Bretscher, A. P. (2012). EPI64 interacts with Slp1/JFC1 to coordinate Rab8a and Arf6 membrane trafficking. *Mol Biol Cell*, *23*(4), 701-715. doi: 10.1091/mbc.E11-06-0521.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S. G., Caspi, M., Elbaum, M., ... Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet*, *8*(9), 1599-1610.
- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., ... Ohno, S. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci*, *122*(Pt 10), 1595-1606. doi: 10.1242/jcs.043174.
- Horton, A. C., & Ehlers, M. D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron*, *40*(2), 277-295.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G., & Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*, *5*(2), 137-142. doi: 10.1038/ncb923.
- Huttner, W. B., & Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*, *17*(6), 648-657. doi: 10.1016/j.ceb.2005.10.005.
- Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., ... Ohno, S. (2006). Inactivation of aPKC λ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development*, *133*(9), 1735-1744. doi: 10.1242/dev.02330.

- Imayoshi, I., & Kageyama, R. (2014). bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron*, *82*(1), 9-23. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.018.
- Insolera, R., Chen, S., & Shi, S. H. (2011). Par proteins and neuronal polarity. *Dev Neurobiol*, *71*(6), 483-494. doi: 10.1002/dneu.20867.
- Inta, D., Meyer-Lindenberg, A., & Gass, P. (2011). Alterations in postnatal neurogenesis and dopamine dysregulation in schizophrenia: a hypothesis. *Schizophr Bull*, *37*(4), 674-680. doi: 10.1093/schbul/sbq134.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., & Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*, *154*(3), 491-497. doi: 10.1083/jcb.200103047.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J., & Choi, K. W. (2002). Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature*, *416*(6877), 178-183. doi: 10.1038/nature720.
- Jiang, X., & Nardelli, J. (2016). Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis*, *92*(Pt A), 3-17. doi: 10.1016/j.nbd.2015.07.007.
- Johnson, L. V., Leitner, W. P., Rivest, A. J., Staples, M. K., Radeke, M. J., & Anderson, D. H. (2002). The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(18), 11830-11835. doi: 10.1073/pnas.192203399.
- Jorissen, E., & De Strooper, B. (2010). Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 201-230. doi: 10.1016/S0070-2153(10)92006-1.
- Kaarniranta, K., Salminen, A., Haapasalo, A., Soininen, H., & Hiltunen, M. (2011). Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? *J Alzheimers Dis*, *24*(4), 615-631. doi: 10.3233/JAD-2011-101908.
- Kalman, M., & Ajtai, B. M. (2001). A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int J Dev Neurosci*, *19*(1), 101-108.
- Kallay, L. M., McNickle, A., Brennwald, P. J., Hubbard, A. L., & Braiterman, L. T. (2006). Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *J Cell Biochem*, *99*(2), 647-664. doi: 10.1002/jcb.20992.
- Kamberov, E., Makarova, O., Roh, M., Liu, A., Karnak, D., Straight, S., & Margolis, B. (2000). Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7. *J Biol Chem*, *275*(15), 11425-11431.
- Kantardzhieva, A., Gosens, I., Alexeeva, S., Punte, I. M., Versteeg, I., Krieger, E., ... Wijnholds, J. (2005). MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(6), 2192-2201. doi: 10.1167/iovs.04-1417.
- Karp, C. M., Tan, T. T., Mathew, R., Nelson, D., Mukherjee, C., Degenhardt, K., ... White, E. (2008). Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial

- tumor progression. *Cancer Res*, 68(11), 4105-4115. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6814.
- Katoh, M. (2004). Identification and characterization of Crumbs homolog 2 gene at human chromosome 9q33.3. *Int J Oncol*, 24(3), 743-749.
- Kemphues, K. (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell*, 101(4), 345-348.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., & Cheng, N. S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 52(3), 311-320.
- Kim, S., Lehtinen, M. K., Sessa, A., Zappaterra, M. W., Cho, S. H., Gonzalez, D., ... Walsh, C. A. (2010). The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron*, 66(1), 69-84. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.019.
- Klebes, A., & Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 10(2), 76-85.
- Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N., & Fukuda, M. (2014). Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open*, 3(9), 803-814. doi: 10.1242/bio.20148771.
- Kohjima, M., Noda, Y., Takeya, R., Saito, N., Takeuchi, K., & Sumimoto, H. (2002). PAR3beta, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun*, 299(4), 641-646.
- Kojetin, D. J., Venters, R. A., Kordys, D. R., Thompson, R. J., Kumar, R., & Cavanagh, J. (2006). Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D(28K). *Nat Struct Mol Biol*, 13(7), 641-647. doi: 10.1038/nsmb1112.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Krummel, M. F., & Macara, I. (2006). Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat Immunol*, 7(11), 1143-1149. doi: 10.1038/ni1404.
- Kumar, D., Ganeshpurkar, A., Modi, G., Gupta, S. K., & Singh, S. K. (2018). Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead. *Eur J Med Chem*, 148, 436-452. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.035.
- Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J., & Tepass, U. (2006). The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev Cell*, 11(3), 363-374. doi: 10.1016/j.devcel.2006.06.001.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P., & 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(28), 25408-25415. doi: 10.1074/jbc.M202196200.

- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J. P., & 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*(3), 1324-1333. doi: 10.1091/mbc.E03-04-0235.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, *60*(4), 585-595.
- Li, M., Zhang, S. S., & Barnstable, C. J. (2003). Developmental and tissue expression patterns of mouse Mpp4 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *307*(2), 229-235.
- Li, Y., Wei, Z., Yan, Y., Wan, Q., Du, Q., & Zhang, M. (2014). Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(49), 17444-17449. doi: 10.1073/pnas.1416515111.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., & Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol*, *2*(8), 540-547. doi: 10.1038/35019582.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., . . . Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(23), 10532-10537. doi: 10.1073/pnas.1004279107.
- Lotery, A. J., Jacobson, S. G., Fishman, G. A., Weleber, R. G., Fulton, A. B., Namperumalsamy, P., ... Stone, E. M. (2001). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol*, *119*(3), 415-420.
- Lotery, A. J., Malik, A., Shami, S. A., Sindhi, M., Chohan, B., Maqbool, C., ... Stone, E. M. (2001). CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic Genet*, *22*(3), 163-169.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature*, *409*(6819), 522-525. doi: 10.1038/35054077.
- Luibl, V., Isas, J. M., Kaye, R., Glabe, C. G., Langen, R., & Chen, J. (2006). Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. *J Clin Invest*, *116*(2), 378-385. doi: 10.1172/JCI25843.
- Macara, I. G. (2004). Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(3), 220-231. doi: 10.1038/nrm1332.
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, *8*(10), 755-765. doi: 10.1038/nrn2212.
- Maguschak, K. A., & Ressler, K. J. (2012). The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, *62*(1), 78-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.032.

- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, *302*(1-2), 21-29.
- Margolis, B., & Borg, J. P. (2005). Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci*, *118*(Pt 22), 5157-5159. doi: 10.1242/jcs.02597.
- Marthiens, V., & French-Constant, C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Rep*, *10*(5), 515-520. doi: 10.1038/embor.2009.36.
- Martin-Belmonte, F. a. P.-M., Mirna. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer*, *12*, 23,38.
- Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G. H., ... Akiyama, T. (1996). Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science*, *272*(5264), 1020-1023.
- Mehalow, A. K., Kameya, S., Smith, R. S., Hawes, N. L., Denegre, J. M., Young, J. A., ... Nishina, P. M. (2003). CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet*, *12*(17), 2179-2189. doi: 10.1093/hmg/ddg232.
- Menezes, J. R., & Luskin, M. B. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci*, *14*(9), 5399-5416.
- Meszar, Z., Girard, F., Saper, C. B., & Celio, M. R. (2012). The lateral hypothalamic parvalbumin-immunoreactive (PV1) nucleus in rodents. *J Comp Neurol*, *520*(4), 798-815. doi: 10.1002/cne.22789.
- Meuleman, J., van de Pavert, S. A., & Wijnholds, J. (2004). Crumbs homologue 1 in polarity and blindness. *Biochem Soc Trans*, *32*(Pt 5), 828-830. doi: 10.1042/BST0320828.
- Ming, G. L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, *70*(4), 687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Mirza, F. J., & Zahid, S. (2018). The Role of Synapsins in Neurological Disorders. *Neurosci Bull*, *34*(2), 349-358. doi: 10.1007/s12264-017-0201-7.
- Mitsuishi, Y., Hasegawa, H., Matsuo, A., Araki, W., Suzuki, T., Tagami, S., ... Nishimura, M. (2010). Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex. *J Biol Chem*, *285*(20), 14920-14931. doi: 10.1074/jbc.M109.038760.
- Miura, E., Hasegawa, T., Konno, M., Suzuki, M., Sugeno, N., Fujikake, N., ... Aoki, M. (2014). VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of alpha-synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *71*, 1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.014.

- Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., ... Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem*, *278*(33), 31240-31250. doi: 10.1074/jbc.M303593200.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, *8*(6), 427-437. doi: 10.1038/nrn2151.
- Musch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W. J., Rodriguez-Boulan, E., & Brennwald, P. J. (2002). Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, *13*(1), 158-168. doi: 10.1091/mbc.01-10-0496.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M. J., Arsanto, J. P., Ginestier, C., ... Borg, J. P. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene*, *24*(27), 4330-4339. doi: 10.1038/sj.onc.1208632.
- NCBI, N.-d. S. G. V. (2018). NCBI - SNP rs1105222
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, *422*(6933), 766-774. doi: 10.1038/nature01602
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, *144*(4), 552-566. doi: 10.1242/dev.145904.
- Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G. Q., Raber, J., ... Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(16), 9572-9577. doi: 10.1073/pnas.1133381100.
- Pang, J. J., Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Li, J., ... Heckenlively, J. R. (2005). Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis*, *11*, 152-162.
- Paniagua, A., Segurado, A., Dolón, J., Esteve-Rudd, J., Velasco, A., Williams, D., & Lillo, C. (2018 Under Review). *CRB2 plays an essential role during apicobasal polarization of retinal pigment epithelial cells*. Molecular Biology of the Cell (MBoC).
- Paniagua, A. E., Herranz-Martin, S., Jimeno, D., Jimeno, A. M., Lopez-Benito, S., Arevalo, J. C., ... Lillo, C. (2015). CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep*, *5*, 14504. doi: 10.1038/srep14504.
- Pardossi-Piquard, R., Chen, F., Silva-Gagliardi, N. F., Szego, M., McInnes, R., McGlade, C. J., ... Fraser, P. E. (2007). Overexpression of human CRB1 or related isoforms, CRB2 and CRB3, does not regulate the human presenilin complex in culture cells. *Biochemistry*, *46*(48), 13704-13710. doi: 10.1021/bi701347w.
- Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*, *15*(4), 351-364. doi: 10.1002/embr.201438447.

- Park, B., Alves, C. H., Lundvig, D. M., Tanimoto, N., Beck, S. C., Huber, G., ... Wijnholds, J. (2011). PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci*, *31*(47), 17230-17241. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4430-11.2011.
- Parker, S. S., Cox, C., & Wilson, J. M. (2018). Rabs set the stage for polarity. *Small GTPases*, *9*(1-2), 116-129. doi: 10.1080/21541248.2016.1277840.
- Pavan, B., & Dalpiaz, A. (2018). Retinal pigment epithelial cells as a therapeutic tool and target against retinopathies. *Drug Discov Today*. doi: 10.1016/j.drudis.2018.06.009.
- Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F., & Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, *416*(6877), 143-149. doi: 10.1038/nature721.
- Pellissier, L. P., Alves, C. H., Quinn, P. M., Vos, R. M., Tanimoto, N., Lundvig, D. M., ... Wijnholds, J. (2013). Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS Genet*, *9*(12), e1003976. doi: 10.1371/journal.pgen.1003976.
- Peranen, J. (2011). Rab8 GTPase as a regulator of cell shape. *Cytoskeleton (Hoboken)*, *68*(10), 527-539. doi: 10.1002/cm.20529.
- Placanica, L., Zhu, L., & Li, Y. M. (2009). Gender- and age-dependent gamma-secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease. *PLoS One*, *4*(4), e5088. doi: 10.1371/journal.pone.0005088.
- Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S., & Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol*, *5*(4), 301-308. doi: 10.1038/ncb948.
- Pocha, S. M., & Wassmer, T. (2011). A novel role for retromer in the control of epithelial cell polarity. *Commun Integr Biol*, *4*(6), 749-751.
- Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B., & Knust, E. (2011). Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr Biol*, *21*(13), 1111-1117. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.007.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., & Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *20*, 559-591. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103108.
- Purves., D., George J, A., David, F., William C, H., Anthony-Samuel, L., James O, M., & S Mark, W. (2004). *Neurociencias: Tercera edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S. A.* (3 ed.).
- Ramkumar, N., Harvey, B. M., Lee, J. D., Alcorn, H. L., Silva-Gagliardi, N. F., McGlade, C. J., ... Anderson, K. V. (2015). Protein O-Glucosyltransferase 1 (POGLUT1) Promotes Mouse Gastrulation through Modification of the Apical Polarity Protein CRUMBS2. *PLoS Genet*, *11*(10), e1005551. doi: 10.1371/journal.pgen.1005551.

- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, *29*(6). doi: 10.1515/revneuro-2017-0063.
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, *7*(3), 137-152. doi: 10.1038/nrneuro.2011.2.
- Richard, M., Roepman, R., Aartsen, W. M., van Rossum, A. G., den Hollander, A. I., Knust, E., ... Cremers, F. P. (2006). Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*, *15 Spec No 2*, R235-243. doi: 10.1093/hmg/ddl195.
- Richier, L., Williton, K., Clattenburg, L., Colwill, K., O'Brien, M., Tsang, C., ... Fawcett, J. P. (2010). NOS1AP associates with Scribble and regulates dendritic spine development. *J Neurosci*, *30*(13), 4796-4805. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3726-09.2010.
- Rita, G., Emily, T., & Rempe, D. A. (2012). Cocultures of neurons and astrocytes as a model for examining hypoxia-induced neuronal death. *Methods Mol Biol*, *814*, 353-366. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_23.
- Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., ... Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol*, *157*(1), 161-172. doi: 10.1083/jcb.200109010.
- Roman-Fernandez, A., & Bryant, D. M. (2016). Complex Polarity: Building Multicellular Tissues Through Apical Membrane Traffic. *Traffic*, *17*(12), 1244-1261. doi: 10.1111/tra.12417.
- Romanitan, M. O., Popescu, B. O., Winblad, B., Bajenaru, O. A., & Bogdanovic, N. (2007). Occludin is overexpressed in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Cell Mol Med*, *11*(3), 569-579. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00047.x.
- Rosso, S. B., & Inestrosa, N. C. (2013). WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. *Front Cell Neurosci*, *7*, 103. doi: 10.3389/fncel.2013.00103.
- Rudloff, S., & Kemler, R. (2012). Differential requirements for beta-catenin during mouse development. *Development*, *139*(20), 3711-3721. doi: 10.1242/dev.085597.
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*, *277*(6), 1348-1358. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x.
- Santos, M. S., Foss, S. M., Park, C. K., & Voglmaier, S. M. (2014). Protein interactions of the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *PLoS One*, *9*(10), e109824. doi: 10.1371/journal.pone.0109824.
- Savioz, A., Leuba, G., & Vallet, P. G. (2014). A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, *18*, 86-94. doi: 10.1016/j.arr.2014.09.004.
- Seabra, M. C., Mules, E. H., & Hume, A. N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med*, *8*(1), 23-30.
- Seaman, M. N. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*, *125*(Pt 20), 4693-4702. doi: 10.1242/jcs.103440.

- Seaman, M. N., & Williams, H. P. (2002). Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Mol Biol Cell*, *13*(8), 2826-2840. doi: 10.1091/mbc.02-05-0064.
- Selkoe, D. J. (1989). Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell*, *58*(4), 611-612.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, *81*(2), 741-766. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.741.
- Sen, A., Sun, R., & Krahn, M. P. (2015). Localization and Function of Pals1-associated Tight Junction Protein in Drosophila Is Regulated by Two Distinct Apical Complexes. *J Biol Chem*, *290*(21), 13224-13233. doi: 10.1074/jbc.M114.629014.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Shi, S. H., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*, *112*(1), 63-75.
- Shih Ie, M., & Wang, T. L. (2007). Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*, *67*(5), 1879-1882. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3958.
- Shin, K., Wang, Q., & Margolis, B. (2007). PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep*, *8*(2), 158-164. doi: 10.1038/sj.embor.7400890.
- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H. C., & Murgod, S. (2015). Neural crest: The fourth germ layer. *J Oral Maxillofac Pathol*, *19*(2), 221-229. doi: 10.4103/0973-029X.164536.
- Siegrist, S. E., & Doe, C. Q. (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev*, *21*(5), 483-496. doi: 10.1101/gad.1511207.
- Slavotinek, A., Kaylor, J., Pierce, H., Cahr, M., DeWard, S. J., Schneidman-Duhovny, D., ... Mehta, L. (2015). CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *Am J Hum Genet*, *96*(1), 162-169. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.11.013.
- Solecki, D. J., Govek, E. E., & Hatten, M. E. (2006). mPar6 alpha controls neuronal migration. *J Neurosci*, *26*(42), 10624-10625. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4060-06.2006.
- Solecki, D. J., Govek, E. E., Tomoda, T., & Hatten, M. E. (2006). Neuronal polarity in CNS development. *Genes Dev*, *20*(19), 2639-2647. doi: 10.1101/gad.1462506.
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J., & Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in Drosophila. *J Cell Biol*, *166*(4), 549-557. doi: 10.1083/jcb.200311031.
- Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K., & Foster, D. C. (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry*, *32*(17), 4481-4486.

- St Johnston, D., & Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell*, *141*(5), 757-774. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.011.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(8), 513-525. doi: 10.1038/nrm2728.
- Stern, C. D. (2006). Evolution of the mechanisms that establish the embryonic axes. *Curr Opin Genet Dev*, *16*(4), 413-418. doi: 10.1016/j.gde.2006.06.005.
- Stohr, H., & 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*(3), 377-384. doi: 10.1006/geno.2001.6559.
- Storey, E., & Cappai, R. (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *25*(2), 81-97.
- Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C. J., Roh, M., & Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell*, *15*(4), 1981-1990. doi: 10.1091/mbc.E03-08-0620.
- Stuhlmiller, T. J., & Garcia-Castro, M. I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell Mol Life Sci*, *69*(22), 3715-3737. doi: 10.1007/s00018-012-0991-8.
- Sun, Y., Aiga, M., Yoshida, E., Humbert, P. O., & Bamji, S. X. (2009). Scribble interacts with beta-catenin to localize synaptic vesicles to synapses. *Mol Biol Cell*, *20*(14), 3390-3400. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1172.
- Suzuki, S. O., & Goldman, J. E. (2003). Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci*, *23*(10), 4240-4250.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J., & Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, *125*(18), 3607-3614.
- Tai, L. M., Holloway, K. A., Male, D. K., Loughlin, A. J., & Romero, I. A. (2010). Amyloid-beta-induced occludin down-regulation and increased permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. *J Cell Mol Med*, *14*(5), 1101-1112. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00717.x.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. [Review]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(6), 397-410. doi: 10.1038/nrm3802.
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M., & Takai, Y. (2003). Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J Biol Chem*, *278*(8), 5497-5500. doi: 10.1074/jbc.C200707200.

- Tamimi, R., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Dyer-Montgomery, K., Lee, J. E., Hernandez, R., ... Tapscott, S. J. (1996). The NEUROD gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2. *Genomics*, *34*(3), 418-421. doi: 10.1006/geno.1996.0306.
- Temkin, P., Lauffer, B., Jager, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J., & von Zastrow, M. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol*, *13*(6), 715-721. doi: 10.1038/ncb2252.
- 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*(5), 787-799.
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*, *366*(1), 34-54. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.041.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Tsika, E., Glauser, L., Moser, R., Fiser, A., Daniel, G., Sheerin, U. M., ... Moore, D. J. (2014). Parkinson's disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, *23*(17), 4621-4638. doi: 10.1093/hmg/ddu178.
- UniProt, U. t. u. p. k. (2018). UniProtKB - Q80YA8 (CRUM2_MOUSE).
- Urban, N., & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*, *8*, 396. doi: 10.3389/fncel.2014.00396.
- Valtorta, F., Pozzi, D., Benfenati, F., & Fornasiero, E. F. (2011). The synapsins: multitask modulators of neuronal development. *Semin Cell Dev Biol*, *22*(4), 378-386. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.008.
- Valle, V. (2014). *Alteraciones durante el desarrollo de la red vascular en el modelo de distrofias retinianas CRB1rd8. Trabajo Fin de Máster (TFM). Universidad de Salamanca.*
- van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., ... Wijnholds, J. (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci*, *117*(Pt 18), 4169-4177. doi: 10.1242/jcs.01301.
- van den Hurk, J. A., Rashbass, P., Roepman, R., Davis, J., Voesenek, K. E., Arends, M. L., ... den Hollander, A. I. (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 Rossum, A. G., Aartsen, W. M., Meuleman, J., Klooster, J., Malysheva, A., Versteeg, I., ... 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*(18), 2659-2672. doi: 10.1093/hmg/ddl194.

- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 329(3), 409-420. doi: 10.1007/s00441-007-0432-4.
- Wang, Q., Chen, X. W., & Margolis, B. (2007). PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 18(3), 874-885. doi: 10.1091/mbc.e06-07-0651.
- Wang, Q., Hurd, T. W., & Margolis, B. (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem*, 279(29), 30715-30721. doi: 10.1074/jbc.M401930200.
- Watanabe, T., Noritake, J., & Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration.. *Trends Cell Biol*, 15(2), 76-83. doi: 10.1016/j.tcb.2004.12.006.
- Watters, A. K., Rom, S., Hill, J. D., Dematatis, M. K., Zhou, Y., Merkel, S. F., ... Ramirez, S. H. (2015). Identification and dynamic regulation of tight junction protein expression in human neural stem cells. *Stem Cells Dev*, 24(12), 1377-1389. doi: 10.1089/scd.2014.0497.
- Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., ... Kemphues, K. J. (1996). par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development*, 122(10), 3133-3140.
- Wert, K. J., Lin, J. H., & Tsang, S. H. (2014). General pathophysiology in retinal degeneration. *Dev Ophthalmol*, 53, 33-43. doi: 10.1159/000357294.
- Whiteman, E. L., Fan, S., Harder, J. L., Walton, K. D., Liu, C. J., Soofi, A., ... Margolis, B. (2014). Crumbs3 is essential for proper epithelial development and viability. *Mol Cell Biol*, 34(1), 43-56. doi: 10.1128/MCB.00999-13.
- Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., ... Liu, G. (2005). Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J Neurosci*, 25(26), 6221-6234. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005.
- Wisniewska, M. B. (2013). Physiological role of beta-catenin/TCF signaling in neurons of the adult brain. *Neurochem Res*, 38(6), 1144-1155. doi: 10.1007/s11064-013-0980-9.
- Xiao, H., & Liu, M. (2013). Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell Mol Life Sci*, 70(17), 3057-3066. doi: 10.1007/s00018-012-1192-1.
- Xiao, Z., Patrakka, J., Nukui, M., Chi, L., Niu, D., Betsholtz, C., ... Tryggvason, K. (2011). Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn*, 240(12), 2646-2656. doi: 10.1002/dvdy.22778.
- Yamaguchi, M., Seki, T., Imayoshi, I., Tamamaki, N., Hayashi, Y., Tatebayashi, Y., & Hitoshi, S. (2016). Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci*, 66(3), 197-206. doi: 10.1007/s12576-015-0421-4.

- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., ... Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity.. *Curr Biol*, *13*(9), 734-743.
- Yang, H. K., Sundholm-Peters, N. L., Goings, G. E., Walker, A. S., Hyland, K., & Szele, F. G. (2004). Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain.. *J Neurosci Res*, *76*(3), 282-295. doi: 10.1002/jnr.20071.
- Yang, J., Pawlyk, B., Wen, X. H., Adamian, M., Soloviev, M., Michaud, N., ... 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*(9), 1017-1029. doi: 10.1093/hmg/ddm047.
- Yin, Y., Sheng, J., Hu, R., Yang, Y., & Qing, S. (2014). The expression and localization of Crb3 in developmental stages of the mice embryos and in different organs of 1-week-old female mice. *Reprod Domest Anim*, *49*(5), 824-830. doi: 10.1111/rda.12374.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M. M., ... Birchmeier, C. (2003). beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system.. *Dev Biol*, *258*(2), 406-418.
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, *1*, 5. doi: 10.1186/1750-1326-1-5.
- Zhou, B., Wu, Y., & Lin, X. (2011). Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs. *Dev Biol*, *360*(1), 87-95. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.009.
- Zollinger, D. R., Chang, K. J., Baalman, K., Kim, S., & Rasband, M. N. (2015). The Polarity Protein Pals1 Regulates Radial Sorting of Axons. *J Neurosci*, *35*(29), 10474-10484. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1593-15.2015.
- Zweifel, S. A., Imamura, Y., Spaide, T. C., Fujiwara, T., & Spaide, R. F. (2010). Prevalence and significance of subretinal drusenoid deposits (reticular pseudodrusen) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *117*(9), 1775-1781. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.01.027.

Anexo



SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Expression and localization of the polarity protein CRB2 in adult mouse brain: a comparison with the CRB1^{rd8} mutant mouse model

Received: 5 February 2018
Accepted: 24 July 2018
Published online: 03 August 2018

Jorge F. Dolón¹, Antonio E. Paniagua^{1,2}, Vicente Valle¹, Alicia Segurado¹, Rosario Arévalo¹, Almudena Velasco¹ & Concepción Lillo¹ 

Acquisition of cell polarization is essential for the performance of crucial functions, like a successful secretion and appropriate cell signaling in many tissues, and it depends on the correct functioning of polarity proteins, including the Crumbs complex. The CRB proteins, CRB1, CRB2 and CRB3, identified in mammals, are expressed in epithelial-derived tissues like brain, kidney and retina. CRB2 has a ubiquitous expression and has been detected in embryonic brain tissue; but currently there is no data regarding its localization in the adult brain. In our study, we characterized the presence of CRB2 in adult mice brain, where it is particularly enriched in cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum. Double immunofluorescence analysis confirmed that CRB2 is a neuron-specific protein, present in both soma and projections where colocalizes with certain populations of exocytic and endocytic vesicles and with other members of the Crumbs complex. Finally, in the cortex of CRB1^{rd8} mutant mice that contain a mutation in the *Crb1* gene generating a truncated CRB1 protein, there is an abnormal increase in the expression levels of the CRB2 protein which suggests a possible compensatory mechanism for the malfunction of CRB1 in this mutant background.

Cell polarity is achieved through the coordinated functions of three evolutionarily conserved polarity complexes: Crumbs and Par (apical complexes) and Scribble (basal complex)^{1–3}. The achievement of correct cell polarity is essential for carrying out different functions in many tissues, such as the accurate positioning of cell adhesions, secretion and cell signaling. In neurons, as in other epithelial-derived cells, the acquisition of polarity is particularly important during neuronal development⁴, especially for the establishment and maturation of the synaptic communications among neurons^{4–6}. The CRB proteins are members of the Crumbs complex which is also comprised of proteins PALS1 and PATJ. The intracellular domain of CRB, the sole transmembrane member of the complex, establishes a scaffolding complex with other members of the Crumbs, Par and Scribble complexes, essential for the correct accomplishment of all these activities^{3,7,8}. The formation of these specialized cell surface domains and the acquisition of cell polarity is highly dependent on the transport and docking of the polarity proteins towards their appropriate locations in the plasma membrane. The transport of the CRB proteins from the TGN (trans Golgi network) to the plasma membrane has been described to be mainly mediated by small GTPases such as some Rab members^{9–11}. In neurons, the particular performance of the GTPases is crucial for the correct development of dendrites and axons¹². Also, the turnover of these proteins are dependent on, not only the *de novo* exocytic pathway, but also on the recycling of components, mediated in many cases by the retromer protein complex, necessary to rescue them from proteolytic degradation. In fact, it has been described that VPS35, a central component of the retromer, is responsible for the proper recycling of the CRB proteins and their retrograde transport into endosomes, contributing to the stabilization of the levels of available CRB^{9,13,14}.

So far, the CRB proteins have been found in many species ranging from invertebrates to mammals¹⁵. Three genes encode the Crumbs orthologues in humans and mice, *CRB1/Crb1*, *CRB2/Crb2* and *CRB3/Crb3*, all of them expressed not only in retina but also in other organs. Using RT-PCR and *in situ* hybridizations analysis, *CRB1/Crb1*

¹Institute of Neurosciences of Castilla y León, IBSAL, Cell Biology and Pathology, University of Salamanca, 37007, Salamanca, Spain. ²Present address: Department of Ophthalmology and Stein Eye Institute, University of California, Los Angeles, CA, 90095, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L. (email: conlillo@usal.es)

was found in the brain, in hypothalamic regions and optic area, the tuberalis region of the hypothalamus, preoptic area and in the granular layer of the cerebellum, the hippocampal dentate gyrus, the olfactory bulb and the rostral migratory stream^{16,17}. *CRB2/Crb2*, again through RT-PCR and *in situ* hybridization analysis, was found in kidney, retinal pigment epithelium and choroid, the adult brain and at low levels in the placenta, heart and lung^{18,19}. Expression of the CRB2 protein has been shown in the retinal pigment epithelium²⁰ and in the embryonic mouse brain²¹. Finally, *CRB3/Crb3*, the most ubiquitously expressed of the three members, has been described in many diverse epithelial-derived tissues, including the retina^{22,23}. It is known that among the three, while all of them are transmembrane proteins, CRB1 and CRB2 share a similar molecular structure, since both have a long extracellular domain. CRB3 lacks of this domain and it has been shown to perform functions different to those carried out by CRB1 and CRB2^{21,23–25}.

It has been shown that mutations in the *Crumbs* gene in *Drosophila* produce alterations in the organization of polarity in epithelial cells^{26,27}. In mammals, CRB3 plays an important role in establishing epithelial polarity and during organogenesis²⁸. Also, loss-of-function in CRB1 causes retinal dystrophies, including retinitis pigmentosa¹⁷ and Leber Congenital Amaurosis²⁹ in humans, but interestingly, without showing any apparent brain dysfunction or alteration^{17,29–32}. The CRB1^{rd8} mouse model has been employed to study CRB1 functions since it presents a single base mutation that generates a premature stop codon resulting in a truncated CRB1 protein that only contains the N-terminal extracellular domain, leading to retinal degeneration^{33,34}. But, to our knowledge, there are no studies analyzing the brain phenotype of this mouse model.

A complete ablation of CRB1 and CRB2 proteins in mouse retina simulate human Leber congenital Amaurosis. Moreover, the lack of *Crb2* gene function causes abnormalities in the gastrulation process in mouse development, producing lethality at embryonic stage 12.5¹⁹. Also, it has been reported that mutations in the *Crb2* gene produce a phenotype resembling congenital nephrosis with cerebral ventriculomegalia³⁵, suggesting this phenotype could be related with a ciliopathy³⁶.

During neural development, neuroepithelial cells undergo several epithelial-mesenchymal transitions, implying particular changes in their structure and cell adhesion features so these cells acquire the capacity to migrate and settle in different areas of the brain³⁷. This process requires modifications in the apico-basal polarity of polarized and joint cells, losing this polarization and junctions/connections with other cells to be able to migrate³⁸. As mentioned above, the acquisition of cell polarity is a highly regulated process involving many different proteins, together with CRB2. Although CRB2 is necessary for embryonic development, acting as an essential regulator for neuronal differentiation during neurogenesis³⁹, and its mutation is pleiotropic, causing both neurological and renal defects³⁵, up to now no studies have explored the presence of CRB2 protein in the brain. Here we demonstrate that CRB2 is ubiquitously distributed throughout the adult mouse brain, although it is particularly present in the cortex and certain hypothalamic areas. In addition, we found that CRB2 is enriched in vesicular compartments, both in soma and in neuronal processes. In these vesicles, CRB2 seems to be travelling together with specific synaptic components in exocytic vesicles, and in some cases together with the small GTPase Rab8. Additionally, here we describe the presence of CRB2 together with the retromer that could be involved in the recycling of this protein from the plasma membrane via VPS35 association, at least in processes of mature neurons. Finally, we find that the expression of CRB2 is increased in certain cortex layers of the CRB1^{rd8} mutant mouse, which presents a defective CRB1 protein, suggesting a possible compensatory mechanism or a gain of function.

Results

Expression and distribution of CRB2 in mouse brain. To determine the expression and spatial distribution of CRB2 in mouse brain, we performed immunofluorescence and immunohistochemistry analyses on sagittal and coronal mouse brain sections. The staining of CRB2 showed a punctate labeling with a broad and general distribution throughout the brain (Fig. 1A), although there were certain areas, such as the cortex (Cx), hippocampus (Hc), hypothalamus (H), the mesencephalic trigeminal nucleus (Me) and cerebellum (Cb), where the labeling was more evident, abundant and intense (yellow arrowheads). The immunohistochemistry analysis showed that in the hypothalamus, CRB2 was found concentrated in particular cell bodies, which were mainly located in specific areas such as the Periventricular Nucleus (PVN), Dorsomedial Hypothalamic Nucleus (DMH), Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH) and the Retrochiasmatic part of the Supraoptic area (SOR) (Fig. 1B). Additionally, besides the nuclear staining, the immunofluorescence analysis showed a distinctive punctate CRB2 labeling that seemed to be accurately arranged between the Hypothalamic Dorsal Area (DA) and the SOR region (Fig. 1C, yellow arrowheads). Due to the particular enrichment of CRB2 labeled structures in the hypothalamus, the rest of the analyses carried out to discern the type of cells, processes and subcellular compartments containing CRB2, were performed in this particular area of the brain.

In brain, CRB2 is exclusively present in neurons. To identify the cell types expressing CRB2 in mouse brain, double immunofluorescence analysis of CRB2 and proteins specific for certain cell types were performed, such as GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) to identify astrocytes (Fig. 2A–D), Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) to identify microglia (Fig. 2E–G) or Olig1 (Oligodendrocyte Transcription Factor 1) for oligodendrocytes (Fig. 2H–J). CRB2 was present as punctate cytoplasmic staining in large round cells (Fig. 2) and in scattered profiles in a pattern resembling cell's processes. This staining did not overlap with GFAP (Fig. 2A–D), since the GFAP+ profiles appeared to surround the CRB2+ labeled cell bodies and profiles, proving that CRB2 was not present in astrocytes. Similarly, CRB2 labeling did not colocalize with Iba1+ profiles (Fig. 2E–G) or oligodendrocyte+ labeling (Fig. 2H–J). The shape and size of the CRB2 labeled cell bodies and the absence of colocalization with glial markers proved that in mouse brain, CRB2 is only present in neurons.

This inference was confirmed by performing double immunofluorescence experiments for CRB2 and typical neuronal cells markers, such as the calcium binding protein calbindin (Fig. 3A–C), Tuj1 (neuron specific class III

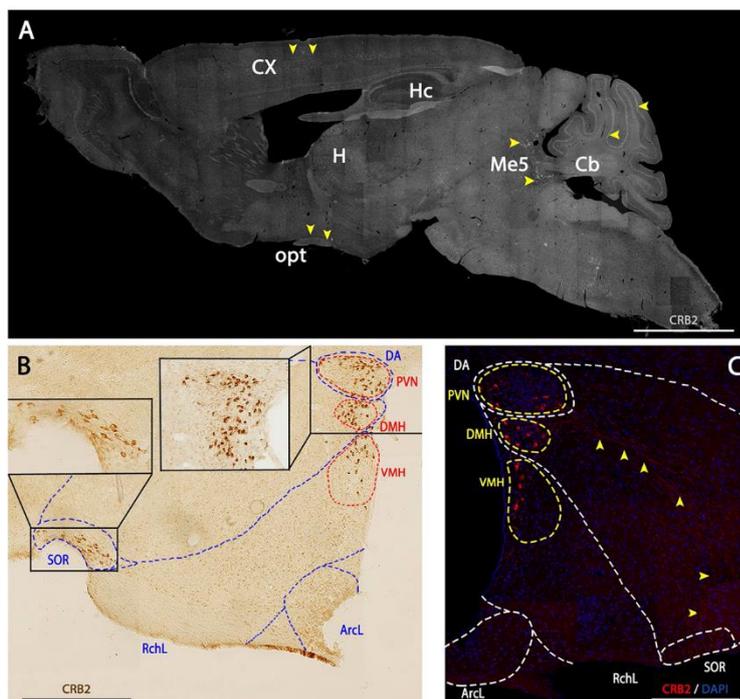


Figure 1. CRB2 localization in mouse brain. (A) Immunofluorescence of CRB2 in a sagittal section of the adult WT brain showing a punctate CRB2 labeling throughout the section, being more evident in certain nuclei of specific areas: Cortex (Cx), Hippocampus (Hc), cerebellum (Cb), Mesencephalic Trigeminal Nucleus (Me5), optic tract (opt) and Hypothalamus (H) (yellow arrowheads). (B) Immunohistochemistry of CRB2 in a coronal section of the hypothalamus. CRB2 labeling is especially evident in certain nuclei like the Dorsal area (DA), Periventricular Nucleus (PVN), Dorsomedial Hypothalamic Nucleus (DMH), Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH), Lateral Retrochiasmatic area (RchL), Lateral Hypothalamic Arcuate Nucleus (ArCL), Retrochiasmatic Supraoptic Nucleus (SOR). (C) Immunofluorescence of CRB2 in a coronal adult mouse of the hypothalamic area showing a highly organized punctate labeling for CRB2 arranged from the DA to the SOR regions (yellow arrowheads). DAPI (in blue): nuclear labeling. Scale bars: 200 μ m (A–C).

beta tubulin) (Fig. 3D–F) or MAP2 (microtubule associated protein 2) (Fig. 3G–I). Calbindin is expressed by the vast majority of the neurons in the PVN of the hypothalamus⁴⁰, the region where CRB2 was abundantly present in cell bodies, being then chosen to characterize its subcellular expression. The double immunofluorescence labeling with the neuronal marker for calbindin (Fig. 3A–C), showed that CRB2 is expressed in a subset of calbindin+ neurons and in fact, all CRB2+ cell bodies were also calbindin+ (shown with white numbers in Fig. 3A,C), but not the opposite (yellow numbers in Fig. 3C). Double immunofluorescence for CRB2 and neuronal cytoskeletal markers, such as Tuj1 (Fig. 3E,F) or MAP2 (Fig. 3H,I) shown that CRB2 (Fig. 3D–I) was present in the soma and in the projections of neurons identified with these markers. To try to identify the structures with a punctate pattern labeled for CRB2 resembling cell processes, we performed double and triple immunofluorescence experiments for CRB2 and proteins present in specific cell compartments, such as synaptic terminals (Fig. 3J–L) and diverse types of vesicles (Fig. 4). Different antibodies were used to specifically distinguish postsynaptic PSD95 profiles (Post Synaptic Density 95) (green in Fig. 3J,L) from presynaptic terminals, labeled for the protein synaptophysin (SYP) (Fig. 3K) or synapsin Ia/b (light blue in Fig. 3L), specifically present in presynaptic vesicles. This determined that PSD95 did not colocalize with the CRB2+ profiles on cellular processes, as shown in Fig. 3J and in the orthogonal views shown in the upper and right margins of Fig. 3L; or within the punctate labeling found in cell bodies (Supplementary Fig. 1A–C). Also, The CRB2/SYP double immunofluorescence analysis showed that these two proteins rarely colocalized in the cell bodies (Supplementary Fig. 1D–F), but frequently colocalized in the same punctate profiles resembling cells' processes (Fig. 3K). Also, there were CRB2+ and SYP+ profiles

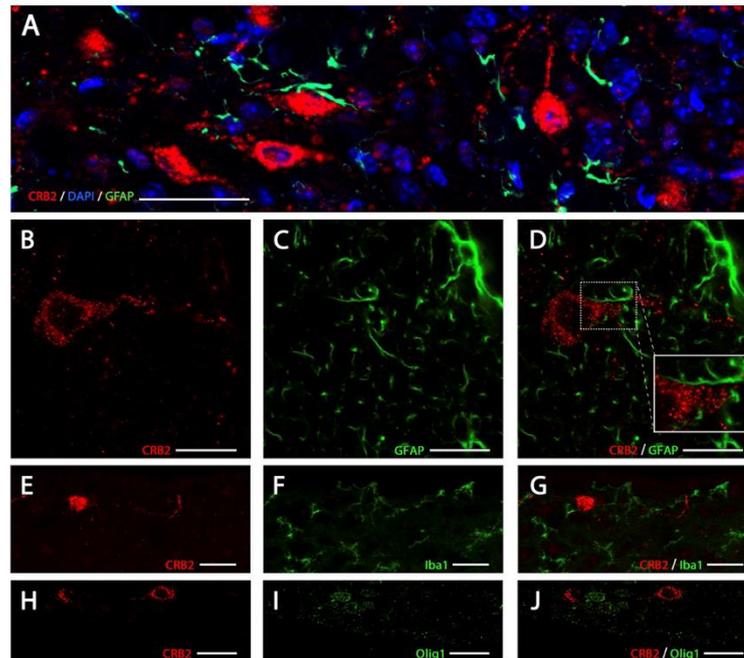


Figure 2. CRB2 immunofluorescence identification in the nervous system. Double immunofluorescence for CRB2 (A,B,D) and GFAP (A,C,D) in coronal sections of adult mouse PVN, showing that the two proteins do not colocalize in any of the cells or profiles. Double immunofluorescence labeling for CRB2 (E,G,H,J) and Iba1 (F,G) or Olig1 (I,J) in coronal sections of adult mouse PVN, showing that CRB2 is not present in microglia or oligodendrocytes. DAPI (in blue): Nuclear labeling. Scale bars: 100 μ m (A), 15 μ m (B–D), 20 μ m (E–J).

which did not colocalize (arrowheads in Fig. 3K). Interestingly, some CRB2+ profiles were clearly opposite to the particles labeled for PSD95, as shown by arrowheads in Fig. 3J, that the triple immunolabeling for CRB2/synapsin Ia/b/PSD95 demonstrated to be presynaptic terminals labeled for both CRB2 and synapsin Ia/b (white labeling, as the result of the colocalization of red CRB2 and light blue synapsin Ia/b, in the upper and right-sided orthogonal views shown in Fig. 3L) facing PSD95+ postsynaptic profiles (green in Fig. 3L). Then, this triple immunofluorescence analysis proved that CRB2 is present in some presynaptic terminals which are usually facing the PSD95+ postsynaptic elements and that CRB2 is not expressed in post-synaptic profiles (demonstrated by the lack of colocalization in the orthogonal views of Fig. 3L).

Double immunofluorescence analysis for CRB2 and V-Glut1, the vesicular glutamate transporter expressed in excitatory synaptic vesicles (Fig. 4A–C), showed some colocalization of these two proteins in the soma of neurons of the PVN (white arrowheads in Fig. 4A–C), although not all profiles labeled with V-Glut1 in the somas were CRB2+ and vice versa. Also, the CRB2 labeling found in the projections resembling cells' processes did not colocalize with the V-Glut1 labeling (yellow arrowheads in Fig. 4A–C). Since CRB2 is a member of the Crumbs polarity protein complex, we analyzed whether it was co-expressed with another Crumbs complex member, Pals1. The CRB2/Pals1 double immunofluorescence analysis showed that there was partial colocalization of these two proteins in the same group of neurons (arrowheads in Fig. 4F), but there was also Pals1 labeling independent of the CRB2+ profiles (yellow arrowheads in Fig. 4F).

Finally, since CRB2 is a transmembrane protein, it should be specifically transported to and from the plasma membrane throughout its lifespan via vesicular trafficking, similar to other transmembrane proteins. To address this, a double immunolabeling for CRB2 and proteins specifically found in vesicles related with the exocytic and endocytic vesicle trafficking pathway was performed. The CRB2/Rab8A (Fig. 4G–I) and CRB2/VPS35 (Fig. 4J–L) immunofluorescence analysis showed that CRB2 a partial colocalization with VPS35, a component of the retromer complex (white arrowheads in Fig. 4J–L), both in soma and projections, although not all VPS35+ profiles where CBR2+ (yellow arrowheads in Fig. 4J–L) and vice versa. Therefore, CRB2 is present at least, in some

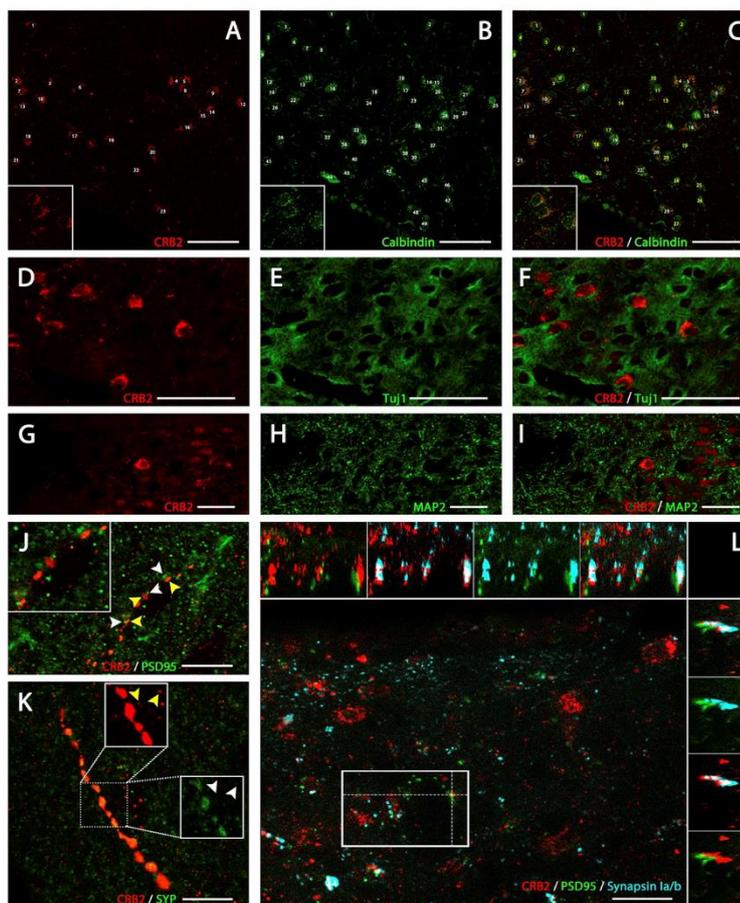


Figure 3. Immunofluorescence localization of CRB2 in cell bodies and profiles. Double immunofluorescence for CRB2 (A,C,D,F,G,I) and neuronal markers as Calbindin (B,C), Tuj1 (D,F) or MAP2 (G,I) in coronal sections of adult mouse PVN. Quantification of CRB2+ neurons (A,C) and Calbindin+ (B,C), showing that most of the Calbindin+ neurons are also CRB2+, and that all CRB2+ neurons are Calbindin+ (white numbers in A and C). Double immunofluorescence for CRB2 (D,F,G,I) and Tuj1 (E,F) or MAP2 (H,I), neuronal cytoskeletal proteins, showing that CRB2+ is present in the cell bodies surrounded by the Tuj1+ and MAP2+ neuronal projections. Double immunofluorescence for CRB2 (J–K) and PSD95 (J) or SYP (K), in coronal sections of adult mouse PVN. (J) CRB2 (yellow arrowheads) and PSD95 (white arrowheads) do not colocalize in the punctate profiles, but some spots are opposite one another. (K) CRB2/SYP colocalization is frequent in the profiles scattered throughout the sections, but there are some SYP profiles (white arrowheads) which are not labeled for CRB2 and vice versa (yellow arrowheads). (L) Projection along the z-axis [Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective; Z-stack: 109 slices (25,92 μm)] of a triple immunofluorescence for CRB2 (red), PSD95 (green) and synapsin Ia/b (light blue) in a coronal section of adult mouse PVN. Orthogonal views (XY images above and YZ on the right side) showed that CRB2 and PSD95 not only do not colocalize but also are opposite one another, CRB2/synapsin Ia/b colocalization is frequent and the presynaptic CRB2/Synapsin Ia/b+ profiles are facing the PSD95+ postsynaptic profiles. Scale bars: 50 μm (A–I), 10 μm (J,K), 20 μm (L).

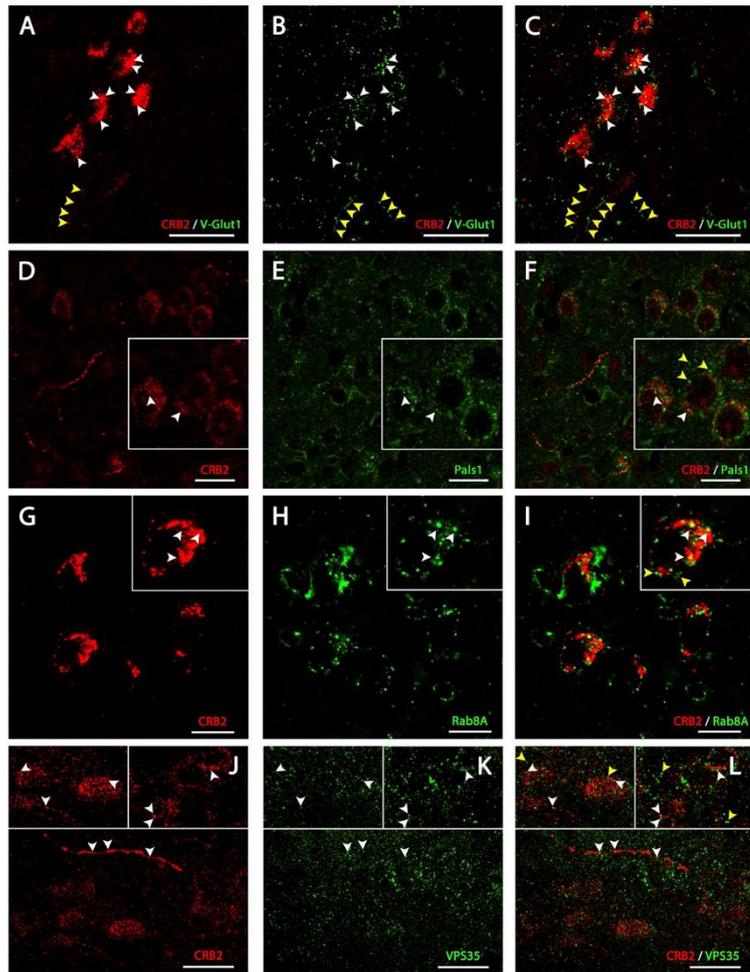


Figure 4. CRB2 localization in vesicular compartments in the cell bodies of neurons. Double immunofluorescence of CRB2 (A,C) and V-Glut1 (B,C) and CRB2 (D,F) and Pals1 (E,F) in coronal sections of adult mouse PVN. (A–C) The CRB2 punctate labeling found in the cell bodies partially colocalize with some V-Glut1 labeled profiles (white arrowheads). (D–F) CRB2 (arrowheads in D) and Pals1 (arrowheads in E) frequently colocalize in the labeled profiles in both soma and in cell processes, but there are some Pals1 profiles which are not labeled for CRB2 and vice versa (yellow arrowheads). Double immunofluorescence analysis of CRB2 (G–I) and Rab8A (H–I) and CRB2 (J–L) and VPS35 (K–L) in coronal sections of adult mouse PVN. CRB2 labeling (arrowheads in G) in cell bodies colocalize partially with Rab8A (arrowheads in H and I), but there are some Rab8A profiles independent of CRB2 (yellow arrowheads in I). CRB2/VPS35 labeling shows partial colocalization throughout sections, but there are VPS35 positive profiles not labeled for CRB2. Scale bars: 20 μ m (A–C), 100 μ m (D–F), 10 μ m (G–I), 20 μ m (J–L).

vesicles trafficking from the cell membrane through a retromer-controlled endocytic pathway. The CRB2/Rab8A immunofluorescence analysis showed partial colocalization (white arrowheads in Fig. 4I), suggesting that in some vesicles, CRB2 is travelling together with Rab8A through the same exocytic pathway, although not all Rab8A vesicles contained CRB2 and vice versa (yellow arrowheads in Fig. 4I).

Differential expression of CRB2 in WT and CRB1^{rd8} adult mouse brain. To try to discern whether the dysfunctional CRB1 protein in the CRB1^{rd8} mouse brain may cause any phenotype related with the expression of CRB2 in this organ, based on their similarity in structure and functions in other tissues, we compared the expression of CRB2 in WT and CRB1^{rd8} mice brains. CRB2 was found in a punctate distribution throughout diverse brain areas such as cortex (Figs 1A, 5A,B) hippocampus and cerebellum (Fig. 1A, Supplementary Fig. 2A–D). In the hippocampus, CRB2 protein expression was more abundant in the CA3 area (Supplementary Fig. 2A,B) and in cerebellum, CRB2 protein expression was enriched in the Purkinje layer (Supplementary Fig. 2C,D). Comparing the CRB2 protein expression in hippocampus (Supplementary Fig. 2B), cerebellum (Supplementary Fig. 2D), hypothalamus (Fig. 1B,C, Supplementary Fig. 2E,F) and SOR area (Fig. 1B,C, Supplementary Fig. 2H) of WT and CRB1^{rd8} mouse models, no major differences were observed regarding the intensity, distribution or enrichment of the CRB2 labelling. On the other hand, the organization of the cortex into segregated layers allowed us to better analyze the precise distribution of the punctate staining of CRB2 in these layers. It was observed that CRB2 was not evenly distributed throughout the different cortical layers; being particularly enriched in layers II/III and V (Fig. 5A). Interestingly, we found that the expression of CRB2 in the cortex of the CRB1^{rd8} mouse was apparently more abundant than that of the WT (Fig. 5A,B). ImageJ software was employed to quantify the immunolabeling of CRB2 in three animals of each genotype (WT and CRB1^{rd8}). First, we quantified the labeling of each separate layer and compared the differences in labeling among layers. To analyze the labeling within the different layers, the cortex was reconstructed using images from each section of every animal included in the study, and then the cortex layers were individually analyzed using the ImageJ software. Using the threshold tool, the labeling intensity of CRB2 was resolved over a black background and the pixel size and circularity of the smallest particle labeled was used as the minimum baseline for quantification. This analysis was performed in five different areas in each cortex layer of the animals analyzed to standardize the data. By using these parameters, we obtained a number of CRB2 positive particles for each cortex layer and genotype, and a relative CRB2 labeling/pixel. This configuration of size and circularity, was constant in all of the experiments and animals analyzed. This analysis demonstrated that in both phenotypes, most of the CRB2 protein is predominantly localized in layer V (Fig. 5C). Although this labeling intensity was not statistically different among the same layers of the two genotypes, statistically significant differences between layers I and V were detected in both WT and CRB1^{rd8} mice, and between layers I and VI, but only in CRB1^{rd8} mouse (Fig. 5C). The lower p-values in the mutant mouse indicated a greater difference in CRB2 labeling in this background. When analyzing the CRB2 labeling in the entire area of the cortex without distinguishing any of the layers, the statistical results showed that there was a significant difference in the amount of immunofluorescence in the cortex of the two genotypes analyzed (Fig. 5D).

The expression of CRB2 in the brain of CRB1^{rd8} and WT mice was also analyzed by WB. The differential WB analysis of the cortex (Cx), hippocampus (Hc) and cerebellum (Cb) areas (Fig. 5E) showed that at least in Cx there is a statistically significant increase in the amount of CRB2 protein in the mutant compared to WT (Fig. 5F). This data verifies the results obtained with the immunofluorescence analysis, where the signal of CRB2 was higher in the Cx of CRB1^{rd8} mouse mutant compared to control (Fig. 5A,B) and no differences in the intensity or enrichment of CRB2 in CRB1^{rd8} Hc and Cb areas were found compared to control (Supplementary Fig. 2). In order to elucidate whether the increase in CRB2 in CRB1^{rd8} brain, as shown by immunofluorescence and WB, could modify the expression of other proteins known to be directly associated with CRB, we performed WB analysis of some of them. Certain members of the Par complex, such as Par3, involved in the acquisition of cell polarization, and proteins involved in the establishment and maintenance of the cell-cell adhesions, such as β -Catenin and occludin, were analyzed (Supplementary Fig. 3A). Even though a relative increase in the level of β -catenin in the Cx and Cb was apparent (Supplementary Fig. 3B) we did not detect any statistically significant differences in the levels of expression of any of these proteins when comparing CRB1^{rd8} and WT tissue samples.

Discussion

CRB2 expression in brain. In this study, the expression of CRB2, one of the three members of the CRB protein family, in adult mouse brain, was investigated. Previous works have shown the expression of CRB1 in brain¹⁶, but to date there is no data regarding the expression and localization of CRB2 in this tissue; although it has been shown to be present in the mouse brain during embryogenesis^{21,41}, in the retinal pigment epithelium²⁰ and in neural retina^{42,43}. Although previous reports have suggested the presence of CRB2 mRNA in neurons³⁹, the lack of evidence supporting this could be due to the absence of proper tools that would have allowed more detailed studies. Thus, using a specific polyclonal antibody designed by our laboratory²⁰ our work shows, for the first time, the expression of the CRB2 protein in adult mouse brain, where it is enriched in certain areas. Also, the detailed confocal microscopy images of the double and triple immunofluorescence analyses clearly showed that CRB2 is exclusively expressed in subsets of neurons, in certain vesicular structures distributed in their cell bodies and in some processes. The experiments performed in our study could not reveal why only specific neurons located in certain brain areas expressed a higher amount of CRB2 than others, or whether the CRB2 + neurons from different brain areas had something in common. Further and more detailed studies to find out the specific role that CRB2 may have in these neurons and the analogies that they share are needed to solve these questions.

CRB2 subcellular localization. When analyzing the distribution of CRB2 in mouse brain, a condensed punctate labeling in the soma of some neurons was detected, as well as another labeling that resembled projections of these cells. Since CRB2 is a transmembrane protein and its final destination is the plasma membrane, it

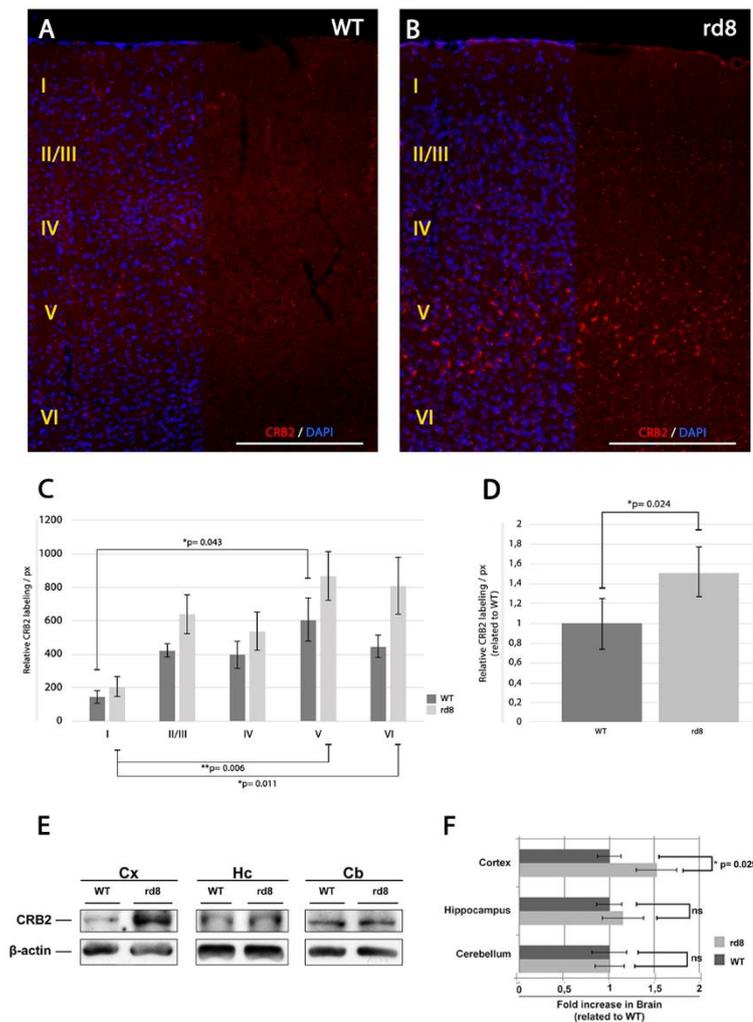


Figure 5. CRB2 distribution in the mouse cortex. (A–B) Immunofluorescence CRB2 labeling of a sagittal section of the adult WT (A) and CRB1^{rd8} (B) Cortex of the mouse brain showing the protein distribution throughout the layers of the cortex. (C) Graph showing the quantification of the CRB2 relative labeling/px in the different layers of the cortex of WT and CRB1^{rd8} mice. (D) Graph showing the normalized quantification of the CRB2 relative labeling/px in the whole CRB1^{rd8} mouse cortex related to WT. (E–F) WB analysis of the expression of CRB2 in adult WT and CRB1^{rd8} mice brain. (E) Comparative CRB2 (150 kD) protein expression in WT and CRB1^{rd8} mice cortex, hippocampus and cerebellum areas. Blots were cropped from the same gel and quantitative comparisons were performed between samples of the same blot. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 4. (F) Graph obtained from data in E showing the comparative quantification of CRB2 protein expression in WT and CRB1^{rd8} mice cortex, hypothalamus and cerebellum. β -actin (42 kD) was used as the loading control. DAPI (in blue): nuclear labeling. Scale bars: 200 μ m. Data are presented as mean \pm s.e.m. Statistical information: The Kolmogorov Smirnov test was used to assess the normality of sample distribution. In C-WT, more than three groups were analyzed with one way-factorial ANOVA and the Bonferroni's post-hoc test (n = 3). In C-rd8, more than three groups were analyzed with Kruskal Wallis test (n = 3). In D, two

experimental groups were compared with the Student's T test (n = 3). In F, in all cases, two experimental groups were compared with the Mann Whitney U test (n = 15). Asterisks indicate statistical differences. Two asterisks indicate highly statistical differences.

was expected that the punctate labeling observed in the soma was associated with vesicles, both those trafficking from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex and those aimed to the plasma membrane as the protein is required to travel towards its target. This would also include those vesicles responsible for recycling the protein into endosomal compartments when endocytosis of the protein is required, as well as other transmembrane components. The retromer complex is a key component involved in recycling endocytosed proteins from endosomes or the plasma membrane to the trans-Golgi network^{13,44}. The retrograde trafficking led by the retromer complex is crucial for the establishment of epithelial cell polarity, allowing the mediation of CRB to define the apical membrane^{14,45}. Likewise, it has been shown to preserve brain homeostasis through its role in preserving the progress of neurodegeneration⁴⁶. In other systems, retromer had already been implicated in the correct internalization and recycling of CRB proteins from the plasma membrane, sorting them away from the degradative route, with the purpose of ensuring their availability and efficiency for turnover and cell-membrane docking⁹. Our results show that most of the CRB2 protein in neurons is enclosed in vesicles, and confirm, as has been shown in other cell types, that the recycling of CRB2 from the cell membrane is accomplished, in part, by the retromer protein complex, revealed by the CRB2/VPS35 colocalization, being VPS35 a major component of the retromer complex⁴⁷; and taking into account that at least in *Drosophila*, Vps35 interacts with Crb and regulates its levels^{14,45}. Regarding the vesicles of the exocytic pathway, some of the synaptic vesicles containing V-Glut1, a vesicular glutamate transporter essential in the synaptic transmission, as it mediates the transport of glutamate into vesicles⁴⁸, contained CRB2, but only in the soma. Thus, this protein would travel together with glutamate in some cases and also with the small GTPase Rab8A protein, since our results confirmed that CRB2 is partially carried through the exocytic pathway together with these proteins. Rab8-containing vesicles seem to be involved in the growth of neurites during the development of PC12 cells *in vitro*⁴⁹, suggesting its role in this same process *in vivo*. Additionally, it has been previously shown that Rab8A mediates the transport of *de novo* generated CRB2-containing vesicles towards the plasma membrane⁹⁻¹¹, supporting the idea that this transport is important for the stabilization of the protein levels of members of the Crumbs complex. Additionally, our results also showed that some neuronal presynaptic terminals contain CRB2 together with synaptophysin or synapsin, proteins specific to the pre-synaptic vesicles, and this colocalization seems to occur preferentially in the neuronal projections, not in the soma. Therefore, it is probable that one of their final targets may be the SYP+ or synapsin+ synaptic vesicles, once the CRB2+/SYP-vesicles observed in the soma have reached the synaptic terminals. Our study reinforces this idea, although further experiments need to be performed in order to provide evidence of this in our model, and other components involved in this exocytic pathway deserve further investigation in the future.

Also, our results show that CRB2 is especially abundant in calbindin+ neurons, a calcium binding protein with broad expression in neurons⁵⁰ but mostly within the hypothalamic lateral area⁵¹. In fact, our data suggest that all neurons containing CRB2 in the soma were calbindin+, but not the opposite. All these results, together with the subcellular localization of CRB2, such as the presence of CRB2/Pals1 colocalization in these neurons expressing calbindin and its colocalization with some of the SYP+ or synapsin vesicles exclusively in the pre-synaptic terminals and V-Glut1+ profiles, seem to be in line with an hypothesis raised by other groups proposing that CRB2 may have a role in signaling and neuronal communication in the adult mouse brain. And that this role may be dependent on the final location of the protein and on the highly regulated exo- and endocytotic events. For example, a previous study has shown that a complete ablation of CRB1 and CRB2 proteins in mouse retina simulate a serious retinal disorder in human, and produces a dysregulation in the proliferative signaling pathway YAP/Hippo in the retinal progenitor cells³⁹. This hypothesis is consistent with many independent studies demonstrating the association between CRB proteins and different cell signaling pathways related with cell proliferation, differentiation and cell-cell adhesion have been proposed and studied in different organisms. For instance, some studies have found an increased level of calcium activity during neuronal signaling and neuronal communication in calbindin-positive neurons⁵²⁻⁵⁴, suggesting the importance of the levels of this molecule for this process. Also, in *Drosophila*, the protein homologous to CRB in these organisms has been shown to repress Notch activity, probably by direct interaction and also by limiting gamma-secretase complex activity, one of the proteases involved in Notch processing⁵⁵. Also, CRB proteins seem to mediate Hippo signaling, a pathway which directly regulates cell proliferation and apoptosis⁵⁶. It has been also shown that in *Drosophila*, the homologous of Pals1 (a member of the Crumbs complex) that interacts with the cytoplasmic domain of CRB1⁵⁷ and with CRB2⁵⁸ plays an important role in the synaptic junctions by recruiting or releasing neurotransmitters to or from the synaptic vesicles⁵⁹. It is also known that in mammalian brain, the expression of proteins of the MAGUK family, such as Pals1, occurs at synaptic junctions and have a central role regulating synaptogenesis, clustering synaptic receptors, organizing signal transduction pathways and modulating synaptic plasticity⁶⁰. Finally, our results showing the localization of CRB2 in different layers of the cortex and the latest studies performed in embryos demonstrating that CRB2 cooperates with Pals1 for the correct development of the cortex⁵⁸, are data that support the hypothesis that in adult mouse brain, CRB2 may lead to the correct establishment of the polarity of neurons and to the interaction with other proteins in the signal transduction pathway to facilitate the correct development of these areas.

CRB2 protein expression is more abundant in CRB1^{td8} mouse brain. The CRB1^{td8} mouse has a deficit in the CRB1 function^{33,34,61}, and our study shows that at least in cortex, there is an increase in the expression level of the CRB2 protein. It is known that CRB1 and CRB2 share a similar molecular structure and, interestingly, in the retina both are co-expressed in the same cell types; for example, in the membrane of Müller cells near the

outer limiting membrane, where they could be performing similar functions⁴³. In addition, although it has not yet been proven, it has been suggested that in some cell types these two proteins are redundant. For instance, some compensatory mechanisms may occur in retinal Müller glial cells, suggesting that the level of one of the proteins could become increased when the other protein becomes defective, although this theory has yet to be shown in this cell type⁶². Our data supports this idea, since defects in the function of CRB1 seem to generate an increase in CRB2 expression in the CRB1^{rd8} mouse brain, which could indicate a compensatory effect in response to this malfunction. This compensatory effect (or gain of function) could also explain the fact that no variation in the relative amounts of proteins such as Par3, β -Catenin and Occludin were observed, whose roles are associated with those of CRB proteins. However, we did notice an increasing trend in β -Catenin protein levels in the CRB1^{rd8} mouse brain areas analyzed. It is known that both CRB2 and β -catenin have crucial roles during gastrulation^{62,63} due, in part, to the importance of the correct function of polarity proteins during the differentiation of progenitor cells via signaling pathways such as Wnt^{7,62,64}. Additionally, it has been described that the removal of CRB2 produces a decrease in the presence of adherens junction proteins, like β -catenin, during brain development, a finding which supports our results⁴¹. On the other hand, it is interesting that, while lack of function of CRB1 in human retina causes retinal dystrophies, this same mutation does not cause any apparent brain dysfunction or manifest functional alteration^{17,29–32}. Our results showing an increase in CRB2 protein expression in the CRB1^{rd8} mouse brain, although exclusively in the cortex, and the fact that the levels of other proteins that cooperate in these functions are not considerably modified, may somehow explain the lack of an obvious brain phenotype. Further and more detailed studies regarding the collaborative interaction of these proteins in other areas of the brain are needed to confirm this hypothesis.

In conclusion, the novelties of our study are that it demonstrates the presence, distribution and localization of the CRB2 protein in mouse brain and also suggests that the increase in the levels of CRB2 in the CRB1^{rd8} mutant could respond to a possible compensatory mechanism that may counteract defects in the functioning of CRB1 in the mutant mouse model. Moreover, this is the first study providing proof that the CRB2 protein is only expressed in neurons in the brain, where it is localized in some neuronal presynaptic terminals, and in exocytic and endocytic vesicles.

Materials and Methods

Animals. All procedures used in this work were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive 2010/63/UE and Spanish legislation RD 53/2013 for the use and care of animals. All the details of the study were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca. For this study, 14 adult (post-natal or P) 180 to 200-day-old wild-type C57BL/6J and mutant C57BL/6J CRB1^{rd8} mice were used to carry out the immunofluorescence analysis; 15 adult (P180–P200) mice of both genotypes for the Western Blot analysis (WB) and 6 adult (P120) mice for the reconstruction of the cortex and quantification of the immunofluorescence labeling using the ImageJ software.

Western blot analysis. Mice were euthanized with carbon dioxide. Portions of the Cortex (Cx), Hippocampus (Hc) and Cerebellum (Cb) areas were lysed in RIPA buffer (150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 50 mM Tris, pH 8.0) containing protease inhibitor cocktail (1:1000 Sigma-Aldrich[®]). Each piece of tissue was homogenized in different tissue grinders, maintained under constant shaking for 2 h at 4 °C and centrifuged at 15,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected, the amount of protein was measured using the Bradford's assay, mixed with 20% Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrates (Bio-Rad Laboratories[™]) and absorbance at 595 nm was measured with a LT40000 Microplate reader (Labtech[®]). The proteins were then 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 loaded onto a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes, blocked for 1 h at room temperature (RT) in a solution with 2% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline-Tween (0.1%) (TBST) and immunolabeled overnight at 4 °C with the primary antibodies of CRB2 (custom-made³⁰, 2.25 μ g/ml), β -actin (Sigma-Aldrich[®], 1:5000), Par3 (Millipore, 1:250), β -catenin (Santa-Cruz Biotechnology[®], 1:100) and Occludin (Invitrogen[™], 1:200) in a solution of 2% BSA in TBST. After several washes in TBST, the membranes were incubated with 1:10000 anti-rabbit IgG, 1:10000 anti-goat IgG, 1:10000 anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch[™]) or 1:10000 protein-A and 1:10000 protein-G (Life Technologies[™]) conjugated with horseradish peroxidase in 2% BSA and 2% nonfat dried milk in TBST for 60 min. At RT, the membranes were washed with TBST and developed with Pierce[™] ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). As negative controls, the nitrocellulose membrane was incubated without the primary or secondary antibodies and without both.

Immunofluorescence. The animals were anaesthetized with chloral hydrate 5% (p/v) in NaCl 0.9% (p/v), and perfused transcardially with a solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 (PB) and the brains were dissected out and post-fixed by immersion for 2 h at RT in the same fixative. Later, brain tissue was cryoprotected with a 30% sucrose solution in 0.1 M PB at pH 7.4, embedded in OCT (Tissue-Tek[®] O.C.T.™) and 30 μ m sections were obtained using a freezing-sliding microtome (Leica[®] frigomobil, Jung SM 2000 Leica[®], Nusscoch Germany). Sections were washed in a PBS solution (0.1 M, pH 7.4) and then stored at 4 °C in a freezing solution (30% glycerol and 30% ethylene glycol in 0.1 M PB at pH 7.4). For immunolabeling, sections were rinsed in PBS with Triton Tx-100 at 0.2% (Sigma-Aldrich[®]) (PBS-Tx) and blocked for 2 h with 1% BSA and 5% normal serum in PBS-Tx. Section were then incubated overnight at 4 °C with 1% BSA, 2% normal serum and the primary antibodies for CRB2 (custom-made³⁰, 2.25 μ g/ml), Pals1 (Abnova, 1:100), Synaptophysin (Sigma-Aldrich[®], 1:5000), PSD95 (Affinity Bioreagents[™], 1:500), V-Glut1 (Synaptic Systems, 1:500), VPS35 (Santa Cruz[®], 1:50), Rab8A (Abcam[®],

1:100), Calbindin (Swant[®], 1:1000), Tuj1 (Biolegend[®], 1:500), Iba1 (Santa-Cruz Biotechnology[®], 1:250), Olig1 (Everest Biotech, 1:100), MAP2 (Sigma[®], 1:1000) and Synapsin 1a/b (Santa-Cruz Biotechnology[®], 1:200). Following on, the sections were washed with PBS and PBS-Tx and incubated for 90 min at RT with 1:250 Cy3 and 1:250 Cy2 (Sigma-Aldrich[®] Jackson ImmunoResearch[™]) or 1:750 Alexa fluor 488, 1:750 Alexa fluor 555 and 1:750 Alexa fluor 633 (Thermo Fisher) fluorescent secondary antibodies and DAPI (1:10000). The sections were cover-mounted using Prolong[®] Gold antifading reagent (Life Technologies[™]). Also, negative controls were prepared by excluding the primary or secondary antibodies in the incubation steps.

Immunohistochemistry. Selected sections were labelled using the Avidin-Biotin Complex (ABC) method. After cryoprotection, the sections were washed in a PBS solution (0.1 M, pH 7.4) and then rinsed in a solution with PBS, methanol and 30% H₂O₂ to remove endogenous peroxidase activity within the tissue. After rinsing with PBS-Tx (0.4 M, pH 8), the sections were incubated with the CRB2 antibody (custom-made²⁰, 2,25 µg/ml at 4 °C for 72 h. Next, the sections were washed in PBS-Tx (0.4 M, pH 8) and incubated for 2 h with the secondary anti rabbit Ig-G biotinylated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) conjugated to horseradish peroxidase in PBS-Tx. The sections were incubated for 3 h in a solution with PBS-Tx (0.4 M, pH 8) and the avidin-biotin peroxidase kit (ABC complex, Vector) and labeling was developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB 0,2%) as chromogen. The negative staining controls were prepared without the primary or secondary antibodies.

Imaging. Images were obtained using different types of microscopes: an epi-fluorescence microscope, Olympus[®] Provis AX70, coupled to a digital DP Olympus[®] camera; a laser scanning spectral confocal microscope, Leica[®] TCS SP2, with the pinhole set at 1.2 Airy Units and 40x and 63x immersion oil objectives (488 nm and 543 nm were used to excite Cy2 or Alexa 488 and Cy3 or Alexa 555 fluorochromes, respectively, and 633 nm was used to excite the TOPRO3 fluorochrome); and an inverted Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, UC, USA) coupled to an Axiocam MRm Zeiss[®] camera for live-cell imaging. The images were captured and processed using Leica Confocal Software (DP controller software Leica[®]) and ZEN 2011 imagen software (Carl Zeiss Microscopy). The brightness and contrast of all original images were further processed and adjusted using Adobe Photoshop CS6.

Statistical analysis. All statistical analysis were performed using Microsoft Excel (Microsoft[®] Office 2013) and SPSS (IBM, Armonk, NY) software. The Kolmogorov Smirnov test was used to assess the normality of sample distribution. Two experimental groups were compared with the Student's T test for parametric data, and Mann Whitney U test for not parametric data. More than three groups were analyzed with one way-factorial ANOVA and the Bonferroni's post-hoc test for parametric data, and the Kruskal Wallis test for not parametric data. Values were expressed as mean ± standard error for the mean (SEM). Values of *P < 0.05 were considered significant and **P < 0.01 highly significant. Values non-significant were indicated by ns.

References

- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallei-Pocachard, E., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 614–630 (2008).
- Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J. P., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 2149–2169 (2009).
- Bulgakova, N. A. & Knust, E. The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *Journal of cell science* **122**, 2587–2596 (2009).
- Valtorta, F., Pozzi, D., Benfenati, F. & Fornasiero, E. F. The synapsins: multitask modulators of neuronal development. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 378–386 (2011).
- Arimura, N. & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews Neuroscience* **8**, 194–205 (2007).
- Ellenbroek, S. I., Iden, S. & Collard, J. G. Cell polarity proteins and cancer. *Seminars in cancer biology* **22**, 208–215 (2012).
- Martin-Belmonte, F. A. & Mirna, P.-M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**(23), 38 (2012).
- Richard, M. *et al.* Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Human molecular genetics* **15**(Spec No 2), R235–243 (2006).
- Roman-Fernandez, A. & Bryant, D. M. Complex Polarity: Building Multicellular Tissues Through Apical Membrane Traffic. *Traffic* **17**, 1244–1261 (2016).
- Sato, T. *et al.* Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *Journal of cell science* **127**, 422–431 (2014).
- Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**, 513–525 (2009).
- Peranen, J. Rab8 GTPase as a regulator of cell shape. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 527–539 (2011).
- Seaman, M. N. & Williams, H. P. Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Molecular biology of the cell* **13**, 2826–2840 (2002).
- Zhou, B., Wu, Y. & Lin, X. Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs. *Developmental biology* **360**, 87–95 (2011).
- Richard, M., Grawe, F. & Knust, E. DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 895–907 (2006).
- den Hollander, A. I. *et al.* Isolation of Crb1, a mouse homologue of *Drosophila* crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mechanisms of development* **110**, 203–207 (2002).
- den Hollander, A. I. *et al.* Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* **23**, 217–221 (1999).
- van den Hurk, J. A. *et al.* Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Molecular vision* **11**, 263–273 (2005).
- Xiao, Z. *et al.* Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **240**, 2646–2656 (2011).
- Paniagua, A. E. *et al.* CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Scientific reports* **5**, 14504 (2015).

21. Ramkumar, N. *et al.* Protein O-Glucosyltransferase 1 (POGLUT1) Promotes Mouse Gastrulation through Modification of the Apical Polarity Protein CRUMBS2. *PLoS genetics* **11**, e1005551 (2015).
22. Herranz-Martin, S. *et al.* Immunocytochemical evidence of the localization of the Crumbs homologue 3 protein (CRB3) in the developing and mature mouse retina. *PLoS one* **7**, e50511 (2012).
23. Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S. & Margolis, B. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* **302**, 21–29 (2003).
24. Szymaniak, A. D., Mahoney, J. E., Cardoso, W. V. & Varelas, X. Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Developmental cell* **34**, 283–296 (2015).
25. Varelas, X. *et al.* The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Developmental cell* **19**, 831–844 (2010).
26. Klebes, A. & Knust, E. A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Current biology: CB* **10**, 76–85 (2000).
27. Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. & Campuzano, S. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* **166**, 549–557 (2004).
28. Karp, C. M. *et al.* Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer research* **68**, 4105–4115 (2008).
29. den Hollander, A. I. *et al.* Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *American journal of human genetics* **69**, 198–203 (2001).
30. Hanein, S. *et al.* Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Human mutation* **23**, 306–317 (2004).
31. Lotery, A. J. *et al.* Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Archives of ophthalmology* **119**, 415–420 (2001).
32. Lotery, A. J. *et al.* CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic genetics* **22**, 163–169 (2001).
33. Mehalow, A. K. *et al.* CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Human molecular genetics* **12**, 2179–2189 (2003).
34. Pang, J. J. *et al.* Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Molecular vision* **11**, 152–162 (2005).
35. Slavotinek, A. *et al.* CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *American journal of human genetics* **96**, 162–169 (2015).
36. Jaron, R. *et al.* Expanding the phenotype of CRB2 mutations - A new ciliopathy syndrome? *Clinical genetics* (2016).
37. Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H. C. & Murgod, S. Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP* **19**, 221–229 (2015).
38. Thiery, J. P., Aclouque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
39. Boroviak, T. & Rashbass, P. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem Cells* **29**, 193–205 (2011).
40. Ikeda, M. & Allen, C. N. Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *The European journal of neuroscience* **17**, 1111–1118 (2003).
41. Dudok, J. J., Murtaza, M., Henrique Alves, C., Rashbass, P. & Wijnholds, J. Crumbs 2 prevents cortical abnormalities in mouse dorsal telencephalon. *Neuroscience research* (2016).
42. Alves, C. H. *et al.* Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Human molecular genetics* **22**, 35–50 (2013).
43. van Rossum, A. G. *et al.* Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Human molecular genetics* **15**, 2659–2672 (2006).
44. Temkin, P. *et al.* SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature cell biology* **13**, 715–721 (2011).
45. Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. & Knust, E. Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Current biology: CB* **21**, 1111–1117 (2011).
46. Wang, S. & Bellen, H. J. The retromer complex in development and disease. *Development* **142**, 2392–2396 (2015).
47. Collins, B. M. The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic* **9**, 1811–1822 (2008).
48. Wilson, N. R. *et al.* Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 6221–6234 (2005).
49. Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-1 during neurite outgrowth. *Biology open* **3**, 803–814 (2014).
50. Baimbridge, K. G., Miller, J. J. & Parkes, C. O. Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain research* **239**, 519–525 (1982).
51. Meszar, Z., Girard, F., Saper, C. B. & Celio, M. R. The lateral hypothalamic parvalbumin-immunoreactive (PV1) nucleus in rodents. *The Journal of comparative neurology* **520**, 798–815 (2012).
52. Bastianelli, E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* **2**, 242–262 (2003).
53. Kojetin, D. J. *et al.* Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca2+-loaded calbindin-D(28K). *Nature structural & molecular biology* **13**, 641–647 (2006).
54. Schwaller, B. The continuing disappearance of “pure” Ca2+ buffers. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **66**, 275–300 (2009).
55. Herranz, H., Stamatakis, E., Feiguin, F. & Milan, M. Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-secretase activity. *EMBO reports* **7**, 297–302 (2006).
56. Ling, C. *et al.* The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10532–10537 (2010).
57. Roh, M. H. *et al.* The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *The Journal of cell biology* **157**, 161–172 (2002).
58. Kim, S. *et al.* The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron* **66**, 69–84 (2010).
59. Budnik, V. Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Current opinion in neurobiology* **6**, 858–867 (1996).
60. Funke, L., Dakoji, S. & Bredt, D. S. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annual review of biochemistry* **74**, 219–245 (2005).
61. Aleman, T. S. *et al.* Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. *Investigative ophthalmology & visual science* **52**, 6898–6910 (2011).
62. Pellissier, L. P. *et al.* Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS genetics* **9**, e1003976 (2013).
63. Haegel, H. *et al.* Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121**, 3529–3537 (1995).
64. Rudloff, S. & Kemler, R. Differential requirements for beta-catenin during mouse development. *Development* **139**, 3711–3721 (2012).

Acknowledgements

The authors thank Emma-Jane Keck for revising the English version of the manuscript, and Dr. Enrique Saldaña from the Laboratory for the Neurobiology of Hearing (Institute of Neurosciences of Castilla y León) for the assistance with the immunohistochemistry assays. This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias Instituto Carlos III (P115/01240), co-funded by European Union (ERDF/ESF, "Investing in your future") to C.L. A. Velasco, R. Arévalo and C. Lillo are members of the UIC.077 from Junta de Castilla y León.

Author Contributions

J.E.D. designed the study, conducted the experiments, contributed to interpretation of the data and to the writing of the manuscript; A.E.P., V.V. and A.S. participated in the acquisition and interpretation of data; A.V. and R.A. participated in the design of the study and interpretation of the data; and C.L. conceived the project hypotheses and aims, supervised the experiments, contributed to the interpretation of the data and to the writing of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30210-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

