



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

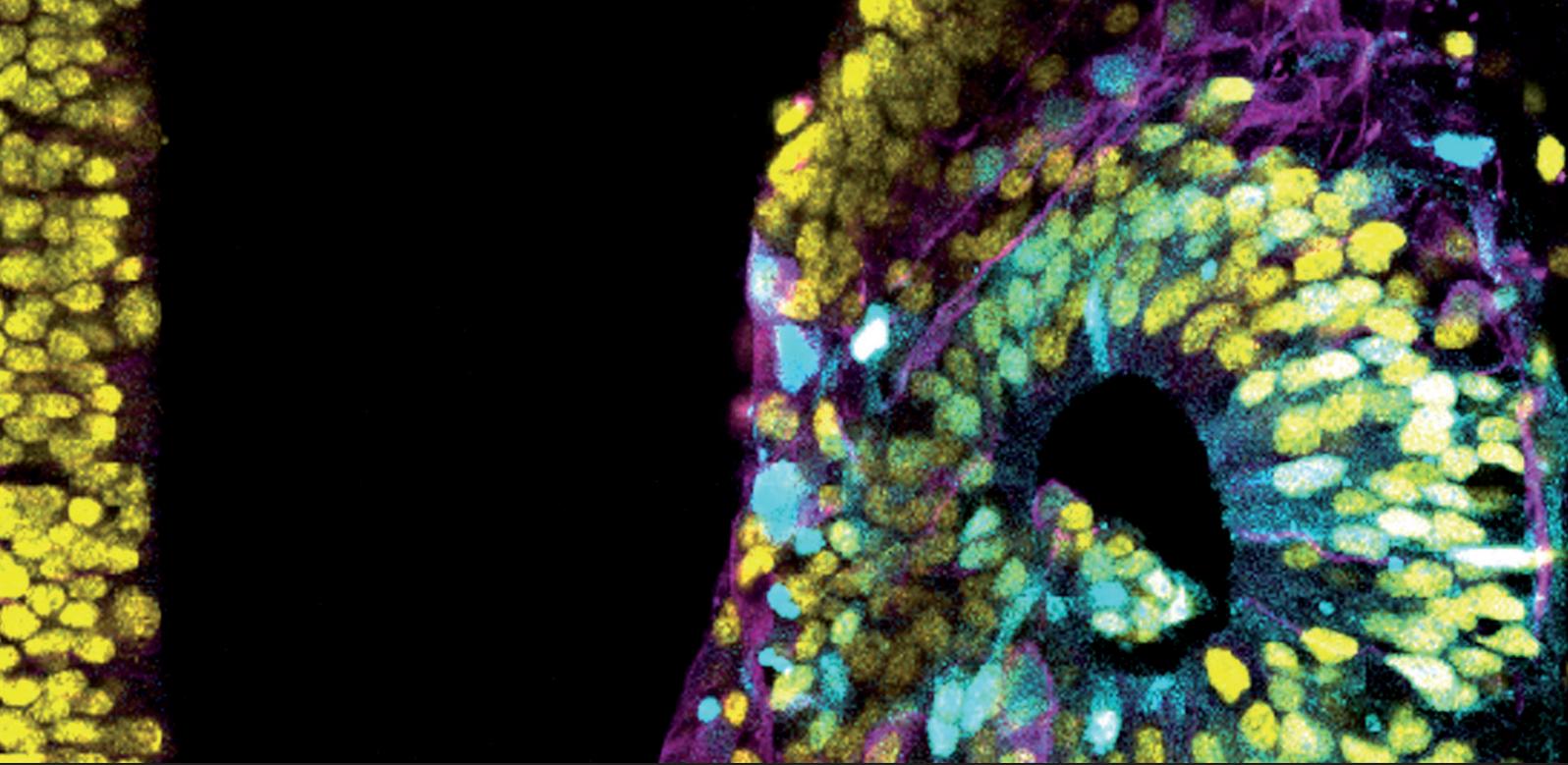
El control de la polaridad celular de los neuroblastos por β -Catenina en la génesis del Meduloblastoma Wnt

Antonio Herrera Camacho

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

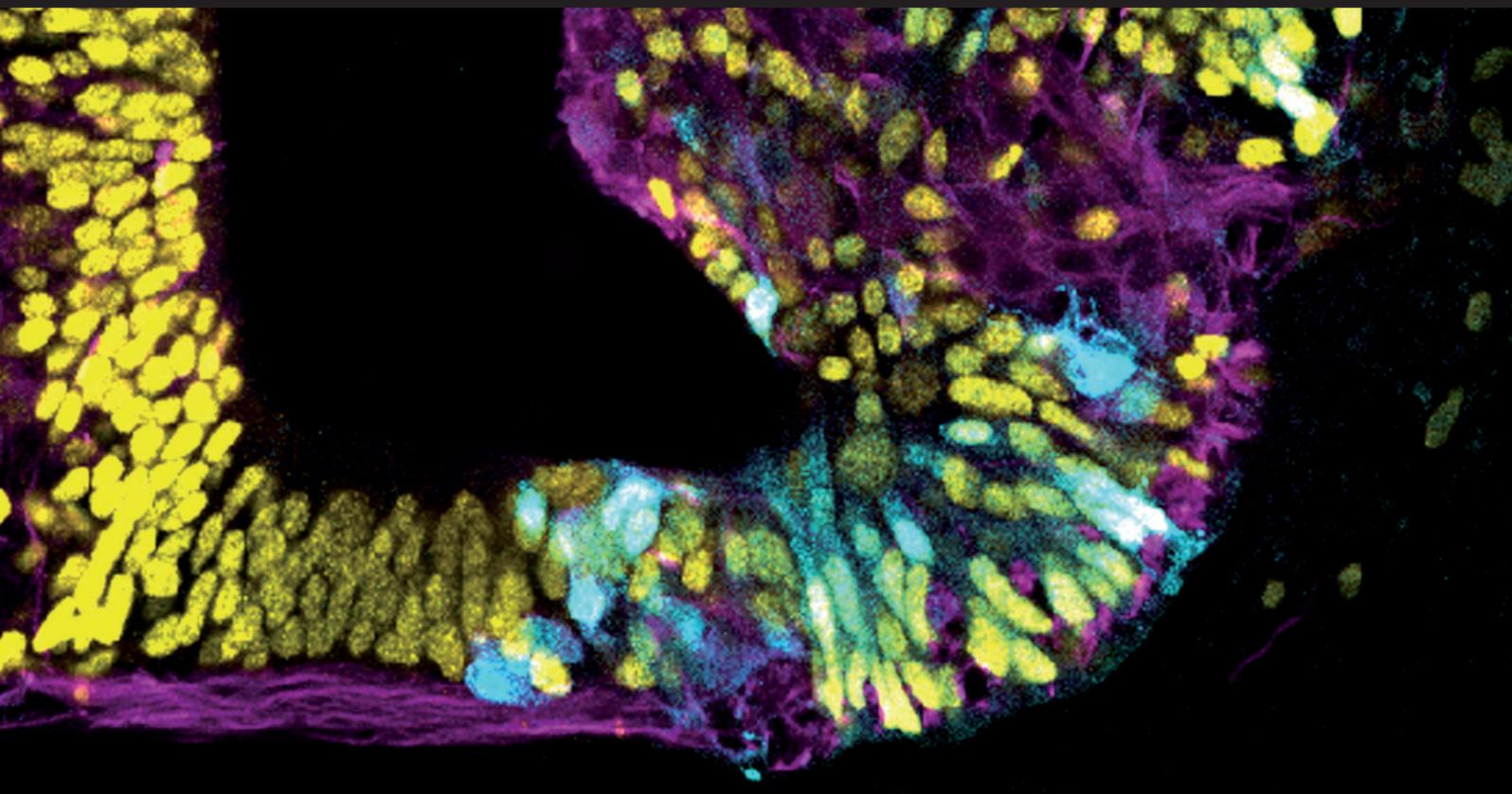
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



El control de la polaridad celular de los neuroblastos por β -Catenina en la génesis del Meduloblastoma Wnt

Antonio Herrera Camacho
Barcelona, 2015





Programa de Doctorado en Biotecnología
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
2014/2015

El control de la polaridad celular de los neuroblastos por β -Catenina en la génesis del Meduloblastoma Wnt

Tesis realizada por Antonio Herrera Camacho en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC) para optar al título de doctor por la Univesitat de Barcelona.

DIRECTOR

DOCTORANDO

Sebastián Pons Fuxà

Antonio Herrera Camacho

Para vencer en un laberinto es imprescindible la técnica del ensayo-error. La ciencia usa el error, trabaja con el error, avanza con el error. Un científico se equivoca prácticamente el cien por cien de su tiempo y cuando deja de equivocarse es bien posible que publique un descubrimiento de mérito. El error obliga a buscar y a probar otra alternativa. Pero nada de todo ello es posible sin memoria. La memoria guarda sobre todo los errores. La memoria sirve sobre todo para archivar errores. Por eso, resolver una ruta laberíntica es un ejercicio continuo de innovación y error, un ejercicio de intuición y memoria donde la intuición es un roce entre lo ya comprendido y lo que aún está por comprender.

Laberints. Ramon Espelt.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
2.1 Desarrollo del sistema nervioso.....	10
2.1.1 Desarrollo antero-posterior del tubo neural.....	11
2.1.2 Especificación dorso-ventral del tubo neural.....	12
2.1.3 Desarrollo del cuarto ventrículo.....	15
2.1.4 Desarrollo embrionario del cerebelo.....	16
2.2 Wnt/ β -Catenina	18
2.2.1 Estructura de β -Catenina y su función estructural y transcripcional.....	19
2.2.1 Cascada de señalización Wnt/ β -Catenina.....	20
2.2.2 β -Catenina en la membrana.....	23
2.3 La polaridad celular.....	24
2.3.1 Migración nuclear intercinética.....	24
2.3.2 La polaridad ápico-basal de los neuroblastos.....	25
2.3.3 Las uniones adherentes.....	26
2.3.4 El complejo Par3-Par6-aPKC.....	29
2.3.5 El establecimiento de la polaridad ápico-basal.....	30
2.3.6 Proteínas de polaridad y orientación del huso mitótico.....	32
2.3.7 Tipo de división y especificación celular.....	35
2.4 Wnt/ β -Catenina y cáncer.....	37
2.4.1 Meduloblastoma.....	39
2.4.2 Células madre iniciadoras de tumor.....	43
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo general.....	48

3.2	Objetivos concretos.....	48
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	Electroporación de formas oncogénicas de β -Catenina causa crecimientos preneoplásicos en el tronco encefálico dorsal.....	50
4.2	La contracción apico-basal de células $s\beta$ -Catenina+ conduce a severas malformaciones del neuroepitelio.....	53
4.3	$s\beta$ -Catenina requiere la transcripción dependiente de TCF pero no la unión a α -Catenina para inducir malformaciones neuroepiteliales.....	55
4.4	$s\beta$ -Catenina regula la formación del complejo apical (AC) a través de mecanismos dependientes e independientes de TCF.....	57
4.5	La actividad quinasa de aPKC ι es esencial para la formación y mantenimiento del complejo apical.....	61
4.6	β -Catenina dirige el transporte apical de las proteínas del AC a través de su interacción con N-Cadherina.....	63
4.7	El mantenimiento del complejo apical dependiente de N-Cadherina es esencial para el estado progenitor.....	70
4.8	La expresión de aPKC ι K274W y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat disminuye la formación de malformaciones inducidas por $s\beta$ -Catenina.....	73
4.9	Identificación de nuevas proteínas asociadas al complejo β -Catenina/N-Cadherina implicadas en la formación del complejo apical.....	74
5.	DISCUSIÓN.....	77
5.1.	El origen del meduloblastoma Wnt.....	78
5.2.	Una excesiva formación de complejo apical evita la diferenciación de los progenitores neurales.....	80
5.3.	Divisiones neurogénicas y contracción ápico-basal.....	81
5.4.	El papel de β -Catenina en la formación del AC.....	84
6.	CONCLUSIONES.....	90
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	92
7.1.	Electroporación in ovo de embriones de pollo.....	93
7.2.	Cultivos de las líneas celulares.....	93
7.3.	Constructos de DNA.....	93

7.4.	Anticuerpos y reactivos.....	94
7.5.	Western blot.....	94
7.6.	Fraccionamiento subcelular.....	95
7.7.	Análisis de glicosilación. PNGaseF y EndoH.....	95
7.8.	Purificaciones Strep-Tactin®.....	96
7.9.	LS-MS/MS.....	96
7.10.	Inmunotinciones.....	96
7.11.	Análisis cuantitativo de imágenes.....	97
7.12.	Incorporación de BrdU e inmunohistoquímica.....	97
7.13.	Citometría de flujo (Fluorescence Associated Cell Sorting (FACS)).....	97
7.14.	Cell sorting.....	98
7.15.	Análisis del número de divisiones usando CellTrace Violet.....	98
7.16.	Real-Time PCR.....	98
7.17.	Ensayos de Luciferasa.....	99
7.18.	Análisis estadístico.....	99
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	100

Resumen

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario la capa ectodérmica sufre un proceso de diferenciación que desemboca en la aparición de tres capas germinativas; el ectodermo externo que dará lugar principalmente a la epidermis; la cresta neural encargada de generar el sistema nervioso periférico (SNP); y el ectodermo neural o neuroectodermo encargado de la génesis del sistema nervioso central (SNC). El neuroectodermo sufre un proceso de transformación que genera una estructura tubular conocida como tubo neural. Al avanzar el desarrollo embrionario, el tubo neural experimenta una elongación rostro-caudal. A medida que esta estructura va creciendo, en la región rostral del neuroepitelio aparecen diferentes vesículas que serán el origen del encéfalo (prosencefalo, mesencefalo, romboencefalo). La región del romboencefalo será la encargada del desarrollo del cerebelo (r1) y del tronco encefálico (r2-r8), generando además una cavidad entre ambas estructuras conocida como IV ventrículo. A diferencia de la región encefálica, la región más dorsal del neuroepitelio mantiene su estructura tubular y será la encargada de generar la médula espinal. La adquisición de las diferentes identidades neurales a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural es determinada por los gradientes dorsales de los morfógenos BMP y Wnt, que determinan las diferentes identidades de las neuronas sensoriales, y el gradiente ventral del morfógeno Shh, que da lugar a las diferentes neuronas motoras.

Los progenitores del tubo neural se caracterizan por poseer una polaridad ápico-basal donde su membrana plasmática apical queda orientada hacia la cara luminal mientras su membrana plasmática basal conecta con la lámina basal. Esta característica genera importantes diferencias moleculares entre ambas regiones y permite el correcto desarrollo del tubo neural. Durante los primeros estadios del desarrollo, las células del tubo neural experimentan sucesivas divisiones proliferativas con el propósito de incrementar el número de progenitores. Las distintas fases del ciclo celular son llevadas a cabo en diferentes localizaciones en un viaje de ida y vuelta desde el dominio apical al dominio basal (migración nuclear intercinética (INM)). Durante la fase G1 el núcleo migra hasta la zona basal, donde comienza su fase de síntesis de DNA (fase S). Durante la migración hasta la membrana apical la célula completa la duplicación de material genético, y una vez situada en el dominio apical, lleva a cabo la mitosis y culmina la división celular (fase M). Las proteínas localizadas en la membrana apical componen lo que definimos como complejo apical (AC) y son determinantes para la orientación y anclaje de los microtúbulos mitóticos durante la mitosis.

El complejo apical de los neuroblastos está formado principalmente por las proteínas de polaridad (complejo Par-aPKC, complejo Crumbs) y por las uniones adherentes (N-Cadherina/ β -Catenina). Al comenzar la neurogénesis, las células destinadas a diferenciarse colocan su núcleo en la parte basal del neuroepitelio (migración lateral), se deshacen su complejo apical mediante un proceso de abscisión, y comienzan su diferenciación generando la capa del manto.

La función de β -Catenina es esencial para el correcto desarrollo del tubo neural al ser pieza clave en la cascada de señalización Wnt que determina las identidades neuronales dorsales (mediante la función transcripcional dependiente de TCF), y al formar parte de las uniones adherentes localizadas en el complejo apical (a través de su interacción con N-Cadherina, función estructural). Su capacidad de interacción con múltiples proteínas le permite ejercer ambas funciones. Esta importancia en el desarrollo hace que una regulación anómala de su actividad sea desencadenante de una gran variedad de tumores, entre ellos el meduloblastoma. El meduloblastoma es un tumor cerebral maligno localizado en la fosa posterior del cráneo. Su alta incidencia en niños lo hace el tumor pediátrico más común. Según su huella genética podemos clasificar a los meduloblastomas en cuatro subtipos: Shh, Wnt, Grupo 3 y Grupo 4. Cada subgrupo presenta una malignidad, invasividad y localización determinada. El subtipo Wnt, tiene su origen en los progenitores del tronco encefálico y se caracteriza por ser el de mejor pronóstico y menos propenso a metástasis dentro de los cuatro subtipos. Mutaciones estabilizantes de β -Catenina causan crecimientos preneoplásicos en el romboencéfalo que no adquieren malignidad a menos que sufran una segunda alteración genética. Estos crecimientos preneoplásicos no presenta una excesiva proliferación siendo un enigma el mecanismo por el cual β -Catenina genera esta población de células iniciadoras de tumor.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es el de estudiar el mecanismo por el cual mutaciones estabilizantes de β -Catenina generan crecimientos preneoplásicos en la región dorsal del romboencéfalo.

RESULTADOS

El modelo de ratón del meduloblastoma Wnt, *Blbp:CTTNB1^{exon3-/+}*, una forma estable de β -Catenina expresada en los progenitores del romboencéfalo genera crecimientos preneoplásicos altamente semejantes a los meduloblastomas Wnt humanos (Gibson et al., 2010). Con el objetivo de reproducir los estadios iniciales de estos tumores usamos el sistema PiggyBac (Lu et al., 2009), el cual permite una transfección estable de estas formas oncogénicas de β -Catenina (*s* β -Catenina) en los progenitores del romboencéfalo de pollo mediante ooelectroporación. Tras 7 días

post-electroporación (7dpe), el neuroepitelio presentaba crecimientos celulares que penetraban en el IV ventrículo. Estos crecimientos aberrantes incluían formaciones neuroepiteliales ectópicas en zonas internas del tejido formadas por células Sox2+ (Figura 24). Para determinar si un desequilibrio en el proceso de proliferación/diferenciación era el origen de estos crecimientos, analizamos la expresión de Sox2 (expresado en progenitores) y NeuroD o HuC/D (expresado en células diferenciadas) tras 24 y 48 horas de expresión de β -Catenina en diferentes regiones del tubo neural (romboencéfalo y medula espinal). Los ensayos mostraban que las células β -Catenina+ mantenían al mismo tiempo la expresión de Sox2 y la polaridad ápico-basal mientras que evitaban la diferenciación creando invaginaciones en la cara apical del neuroepitelio. El análisis de la cinética del ciclo celular nos mostraba que las células β -Catenina+ experimentaban un incremento en el ratio de proliferación en las primeras 24 horas de transfección, sin embargo, una vez que aparecían las invaginaciones (24hpe), las células disminuían su velocidad de ciclo debido a una extensión de la fase M (48hpe). Durante las invaginaciones las células β -Catenina+ sufrían una contracción ápico-basal de su citoplasma que desembocaba en la formación de lúmenes ectópicos (Figuras 25 y 26).

Para evaluar la influencia de la función estructural y transcripcional de β -Catenina en la génesis de estas malformaciones, usamos una colección de diferentes constructos que nos permitía aislar ambas funciones. Mientras la actividad transcripcional dependiente de TCF era requerida para la generación de las invaginaciones, β -Catenina no necesitaba de la unión a α -Catenina para generar dicho fenotipo. Sin embargo, la inducción de la actividad transcripcional dependiente de TCF no lograba reproducir el fenotipo generado por la expresión de β -Catenina+, sugiriendo que ambas funciones cooperaban en la génesis de las malformaciones (Figuras 27 y 29).

Ya que las invaginaciones comenzaban en la membrana apical, decidimos analizar si las proteínas del complejo apical se veían alteradas por la expresión de β -Catenina. Los ensayos de inmunohistoquímica y western blot nos mostraban que algunas proteínas apicales como aPKC y N-Cadherina estaban enriquecidas en el dominio apical tras la expresión de β -Catenina, concluyendo que β -Catenina inducía la formación del complejo apical. Además, β -Catenina causaba un aumento de la actividad de aPKC en las células que iniciaban invaginaciones (Figura 28). Los ensayos de *Real-Time PCR* e inmunohistoquímica nos mostraban que mientras el aumento de la expresión de aPKC era debido a una excesiva actividad transcripcional de β -Catenina, la acumulación apical de aPKC y N-Cadherina era dependiente de la actividad estructural de β -Catenina (Figura 29).

Con el objetivo de descifrar el mecanismo responsable de la localización apical de estas proteínas generamos varios mutantes de aPKC y N-Cadherina; dos formas de aPKC sin actividad quinasa (aPKC ζ ^{K281W} y aPKC ι ^{K274W}); y un mutante de N-Cadherina que carece del dominio de unión a β -Catenina (N-Cadherina $\Delta\beta$ -Cat). Sorprendentemente,

la expresión de los mutantes de aPKC sin actividad quinasa generaban diferencias fenotípicas llamativas. Mientras aPKC ζ^{K281W} no provocaba ninguna anomalía observable, la expresión de aPKC ζ^{K274W} causaba pérdidas de polaridad y una disminución del ratio de células mitóticas, demostrando un papel específico de aPKC ζ en ambos eventos (Figura 30). Las pérdidas de polaridad observadas con el mutante aPKC ζ^{K274W} eran reproducidas por N-Cadherina $\Delta\beta$ -Cat, sugiriendo que ambas proteínas estaban implicadas en un mecanismo común (Figura 33). Mediante diferentes experimentos demostramos que la interacción entre N-Cadherina y β -Catenina era requerida para la localización de las uniones adherente y aPKC en la membrana apical, sugiriendo que β -Catenina regula el transporte de las proteínas del complejo apical mediante su asociación a N-Cadherina (Figura 31,33,34).

Habíamos observado que las invaginaciones inducidas por $s\beta$ -Catenina comenzaban con una formación excesiva de complejo apical, y que las células que formaban estas invaginaciones se mantenían como progenitores Sox2+. Por lo tanto, nos planteamos que podría existir una relación entre el control de la polaridad ápico-basal y el mantenimiento del estado progenitor. Ensayos de luciferasa e inmunohistoquímica nos mostraban que tanto la expresión de $s\beta$ -Catenina como de la forma activa de aPKC, aPKC ζ^{ANT} (ambas proteínas inducen la formación de complejo apical) impedían la diferenciación de los progenitores neurales. Sin embargo, la expresión de los mutantes N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat y aPKC ζ^{K274W} inducía la diferenciación prematura de estos progenitores al mismo tiempo que causaban una pérdida de la polaridad ápico-basal (Figura 35). Estos resultados demostraban que la pérdida del complejo apical es un requisito esencial para la diferenciación de los progenitores del tubo neural. Además, la expresión de los mutantes N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat o aPKC ζ^{K274W} reducía significativamente la aparición de invaginaciones inducidas $s\beta$ -Catenina, demostrando que $s\beta$ -Catenina induce la formación de invaginaciones neuroepiteliales a través de la excesiva formación de complejo apical.

Por último decidimos identificar nuevas proteínas implicadas en la formación del complejo apical y por tanto en la génesis de crecimientos preneoplásicos inducidos por $s\beta$ -Catenina. Para ello, diseñamos una estrategia para identificar proteínas que se asociaban con N-Cadherina exclusivamente a través de su interacción con β -Catenina. Esta estrategia consistía en un tándem de purificaciones de N-Cadherina y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat mediante el sistema Strep-Tactin®, y una posterior identificación por LC-MS/MS (*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) de las proteínas presentes en ambos complejos. Las proteínas identificadas; Cdc42, ARHGDI, Destrina, DBNL, Queratina12, Cortactina, α -Actinina4 y Vinculina, han sido implicadas en diferentes eventos que conducen al establecimiento de la polaridad celular; formación de vesículas en el *trans*-Golgi, tráfico de vesículas a la membrana apical, activación apical de aPKC, formación de uniones adherentes y ensamblaje al citoesqueleto de actina, demostrando la importancia de la interacción N-Cadherina/ β -Catenina en la formación del complejo apical.

DISCUSIÓN

El origen del meduloblastoma Wnt.

Aunque *MYC* y *CCND1* son dianas directas de la cascada de señalización Wnt que tienen un potente efecto sobre la proliferación de los neuroblastos (Álvarez-Medina et al., 2009), una excesiva proliferación no parece ser la causa de la oncogenicidad de β -Catenina en el caso del meduloblastoma (Gibson et al., 2010). En la presente tesis, demostramos que la expresión de $s\beta$ -Catenina en el tejido neural en desarrollo causa anomalías que se inician con invaginaciones del neuroepitelio que acaban en estructuras similares a rosetas clásicas, donde las células permanecen como progenitores Sox2 pero inesperadamente poseen un ciclo celular lento. La actividad aberrante de β -Catenina impide la diferenciación de los progenitores neurales mediante una desproporcionada formación de complejo apical. Además demostramos que la reducida proliferación de los progenitores β -Catenina+ es causada por una extensión de la fase M (metafase/anafase), lo cual puede ser indicativo de dificultades en el proceso de alineamiento y separación de los cromosomas. La ilimitada capacidad de auto-renovación, acoplado a una incorrecta alineación/separación de los cromosomas, incrementa la posibilidad de que los neuroblastos $s\beta$ -Catenin+ adquieran nuevas alteraciones genéticas requeridas para el desarrollo del tumor.

El meduloblastoma Wnt es considerado el menos agresivo de los cuatro subgrupos, y por lo tanto es asociado con un pronóstico favorable (Taylor et al., 2012). Nuestros resultados demuestran que las lesiones inducidas por $s\beta$ -Catenina son debidas a una excesiva formación del complejo apical, proporcionando a las células una alta adherencia y un ciclo celular lento. En conclusión, las mismas anomalías celulares que convierten a estas células en células iniciadoras de tumor parecen contribuir a la baja malignidad característica de este subtipo de meduloblastomas.

Una excesiva formación de complejo apical evita la diferenciación de los progenitores neurales

Durante las divisiones neurogénicas ápico-basales los neuroblastos se dividen de forma que el huso mitótico queda orientado paralelo a la cara luminal del epitelio. De esta forma, una célula hija mantiene el complejo apical mientras la otra hereda la casi totalidad de la membrana baso-lateral. Sorprendentemente, la célula hija basal genera un nuevo polo apical y se mantiene como progenitor, mientras que la célula hija apical primero coloca su núcleo en la zona del manto, y continuación y de forma coordinada se deshace del complejo apical heredado y activa un proceso de retracción apical que da comienzo al proceso de diferenciación (Das&Storey 2012, 2014). Tras la abscisión del complejo apical, la expresión de p27 promueve la salida del ciclo celular y

da comienzo la remodelación morfológica que transforma a estas células en neuronas. Nosotros observamos que células que expresan una forma constitutivamente activa de aPKC (aPKC^{ANT}) permanecen como progenitores. Además, la expresión de β -Catenina impide la diferenciación al mismo tiempo que genera un sobredimensionado complejo apical que contienen altos niveles de aPKC activa. Un reciente estudio realizado en *Xenopus* muestra como la sobre-expresión de formas activas de aPKC impide la diferenciación inducida por p27 a través de la fosforilación directa de su dominio N-terminal (Sabherwal et al., 2014). Nuestros hallazgos demuestran que la interacción de β -Catenina con N-Cadherina favorece la activación de aPKC al mismo tiempo que impide la diferenciación. Por el contrario, la expresión de N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat o aPKC^{K274W}, moléculas que reducen la activación de aPKC, promueven la diferenciación de los progenitores neurales. En conclusión, el sobredimensionado complejo apical de las células β -Catenina+ podría evitar la normal abscisión de la membrana apical durante las divisiones neurogénicas, manteniendo una alta actividad de aPKC que podría impedir la salida de ciclo de estas células a través de la inhibición de p27.

Divisiones neurogénicas y contracción ápico-basal

La constricción apical durante la transición columnar-cuboidal está implicada en invaginaciones epiteliales durante la organogénesis (Lecuit & Lenne 2007; Llimargas & Casanova, 2010; Sawyer et al., 2010). Sin embargo, debido al estrecho polo apical que presentan los neuroblastos, la constricción apical posee una limitada capacidad de invaginación en el neuroepitelio. En las invaginaciones inducidas por β -Catenina un número importante de células permanecen arrestadas en fase M, sugiriendo que las fuerzas que distorsionan el neuroepitelio y las que obstruyen la correcta finalización de la mitosis podrían tener un origen común. En las divisiones planares, los microtúbulos astrales interactúan con G α -LGN-NuMA en la membrana lateral de la célula en mitosis, donde el anclaje apical de estos microtúbulos es prevenido por la actividad apical de aPKC a través de la fosforilación de LGN (Hao et al., 2010) y NuMA (Galli et al., 2011). En cambio, en divisiones ápico-basales (A-B), Inscutable (Insc) localiza el complejo Lis1-Dynein-Dynactin junto al complejo aPKC-Par y las uniones adherentes, permitiendo el reclutamiento de G α -LGN-NuMA en el dominio apical (Zigman et al., 2005). Una excesiva actividad de aPKC durante las divisiones ápico-basales podría alterar el anclaje de los microtubulos mitóticos en el dominio apical que impediría contrarrestar adecuadamente la tensión generada por los microtúbulos anclados en la membrana basal. Este desequilibrio podría ser el origen de alteraciones genéticas y del inicio de las invaginaciones en la cara apical. Por otro lado, durante las divisiones neurogénicas la expresión de genes implicados en diferenciación como Tis21 (*BTG2*) comienza durante la fase G1 del ciclo celular que da lugar a la división neurogénica (Saade et al., 2013). Tis21 controla la expresión de genes proneurales que activan los procesos que la célula destinada a diferenciarse debe llevar a cabo en las fases iniciales

de su diferenciación, como la abscisión y la retracción apical. La prolongada mitosis junto al sobredimensionado complejo apical de las células β -Catenina podría provocar la descoordinación entre el proceso de abscisión y retracción apical y podría contribuir a la progresión de la invaginaciones iniciales hasta la formación de rosetas. En resumen, proponemos un mecanismo para las invaginaciones inducidas por β -Catenina que comienza con una hiperactividad apical de aPKC consecuencia de una excesiva formación de complejo apical. Esta actividad aberrante de aPKC podría impedir el correcto anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana apical durante las divisiones A-B, siendo mayor la fuerza generada en dirección apical->basal que la generada en dirección basal->apical durante la mitosis, y conduciendo al inicio de las invaginaciones. Más tarde, una contracción ápico-basal de la membrana citoplasmática debida a una descoordinación entre el proceso de abscisión y retracción apical contribuiría al avance de la invaginación hasta la formación de lúmenes ectópicos.

El papel de β -Catenina en la formación del AC

β -Catenina induce la formación del complejo apical a través de una combinación de su función transcripcional y no transcripcional. Sin embargo, la característica que define a la polaridad celular es la distribución asimétrica de proteínas dentro de la membrana citoplasmática, y nuestros resultados demuestran que esta función no puede ser atribuida a la función transcripcional dependiente de β -Catenina. Sin embargo, su capacidad de interacción con N-Cadherina se revela como esencial para la distribución asimétrica de las proteínas de polaridad. Las proteínas identificadas en nuestro estudio, Cdc42, ARHGDI1, Destrina, DNL, Queratina12, Cortactina, α -Actinina4 y Vinculina, representan un nuevo grupo de moléculas asociadas a las uniones adherentes implicadas en la formación del complejo apical. Estas proteínas intervienen en los sucesivos eventos que conducen al establecimiento de la polaridad celular; formación y tráfico de vesículas de transporte desde el *trans*-Golgi hasta la membrana apical, acumulación y activación apical de aPKC, y enriquecimiento apical de uniones adherentes y actina. La gran capacidad de asociación que proporciona β -Catenina permite el establecimiento de estos múltiples complejos encargados de la formación del complejo apical.

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

El desarrollo del sistema nervioso en humanos abarca desde las primeras fases de la gestación hasta los primeros años de vida. Al alcanzar el desarrollo embrionario la etapa de la gastrulación, aparecen tres capas germinativas (Figura 1A): el endodermo, cuyas células llegarán a ser parte del sistema digestivo y respiratorio; el mesodermo, encargado de la génesis del sistema reproductor, excretor, osteoartromuscular y el circulatorio; y el ectodermo, del que derivan la epidermis y el sistema nervioso. Llegado el momento, el ectodermo se subdivide en otras tres poblaciones celulares: las células del ectodermo externo que darán lugar principalmente a la epidermis; las células de la cresta neural encargadas principalmente de generar el sistema nervioso periférico (SNP); y por último, las células del ectodermo neural o neuroectodermo encargadas de la génesis del sistema nervioso central (SNC) (Figura 1B). El proceso de maduración de la capa ectodérmica es conocido como neurulación primaria (Figura 1). Durante esta etapa, el ectodermo va adquiriendo características neurales. Inicialmente se forma la *placa neural* (Figura 1A), una monocapa pseudo-estratificada de células neuroepiteliales que se extiende rostrocaudalmente a lo largo del embrión. Más tarde, a medida que estas células van proliferando, las células de la parte central forman una invaginación (Figura 1B,C; *surco neural*), de manera que las partes más laterales de la placa neural se van elevando hasta que se fusionan llegando a formar un tubo cerrado conocido como *tubo neural* (Figura 1D), el cual será el origen del SNC. Una vez que se ha llevado a cabo el cierre del tubo neural, las células de la cresta neural comienzan su delaminación y migran hacia distintas localizaciones, adquiriendo nuevas identidades celulares necesarias para el desarrollo del SNP (Figura 1D) (Gilbert, 2000). Por lo tanto, en estos estadios iniciales el SNC es una estructura anatómicamente simple y muy conservada en vertebrados. La enorme accesibilidad y el rápido desarrollo del embrión pollo hacen de la ovo-electroporación del tubo neural de este animal un modelo perfecto para el estudio de mecanismos implicados en el desarrollo de SNC.

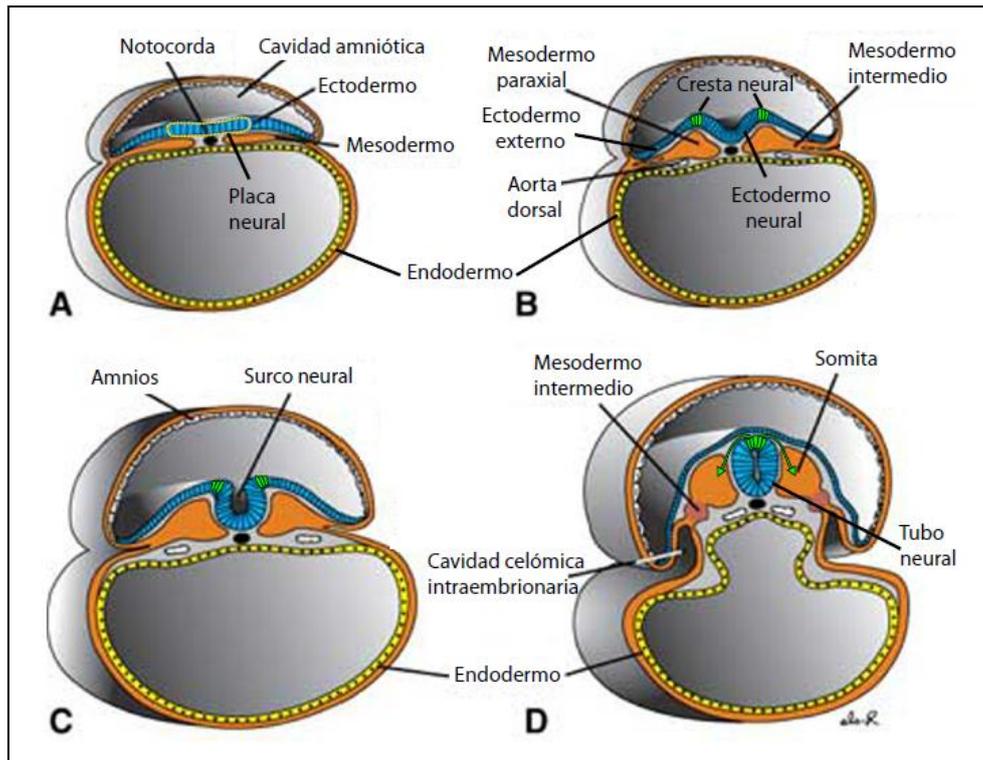


Figura 1: Esquema del proceso de neurulación primaria. **(A)** La placa neural (línea discontinua amarilla) se genera formando un epitelio bajo el cual se encuentra la notocorda. **(B)** El ectodermo se subdivide en ectodermo externo, cresta neural y neuroectodermo, y comienzo de la fase de plegamiento de la placa neural. **(C)** Elevación de la cresta neural y aparición del surco neural. **(D)** Cierre del tubo neural y migración de las células de la cresta neural. Modificación de la imagen obtenida de http://www.cosmicmindreach.com/sitebuilder/images/human_embryo_gastrulation-527x404.jpg.

Desarrollo antero-posterior del tubo neural

El lugar donde se origina la placa neural determinará la parte más rostral del tubo neural, y a medida que su desarrollo va avanzando, ésta estructura primaria crecerá hacia regiones más caudales o posteriores. De manera que antes de que la región más caudal o posterior haya aparecido, la región más rostral o anterior, donde el tubo neural ya se ha cerrado, está experimentando cambios en su estructura que llevarán a la aparición de las tres vesículas encefálicas primarias: prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio, y el romboencéfalo o cerebro posterior (Figura 2A). Estas vesículas rostrales darán lugar más tarde al encéfalo maduro (cerebro, cerebelo y tronco encefálico), mientras que la región más caudal del tubo neural ira elongándose a medida que se va produciendo la extensión caudal del embrión, hasta finalmente madurar y dar origen a la medula espinal. Pero el desarrollo del sistema nervioso es un proceso muy complejo que requiere de múltiples etapas antes de llegar a la maduración. Las vesículas encefálicas primarias sufren posteriormente una serie de constricciones y dilataciones hasta la aparición de las vesículas encefálicas secundarias (Figura 2B): Del prosencéfalo surgirá el telencéfalo, que se convertirá finalmente en los hemisferios cerebrales, y el diencéfalo, que dará

lugar al hipotálamo y las regiones talámicas del cerebro. Por otro lado, del romboencéfalo surgirán el cerebelo (r1) y las distintas estructuras del tronco encefálico (r2-r8) (Figura 3B). Para ello primeramente se dividirá en metencéfalo, que contribuirá al desarrollo del cerebelo y al puente troncoencefálico (*pons*), y en mielencéfalo, que acabará por convertirse en el bulbo raquídeo (*medulla oblongata*) (Gilbert, 2000). Por lo tanto, el desarrollo del sistema nervioso es un proceso dinámico y prolongado en el tiempo que consta de múltiples etapas hasta su maduración. A diferencia del pollo, donde el desarrollo del SNC se lleva a cabo durante la fase embrionaria (21 días de incubación), el sistema nervioso de los humanos culmina su desarrollo aproximadamente dos años después del nacimiento.

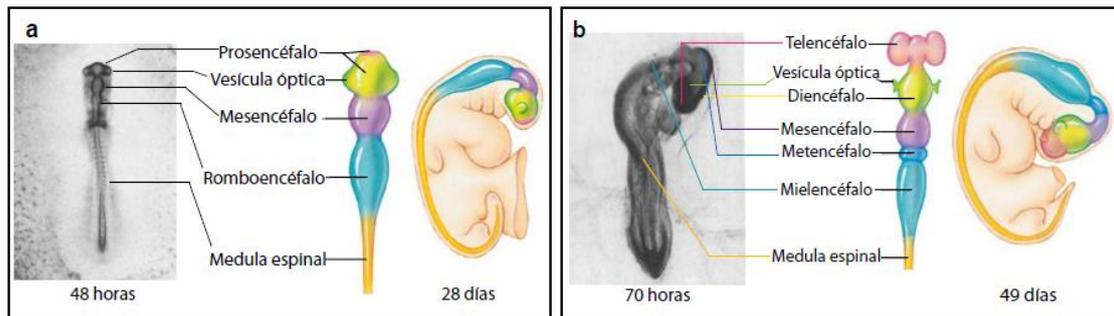


Figura 2: Esquema representativo de la aparición de las vesículas primarias (A) y secundarias (B) durante el desarrollo del embrión de pollo (a la izquierda cada una) y humano (derecha). Imágenes obtenidas de Hamburger & Hamilton, (1951) y <http://es.slideshare.net/dediego/embriologa-uph-teora08>.

Especificación dorso-ventral del tubo neural

Al mismo tiempo que se da el proceso de extensión rostro-caudal de la placa neural, las células de éste neuroepitelio llevan a cabo un proceso de especificación neuronal a través del eje dorso-ventral. Durante este proceso, estos progenitores van adquiriendo distintas identidades progenitoras en respuesta a las señales provenientes tanto de la placa del techo como de la placa del suelo del tubo neural (roof/floor plate). Desde el techo se genera un gradiente de morfógenos tales como BMPs (Bone Morphogenetic Proteins, BMP4, BMP6 y BMP7) y Wnts (Wnt1 y Wnt3a) que orquestarán los programas de expresión génica necesarios para la adquisición de las identidades dorsales e intermedias, que principalmente conducirán a esos progenitores a la posterior formación de los distintos tipos de neuronas sensoriales (Briscoe & Ericson, 2001; Le Dreau & Marti, 2012). Por otro lado, la especificación de los progenitores de la parte ventral del tubo neural, identificados por la expresión de Nkx6.1 (Figura 3M-R), dependerá del gradiente de otro morfógeno, Sonic Hedgehog (Shh) (Briscoe & Ericson, 2001; Michos et al., 2004). Inicialmente, el Shh sintetizado por la notocorda induce la especificación de las células de la placa del suelo del tubo neural, determinada por la expresión del factor de transcripción FoxA2 (Figura 3A-C). Más tarde, estas células comienzan a secretar Shh al ventrículo, creando un gradiente

ventro-dorsal que determina la adquisición de las diferentes identidades de los progenitores ventrales Nkx6.1 (Figura 3D-F). La adquisición de una identidad u otra, será determinada por la concentración de morfógeno que llegue al progenitor. De manera que los progenitores más ventrales y por lo tanto los que reciben una mayor concentración de Shh, adquieren la identidad de progenitores Nkx2.2. Mientras que los progenitores del siguiente dominio ventral, los cuales reciben una concentración media de Shh adquieren la identidad de progenitores Olig2 (Figura 3G-L).

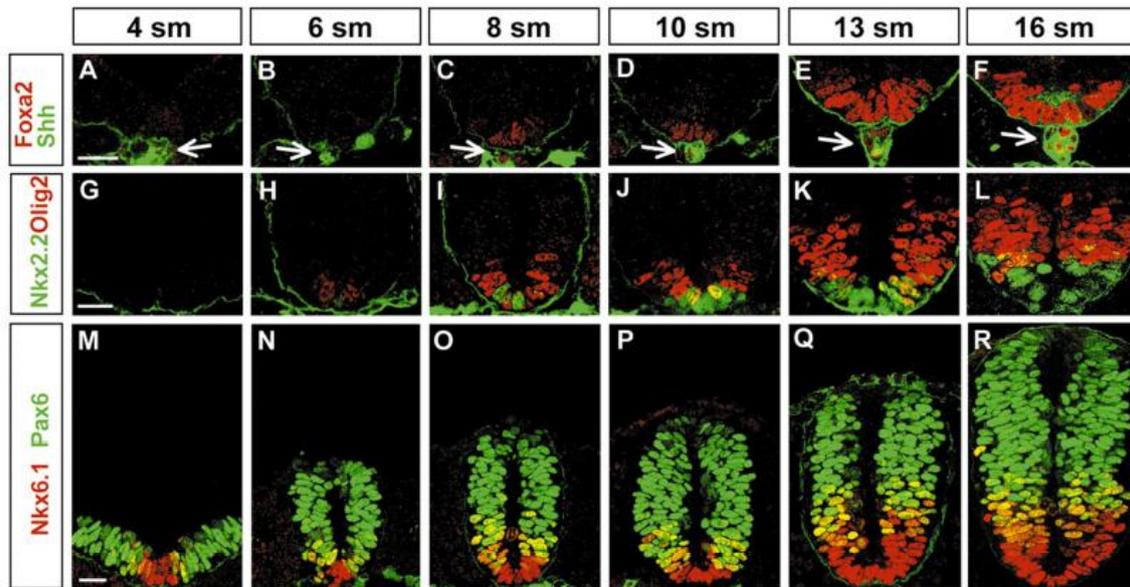


Figura 3: Especificación ventral dependiente de Shh (A-F) Formación del gradiente de Shh (verde) y adquisición de la identidad FoxA2 (rojo) por los progenitores de la placa del suelo. Las flechas indican la expresión de Shh en la notocorda. (G-L) Progresiva adquisición de las identidades Nkx2.2 (verde) y Olig2 (rojo). (M-N) Identificación de los progenitores ventrales Nkx6.1 (rojo) y dorsales Pax6 (verde). Los paneles superiores indican los diferentes estadios embrionarios (sm=somitas). Michos et al., 2004.

De la misma forma, los gradientes dorsales de BMPs y Wnts definen la identidad de los progenitores dorsales (Figura 4A). Mientras las células que reciben una mayor concentración de estos morfógenos reducen la expresión de Pax6 y presentan una alta expresión de Pax7 (Figura 4B), los progenitores de la parte media del tubo mantienen una alta expresión de Pax6 (Figura 3M-R).

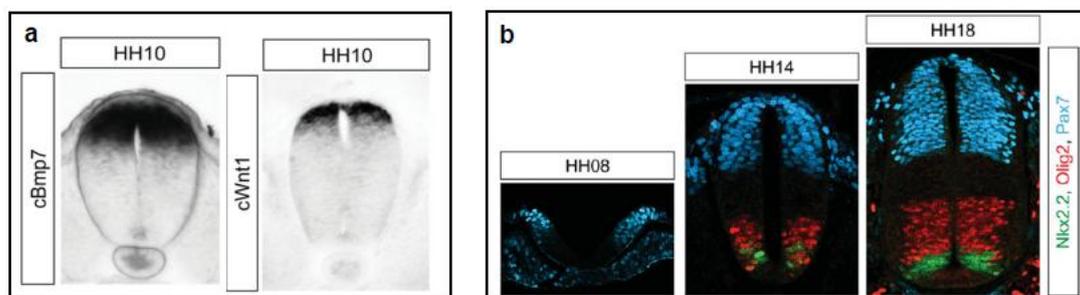


Figura 4: Especificación dorsal dependiente de Wnt y BMP (A) Hibridación in situ de secciones de pollo en estadio HH10 mostrando la expresión dorsal de BMP7 y Wnt1. (B) Inmunohistoquímica que muestra la progresiva aparición del dominio dorsal Pax7 (azul) y los dominios ventrales Nkx2.2 (verde) y Olig2 (rojo). HH08=4 somitas, HH14=22 somitas. Le Dreau & Marti, 2012.

Es importante mencionar que aunque estos progenitores hayan experimentado el proceso de especificación dorso-ventral, todos ellos siguen conservando propiedades de células madres multipotentes, como demuestra la expresión de Sox2 a lo largo del eje dorso-ventral (Figura 5B, Sox2 (verde)). Al comenzar la neurogénesis, los distintos dominios de progenitores generan diferentes subtipos neuronales que podemos dividir en 11 dominios (Figura 5A,B). Por un lado, los progenitores ventrales generan 5 dominios neuronales, que incluyen al dominio de motoneuronas (MN), las cuales proyectarán sus axones fuera del SNC hasta inervar los músculos, y los 4 dominios de interneuronas motoras (v0-v3), que regularan la comunicaciones entre las neuronas sensoriales y motoras (Figura 5B,6). Por otro lado, a partir de los progenitores dorsales surgirán 6 dominios de interneuronas dorsales (de dl1 a dl6, Figura 5B), que culminaran la génesis de las distintas interneuronas sensoriales de la medula espinal (Goulding, 2009). Estas interneuronas sensoriales se encargarán de procesar los impulsos provenientes de las neuronas sensoriales del SNP generadas a partir de las células de cresta (Figura 6).

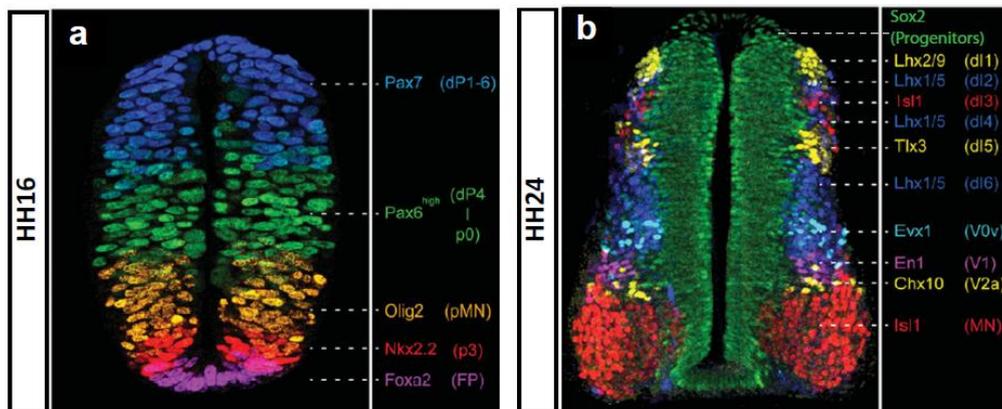


Figura 5: Especificación dorsal-ventral durante el desarrollo del tubo neural. **(A)** Reconstrucción fotográfica de inmunohistoquímica de secciones de tubo neural de pollo HH16, mostrando los distintos dominios de progenitores (FoxA2, Nkx2.2, Olig2, Pax6^{high} y Pax7). **(B)** Reconstrucción fotográfica de inmunohistoquímica de secciones de tubo neural de pollo HH24 mostrando la localización de los progenitores Sox2+(verde) en la zona ventricular y la expresión de los marcadores de las diferentes subpoblaciones de neuronas diferenciadas en la zona del manto. Le Dreau & Marti, 2012.

Los distintos tipos neuronales que se generan durante la neurogénesis se van acumulando en la parte basal del neuroepitelio, culminando allí su proceso de diferenciación. Ésta zona donde se acumulan los somas de las neuronas diferenciadas es conocida como capa del manto o *mantle zone* (MZ). A medida que el número de células diferenciadas va incrementando, la capa del manto se va engrosando tanto por su región dorsal como por la ventral, conformando la placa basal (engrosamiento ventral) y la placa alar (engrosamiento dorsal). El surco limitante separa la región motora ventral (placa basal) de la región sensorial ventral (placa alar). Al finalizar la neurogénesis la capa del manto queda rodeada por la capa marginal, una estructura que contiene las prolongaciones dendríticas y axónicas de las neuronas de la capa del manto, y que dará origen a la sustancia blanca. Recubriendo los axones y dendritas de

la sustancia blanca encontramos los oligodendrocitos, unas células generadas en la fase final de la neurogénesis encargadas de producir la vaina de mielina que permitirá la transmisión de los impulsos nerviosos en el SNC (Figura 6).

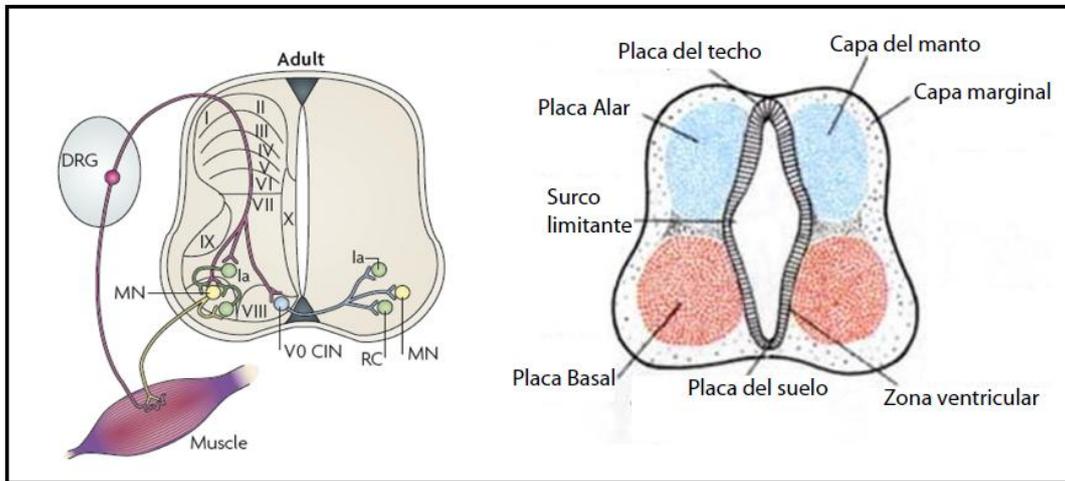


Figura 6: Representación esquemática de la medula espinal adulta. El dibujo de la izquierda muestra la posición y proyección de las distintas poblaciones neuronales; neuronas motoras (MN, amarillo), células de Renshaw (RC, derivan de las V1) e interneuronas inhibitorias Ia (verde) e interneuronas comisurales V0 (CIN, azul). Las láminas de la medula espinal son indicadas con números romanos. DRG=dorsal root ganglion, ganglio espinal. El dibujo de la derecha están representadas las distintas áreas de una medula espinal en un estado avanzado de desarrollo. Goulding, 2009.

Desarrollo del cuarto ventrículo

El cuarto ventrículo es una de las cuatro cavidades del cerebro por las que circula el líquido cerebroespinal (LCE). Esta cavidad está limitada en su parte ventral por el tronco encefálico y en su parte dorsal por el cerebelo. El LCE proveniente del III ventrículo entra en el IV ventrículo a través de un conducto localizado en su parte más rostral llamado acueducto del mesencéfalo, continuando su flujo tanto por la medula espinal a través del conducto central, como por unas aberturas laterales (agujeros de Luchka y Magendie) que comunican con el espacio subaracnoideo. El IV ventrículo comienza su desarrollo tras la aparición de las vesículas secundarias, en la región del romboencéfalo. Mientras en el desarrollo embrionario humano coincide con la novena semana de gestación, en el caso del pollo aparecen aproximadamente tras 3 días de incubación (Figura 7A). En éste estadio, la zona dorsal del tubo neural se ensancha formando una membrana transparente que recubre lo que denominamos canal neuronal romboencefálico y que será el origen del futuro cuarto ventrículo (Figura 7B,C). Al mismo tiempo van surgiendo los restantes ventrículos del sistema ventricular, III ventrículo y ventrículos laterales. En estos últimos aparecerán unas estructuras encargadas del filtrado del plasma llamadas plexos coroideos. Éste plasma filtrado será secretado al sistema ventricular formando el LCE.

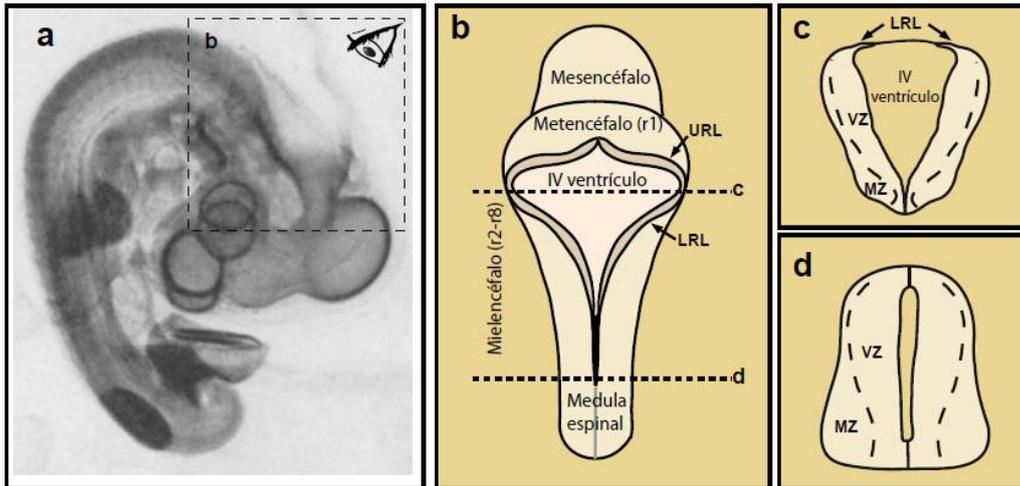


Figura 7: (A) Visión lateral de un embrión de pollo tras 4 días de incubación (HH23; Hamburger & Hamilton, 1951). (B) Esquema representativo de la visión dorsal del romboencéfalo de un embrión de pollo en estadio HH20 donde podemos observar el canal neuronal romboencéfalo (IV ventrículo), el URL (upper rhombic lip) y el LRL (lower rhombic lip). (C) Esquema representativo de una sección transversal de romboencéfalo (r2-r8) de un embrión de pollo HH23. (D) Esquema representativo de una sección transversal de medula espinal de un embrión de pollo HH23. VZ: Zona ventricular. MZ: Zona del manto.

Desarrollo embrionario del cerebelo

El cerebelo, cuya función es la de integrar las vías sensitivas y motoras, es una región del sistema nervioso central localizada en parte dorsal de la fosa posterior, por detrás del tronco encefálico y el IV ventrículo. El desarrollo del cerebelo comienza con la aparición de las vesículas secundarias, una vez establecida la frontera entre metencéfalo y mesencéfalo. Una vez delimitadas ambas regiones, se generan dos zonas germinativas que darán origen a las distintas poblaciones de precursores del cerebelo, la zona germinal ventricular (vz) y la zona germinal externa (egl). Ambas surgen de la región dorsal del metencéfalo (r1). Mientras la primera de ellas se origina de la zona más ventral dentro de esta región, en contacto con el IV ventrículo, la segunda se origina en la zona dorsolateral, la cual se pliega para definir el labio rómbico (URL, *upper rhombic lip*) (Figura 8A, sagital). Como antes he mencionado, el romboencéfalo ha experimentado previamente un proceso de ensanchamiento, de forma que en la porción más caudal los labios rómbicos (llamados en esta zona Lower Rhombic Lip, r2-r8) se encuentran separados por una membrana, mientras que a medida que se aproximan al metencéfalo, los labios rómbicos (aquí denominados Upper Rhombic Lip, r1) se van aproximando hasta confluir y formar la placa cerebelosa (cb) la cual será el origen del cerebelo (Figura 8A, dorsal). En el neuroepitelio del labio rómbico (URL), los precursores de la capa granular externa proliferan y posteriormente migran hacia la zona más superficial de la capa marginal, formando la capa granular externa (egl) (Figura 8A, sagital, flecha roja). Una vez allí, estas células llamadas progenitores de células granulares de cerebelo (PCGC) siguen proliferando en respuesta al Shh secretado principalmente por las células de Purkinjes provenientes de

la zona ventricular (vz) (Figura 8A, sagittal, flecha azul). La proliferación de la capa granular externa se puede llegar a mantener hasta dos años después del nacimiento (en humanos) y facilita el plegamiento progresivo de la capa cerebelosa que dará la característica forma al cerebelo adulto (Figura 8B). En cambio, los precursores de la zona ventricular (vz), que darán lugar a las células de Purkinje y a varias interneuronas inhibitorias, dejan de proliferar una vez que migran hacia la capa marginal. Una vez allí, las células de Purkinje se aglomeran formando una multicapa justo debajo de la capa granular externa (egl) (Figura 8A, sagittal, flecha azul), donde comienzan a secretar el Shh que induce la expansión de la EGL (Figura 8A, sagittal, flechas negras). A medida que la capa granular externa va creciendo, las células de Purkinje van adquiriendo una disposición ordenada hasta formar una monocapa conocida como capa de Purkinje (Butts et al., 2014).

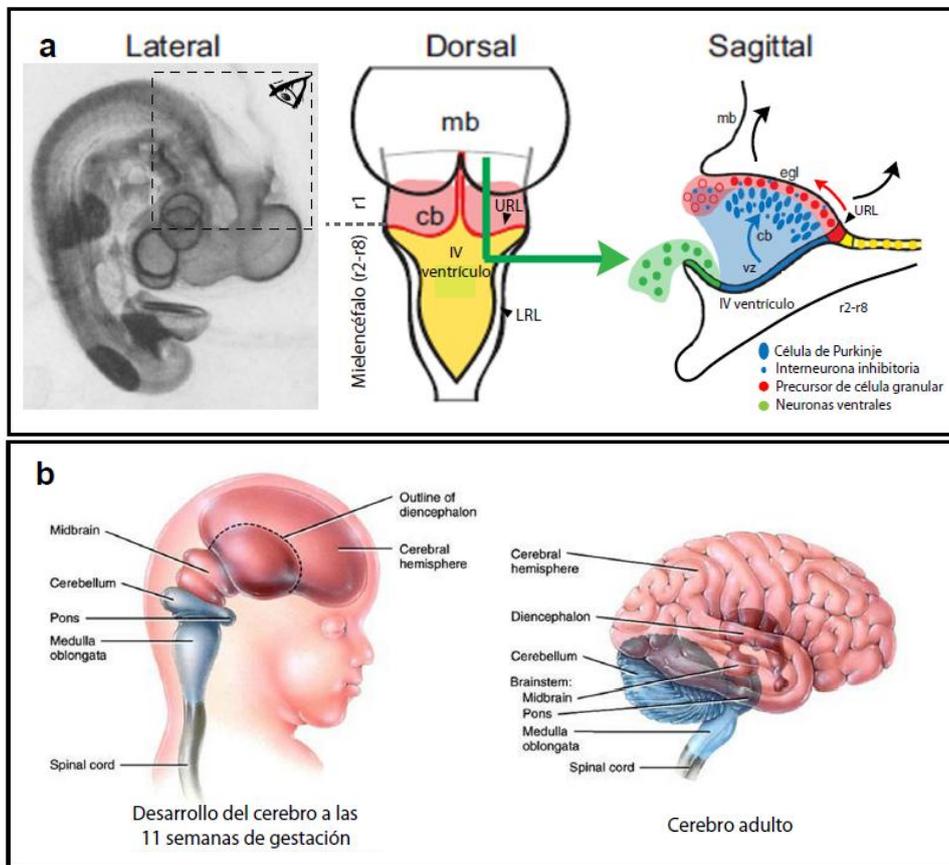


Figura 8: (A) Visión lateral, dorsal y sagittal durante el inicio del desarrollo del cerebelo de pollo (HH23; Hamburger & Hamilton, 1951). En la visión dorsal y sagittal se muestran las distintas zonas germinativas y tipos celulares cerebelares. Cb=cerebelo o placa cerebelosa, mb=mesencéfalo, URL=upper rhombic lip, LRL=lower rhombic lip, egl=capa granular externa, vz=zona germinal ventricular. (B) Representación gráfica del cerebro humano en dos etapas distintas del desarrollo indicando las diferentes regiones del SNC. La imagen de la izquierda representa al cerebro de un feto humano durante el inicio del desarrollo cerebelar (11 semanas de gestación). La imagen de la derecha representa a un cerebro adulto. Butts et al., 2014.

WNT/ β -CATENINA

La ruta de Wnt/ β -Catenina junto con otras como Notch, Hedgehog, TGF β /BMP, Hippo y las rutas mediadas por el receptor tirosina quinasa forman parte de un pequeño grupo de cascadas de señalización que regulan el desarrollo en organismos de menor y mayor complejidad. Aunque una amplia gama de funciones han sido otorgadas a la cascada de señalización de Wnt/ β -Catenina, esta ruta metabólica cumple un papel fundamental en la formación de patrones tanto en vertebrados como en invertebrados.

El desarrollo de técnicas de mutagénesis durante la década de los 70 permitieron a los Premios Nobel Eric Wieschaus y Christiane Nüsslein-Volhard llevar a cabo un estudio masivo de mutagénesis en *Drosophila melanogaster*. Aunque la mayoría de estas mutaciones eran letales, un pequeño grupo provocaba defectos durante el desarrollo que sugerían el requerimiento de la actividad de estos genes durante la embriogénesis. Para dar nombre a estos genes se basaban en la apariencia de los diferentes fenotipos, aunque un aporte de imaginación era requerido. Así aparece por primera vez *armadillo* (homologo de β -Catenina en *Drosophila*), que parecía definir la polaridad anterior-posterior de la larva de *Drosophila* (Wieschaus et al., 1984). A diferencia del embrión salvaje, donde la cutícula contiene segmentos con alternancia de filas de dentículos y cinturones desnudos, el mutante carecía de segmentos desnudos presentando dentículos en toda la cutícula (Figura 9A), semejante al caparazón del peculiar animal oriundo del continente americano (Figura 9B). Otro fenotipo característico de la pérdida de función de *armadillo* era la ausencia de alas en estos mutantes de *Drosophila*, fenotipo que compartían con otros mutantes con pérdida de función en un gen al que llamaron *Wingless*, homologo de Wnt en *Drosophila* (Sharma & Chopra, 1976; Lawrence & Morata, 1976). El hecho de que ambos genes presentaran un fenotipo similar indicaba que afectaba a un mismo proceso en el desarrollo, anticipando así las relaciones posteriormente descritas que nos hace entender hoy día el mecanismo de la ruta de Wnt/ β -Catenina.

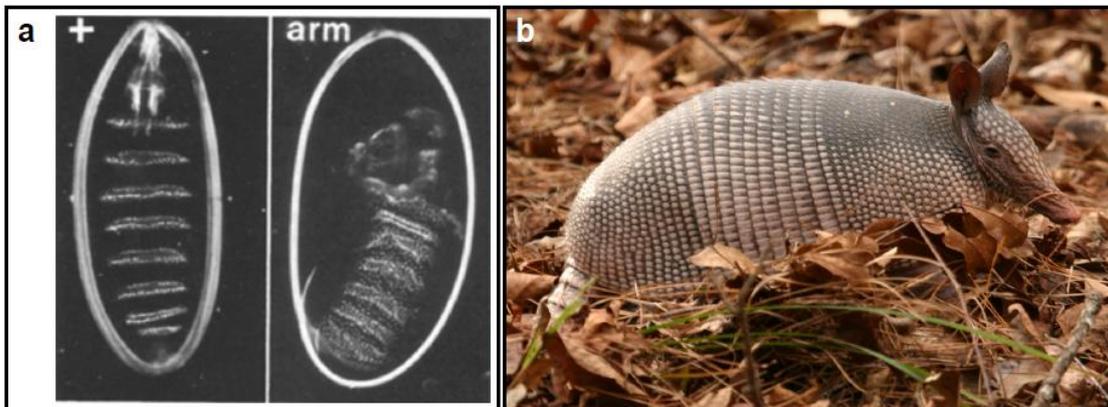


Figura 9: (A) Fotografía de campo oscuro de preparaciones de cutícula de un embrión salvaje (+) y del mutante de armadillo (arm) donde se aprecia la ausencia de segmentos desnudos (Wieschaus et al., 1984). **(B)** *Dasyurus novemcinctus* (armadillo). Fuente: Wikipedia.

Estructura de β -Catenina y su función estructural y transcripcional

β -Catenina es una proteína altamente conservada en metazoos que ejerce un papel importante en multitud de procesos durante el desarrollo y el mantenimiento de órganos adultos. A nivel celular la podemos encontrar tanto en la membrana celular, formando parte estructural de las uniones adherentes, como en el núcleo, ejerciendo de efector transcripcional de la ruta canónica de Wnt. Tanto su función estructural como la transcripcional parecen ser esenciales para el correcto desarrollo embrionario. Un claro ejemplo es el hecho de que la carencia de β -Catenina en células madres embrionarias impide la formación de mesodermo y neuroepitelio. Este déficit provoca en estas células defectos de adherencia y ausencia de señal transcripcional Wnt. Al incorporar una β -Catenina que solo presenta actividad estructural, estas células madres recuperan la integridad de las uniones adherentes y su habilidad de formar estructuras neuroepiteliales, sin embargo, necesitan de la actividad transcripcional de Wnt para restaurar la formación del mesodermo (Lyashenko et al., 2011). Por otro lado, en el tubo neural, donde la ruta de Wnt/ β -Catenina está implicada en procesos como la especificación de los progenitores neurales dorsales y la migración de las células de cresta, ambas funciones de β -Catenina parecen ser fundamentales (Valenta et al., 2011).

La composición estructural de β -Catenina le otorga la habilidad de ejercer ambas funciones. La estructura de β -Catenina se compone de una región central (del aa 141-665 de un total de 781aa en humanos) dividida en 12 repeticiones conocidas como dominios armadillos (ARM R1-R12). Esta región central presenta poca flexibilidad y sirve como dominio de interacción para sus diferentes *partners*, ya sea en membrana, en el citosol o en el núcleo. Flanqueando a esta región central se encuentran los dominios N-terminal y C-terminal (Figura 10A). Estos dominios son estructuralmente flexibles y pueden unir diferentes moléculas que regulan las interacciones de la región central (Huber et al., 1997; Solanas et al., 2004). Estudios de cristalización han demostrado que β -Catenina comparte dominio de interacción con muchos de sus principales *partners*, de manera que β -Catenina no se puede unir simultáneamente a moléculas como Cadherina, APC, Axin o TCF (Figura 10B), ya que todas estas moléculas se unen en la región que va del R3 al R9 a través de puentes salinos con la Lys312 y la Lys435 (Graham et al., 2000; Eklof Spink et al., 2001; Huber and Weis, 2001). El dominio C-terminal es esencial para la actividad transcripcional de β -Catenina, debido a que la mayoría de co-activadores transcripcionales interactúan con β -Catenina a través de este dominio (Mosimann et al., 2006). Por otro lado, por la región N-terminal β -Catenina se une a α -Catenina, a través del dominio de interacción de α -Catenina (aa120-151, Aberle et al., 1994). Adyacente a este dominio encontramos el dominio de unión a BCL9, un importante co-activador transcripcional (Figura 10A). La mutación en Asp164 (secuencia humana) inhibe ésta interacción y reduce drásticamente la actividad transcripcional de β -Catenina (Sampietro et al., 2006).

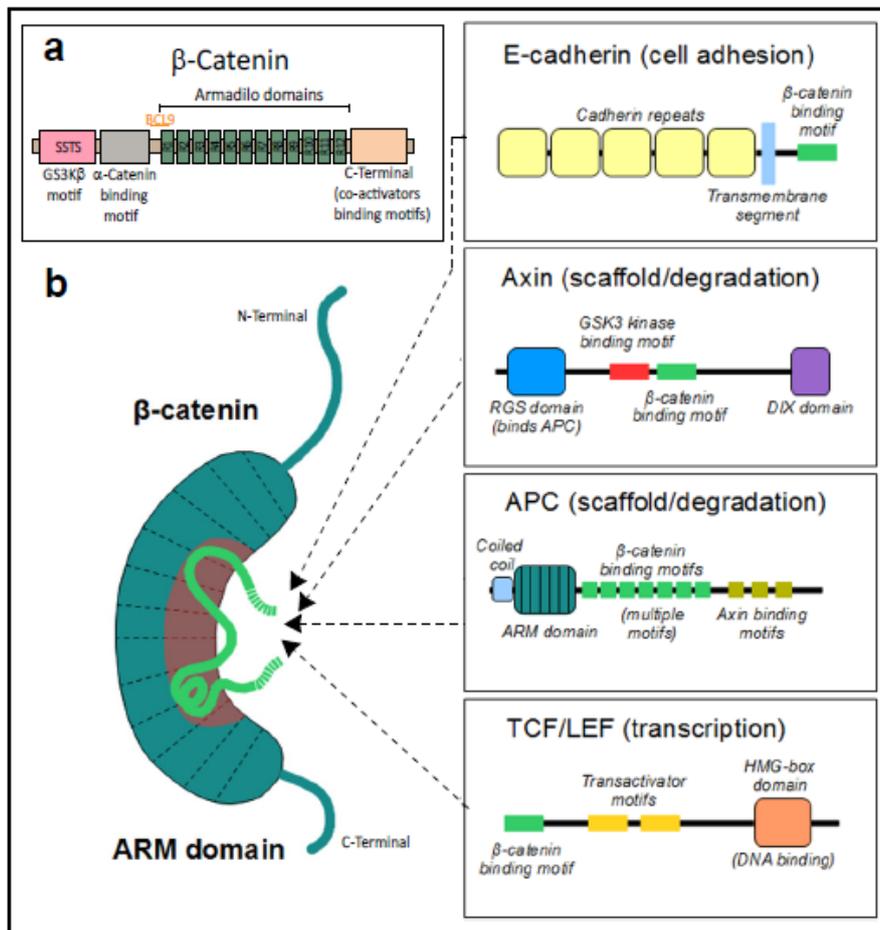


Figura 10: (A) Esquema de la estructura de β -Catenina. (B) Esquema de la estructura de las diferentes proteínas que interaccionan con β -Catenina. Los diferentes *partners* compiten por el mismo motivo de interacción en los dominios armadillo de β -Catenina (R3-R9). Imagen modificada de "Beta-catenin-ARM-domain-interactions" by Bubus12 - Own work. Licensed under CC BY 3.0 via Wikimedia Commons - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-catenin-ARM-domain-interactions.png>

Cascada de señalización Wnt/ β -Catenina

Como antes he mencionado, en 1984 había sido descrito como mutaciones en *armadillo* afectaba a la segmentación del embrión de *Drosophila* (Wieschaus et al., 1984), fenotipo altamente semejante al mutante *Wingless* (Sharman & Chopra, 1976; Lawrence & Morata, 1976). Un estudio posterior determinó que la función de *armadillo* en la segmentación del embrión de *Drosophila* estaba regulada por *Wingless* (Riggelman et al., 1990). Este hallazgo fue un paso clave para la posterior caracterización de la cascada de señalización de Wnt/ β -Catenina o ruta canónica de Wnt. Otro paso importante fue la descripción de Dishevelled como segundo mensajero de la ruta, que en respuesta al ligando *Wingless* (Wnt en vertebrados) provocaba la estabilización de armadillo al inhibir a *Shaggy/Zeste-white-3* (GSK3 en vertebrados) (Siegfried et al., 1994). Finalmente, a finales de los 90, diferentes grupos definieron que *armadillo*/ β -Catenina ejercía su función transcripcional en el núcleo a través de los

factores de transcripción de la familia TCF/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor). Gracias a estos estudios y muchos otros llevados a cabo durante las 3 últimas décadas hemos podido descifrar el funcionamiento y los múltiples componente de la cascada de señalización de la ruta canónica de Wnt (Figura 11).

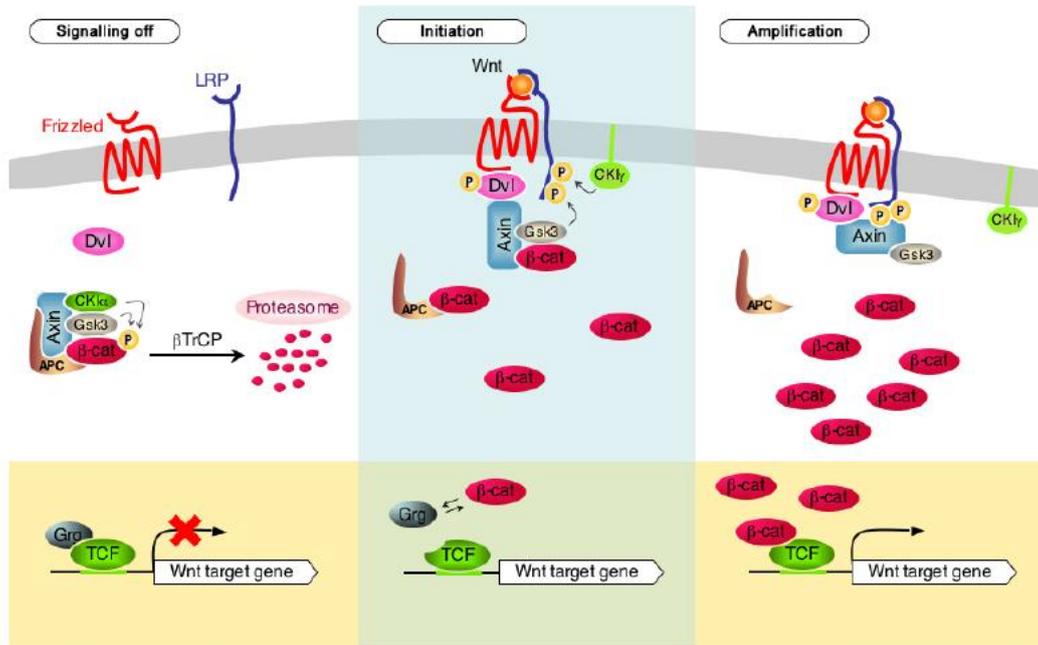


Figura 11: Modelo para la transducción de la cascada de señalización Wnt/β-Catenina. En ausencia de señalización de Wnt, β-Catenina es fosforilada y degradada por el proteosoma. La fosforilación es llevada a cabo por un complejo de proteínas, conocido como complejo de destrucción, que incluye principalmente la quinasa GSK3β (quinasa glucógeno sintetasa 3), y las proteínas Axin y APC (adenomatosus poliposis coli). Al unirse de Wnt a los receptores Frizzled (Fz) y LRP, Dvl (dishevelled) interacciona con Fz y recluta al complejo de destrucción a través de su interacción con Axin. Consecuentemente, GSK3β y CK1γ fosforilan a LRP. Estos residuos fosforilados sirven de sitios de anclaje para Axin e impiden la actividad del complejo de destrucción. La inhibición de la degradación conduce a la acumulación de β-Catenina y su translocación al núcleo, donde interactúa con los factores de transcripción de la familia TCF/Lef que pasan de inhibir a inducir la transcripción de sus genes diana.

En ausencia de señal Wnt, los niveles de β-Catenina libre en el citoplasma son muy bajos, ya que la β-Catenina que no se encuentra unida a Cadherina es fosforilada y posteriormente degradada por el proteosoma. El complejo encargado de la fosforilación de β-Catenina está compuesto por Axin, APC y GSK3β (la quinasa que la fosforila), además de CK1α (casein kinase 1α) y PP2A (una fosfatasa) (Figura 10A; *signalling off*). Primero, la β-Catenina libre en el citoplasma es reconocida por Axin y APC, estableciendo un complejo que permite la asociación con el resto de componentes. CK1α fosforila a β-Catenina en la Ser45, promoviendo la fosforilación secuencial de la Thr41, Ser37 y Ser33 por GSK3 (principalmente GSK3β). Posteriormente, APC conduce a la β-Catenina fosforilada para ser ubiquitinada. Para ello, β-TrCP, una subunidad del complejo de ubiquitinación, reconoce a las fosforilaciones de las Ser33 y 37 y β-Catenina es ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma 26S.

La unión de ligandos Wnt al receptor transmembrana Frizzled (receptor 7 pasos transmembrana acoplado a proteínas G) y al co-receptor LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related Protein) activa una cascada molecular que culmina en la inhibición del complejo de destrucción de β -Catenina. Para ello, Frizzled recluta a Dvl (Dishevelled), y éste a su vez recluta a Axin (junto a GSK3 β), que interacciona con LRP5/6 (Figura 10A; *initiation*). Otro evento importante para la desactivación del complejo es la fosforilación de LRP5/6 por CK1 γ y GSK3 β , lo cual provoca la asociación de Axin con LRP5/6 quedando el complejo de destrucción secuestrado por estos receptores (Zeng et al., 2008). El secuestro del complejo impide la asociación con β -Catenina y por lo tanto su fosforilación. La β -Catenina que escapa de ser fosforilada, es acumulada en el citoplasma y en parte transportada al núcleo, donde interactúa con los factores de transcripción de la familia TCF/LEF, que pasan de inhibir a inducir la transcripción de una gran variedad de genes (Figura 10A; *amplification*).

La asociación de β -Catenina con APC y Axin es esencial para la fosforilación mediada por GSK3 β (Hur & Zhou, 2010). En ciertas patologías (principalmente tumores), determinadas mutaciones en estos componentes del complejo de destrucción (*APC*, Síndrome de Turcot), o en *CTNNB1* (gen que codifica para β -Catenina; mutaciones en los residuos fosforilables por el GSK3 β), impiden la actividad del complejo de destrucción y por lo tanto resulta en un aumento de la β -Catenina disponible para ejercer sus funciones.

El mecanismo por el cual la β -Catenina es translocada al núcleo no está ampliamente estudiado. Al carecer en su secuencia de una señal de localización nuclear (NLS), β -Catenina necesita de moléculas que le faciliten su paso al núcleo. Aunque todavía no se conocen muchas moléculas implicadas en esta función, lo que sí parece evidente es que los dominios ARM R10-12 son fundamentales. La fosforilación de la Tyr654 que se encuentra en el R12 promueve su localización nuclear, disminuyendo su afinidad por cadherinas y aumentando la señal transcripcional (Sharma et al., 2012). FoxM1 es una de las pocas moléculas implicadas en el transporte al núcleo de β -Catenina. Este factor de transcripción se une directamente a los ARM R11-R12 cediendo su NLS a β -Catenina. Además FoxM1 aparece altamente expresado en una gran variedad de tumores, como por ejemplo en glioblastomas que presentan una alta actividad Wnt a pesar de la ausencia de mutaciones estabilizantes de β -Catenina (Zhang et al., 2011). Una vez en el núcleo, β -Catenina es capaz de activar sus genes dianas gracias a su asociación con los factores de transcripción de la familia TCF/Lef y diferentes combinaciones de co-factores. Los diferentes TCFs (TCF1, TCF3 y TCF4) y Lef1, guían a β -Catenina a diferentes locus dentro del genoma, donde interactúan con un motivo específico conocido como *TCF binding site* (CCTTTGAT(G/C) a través del dominio HMG de TCF (van de Wetering et al., 1997; van Beest et al., 2000). En ausencia de β -Catenina, los TCFs actúan como represores transcripcionales al formar complejo con Groucho. La unión de β -Catenina a TCFs desplaza a Groucho formando un complejo activador.

La selectividad por uno u otros genes parece ser regulada mediante acetilación y por asociación con los co-activadores transcripcionales. Por ejemplo, β -Catenina puede ser acetilada por CBP (CREB-binding protein) en la Lys49. Este residuo de Lys aparece mutado en varios tipos de tumores y parece regular la afinidad por determinados genes diana. Mutaciones puntuales en este residuo, lo cual impide su acetilación, provoca un aumento de la expresión de *c-myc* sin verse afectada la expresión de otros genes (Wolf et al., 2002). Además, la acetilación de la Lys345 por p300 aumenta la afinidad por TCFs y por lo tanto causa un incremento de la actividad transcripcional Wnt. Esta acetilación es común en cáncer de colon (Lévy et al., 2004). Esta regulación de la especificidad por sus genes dianas otorga a β -Catenina un papel en procesos muy diversos. Por ejemplo, en células madres embrionarias de ratón (mESCs), la actividad de CBP mantiene a la célula en estado de pluripotencia, mientras que la actividad de p300 promueve la diferenciación de dichas células (Miyabayashi et al., 2007).

β -Catenina en la membrana

A finales de los 80, el grupo de Rolf Kemler aisló β -Catenina junto a otras dos moléculas, α -Catenina y γ -Catenina/plakoglobina, como proteínas asociadas a E-cadherina (Ozawa et al., 1989). En su siguiente trabajo definieron que β -Catenina interacciona con la región citoplásmica de las cadherinas clásicas a través del dominio de unión de Catenina (72 últimos aa en la secuencia de Cadherina)(Figura 14B)(Ozawa et al., 1990). Por lo tanto, β -Catenina posee una función estructural al formar parte de las uniones adherentes. La formación del complejo β -Catenina/cadherina es esencial para el transporte eficiente de las uniones adherentes (AJ) hasta la membrana plasmática (Chen et al., 1999; Wahl et al., 2003; Baum & Georgiou, 2011). Mientras algunos estudios defienden que la interacción entre β -Catenina y Cadherina ocurre ya en el retículo endoplásmico (Chen et al., 1999), otros muestran que esto solo sucede con una pequeña fracción de cadherina, y que la verdadera formación del complejo se da tras el procesamiento de cadherina en el aparato de Golgi (Wahl et al., 2003). Una vez en el citosol, la cadherina que no interacciona con β -Catenina es rápidamente degradada. Esto es debido a que la interacción con β -Catenina enmascara un motivo PEST, el cual al quedar expuesto es ubiquitinado, provocando la degradación de cadherina (Figura 14C) (Hinck, 1994). Por lo tanto, además de permitir el transporte a la membrana, la interacción con β -Catenina aumenta la estabilidad de las cadherinas. Por otro lado, β -Catenina une por su dominio N-terminal a otro componente de las AJ, α -Catenina (Figura 14A)(Aberle et al., 1994). El dominio de unión a β -Catenina de α -Catenina coincide con el dominio de homodimerización de α -Catenina, por lo tanto, en las uniones adherentes, α -Catenina se encuentra en su forma monomérica formando un heterodimero junto a β -Catenina (Yamada et al., 2005). La fosforilación de β -Catenina en la Tyr654 por la quinasa *c-src* reduce drásticamente la unión cadherina/ β -

Catenina, mejorando la actividad transcripcional dependiente de β -Catenina (Piedra et al., 2001). Esta fosforilación puede ser revertida por la fosfatasa PTP1B, favoreciendo la adhesión (Figura14C)(Xu et al., 2004).

LA POLARIDAD CELULAR

La polaridad celular consiste en la capacidad de algunas células de distribuir sus componentes de forma asimétrica en diferentes localizaciones subcelulares. Esta distribución asimétrica confiere a la célula una determinada forma, estructura y función. Las neuronas, las células epiteliales o las células migratorias son clásicos ejemplos de células polarizadas.

Los precursores neuroepiteliales del tubo neural son células que exhiben una polaridad ápico-basal, donde su membrana plasmática apical queda orientada hacia el lumen del tubo neural, mientras su membrana plasmática basal conecta con la lámina basal, presentando importantes diferencias moleculares y estructurales entre sus caras apical y basal. Las proteínas que se acumulan en la región apical del neuroblasto conforman lo que conocemos como polo apical o complejo apical (AC) y asumen funciones muy ligadas al estado progenitor del neuroblasto. Por ejemplo, proteínas localizadas en el complejo apical cumplen importantes funciones en la división celular, como determinar la orientación del huso mitótico durante la mitosis. Además en el polo apical se acumulan las uniones adherentes, las cuales mantienen el contacto entre células vecinas o entre la célula y la matriz extracelular, proporcionando la correcta orientación de la membrana apical en el neuroepitelio. En la membrana apical de los neuroblastos encontramos de forma exclusiva estructuras como el cilio primario, donde se concentran la mayoría de los receptores que darán respuesta a las señales extracelulares del lumen requeridas para la adquisición o mantenimiento de la identidad celular.

Migración nuclear intercinética

Si analizamos una sección transversal del tubo neural, observamos que los neuroblastos que lo constituyen forman una capa pseudoestratificada. Cada célula se extiende desde la lámina apical (ventricular) hasta la lámina basal del neuroepitelio presentando una polaridad ápico-basal (Figura 12). Inicialmente los neuroblastos proliferan de forma simétrica, generando dos nuevos precursores multipotentes idénticos con el objetivo de incrementar el número de progenitores y así expandir el neuroepitelio germinativo. Estos precursores neurales mitóticamente activos experimentan una migración ápico-basal de sus núcleos, caracterizada por el hecho de que cada fase del ciclo celular es llevada a cabo en una posición específica dentro de su citoplasma, proceso conocido como migración nuclear intercinética (INM; interkinetic nuclear migration). El hecho de encontrar núcleos en diferentes posiciones dentro del

eje ápico-basal da al epitelio una apariencia de multicapa, por eso decimos que es un epitelio pseudoestratificado. Durante la INM, las células que están llevando el proceso de mitosis sitúan sus núcleos en la cara apical. Al completar la mitosis, comienzan un nuevo ciclo celular con una migración ápico-basal durante la fase G1 del ciclo, de manera que a medida que se acercan a la parte basal del epitelio, los neuroblastos comienzan la duplicación de su material genético. Esta fase de síntesis de ADN (fase S) continúa durante la migración baso-apical, y es proseguida por la fase G2 antes de alcanzar la cara luminal donde tendrá lugar la siguiente mitosis (fase M) (Figura 12) (Taverna & Huttner, 2010).

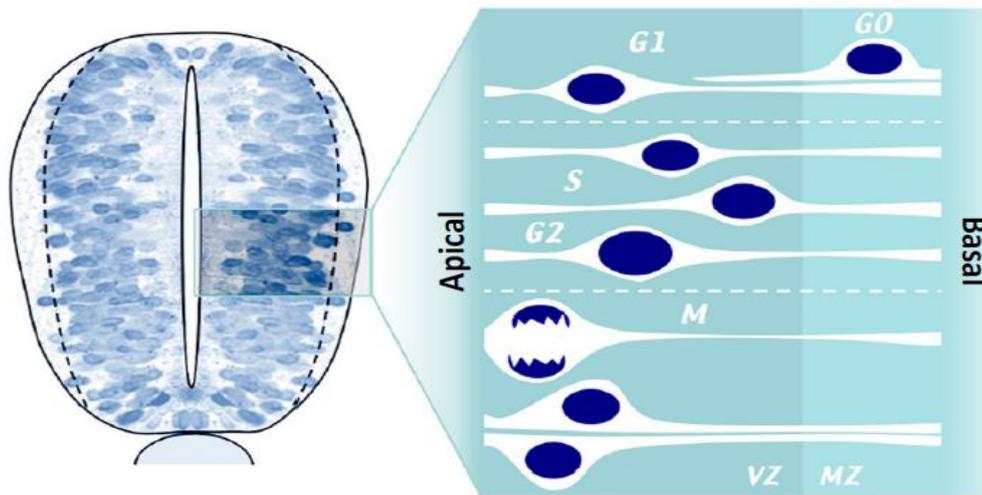


Figura 12: Esquema representativo de la migración nuclear intercinética en el tubo neural. La figura de izquierda representa las diferentes localizaciones ápico-basales de los núcleos de los neuroblastos en una sección transversal. La figura de la derecha muestra el recorrido experimentado por los núcleos de los neuroblastos durante las distintas fases de un ciclo celular.

La polaridad ápico-basal de los neuroblastos

La membrana plasmática de los neuroblastos que forman el tubo neural presenta dos dominios diferenciados por su composición proteica y lipídica, uno apical expuesto al lumen y otro basolateral que contacta con las células adyacentes y la lámina basal. Ambos dominios están separados por las uniones adherentes que se localizan en la región subapical. Tres complejos proteicos definen la polaridad ápico-basal; los complejos apicales Crumbs-PALS-PATJ y Par-aPKC, y el complejo baso-lateral Scribble-Lgl-DLG (Figura 13B). Aunque todos ellos son importantes para el mantenimiento de la polaridad ápico-basal, el complejo Par-aPKC es el regulador clave (Munro et al., 2006). Tras la neurogénesis, las células postmitóticas comienzan su diferenciación migrando lateralmente hasta alcanzar la zona basal del epitelio, una vez allí pierden su polaridad ápico-basal y comienzan su diferenciación hasta neuronas en la capa del manto (Figura 13A)(Gotz & Huttner, 2005; Das & Storey, 2014). De manera que mientras los precursores mantienen su polaridad ápico-basal, las células que

comienzan su diferenciación se deshacen de su AC perdiendo al mismo tiempo sus características de células multipotentes. Las proteínas de AC de los neuroblastos del tubo neural se distribuyen en tres subdominios. En el más apical se encuentran los factores determinantes de linaje, como el complejo Par6-aPKC-Cdc42. En el dominio intermedio encontramos proteínas zonulares como Zo-1. Por último, en el dominio más interno, localizado en la zona subapical, es donde encontramos las uniones adherentes junto a Par3 (Figura 3B)(Afonso & Henrique, 2006).

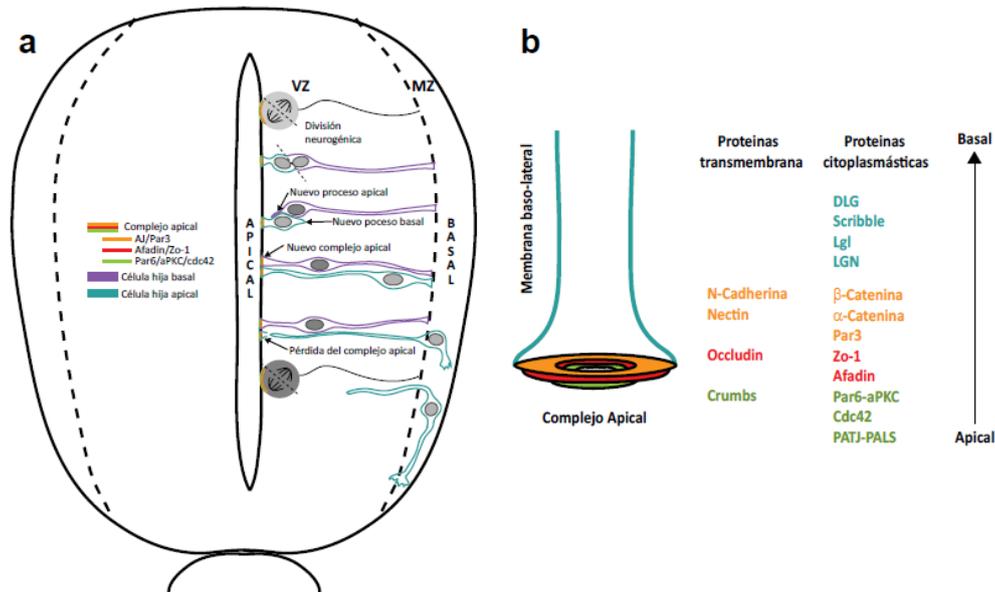


Figura 13: (A) Esquema representativo de la pérdida y adquisición del complejo apical tras una división neurogénica. VZ=zona ventricular, MZ=capa del manto. (B) Modelo de la disposición de los diferentes subdominios del complejo apical de los neuroblastos indicando la composición proteica a lo largo del eje apico-basal.

Las uniones adherentes

Las uniones adherentes son complejos proteicos que promueven la adhesión celular cuya función es esencial para la formación de epitelios polarizados. En el tubo neural permite la unión de los neuroblastos a la cara luminal del neuroepitelio. Aunque su función adhesiva permite el mantenimiento de la estructura de los tejidos, el hecho de presentar altos niveles de expresión en células madre, tanto en adultas como en embrionarias, ha llevado a estudiar su implicación en funciones propias de células multipotentes.

Las uniones adherentes están compuestas por cadherinas(1) y proteínas de la familia de la cateninas; delta-Catenina (p120)(2), γ-Catenina (plakoglobina), α-Catenina(3) y β-Catenina. Mientras las cadherinas son proteínas transmembrana, que forman homodimeros con otras cadherinas de células adyacentes, las cateninas son proteínas intracelulares que se caracterizan por contener un dominio armadillo en su parte central (con excepción de la α-Catenina) y asociarse al dominio citoplasmático de las cadherinas.

Las cadherinas(1) presentes en las uniones adherentes son las denominadas clásicas o del tipo 1; E-cadherina, N-cadherina, P-cadherina, R-cadherina y VE-cadherina. Las cadherinas clásicas fueron nombradas en base al tejido donde se encontraban mayormente expresadas, por ejemplo, la cadherina del tejido epitelial, E-cadherina, la del tejido neural, N-cadherina. Aunque cada tipo celular puede presentar otros tipos de cadherina expresado en menor medida. Durante el desarrollo de la placa neural, la expresión de E-cadherina disminuye, de forma que en el tubo neural las uniones adherentes de los neuroblastos están formadas casi exclusivamente por N-cadherina (*CDH2*). Como todas las cadherinas clásicas, N-cadherina está compuesta por una parte extracelular, una transmembrana y una citoplasmática. La parte extracelular se divide a su vez en cinco subdominios (Figura 14B). En presencia de calcio, cada subdominio extracelular se une al mismo subdominio de otra molécula de N-cadherina (Figura 14C). La unión de iones calcio es necesaria tanto para la interacción cadherina-cadherina como para la protección contra la degradación proteolítica.

Justamente después de atravesar la membrana, las cadherinas presentan una región de interacción con la Catenina p120(2)(Figura 14B). Aunque se ha observado que esta interacción ya ocurre en el retículo endoplásmico (Wahl et al., 2003), no parece que sea requisito para el tráfico a la membrana de la cadherina naciente (Davis et al., 2003). Sin embargo, p120 juega un papel clave en la regulación de la estabilidad de N-cadherina una vez localizada en la membrana citoplasmática. Se ha observado que al favorecer la interacción p120/cadherina, el proceso de endocitosis de Cadherina disminuye, provocando un aumento de uniones adherentes en la membrana (Ireton et al., 2002; Davis et al., 2003). En células polarizadas esta interacción es regulada por NUMB, cuya interacción con p120 desestabiliza las uniones adherentes promoviendo su endocitosis. En cambio, la fosforilación de NUMB por aPKC inhibe su actividad y favorece la acumulación apical de uniones adherentes (Figura 14C)(Sato et al., 2011).

Originalmente α -Catenina(3) fue descrita como una proteína de unión entre las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina (Rimm et al 1995). Sin embargo, recientes estudios ponen en duda esta función. Aunque α -Catenina posee un dominio de unión a β -Catenina en su extremo amino y otro a actina en su extremo carboxilo, no se ha podido aislar un complejo que incluya cadherina/ β -Catenina/ α -Catenina/actina. Además se ha observado que cuando α -Catenina no está formando complejo con β -Catenina, forma un homodimero, y que este homodimero posee una afinidad por los filamentos de actina mucho mayor que el monómero α -Catenina (Drees et al., 2005). El homodimero inhibe la nucleación de actina al competir con Arp2/3 (Drees et al., 2005; Hansen et al 2013), y la ausencia del homodimero en el citoplasma aumenta la formación de lamelipodios y consecuentemente la migración celular (Benjamin et al., 2010). Todos estos estudios, junto con el de Yamada (2005), desacreditan la creencia inicial de definir a α -Catenina simplemente como una proteína puente entre las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina.

En conclusión, podemos decir que las cadherinas necesitan de las cateninas para llevar a cabo su función en la adhesión celular. Mientras p120 interviene en la estabilidad de las cadherinas en la membrana, la asociación a β -Catenina parece contribuir a su transporte hasta ésta. Aunque las cadherinas son una pieza fundamental en la función adhesiva, el papel de β -Catenina en la adhesión parece evolutivamente anterior al de las cadherinas. En condiciones normales, *Dictyostelium discoïdium* (una ameba que vive en la arena) es un organismo unicelular, pero en respuesta a inanición, diferentes individuos comienzan a agregarse formando esporocarpos. Durante la formación de estos esporocarpos, las células establecen un epitelio polarizado. El ortólogo de β -Catenina en esta especie, Aardvark, es esencial para mantener la estructura polarizada de este epitelio (Dickinson et al., 2011). Curiosamente estos organismos carecen de cadherinas y de TCFs, sugiriendo un papel de la función estructural de β -Catenina en la formación de epitelios polarizados incluso anterior a la aparición de las cadherinas.

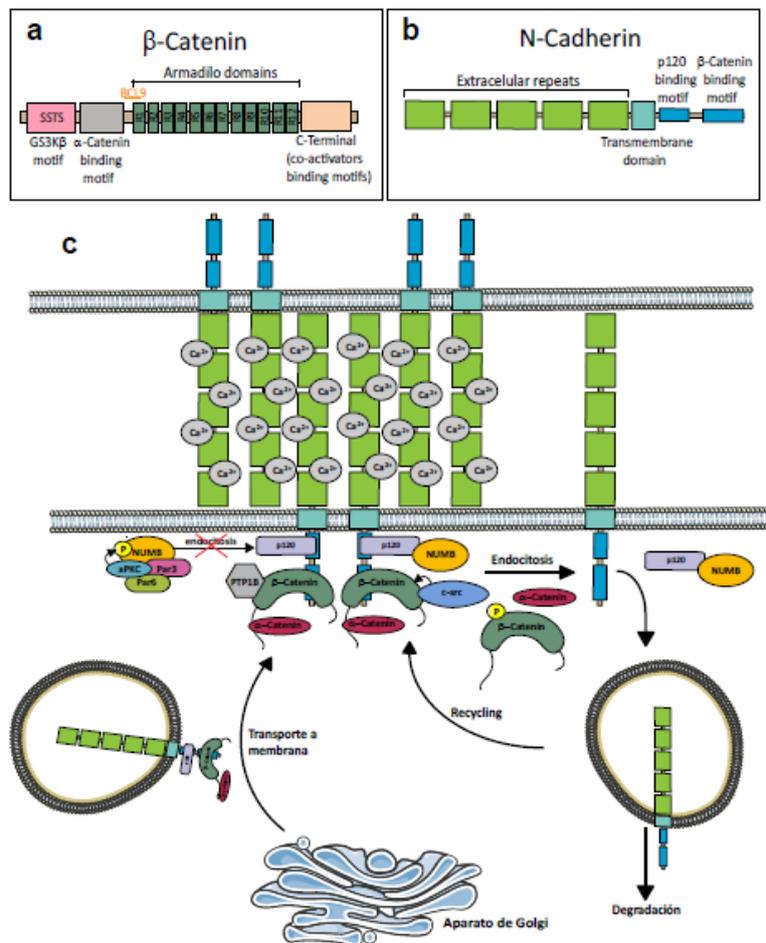


Figura 14: (A) Esquema de la estructura de β -Catenina. (B) Esquema de la estructura de N-cadherina. (C) Modelo de la regulación de la estabilidad de las uniones adherentes en la membrana de células polarizadas. El complejo Cadherina/p120/ β -Catenina/ α -Catenina es transportado hasta la membrana para formar las uniones adherentes. La actividad de PTP1B y aPKC favorece la estabilidad de las uniones adherentes en la membrana. NUMB y c-src desestabilizan las uniones adherentes promoviendo la endocitosis de cadherina.

El complejo Par3-Par6-aPKC

Al igual que armadillo, los genes que codifican para Par3, Par6 y aPKC fueron identificados en mutantes que presentaban alteraciones de la polaridad antero-posterior (Kemphues et al., 1988; Watts et al., 1996). Más tarde, múltiples estudios han evidenciado la participación del complejo Par6-aPKC-Par3 (también llamado simplemente Par6-aPKC o complejo Par) en otros tipos de polaridad como la polaridad apical-basal de células epiteliales, la polaridad axón-dendrita en neuronas o la polaridad de astrocitos durante su migración. Par3 y Par6 se caracterizan por ser “scaffolding proteins”, por lo cual tienen la capacidad de interactuar con una gran variedad de proteínas. Esta característica se debe a la presencia de diversos dominios de interacción dentro de su secuencia proteica. Par3 contiene 3 dominios PDZ que le permiten la unión a Par6, PTEN y fosfolípidos de membrana (Wu et al. 2007). Además de poseer un dominio de interacción con aPKC, en su extremo carboxilo encontramos 2 dominios 4N que le permite la unión a Numb, Tiam1 y KIF3A (Figura 15B). Par6 por su parte contiene un único dominio PDZ por el cual además de interactuar con Par3, permite la interacción con las proteínas apicales PALS y Crumbs. En su extremo amino encontramos un dominio PB1 por el que interacciona con aPKC, e inmediatamente antes del dominio PDZ, un dominio semi-CRIB por el que se une a Cdc42 (Figura 15B) (Horikoshi et al., 2009).

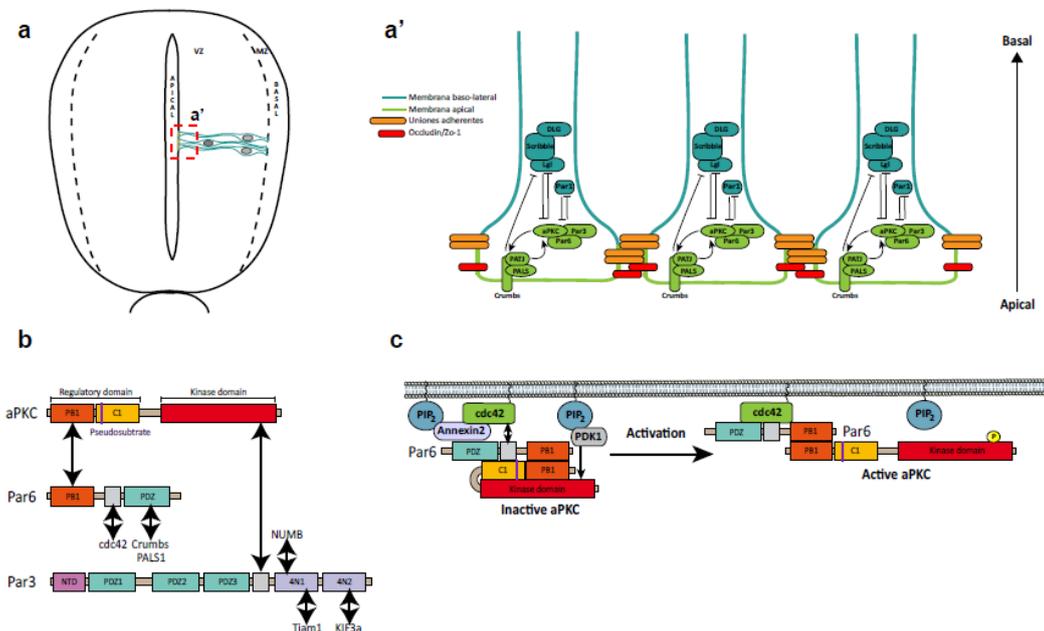


Figura 15: (A-A') Mecanismo del mantenimiento de la polaridad ápico-basal a través del antagonismo entre los componentes de la membrana apical y basolateral. Los complejos apicales Crumbs/PALS/PATJ y Par-aPKC interactúan entre ellos promoviendo su localización apical. La interacción entre los componentes baso-laterales (Scribble/Lgl/DLG y Par-1) y los componentes apicales (Crumbs/PALS/PATJ y Par-aPKC) previene la localización ectópica de cada uno de ellos. **(B)** Esquema de la estructura de aPKC, Par6 y Par3, mostrando las interacciones de algunos de sus dominios. **(C)** Modelo del mecanismo de activación de aPKC. Hasta que aPKC no alcanza la membrana apical permanece en su forma inactiva. El enriquecimiento de PI(4,5)P₂ (PIP₂) en la membrana apical permite la activación de aPKC a través de Cdc42 y PDK1.

aPKC es el verdadero efector de éste complejo. Esta familia de quinasas está formada principalmente por las isoformas aPKC ζ y aPKC ι , y se diferencian de la clásicas PKC por no requerir ni DAG (diacilglicerol) ni Ca²⁺ para su activación. aPKC define los dominios apical y basolateral en la membrana citoplasmática mediante la fosforilación y consecuente reclutamiento o exclusión de proteínas del compartimento apical. De ésta forma la actividad quinasa de aPKC es capaz de reclutar en el compartimento apical proteínas como el complejo Crumbs-PALS-PATJ, y excluir de este dominio proteínas basolaterales como Par1 o el complejo Scribble-Lgl-DLG (Figura 15A). Por lo tanto, para el correcto mantenimiento de la polaridad, la actividad quinasa de aPKC debe ser controlada y localizada en la membrana apical. aPKC contiene un dominio regulador en su extremo amino, donde podemos encontrar un dominio PB1 por donde se une a Par6 y un dominio C1 que posee un pseudosustrato. A continuación encontramos un dominio “bisagra” seguido un dominio quinasa en su extremo carboxilo por donde interacciona con Par3 (Figura 15B). Mientras Par3 parece involucrado en la localización apical del complejo, Par6 actúa como un regulador de la actividad de aPKC. De manera que mientras el complejo Par6-aPKC-Par3 es transportado, aPKC se mantiene inactiva. Una vez en la membrana, Cdc42, una *small GTPase* de la familia Rho, se une a Par6 revirtiendo la inhibición sobre aPKC. Además aPKC requiere de la fosforilación por PDK1 para completar su activación (Balendran et al., 2000; Ghosh et al., 2008). Durante el establecimiento de la polaridad (del que hablaremos más profundamente en el siguiente apartado), la membrana apical queda definida por un enriquecimiento de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂). PI(4,5)P₂ posee la capacidad de interactuar de forma directa con PDK1 y a través de Annexin2 con Cdc42, por lo que el enriquecimiento apical de PI(4,5)P₂ recluta PDK1 y Cdc42 en la membrana favoreciendo así la activación de aPKC (Figura 15C)(Balendran et al., 2000; Martín-Belmonte et al., 2007). La compleja regulación de la localización y actividad de aPKC es indicativa de la importancia biológica que esta quinasa.

El establecimiento de la polaridad ápico-basal

El establecimiento de la polaridad ha sido ampliamente estudiado en cultivos 3D de células MDCK. Este modelo permite que simples células se dividan y se organicen formando monocapas esféricas con un lumen central denominados quistes (“*cysts*”). En este modelo, después de que una única célula lleve a cabo la mitosis, aparecen los primeros eventos en la adquisición de la polaridad. Mientras los complejos de adhesión, como uniones adherentes y ocluyentes, se localizan en la zona de contacto entre las dos células hijas, las proteínas apicales, como gp135 (podocalyxin), el complejo Par-aPKC o el complejo Crumb, se encuentran en la periferia de la célula (Figura 16B; 8 horas). Parte de la zona de contacto entre ambas células se convertirá en membrana apical. Esta prematura membrana apical se denomina AMIS (apical membrane initiation site). El AMIS se establece debido a la acumulación de PTEN en

esta zona de unión. La actividad de PTEN provoca un enriquecimiento de PI(4,5)P₂, de modo que se rompe el equilibrio entre PI(4,5)P₂, que quedan restringidos en el dominio apical, y PI(3,4,5)P₃, acumulados en el dominio basolateral (Martín-Belmonte et al., 2007). Al mismo tiempo comienza un proceso de endocitosis de proteínas apicales desde la periferia celular y otro de exocitosis hasta el AMIS (Figura 16A,16B; 16 horas). Las vesículas transportadoras de proteínas apicales se denominan VACs (vacuolar apical compartment) y son fácilmente observadas cuando el transporte a membrana es inhibido (Vega-Salas et al., 1987). La falta de función de Cdc42 en cultivos 3D de células MDCK provoca una acumulación citoplasmática de VACs debido a la fusión de vesículas que no llegan a alcanzar el AMIS (Figura 16C) (Martín-Belmonte et al., 2007). Del mismo modo, la sobre-expresión de la forma dominante negativo de Cdc42 en neuroblastos de *Drosophila* causa una acumulación citoplasmática de Par6/aPKC (Atwood et al., 2007). Este hecho indica el papel de Cdc42 en la exocitosis de proteínas apicales. Esta exocitosis permite la acumulación de los componentes del complejo apical en el AMIS (Figura 16A, 24 horas). Como último paso, PI(4,5)P₂ recluta a Cdc42 a través a Annexin 2. Cdc42 se une al complejo Par3-Par6-aPKC a través de Par6 provocando la disociación de Par3 y favoreciendo la activación de aPKC (Martín-Belmonte et al., 2007; Apodaca et al., 2012).

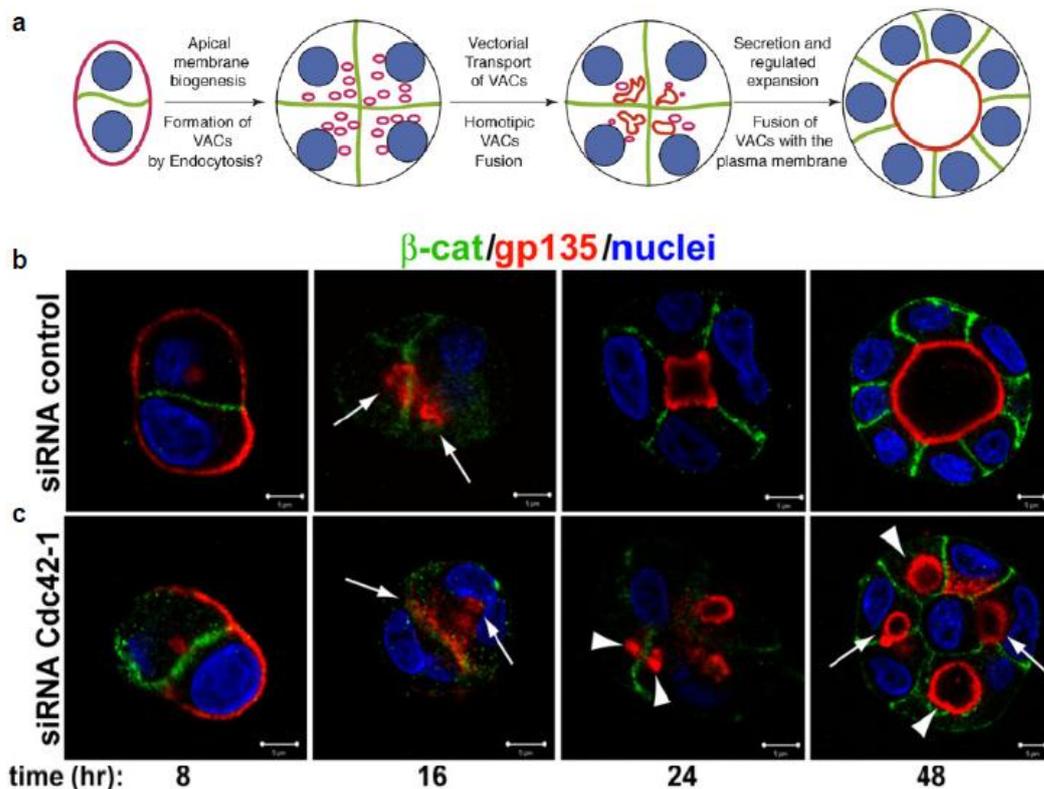


Figura 16: (A) Modelo para la formación del lumen durante el desarrollo de quistes en células MDCK. Martín-Belmonte & Mostov, 2008. (B-C) Imágenes de confocal de una secuencia temporal de 48 horas durante la formación de quistes de células MDCK. (B) Control (C) Knock-down de cdc42 donde se puede observar como las células fracasan en la adquisición de la polaridad ápico-basal y en la formación del lumen. Gp135 es usado como marcador apical (rojo), β-Catenina (uniones adherentes) es usado como marcador baso-lateral (verde) y los núcleos están marcados en azul. Martín-Belmonte et al., 2007.

Un proceso íntimamente ligado a la adquisición de la polaridad ápico-basal es la formación del lumen. Células con polaridad ápico-basal forman parte de estructuras caracterizadas por poseer una cavidad luminal a donde quedan orientadas sus membranas apicales. Son ejemplos clásicos las células epiteliales del glomérulo renal o los neuroblastos del tubo neural. En cultivos 3D de células MDCK el lumen comienza a formarse al mismo tiempo que las células adquieren la polaridad ápico-basal (Figura 16B, 16 horas y 24 horas). En ese momento las membranas apicales de las células vecinas aún se encuentran demasiado próximas entre sí. La separación de las membranas es debida a cambios osmóticos generados en la célula y a un aumento de los complejos de unión y las proteínas de polaridad apicales. Entre estas proteínas apicales encontramos factores anti-adhesivos que promueven la apertura del lumen. Estos factores anti-adhesivos pueden ser polisacáridos o glicoproteínas transmembrana, como Podocalixina (gp135), una sialoglicoproteína implicada en la formación del lumen en células MDCK (Figura 16B,C)(Meder et al., 2005).

Es importante indicar que aunque los cultivos 3D de células MDCK son un excelente modelo para el estudio de la polaridad, existen diferencias estructurales entre estas células epiteliales y los neuroblastos del tubo neural. Mientras las uniones adherentes de las células MDCK se localizan en la zona baso-lateral, en los neuroblastos del tubo neural están localizadas en la zona subapical formando parte del complejo apical.

Proteínas de polaridad y orientación del huso mitótico

El huso mitótico está formado por dos polos mitóticos (centrosomas) y 3 clases de microtúbulos que emanan de estos: los microtúbulos cinetocóricos, que se unen a los cromosomas a través de los cinetocoros, los microtúbulos polares, que forman un red entre ambos polos al conectar sus extremos (+) mediante kinesinas, y los microtúbulos astrales, los cuales conectan los centrosomas a la corteza celular a través de dineínas. El anclaje a la membrana va a determinar la orientación del huso mitótico y es necesario para generar las fuerzas que separarán los polos mitóticos durante la prometáfase. Los microtúbulos astrales se unen a la membrana celular de forma transitoria ($\leq 1s$ *time-lapse imaging* en *C.elegans*) antes de producirse la despolimerización de éstos (Kozlowski et al., 2007). De esta interacción dependerá la orientación del huso mitótico y por tanto el tipo de división. Una vez completada la división se produce una despolimerización de los microtúbulos mitóticos y comienza la organización ápico-basal del citoesqueleto de tubulina que acompaña a la migración intercinética nuclear hasta la membrana basal tras la mitosis (Messier & Auclair, 1974). Los progenitores del tubo neural llevan a cabo la mitosis en la cara apical. Las proteínas de polaridad que se localizan en este dominio han sido implicadas en el mecanismo de orientación y generación de fuerzas del huso mitótico. Aunque dependiendo de la especie y el tipo celular, diferentes mecanismos han sido propuestos.

Diferentes estudios han sido llevados a cabo en neuroepitelio de vertebrados. En el neuroepitelio las células poseen un dominio apical muy pequeño si lo comparamos con las células epiteliales. Este dominio apical rico en cdc42-Par-aPKC es separado por las uniones adherentes del dominio basolateral rico en LGN. Durante la mitosis, estas células mantienen un delgado proceso basal carente de microtúbulos de manera que la célula adquiere una forma pseudo-esférica (Afonso&Henrique, 2006). En el neuroepitelio las divisiones pueden ser planares (proliferativas o neurogénicas) o ápico-basales (exclusivamente neurogénicas) (Figura 17A). Durante una división planar el huso mitótico queda orientado perpendicular a la membrana apical, con ambos polos mitóticos anclados a la membrana lateral. Mientras en una división ápico-basal el huso mitótico queda orientado paralelo a la membrana apical, de manera que un polo mitótico se mantiene anclado a la membrana apical y otro a la basal. Durante la metafase y anafase de divisiones planares, LGN aparece localizado en la membrana lateral de los progenitores (Peyre et al., 2011). Inactivación de la función de LGN lleva a una orientación al azar del uso mitótico provocando un aumento de divisiones ápico-basales, tanto en ratón (Konno et al., 2008) como en pollo (Morin et al., 2007). Lo que demuestra que LGN es requerido para el anclaje de microtúbulos a la membrana lateral durante las divisiones planares. LGN se une a NuMA-Gai para interactuar con Lis1/dineína/dinactina y anclar los microtúbulos astrales a dicha membrana. Gai a través de su grupo miristilo cumple esta función. Durante las divisiones planares la actividad quinasa de aPKC previene la localización apical de LGN, lo que favorece el anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana lateral (Figura 17B) (Hao et al., 2010). ¿Qué permite el anclaje apical en las divisiones ápico-basales? La expresión de Inscuteable (Insc) parece ser la respuesta. Durante las divisiones ápico-basales, Insc permite la unión de Gai/LGN/NuMA al complejo cdc42-Par-aPKC, haciendo posible el anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana apical (Figura 17C) (Zhong et al., 2008; Siller et al., 2009). Prueba de este mecanismo es el hecho de que en ausencia de Insc las células realizan divisiones planares de forma persistente y que la sobre-expresión de Insc conduce a un aumento de divisiones ápico-basales (Das & Storey, 2012). Al igual que en el neuroepitelio de ratón y pollo, estudios llevados a cabo en C.elegans y Drosophila han demostrado que las proteínas de polaridad dirigen la localización de GPR1/2 o Pins en estas especies (homólogos de LGN en *C.elegans* y *Drosophila* respectivamente) (Cowan et al., 2004; Wodarz et al., 2005; Schaefer et al., 2001). En neuroblastos de *Drosophila* la pérdida de proteínas apicales como Bazooka (Par3) o Inscuteable (Insc) provoca una orientación al azar del huso mitótico, mientras que la pérdida de proteínas basales no tiene ningún efecto sobre el posicionamiento del huso (Kraut et al., 1996; Wodarz et al., 1999). Por otro lado, se ha estudiado si existe un vínculo entre moléculas de adhesión y los microtúbulos astrales. En

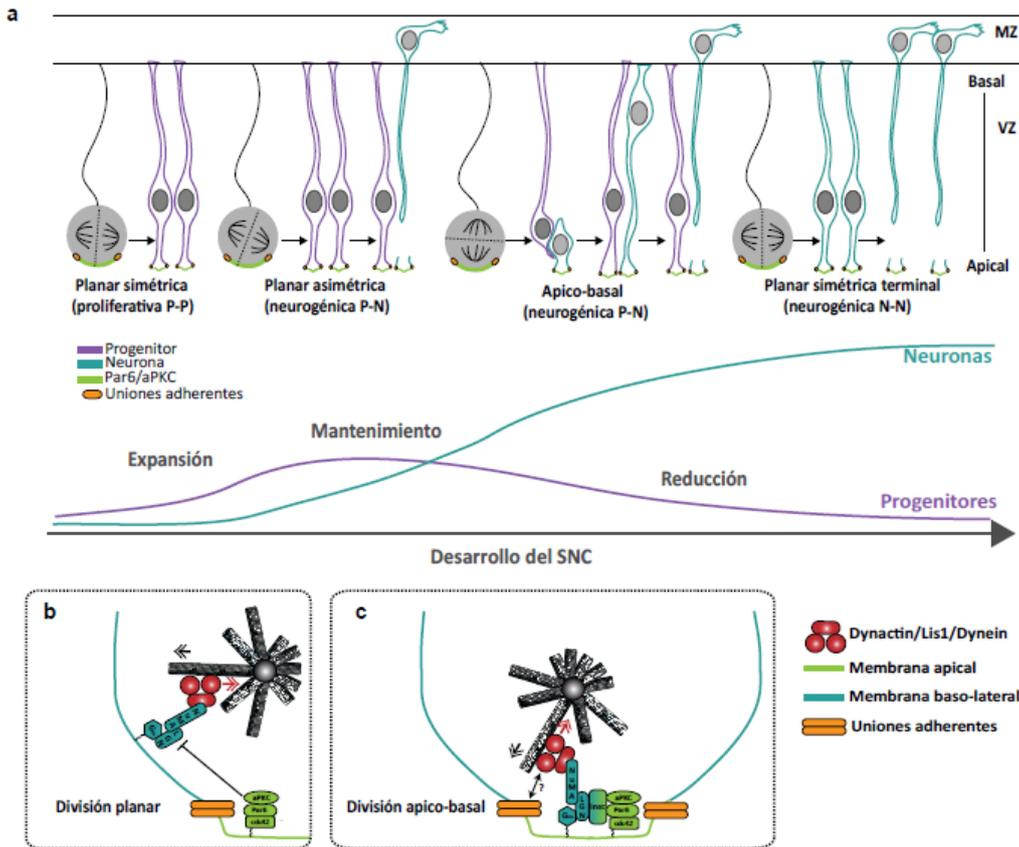


Figura 17: (A) Orientación del huso mitótico en los distintos tipos de divisiones que llevan a cabo los progenitores neuroepiteliales durante el desarrollo del SNC. Durante la fase de expansión los progenitores realizan divisiones planares simétricas proliferativas que dan lugar a dos progenitores idénticos. Al comienzo de la neurogénesis las divisiones planares asimétricas o ápico-basales permiten la generación de células diferenciadas y un mantenimiento del número de progenitores. Al final de la neurogénesis el número de células diferenciadas sufre un gran incremento a expensas de una reducción drástica del número de progenitores a través de divisiones simétricas terminales. MZ=Capa del manto. VZ= Zona ventricular. **(B)** Esquema representativo del mecanismo de anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana lateral durante las divisiones planares. **(C)** Esquema representativo del mecanismo de anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana apical durante las divisiones ápico-basales. La flecha roja indica la dirección del movimiento del motor de dineína. La flecha negra indica la dirección de la fuerza ejercida sobre la red de microtúbulos mitóticos.

Drosophila, APC ancla los microtúbulos astrales a las uniones adherentes ricas en E-Cadherina. APC podría unirse a las uniones adherentes a través de su conocida interacción con β -Catenina. La pérdida de función de APC en progenitores neuroepiteliales de *Drosophila*, donde las uniones adherentes se encuentran localizadas en la membrana basolateral, lleva a una alteración en la orientación del huso mitótico, cambiando el tipo de división de simétrica (con los centrosomas colocados con las uniones adherentes) a asimétrica (con los centrosomas localizados en las membranas apical y basal).

En definitiva, las proteínas de polaridad como Par-aPKC, LGN y las AJ tienen una implicación en la orientación y anclaje del huso mitótico que condiciona el tipo de división.

Tipo de división y especificación celular

Ha sido propuesto que la orientación del huso mitótico puede determinar el modo de división y consecuentemente la especificación celular. Durante el desarrollo del tubo neural, las divisiones proliferativas iniciales (progenitor-progenitor, P-P) permiten la expansión de los progenitores mediante divisiones planares simétricas donde el plano de división forma un ángulo (aproximadamente aunque no estrictamente) perpendicular a la cara luminal. Más tarde, dos tipos de divisiones neurogénicas progenitor-neurona (P-N) permiten la generación de neuronas manteniendo el número de progenitores; las divisiones planares asimétricas donde el plano de división sigue siendo aproximadamente perpendicular a la cara luminal, y las divisiones ápico-basales donde el huso mitótico es anclado a la membrana lateral proporcionando un ángulo paralelo a la membrana apical. Al final de la neurogénesis, el número de progenitores se reduce drásticamente gracias a las divisiones simétricas terminales (neurona-neurona, N-N) donde el plano de división es estrictamente perpendicular a la cara luminal (Figura 17A). Por lo tanto, mientras las divisiones planares simétricas generan dos identidades idénticas, progenitor-progenitor (divisiones proliferativas) o neurona-neurona (divisiones neurogénicas o simétricas terminales) dependiendo del estadio de desarrollo, las divisiones ápico-basales y planares asimétricas generan dos tipos celulares diferentes (progenitor-neurona). (Wilcock et al., 2007; Das & Storey, 2012). Además en base a estudios realizados en neuroprogenitores corticales, se ha propuesto un modelo donde la herencia de las proteínas de polaridad durante la mitosis supone el mantenimiento del estado progenitor (Kosodo et al., 2004; Sanada et al., 2005; Gotz & Huttner, 2005; Marthiens & ffrench-Constant, 2009). Los primeros trabajos proponían que durante las divisiones simétricas proliferativas existía un reparto equitativo del complejo apical (incluyendo uniones adherentes) que establecía que ambas células se mantuvieran como progenitores, mientras que en divisiones asimétricas o ápico-basales el reparto desigual del complejo apical determinaba dos identidades celulares diferentes, un progenitor que heredaría la mayor parte o todo el complejo y una neurona que no heredaría el complejo o tan solo una pequeña porción del mismo (Kosodo et al., 2004; Gotz & Huttner, 2005). En todos estos trabajos se considera que la división simétrica es aquella donde el plano de división es perpendicular al hueco apical existente entre las uniones adherentes. En el trabajo de Marthiens & ffrench-Constant (2009), cuantifican la cantidad de N-Cadherina a ambos lados del plano de división durante el momento de la mitosis y concluyen que tanto en las divisiones simétricas proliferativas como en las asimétricas, ambas células hijas heredaban distintas cantidades de N-Cadherina. Concluyendo que el reparto desigual de uniones adherentes durante la división no estaba ligado a la especificación celular. Curiosamente, observan que aPKC es heredada por una sola célula durante las divisiones neurogénicas, mientras que en las divisiones proliferativas es repartida entre ambas células hijas. Basándose en esta

observación, proponen que la célula que mantiene el dominio aPKC, permanece en contacto con el ventrículo y por lo tanto mantiene el estado de progenitor. Mientras la otra célula carente de aPKC comienza el proceso de diferenciación que implicaría una desestabilización posterior de las uniones adherentes y la pérdida de contacto con el ventrículo. El mecanismo de este modelo donde la herencia del dominio apical formado por el complejo Par-aPKC determina el tipo celular fue recientemente ampliado por sucesivos trabajos llevados a cabo por Das&Storey (2012; 2014). Mediante *time-lapse* imaging en tubo neural de pollo, muestran como durante divisiones neurogénicas ápico-basales (P-N) la célula que mantiene el complejo apical es la que comienza su proceso de diferenciación, mientras la célula basal hija restablece rápidamente su polaridad ápico-basal y entra en un nuevo ciclo de división. Durante la diferenciación de la célula hija apical, ésta se deshace de su polo apical a través de un proceso de abscisión de la membrana citoplasmática, de manera que una vez seccionada, el polo apical remanente queda unido a la membrana apical mientras el resto del soma comienza un proceso de retracción apical hasta la zona del manto (Figura 18A,B).

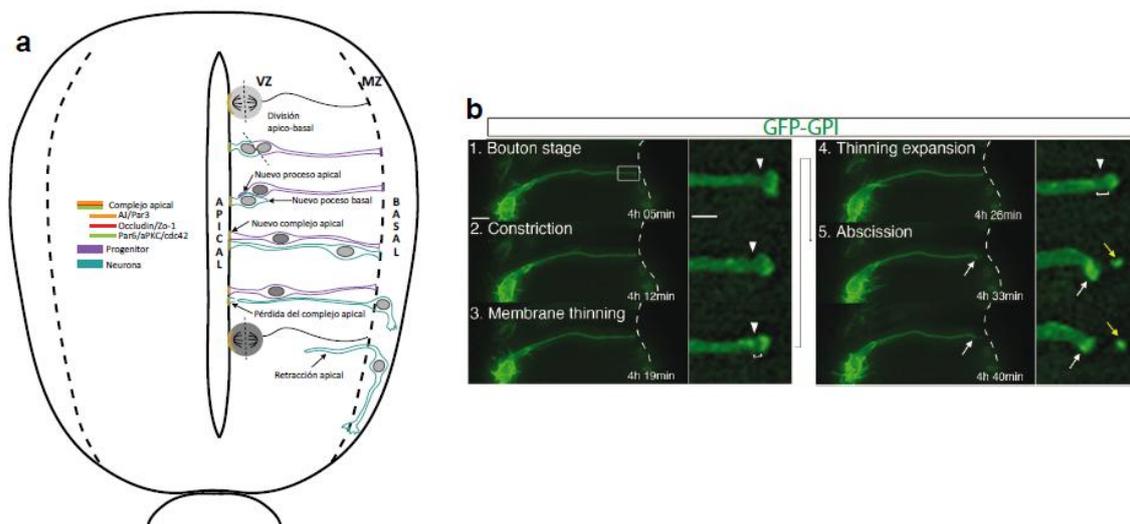


Figura 18: (A) Esquema representativo de la pérdida y adquisición del complejo apical tras una división ápico-basal. VZ=zona ventricular, MZ=capa del manto. (B) Secuencia *time-lapse* de los diferentes estadios durante la abscisión apical. Das&Storey, 2014.

Aunque estos trabajos contradicen en parte al modelo propuesto por Marthiens & French-Constant, ambos coinciden en que la eliminación del complejo apical es parte del proceso de diferenciación neural. Por otro lado, Kosodo (2008) proponía que durante las divisiones ápico-basales de los progenitores de la corteza cerebral, el delgado proceso basal de estas células en mitosis era dividido y así se mantenía el contacto de ambas células con la lamina basal. Sin embargo en los trabajos de Das&Storey (2012; 2014) podemos observar que, al menos en las divisiones ápico-basales (P-N) del tubo neural, el proceso basal es heredado únicamente por el progenitor basal, el cual restablece su polo apical, mientras que la futura neurona que hereda el complejo apical carece de anclaje a la lamina basal justo

después de la división, aunque éste es restablecido rápidamente. El hecho de que solo una célula mantenga el polo basal y otra el apical, puede ser debido a que moléculas presentes en esos dominios sean necesarias para los procesos que inmediatamente después de la división experimentarían cada una de ellas. La célula que mantiene el dominio basal genera un nuevo dominio apical, y permanece como progenitor. Curiosamente durante la gastrulación secundaria lo primero que se genera durante la polarización de estas células es la lámina basal, lo que hace indicar que señales basales pueden ser necesarias para el establecimiento de la polaridad en estas células. Además, las integrinas presentes en el dominio basal contribuyen al mantenimiento del dominio apical. Anticuerpos contra integrinas inyectados en el ventrículo derivan en una prematura salida de éstas células de la zona ventricular (Lathia et al., 2007). Estos resultados sugieren que la lámina basal provee señales esenciales para el mantenimiento de la polaridad de éstos progenitores. Por otro lado, las futuras neuronas mantienen de forma transitoria el polo apical tras la mitosis, tanto en las divisiones P-N como en las N-N. En nuestro laboratorio hemos observado que durante las divisiones neurogénicas, la β -Catenina presente en el polo apical viene estabilizada y translocada al núcleo para activar la expresión de genes necesarios para una adecuada culminación de la diferenciación (datos no publicados). Todos estos datos nos ayudan a entender la importancia de las señales basales y apicales en la adquisición del *fate*.

WNT/ β -CATENINA Y CÁNCER

Componentes de la ruta de Wnt/ β -Catenina están involucrados en multitud de tumores; cáncer de mama, cáncer de colon, hepatoblastoma, leucemia, polimatricomas, tumores desmoides y tumores cerebrales (Taipale & Beachy, 2001; Reya & Clevers, 2005). La asociación de la cascada de Wnt/ β -Catenina con cáncer, surge inicialmente tras comprobar que el virus MMTV (murine mammary tumour virus), un retrovirus de ratón causante de cáncer de mama, provocaba la activación del gen *int-1* (*WNT1*) (Nusse & Varmus, 1982). Más tarde, la relevancia de la señal de Wnt en cáncer fue fortificada por el descubrimiento de la asociación de β -Catenina con APC, conocida ya entonces por ser una proteína supresora de tumores (Su et al., 1993). El hecho de que β -Catenina fuera regulada positivamente por Wnt-1 y negativamente por APC hacía de β -Catenina un potencial inductor de tumores. Esta hipótesis fue confirmada al identificar mutaciones puntuales en el gen codificante para β -Catenina (*CTTNB1*), que impedían la regulación negativa por parte de APC (Rubinfeld et al., 1997). Por otro lado, mutaciones en *APC* son la principal causa del síndrome de Turcot tipo 2 o Poliposis adenomatosa familiar, un síndrome congénito que se caracteriza por una alta incidencia en cáncer de colon y meduloblastoma (Hamilton et al., 1995). Estas mutaciones en *APC* suprimen los sitios de unión a Axin, impidiendo así la formación del

complejo de destrucción de β -Catenina. Además, mutaciones somáticas de *APC* y *AXIN* son también detectadas en cáncer de colon y meduloblastomas esporádicos (Clements et al., 2003; Ellison, 2010). Por otro lado, aunque tanto $GSK3\alpha$ como $GSK3\beta$, son considerados supresores de tumores por su función en el complejo de destrucción de β -Catenina, no han sido identificadas mutaciones de sus genes en tumores humanos. Probablemente debido a que $GSK3$ es importante para una gran diversidad de funciones celulares, mutaciones inactivantes en sus genes podría llevar a la muerte celular antes que a la generación del tumor. Por último, comentar que también han sido descritas mutaciones en el co-receptor LRP5 en cáncer de paratiroides y cáncer de mama (Bjorklund et al., 2009). Estas mutaciones impiden la asociación del represor DDK1, y provoca, del mismo modo que las anteriores, un aumento de la β -Catenina disponible, y por tanto una activación sostenida de la ruta de Wnt/ β -Catenina.

El síndrome de Turcot se caracteriza por la concurrencia de tumores cerebrales primarios y múltiples adenomas colorectales. Su variante hereditaria, conocida como poliposis adenomatosa familiar (FAP), es generada por mutaciones en el gen *APC* en casi el 100% de los casos (Hamilton et al., 1995). En 1959, el Dr. Turcot y sus compañeros describieron los casos de dos hermanos en edad adolescente que ingresaron inicialmente por diarrea y hematoquecia (deposiciones con sangre fresca) en el hospital Hôtel-Dieu de Québec. Los médicos hallaron una alta presencia de pólipos en el colon y el recto. Tras la muerte de los pacientes, la autopsia reveló la presencia de tumores cerebrales en ambos hermanos. Uno de ellos presentaba un meduloblastoma envolviendo la medula espinal y su hermana un adenoma en la pituitaria y un glioblastoma multiforme. No era la primera vez que se asociaba pólipos en el colón y meduloblastoma. Diez años antes, se había descrito el caso de un paciente que presentaba pólipos adenomatosos, un meduloblastoma en el tronco encefálico y un carcinoma papilar en la glándula tiroides (Crail et al., 1949; Hamilton et al., 1995). Según el estudio de Hamilton, el 79% de los pacientes con mutaciones en *APC* presentan meduloblastoma (un riesgo 92 veces mayor de padecer meduloblastoma que el resto de la población). La relación inicial entre FAP y otros tumores cerebrales, como el glioblastoma multiforme descrito inicialmente por Turcot, se basó simplemente en observaciones clínicas. Estos tumores son comunes en el síndrome de Lynch o síndrome de Turcot tipo 1, una variante que comparte características clínicas con el tipo 2 pero que no es debido a mutaciones en *APC*. Aunque otros tumores cerebrales como astrocitomas y ependimomas han sido encontrados en pacientes con FAP, el meduloblastoma es el que tiene una mayor incidencia en estos pacientes (Hamilton et al., 1995). No obstante, el principal signo clínico observado en pacientes con FAP es la presencia de un gran número de pólipos o adenomas de colon a edad temprana. Estos pólipos se originan debido a un crecimiento aberrante de células epiteliales de la cripta intestinal. Más tarde, un amplio número de estos pólipos va acumulando mutaciones oncogénicas adicionales,

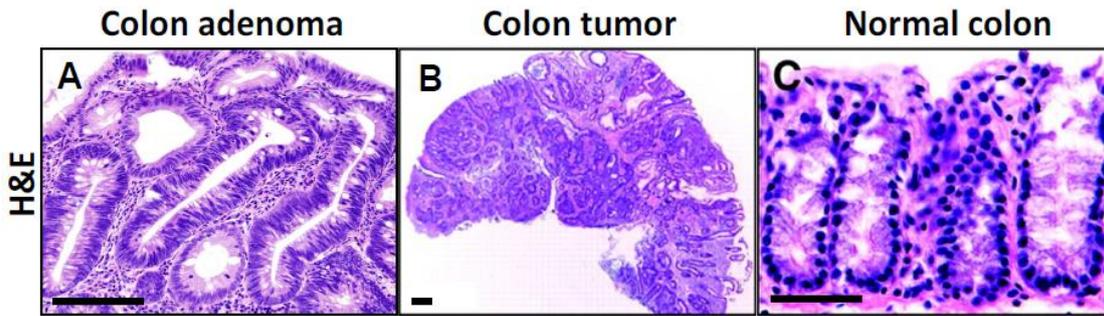


Figura 19: Ejemplos de tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) de los diferentes estadios durante la aparición de cáncer de colon. **(A)** Ejemplo de adenoma de colon donde podemos observar la aparición de lúmenes internos formando rosetas clásicas. Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Adenoma> . **(B)** Ejemplo de cáncer de colon. **(C)** Ejemplo de un epitelio de colon sano. Fuente: Fijneman et al., 2012.

(*KRAS*, *TP53* y *SMAD4*), que conduce a la aparición de cáncer de colon (Figura 19) (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Existen múltiples evidencia que indican que el cáncer de colon se inicia de forma casi exclusiva con una mutación activante de la cascada de Wnt. En casos de cáncer de colon donde *APC* no se encuentra mutada, es frecuente encontrar mutaciones en *AXIN2* o *CTNNB1* que también resultan en una estabilización aberrante de β -Catenina (Morin et al., 1997; Liu et al., 2000). El hecho de que la cascada de Wnt/ β -Catenina active la expresión genes implicados en la progresión del ciclo celular, como *MYC* y *CiclinaD1*, ha llevado a proponer a estas dianas como las responsables del mecanismo oncogénico dependiente de β -Catenina. Aunque no hay que olvidar el doble papel de β -Catenina en transcripción y adhesión. Debido a la difícil disección de ambas funciones, no queda claro cuál de ellas es la responsable de la oncogenicidad de β -Catenina. Para esclarecer este dilema, Cong et al (2003) crearon una proteína de fusión que estimula el reclutamiento de β -Catenina por β -TrCP provocando una disminución de la β -Catenina citoplasmática, y por lo tanto de la señal transcripcional Wnt, sin apreciarse alteraciones en las uniones adherentes. Como resultado, las células de colon que expresaban esta proteína de fusión perdían la habilidad de formar tumores en ratón. Sin embargo, por otro lado, ratones que carecen de Bcl9, un co-factor transcripcional importante para la actividad nuclear de β -catenin (Sampietro et al., 2006), son capaces de generar adenocarcinomas intestinales (Deka et al., 2010).

Meduloblastoma

El meduloblastoma es el tumor cerebral maligno más común en niños, aunque en algunas ocasiones también son diagnosticados en adultos. El tratamiento actual incluye extirpación y altas dosis de quimioterapia. Aunque con este tratamiento aumenta significativamente la esperanza de vida, aproximadamente un tercio de los pacientes mueren a causa de la enfermedad. Además los supervivientes a menudo

sufren secuelas neurológicas y endocrinas como resultado de los agresivos tratamientos y su corta edad (Northcott et al., 2011).

Estos tumores se localizan en la fosa posterior del cráneo (tronco encefálico y cerebelo). Dependiendo del tipo de meduloblastoma podemos encontrarlos localizados en los hemisferios cerebelares u ocupando el espacio del IV ventrículo.

Tradicionalmente los meduloblastomas se han clasificado en base a sus características histológicas. En este contexto, la OMS clasifica los meduloblastomas en cinco variantes: clásico (1), anaplásico (2), de células grandes (3), desmoplásico/nodular (4) y con extensa nodularidad (5) (Pfister et al., 2010).

(1) Clásico: Compuesto por células indiferenciadas de núcleo hipercromático, escaso citoplasma y altamente empaquetadas formando múltiples rosetas. Es la histología más común.

(2) De células grandes: Células grandes de núcleos pleomórficos mostrando angulación, y presencia de nucléolos también prominentes.

(3) Anaplásico: Células redondas y grandes de núcleos prominentes.

El 10% de los meduloblastomas combina estos dos últimos tipos de histología (Kool et al., 2012). Se denomina anaplásico de células grandes (LCA- *Large cell/anaplastic*).

(4) Desmoplásico/nodular: Caracterizado por combinar zonas con abundante diferenciación neuronal y regiones celulares muy activas mitóticamente con abundante desmoplasia (tejido conectivo).

(5) Con extensa nodularidad: Representa a tumores casi enteramente compuestos por nódulos con amplias zonas de neuropilo fibrilar y poco o nada desmoplásico.

La mayoría de meduloblastomas suelen ser de histología desmoplásica o clásica. Los de tipo demoplásico representan el 15% de los meduloblastomas y conforman el grupo con mayor incidencia en adultos (Kool et al., 2012). Este tipo se localiza en los hemisferios cerebelares y tienden a expresar marcadores de progenitores de células granulares del cerebelo, como Math1 y Pax6 (Pomeroy et al., 2002; Kho et al., 2004), representando la mayor parte de los meduloblastoma tipo Shh (Kool et al., 2012; Ellison et al., 2011b). Por el contrario, los histología clásica que representan entorno al 70% del total de meduloblastomas, expresan un heterogéneo grupo de marcadores neuronales no asociados a ningún tipo neuronal concreto (Kool et al., 2012). Varios tipos de formaciones en rosetas están presentes en los meduloblastoma de histología clásica. Entre ellas destacan las rosetas Homer-Wright (células tumorales alrededor de una área fibrilar), pseudorosetas perivasculares y las rosetas clásicas, donde las células tumorales se encuentran en torno a un lumen central.(Wolff et al., 2008; Ropper & Samuels, 2009).

Más recientemente, la necesidad de una clasificación más precisa, ha llevado a diversos grupos de investigación a realizar estudios de perfiles de expresión génica, análisis de número de copias de genes, alteraciones cromosómicas, epidemiología y

supervivencia. En base a estos parámetros podemos clasificar a los meduloblastomas en 4 subgrupos bien definidos: Wnt, Shh, Grupo 3 y Grupo 4 (Taylor et al., 2012). (Figura 20). Además, para ayudar al diagnóstico, se han identificado marcadores específicos para cada subtipo: DKK1 (o β -Catenina) para Wnt, SFRP1 (o Gli1) para Shh, NRP3 para el grupo 3, y KCNA1 para el grupo 4 (Northcott et al., 2011).

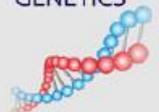
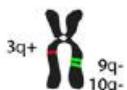
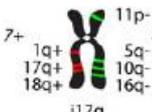
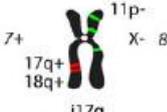
Molecular Subgroups of Medulloblastoma				
CONSENSUS	WNT	SHH	Group 3	Group 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	Group C	Group D
Kool (2008)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C, D	E, A	A, C
DEMOGRAPHICS				
Age Group:   	  	    	  	    
Gender: ♀ ♂	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀♀
CLINICAL FEATURES				
Histology	classic, rarely LCA	desmoplastic/nodular, classic, LCA	classic, LCA	classic, LCA
Metastasis	rarely M+	uncommonly M+	very frequently M+	frequently M+
Prognosis	very good	infants good, others intermediate	poor	intermediate
GENETICS				
	 CTNNB1 mutation	 PTCH1/SMO/SUFU mutation GLI2 amplification MYCN amplification	 i17q MYC amplification	 i17q CDK6 amplification MYCN amplification
GENE EXPRESSION				
	WNT signaling MYC+	SHH signaling MYCN+	Photoreceptor/GABAergic MYC+++	Neuronal/Glutamatergic minimal MYC/MYCN

Figura 20: Tabla comparativa de las características diferenciales de los diferentes subtipos de meduloblastomas. Taylor et al., 2012.

Una excesiva activación de la cascada de señalización Wnt/ β -Catenina tiene lugar entre el 13-15% de los meduloblastomas y es indicativa de un diagnóstico favorable (Pfister et al., 2010). Estos tumores son principalmente diagnosticados en niños de edades comprendidas entre 7-15 años, a diferencia de los tipo Shh que son diagnosticados a edades más tempranas o en algunas ocasiones en adultos (Fattet et al., 2009). El meduloblastoma del subtipo Wnt además de poseer unas características clínicas muy diferenciadoras es el único subtipo que ocupa el espacio del IV ventrículo al encontrarse adherido al tronco encefálico y al cerebelo (Figura 21). Este subtipo de meduloblastomas exhibe una alta inmunoreactividad contra β -Catenina, debido principalmente a mutaciones en *CTNNB1* (65% de los meduloblastomas esporádicos) en el entorno de la Ser33 y 37 (Ellison et al., 2011). Aunque también puede ser consecuencia de mutaciones en *APC* o *AXIN* (Fattet et al., 2009). Otra característica

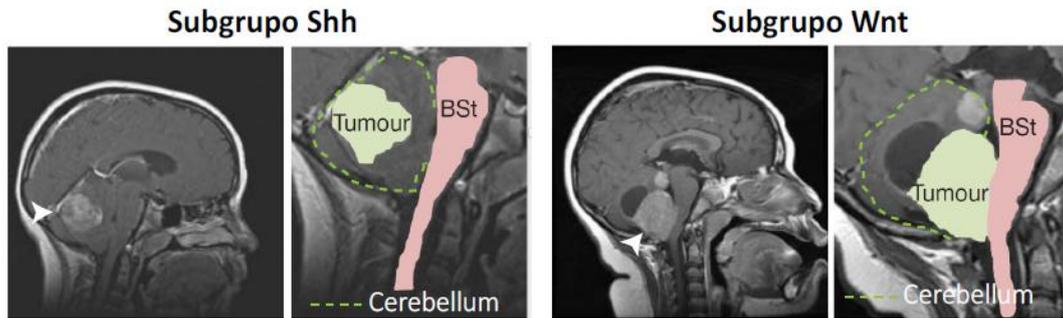


Figura 21: Ejemplos de RMN comparando pacientes con meduloblastoma del subtipo Shh y meduloblastomas del subtipo Wnt indicando la localización del tumor (punta de flecha blanca y tumour) respecto al tronco encefálico (Bst) y el cerebelo (línea discontinua verde). Gibson et al., 2010.

genética propia de éste subtipo es la monosomía del cromosoma 6, presente en el 80% de los casos (Clifford et al., 2006).

Aunque el origen celular del meduloblastoma ha sido cuestión de debate hasta recientemente, datos de modelos de ratón linaje-específicos han demostrado el origen celular de algunos tipos de meduloblastomas. Mientras los meduloblastomas del tipo Shh se originan exclusivamente de los precursores de células granulares del cerebelo (PCGC)(Schüller et al., 2008), los del grupo 3 (MycT58A;DNp53) parecen surgir tanto de poblaciones de células madres neuronales de la materia blanca del cerebelo como de PCGC, aunque estas últimas una vez transformadas pierden la expresión de marcadores propios de esta población celular (Pei et al., 2012). Por su parte, los del tipo Wnt, surgen de una población no cerebelar localizada en los progenitores neuroepiteliales del tronco encefálico dorsal. Concretamente, la huella genética de los meduloblastoma tipo Wnt correlaciona con la de los progenitores neurales del romboencéfalo (r2-r8) (Gibson et al., 2010). Aunque un origen cerebelar del meduloblastoma Wnt ha sido ampliamente propuesto, mutaciones activantes de *CTNNB1* no han demostrado causar neoplasia o una marcada expansión de poblaciones de progenitores cerebelares, aún demostrando un efecto proliferativo en algunas de ellas (Gibson et al., 2010; Pei et al., 2012b)

Los meduloblastomas pueden diseminarse a otras partes del cerebro o de la medula espinal a través del líquido cerebroespinal (Perry & Brat, 2010). La metástasis es más común en el grupo 3 (33%) y 4 (30%) que en el tipo Shh (17%), siendo muy poco frecuente en el meduloblastoma Wnt (9%) (Northcott et al., 2011). Los tumores de los grupos 3 y 4 además de ser los más proclives a la metástasis son los de peor pronóstico. Se caracterizan por contener amplificaciones del gen *MYC* (Grupo 3) o *MYCN* (Grupo 4) e isocromosoma 17q (que frecuentemente conlleva la pérdida de *TP53*). Además son normalmente de histología LCA. Algunos meduloblastomas con fenotipo LCA han sido descritos por presentar una activación de la ruta de Wnt. También se han encontrado meduloblastomas Wnt donde se han observado altos niveles de expresión de *MYC*. Curiosamente aunque tanto una alta expresión de *MYC* como una histología LCA son asociados a mal pronóstico, estos pacientes presentan un

buen pronóstico, reforzando la idea de que la activación de la cascada de Wnt supone un marcador de pronóstico favorable (Ellison et al., 2005; Thompson et al., 2006).

Células madre iniciadoras de tumor

Existen muchas evidencias de que la iniciación, crecimiento y mantenimiento de tumores es sostenido por una pequeña fracción de células que muestra propiedades de células madre, conocidas como células madre tumorales (Reya et al., 2001). Estas células madre tumorales comparten muchas características con las células madre normales (embrionarias o adultas), como una continua auto-renovación y propiedades de células multipotentes. Diferentes tumores cerebrales, entre los que incluimos meduloblastomas y glioblastomas, contienen células madre tumorales que expresan genes característicos de células madre normales, tales como Sox2 y CD133 (Singh et al., 2004; Hemmati et al., 2003).

La proteína de membrana CD133 (prominin1) se expresa en progenitores de diferentes tejidos en desarrollo. Durante el desarrollo del SNC se expresa en los progenitores del tubo neural (Zhu et al., 2009) formando parte del complejo apical de estas células (Figura 22a, b) (Marthiens & ffrench-Constant, 2009). Sin embargo, su expresión en el SNC adulto queda restringida a la capa ependimaria y a la zona subventricular (Zhu et al., 2009). Las células CD133+ han sido definidas como células iniciadoras de tumores cerebrales. Células CD133+ aisladas de meduloblastomas y glioblastomas son capaces de generar un nuevo tumor tras ser inyectadas en el cerebro de ratón, en contraste con las CD133- que no consiguen re-formar un nuevo tumor incluso cuando son inyectadas en un número significativamente superior (Singh et al., 2004). Fuera del sistema nervioso, la expresión de CD133 coincide con la de LGR5, un marcador de células madres intestinales y un conocido target de Wnt (Zhu et al., 2009). Por este motivo CD133 es usado como marcador de células madres cancerígenas en tumores intestinales frecuentemente asociados a una señal aberrante de Wnt. Expresión de mutaciones activantes de β -Catenina en células intestinales

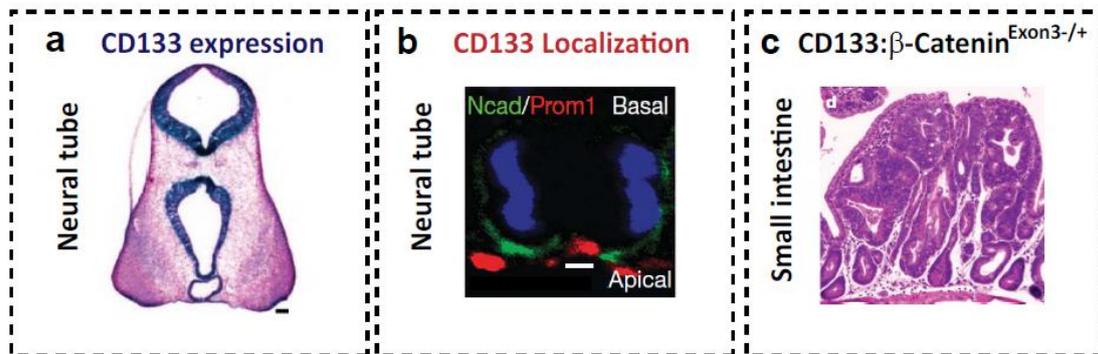


Figura 22: (A) Expresión de CD133 (azul) durante el desarrollo del tubo neural de ratón. Zhu et al., 2009. (B) Localización subcelular de CD133 (rojo, Prom1) en el complejo apical de células neuroepiteliales de ratón junto a N-Cadherina (verde, NCad). Marthiens & ffrench-Constant, 2009. (C) Tinción con hematoxilina y eosina en una sección de un tumor de intestino delgado de ratón tras 60 días de expresión de una forma estable de β -Catenina en células CD133. Zhu et al., 2009.

CD133+ de ratones adultos, provoca una alteración de la arquitectura de la cripta y una expansión desproporcionada de ésta, que finalmente desemboca en la transformación de la mucosa intestinal (Figura 22C) (Zhu et al., 2009).

Sox2 por su parte, es un factor de transcripción expresado diferencialmente en células madre pluripotentes y progenitores del tubo neural que se encuentra también sobre-expresado en células madre derivadas de tumores primarios del SNC a pesar de no presentar mutaciones (Pomeroy et al., 2002; Oliver & Wechsler-Reya, 2004; Lee et al., 2006). Aunque Sox2 empieza ya a expresarse en células pluripotentes del embrioblasto, los tumores cerebrales parecen derivar de progenitores neurales multipotentes (neuroblastos), como indica la presencia de células diferenciadas pertenecientes únicamente al linaje neural dentro de estos tumores. Estos neuroblastos (Sox2+;CD133+) aparecen en el desarrollo temprano del sistema nervioso, con la aparición del tubo neural (Hitoshi et al., 2004).

Al final de la neurogénesis los neuroblastos comienzan una fase de diferenciación simétrica (divisiones neurona-neurona) que supone la pérdida progresiva del número de progenitores, de forma que en individuos adultos solo un pequeño número de células madre neurales persisten en determinadas áreas del sistema nervioso central, como en el hipocampo (células granulares del giro dentado) o en la zona subventricular (McKay, 1997; Temple, 2001). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que células obtenidas de distintas áreas del sistema nervioso central, donde no se han identificado células madre adultas in vivo, pueden exhibir propiedades de células madres en cultivo (Kondo and Raff, 2000; Walder & Ferretti, 2004; Weiss et al., 1996; Lee et al., 2005). Además es conocido que la inducción de ciertos genes presentes en tumores (Oct-3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4) lleva a la reprogramación de células diferenciadas, las cuales adquieren características de células madre a través de un proceso denominado desdiferenciación (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Si ponemos en conjunto estos datos, podemos asumir tres diferentes vías de generación de células madre tumorales. Una proveniente de células ya diferenciadas, que sufrirían un proceso de desdiferenciación al incorporar mutaciones oncogénicas; una segunda a partir de una expansión descontrolada de células madre adultas; y una tercera generada por una alteración en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias. Debido al hecho de que los meduloblastomas Wnt tengan una mayor incidencia en niños y que mutaciones hereditarias como las de APC en el síndrome de Turcot sean efectivas en todas las etapas de la embriogénesis, resulta muy probable que en el caso de los meduloblastoma Wnt, las células madre embrionarias sean la principal fuente de células madre tumorales. El mantenimiento de señales que controlan las características de célula madre podría generar un estado de quiescencia que podría proporcionar una fuente de células madre iniciadoras de tumor. Además esta población latente de células iniciadoras de tumor es susceptible a nuevas mutaciones que pueden favorecer su adaptación al medio (proliferación celular, evasión de la

respuesta inmune, respuesta a anoxia) y que junto a su capacidad de replicación contribuyan a la progresión del tumor. Se cree que de media son requeridas entre 4 y 7 mutaciones para la transformación tumoral de una célula (Hanahan et al., 2000). En el caso del meduloblastoma Wnt, las mutaciones estabilizantes de β -Catenina siempre van acompañadas de una alteración cromosómica (principalmente monosomía 6), y en la mayoría de los casos de 1-4 mutaciones adicionales (Robinson et al., 2012). Desde este punto de vista, existe un grupo de mutaciones primarias que evitando los programas de diferenciación contribuyen a la generación de una población latente de células madre, y un segundo grupo de alteraciones génicas implicadas en la transformación y progresión del tumor. En concordancia, el gen *TP53* es afectado en aproximadamente el 15% de los meduloblastomas totales suponiendo un factor de mal pronóstico (Frank et al., 2004; Tabori et al., 2010). El modelo de ratón del meduloblastoma Wnt genera crecimientos preneoplásicos en el cuarto ventrículo que no llegan a ser tumorales a menos que incorporen una segunda mutación oncogénica como la delección de *TP53* (Figura 23B)(Gibson et al., 2010). Además se ha demostrado que deficiencias en p53 aumenta la incidencia de meduloblastomas en el modelo de ratón del subtipo Shh (*Patched*^{+/-}; Wetmore et al., 2001) y parece requisito imprescindible para la génesis de meduloblastomas dependientes de *MYC* (Pei et al., 2012). Por otro lado, en un estudio reciente donde se secuencian el genoma de células de 37 meduloblastomas, comparándolas con el genoma de células sanguíneas del mismo paciente, encuentran nuevas mutaciones oncogénicas secundarias en los diferentes subtipos, como mutaciones activantes de *PIK3CA* (p110 α). Curiosamente, antagonistas de la señal PI3K/mTOR han demostrado inhibir el crecimiento de xenotrasplantes de meduloblastomas *MYC* dependiente (Pei et al., 2012). Aunque ninguna de estas mutaciones (*PIK3CA* o *TP53*) es capaz de generar meduloblastomas cuando son expresadas en progenitores del romboencéfalo, por si solas o combinando ambas, éstas generan meduloblastomas cuando se combinan con mutaciones activantes en *CTNNB1*. Además su efecto es aditivo, ya que la combinación de ambas

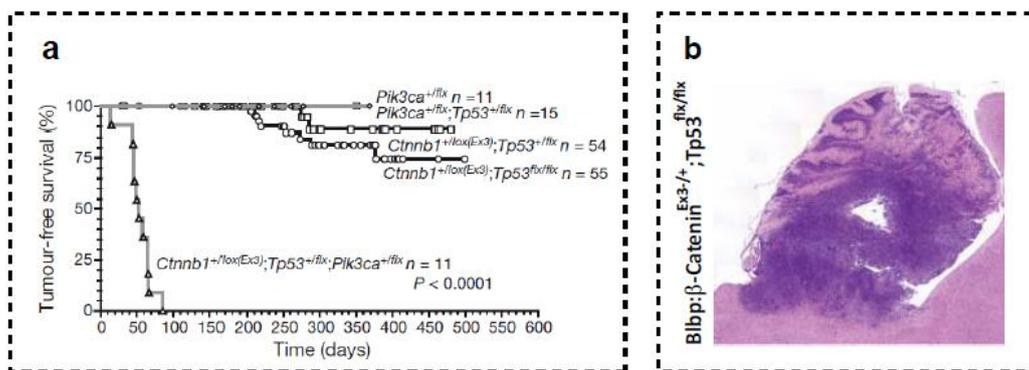


Figura 23: (A) Estudio de la supervivencia tras la incorporación de mutaciones adicionales (*TP53*^{-/-} y *PIK3CA*^{E545K}) en el modelo de ratón del meduloblastoma tipo Wnt (Blbp:β-catenin^{exon3+/-}). Robinson et al., 2012 **(B)** Tinción con hematoxilina y eosina en una sección sagital de un meduloblastoma de un ratón Blbp:β-catenin^{exon3+/-};TP53^{-/-}. Gibson et al., 2010.

acelera significativamente la iniciación de tumores dependientes de β -Catenina (Figura 23A) (Robinson et al., 2012).

Estos resultados demuestran que mutaciones en *CTNNB1* provoca una predisposición en la célula para su transformación maligna, sin ser ella por si sola causante de malignidad. Esta población residual de células madre embrionarias inducidas por β -Catenina son susceptibles a nuevas alteraciones génicas que las transforman en células madre tumorales. El estudio del mecanismo implicado en la generación de esta población residual de células madre iniciadoras de tumor es el principal objetivo de la presente tesis.

Objetivos

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis es el de estudiar el mecanismo por el cual mutaciones estabilizantes de β -Catenina generan crecimientos preneoplásicos en la región dorsal del romboencéfalo.

OBJETIVOS CONCRETOS

- Analizar el efecto de la expresión de β -Catenina sobre la proliferación y diferenciación de los progenitores del tubo neural.
- Determinar la implicación de la función transcripcional y estructural de β -Catenina en la generación de crecimientos preneoplásicos.
- Analizar la implicación de β -Catenina en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal de los neuroblastos.
- Estudiar la relación entre polaridad celular y estado progenitor en los progenitores del tubo neural.
- Identificación de nuevas proteínas implicadas en el génesis de crecimientos preneoplásicos inducidos por formas oncogénicas de β -Catenina.

Resultados

RESULTADOS

Electroporación de formas oncogénicas de β -Catenina causa crecimientos preneoplásicos en el tronco encefálico dorsal

El modelo de ratón del meduloblastoma Wnt, $Blbp:CTTNB1^{exon3-/+}$, genera crecimientos preneoplásicos altamente semejantes a los estadios iniciales de meduloblastomas Wnt humanos. En este ratón, una forma estable de β -Catenina es expresada bajo el control del promotor de *Blbp* en los progenitores del romboencéfalo (Gibson et al., 2010). Con el objetivo de reproducir los estadios iniciales de estos tumores usamos el sistema PiggyBac (Lu et al., 2009), el cual permite una transfección estable de formas oncogénicas de β -Catenina ($s\beta$ -Catenina) en los progenitores del romboencéfalo de pollo mediante ooelectroporación (Figura 24A).

La tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y hematoxilina-eosina (H&E) del tronco encefálico tras 7 días post-electroporación (7dpe), nos reveló anomalías citológicas que incluían; crecimientos celulares que penetraban en el IV ventrículo, discontinuidades en el neuroepitelio y formaciones neuroepiteliales ectópicas en zonas internas del tejido neural semejantes a rosetas clásicas (flechas Figura 24B). El doble marcaje con GFP y el marcador de proliferación PCNA reveló que solo una fracción de células $s\beta$ -Catenina⁺ eran proliferativas (Figura 24C, 7dpe, flecha). Inmunohistoquímica contra el marcador de progenitores neurales Sox2 confirmó que la estructura neuroepitelial estaba severamente alterada y que las células que formaban rosetas eran positivas para Sox2 (Figura 24D, flechas).

Tras 15 días post-electroporación (18 días post-incubación), estadio en el cual el desarrollo del cerebelo de pollo se encuentra muy avanzado, las masas de células que contenían células GFP⁺ ($s\beta$ -Catenina⁺) ocupaban el espacio del IV ventrículo (Figura 24E). Al igual que en el modelo de ratón del meduloblastoma Wnt (Gibson et al., 2010), en este estadio ninguna de las masas $s\beta$ -Catenina⁺ aparecían adheridas o invadían el cerebelo (identificado con Pax6) (Figura 24E).

Estos resultados indicaban que la electroporación de formas oncogénicas de β -Catenina en el romboencéfalo de pollo reproducía ampliamente los crecimientos preneoplásicos observados en el modelo de ratón del meduloblastoma Wnt. Además, el análisis de estos crecimientos en el ratón $Blbp:CTTNB1^{exon3-/+}$ sugería que la capacidad oncogénica de β -Catenina no era debida a una elevada proliferación (Gibson et al., 2010). Consistentemente, nosotros observamos que solo una fracción de las células $s\beta$ -Catenina⁺ que formaban estos crecimientos eran proliferativas (Figura 24C).

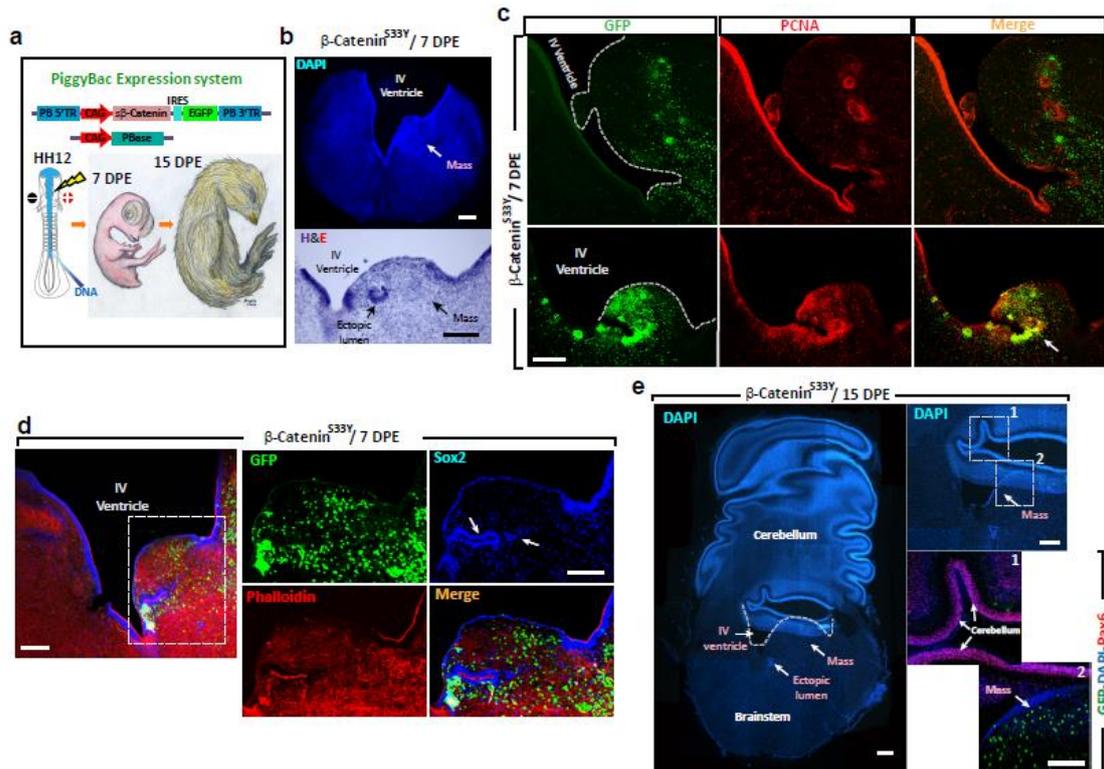


Figura 24: Electroporación de una forma estable de β -Catenina ($s\beta$ -Catenina) en los progenitores del romboencéfalo causa un crecimiento aberrante que se asemeja a los meduloblastomas del subtipo *Wnt*. (A) Embriones de pollo HH12 (48h de incubación) fueron electroporados con β -catenina^{533Y} en el vector de expresión PiggyBac y posteriormente sacrificados tras 7 o 15 días post-electroporación (dpe). (B) Tinciones con DAPI y H&E de secciones transversales de tronco encefálico 7dpe. (C) Imágenes de mayor magnificación de secciones de tronco encefálico mostrando dos ejemplos de acumulaciones aberrantes de células teñidas con anticuerpos contra GFP (verde; transfección) y PCNA (rojo, marcador de células proliferativas). (D) Imágenes de menor y mayor magnificación de secciones de tronco encefálico de 7dpe teñidas con Phalloidin (rojo, F-Actina) y anticuerpos contra GFP (verde, transfección) y Sox2 (azul, marcador de células progenitoras). (E) Tinción con DAPI de una sección transversal de tronco encefálico que la cual el suelo del IV ventrículo y la masa aberrante de células están delimitadas por una línea discontinua. Los paneles inferiores de la derecha muestran las ampliaciones de las dos áreas indicadas con recuadros de línea discontinua (1 y 2) en la imagen superior. Las secciones fueron teñidas con DAPI (azul) y anticuerpos contra GFP (verde, transfección) y Pax6 (rojo, marcador de la capa granular externa del cerebelo). Escala 150 μ m.

Para determinar si un desequilibrio en el proceso de proliferación/diferenciación era el origen de estos crecimientos, analizamos la actividad de los reporteros luciferasa Sox2 (expresado en progenitores) y NeuroD (expresado en neuronas) en experimentos a corto plazo. Ensayos de luciferasa a 24 y 48 horas tras la electroporación de $s\beta$ -Catenina mostraban un reducción significativa de la expresión de NeuroD, mientras que la expresión de Sox2 aparecía incrementada (Figura 25A). De forma interesante, inmunohistoquímica contra Sox2 y los marcadores de diferenciación β -Tubulina-III y HuC/D, mostraban que las células $s\beta$ -Catenina+ expresaban Sox2 y mantenían la polaridad ápico-basal, como indica la presencia de N-Cadherina apical en estas células (Figura 25B). Además las células $s\beta$ -Catenina+ carecían de expresión de marcadores de diferenciación (β -Tubulina-III y HuC/D) y no experimentaban la migración lateral a la zona del manto (Figura 25B; cuantificación en Figura 35F). Asimismo las células $s\beta$ -

Catenina+ causaban malformaciones que incluían invaginaciones del neuroepitelio y formación de lúmenes ectópicos a los largo del eje rostro-caudal del tubo neural (Figura 25B).

Ya que el estado progenitor y el mantenimiento del ciclo celular son dos procesos estrechamente relacionados, lo siguiente que nos preguntamos era si el ratio de proliferación estaba afectado. Curiosamente, la incorporación de BrdU mostraba un incremento en células s β -Catenina tras 24 horas de electroporación (hpe), mientras disminuía tras 48 horas de electroporación (Figura 25D). Para confirmar este resultado evaluamos mediante citometría de flujo (*Flourescence-Activated Cell Sorting-FACS*) el número medio de divisiones de células GFP+ usando *Cell Trace Violet*, un colorante citoplasmático retenido por las células, que se va diluyendo con cada división celular (Saade et al., 2013). Comparando con las células control, las células s β -Catenina+ mostraban una menor intensidad media de *Cell Trace Violet* a 24hpe, pero mayor a 48hpe, indicando que los progenitores que expresaban s β -Catenina experimentaban más divisiones al inicio pero disminuían su ratio de proliferación pasadas las primeras 24hpe (Figura 25E).

Para profundizar en la cinética del ciclo celular, analizamos el contenido de DNA mediante citometría de flujo (GFP⁺-Hoechst-FACS) para determinar qué porcentaje de células se encontraban en las diferentes fases del ciclo celular. Al igual que mostraban los ensayos de BrdU y *Cell Trace Violet*, el porcentaje de células s β -Catenina+ en fase S era mayor tras 24hpe, pero disminuía tras 48 hpe en comparación con las células control. Además este resultado mostraba que tras 48hpe, el porcentaje de células s β -Catenina+ en fase M era significativamente mayor (Figura 25F). Inmunohistoquímica con anti-fosfohistona H3 (PH3), un marcador de células en mitosis, confirmó los datos de FACS y al mismo tiempo mostraba que en las zonas donde el neuroepitelio presentaba invaginaciones, el porcentaje de células s β -Catenina+ en fase M era significativamente mayor, si lo comparábamos con células control GFP+ o células β -Catenina+ de zonas donde el neuroepitelio no sufría malformaciones (Figura 25G,H).

Todos estos resultados, indicaban que la electroporación en el tubo neural de formas oncogénicas de β -Catenina causaba una aceleración inicial de ciclo celular, en concordancia con la bibliografía (Álvarez-Medina et al 2009), y una posterior desaceleración del ciclo debido a una prolongada fase M. Por consiguiente, las células s β -Catenina+ se mantenían dividiéndose lentamente como progenitores neurales Sox2+, reteniendo la polaridad ápico-basal y evitando la diferenciación y migración lateral a la zona del manto propia de la neurogénesis. Por otro lado, la sobre-expresión de *MYC* y *CCND1* (Ciclina D1), dos conocidas dianas de la cascada de Wnt/ β -Catenina que inducen proliferación en neuroblastos (Álvarez-Medina et al., 2009), no generaban malformaciones epiteliales (Figura 26F), demostrando que los crecimientos preneoplásicos del neuroepitelio inducidos por s β -Catenina no eran debidos simplemente a una excesiva proliferación de los neuroblastos.

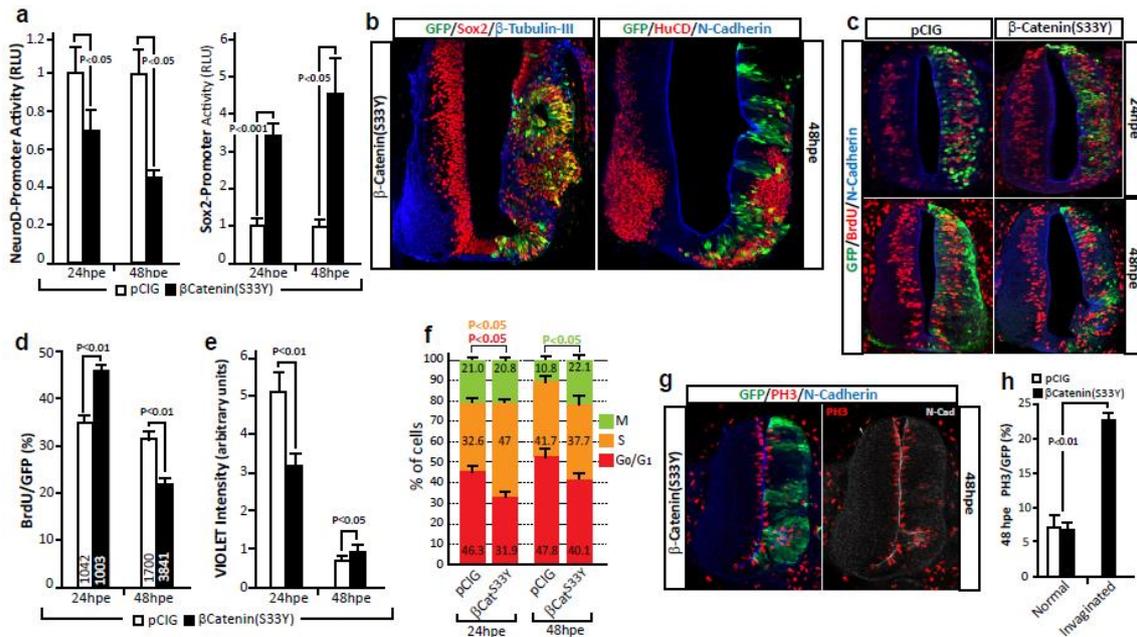


Figura 25: β -Catenina mantiene las características multipotentes de los neuroblastos pero reduce su proliferación. **(A)** β -catenina^{S33Y} o pCIG (control) fueron electroporados junto con los reporteros luciferasa Sox2 y NeuroD. La actividad luciferasa fue medida tras 24 y 48 hpe. **(B)** Secciones transversales de tubo neural tras 48 hpe con β -catenina^{S33Y} teñidas con anticuerpos contra GFP (verde), Sox2 (marcador de progenitores) o HuC/D (marcador de diferenciación) (rojo) y β -TubulinIII (marcador de diferenciación) o N-Cadherina (marcador de uniones adherentes) (azul). **(C,D)** Imágenes representativas y cuantificación de 24 y 48 hpe de β -catenina^{S33Y} o pCIG (control) en tubo neural de pollo HH12 teñidas con anticuerpos contra GFP (verde), BrdU (rojo, marcador de proliferación) y N-Cadherina (azul). El total de células GFP+ contadas para cada condición es mostrado en cada barra. **(E)** Ensayo en condiciones similares a (C) de *Cell Trace Violet* donde el diagrama de barras muestra la intensidad media de *Violet* por célula cuantificado por FACS. **(F)** Análisis del ciclo celular de células GFP+ analizadas por FACS de tubo neural de pollo HH12 electroporado con β -catenina^{S33Y} y pCIG por 24 y 48 horas. Un mínimo de 2500 células GFP+ fueron analizadas por cada condición. **(G,H)** Imágenes representativas y cuantificación de tubo neural de pollo electroporado con β -catenina^{S33Y} y pCIG por 24 y 48 horas y teñido con anticuerpos contra GFP (verde, transfección), PH3 (rojo, fosfohistona H3, marcador de células en fase M) y N-Cadherina (azul). El porcentaje de células transfectadas PH3+ fue evaluado comparando zonas del neuroepitelio invaginadas y no invaginadas. Las barras de las gráficas muestran las medias \pm SD (desviación estándar) de al menos tres experimentos. Las diferencias significativas fueron evaluadas por one-way ANOVA y Tukey's test.

La contracción ápico-basal de células β -Catenina+ conduce a severas malformaciones del neuroepitelio

Para comenzar a descifrar que proceso celular llevaba a la formación de crecimientos preneoplásicos, primero de todo evaluamos la conservación de la actividad de β -Catenina a lo largo del eje rostro-caudal del tubo neural. Para ello, electroporamos 3 formas estables de β -Catenina diferentes (β -Catenin^{S37A}, β -Catenin ^{Δ 29-48}, β -Catenin^{S33Y}), a niveles del romboencéfalo y de la medula espinal en desarrollo (Figura 26A). La tinción del citoesqueleto de actina con Phalloidin mostraba que las tres formas diferentes de β -Catenina inducían malformaciones similares en la

zona ventricular. Estas malformaciones consistían en la formación de profundas invaginaciones de la cara luminal del neuroepitelio con una distorsión mínima de la membrana basal (Figura 26B-E). Las invaginaciones eran similares en ambas regiones, romboencéfalo (Figura 26B) y medula espinal (Figura 26C-E). Las alteraciones epiteliales causadas por β -Catenina eran muy similares en los diferentes niveles estudiados del tubo neural (Figura 26C-E:medula espinal, 26B:romboencéfalo), sugiriendo que un mecanismo celular común controlaba la integridad del neuroepitelio a través de β -Catenina.

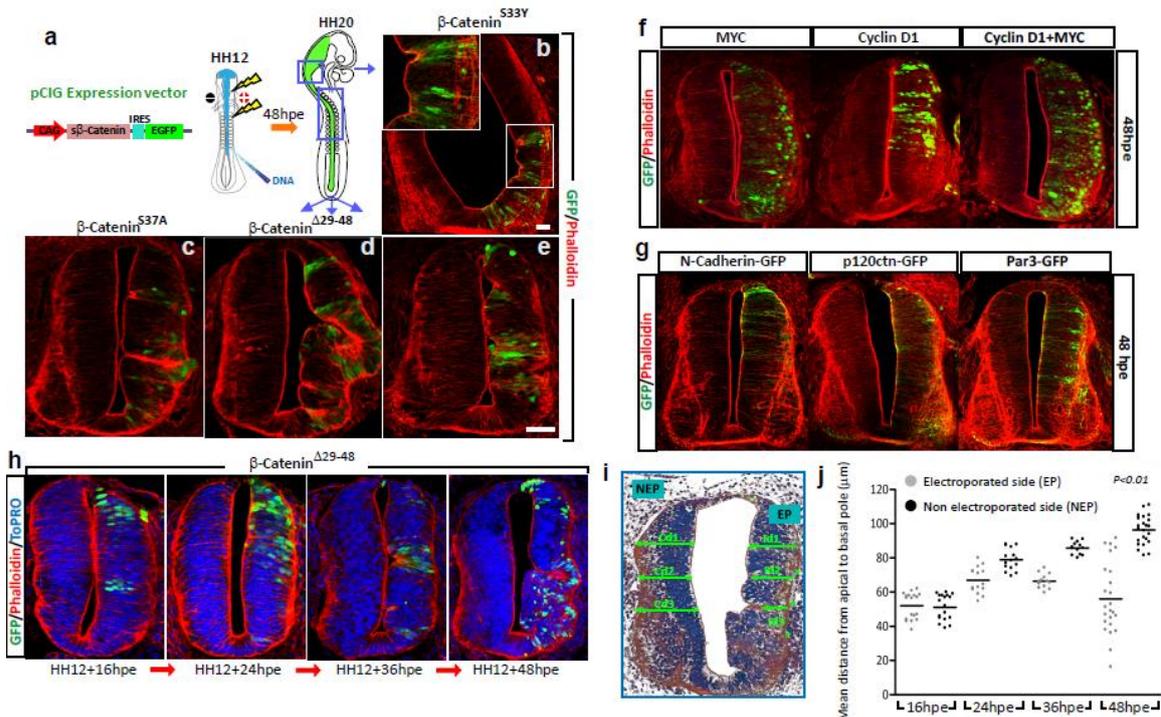


Figura 26: La contracción ápico-basal de las células que expresan β -Catenina lleva a severas malformaciones del neuroepitelio. **(A-E)** Electroporación de tres diferentes formas estables de β -Catenina (β -catenina^{S37A}, β -catenina ^{Δ 29-48}, β -catenina^{S33Y}) a nivel del romboencéfalo (B) y medula espinal (C-E) de tubo neural de pollo HH12+48hpe. Secciones transversales teñidas con Phalloidin (rojo, F-actina) y anti-GFP (verde, transfección). **(F-G)** Sobre-expresión de MYC, CyclinD1, MYC+CyclinD1, N-Cadherina, p120ctn o Par3 no causa contracción ápico-basal ni malformaciones neuroepiteliales. MYC, CyclinD1, MYC+CyclinD1, N-Cadherina-GFP, p120ctn-GFP o Par3-GFP fueron electroporados en tubo neural de embriones de pollo HH12 por 48 horas. Secciones transversales teñidas con Phalloidin (rojo, F-actina) y anti-GFP (verde, transfección). Ninguna de estas moléculas causaba crecimientos aberrantes. **(H)** Secciones de embriones de pollo tras 16, 24, 36 y 48 hpe con β -Catenina teñidas con Phalloidin (rojo, F-actina) y anti-GFP (verde, transfección). **(I)** Esquema representativo de como la distancia ápico-basal fue medida en las células β -Catenina+ que formaban invaginaciones. Para cada Id (Invagination distance) medida en el lado electroporado (EP) un Cd (control distance) fue medido al mismo nivel dorso-ventral del lado no-electroporado (NEP). **(J)** Gráfica de puntos representando la distancia ápico-basal a diferentes tiempos de transfección (16, 24, 36, 48hpe).

El análisis de células β -Catenina+ en una secuencia temporal, nos mostraba que las primeras invaginaciones del lumen empezaban a ser evidentes a 24hpe, llegando a ser claramente visibles a 36 y 48 hpe (Figura 26H). Para cuantificar las invaginaciones, medimos la distancia ápico-basal de la célula localizada en el centro de

la invaginación (Id) y la distancia ápico-basal al mismo nivel dorso-ventral de la parte contralateral no electroporada (Cd), en la cual el proceso de neurogénesis y migración lateral no está alterado (Figura 26I). La gráfica (Figura 26J) mostraba que la distancia ápico-basal en la parte no electroporada aproximadamente se duplicaba entre 16 y 48 hpe, debido a la aparición de la zona marginal, mientras que la distancia en las zonas invaginadas incrementaba significativamente menos. De forma notable, la distancia ápico-basal de algunas de las células β -Catenina+ que formaban las invaginaciones era incluso menor a 48hpe que a 16hpe, demostrando que β -Catenina inducía una contracción ápico-basal en estas células.

La ausencia de migración lateral y la conservación de la polaridad ápico-basal en células β -Catenina+ sugería una implicación del papel estructural de β -Catenina en la formación de las invaginaciones. Por otro lado, los cambios observados en la cinética del ciclo celular apuntaban a una respuesta transcripcional. Así que nos propusimos diseccionar el papel estructural y transcripcional de β -Catenina en el inicio de estas malformaciones del neuroepitelio.

β -Catenina requiere la transcripción dependiente de TCF pero no la unión a α -Catenina para inducir malformaciones neuroepiteliales

Para examinar la influencia de la función estructural y transcripcional de β -Catenina en la génesis de crecimientos preneoplásicos, usamos una colección de diferentes constructos que nos permitía aislar ambas funciones. Entre ellos incluimos un mutante de β -Catenina que carece del dominio de unión a α -Catenina (Aberle et al., 1994), β -Catenin^{S33Y} $\Delta\alpha$ CatBS; y un mutante que al carecer del dominio de unión C-terminal a los co-activadores transcripcionales, posee solo una leve actividad transcripcional pero conserva la capacidad de unirse a las uniones adherentes (Valenta et al., 2011), β -Catenin^{S33Y} Δ CT (Figura 27A). Además, usamos tres constructos que contienen el dominio HMG box de TCF3: (1) Tcf3-HMGB, que contiene simplemente el dominio HMG y que mediante un antagonismo competitivo neutraliza la transcripción dependiente de TCF; (2) el dominio HMG box de TCF3 fusionado al dominio del transactivador de VP16, VP16-Tcf3; (3) o fusionado al dominio represor de la proteína Engrailed, EnR-Tcf3 (Figura 27A).

Además, con el fin de observar la respuesta transcripcional Wnt a nivel celular, generamos el reportero 5X Tcf-bs-RFP (TopRed; TR), una modificación del clásico 5XTcf-bs-Luc (TopFlash). La capacidad relativa de VP16-Tcf3 y β -Catenina para estimular la transcripción dependiente de TCF fue estudiada en células neuroepiteliales con TopFlash y la sensibilidad del reportero TopRed fue probada mediante la transfección de EnR-Tcf3 o VP16-Tcf3 en células HEK (Figura 27A). La co-electroporación de TopRed con el vector control pCIG(GFP) nos mostraba la señal TopRed en el dominio endógeno Wnt de la zona dorsal del tubo neural (Figura 27B,B'), demostrando que TopRed es un reportero fiable de la actividad Wnt.

La co-electroporación de β -Catenin^{S33Y} (transcripcional⁺/estructural⁺) con TopRed mostraba que las células que formaba parte de las malformaciones neuroepiteliales expresaban altos niveles de RFP (Figura 27C,C'). Sin embargo, niveles similares de RFP eran evidentes con VP16-Tcf3 (transcripcional⁺/estructural⁻) incluso cuando las invaginaciones generadas eran apreciablemente más pequeñas (Figura 27D,D'). β -Catenin^{S33Y} $\Delta\alpha$ CatBS (transcripcional⁺/ α -Catenina⁻), inducía una respuesta transcripcional y celular similar a β -Catenin^{S33Y} (Figura 27E,E'), mientras que β -Catenin^{S33Y} Δ CT (transcripcional⁻/estructural⁺) ni inducía actividad transcripcional (incluso presentaba un leve efecto dominante negativo sobre la actividad endógena

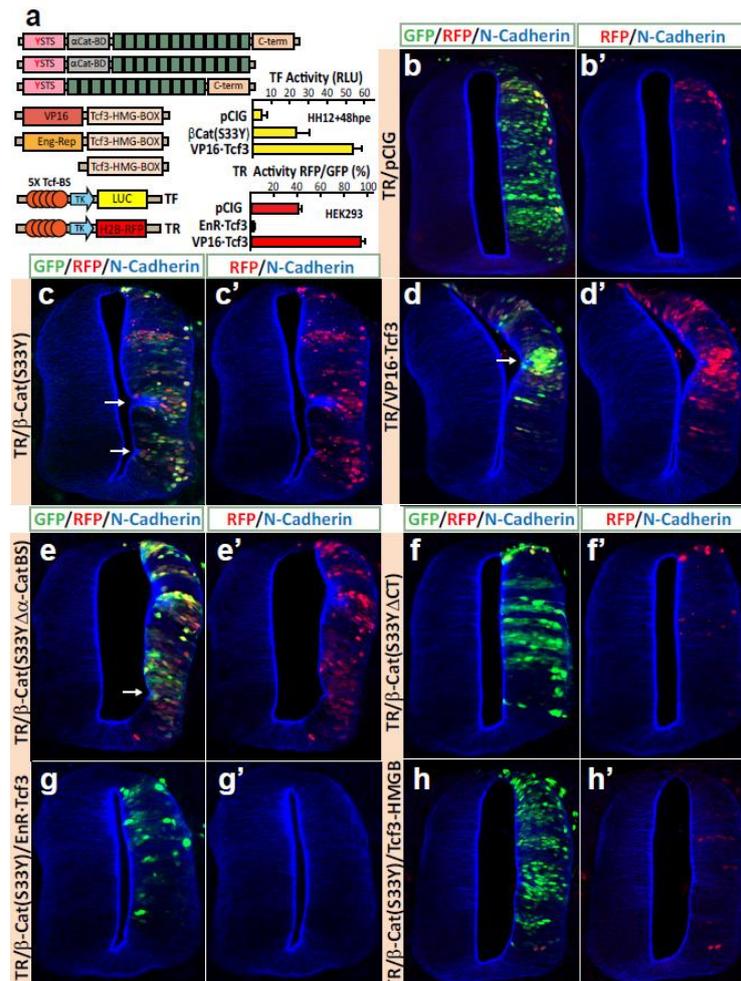


Figura 27: β -Catenina requiere la transcripción dependiente de TCF pero no la unión a α -Catenina para inducir malformaciones neuroepiteliales. **(A)** Esquema de los diferentes constructos usados en la figura. Todos los constructos, excepto los reporteros (TopFlash y TopRed), fueron clonados en pCIG. Moduladores de la transcripción dependiente de TCF contenían simplemente un Tcf3-HMG box (Tcf3-HMGB), o fusionado al activador VP16 (VP16-Tcf3) o al represor Engrailed (EnR-Tcf3). Los reporteros TopFlash y TopRed contenían un 5xTcf binding site controlando la expresión de Luciferasa o RFP. La potencia transcripcional de β -Catenina y VP16-Tcf3 fue comparada con TopFlash en embriones de pollo HH12 tras 48hpe. El rendimiento de TopRed se evaluó en HEK293 con VP16-Tcf3 y EnR-Tcf3. **(B-H)** Los diferentes combinaciones de constructos fueron analizadas 39hpe en tubo neural de embriones de pollo HH12. Secciones transversales fueron teñidas con anticuerpos contra GFP (verde, transfección), RFP (rojo, actividad dependiente de TCF) y N-Cadherina (azul). Las flechas indican las invaginaciones.

Wnt), ni mostraba capacidad de formar invaginaciones (Figura 27F,F'). Por otro lado, los represores transcripcionales Tcf3-HMGB y EnR-Tcf3, eran capaces de revertir totalmente las malformaciones y la expresión de RFP inducida por β -Catenin^{S33Y} (Figura 27 G,G' y H,H'; transcripcional⁻/estructural⁺).

Juntos, estos experimentos demostraban que la asociación entre β -Catenin y α -Catenina no era requerida para la retención de células β -Catenina⁺ en la zona ventricular ni para la formación de invaginaciones inducidas por β -Catenina. En cambio, la actividad transcripcional Wnt resultaba ser absolutamente necesaria para la formación de estas malformaciones preneoplásicas.

β -Catenina regula la formación del complejo apical (AC) a través de mecanismos dependientes e independientes de TCF

Experimentos previos demostraban que las malformaciones comenzaban con la formación de invaginaciones en la cara apical del neuroepitelio sin apreciable distorsión de la membrana basal (Figura 26H). Así que lo siguiente que decidimos fue analizar si la expresión de β -Catenina afectaba a los componentes del complejo apical (AC) en estos estadios iniciales.

La cantidad total de N-Cadherina y aPKC detectada por Western Blot era significativamente mayor en lisados de tubo neural transfectado con β -Catenina, mientras que otros componentes del AC, tales como Zo-1, solo aumentaban levemente (Figura 28A). Por lo tanto, la expresión de algunos componentes del AC parecía ser regulada por la actividad Wnt. Mediante inmunohistoquímica comprobamos la distribución sub-celular de los componentes del AC. La distribución de β -Catenina principalmente co-localizaba con N-Cadherina en el complejo apical (Figura 28B). Además, en células β -Catenina⁺, ZO-1 (Figura 28C), aPKC (Figura 28D) y N-Cadherina (Figura 28C,D) aparecían acumuladas en la membrana apical. La cuantificación de la intensidad de pixel en el polo apical para cada tinción nos indicaba la cantidad relativa de proteína acumulada en este compartimento. De esta forma comprobamos que las células β -Catenina⁺ acumulaban una mayor cantidad de proteínas de polaridad en la membrana apical, principalmente N-Cadherina y aPKC, que las células no electroporadas (Figura 28E; Detalles de la cuantificación en material y métodos). Además, el ratio entre P-aPKC/aPKC (activa/inactiva) era claramente mayor en las células β -Catenina⁺ que iniciaban invaginaciones (Figura 28F).

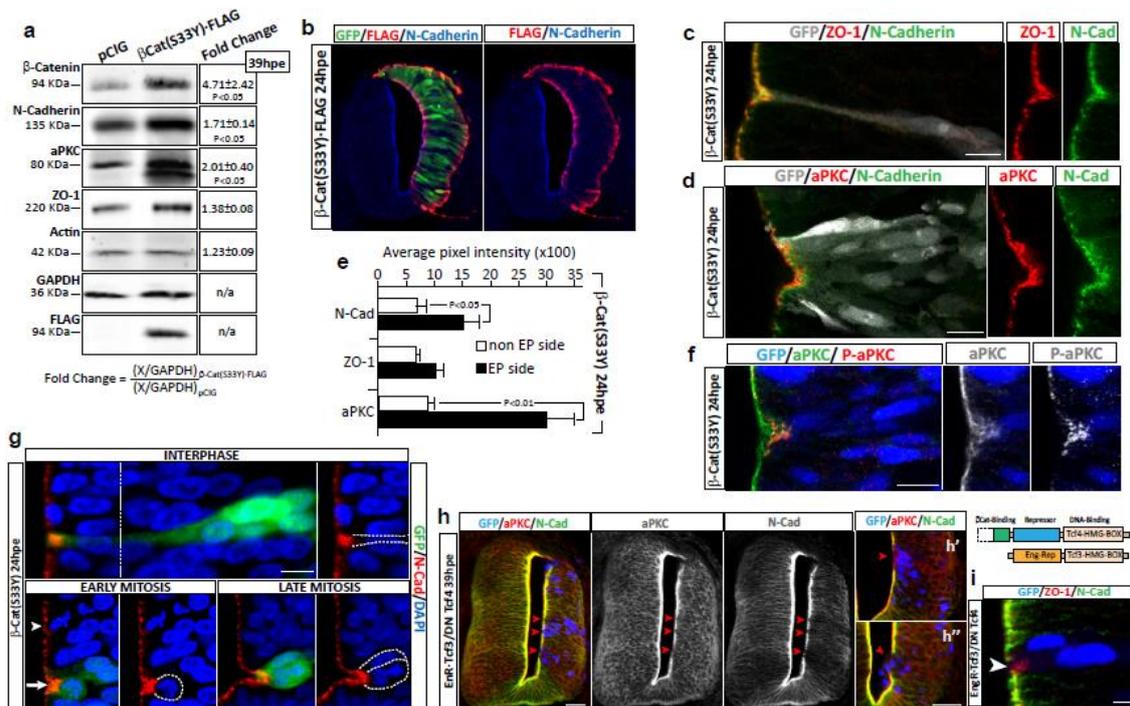


Figura 28: sβ-Catenina regula la formación del complejo apical (AC). Electroporaciones en tubo neural de pollo HH12. Escala 10µm en C-D-F-G, 50 µm en H'' y 5 µm en I. **(A)** Los niveles de proteínas del AC fueron analizados en lisados de tubo neural electroporados con pCIG (control) o sβ-Catenina mediante Western Blot. Los niveles para cada proteína fueron normalizados por GAPDH. Fold change=Media de tres experimentos ±SD. **(B)** Secciones transversales de tubo neural electroporados con β-Catenin^{S33Y}-FLAG teñidas con anticuerpos contra GFP (verde, transfección), FLAG (rojo, β-Catenina) y N-Cadherina (azul) 24hpe. **(C-E)** Imágenes representativas y cuantificación de la intensidad de pixel de secciones de tubo neural transfectadas con sβ-Catenina y teñidas con anticuerpos contra GFP (gris, transfección), Zo-1 (rojo, panel C), aPKC (rojo, panel D) y N-Cadherina (verde) 24hpe. **(F)** Secciones similares a C y D teñidas con anticuerpos contra GFP (azul, transfección), aPKC (verde) y P-aPKC (rojo, aPKC activa). Los canales por separados son mostrados en gris. **(G)** Secciones de tubo neural electroporadas con sβ-Catenina y teñidas con anticuerpos contra GFP (verde, transfección), N-Cadherina (rojo) y DAPI (azul, DNA) 24hpe. Los tres paneles muestran células sβ-Catenina+ en tres diferentes estadios del ciclo celular. En *early mitosis* dos células en metafase son indicadas (punta de flecha=no transfectada; flecha=sβ-Catenina+). **(H)** Secciones de tubo neural electroporadas con EnR-Tcf3+DN Tcf4 39hpe (a la derecha de las imágenes se muestra un esquema de los constructos), y teñidas con anticuerpos contra GFP (azul), aPKC (rojo) y N-Cadherina (verde) 39hpe. Las puntas de flechas indican las discontinuidades de la membrana apical que coinciden con las células transfectadas. **(H'H'')** Amplificación de las imágenes anteriores mostrando las áreas de células transfectadas con ausencia de AC (cabezas de flecha). **(I)** Secciones similares a h mostrando la localización ectópica de Zo-1 en células con ausencia de N-Cadherina (cabeza de flecha). GFP (azul, transfección), Zo-1 (rojo) y N-Cadherina (verde).

Al reunir todos los datos de estos experimentos concluimos que la expresión de sβ-Catenina no solo era suficiente para incrementar la expresión de algunos componentes del AC (principalmente N-Cadherina y aPKC), sino también para conducirlos hasta su localización apical y provocar la activación de aPKC. Por otro lado, la sobre-expresión directa de N-Cadherina, p120^{ctn} (incrementa la estabilidad de N-Cadherina), o Par3 (implicada en el establecimiento de la polaridad) no conseguían inducir invaginaciones (Figura 26G).

Lo siguiente que hicimos fue evaluar si el engrosamiento del AC aparecía al mismo tiempo que se generaban las invaginaciones apicales (Figura 28G), y encontramos que las células $s\beta$ -Catenina+ con ACs agrandados se encontraban normalmente en interfase (Figura 28G, interphase). Sin embargo, al llegar a la fase de mitosis, ésta comenzaba en una posición más profunda en el neuroepitelio si las comparábamos con las células no transfectadas (Figura 28G, *early mitosis*; flechas ($s\beta$ -Catenina+), puntas de flechas ($s\beta$ -Catenina-)). Más tarde, durante la anafase, las células $s\beta$ -Catenina+ causaban pequeñas invaginaciones de la cara luminal (Figura 28G, *late mitosis*), sugiriendo que una alteración en el anclaje/despolimerización de los microtúbulos mitóticos podía ser responsable de la generación de invaginaciones. Este fenómeno además podía explicar el arresto en fase M causado por $s\beta$ -Catenina (Figura 25F,G,H).

Por lo tanto, ya que habíamos comprobado que las invaginaciones comenzaban con un enriquecimiento de proteínas del complejo apical, y que la función transcripcional Wnt era esencial para el desarrollo de las invaginaciones, decidimos examinar si TCF era requerido para la formación y mantenimiento del AC. Para ello, co-electroporamos dos potentes represores transcripcionales para anular la señal dependiente de TCF; EnR-Tcf3 y la forma dominante negativo de TCF4 (DN-Tcf4; Figura 28H). La pérdida de función TCF resultó en una pérdida de expresión de N-Cadherina y aPKC (Figura 28H,H', puntas de flechas), y en una deslocalización de Zo1 del polo apical (Figura 28I). Curiosamente, alguna de estas células que carecían de complejo apical fueron encontradas en el ventrículo formando aglomerados de células no polarizadas (Figura 28H'', puntas de flecha). En conclusión, estos datos mostraban que la actividad TCF es requerida para el mantenimiento del AC, impulsándonos a estudiar si la actividad TCF era suficiente para la formación del AC.

Para ello, usamos el constructo VP16-Tcf3, el cual es capaz de estimular la transcripción dependiente de TCF en ausencia de β -Catenina. Curiosamente, la electroporación de VP16-Tcf3 generaba invaginaciones más pequeñas que las generadas por $s\beta$ -Catenina (Figura 29A), incluso siendo VP16-Tcf3 un activador más potente de la señal Wnt (Figura 27A, *TF activity(RLU)*). Cuando evaluamos la expresión de los componentes del AC, encontramos que las células VP16-Tcf3+ presentaban una gran expresión de aPKC que aparecía distribuida por el citoplasma, sin estar restringida en el compartimento apical (Figura 29B, flechas). Sin embargo, la expresión de N-Cadherina, β -Catenina o Zo1 no se veía alterada por la electroporación de VP16-Tcf3 (Figura 29B). De forma notable, observamos grupos de células ocupando el lumen, que aunque expresaban proteínas del AC, presentaban una orientación alterada (Figura 29B, cabezas de flechas). De forma interesante, aunque tanto $s\beta$ -Catenina como VP16-Tcf3 provocaban una inducción de la expresión de mRNA de aPKC cuantitativamente semejante (Figura 29C, Real-Time PCR), la respuesta celular era cualitativamente diferente. Mientras las células VP16-Tcf3+ acumulaban aPKC en diferentes puntos del citoplasma (Figura 29B), las células $s\beta$ -Catenina+ aumentaban la presencia de aPKC

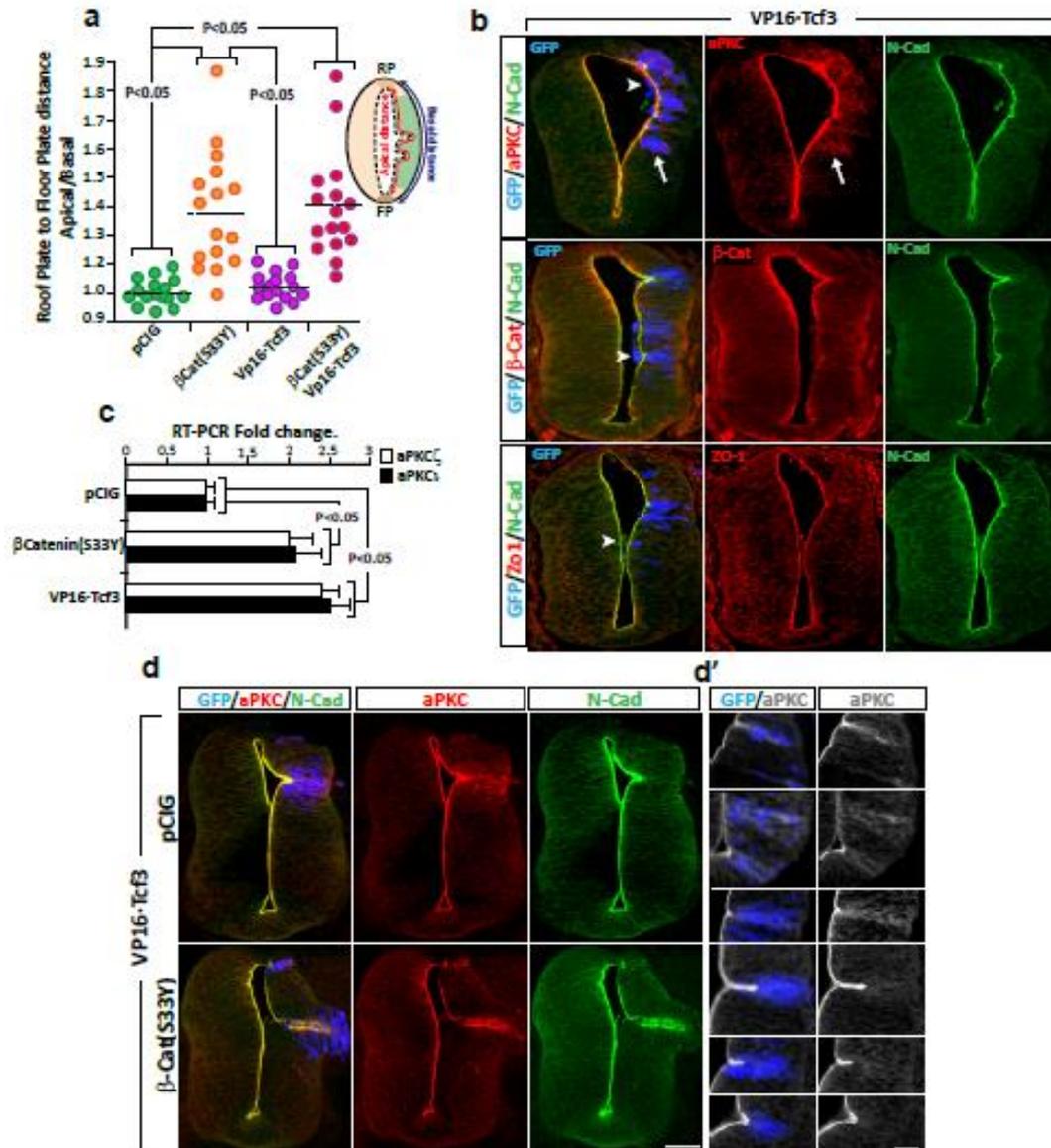


Figura 29: β -Catenina regula la expresi3n y localizaci3n de aPKC a trav3s de mecanismos dependientes e independientes de TCF. (A) Secciones de tubo neural electroporadas con pCIG (control), β -Catenina y VP16-Tcf3 o ambos y analizadas 48hpe. La distancia desde el *roof* al *floorplate* fue medida en la membrana apical (apical distance) y basal (basal distance) del neuroepitelio, y el ratio entre ambas distancias fue representada en un diagrama de puntos. Para cada tratamiento, cuatro secciones por embri3n de un total de 4 embri3nes fueron cuantificadas. **(B)** Secciones transfectadas con VP16-Tcf3 fueron teñidas 39hpe con anticuerpos contra GFP (azul, transfecci3n), aPKC, β -Catenina, Zo-1 (rojo) y N-Cadherina (verde). Las cabezas de flecha indican grupos de c3lulas invadiendo el ventrículo y las flechas indican c3lulas VP16-Tcf3+ con acumulaciones citopl3smicas de aPKC. **(C)** Los niveles de RNAm de aPKC ζ y aPKC ι fueron medidos mediante RT-PCR (Real-Time PCR) en tubo neural de pollo tras 24hpe con control (pCIG), β -Catenin o Vp16-Tcf3 usando 5 embri3nes por cada condici3n. Las c3lulas GFP+ fueron previamente aisladas mediante FACS. El gr3fico de barras muestra la media \pm SD (desviaci3n est3ndar) de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas fueron evaluadas por one-way ANOVA y Tukey's test. **(D)** Secciones de tubo neural teñidas con anticuerpos contra GFP (azul, transfecci3n), aPKC (rojo) y N-Cadherina (verde) 39hpe con VP16-Tcf3 o VP16-Tcf3+ β -Catenin. Escala 50 μ m. **(D')** Tres ejemplos de los efectos de la expresi3n de β -Catenin sobre la distribuci3n de aPKC. Escala 25 μ m.

únicamente en el polo apical (Figura 28D), indicando que β -Catenina cumple obligaciones independientes de TCF que contribuyen al transporte apical de aPKC. Cuando examinamos esta posibilidad mediante la co-electroporación de β -Catenina y VP16-Tcf3, el exceso de aPKC fue redistribuido en el complejo apical (Figura 29D,D'). Por lo tanto, concluimos que β -Catenina controla la transcripción y localización apical de aPKC a través de mecanismos dependientes e independientes de TCF.

La actividad quinasa de aPKC ζ es esencial para la formación y mantenimiento del complejo apical

La unión de Par6 a aPKC provoca en éste último un cambio conformacional que se traduce en una baja actividad quinasa. Tras la unión, el dominio quinasa, situado en la región C-terminal, se une a un pseudo-sustrato localizado en el dominio N-terminal (aa120) de la secuencia de aPKC. Par3 es requerido para la localización apical del complejo aPKC-Par6, donde tanto la acción de Cdc42, al revertir la unión al pseudo-sustrato, como la fosforilación de aPKC por PDK1, son necesarias para la activación del complejo (Balendran et al., 2000; Martín-Belmonte et al., 2007). Habiendo demostrado el papel de β -Catenina en la expresión, localización y activación de aPKC en la membrana apical de los progenitores neuroepiteliales, decidimos evaluar si la actividad de aPKC era suficiente para mimetizar el papel de β -Catenina en la formación del complejo apical durante el inicio de lesiones preneoplásicas.

A diferencia de la expresión de la forma salvaje de aPKC ζ , la expresión de aPKC $\zeta^{\Delta NT}$, una forma que al prescindir del dominio N-terminal es constitutivamente activa, conduce a una drástica desorganización de la estructura del tubo neural (Ghosh et al., 2008). De forma similar, nosotros no observamos ningún cambio fenotípico tras la transfección de la forma salvaje de aPKC ζ , mientras que la electroporación de aPKC $\zeta^{\Delta NT}$ inducía una acumulación de proteínas del complejo apical (N-Cadherina, Zo1 y F-Actina) en las células electroporadas, (Figura 30B; puntas de flechas). Además a tiempo cortos causaba malformaciones neuroepiteliales similares a aquellas inducidas por β -Catenina (Figura 30B: spinal cord (16hpe), hindbrain (24hpe); flechas). Sin embargo, a tiempos más largos (39 hpe), aPKC $\zeta^{\Delta NT}$ perturbaba la polaridad del neuroepitelio (Figura 30D, paneles superiores). Las células aPKC $\zeta^{\Delta NT}$ + presentaban un enriquecimiento de proteínas apicales en localizaciones ectópicas que provocaba una alteración en la orientación de las células dentro del neuroepitelio (Figura 30D, paneles superiores). Fenotipo, que aunque más agresivo, guardaba semejanza con la sobre-expresión de VP16-Tcf3 (Figura 29B).

Previamente habíamos demostrado que la expresión de aPKC inducida por VP16-Tcf3 era redistribuida en el AC por β -Catenina (Figura 29D,D'). De la misma forma, la acumulación citoplasmática tras la sobre-expresión de la forma salvaje de aPKC también aparecía restringida en el polo apical al co-expresar β -Catenina (Figura 30C). Además β -Catenina también era capaz redirigir a aPKC $\zeta^{\Delta NT}$ al polo apical, y lo

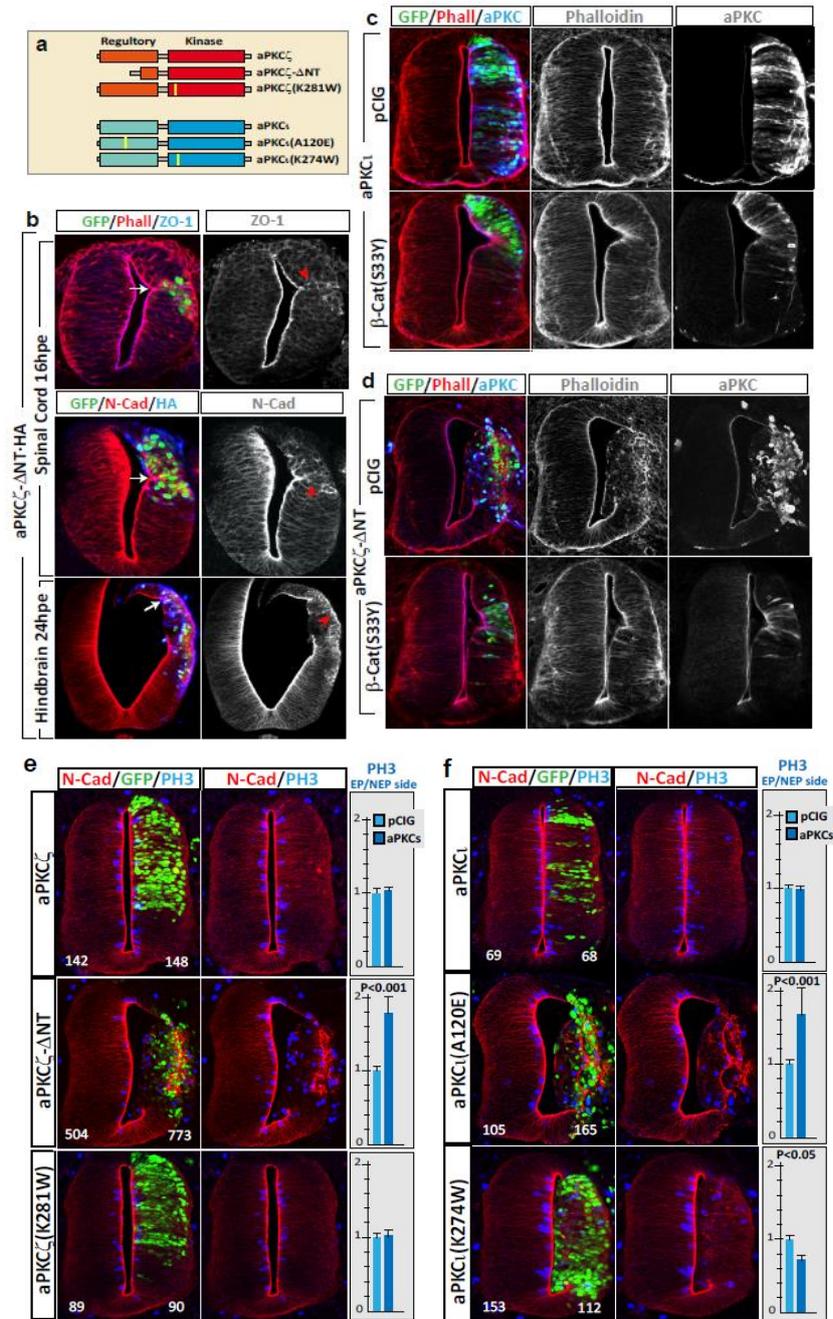


Figura 30: La actividad quinasa de aPKC ι es esencial para la formación y mantenimiento del complejo apical. (a) Esquema de los constructos de DNA usados en esta figura. (b) Secciones de tubo neural 16hpe con aPKC ζ ^{ANT}-HA y teñidas con anticuerpos contra GFP (verde transfección), Phalloidin (F-actina) o N-Cadherina (rojo) y Zo-1 o HA (aPKC ζ ^{ANT}) en azul. Las puntas de flechas indican las acumulaciones ectópicas de proteínas del AC. Las flechas indican invaginaciones del neuroepitelio. (c) Secciones de tubo neural teñidas con Phalloidin (rojo) y anticuerpos contra GFP (verde) y aPKC (azul) tras 39hpe con aPKC ι o con aPKC ι + β -Catenina. Canales aislados son mostrados en gris. (d) Condiciones experimentales similares a c pero con transfección de aPKC ζ ^{ANT} en lugar de aPKC ι . (e-f) Secciones de tubo neural de pollo teñidas con anticuerpos contra GFP (verde, transfección), N-Cadherina (rojo) y PH3 (fosfohistona H3, azul) 39hpe con las formas salvajes (aPKC ζ y aPKC ι), activas (aPKC ζ ^{ANT} y aPKC ι ^{A120E}) y sin actividad quinasa (aPKC ζ ^{K281W} y aPKC ι ^{K274W}) de las isoformas ι y ζ de aPKC. El ratio obtenido de dividir el número de células PH3+ en el lado electroporado (EP) entre el número de células PH3+ en el lado no electroporado (NE) es representado en un diagrama de barras a la derecha de cada tratamiento. El número total de células PH3+ contadas (n) está indicado en cada imagen. El gráfico de barras muestra la media \pm SD (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas fueron evaluadas por one-way ANOVA y Tukey's test.

que es más importante, prevenía la despolarización causada por este mutante constitutivamente activo. De hecho, las lesiones observadas tras la expresión de $\text{aPKC}\zeta^{\Delta\text{NT}}$ junto a $\text{s}\beta\text{-Catenina}$ eran indistinguibles de aquellas generadas tras la expresión única de $\text{s}\beta\text{-Catenina}$ (Figura 30D). Estos resultados confirmaban el papel de $\beta\text{-Catenina}$ en la localización apical de aPKC y sugerían una implicación de la actividad quinasa de aPKC en la formación del AC. Así que usamos las formas activas e inactivas de $\text{aPKC}\zeta$ y $\text{aPKC}\iota$, para tratar de comprender el papel que juega cada isoforma en la formación del AC, y por tanto, en la generación de las malformaciones inducidas por $\text{s}\beta\text{-Catenina}$. Para ello electroporamos distintos mutantes de $\text{aPKC}\zeta$ y $\text{aPKC}\iota$ (Figura 30A) y analizamos la acumulación de proteínas del AC (N-Cadherina) y el arresto en fase M (PH3), dos anomalías características en las lesiones causadas por $\text{s}\beta\text{-Catenina}$. Mientras ninguna de las formas salvajes de aPKC causaba malformaciones del tejido ($\text{aPKC}\zeta$ y $\text{aPKC}\iota$; Figura 30G,H), ambas formas activas inducían una abundante acumulación ectópica de N-Cadherina y un significativo aumento de células en fase M en diferentes localizaciones de neuroepitelio ($\text{aPKC}\zeta^{\Delta\text{NT}}$ y $\text{aPKC}\iota^{\text{A120E}}$; Figura 30G,H). Sorprendentemente, la expresión de las formas sin actividad quinasa, $\text{aPKC}\zeta^{\text{K281W}}$ y $\text{aPKC}\iota^{\text{K274W}}$ generaban diferencias fenotípicas llamativas. Mientras $\text{aPKC}\zeta^{\text{K281W}}$ no provocaba ninguna anomalía observable, la expresión de $\text{aPKC}\iota^{\text{K274W}}$ causaba pérdidas de polaridad y una disminución del ratio de células mitóticas ($\text{aPKC}\zeta^{\text{K281W}}$ y $\text{aPKC}\iota^{\text{K274W}}$; Figura 30E,F), demostrando un papel específico de $\text{aPKC}\iota$ en ambos eventos.

$\beta\text{-Catenina}$ dirige el transporte apical de las proteínas del AC a través de su interacción con N-Cadherina

$\beta\text{-Catenina}$ conduce el tráfico de uniones adherentes hasta la membrana citoplasmática a través de su asociación con Cadherina (Chen et al., 1999; Wahl et al., 2003; Baum and Georgiou, 2011). Aunque $\beta\text{-Catenina}$ es capaz de asociarse a Cadherina ya en el retículo endoplasmático (ER), la mayor parte del complejo se forma tras el procesamiento de cadherina por el aparato de Golgi (Whal et al., 2003). Por otro lado, nosotros habíamos comprobado que la expresión de formas activas de aPKC causaba una acumulación ectópica de N-Cadherina (Figura 30E,F; $\text{aPKC}\zeta^{\Delta\text{NT}}$ y $\text{aPKC}\iota^{\text{A120E}}$). Asimismo, la expresión de $\text{s}\beta\text{-Catenina}$ promovía la localización apical de aPKC a través de un mecanismo en parte independiente de TCF (Figura 29D,D' y Figura 30C,D). Por lo tanto, nos planteamos la posibilidad de que $\beta\text{-Catenina}$ podía estar promoviendo la localización apical de aPKC a través de su conocida interacción con N-Cadherina.

Para evaluar la capacidad de $\beta\text{-Catenina}$ de promover el transporte de N-Cadherina de nueva síntesis a las zonas de unión entre células, sobre-expresamos N-Cadherina en cultivos de células HEK, las cuales carecen de expresión de éste tipo de Cadherina. Mediante inmunocitoquímica, observamos que el exceso de N-Cadherina en estas células era distribuido por el citoplasma, concentrándose principalmente en el

espacio perinuclear. Sin embargo, al co-expresar N-Cadherina junto a β -Catenina, N-Cadherina era redistribuida en la zonas de unión entre células (Figura 31C). Para evaluar si β -Catenina inducía el transporte de N-Cadherina a través de la interacción física con ésta última, generamos un mutante de N-Cadherina que carecía del dominio de unión a β -Catenina (Ozawa et al., 1990), N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat (Figura 31A,B). A diferencia de con la forma salvaje de N-Cadherina, β -Catenina no era capaz de redistribuir el exceso de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat en la uniones celulares (Figura 31D). De esta forma confirmamos la implicación de la asociación N-Cadherina/ β -Catenina en el transporte de uniones adherentes hasta las zonas de contacto entre células.

Anteriormente habíamos demostrado una implicación de la actividad transcripcional de β -Catenina en la formación del AC. Para evaluar la implicación de cada una de las funciones de β -Catenina (transcripcional/estructural) en el transporte a membrana de N-Cadherina realizamos un fraccionamiento subcelular de extractos de células electroporadas con diferentes constructos que nos permitían diseccionar ambas funciones. Mientras en la fracción del pellet encontramos principalmente material nuclear (Figura 31E, HistoneH3), retículo endoplasmático (Figura 31E, CLIMP63) y el aparato de Golgi (Figura 31E, GM130), la fracción de membrana y citosólica estaban compuestas exclusivamente por proteínas de membrana (Figura 31E, RFPmb) y proteínas citoplásmica (Figura 31E, α -Tubulin) respectivamente. Al cuantificar el porcentaje de N-Cadherina en cada una de las fracciones, comprobamos que al igual que habíamos visto mediante inmunocitoquímica, β -Catenina inducía un aumento de N-Cadherina en la fracción de membrana (Figura 31E,F). Sin embargo, la expresión de β -Catenina Δ C, un mutante que carece de función transcripcional pero conserva la capacidad de unión a N-Cadherina, no inducía cambios en la distribución de N-Cadherina respecto al control (Figura 31E,F). Por otro lado, la expresión de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat provocaba una disminución de N-Cadherina en la fracción de membrana y un consecuente aumento en la fracción del pellet. Curiosamente, la expresión de β -Catenina provocaba una pequeña disminución del porcentaje de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat en la fracción del pellet sin llegar a provocar un aumento de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat en membrana (Figura 31E,F). Estos datos indicaban que tanto la función transcripcional de β -Catenina como la estructural estaban implicadas en el transporte a membrana de N-Cadherina.

N-Cadherina no es detectable en la fracción citosólica (Figura 31E), ya que al ser una molécula lipofílica siempre está formando parte de una membrana, ya sea en la membrana citoplasmática o en las vesículas de transporte (Figura 31E, fracción de membrana), o anclada a las membranas del retículo endoplasmático (ER) o del aparato de Golgi (Figura 31E, fracción pellet). β -Catenina por su parte la podemos encontrar libre en el citoplasma (fracción citosólica), formando complejo con N-Cadherina, ya sea en la membrana citoplasmática (fracción membrana) o en el retículo endoplasmático/aparato de Golgi (fracción pellet), o en el núcleo unida a los factores de transcripción TCFs (fracción pellet). La cuantificación del porcentaje de β -Catenina

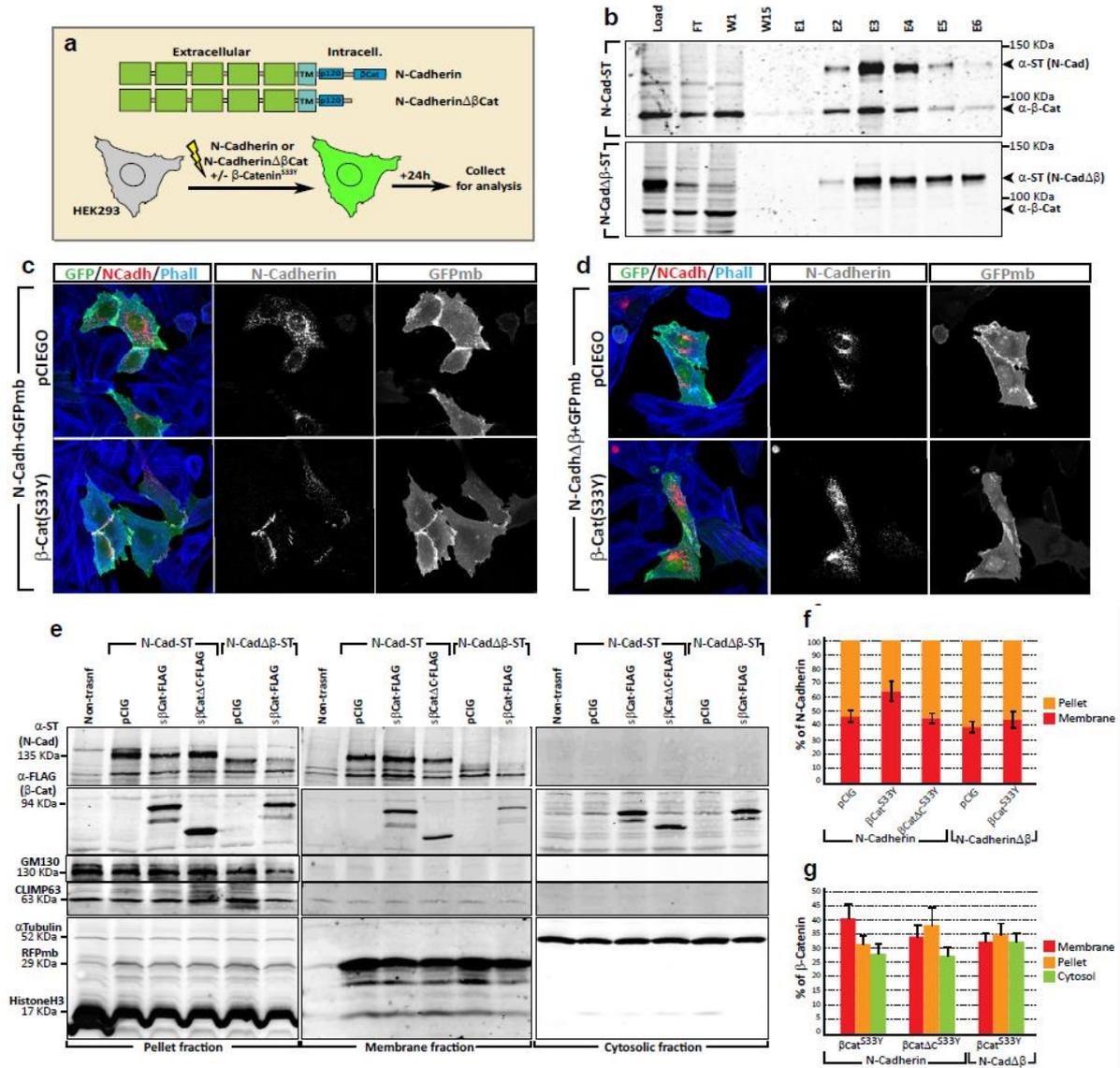


Figura 31: β -Catenina dirige el transporte a membrana de N-Cadherina. (A) Esquema de los constructos de DNA usados en esta figura y diseño experimental. (B) La asociación de β -Catenina a N-Cadherina y N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat fue estudiada mediante purificación con el sistema Strep-Tactin® y Western blot de lisados de células HEK transfectadas con ambos constructos. Load=input, FT=flow through, W1=lavado 1, W15=lavado 15, E1-E6=Elución 1-6. (C) Inmunocitoquímica de células HEK transfectadas durante 24 horas con N-Cadherin+GFPmb en ausencia o presencia de β -Catenina y con N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat+GFPmb en ausencia y presencia de β -Catenina. GFPmb (verde, transfección y marcador de membrana), tinciones con Phalloidin (azul, citoesqueleto de actina) y con anti-NCadherina (rojo). Los canales por separado se muestran en gris. (E) Western blot mostrando los niveles de N-Cadherina (anti-ST) y β -Catenina (anti-Flag) en las diferentes fracciones subcelulares de células HEK transfectadas con los constructos indicados en la parte superior junto a RFPmb (marcador de membrana). Pellet fraction incluye la fracción nuclear (HistoneH3), retículo endoplasmático (CLIMP63) y Golgi (GM130). Membrane fraction incluye únicamente la fracción de membrana (RFPmb). Cytosolic fraction corresponde a la fracción citoplasmática soluble (α -Tubulin). (F) Diagrama de barras mostrando la fracción relativa de N-Cadherina en la fracción pellet y en la fracción de membrana en las condiciones experimentales indicadas. (G) Diagrama de barras mostrando la fracción relativa de β -Catenina en la fracción pellet, fracción de membrana fracción citoplasmática en las condiciones experimentales indicadas. Las cuantificaciones de las gráficas F y G corresponden a la media \pm SD (desviación estándar) de la fracción relativa de tres experimentos independientes.

en cada fracción nos reveló que al igual que en la cuantificación de N-Cadherina, solo la expresión conjunta de β -Catenina y la forma salvaje de N-Cadherina provocaba un aumento significativo de β -Catenina en la fracción de membrana (Figura 31G). Sugiriendo en ambos casos, que tanto la actividad transcripcional de β -Catenina, como la capacidad de formar complejo con N-Cadherina (función estructural) son necesarias para inducir el transporte a membrana de las uniones adherentes. Curiosamente, aunque la interacción entre N-Cadherina y β -Catenina impide la localización nuclear de β -Catenina (Orsulic et al., 1999), la expresión conjunta de N-Cadherina y β -Catenina Δ C, la cual conserva la capacidad de unión a N-Cadherina (Valenta et al., 2011), provocaba una mayor acumulación de β -Catenina en la fracción del pellet que la co-expresión de β -Catenina y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat (Figura 31E,G), lo que indicaba que en el primer caso una fracción importante de β -Catenina quedaba retenida en la vía secretora (ER-Golgi), y sugiriendo un papel de la función transcripcional de β -Catenina en el transporte desde el retículo endoplasmático hasta su salida del aparato de Golgi.

La mayoría de proteínas que entran en el retículo endoplasmático llegan a ser glicosiladas principalmente por la adición de un oligosacárido al grupo amino libre de un residuo de asparagina (N-glicosilación). Dependiendo del grado de maduración de las proteínas glicosiladas dentro de la vía secretora, éstas llegan a ser sensibles o resistentes a glicosidasas altamente específicas. De manera que la acción de tales glicosidasas puede ser usada para determinar la localización de una glicoproteína a lo largo de la vía secretora (Freeze & Kranz, 2010). Dos glicosidasas son normalmente usadas para este fin: N-Glicosidasa F (PNGaseF) y Endoglicosidase H (EndoH). Antes de entrar en el compartimento del *cis*-Golgi las glicoproteínas son sensibles a la digestión por EndoH y PNGaseF, presentando una mayor movilidad por SDS-PAGE. Durante el movimiento direccional de estas glicoproteínas a través de la vía secretora, los oligosacáridos unidos a las proteínas experimentan una remodelación masiva, especialmente en el aparato de Golgi (Stanley, 2011). Tras estas modificaciones en el Golgi las glicoproteínas permanecen sensibles a PNGaseF pero adquieren resistencia a la digestión por EndoH (Figura 32A). Para evaluar la contribución de la función transcripcional/estructural de β -Catenina durante el recorrido de N-Cadherina por la vía secretora, digerimos con ambas enzimas extractos provenientes de células donde la función estructural y transcripcional de β -Catenina podían ser separadas. Mientras que tanto la falta de función estructural (N-Cadh $\Delta\beta$ / β -Cat) como el control (N-Cadh/ β -Cat; posee ambas funciones) solo provocaba cambios de movilidad con el tratamiento con PNGaseF, los extractos de células N-Cadh/ β -Cat Δ C (estructural+/transcripcional-) presentaban un leve cambio de movilidad en una fracción de N-Cadherina tratada con EndoH (Figura 32B, punta de flecha) que indicaba que una parte de N-Cadherina era retenida en el ER. Además la localización de N-Cadherina respecto al marcador de *cis*-Golgi (GM130) apoyaba el resultado anterior. Aunque no era evidente una diferencia en la localización de N-Cadherina en células que presentaban una alta expresión si comparábamos células N-Cadh/ β -Cat Δ C+ con

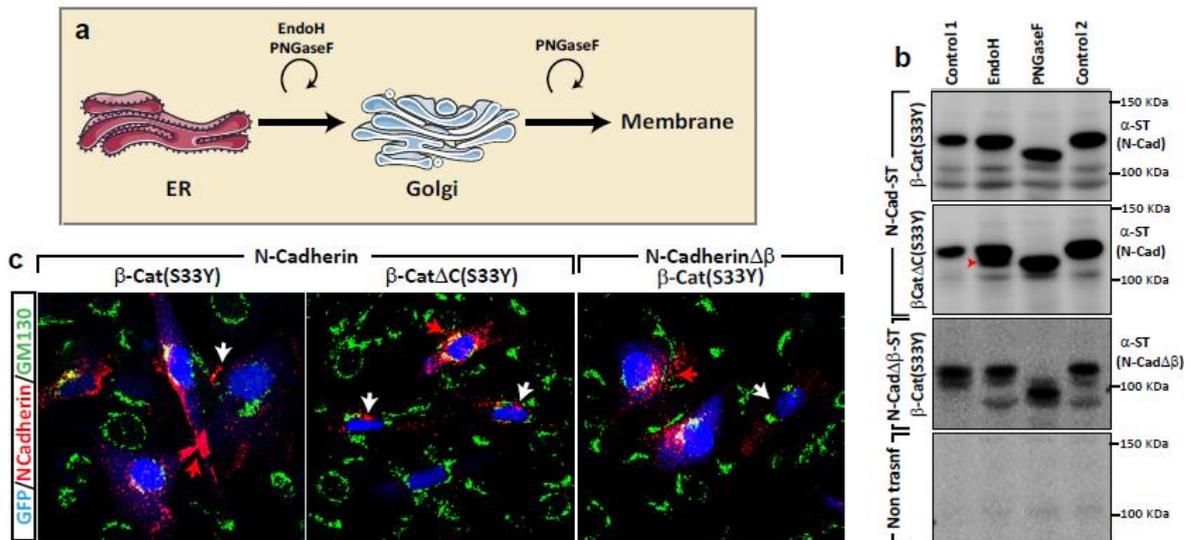


Figura 32: El tránsito de N-Cadherina desde el ER al Golgi no requiere la interacción entre N-Cadherina y β -Catenina pero mejora con la actividad transcripcional dependiente de β -Catenina. **(A)** Esquema representativo de la actividad de las glicosidasas EndoH y PNGaseF en la vía secretora. **(B)** Western blot mostrando la movilidad de N-Cadherina (anti-ST) en SDS-PAGE de lisados totales tratados con EndoH y PNGaseF. Control 1=Lisado sin tratamiento. Control 2=Lisado tratado únicamente con buffer. Los lisados proviene de células HEK transfectadas con los constructos indicados a la izquierda de la figura. **(C)** Inmunocitoquímica de células HEK transfectadas durante 24 horas con los constructos indicados en la parte superior de la figura. GFP (azul, transfección), tinciones con los anticuerpos contra N-Cadherina (rojo) y GM130 (verde, *cis*-Golgi). Flechas blancas=células con baja transfección. Flechas rojas=células con alta transfección.

células N-Cadh Δ β / β -Cat+ (Figura C, flechas rojas). En células con baja expresión, N-Cadherina formaba acúmulos perinucleares que no localizaban con el marcador de *cis*-Golgi (GM130) en células N-Cadh/ β -Cat Δ C+, mientras que en células N-Cadh Δ β / β -Cat con baja expresión N-Cadherina aparecía distribuida de forma homogénea en el citoplasma sin formar acúmulos perinucleares (Figura C, flechas blancas). En concordancia con los resultados anteriores, NCadherina se localizaba principalmente en las uniones entre células N-Cadh/ β -Cat (estructural+/transcripcional+) independientemente de los niveles de transfección (Figura C, flechas blanca (baja transfección) y roja (alta transfección)). Al reunir todos estos resultados concluimos que mientras la función transcripcional contribuye, al menos en parte, al paso eficiente de N-Cadherina a través de la vía secretora, la interacción N-Cadherina/ β -Catenina no es requerida para el tránsito desde el ER hasta el Golgi pero es esencial para el transporte de N-Cadherina desde el trans-Golgi hasta su llegada a la membrana.

Una vez habíamos definido el papel de la interacción entre N-Cadherina y β -Catenina en el transporte a membrana de uniones adherentes, decidimos comprobar la implicación de esta interacción en el transporte apical de otros componentes del AC de los progenitores del tubo neural. Para ello, lo primero que hicimos fue comprobar que β -Catenina conservaba la capacidad de transportar N-Cadherina de nueva síntesis hasta las uniones celulares localizadas en el compartimento apical de estas células. Para este fin, usamos una forma de N-Cadherina fusionada a GFP, N-Cadherin-GFP, la cual nos permitía observar la localización del exceso N-Cadherina sin necesidad de

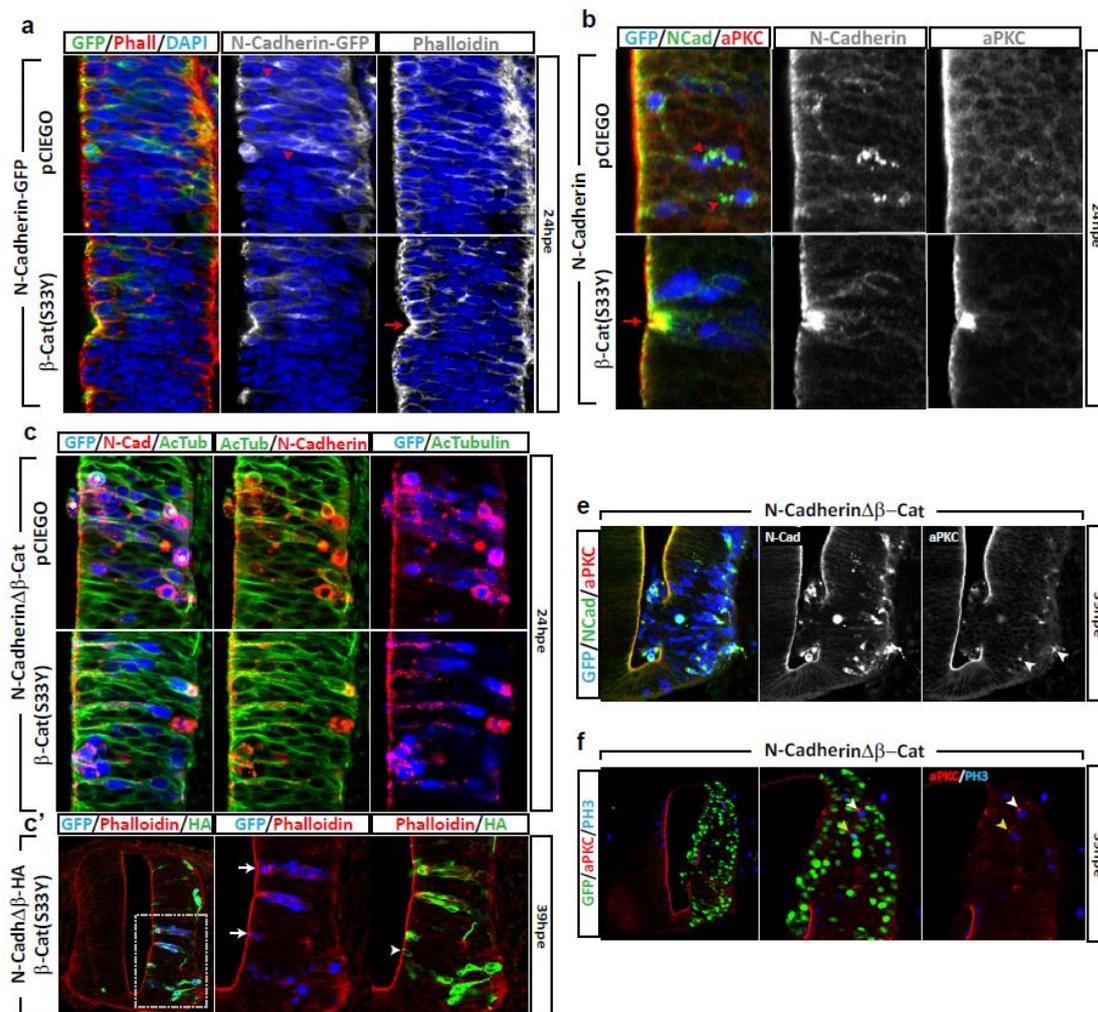


Figura 33: β -Catenina induce la localización apical de los componentes del AC a través de su interacción con N-Cadherina. (A) Secciones de tubo neural de pollo electroporados (24hpe) con N-Cadherina-GFP en ausencia (pCIEGO=control) y presencia de β -Catenina (β -cat(S33Y)). GFP (verde) muestra la localización de N-Cadherina-GFP. Las secciones fueron teñidas con Phalloidin (rojo, F-actina) y DAPI (azúl, núcleos). GFP y Phalloidin (gris) se muestran por separado junto a DAPI (azul). Las puntas de flecha indican la localización perinuclear de N-Cadherina-GFP en ausencia de β -Catenina. Las flechas indican el enriquecimiento de AC inducido por β -Catenina. **(B)** Secciones de tubo neural de pollo electroporados (24hpe) con N-Cadherina en ausencia (pCIEGO=control) y presencia de β -Catenina (β -cat(S33Y)). GFP (azul, transfección), N-Cadherina (verde), aPKC (rojo). Las puntas de flecha indican la localización perinuclear de N-Cadherina en ausencia de β -Catenina. Las flechas indican el enriquecimiento de AC inducido por β -Catenina. **(C-C')** Secciones de tubo neural de pollo electroporados con N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat en ausencia (pCIEGO=control; C) y presencia de β -Catenina (β -cat(S33Y), C y C') durante 24 (C) y 39 horas (C'). GFP (azul, transfección), N-Cadherina y Phalloidin (rojo), Tubulina acetilada (citoesqueleto de tubulina) y HA (N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat) (verde). Las puntas de flecha indican la localización no apical de N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat. Las flechas indican como β -Catenina no induce un enriquecimiento de AC en presencia de N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat. **(E)** Secciones de tubo neural de pollo 39hpe con N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat mostrando una localización ectópica de aPKC (puntas de flecha). GFP (azul, transfección), N-Cadherina (verde), aPKC (rojo). **(F)** Condiciones experimentales similares a e pero con tinción con anticuerpos contra aPKC (rojo) y PH3 (azúl, células mitóticas). Las puntas de flecha indican células mitóticas por pérdidas de polaridad ápico-basal mitóticamente activas. Punta de flecha blanca=célula no transfectada. Punta de flecha amarilla=célula con baja expresión de blanca N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat.

tinción. Las imágenes nos mostraban que en ausencia de β -Catenina, el exceso de N-Cadherina se localizaba parcialmente en el complejo apical de los neuroblastos (Figura 33A), aunque no provocaba un enriquecimiento de uniones adherentes u otros componentes del complejo apical (Figura 33A (Phalloidin=F-actina), 33B (aPKC)). Al igual que en HEK, el exceso de N-Cadherina formaba evidentes acúmulos en el espacio perinuclear (Figura 33A,B, puntas de flecha). En cambio, la expresión de β -Catenina conducía el exceso de N-Cadherina hasta la membrana apical (Figura 33A), y consecuentemente provocaba un aumento de proteínas apicales (F-Actina, aPKC) y el inicio de las invaginaciones apicales inducidas por β -Catenina (Figura 33A,B). Por otro lado, β -Catenina no era capaz de inducir la localización apical de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat (Figura 33C (N-Cadherina), 33C'(HA): flecha) ni de provocar un enriquecimiento apical de las proteínas de polaridad en las células electroporadas (Figura 33C', Phalloidin, puntas de flecha). Además, una fracción de células N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat+ perdían la polaridad ápico-basal, adquirían una forma redondeada y se localizaban, o bien en la zona basal del neuroepitelio, o bien invadiendo el ventrículo (Figura 33C, asteriscos). Tras 39hpe estas pérdidas de polaridad llegaban a ser más evidentes (Figura 33E,F). De forma interesante, la localización ectópica de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat provocaba un deslocalización de otras componentes del AC que colocalizaban con N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat incluso en presencia de β -Catenina (Figura 33C'(Phalloidin), 33D(aPKC), puntas de flecha). Solo una fracción de las células que perdían la polaridad al expresar N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat era mitóticamente activa (Figura 33E). Curiosamente, muchas de estas células PH3+ eran a su vez N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat- (Figura 33F, punta de flecha blanca) o células N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat con baja expresión (Figura 33F, punta de flecha amarilla) que conservaban otros componentes del AC como aPKC. Todos estos resultados mostraban que β -Catenina inducía la localización apical de uniones adherentes y otros componentes de polaridad a través de su interacción con N-Cadherina.

Por lo tanto, estos resultados junto a los resultados anteriores, donde demostrábamos que β -Catenina inducía la acumulación apical de un exceso de aPKC, sugerían fuertemente que el mecanismo de transporte de las proteínas apicales era un mecanismo común y dependiente de la interacción N-Cadherina/ β -Catenina. Para confirmar esta hipótesis llevamos a cabo purificaciones mediante el sistema Strep-Tactin® con una forma de N-Cadherina (N-Cadherin-ST) en la que incorporamos en el extremo C-terminal tres repeticiones de Strep-tag, una secuencia de 8 aa que es retenida por Streptactin, una estreptavidina modificada. Células de tubo neural de pollo transfectadas con N-Cadherin-ST fueron lisadas en condiciones nativas (Uncrosslinked N-Cadherin-ST, PIK buffer) o en presencia de reticulantes (Crosslinked N-Cadherin-ST, detalles en materiales y métodos), para diferenciar entre proteínas que interaccionan con N-Cadherina débilmente (Uncrosslinked) o fuertemente (Crosslinked). Mediante Western Blot detectamos que componentes del complejo apical como aPKC y Zo-1 formaban parte de complejos que incluían uniones adherentes (Figura 34A). También detectamos en esos complejos GAPDH (Figura 34A),

una enzima que posee varias funciones entre las que encontramos una implicación en el transporte de vesículas portadoras de aPKC ζ entre el ER y el aparato de Golgi (Tisdale, 2001). En estas vesículas, aPKC ζ interacciona y fosforila a GAPDH, promoviendo el anclaje de estas vesículas a microtúbulos y su transporte hasta el aparato de Golgi (Tisdale, 2002). Anteriormente habíamos demostrado que β -Catenina inducía la expresión de aPKC ζ y que la expresión de formas activas de aPKC causaba acumulaciones ectópicas de otros componentes del complejo apical. Además, tenemos datos que demuestran una posible implicación de la actividad transcripcional de β -Catenina en el transporte de N-Cadherina desde el ER hasta su salida al Golgi. Así que concluimos que β -Catenina favorece el transporte vesicular de componentes del AC desde el ER al Golgi a través de su actividad transcripcional (probablemente mediante el control de la expresión de aPKC), siendo la interacción N-Cadherina/ β -Catenina indispensable para el transporte desde el Golgi hasta la membrana apical.

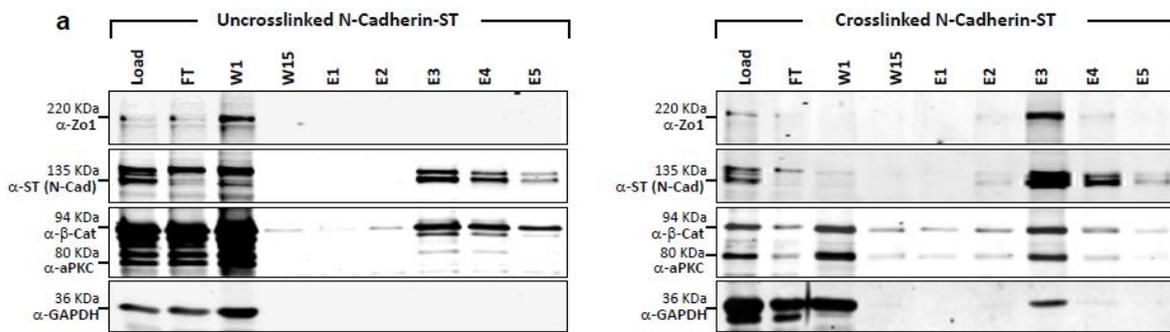


Figura 34: N-Cadherina interacciona con otros componentes del AC. (A) Purificación de N-Cadherina mediante el sistema Strep-Tactin® de lisados de tubo neural de embriones de pollo transfectados con N-Cadherina-ST. Las muestras fueron lisadas en condiciones nativas (PIK, uncrosslinked) y en presencia de reticulantes (crosslinked). Las proteínas asociadas a N-Cadherina fueron detectadas por inmunoblotting usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada panel. Load=input, FT=flow through, W1=lavado 1, W15=lavado 15, E1-E5=Elución 1-5.

El mantenimiento del complejo apical dependiente de N-Cadherina es esencial para el estado progenitor

Hasta ahora los resultados demuestran el papel de β -Catenina en el transporte de los componentes del complejo apical a través de su interacción con N-Cadherina. Además, una actividad excesiva de esta función conduce a malformaciones en el neuroepitelio donde las células se mantienen como progenitores neurales Sox2+. Asimismo, es sabido que la expresión de N-Cadherina disminuye durante la diferenciación de los progenitores del tubo neural (Rousso et al., 2012) y que la abscisión del complejo apical es parte del proceso de diferenciación de estas células (Das & Storey, 2014). Por lo tanto, nos planteamos que podría existir una relación entre el control de la polaridad ápico-basal y el mantenimiento del estado progenitor en la génesis de crecimientos preneoplásicos inducidos por s β -Catenina.

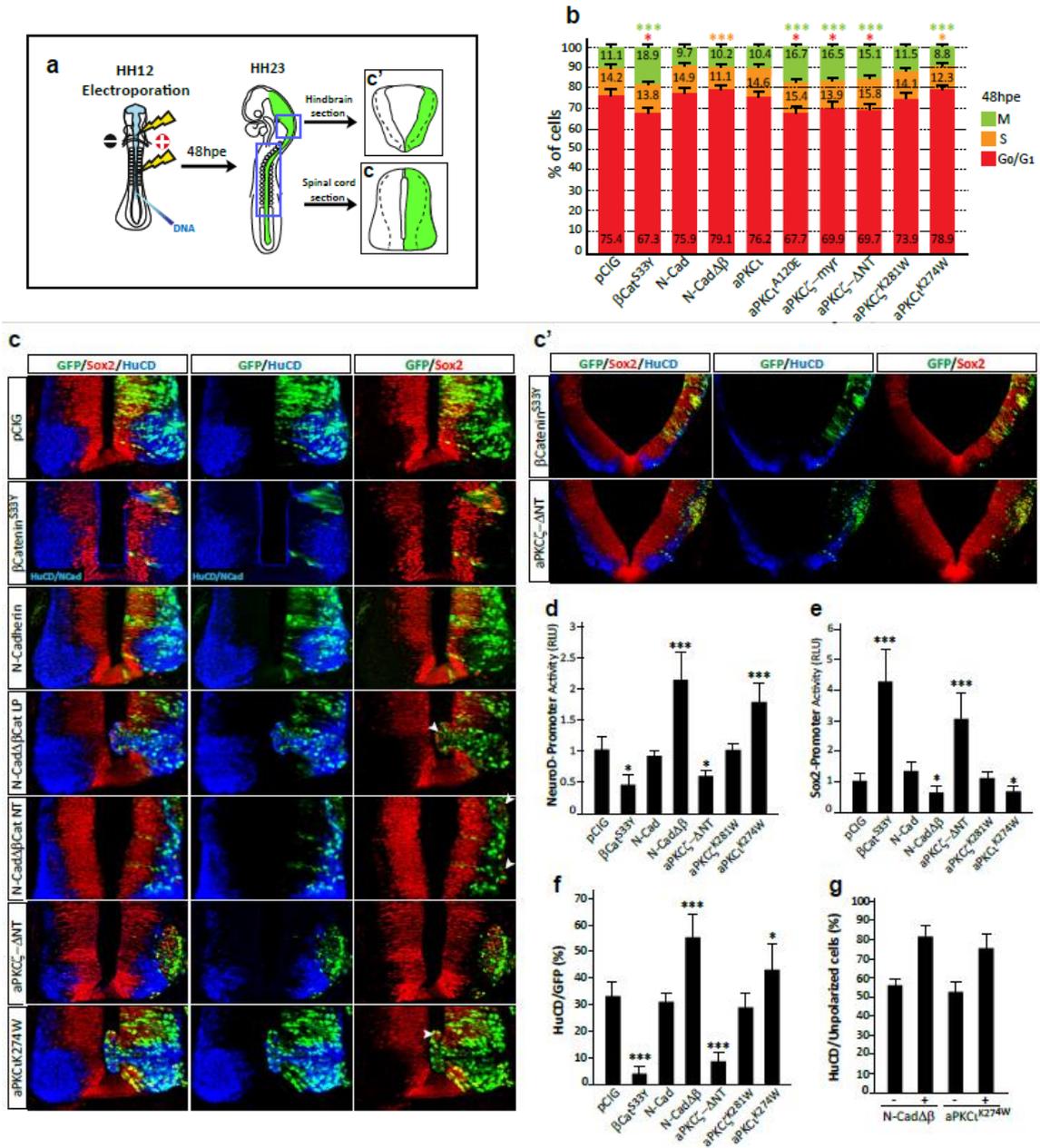


Figura 35: El mantenimiento del complejo apical dependiente de N-Cadherina es esencial para el estado progenitor. (A) Esquema representativo del diseño experimental. **(B)** Análisis del ciclo celular de células GFP+ analizadas por FACS de tubo neural de pollo HH12 electroorado con los constructos indicados en la parte inferior de la gráfica de barras. Un mínimo de 2500 células GFP+ fueron analizadas por cada condición. **(C-C')** Secciones transversales de tubo neural de pollo a nivel de la medula espinal (C) y del romboencéfalo (D) tras 48 hpe con los constructos indicados en la parte izquierda de cada panel de imágenes y teñidas con anticuerpos contra Sox2 (rojo, marcador de progenitores) y HuC/D (azul, marcador de diferenciación). GFP (verde, transfección). **(D-E)** Ensayos de luciferasa con los reporteros Sox2 y NeuroD tras 48 hpe con los vectores indicados en la parte inferior de las gráficas. **(F)** Gráfica de barras indicando el porcentaje de células HuCD/GFP+ tras 48 hpe en tubo neural de pollo de los constructos indicados en la parte inferior. **(G)** Gráfica de barras indicando el porcentaje de células HuCD+ restringiendo el análisis a células que no presentaban polaridad ápico-basal al encontrarse invadiendo el ventrículo. Se analizaron células GFP+ (+) y GFP- (-) que invadían el ventrículo en secciones de tubo neural electroporadas durante 48 horas con N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat y aPKCⁱK274W.

Previamente, habíamos observado que la expresión de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat causaba una desestructuración del neuroepitelio semejante a la provocada por la expresión de aPKC I^{K274W} (Figura 30F y Figura 33F). Además en ambos casos la tinción con PH3 indicaba un descenso en el número de células mitóticamente activas. Así, que decidimos determinar el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular (Hoechst-FACS), comparando células que expresaban proteínas que inducen pérdidas de polaridad ápico-basal (N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat y aPKC I^{K274W}), con células que expresaban proteínas que inducen la formación de complejo apical, como β -Catenina o las formas activas de aPKC; aPKC $\zeta^{\Delta\text{NT}}$, aPKC ζ -myr y aPKC I^{A120E} . Mientras las formas activas de aPKC provocaban un aumento significativo de la fase M y un descenso de las fases Go/G1 semejante al inducido por β -Catenina (Figura 35B), la expresión de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat y aPKC I^{K274W} causaba un descenso del número de células proliferantes (Figura 35B, Fase S). Así que lo siguiente que hicimos fue determinar si esos cambios en la cinética del ciclo celular se correspondían con un desequilibrio en el ratio entre progenitores y células diferenciadas. El análisis con los reporteros luciferasa Sox2 (progenitores) y NeuroD (células diferenciadas) mostraba una reducción significativa de la expresión de NeuroD tras la electroporación durante 48 horas de β -Catenina o aPKC $\zeta^{\Delta\text{NT}}$, que era concomitante con un aumento significativo en la expresión de Sox2 (Figura 35D,E). En cambio, la expresión de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat y aPKC I^{K274W} provocaba el efecto inverso, un aumento significativo de la expresión de NeuroD y un descenso también significativo en la expresión de Sox2 (Figura 35D,E).

La inmunohistoquímica contra Sox2 y el marcador neuronal HuC/D nos mostraba que tanto la expresión de β -Catenina como de aPKC $\zeta^{\Delta\text{NT}}$ impedía la diferenciación de los progenitores neurales a lo largo del eje rostro-caudal del tubo neural (Figura 35C (medula espinal), C' (romboencéfalo) y F (cuantificación)). Sin embargo, la expresión de los mutantes despolarizantes N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat y aPKC I^{K274W} inducía la diferenciación prematura de estos progenitores (Figura 35C,E). En estos últimos casos, el porcentaje de células HuC/D era aún mayor cuando restringíamos nuestro análisis a células que se encontraban invadiendo el ventrículo, y por tanto carecían de polaridad ápico-basal (Figura 35G), indicando que la pérdida de la polaridad ápico-basal estaba induciendo la diferenciación prematura de los neuroblastos. Curiosamente, al igual que habíamos notado al teñir con PH3 (Figura 33f), un porcentaje importante de células N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat- o aPKC I^{K274W} - que habían perdido el contacto con la cara luminal y basal del neuroepitelio mantenían la expresión de Sox2. Esta observación era evidente tanto en células que se encontraban invadiendo el ventrículo (Figura 35C, N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat LP (*loss polarity*), aPKC I^{K274W} ; puntas de flechas) como en células que al perder la unión a la cara apical se acumulaban en la parte basal del neuroepitelio (Figura 35C, N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat NT (*normal tissue*); puntas de flecha). Además, la tinción con PH3 nos había revelado que esas células mitóticamente activas que carecían de polaridad ápico-basal dentro del neuroepitelio mantenían la expresión de proteínas apicales como aPKC (Figura 33F),

sugiriendo que la falta de función del complejo apical era el verdadero responsable de la diferenciación prematura. Por otro lado, tanto la expresión de β -Catenina como de $aPKC\zeta^{\Delta NT}$ mantenía el estado progenitor. En el caso de $aPKC\zeta^{\Delta NT}$ incluso cuando estas células Sox2+ carecían de contacto con la cara luminal del tubo neural (Figura 35C,C'). Curiosamente, tanto las células β -Catenina+ (Figura 28E,F) como las células $aPKC\zeta^{\Delta NT}$ (Figura 30E,F) presentan altos niveles de expresión de N-Cadherina y $aPKC$ activa.

Todos estos datos demuestran que la pérdida del complejo apical es un requisito esencial para la diferenciación de los progenitores del tubo neural.

La expresión de $aPKC\zeta^{K274W}$ y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat disminuye la formación de malformaciones inducidas por β -Catenina

Por un lado, habíamos demostrado que los crecimientos preneoplásicos inducidos por β -Catenina se iniciaban con invaginaciones del neuroepitelio a causa de una excesiva formación de AC. Por otro, que tanto la falta de actividad de $aPKC\zeta$ ($aPKC\zeta^{K274W}$) como la falta de función de N-Cadherina (N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat) disminuía la estabilidad de complejo apical y consecuentemente causaban pérdidas de la polaridad ápico-basal que conducían a una diferenciación prematura de los progenitores del neuroepitelio. Por lo tanto, decidimos evaluar si estos mutantes despolarizantes poseían capacidad de inhibir las malformaciones generadas por β -Catenina. De forma específica, $aPKC\zeta^{K274W}$ pero no $aPKC\zeta^{K281W}$, reducía significativamente el número de invaginaciones inducidas por β -Catenina (Figura 36A, *invaginations*). Mientras encontrábamos invaginaciones en el ~94% de las secciones transversales de tubo neural transfectadas con β -Catenina, solo aparecían invaginaciones en el ~35% de las secciones cuando transfectábamos β -Catenina junto a $aPKC\zeta^{K274W}$. Por su parte, N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat causaba una reducción aún más drástica del número de invaginaciones

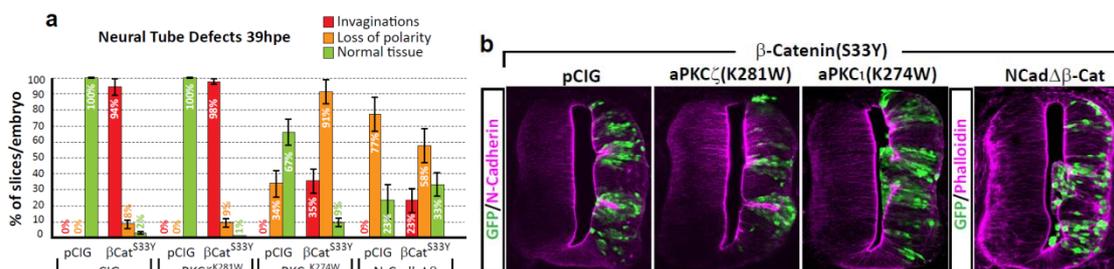


Figura 36: La expresión de $aPKC\zeta^{K274W}$ y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat disminuye la formación de malformaciones inducidas por β -Catenina. Embriones de tubo neural de pollo fueron transfectados por 39 horas con β -Catenina junto a pCIG (control), $aPKC\zeta^{K281W}$, $aPKC\zeta^{K274W}$ o N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat. Secciones fueron teñidas con anti-GFP (verde transfección) y Phalloidin o anti-N-Cadherina (magenta, marcadores de la estructura del neuroepitelio). **(A)** La gráfica de barras muestra el porcentaje de secciones en cada embrión que presentaban invaginaciones (invaginations), células invadiendo el ventrículo (loss of polarity) o ausencia de ambas alteraciones (normal tissue). Esquema representativo del diseño experimental. Se analizaron 10 secciones por cada embrión de un total de 6 embriones por condición. **(B)** Ejemplo del fenotipo más característico en cada condición.

inducidas por β -Catenina (~23%). De forma interesante, un fracción importante de secciones co-transfectadas con β -Catenina y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat (~33%) no presentaban alteraciones evidentes en la arquitectura del neuroepitelio (Figura 36A, normal tissue). Sin embargo, este porcentaje era significativamente menor cuando co-electroporábamos β -Catenina junto a aPKC^{K274W} (~9%), probablemente debido a que la presencia de β -Catenina estaba promoviendo (a través de la N-Cadherina endógena) la localización apical de este mutante sin actividad quinasa, lo que se traducía en un aumento del ~34% al ~91% en pérdidas de polaridad (Figura 36A, aPKC^{K274W}+/- β -Cat, loss of polarity). En el caso de N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat las pérdidas de polaridad disminuían con la presencia de β -Catenina (Figura 36A, N-Cadh $\Delta\beta$ +/- β -Cat, loss of polarity). Un aumento de la estabilidad de la N-Cadherina en membrana o del transporte de N-Cadherina endógena por β -Catenina podría explicar este menor porcentaje de pérdidas de polaridad.

Estos resultados confirman que β -Catenina induce la formación de invaginaciones neuroepiteliales a través de la excesiva formación de complejo apical y que N-Cadherina es el principal efector en la génesis de estas malformaciones inducidas por β -Catenina.

Identificación de nuevas proteínas que interactúan con el complejo β -Catenina/N-Cadherina implicadas en la formación del complejo apical

Nuestros resultados demostraban que el mecanismo por el cual β -Catenina induce malformaciones neuroepiteliales que conducen a crecimientos preneoplásicos depende de la interacción N-Cadherin/ β -Catenina. Así que por último decidimos identificar nuevas proteínas implicadas en la formación del complejo apical y por tanto en la génesis de estos crecimientos preneoplásicos. Para ello, diseñamos una estrategia para identificar proteínas que se asociaban con N-Cadherina exclusivamente a través de su interacción con β -Catenina. Esta estrategia consistía en un tándem de purificaciones de N-Cadherina y N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat mediante el sistema Strep-Tactin[®], y una posterior identificación por LC-MS/MS (*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) de las proteínas presentes en ambos complejos. De esta forma, la diferencia cualitativa de las proteínas presentes en ambos complejos nos revelaba qué proteínas interactuaban con el complejo N-Cadherina/ β -Catenina exclusivamente a través de β -Catenina (Figura 37A). Entre las proteínas identificadas encontramos algunas como α -E-Catenina y α -N-Catenina, cuya interacción con el complejo N-Cadherina/ β -Catenina a través de β -Catenina está bien definida. El dominio de unión de ambas isoformas se localiza entre el aa 120 y el aa 151 de la secuencia humana de β -Catenina (Aberle et al., 1994). La implicación de esta interacción en la formación del complejo apical ya había sido estudiada previamente (Figura 27E,E'), donde la expresión de un mutante de β -Catenina que carecía del dominio de unión a α -Catenina no presentaba diferencias fenotípicas con la expresión de la forma entera de

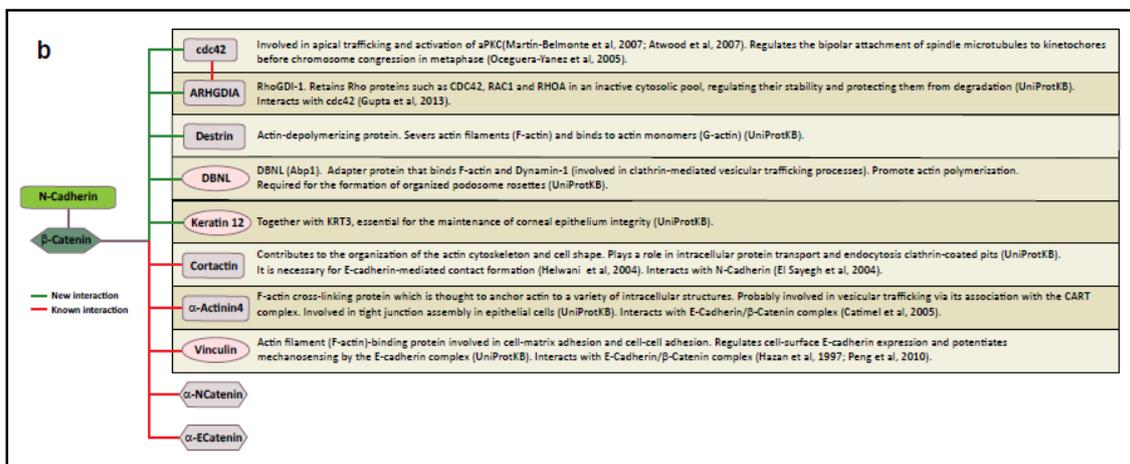
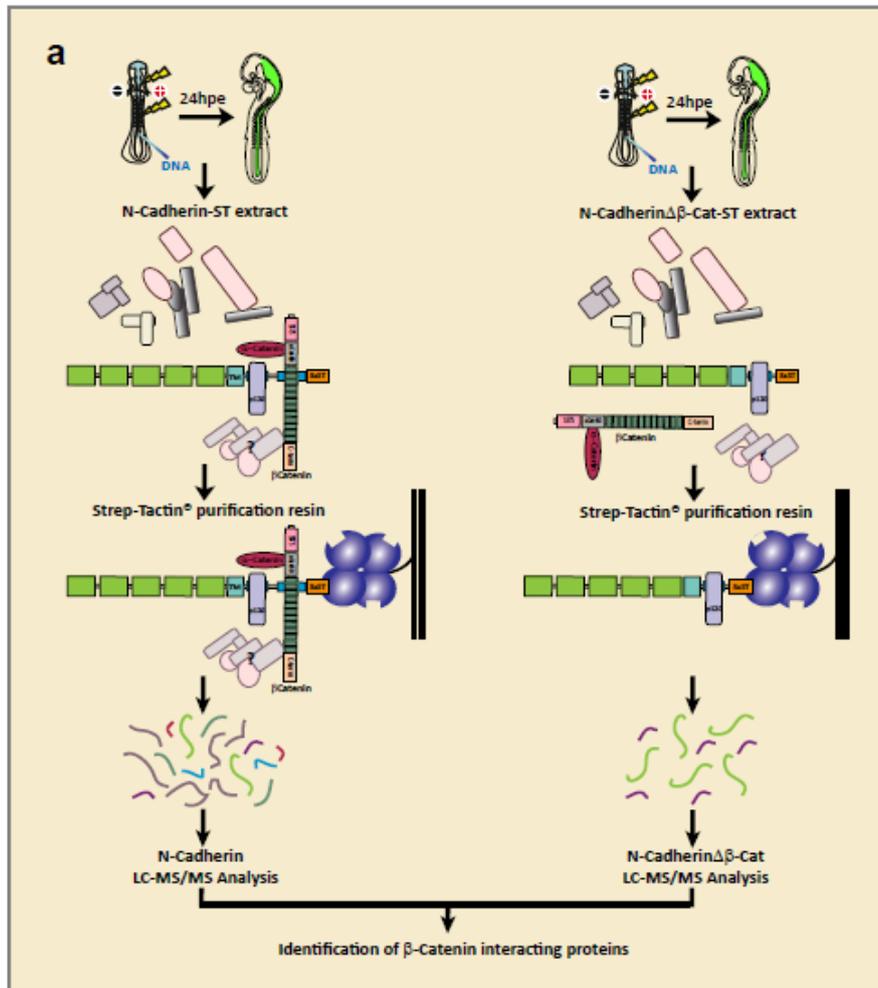


Figura 37: Identificación de nuevas proteínas que interaccionan con el complejo β -Catenina/N-Cadherina implicadas en la formación del complejo apical. (A) Esquema del diseño experimental. Tubo neural de embriones de pollo fueron transfectados con N-Cadherina y N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat y lisados en condiciones nativas 24hpe. Las proteínas asociadas a N-Cadherina y N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat fueron aisladas mediante tándem de purificaciones con el sistema Strep-Tactin[®] y posteriormente identificadas por LC-MS/MS (*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Un total de 100 embriones fueron usados para cada condición. **(B)** Proteínas identificadas por LC-MS/MS que forman complejo con N-Cadherina exclusivamente a través de su interacción con β -Catenina. A la derecha se muestran algunas funciones conocidas de las proteínas identificadas. La línea roja=interacción previamente observada. La línea verde=nueva interacción.

β -Catenina. Otras proteínas identificadas como α -Actinina4, Vinculina y Cortactina han sido previamente asociadas con uniones adherentes. Mientras α -Actinina4 y Vinculina han sido encontradas formando complejos con E-Cadherina/ β -Catenina (Hazan et al., 1997; Catimel et al., 2005; Peng et al., 2010), Cortactina inmunoprecipita junto a N-Cadherina en fibroblastos (El Sayegh et al., 2004). Sin embargo, el resto de proteínas identificadas, Cdc42, ARHGDI (RhoGDI-1), Destrina, DBNL (ABP1) y Queratina12, suponen un nuevo grupo de proteínas asociadas al complejo N-Cadherina/ β -Catenina (Figura 37B). Muchas de las funciones ya descritas para todas estas proteínas guardan una estrecha relación con la formación del complejo apical y con el fenotipo característico de células β -Catenina+. Mientras Destrina, DBNL, Cortactina, α -Actinina4 y Vinculina, pertenecen a un grupo de proteínas implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina (UniProtKB) y podrían ser responsables del transporte vesicular y del enriquecimiento apical de F-actina en células β -Catenina+, otras proteínas como Queratina12 son esenciales para el mantenimiento del epitelio de la cornea (UniProtKB). Asimismo, Cortactina, Vinculina y α -Actinina4 han sido implicadas en la formación de uniones adherentes y ocluyentes en diferentes tipos celulares (Helwani et al., 2004; UniProtKB).

Otras dos proteínas fueron identificadas como proteínas de unión al complejo N-Cadherina/ β -Catenina, Cdc42 y ARHGDI. Cdc42 es un Rho-GTPasa estrechamente implicada en el establecimiento de la polaridad. Muchos estudios la definen como responsable de la activación y localización de aPKC (Martín-Belmonte et al., 2007; Atwood et al., 2007). Además, su papel en la regulación del anclaje de los microtúbulos a los cinetocoros durante la metafase (Oceguera-Yanez et al., 2005) podría contribuir a la expansión de esta fase del ciclo en células β -Catenina+. Por otro lado, ARHGDI es una RhoGDI que puede interaccionar con Cdc42, Rac1 o RhoA (Gupta et al 2013). Su función es proteger a estas RhoGTPasas desde su prenilación en el ER hasta su llegada a la membrana citoplasmática, evitando así, que sean degradadas por el proteosoma o activadas en localizaciones ectópicas (Rafael Garcia-Mata et al., 2011).

El papel de este grupo de proteínas en funciones que forman parte del fenotipo de células β -Catenina+ como transporte vesicular, formación de uniones adherentes, localización y activación de aPKC y regulación del anclaje de microtúbulos mitóticos nos ayuda a entender aun más el mecanismo oncogénico de β -Catenina.

En resumen, los resultados de la presente tesis demuestran ampliamente que formas oncogénicas de β -Catenina inducen la formación de invaginaciones que comienzan con una formación excesiva de complejo apical a través de mecanismos dependientes e independientes de TCF que impide la diferenciación de los progenitores neurales. Estas invaginaciones conducen a la formación de rosetas donde las células presentan características de células madre, como poseer un ciclo celular lento y el mantenimiento de la expresión de Sox2, que explican la función de β -Catenina en la generación de células iniciadoras de tumor durante la génesis del meduloblastoma Wnt.

Discusión

DISCUSIÓN

El origen del meduloblastoma Wnt

El meduloblastoma es el tumor cerebral maligno más común en niños. Cuatro distintos subgrupos de meduloblastomas han sido definidos en base a su huella de expresión génica: Wnt, Shh, Grupo 3 y 4 (Taylor et al., 2012). En el subgrupo de Wnt, mutaciones estabilizantes de β -Catenina (*APC*, *AXIN*, *CTNNB1*) son responsables de la fase de iniciación del tumor. Estas mutaciones provocan un aumento de β -Catenina a nivel celular, generando una actividad sostenida de su función estructural y transcripcional. Mutaciones en el entorno de la S33 y S37 de la secuencia de β -Catenina (*CTNNB1*), las cuales generan formas meta-estables de β -Catenina ($s\beta$ -Catenina), son las mutaciones más comunes en meduloblastomas Wnt esporádicos. Aunque *MYC* y *CCND1* son dianas directas de la cascada de señalización Wnt que tienen un potente efecto sobre la proliferación de los neuroblastos (Álvarez-Medina et al., 2009), una excesiva proliferación no parece ser la causa de la oncogenicidad de β -Catenina en este tumor (Gibson et al., 2010). En la presente tesis, demostramos que la expresión de $s\beta$ -Catenina en el tejido neural en desarrollo causa anomalías que inician con invaginaciones del neuroepitelio que acaban en estructuras similares a rosetas clásicas, donde las células permanecen como progenitores Sox2 pero inesperadamente poseen un ciclo celular lento. La actividad aberrante de β -Catenina no impide la diferenciación de los progenitores neurales a causa de una excesiva proliferación sino mediante una desproporcionada formación de complejo apical. Por lo tanto, la función de β -Catenina en esta fase inicial del tumor es la de generar células iniciadoras de tumor, que aunque carecen de capacidad de desarrollar el tumor por sí mismas, suponen el punto de inicio del proceso tumoral. Como en la mayoría de cáncer, el desarrollo del tumor depende de la aparición de nuevas alteraciones del material genético sobre estas células iniciadoras de tumor que dan lugar a un aumento de la malignidad (hiperproliferación, evasión de la respuesta inmune, resistencia a hipoxia). Esta fase es denominada como fase de promoción y las células que la experimentan, células promocionadas. En el caso del meduloblastoma Wnt, los tumores presentan, además de las mutaciones estabilizantes de β -Catenina, monosomía del cromosoma 6 en el 80% de los casos (Clifford et al., 2006) y de 1 a 4 mutaciones heterogéneas (Robinson et al., 2012). Así que la pérdida del cromosoma 6 parece ser la alteración genética que transforma en células promocionadas al remanente de progenitores mantenidos por la señal aberrante de β -Catenina. Prueba de la necesidad de una segunda alteración quedó demostrada con el modelo de ratón del meduloblastoma Wnt (Gibson et al., 2010). El ratón *Blbp-Cre-Ctnnb1^{+/-Exon3-}* desarrolla crecimientos preneoplásicos en la parte dorsal del tronco encefálico durante el periodo fetal que no

llegan a adquirir malignidad a menos que incorporen otras alteraciones oncogénicas como la delección de *TP53* o mutaciones en *PI3KCA* (Robinson et al., 2012). Nosotros hemos demostrado que la reducida proliferación de los progenitores β -Catenina+ es causada por una extensión de la fase M (metafase/anafase), lo cual puede ser indicativo de dificultades en el proceso de alineamiento y separación de los cromosomas. Por lo tanto, la ilimitada capacidad de auto-renovación, acoplado a una incorrecta alineación/separación de los cromosomas, incrementa la posibilidad de que los neuroblastos β -Catenina+ adquieran sucesivas mutaciones y podría ser responsable de la pérdida del cromosoma 6. La diferente organización cromosómica de los genes en las distintas especies hace difícil concebir un modelo *in vivo* que confirme ésta hipótesis y podría explicar que mutaciones estabilizantes de β -Catenina no sean por sí solas generadoras de tumor en el modelo de ratón del meduloblastoma Wnt.

La amplificación del gen *MYC* está asociada a una histología LCA y es común en los meduloblastomas del Grupo 3 y 4 (Taylor et al., 2012). Ambas características son consideradas un signo de alta malignidad (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012). Sin embargo, aunque el meduloblastoma Wnt presenta una alta expresión de *MYC*, este subgrupo es considerado el menos agresivo de los cuatro subgrupos, y por lo tanto es asociado con un pronóstico favorable (Taylor et al., 2012). De hecho, incluso pacientes que presentan meduloblastomas Wnt con histología LCA y amplificación de *MYC* mantienen el buen pronóstico (Ellison et al., 2011). Además, la expresión de β -Catenin incrementa significativamente la supervivencia del modelo de ratón del meduloblastoma Shh (Poschl et al., 2014). Por lo tanto, la expresión de β -Catenin debe activar simultáneamente mecanismos que desencadenan la iniciación del tumor y otros que limitan la malignidad del mismo. Por otro lado, los meduloblastomas del subtipo Wnt raramente son metastásicos (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012). Mientras alrededor del 30% de los pacientes diagnosticados con meduloblastomas de los subtipos 3 o 4 presentan algún grado de metástasis, solo entorno a un 9% de los pacientes con meduloblastomas del subtipo Wnt presenta nódulos metastásicos (Northcott et al., 2011). Curiosamente, en un estudio posterior, la aparición de metástasis en meduloblastomas Wnt correlaciona con mutaciones en *PI3KCA* (Robinson et al., 2012), una quinasa estrechamente relacionada con la formación/mantenimiento de la polaridad. Mientras PTEN delimita la membrana apical mediante un enriquecimiento de PIP2, PI3K define la baso-lateral a través de un enriquecimiento de PIP3. Durante la formación de crecimientos preneoplásicos β -Catenin mantiene a las células como progenitores a través de una excesiva polarización que conduce a una alta adherencia y una reducida proliferación. Un desequilibrio entre la actividad de PTEN y PI3K podría llevar a pérdidas de polaridad que contribuirían a contrarrestar esta reducida malignidad inducida por β -Catenina. De hecho, la pérdida de polaridad ha sido ya asociada con un incremento de invasividad y por lo tanto de malignidad en diferentes tumores (Martin-Belmonte&Perez-Moreno

2012). En conclusión, las mismas anomalías celulares que convierten a estas células en células iniciadoras de tumor parecen contribuir a la baja malignidad característica de este subtipo de meduloblastoma.

Una excesiva formación del complejo apical evita la diferenciación de los progenitores neurales

Los neuroblastos del tubo neural son células madres embrionarias del tejido nervioso que presentan polaridad ápico-basal. Estas células polarizadas poseen una extensa membrana baso-lateral y un pequeño compartimento apical orientado al lumen rico en N-Cadherina. En los estadios iniciales del desarrollo del tubo neural, los neuroblastos se dividen de un modo simétrico (divisiones planares proliferativas) con el objetivo de incrementar el número de progenitores. Al comenzar la neurogénesis, las divisiones asimétricas dan lugar a un progenitor y a una célula que comienza su proceso de diferenciación. Durante las divisiones neurogénicas ápico-basales los neuroblastos se dividen de forma que el huso mitótico queda orientado paralelo a la cara luminal del epitelio. De esta forma, una célula hija mantiene el complejo apical mientras la otra hereda la casi totalidad de la membrana baso-lateral. Sorprendentemente, la célula hija basal genera un nuevo polo apical y se mantiene como progenitor, mientras que la célula hija apical primero coloca su núcleo en la zona del manto, y continuación y de forma coordinada se deshace del complejo apical heredado y activa un proceso de retracción apical que da comienzo al proceso de diferenciación (Das&Storey 2012, 2014). Para poder desprenderse del complejo apical la célula destinada a diferenciarse reduce la expresión de N-Cadherina (Rousso et al., 2012) y activa un proceso de abscisión de la membrana citoplasmática dependiente de actomiosina parecido al llevado a cabo durante la citocinesis. De esta forma, las proteínas apicales en las que incluimos N-Cadherina se mantienen en la cara apical formando parte de la fracción de membrana escindida, mientras que la célula retrae el citoplasma restante hasta la capa del manto (Das&Storey, 2014). El mantenimiento del complejo apical por estas células podría asegurar el anclaje del citoesqueleto y la migración nuclear hasta la zona del manto previa a la diferenciación. En concordancia, nosotros observamos que una fracción importante de células que carecen de complejo apical se diferencian en el ventrículo, indicando la implicación del AC en la migración a la zona del manto previa a la diferenciación. Tras la abscisión del complejo apical, la expresión de p27 promueve la salida del ciclo celular y da comienzo la remodelación morfológica que transforma a estas células en neuronas. Formas activas de aPKC incrementan el número de progenitores Sox2+ en el tubo neural de pollo (Ghosh et al., 2008) y durante la neurogénesis en *Xenopus* (Sabherwal et al 2009). En concordancia, nosotros observamos que células que expresan aPKC^{ΔNT} permanecen como progenitores en zonas internas de neuroepitelio. Además, la expresión de β-Catenina+ impide la diferenciación al mismo tiempo que genera un sobredimensionado complejo

apical que contienen altos niveles de aPKC activa. Aunque no podemos olvidar que β -Catenina induce la expresión de genes que estimulan la progresión del ciclo celular como *MYC* y *CCND1*, el fenotipo inducido por β -Catenina es debido a un impedimento de la diferenciación más que a una excesiva proliferación. Un reciente estudio realizado en *Xenopus* muestra como la sobre-expresión de formas activas de aPKC impide la diferenciación inducida por p27 (Sabherwal et al., 2014). P27 es un conocido inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (Cdk) con capacidad de unirse e inhibir complejos como ciclina E/Cdk2, ciclina D/Cdk4 y ciclina A/Cdk2, induciendo la diferenciación al impedir la progresión del ciclo celular. aPKC controla la actividad de p27 a través de la fosforilación directa de su dominio N-terminal (Sabherwal et al., 2014). Aunque β -Catenina aumenta la expresión de aPKC a través de su función transcripcional, ésta permanece en un estado de autoinhibición hasta no alcanzar la membrana apical y ser activada por Cdc-42 y PDK1. Nuestros hallazgos demuestran que la interacción de β -Catenina con N-Cadherina favorece esta activación al promover la localización apical de aPKC y Cdc-42 al mismo tiempo que impide la diferenciación. Por el contrario, la expresión de N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat o aPKC^{K274W}, moléculas que reducen la activación de aPKC, promueven la diferenciación de los progenitores neurales. En conclusión, un sobredimensionado AC evitaría la normal abscisión de la membrana apical manteniendo una alta actividad de aPKC que impediría la salida de ciclo de estas células a través de la inhibición de p27. En glioblastomas, un tumor cerebral que suele presentar una alta actividad de aPKC, abundancia de aPKC correlaciona con mal pronóstico. Curiosamente, la inhibición de la actividad de aPKC en modelos de ratón de glioblastoma reduce el crecimiento del tumor, sugiriendo una relación entre la actividad de aPKC y el ciclo celular (Kusne et al., 2014).

Divisiones neurogénicas y contracción ápico-basal

β -Catenina inicia los crecimientos preneoplásicos a través de una invaginación apical del neuroepitelio que acaba creando lúmenes ectópicos semejantes a formaciones en rosetas. La implicación de la cascada de Wnt en la formación de invaginaciones no es algo nuevo. El epitelio del intestino presenta numerosos pliegues que tienen como función la de incrementar la superficie de absorción de dicho epitelio. En el fondo de cada pliegue encontramos una estructura conocida como criptas de Lieberkühn o simplemente criptas intestinales. Estas criptas intestinales están formadas por células madre Lgr5+ que son las encargadas de la continua auto-renovación de este tejido. Curiosamente, la expresión de Lgr5 parece controlada exclusivamente por la cascada de Wnt (Barker et al., 2007). Células Lgr5+ aisladas de intestino de ratón son capaces de generar un nuevo epitelio en cultivos 3D. Estas células en cultivo se dividen al tiempo que van formando invaginaciones que recuerdan a los pliegues intestinales y a las invaginaciones inducidas por β -Catenina en el neuroepitelio. Tras 3 semanas en cultivo estas células han formado pequeños

organoides consistentes en numerosas invaginaciones o criptas, rodeando a un gran lumen central (Sato et al., 2009). Así que además de mantener las características de célula madre, β -Catenin podría estar contribuyendo a la formación de los pliegues intestinales. El mecanismo por el cual puede ejercer tal función probablemente guarde alguna relación con el mecanismo responsable de la formación de invaginaciones en el neuroepitelio.

La constricción apical durante la transición columnar-cuboidal está implicada en invaginaciones epiteliales durante la organogénesis (Lecuit & Lenne 2007; Llimargas & Casanova, 2010; Sawyer et al., 2010). Sin embargo, debido al estrecho polo apical que presentan los neuroblastos, la constricción apical posee una limitada capacidad de invaginación en el neuroepitelio. En las invaginaciones inducidas por β -Catenina un número importante de células permanecen arrestadas en fase M, sugiriendo que las fuerzas que distorsionan el neuroepitelio y las que obstruyen la correcta finalización de la mitosis podrían tener un origen común. Durante la mitosis, la posición y orientación del huso mitótico son determinadas por fuerzas generadas en la corteza celular, donde los microtúbulos astrales que emanan desde los polo mitóticos son anclados a la membrana citoplasmática (Siller&Doe, 2009). Cuando los microtúbulos se encuentran correctamente anclados a la membrana plasmática y a los cinetocoros, la célula procede a entrar en anafase para separar los cromosomas antes de producirse la despolimerización de los microtúbulos mitóticos (Kozlowski et al., 2007). El complejo $G\alpha$ -LGN-NuMA ancla a la membrana los microtúbulos mitóticos y Lis1-Dynein-Dynactin genera las fuerzas de tracción necesarias para la segregación de los cromosomas. En divisiones planares, los microtúbulos astrales interaccionan con $G\alpha$ -LGN-NuMA en la membrana lateral de la célula en mitosis, donde el anclaje apical de estos microtúbulos es prevenido por la actividad apical de aPKC a través de la fosforilación de LGN (Hao et al., 2010) y NuMA (Galli et al., 2011). En cambio, en divisiones ápico-basales (A-B), Inscutable (Insc) localiza el complejo Lis1-Dynein-Dynactin junto al complejo aPKC-Par y las uniones adherentes, permitiendo el reclutamiento de $G\alpha$ -LGN-NuMA en el dominio apical (Zigman et al., 2005) y generando una orientación del huso mitótico paralelo a la cara luminal. Una excesiva actividad de aPKC durante las divisiones ápico-basales podría promover al mismo tiempo el reclutamiento de Insc y la exclusión $G\alpha$ -LGN-NuMA del dominio apical provocando un inadecuado anclaje de los microtúbulos en la cara apical que impediría contrarrestar adecuadamente la tensión generada por los microtúbulos anclados en la membrana basal. Este desequilibrio de fuerzas podría ser el origen de alteraciones genéticas y de la formación de invaginaciones en la cara apical. En armonía con esta hipótesis, mutaciones inactivantes del regulador de Dineína, Lis1, causa Lisencefalía, una enfermedad hereditaria caracterizada por la ausencia de circunvoluciones (pliegues) en la corteza cerebral (Vallee and Tsai 2006). Por lo tanto, podemos decir que Lis1-Dynein-Dynactin es requerido para la formación de las invaginaciones neuroepiteliales fisiológicas que dan lugar al pliegue que la corteza cerebral. Curiosamente las primeras invaginaciones comienzan a ser visibles

tras 72 horas post-incubación (Figura 26H; HH12+24hpe), momento en el cual las células del neuroepitelio comienzan las primeras divisiones neurogénicas (parte de ellas ápico-basales), siendo claramente evidentes entre 84-96 hpi (Figura 26H; HH12+36hpe), periodo en el que se produce el mayor pico de éste tipo de divisiones (Saade et al., 2013). Además durante las primeras 24 horas de electroporación de β -Catenina (Figura 26H; HH12+24hpe), cuando los progenitores del neuroepitelio experimentan de forma casi exclusiva divisiones planares proliferativas, β -Catenina induce un incremento de la proliferación sin provocar una extensión de la fase M. Es a partir del comienzo de la neurogénesis cuando las invaginaciones y estas anomalías en la mitosis se hacen manifiestas. Aunque la sobre-expresión de la forma activa de aPKC, aPKC^{ANT}, causa pequeñas invaginaciones antes de que aparezcan las primeras divisiones ápico-basales (Figura 30B; HH12+16hpe), estas invaginaciones son considerablemente más pequeñas y no llegan a avanzar hasta formar lúmenes ectópicos. Las diferencias fenotípicas entre ambas invaginaciones podrían ser debidas a que aPKC^{ANT} induce una hiperactividad de aPKC en toda la membrana, y no restringida al dominio apical como en el caso de β -Catenina, causando en el primer caso, una posible alteración de la mitosis durante las divisiones planares al inhibir el anclaje de α -LGN-NuMA a la membrana lateral. En concordancia, la localización apical de aPKC^{ANT} inducida por β -Catenina inhibe la aparición de invaginaciones tempranas (Figura 30D).

Tras 96 hpi (Figura 26H; HH12+48hpe) encontramos invaginaciones en diversos estadios, mientras algunas células han reducido su citoplasma enormemente, otras comienzan el proceso de invaginación con una mínima contracción ápico-basal, indicando que un evento específico, secundario al enriquecimiento apical, debe ocurrir para dar comienzo a la invaginación. Las divisiones ápico-basales (A-B) podrían ser el evento responsable de la generación pero también de la progresión de las invaginaciones. Aunque las invaginaciones se inician durante la fase final de la mitosis de algunos progenitores, durante la progresión hasta la formación de un lumen ectópico, un considerable número de invaginaciones están formadas por células que presentan contracción ápico-basal y nos son positivas para PH3. Por lo tanto un mecanismo posterior a la mitosis parece contribuir a la progresión de la invaginación. Durante las divisiones neurogénicas la expresión de genes implicados en diferenciación como Tis21 (*BTG2*) comienza durante la fase G1 del ciclo celular que da lugar a la división neurogénica. En las divisiones progenitor-neurona (P-N), entre las que se incluyen las divisiones A-B, la expresión de Tis21 coincide con la de Sox2. Tras la mitosis, la célula colocada en la capa del manto deja de expresar Sox2 y comienza su diferenciación, mientras que la célula que se mantiene como progenitor reprime la expresión de Tis21 y entra en un nuevo ciclo celular (Saade et al., 2013). Tis21 controla la expresión de genes proneurales al actuar como un co-activador transcripcional. Estos genes proneurales activan los procesos que la célula destinada a diferenciarse debe llevar a cabo en las fases iniciales de su diferenciación, como la abscisión y la

retracción apical. Por lo tanto, durante las divisiones neurogénicas las células expresan genes implicados en las fases iniciales de la diferenciación (como la retracción apical) incluso antes de que la célula experimente la mitosis. La prolongada mitosis junto al sobredimensionado complejo apical de las células β -Catenina podría provocar la descoordinación entre el proceso de abscisión y retracción apical y podría contribuir a la progresión de la invaginaciones iniciales hasta la formación de rosetas.

En resumen, proponemos un mecanismo para las invaginaciones inducidas por β -Catenina que comienza con la formación excesiva de complejo apical que conduce a una hiperactividad apical de aPKC. Esta actividad aberrante de aPKC podría impedir el correcto anclaje de los microtúbulos astrales a la membrana apical durante las divisiones A-B, siendo mayor la fuerza generada en dirección apical->basal que la generada en dirección basal->apical durante la mitosis, y conduciendo al inicio de las invaginaciones. Más tarde, una contracción ápico-basal de la membrana citoplasmática debido a una descoordinación entre el proceso de abscisión y retracción apical contribuiría al avance de la invaginación hasta la formación de lúmenes ectópicos.

El papel de β -Catenina en la formación del AC

β -Catenina induce la formación del complejo apical a través de una combinación de su función transcripcional y no transcripcional. Mientras la interacción con N-Cadherina permite el transporte apical de los componentes de polaridad, la actividad transcripcional dependiente de β -Catenina induce la expresión de aPKC y favorece el transporte vesicular desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi. Aunque aPKC es un regulador clave de la polaridad celular, nuestros experimentos demuestran que esta actividad transcripcional (o la actividad aPKC) es necesaria pero no suficiente para el correcto establecimiento de la polaridad. La característica que define a la polaridad celular es la distribución asimétrica de proteínas dentro de la membrana citoplasmática, y nuestros resultados demuestran que esta función no puede ser atribuida a la función transcripcional dependiente de β -Catenina. Sin embargo, su capacidad de interacción con N-Cadherina se revela como esencial para la distribución asimétrica de las proteínas de polaridad.

Cdc42, ARHGDI1, Destrina, DBNL, Queratina12, Cortactina, α -Actinina4 y Vinculina representan un nuevo grupo de proteínas asociadas a las uniones adherentes a través de β -Catenina implicadas en el establecimiento de la polaridad ápico-basal (Figura 37B). Nuestros resultados demuestran de forma consistente que la interacción β -Catenina/N-Cadherina estimula la formación de AC mediante el transporte apical de las proteínas de polaridad. La identificación de estos nuevos actores nos ayuda a entender el porqué del requerimiento de la interacción β -Catenina/N-Cadherina en el tráfico de proteínas apicales.

Las proteínas de membrana sintetizadas en el retículo endoplasmático son transportadas en vesículas hasta la región *cis* del aparato de Golgi donde se fusionan

con la membrana de éste. Durante su paso por el Golgi las proteínas son modificadas, marcadas y dirigidas hasta el *trans*-Golgi (TGN, *trans-Golgi network*) hasta finalmente formar nuevas vesículas que serán enviadas hasta su localización en la membrana citoplasmática a través de las miosinas no convencionales I,II y V (Fucini et al., 2002; Cao et al., 2005; Carmosino et al., 2009). El TGN funciona como una estación donde se reciben y ordenan las proteínas en diferentes vesículas dependiendo de su destino. En células epiteliales, la polaridad es establecida por el tráfico de vesículas a través de diferentes rutas que conectan el TGN con la membrana apical y basolateral. Este tráfico permite establecer la distinta composición de ambos dominios y demuestra ser clave para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad (Duffield et al., 2008; Weisz & Rodriguez-Boulan, 2009, Carmosino et al 2009). Muchas de las proteínas de unión y reguladoras de actina que aparecen en nuestro análisis localizan en el Golgi, donde el citoesqueleto de actina parece tener un papel esencial en el transito vesicular. La formación de vesículas en el TGN y su posterior transporte requiere de un conjunto de lípidos y proteínas que se encuentran revistiendo la membrana vesicular (*vesicular coat proteins*) y poseen capacidad de unirse al citoesqueleto de actina (Stamnes, 2002). ARF1, una Ras *small GTPases*, activa el reclutamiento de estas proteínas de revestimiento en la membrana del TGN, induciendo la deformación y escisión de la membrana que da lugar a la formación de las vesículas dependientes de clatrina. ARF1 a través del reclutamiento de AP-1 promueve la asociación de clatrina, y mediante el reclutamiento de espectrina estimula el ensamblaje del citoesqueleto de actina a las membranas del Golgi. Para esto último, requiere además de su habilidad de incrementar los niveles de PIP2 en esta membrana a través de la activación de PI4KIII y PIP5K (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). El enriquecimiento de PIP2 recluta y activa a **Cdc42**, el cual tiene un papel muy importante en este proceso. Cdc42 estimula la polimerización de actina en las membranas del TGN a través de su interacción con **DBNL** (ABP1) y N-Wasp. Esta interacción revierte la auto-inhibición de N-Wasp y permite la activación del complejo de nucleación de actina Arp2/3. Durante la formación de vesículas, ARHGAP21 modula los niveles de Cdc42-GTP y permite un dinámico ciclo de ensamblaje y desensamblaje de actina en el Golgi (Fucini et al, 2002; Luna et al, 2002; Matas et al, 2004). Probablemente la actividad GTPase de Cdc42 se mantiene inactiva durante el transporte de estas vesicular hasta ser de nuevo activada en la membrana apical, también rica en PIP2, y facilitar la activación del complejo Par-aPKC (Martín-Belmonte, 2007). Esta función de protección de la actividad de Cdc42 durante el transporte de vesículas apicales podría ser llevada a cabo por **ARHGDI** (Rafael Garcia-Mata et al, 2011).

El ensamblaje de actina y clatrina permite la formación de vesículas transportadoras al promover la deformación de las membranas del Golgi, pero antes de ser transportadas se debe producir la escisión de estas vesículas. Para ello, ARF1-GTP activa el reclutamiento de **Cortactina** y Dinamina en el TGN (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). **DBNL** mediante su interacción con Dinamina podría contribuir a la

estabilización del complejo Cortactina/Dinamina en las deformadas membranas del TGN. Una vez allí, Cortactina interacciona con el entramado de filamentos de actina a través de su interacción directa con el complejo Arp2/3, mientras que Dinamina es requerida para la generación de las fuerzas implicadas en la escisión (Cao et al, 2005).

Por lo tanto, algunas de las proteínas identificadas en nuestro análisis cumplen importantes funciones durante la formación de vesículas de transporte. La unión de estas proteínas a las uniones adherentes podría proveer una señal que determine la formación de vesículas específicamente apicales. La interacción con Cdc42 además de promover la polimerización de actina podría garantizar el correcto destino apical. Cdc42 ha demostrado ser una pieza clave en el establecimiento de la polaridad celular a través de dos mecanismos, el tráfico vesicular y la activación de aPKC. La implicación de Cdc42 en el tránsito vesicular estrictamente apical ha sido ampliamente demostrada. La falta de expresión de Cdc42 impide la exocitosis de vesículas apicales en cultivos 3D de células MDCK inhibiendo la formación normal del lumen (Figura 16B,C; Martín-Belmonte et al., 2007). En estas células se observa una acumulación citoplasmática de vesículas que contienen proteínas apicales mientras que las proteínas basolaterales no se ven alteradas, sugiriendo que Cdc42 es requerida específicamente para el tráfico apical. Además la expresión de Cdc42 resulta en un transporte anómalo de proteínas basolaterales al dominio apical (Kroschewski et al 1999; Cohen et al., 2001). Este efecto es reproducible tanto con el mutante dominante negativo como con el constitutivamente activo de Cdc42, y sugiere que la actividad GTPase no está implicada en la direccionalidad de las vesículas. Sin embargo, los mutantes de Cdc42 afectan a la formación de vesículas en el TNG a través del mecanismo antes comentado (Müsch et al., 2001). La interacción de Cdc42 con β -Catenina podría ser responsable del transporte apical inducido por la asociación β -Catenina/N-Cadherina en los progenitores del tubo neural. Curiosamente, cuando expresamos N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat junto a β -Catenina (de esta forma estimulamos el tráfico ER-Golgi a través de la actividad transcripcional pero impedimos la interacción Cdc42/ β -Catenina/N-Cadherina), N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat aparece localizado en la membrana basolateral (Figura 33C';HA, punta de flecha), sugiriendo que la asociación entre las uniones adherentes y Cdc42 condiciona la localización apical o basolateral de las uniones adherentes en los progenitores del tubo neural. En *Drosophila*, Cdc42 ha demostrado regular la integridad de las uniones adherentes mediante la regulación del tráfico vesicular dependiente de actina (Georgiou et al., 2008; Harris & Tepass, 2008). Dos mecanismos han sido propuestos; Uno que sugiere que el tráfico apical de las proteínas propias de polaridad (aPKC, Crumbs) generara consecuencias *downstream* sobre la integridad de las uniones adherentes. Y un segundo más acorde con nuestros resultados que implica la regulación directa de la exocitosis de las uniones adherentes. Tras la inhibición de la actividad de Cdc42 en embriones de *Drosophila*, las proteínas del complejo apical se acumulan en endosomas de las células del ectodermo (Harris & Tepass, 2008). Curiosamente, aunque este defecto en el tráfico se produce en todo el

ectodermo, en el neuroectodermo esta depleción de las proteínas polaridad de la membrana apical está acompañada de una pérdida de la integridad de uniones adherentes. Mientras las uniones adherentes de las células epiteliales se concentran en la membrana lateral, en el neuroepitelio las uniones adherentes forman parte del complejo apical. Así que la integración de las uniones adherentes en diferentes vesículas de transporte dependiendo del tipo celular podría explicar la diferencia fenotípica de la inhibición de Cdc42 en las diferentes capas ectodérmicas. Las señales que permiten o impiden la asociación de Cdc42 con β -Catenina en estos dos tipos de células polarizadas podrían ser claves en la especificación del ectodermo.

Una vez las proteínas apicales se encuentran en el dominio apical, Cdc42 contribuye al establecimiento de la polaridad a través de la activación de aPKC (Etienne-Manneville, 2004). Tanto el enriquecimiento como la activación de Cdc42 en la membrana apical son dependientes de la producción de PIP2 por parte de PTEN. PTEN es una de las proteínas más frecuentemente mutadas en cáncer, pero en muchas ocasiones la reducción de los niveles de PTEN no corresponden con ninguna mutación (Bastola et al., 2002), sugiriendo una importante regulación de estabilidad de PTEN por un mecanismo post-transcripcional. PTEN interacciona con miembros de la familia de guanilato quinasas asociadas a membrana como MAGI-2 (Torres & Pulido, 2001), una proteína que también muestra capacidad de interacción con β -Catenina (Kawajiri et al., 2000). **Vinculina** otra proteína de unión a actina que aparece en nuestro análisis, podría favorecer el enriquecimiento de PTEN en la membrana apical durante el establecimiento de la polaridad. En un estudio donde usan una línea celular que carece de la expresión de Vinculina los autores no detectan niveles de proteína PTEN a pesar de que los niveles de RNA no se ven alterados. Este fenotipo también ocurre cuando E-Cadherina es bloqueada con el uso de anticuerpos. Curiosamente la expresión de Vinculina promueve la interacción entre β -Catenina y MAGI-2 y restaura los niveles proteicos de PTEN, sugiriendo que la interacción de las uniones adherentes con PTEN a través de MAGI-2 previene la degradación de PTEN (Subauste et al., 2005). Este mecanismo podría contribuir a la activación de Cdc42 y justificaría la excesiva actividad apical de aPKC observada en los neuroblastos β -Catenina+.

El enriquecimiento apical de F-Actina es parte de la polaridad ápico-basal de los progenitores del neuroepitelio. Los filamentos de actina se ensamblan a las uniones adherentes proporcionando la unión del citoesqueleto de actina a la membrana celular y determinando la forma y orientación de los progenitores dentro del neuroepitelio. Muchas proteínas de unión a actina pueden asociarse a Cadherina: α -Catenina, Vinculina, α -Actinina, Zo-1, Eplina y Afadina (Simske et al., 2003; Tinkle et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2010), pero el mecanismo por el cual la actina es reclutada y ensamblada a las uniones adherentes es un misterio. La iniciación de un nuevo contacto entre célula y célula impulsa la formación de uniones adherentes y el ensamblaje local de actina. Aunque se pensaba que α -Catenina cumplía esta función de ensamblaje, α -Catenina muestra una mínima capacidad de asociarse a filamentos

de actina cuando forma parte de las uniones adherentes (Drees et al., 2005). Un reciente estudio demuestra que durante el ensamblaje del citoesqueleto de Actina, las uniones adherentes polimerizan nuevos filamentos de actina a través del complejo Arp2/3 (Tang & Briehner, 2012). Los autores comprueban que **α -Actinina4** localiza específicamente en los sitios de incorporación de actina de las uniones adherentes tanto en ensayos *in vitro* de membranas purificadas como en ensayos *in vivo* en células MDCK. La expresión de shRNA contra α -Actinina4 o la expresión de un mutante dominante negativo de α -Actinina4 inhibe el ensamblaje de actina, demostrando el importante papel que desempeña α -Actinina4 en la nucleación y ensamblaje del citoesqueleto de actina a las uniones adherentes (Tang & Briehner, 2012). Además α -Actinina4 forma parte del complejo CART implicado en el tráfico de vesículas hasta la membrana citoplasmática dependiente de miosina V (Yan et al., 2005). Así que α -Actinina4 podría contribuir tanto en el tráfico de vesículas desde el TGN a la membrana apical como en el enriquecimiento apical de Actina durante el establecimiento de la polaridad.

Una vez en la membrana citoplasmática, la estabilidad de N-Cadherina depende de su asociación a p120^{ctn}. β -Catenina además de favorecer la llegada a la membrana apical de nueva N-Cadherina podría favorecer su estabilidad en este compartimento a través de la actividad sostenida de aPKC. Numb fue identificada por primera vez en *Drosophila melanogaster*, como un determinante de linaje celular. Durante las divisiones ápico-basales de los neuroblastos de *Drosophila*, Numb queda restringido en la membrana basal induciendo la diferenciación de la célula hija basal tras la división. En el neuroepitelio de mamíferos, Numb es localizado en vesículas distribuidas por la membrana basolateral que están especialmente enriquecidas en las uniones adherentes de las células en interfase (Kim&Walsh, 2007). Numb interacciona con N-Cadherina secuestrando p120^{ctn} induciendo la endocitosis de las uniones adherentes. De esta forma Numb restringe las uniones adherentes en el dominio subapical evitando la inserción de N-Cadherina en el dominio lateral. De forma interesante, la fosforilación de Numb por parte de aPKC induce su asociación a 14-3-3 y previene el secuestro de p120^{ctn} (Sato et al., 2011). De esta forma la actividad apical de aPKC y la estabilidad de las uniones adherentes en la membrana están coordinadas. La sobreexpresión de aPKC^{K274W}, isoforma de aPKC que parece específica del tubo neural, causa pérdidas de polaridad donde la expresión apical de N-Cadherina no es detectable. Esta pérdida de polaridad se acentúan en presencia de β -Catenina, indicando que la localización apical de aPKC^{K274W} favorece la desestabilización de N-Cadherina. La actividad de aPKC podría estar regulando la estabilidad de las uniones adherentes a través de la fosforilación de Numb. Además, en el inicio de las invaginaciones inducidas por β -Catenina, las células en interfase presentan una acumulación de uniones adherentes que invade el dominio lateral al mismo tiempo que muestran altos niveles de aPKC activa no estrictamente restringida en el dominio apical. Un desproporcionado tráfico de uniones adherentes al compartimento apical

junto a una inhibición de la función de Numb por parte de aPKC podría ser la causa de la invasión ápico-lateral de uniones adherentes en células β -Catenin.

En conclusión, la interacción de N-Cadherina con β -Catenina permite la asociación con diferentes proteínas implicadas en los sucesivos eventos que conducen al establecimiento de la polaridad celular. La gran capacidad de asociación que proporciona β -Catenina permite el establecimiento de múltiples complejos que facilitan la formación y el transporte de vesículas desde el *trans*-Golgi hasta la membrana apical, la acumulación-activación apical de aPKC y el enriquecimiento apical de uniones adherentes y Actina. Una descripción más completa de este mecanismo será un nuevo desafío hacia la comprensión de este proceso tan importante durante la embriogénesis y tumorigénesis que es la polaridad celular.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- β Catenina inhibe la diferenciación de los progenitores del tubo neural si causar una hiperproliferación de dichas células.
- β Catenina induce la aparición de malformaciones neuroepiteliales a través de un mecanismo combinado que requiere su función transcripcional y estructural.
- β Catenina induce la formación del complejo apical y es necesaria para el mantenimiento de la polaridad ápico-basal de los neuroblastos.
- La interacción N-Cadherina/ β Catenina regula la localización de las uniones adherentes y de las proteínas de polaridad en el dominio apical de los neuroblastos.
- La polaridad ápico-basal es requerida para el mantenimiento del estado progenitor de los neuroblastos.
- El bloqueo de la formación del complejo apical reduce la aparición de malformaciones neuroepiteliales inducidas por β Catenina

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

Electroporación in ovo de embriones de pollo

Los embriones de pollo de la raza White Leghorn se incubaron a 38,5°C y con una humedad del 70%. El DNA plásmidico purificado por columna (Clontech) a la concentración de 0.5-2 µg/µl se resuspendió en agua y antes de la electroporación se añadió colorante Fast Green (50 ng /ml). El DNA fue inyectado en el tubo neural de embriones en el estadio HH12 (Hamburger & Hamilton, 1951) que seguidamente se electroporaron en la región a estudiar (romboencéfalo o medula espinal) usando un electroporador Intracell Dual Pulse (TSS10) aplicando cinco pulsos de 50 ms de 20-25 V. Los embriones transfectados se dejaron desarrollar hasta el estadio deseado y fueron procesados según el tipo de análisis realizado.

Cultivos de las líneas celulares

La línea celular HEK293 se cultivó DMEM/F12 suplementado con un 10% de FBS en una atmósfera de 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C. Las transfecciones transitorias se realizaron mediante electroporación con el Microporator MP-100 (Digital Bio, Seoul, Korea) usando dos pulsos de 1000V de 20ms de duración. Las células se crecieron durante 24 horas hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Todos los medios se obtuvieron de Invitrogen.

Constructos de DNA

Todos los constructos usados, excepto los reporteros Luciferasa y el reportero TopRed, fueron clonados por PCR en los plásmidos PiggyBac (GFP bicistrónico para transfección estable), pCIG (GFP bicistrónico para transfección transitoria), pCIEGO (sin repotero) o pCIEGO-GFP (vector para fusiones con GFP). Los constructos generados fueron los siguientes:

Constructos TCF: Tcf3HMG (secuencia del HMG-box de TCF3 de ratón), VP16-Tcf3 (dicha secuencia fusionada al activador VP16); EnR-Tcf3 (misma secuencia fusionada al represor Engrailed) y DNTCF4 (CDS humana de *TCF7L2* con delección del dominio de unión a β-Catenina, del aa 1 al 53).

Constructos β-Catenina: sβ-Catenina, CDS humana de *CTNNB1* con mutaciones en S33 (β-CateninaS33Y), en S37 (β-CateninaS37A) o delección entre el aa29 y el 48 (β-CateninaΔ29-48)); sβ-CateninaΔC (β-CateninaS33Y con delección del dominio C-terminal, desde el aa 674 al 782); sβ-CateninaΔαCat (β-CateninaS33Y con delección del

dominio de unión a α -Catenina, desde el aa 120 al 151). Para los estudios de localización se incorporó un *FLAG*.

Constructos aPKC: *Wild-type* aPKC ζ (CDS de *PRKCZ* de ratón), aPKC ζ Δ NT (CDS de pollo con delección en N-terminal, desde el aa 1 al 183), aPKC ζ K281W (CDS de ratón con mutación en el dominio quinasa, aa 281), aPKC ζ -myr (CDS de rata fusionada a miristilo). *Wild-type* aPKC ι (CDS de *PRKCI* de humano), aPKC ι A120E (CDS humana con mutación en el aa120), aPKC ι K281W (CDS humana con mutación en el dominio quinasa, aa 281).

Constructos N-Cadherina: N-Cadherin-GFP (CDS de *CDH2* de pollo fusionada a GFP); N-Cadherin (CDS de *CDH2* de pollo); N-Cadherin Δ β Cat (CDS de *CDH2* de pollo con una delección entre el aa 844 y el 912). Para los estudios de localización se incorporó un HA y para las purificaciones un 3xST (3xStrep-tag: WSHQPFEKGG).

Anticuerpos y reactivos

Anticuerpos monoclonales de ratón contra: PCNA (Santa Cruz, SC-56); HuC/D (Molecular Probes, A21271); β -Tubulin III/Tuj1 (Covance, MMS435P); β -Actin (Sigma, AC15); β -Catenin (Sigma, C7207); ZO-1 (Invitrogen, 1A12); Pax6 (DSHB); and GAPDH (Enzo, 1D4); α -Tubulin (Sigma, T6199); Acetylated Tubulin (Sigma, T6793); Strep-Tag (ST, IBA, 2-1507-001); GM130 (BD, 610822); y CLIMP63 (US Biological, C5840-93).

Anticuerpo monoclonales de rata contra: Bromodeoxiuridina (BrdU, AbD-Serotec, BU1/75); y N-Cadherin (Invitrogen, NCD-2).

Anticuerpos policlonales de conejo contra: GFP, RFP, FLAG y HA (producidos en nuestro laboratorio); Sox2 (Invitrogen, 48-1400); Phospho^{S10} Histone H3 (PH3, Millipore, 06-570); Histone H3 (Abcam, ab1791); aPKC ζ / λ (Santa Cruz SC- 17781); y Phospho^{T410/403}aPKC ζ / λ (Cell Signaling, 9378).

Los anticuerpos secundarios marcados con Alexa o peroxidasa fueron obtenidos de Molecular Probes and Pierce respectivamente, Rhodamine-Phalloidin de Invitrogen, Hoechst de Molecular Probes y To-PRO de Life Technologies.

Western blot

Para los experimentos de Western blot ambos lados del tubo neural de pollo fueron secuencialmente electroporados. Las áreas GFP+ de los tubos neurales electroporados fueron disecadas con un microscopio binocular de fluorescencia. Los tejidos fueron lisados con 1X SDS Laemmli buffer (5 embriones por condición) y sonicación. El material soluble fue sometido a SDS-PAGE y transferido a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con TTBS (150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 and 20 mM Tris-HCl [pH 7.4]) con 8% de leche desnatada en polvo y luego incubadas con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. Se usaron anticuerpos

secundarios acoplados a peroxidasa o fluoróforos. La unión de los anticuerpos peroxidasa a las membranas se visualizo con el sistema ECL y Versadoc Imaging System de Bio-Rad y los acoplados a fluoróforos con *Odyssey* (LI-COR, Biosciences). Los valores de expresión fueron cuantificados con Quantity One™ software (Bio-Rad). Los pesos moleculares fueron calculados usando Bio-Rad Precision Molecular Weight Markers. Los valores fueron normalizados con GAPDH y las diferencias fueron calculadas. Los valores de la figura 28a muestran la media \pm SD (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

Fraccionamiento subcelular

Células HEK se transfectaron con N-Cadherin-ST o N-Cadherin $\Delta\beta$ Cat junto a los correspondientes constructos a estudiar (pCIG(control), s β -Catenina o s β -Catenina Δ C). Todas las condiciones se co-electroporaron junto a RFPmb que fue usado como marcador de membrana. Además se usaron células sin transfectar como control negativo. Tras 24 horas en cultivo las células fueron lisadas sobre hielo con tampón de homogenización (1mM NaHCO₃, 2mM phenylmethylsulfony fluoride) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La lisis fue realizada en homogeneizador cilíndrico de vidrio con embolo de teflón. La suspensión generada fue centrifugada a 1000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (fracción membrana y citosolica) fue transferido a un nuevo tubo y el pellet (fracción insoluble: núcleos, ER y Golgi), lavado dos veces con el tampón de homogenización y posteriormente lisado con 1X SDS Laemmli buffer y sonicación. El sobrenadante (fracción membrana y citosolica) fue sometida a centrifugación 25.000g durante 30 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante obtenido (fracción citoplasmática) fue transferido a un nuevo tubo y disuelto el 1X SDS Laemmli buffer. La fracción de membrana contenida en el nuevo pellet fue lavada dos veces con el tampón de homogenización y posteriormente disuelta el 1X SDS Laemmli buffer y sonicación. Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas por Western Blot.

Análisis de glicosilación. PNGaseF y EndoH

Células HEK fueron co-transfectadas con N-Cadherina-ST/s β -Catenina, N-Cadherina-ST/s β -Catenina Δ C o N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat-ST/s β -Catenina. Tras 24 horas en cultivo las células fueron lisadas en 1X Glycoprotein Denaturing Buffer (New England Biolabs, P0703L, P0704L) conteniendo 0.5% SDS, 40 mM DTT. Los lisados obtenidos fueron desnaturalizados a 100°C durante 10 minutos y luego divididos en 4 tubos: control 1(sin incubación), EndoH, PNGaseF y control 2 (incubación sin enzimas). Control 1 fue disuelto en 1X SDS Laemmli buffer y guardado a 4°C. EndoH fue diluido en G5 Reaction Buffer e incubado con EndoH a 37°C durante 4 horas siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, P0703L). PNGaseF fue diluido en G7 Reaction Buffer

suplementado con NP-40 (1% concentración final) e incubado con PNGaseF a 37°C durante 4 horas como indica el fabricante (New England Biolabs, P0704L). Control 2 fue diluido en G7 Reaction Buffer suplementado con NP-40 (1% concentración final) e incubado durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación las diferentes muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Purificaciones Strep-Tactin®

Para las purificaciones ambos lados del tubo neural de pollo fueron secuencialmente electroporados. Las áreas GFP+ de los tubos neurales electroporados fueron disecadas con un microscopio binocular de fluorescencia. Los tejidos se lisaron directamente en PIK buffer (Tris-HCl 20mM pH=7.4, NaCl 137mM, Glycerol 10%, NP-40 1%, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas para las muestras *Uncrosslinked*; Las muestras *crosslinked* fueron sometidas a 1% de PFA durante 10 minutos previamente a la lisis con SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.1) y sonicación. Antes de proceder a la purificaciones las muestras *crosslinked* fueron diluidas con ChIP dilution buffer (0.1% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 17 mM Tris pH 8.1, 170 mM NaCl) hasta llegar a una concentración final de 0.2% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris.HCl pH 8.1, 150 mM NaCl siguiendo el protocolo descrito en *Kubben et al., 2010*. Tras centrifugación, el material soluble fue purificado con columnas Gravity flow Strep-Tactin MacroPrep (IBA, 2-1506-550) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas por Western Blot. En el caso de muestras *crosslinked* se procedió a un proceso de decrosslinking (100°C durante 25 minutos) previo al análisis por Western Blot.

LS-MS/MS

Para el análisis por LS-MS/MS se realizaron purificaciones de los complejos asociados a N-Cadherina y N-Cadherina $\Delta\beta$ Cat siguiendo el protocolo anteriormente descrito para muestras *crosslinked*. Para cada condición se llevaron a cabo 4 purificaciones de muestras provenientes de un total de 100 embriones de pollo. El tampón de elución fue eliminado y las diferentes purificaciones concentradas en *stacking gel* mediante SDS-PAGE. El análisis por LS-MS/MS y la identificación de las proteínas asociadas fue realizado por la Plataforma de Proteómica del Parc Científic de Barcelona (<http://www.pcb.ub.es/plataforma/proteomica>).

Inmunotinciones

Para la inmunocitoquímica, las células fueron fijadas en 4% de paraformaldehído durante 15 minutos, permeabilizadas con PBT (Triton 0.1%) durante 10 minutos y

lavadas con el tampón PBS-BSA (PBS 1X, 0.1% de TX-100, 0.05% de Azida, 0.5% de BSA). Las muestras fueron incubadas a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios durante una noche y a T^a ambiente durante 2 horas con los anticuerpos secundarios. Posteriormente se marcaron con Hoechst, To-PRO3 o Phalloidin si correspondía. Para la inmunohistoquímica de tubo neural de pollo, los embriones se fijaron de 2 a 4 horas en 4% de paraformaldehído y luego se incluyeron en boques de 5% de agarosa y 10% de sacarosa en PBS. Los bloques fueron procesados en vibratomo (VT 1000S, Leica) para obtener secciones de 40-60 µm. La inmunohistoquímica se realizó con el mismo procedimiento descrito anteriormente para inmunocitoquímica. En ambos casos las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal SPE, SP2 o SP5 (Laser-spectral scanning confocal, Leica) y luego procesada con Adobe Photoshop CS5 o ImageJ software (National Institutes of Health).

Análisis cuantitativo de imágenes.

La cantidad relativa de N-Cadherina, Zo-1 y aPKC en el polo apical de las células sβ-Catenina+ fueron comparadas con células no transfectadas de la misma sección de tubo neural. La imágenes de confocal fueron adquiridas usando el microscopio confocal SP5 (Laser-spectral scanning confocal, Leica) y la proyección máxima de 3 secciones consecutivas (2 µm total Z) fue cuantificada por ImageJ software (National Institutes of Health). Todas las imágenes fueron convertidas a 32 bits, el fondo fue sustraído y los *thresholds* originales se establecieron con el fondo como NaN (no un número). Finalmente la media del *grey value* fue cuantificada en el complejo apical. De 5-9 imágenes fueron usadas para calcular el valor medio por embrión. El diagrama de barras representa la media ± SD (desviación estándar) de 6 embriones diferentes por condición experimental.

Incorporación de BrdU e inmunohistoquímica.

Para los ensayo de proliferación en los embriones de pollo, la BrdU fue inyectada 2 horas antes de la fijación durante 2-4 horas en paraformaldehído al 4%. Las secciones obtenidas de vibratomo (40 µm) fueron incubadas por 30 minutos en 2N HCl y luego lavadas con 0.1M Na₂B₄O₇ [pH 8.5]. Después de varios lavados con PBS-BSA las secciones fueron incubadas con anticuerpos primarios contra BrdU y N-Cadherina y los correspondientes secundarios conjugados con Alexa. Después de la tinción, las secciones fueron montadas para ser examinadas en el microscopio confocal Leica SP5.

Citometría de flujo (Fluorescence Associated Cell Sorting (FACS))

Los embriones se electroporaron con los constructos a estudiar y los tubos neurales se diseccionaron bajo un microscopio binocular de fluorescencia 24 o 48 horas después

de la electroporación según el experimento. La suspensión celular se obtuvo a través de la digestión de los tubos neurales en tripsina-EDTA (Sigma) durante 10-15 minutos. La fluorescencia emitida por Hoechst en las células GFP+ fue determinada por el citómetro *MoFlo* (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) y el contenido de DNA celular se analizó (análisis Ploidía) con el software *Multiciclo* (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Al menos se realizaron tres experimentos independientes usando 6-8 embriones por condición.

Cell sorting

Embriones de pollo HH12 fueron electroporados con β -Catenin o control (pCIG) a lo largo del eje rostro-caudal (8 por condición). 24hpe las regiones GFP+ de tubo neural fueron diseccionadas y tratadas con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) durante 10–15 minutos. La suspensión celular obtenida fue filtrada y procesada por FACS Aria III (BD) para obtener una suspensión celular purificada de células GFP+.

Análisis del número de divisiones usando *CellTrace Violet*

Para evaluar el número medio de divisiones en los progenitores del tubo neural usamos *CellTrace Violet Cell Proliferation Kit* de Invitrogen, una molécula acoplada a un fluoróforo (405/450 nm; excitación/emisión) retenida en el citoplasma de las células, que se va diluyendo a medida que las células se dividen. El *CellTrace Violet* fue inyectado en el lumen del tubo neural en el momento de la electroporación con los constructos a estudiar. Los tubos neurales de los embriones electroporados se diseccionaron bajo un microscopio binocular de fluorescencia 24 o 48 horas después de la electroporación según el experimento y digeridos con Tripsina-EDTA (Sigma) durante 10-15 minutos. La intensidad de la fluorescencia del *CellTrace Violet* (405/450 nm) en las células GFP+ fue medida con el citómetro *MoFlo* (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) Los datos representan la intensidad media del *CellTrace Violet* \pm SD (desviación estándar) de 10 embriones por condición experimental.

Real-Time PCR

El RNA total de una población de células GFP+ previamente purificadas por *cell sorting* (50000 células por condición) se purificó con el kit de purificación (RNeasy® Micro Kit de Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA y la concentración se analizó mediante NanoDrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, ThermoScientific). Posteriormente se retro-transcribieron cantidades equivalentes de RNA con la transcriptasa reversa Omniscript (Qiagen) y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *MyiQ Single Colour Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad usando *SYBR Green* de Bio-Rad.

Los oligonucleótidos usados fueron:

<i>PRKCI</i>	F: ttccagtctgggtcttcagg	R: gcaagagtgcagtccaaca
<i>PRKCZ</i>	F: ccagaagatggaggaagctg	R: ttgcaggtcagtggaacaag
<i>GAPDH</i>	F: cctctctggcaaagtccaag	R: catctgcccatttgatgttg
<i>ACTB</i>	F: gatgaagcccagagcaaaaag	R: ggggtgttgaaggtctcaaa

Los oligonucleótidos específicos contra GAPDH y β -Actin (*ACTB*) fueron usados para normalización.

Ensayos de Luciferasa

Los plásmidos reporteros Sox2-Luciferasa (Saade et al., 2013), NeuroD-Luciferasa (Huang et al., 2000) o TopFlash (Promega) se coelectroporaron con el vector constitutivo Renilla (Promega) y un exceso de seis veces los constructos a estudiar. Los embriones de pollo fueron electroporados (10 por condición) a lo largo del eje dorso-ventral (romboencéfalo y medula espinal) del tubo neural y se diseccionaron 24 o 48 horas después de la transfección según el experimento. La lisis y la preparación de muestras se hizo según las instrucciones del fabricante del kit Dual-Luciferase Assay System de Promega (Madison, WI). La actividad luciferasa y renilla se analizaron con un luminómetro *Orion II Microplate Luminometer* de Berthold. Los datos de luciferasa fueron normalizados con los de renilla y se representaron las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism (Motulsky 1999). Los datos cuantitativos se expresan como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias se analizaron mediante una ANOVA seguida de un Test de Tukey. En todos los casos se estableció un grado de significancia <0.05 (límite de confianza mayor al 95%).

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Aberle H, et al. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *Journal of Cell Science*. 107 (Pt 12), 3655-3663.

Afonso C, Henrique D (2006) PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. *J Cell Sci* 119:4293–4304.

Álvarez-Medina R, Le Dreau G, Ros M & Marti E. (2009). Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development*. 136, 3301–3309.

Apodaca G, Gallo LI, Bryant DM. (2012) Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat Cell Biol*. 14(12):1235-43.

Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ, Prehoda KE.(2007). Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J Cell Sci*. 120:3200-3206.

Balendran A, Biondi RM, Cheung PC, Casamayor A, Deak M, Alessi DR. (2000). A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J. Biol. Chem*. 275 (27): 20806–13.

Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 449(7165):1003-7.

Bastola, D. R., Pahwa, G. S., Lin, M. F., and Cheng, P. W. (2002) *Mol. Cell.Biochem*. 236, 75–81.

Baum, B. and Georgiou, M. (2011) 'Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling', *J Cell Biol* 192(6): 907-17.

Benjamin JM, Kwiatkowski AV, Yang C, Korobova F, Pokutta S, Svitkina T, et al. (2010) AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 189(2):339-52.

Bjorklund P, Svedlund J, Olsson AK, Akerstrom G, Westin G. (2009). The internally truncated LRP5 receptor presents a therapeutic target in breast cancer. *PLoS One* 4: e4243.

Briscoe, J. and Ericson, J.(2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr.Opin. Neurobiol*. 11, 43-49.

Butts T, Green MJ, Wingate RJ. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. *Development*. 141(21):4031-41.

Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen JL, Stamnes M, McNiven MA. (2005). Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat Cell Biol.* 7(5):483-92.

Carmosino M, Valenti G, Caplan M, Svelto M. (2009). Polarized traffic towards the cell surface: how to find the route. *Biol Cell*;102:75–91.

Catimel B, Rothacker J, Catimel J, Faux M, Ross J, Connolly L, Clippingdale A, Burgess AW, Nice E. (2005). Biosensor-based micro-affinity purification for the proteomic analysis of protein complexes. *J Proteome Res.* 4(5):1646-56.

Chen, Y. T., Stewart, D. B. and Nelson, W. J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells', *J Cell Biol* 144(4): 687-99.

Clements WM, Lowy AM, Groden J. (2003). Adenomatous polyposis coli/beta-catenin interaction and downstream targets: altered gene expression in gastrointestinal tumors. *Clin Colorectal Cancer.* 3: 113–120.

Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, et al. (2006). Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle.* 5:2666–2670.

Cohen D, Müsch A, Rodriguez-Boulán E.(2001). Selective control of basolateral membrane protein polarity by cdc42. *Traffic.* 2:556–564.

Cong F, Zhang J, Pao W, Zhou P, Varmus H (2003) A protein knockdown strategy to study the function of beta-catenin in tumorigenesis. *BMC Mol Biol* 4: 10.

Cowan CR, Hyman AA.(2004). Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:427-453.

Crail HW. (1949). Multiple primary malignancies arising in rectum, brain, and thyroid:report of a case. *US Naval Med Bull.* 49:123-8.

Das RM, Storey KG. (2012). Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube. *EMBO Rep.* 13(5):448-54.

Das RM, Storey KG. (2014) Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis.*Science.* Jan 10;343(6167):200-4.

Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 10;163(3):525-34.

Deka J, et al. (2010). Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas. *Cancer Res* 70: 6619–6628.

Dickinson DJ, Nelson WJ, Weis WI (2011) A polarized epithelium organized by beta- and alpha-catenin predates cadherin and metazoan origins. *Science*. 331: 1336–1339.

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123: 903–915.

D'Souza-Schorey C, Chavrier P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(5):347-58.

Duffield A, Caplan MJ, Muth TR. (2008). Protein trafficking in polarized cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 270:145–179.

Eklof Spink K, Fridman SG, Weis WI (2001) Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *EMBO J*. 20: 6203–6212.

El Sayegh TY, Arora PD, Laschinger CA, Lee W, Morrison C, Overall CM, Kapus A, McCulloch CA. (2004). Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J Cell Sci*. 1;117(21):5117-31.

Ellison DW, et al. (2011). Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*. 29(11):1400-7.

Ellison DW, et al. (2011b). Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 121(3):381-96.

Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, et al. (2005). Beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* 23:7951-7957.

Ellison DW. (2010). Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol*. 120(3):305-16.

Etienne-Manneville S. (2004). Cdc42 – the centre of polarity. *J Cell Sci* . 117:1291–1300.

Fattet S, et al. (2009). Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol*. 218(1):86-94.

Frank AJ. et al. (2004). The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma. *Brain Res Mol Brain Res*. 121:137–140.

Freeze, H.H., and Kranz, C. (2010). Endoglycosidase and glycoamidase release of Nlinked glycans. *Curr Protoc Immunol* Chapter 8, Unit8.15.1–Unit8.15.25.

Fucini, R. V., Chen, J. L., Sharma, C., Kessels, M. M. & Stamnes, M. (2002). Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol. Biol. Cell* 13,621–631.

Galli M., Munoz J, Portegijs V, Boxem M, Grill SW, Heck AJ et al.(2011). aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nature cell biology* 13: 1132-1138.

Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12, 493-504.

Georgiou M, Marinari E, Burden J, Baum B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol*. Nov 11;18(21):1631-8.

Ghosh S, et al. (2008). Instructive role of aPKCzeta subcellular localization in the assembly of adherens junctions in neural progenitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 335–340.

Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C et al (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468: 1095-1099.

Gilbert SF. (2000). *Developmental Biology* -- NCBI Bookshelf. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dbio>.

Gotz M, Huttner WB. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777–788.

Goulding M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci*. 10(7):507-18.

Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. (2000). Crystalstructure of a beta-catenin/TCF complex. *Cell* 103: 885–896.

Gupta IR, et al. (2013).ARHGDI A: a novel gene implicated in nephrotic syndrome. *J Med Genet*. 50(5): 330–338.

Hamilton SR, et al. (1995). The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*.332(13):839-47.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hansen SD, Kwiatkowski AV, Ouyang CY, Liu H, Pokutta S, Watkins SC, et al. (2013) Alpha-E-catenin actin-binding domain alters actin filament conformation and regulates binding of nucleation and disassembly factors. *Mol Biol Cell* 24: 3710–372.

Hao Y, Du Q, Chen X, Zheng Z, Balsbaugh JL, Maitra S et al (2010). Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Current biology*. 20: 1809-1818.

Harris TJ, Peifer M. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 183:1129–1143.

Hazan RB, Kang L, Roe S, Borgen PI, Rimm DL. (1997). Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem*. 19;272(51):32448-53.

Helwani FM, Kovacs EM, Paterson AD, Verma S, Ali RG, Fanning AS, Weed SA, Yap AS. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *JCB*. 164 (6): 899.

Hemmati HD, et al. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15178–15183.

Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ (1994) Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 25: 1327–1340.

Hitoshi S, et al. (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev*. 18, 1806–1811.

Horikoshi Y, et al. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J. Cell Sci*. 122: 1595–1606.

Huang, HP, et al. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Molecular and cellular biology*. 20, 3292-3307.

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90:871–882.

Huber AH, Weis WI. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105: 391–402.

Hur EM, Zhou FQ (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 11: 539–551.

Ireton RC, et al. (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J. Cell Biol.*, 159, 465.

Kawajiri A, et al. (2000). Identification of a Novel β -Catenin-Interacting Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 712–717.

Kawauchi D, et al. (2012). A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer cell* 21, 168-180.

Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS.(1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 52(3):311-20.

Kho AT, Zhao Q, Cai Z, et al. (2004). Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. *Genes Dev.* 18: 629–640.

Kim S, Walsh CA. (2007). Numb, neurogenesis and epithelial polarity. *Nat Neurosci.* 10(7):812-3.

Kinzler K W, Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.

Kondo T, Raff M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289, 1754–1757.

Konno D, et al. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature Cell Biol* 10,93–101 (2008).

Kool M, et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 123(4):473-84.

Kosodo Y, et al. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* 23, 2314–2324.

Kosodo Y, et al. (2008). Cytokinesis of neuroepithelial cells can divide their basal process before anaphase. *EMBO J.* 27, 3151-3163.

Kozlowski C, et al. (2007). Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell* 129, 499–510.

Kraut R, et al. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50–55.

Kroschewski R, et al. (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol*;1:8–13.

Kubben N, et al. (2010). Identification of differential protein interactors of lamin A and progerin. *Nucleus*. 1(6):513-25.

Kusne Y, et al. (2014). Targeting aPKC disables oncogenic signaling by both the EGFR and the proinflammatory cytokine TNF α in glioblastoma. *Sci Signal*. 7(338):ra75.

Kwiatkowsk AV, et al. (2010). In vitro and in vivo reconstitution of the cadherin-catenin-actin complex from *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:14591–14596.

Lathia JD, et al. (2007). Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J.Comp. Neurol*. 505, 630-643.

Lawrence PA, Morata G. (1976) Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene *Developmental biology*. Vol. 50, No. 2, pp. 321-37.

Le Dréau G, Martí E. (2012). Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Dev Neurobiol*. 72(12):1471-81.

Lecuit T, Lenne PF. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 8: 633-644.

Lee, A., et al. (2005). Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat. Neurosci*. 8, 723-729.

Lee, J., et al (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 9, 391–403.

Lévy L, Wei Y, Labalette C, Wu Y, Renard CA, Buendia MA, Neuvet C. (2004). Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-TCF4 interaction. *Mol Cell Biol*. 24: 3404–3414.

Liu W, et al. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating β -catenin/TCF signalling. *Nature Genet*. 26, 146–147.

Llimargas M, Casanova J (2010). Apical constriction and invagination: a very self-reliant couple. *Developmental biology* 344: 4-6.

Lu, Y., Lin, C. & Wang, X. (2009). PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic acids research*. 37, e141.

Luna A, et al. (2002). Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol. Biol. Cell* 13, 866–879.

- Lyashenko N, Winter M, Migliorini D, Biechele T, Moon RT, Hartmann C. (2011). Differential requirement for the dual functions of β -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol.* 13: 753–761.
- Marthiens V, French-Constant C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Report.* 10(5): 515–520.
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell.* 128(2):383-97.
- Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature reviews Cancer.* 12: 23-38.
- Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Egea G. (2004). Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic.* 5, 838–846.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66–71.
- Meder D, Shevchenko A, Simons K, Fullekrug J. (2005). Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *J Cell Biol.* 168:303-313.
- Messier PE, Auclair C. (1974). Effect of cytochalasin B on interkinetic nuclear migration in the chick embryo. *Dev. Biol.* 36, 218-223.
- Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. (2004). Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development.* 131(14):3401-10.
- Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M (2007) Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5668–5673.
- Morin PJ, et al. (1997). Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science.* 275, 1787–1790.
- Morin X, Jaouen F, Durbec P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature Neurosci.* 10,1440–1448.
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K. (2006). Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell.* 125: 327–341.

Munro E, Nance J, Priess JR.(2004). Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell*. 7:413-424.

Munro EM.(2006). PAR proteins and the cytoskeleton: a marriage of equals. *Curr Opin Cell Biol*. 18:86-94.

Müsch A, Cohen D, Kreitzer G, Rodriguez-Boulan E. (2001). Cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *EMBO J*.20, 2171–2179.

Northcott PA, et al. (2011). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 29(11):1408-14.

Nusse R, Varmus HE. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99–109.

Oceguera-Yanez F, Kimura K, Yasuda S, Higashida C, Kitamura T, Hiraoka Y, Haraguchi T, Narumiya SJ. (2005). Cell Biol. Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. 17;168(2):221-32.

Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. (2004). Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 42, 885–888.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*. 112 (8):1237-45.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. 8(6):1711-7.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(11):4246-50.

Pei Y, et al (2012b). WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development*. 139(10):1724-33.

Pei Y, et al. (2012). An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell*. 14;21(2):155-67.

Peng X, Cuff LE, Lawton CD, DeMali KA. (2010). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin . *J Cell Sci*. 123(4):567-77.

Perry A, Brat DJ, (2010). *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach: A Volume in the Pattern Recognition Series*. Elsevier Health Sciences.

Peyre E, Jaouen F, Saadaoui M, Haren L, Merdes A, Durbec P, Morin X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J Cell Biol.*193(1):141-54.

Pfister SM, et al. (2010). Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol.* 120(5):553-66.

Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG. (2001). Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 276: 20436–20443.

Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature.* 415:436–442.

Poschl J, et al.(2014). Wnt/beta-catenin signaling inhibits the Shh pathway and impairs tumor growth in Shh-dependent medulloblastoma. *Acta neuropathologica* 127, 605-607.

Reya T, Clevers H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 14;434(7035):843-50.

Reya T, et al. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Riggleman B, Schedl P, Wieschaus E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell.* 63: 549–560.

Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8813–8817.

Robinson G, et al., (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature.* 488 (7409):43-8.

Ropper AH, Samuels MA. (2009). Ch. 31. Intracranial Neoplasms and Paraneoplastic Disorders. *Adams and Victor's Principles of Neurology* (9e ed.).

Rouso DL, Pearson CA, Gaber ZB, Miquelajauregui A, Li S, Portera-Cailliau C, Morrisey EE, Novitsch BG. (2012). Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron.* 74(2):314-30.

Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* 275: 1790–1792.

Saade M, Gutierrez-Vallejo I, Le Dreau G, Rabadan MA, Miguez DG, Buceta J et al (2013). Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell reports.* 4:492-503.

Sabherwal N, et al. (2009). The apicobasal polarity kinase aPKC functions as a nuclear determinant and regulates cell proliferation and fate during *Xenopus* primary neurogenesis. *Development*. 136, 2767–2777.

Sabherwal N, Thuret R, Lea R, Stanley P, Papalopulu N. (2014). aPKC phosphorylates p27^{Xic1}, providing a mechanistic link between apicobasal polarity and cell-cycle control. *Dev Cell*. 31(5):559-71.

Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, Hinds TR, Kimelman D, Xu W. (2006). Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/TCF4 complex. *Mol Cell*. 24: 293–300.

Sanada K, Tsai LH. (2005). G protein $\beta\gamma$ subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell*. 122, 119–131.

Sato K, Watanabe T, Wang S, Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T et al. (2011). Numb controls Ecadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Molecular biology of the cell*. 22: 3103-3119.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 459(7244):262-5.

Sawyer JM, Harrell JR, Shemer G, Sullivan-Brown J, Roh-Johnson M, Goldstein B. (2010). Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Developmental biology*. 341: 5-19.

Schaefer M, et al. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell*. 107, 183–194.

Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG et al. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell*. 14: 123-134.

Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR. (2012). Specific armadillo repeat sequences facilitate β -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J Biol Chem*. 287:819–831.

Sharma RP, Chopra VL. (1976). Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 48(2):461-5.

Siegfried E, Wilder EL, Perrimon N. (1994). Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature*. 367: 76–80.

Siller KH, Doe CQ. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature cell biology*. 11: 365-374.

Simske JS, et al. (2003). The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. *Nat. Cell Biol.* 5:619–625.

Singh SK, et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432, 396–401.

Solanas G, et al. (2004), Beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *J Biol Chem*. 279:49849–49856.

Stamnes M. (2002). Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol*. 14(4):428-33.

Stanley P. (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 262: 1734–1737.

Subauste MC, Nalbant P, Adamson ED, Hahn KM. Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2. *J Biol Chem*. 280(7):5676-81.

Tabori U. et al. (2010). Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. *J Clin Oncol*. 28:1345–1350.

Taipale J, Beachy PA. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 17;411(6835):349-54.

Takahashi K, et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5): 861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 (4): 663-676.

Tang VW, Brieher WM. (2012). α -Actinin-4/FSGS1 is required for Arp2/3-dependent actin assembly at the adherens junction. *J Cell Biol*. 9;196(1):115-30.

Taverna E, Huttner WB. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*. 67, 906-914.

Taylor MD, et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 123(4):465-72.

Temple S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.

Thompson MC, et al. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 24:1924–1931.

Tinkle CL, et al. (2008). New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:15405–15410.

Tisdale EJ. (2001). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* Jan 26;276(4):2480-6.

Tisdale EJ. (2002). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C α / λ and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 1;277(5):3334-41.

Torres J, Pulido R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 993–998.

Valenta T, Gay M, Steiner S, Draganova K, Zemke M, Hoffmans R, Cinelli P, Aguet M, Sommer L, Basler K. (2011). Probing transcription-specific outputs of β -catenin in vivo. *Genes Dev.* 25:2631–2643.

Vallee RB, Tsai JW (2006). The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes & development.* 20: 1384-1393.

van Beest M, Dooijes D, van De Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, Clevers H (2000) Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem.* 275: 27266–27273.

van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell.* 88: 789–799.

Vega-Salas DE, Salas PJ, Rodriguez-Boulan E. (1987). Modulation of the expression of an apical plasma membrane protein of Madin-Darby canine kidney epithelial cells: cell–cell interactions control the appearance of a novel intracellular storage compartment. *J Cell Biol* 1987 104:1249-1259.

Wahl JK, et al. (2003). N-cadherin-catenin complexes form prior to cleavage of the proregion and transport to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278: 17269-17276.

Walder S, Ferretti P. (2004). Distinct neural precursors in the developing human spinal cord. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 671–674.

Watts JL, Etemad-Moghadam B, Guo S, Boyd L, Draper BW, Mello CC, Priess JR, Kemphues KJ. (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):3133-40.

Weiss S, et al. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci*. 16, 7599–7609.

Weisz OA, Rodriguez-Boulan E.(2009). Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci*. 122:4253–4266.

Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. (2001). Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res*. 61:513–516.

Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Jürgens G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Roux Arch Dev Biol*. 193: 296–387.

Wieschaus E, Riggelman R. (1987). Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*. 49: 177–184.

Wilcock AC, Swedlow JR, Storey KG. (2007). Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development*. 134: 1943–1954.

Wodarz A. (2005). Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol*. 17(5):475-81.

Wodarz A. et al. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 402, 544–547.

Wolf D, Rodova M, Miska EA, Calvet JP, Kouzarides T. (2002). Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J Biol Chem*. 277: 25562–25567.

Wolff K, et al (2008). Ch. 127. Neoplasias and Hyperplasias of Muscular and Neural Origin. *Dermatology in General Medicine* (7e ed.). McGraw-Hill Medical.

Wu H. et al. (2007). PDZ domains of Par3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol.Cell* 28:886–898

Xu G, Craig AW, Greer P, Miller M, Anastasiadis PZ, Lilien J, Balsamo J. (2004). Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J Cell Sci*. 117(15): 3207–3219.

Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889–901.

Yan Q, Sun W, Kujala P, Lotfi Y, Vida TA, Bean AJ.(2005).CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol Biol Cell*. 16(5):2470-82.

Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C,Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A,Hsieh JC, He X. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*. 135:367–375.

Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee HT, Colman H,Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, Sawaya R, Xie K, Yung WK, Medema RH, He X, Huang S. (2011). FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*. 20:427–442.

Zhong W, Chia W. (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol*. 18: 4–11

Zhu L., et al. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*. 29;457(7229):603-7.

Zigman M, Cayouette M, Charalambous C, Schleiffer A, Hoeller O, Dunican D et al (2005). Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron* 48: 539-545.