



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel de la vinculina en la migración nuclear intercinética durante el desarrollo del tubo neural de pollo

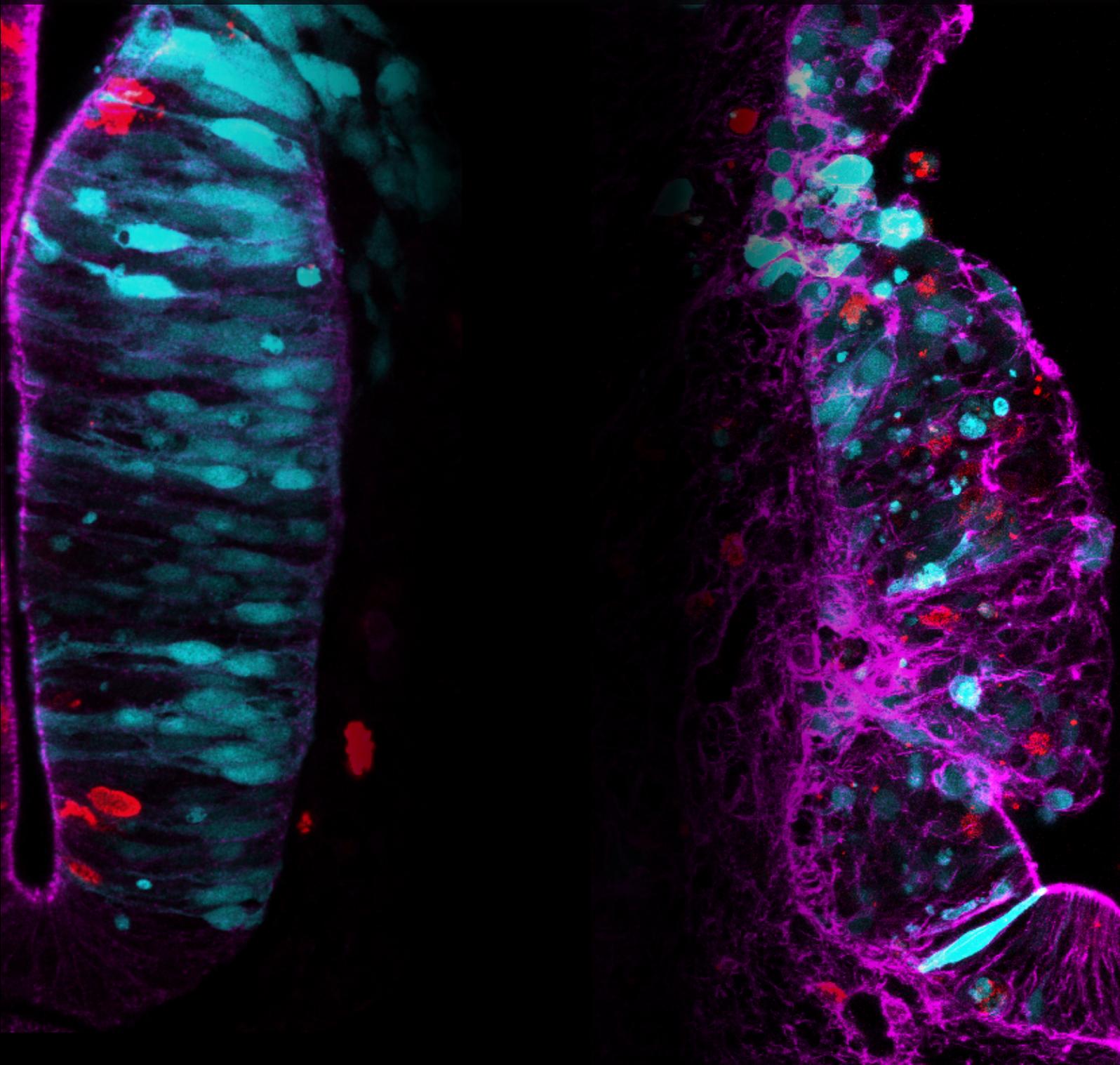
Andrea Ochoa Alcalá

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.

Papel de la vinculina en la migración nuclear intercinética durante el desarrollo del tubo neural de pollo



Andrea Ochoa Alcalá
Barcelona, 2020

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

2020



PAPEL DE LA VINCULINA EN LA MIGRACIÓN NUCLEAR INTERCINÉTICA DURANTE EL DESARROLLO DEL TUBO NEURAL DE POLLO

Memoria presentada por

Andrea Ochoa Alcalá

para optar al título de

Doctora por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Sebastián Pons Fuxà y el Dr. Antonio Herrera Camacho en el
Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

DIRECTOR

CO-DIRECTOR

TUTOR

Sebastián Pons Fuxà

Antonio Herrera Camacho

Oriol Bachs Valldeneu

DOCTORANDA

Andrea Ochoa Alcalá

“Life isn't about finding yourself. Life is about creating yourself”

George Bernard Shaw

AGRADECIMIENTOS

Y de repente, después de 4 años y medio de duro trabajo, con una pandemia incluida, llegó el momento de escribir los agradecimientos. Han sido unos años de mucho trabajo e ilusión en el que además de adquirir diferentes habilidades he podido conocer a gente increíble y afianzar mi relación con mis contactos más duraderos. Viene a mi mente todo el trabajo y las horas en el laboratorio con mis compañeros, pero también cervezas, muchas, muchas cervezas.... Aunque es difícil mencionar a todas esas personas que han contribuido a la realización de esta tesis, no quiero dejar de agradecer a las personas más importantes que de manera directa o indirecta han colaborado a que finalmente me tengáis que llamar Dra. Ochoa. A todos vosotros os dedico esta tesis.

Para empezar, como no podía ser de otra manera, a mis padres. Por apoyarme en todos mis objetivos desde el principio de los tiempos, aunque ni ellos ni yo tuviéramos claro cuál era el camino correcto: “lo que tú hagas estará bien”. Por todo vuestro amor y cariño, por mostrarme la importancia del trabajo duro, por no dejarme tirar nunca la toalla y no dejar de animarme en mis nuevas metas. Por hacerle entender a todo el mundo que no estoy “estudiando” y por no dejar de cuidarme ni un momento durante estos 28 años. A mi hermano por estar tan pendiente durante el confinamiento haciendo todas las tareas de la casa posibles (jijiji) y por siempre estar dispuesto a ayudarme. y por supuesto también a mi abuelo, por estar tan pendiente y siempre preguntarme como iba la escritura de “el libro ese”. Gracias.

A mis amigas de toda la vida Esther y Andrea, por interesarse siempre en mi tesis y escucharme, aunque fuera difícil de entender. Especial mención a Vero. Por siempre haber estado ahí, porque desde aquel día en el patio del colegio cuando fuiste la única que dejó al grupo de “amigas” que no quería jugar conmigo para irnos las dos solas por ahí. En ese momento supe que esta amistad duraría para siempre. Y saber que, aunque apenas hablemos en la distancia pero que cuando llego a Mallorca siempre tienes mil huecos para mí es una sensación inexplicable. Y por supuesto gracias por todo tu apoyo durante el confinamiento.

A mis amigos de la carrera. A Patri, por todos esos buenos momentos en Mallorca, Madrid y finalmente Barcelona, donde empezamos juntas esta aventura, con nervios y dudas. Por tirar hacia delante juntas, apoyándonos en los buenos y, sobretodo, en los malos momentos (ha habido mucho de todo) como sólo las buenas amigas pueden hacerlo. Gracias por esos tres años y medio de convivencia, por toda esa ayuda, apoyo y comprensión, por esas vacaciones en casa donde no

hemos dejado de vernos, las risas, las cervezas, los cotilleos, las sesiones de risoterapia en el sofá y por estar siempre ahí. A Raquel, por comenzar en la ciencia juntas, por esa bonita casualidad que te llevó a ser mi primera compañera de laboratorio, aunque pensaras que al principio te miraba mal, cosa que jamás haría. Gracias por la convivencia en Madrid, por esas, conexiones con NY a horas extrañas y sobre todo gracias por el confinamiento. Nunca pensé que acabaría escribiendo la tesis a tu lado, todos los días de confinamiento por Skype, como en los viejos tiempos de biblioteca en la UIB donde se nos pasaron los días, meses y años. Las últimas semanas me ha costado trabajar sin ti jajajaja. A Alberto, que me ayudó a elegir carrera y con el que empecé a aprender los secretos de la poyata siendo mi “marido” en el laboratorio en la UIB. Por todos estos años, por el año en Madrid y por esa distancia que a menudo se hace larga entre Madrid y Barcelona pero que cuando nos encontramos, desaparece. Al final la vida da muchas vueltas, pero parece que las nuestras siguen, al menos, laboralmente en la misma dirección. A Lida, por descubrirme y guiarme en el mundo de los ensayos clínicos, por ese apoyo e interés durante la tesis. A Pere, por siempre interesarse en la progresión del proyecto y no dejar pasar la oportunidad de dar algún consejo experimental y personal. Finalmente, a Borràs, por ser a la vez, mi mejor y peor influencia. Por enseñarme a disfrutar un poco más la buena vida y a no conformarme con lo que tengo. Por ser mi guía en el mundo de la empresa y darme a conocer que hay más mundo más allá de la poyata, por estar siempre ahí y por este confinamiento en Mallorca, que nos ha hecho revivir los viejos tiempos, esta vez con algo más de dinero.

A Marta, mi compi de máster, por esas buenas conversaciones después de meses sin hablar y por esta bonita relación, aunque nos veamos como máximo una vez al año. Gracias por ayudarme en esta etapa que empezaremos en octubre, también en la distancia. ¡Nos vemos en tu tesis!

A todos mis compañeros del IBMB. Especialmente a mi súper grupo de laboratorio, Sebastián, Toni y Jari, porque jamás hubiera imaginado estar tan a gusto trabajando durante 4 años. A Sebastián, por darme esta oportunidad en 2015 cuando me llamaste una mañana y me ofreciste la beca para trabajar en tu grupo, donde tu única pregunta fue cómo me llevaba con mis compañeros de laboratorio en Madrid y si era de Palma. Me parece maravilloso que ambos pasáramos por la UIB, el Cajal y el IBMB, pero con 28 años de diferencia. Muchas gracias por fomentar siempre el buen ambiente en el laboratorio, todo tu apoyo durante estos casi 5 años ya, entre una cosa y otra, por toda esa ayuda y atención. Por ser más un colega que un jefe, mil gracias. A Toni, gracias por todo, porque sin ti esta tesis no sería ni la mitad de lo que es. Gracias por ayudarme en todo momento, aunque eso supusiera dejar de hacer tus cosas o quedarnos hasta las tantas por un experimento, por enseñarme tanto en tan poco tiempo. Por animarme siempre a ser mejor científica y por alguna bronca merecida (sólo alguna, jajajaja). Queda pendiente otro finde de camping para celebrar esto.

Finalmente, a Jari, gracias por ayudarme en todo siempre. Aún me acuerdo el día en que me dijiste: “no sé yo si estaré en el lab cuando deposites, Andrea”, en ese momento casi me dio un infarto sólo de imaginarme lo que sería estar en el laboratorio sin ti. Menos mal que ese momento nunca llegó. Gracias por convertirte en una de mis mejores amigas, por compartir tantas cosas tanto dentro como fuera del laboratorio y por todas esas... digamos... llamadas de atención por ser desordenada... has conseguido que para mí estar en el laboratorio sea como estar en casa. ¡¡¡No sé qué voy a hacer en mi próximo trabajo sin ti!!!

Gracias a toda la gente genial del IBMB con la que he podido coincidir. A Elena y a todo el equipo de la plataforma de microscopía, por toda su ayuda durante estos 4 años y por todas los videos que hemos hecho que han sido fundamentales para esta tesis. A Elisa y a todo su laboratorio por siempre tener un hueco para mí. Gracias a Gwen, Murielle, Lucía, Elena, Susana y Jose, gracias por todos los reactivos prestados durante estos cuatro años, por sus grandes consejos y mensajes de ánimo en todas las sesiones de vibrátomo y confocal!! Al laboratorio de Mariona, por proporcionarme el mejor anticuerpo contra vinculina usado en esta tesis y especialmente a Isa, por esas charlas que han ido aumentando en los pasillos a lo largo del tiempo, por esos grandes consejos para la finalización de la tesis y la inmersión en el nuevo mundo laboral. A Joan, a Marta y a su laboratorio, por todos estos años compartiendo laboratorio, ha sido un placer. Especialmente a Ettore y Anni, gracias sobre todo por soportarnos, hemos intentado ser poco ruidosos, lo prometemos. Gracias por esa compañía y por estar ahí siempre que lo hemos necesitado. Evidentemente no me olvido de Nuria, para ella un apartado especial :). Gracias Nuria, por estar ahí para hablar siempre de cualquiera cosa, por apoyarme en los momentos difíciles y por compartir todo el estrés de fin de tesis conmigo y por hacerme ver que siempre se puede estar más estresada que yo XD. Sin duda los fines de semana trabajando juntas y viendo las galas de OT, agilizaron mucho el camino. Aunque ha sido raro acabar la tesis a distancia, sin duda te he tenido presente siempre con nuestros audios infinitos y con nuestros consejos de Illustrator XDD. Gracias por todo, esto ya se acaba.

Gracias a Laura Mariño, Laura del Amo y Soraia, por demostrarme que siempre se puede salir más tarde del laboratorio XDD. Gracias por todas esas vivencias junto con Inés. Por esos viajecitos a Ibiza y Olot, que nos permitieron desconectar de todo por un finde, por todas las cenas y cumpleaños celebrados y por esos mensajes de ánimo en cultivos y por los pasillos. También agradecer a todos esos compañeros del IBMB que de alguna manera u otra habéis interactuado conmigo, ya sea por un anticuerpo, una duda sobre el microscopio o la cantidad de cervezas bebidas en alguna de todas nuestras reuniones. Gracias a María José, Alex, Marco, Mónica, Ismael, Javi, Laura Pastor, Bastian, Simonna, Marta, Aleix, Arkadiusz y muchos otros, por tener siempre unas palabras y una sonrisa para mí.

Como no a Inés, por esa bonita casualidad que nos hizo encontrarte por Facebook antes de llegar a Barcelona. Muchas gracias por toda esa ayuda tanto en el laboratorio como en casa, por estos 4 años y medio de convivencia y de amistad, por todos los buenos y malos momentos, por esos viajes hechos durante este tiempo, los cotilleos, las risas y el ánimo transmitido. Por esas “sesiones de biblio” en casa que han hecho trabajar los fines sea menos doloroso. Mal de muchos, consuelo de tontos como se suele decir XD. Y por supuesto también a Craig, por ser mi compi de piso durante un añito (aunque la mitad haya sido a distancia), gracias por ser siempre tan positivo y generoso y, por interesarte tanto en como llevaba esos días de trabajo continuo en casa, te echaré de menos a ti y a tus conciertos en casa.

También quiero agradecer todo su apoyo a Alba, que, aunque no seas del IBMB me has hecho sentir medio del IRB. Aún recuerdo cuando me explicabas que ibas a empezar en un laboratorio del IRB que casualmente está encima del mío. Desde ahí, los saludos por el pasillo y cultivos se transformaron en cafés, meriendas de la máquina, alguna fiestecilla y en una bonita amistad. Gracias por estar siempre ahí.

Y finalmente a Nacho, una de las personas más importantes de mi vida. Muchas gracias por aparecer en mi camino y por apoyarme y motivarme a avanzar desde el primer momento. Gracias por aguantar mis días malos (que no han sido pocos) y por no perder esa sonrisa y sentido del humor. Aunque ha sido difícil, todo este confinamiento te he sentido muy muy cerca. Gracias por leerte toda la tesis y probablemente haber puesto todos los puntos y coma que hay en ella. Sé que ha sido difícil al no entender mucho del tema y por eso valoro aún más todo el esfuerzo. Gracias por no dejar que me rinda, por quitarle hierro a mis quejas y por apoyarme en la nueva aventura laboral. Te quiero mucho.

RESUMEN

El citoesqueleto de actina es un componente esencial de las células eucariotas que tiene un importante papel en muchas funciones biológicas básicas como el mantenimiento de la morfología, la migración, el tráfico intracelular, la adhesión, la división celular y la migración nuclear intercinética (INM) entre otros. Durante todos estos procesos, la actividad del citoesqueleto de actina está regulada por muchas proteínas conocidas como proteínas unidoras de actina (ABPs). En el tubo neural en desarrollo, los progenitores neurales presentan una polaridad apicobasal y una morfología alargada. El citoesqueleto de actina de estas células se ancla a la membrana apical, a través de las uniones adherentes mediadas por las N-cadherina y a la membrana basal, a través de las adhesiones focales mediadas por integrinas. Los núcleos de estos progenitores neurales adquieren diferentes posiciones a lo largo del eje apicobasal en función de la fase del ciclo en la que se encuentran gracias a un proceso conocido como migración nuclear intercinética (INM), que proporciona al tejido su apariencia pseudoestratificada.

En la presente tesis hemos identificado proteínas unidoras de actina (ABPs) como la α -actinina4, la α -E-catenina, la α -N-catenina, la cortactina, la Dbn1 y la vinculina, que se unen a la N-cadherina a través de su dominio de unión a la β -Catenina en el tubo neural de pollo. Nuestro trabajo se centra en la función de la vinculina durante el desarrollo de este neuroepitelio donde hemos observado que esta ABP se localiza mayoritariamente en las membranas apical y basal del tubo neural. La vinculina es una proteína esencial para la correcta distribución de actina a lo largo del eje apicobasal y para el mantenimiento de la morfología tisular del tubo neural. Además, en nuestro trabajo demostramos que el citoesqueleto de actina y la vinculina participan en la regulación de la INM, especialmente en la migración apical, y en la correcta progresión del ciclo celular de los progenitores neurales del tubo neural de pollo a través de su unión a las moléculas de adhesión.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXXVIII
INTRODUCCIÓN	1
1.Desarrollo del sistema nervioso	3
1.1 Formación del tubo neural	3
1.2 Especificación AP del tubo neural	5
1.3 Especificación DV del tubo neural	6
1.4 Estructura del tubo neural	8
1.5 Polaridad en el neuroepitelio	10
2.Citoesqueleto	13
2.1 Citoesqueleto de microtúbulos	14
2.1.1 <i>Dinámica de los microtúbulos</i>	14
2.1.2 <i>Proteínas unidoras de microtúbulos</i>	17
2.2 Citoesqueleto de actina.....	17
2.2.1 <i>Polimerización de la actina</i>	18
2.2.2 <i>Proteínas unidoras de actina</i>	20
2.2.3 <i>Funciones del citoesqueleto de actina</i>	23
3.Adhesión celular	25
3.1 Adhesiones focales.....	27
3.2 Uniones adherentes	29
4.Ciclo celular	32
4.1 Regulación ciclo celular	36
4.2 Ciclo celular y el citoesqueleto de actina	37
5.Migración nuclear intercinética	40
5.1 Funciones de la INM.....	42
5.2 Movimiento apical.....	44
5.3 Movimiento basal.....	47
5.4 Relación entre la progresión del ciclo celular y la INM	48

6.Vinculina	50
6.1 Estructura y activación de la vinculina	51
6.1.1 Estructura de la vinculina	51
6.1.2 Regulación y activación de la vinculina	53
6.2 La vinculina modula la adhesión y la migración celular	54
6.2.1 La vinculina y las adhesiones focales	54
6.2.2 La vinculina y las uniones adherentes	57
6.3 Función in vivo de la vinculina.....	58
7.Resultados previos del laboratorio	60
OBJETIVOS	65
Objetivo general.....	67
Objetivos concretos.....	67
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1.Embrión de pollo como modelo de experimentación	71
2.Electroporación <i>in ovo</i> de embriones de pollo	71
3.Cultivos celulares	72
4.Electroporación de cultivos celulares.....	72
5.Cultivo de los fibroblastos de pollo (CEFs).....	73
6.Constructos de DNA	73
7.Inmunotinción.....	76
8.RT-qPCR	78
9.Hibridación in situ.....	79
10.Ensayo incorporación EdU	81
11.Citometría de flujo	81
12.Imágenes in vivo	81
13.Adquisición de imágenes	82
14.Cuantificaciones con ImageJ.....	82
15.Análisis estadístico	85
16.Productos y materiales.....	85

RESULTADOS	89
1. La vinculina controla el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio	91
2. La vinculina: expresión y localización	95
3. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en proteínas asociadas al complejo apical	96
4. La vinculina regula la migración nuclear intercinética (INM)	100
4.1 La falta de la vinculina provoca una acumulación basal de núcleos en el tubo neural	100
4.2 La vinculina es importante para la migración basal→apical durante la migración nuclear intercinética.....	101
4.2.1 <i>En condiciones normales el movimiento apical →basal es estocástico mientras que el basal→apical es directo</i>	102
4.2.2 <i>El citoesqueleto de actina es importante en ambos movimientos de la INM</i>	105
4.2.3 <i>La ausencia de la vinculina altera la migración basal→apical de la INM</i>	107
5. La falta de la vinculina produce un retraso en el ciclo celular y una acumulación de células en fase G2	114
5.1 La falta de la vinculina provoca un descenso en el número de células en mitosis	114
5.2 La vinculina es necesaria para la correcta progresión del ciclo celular de la fase S a la M.116	
5.2 La ausencia de la vinculina provoca una menor internalización del centrosoma en G2 ...	119
5.3 La falta de la vinculina provoca una acumulación de células en fase G2	121
6. La vinculina es necesaria para la supervivencia de los progenitores neurales	122
7. La ausencia de la vinculina no promueve una diferenciación neuronal prematura ..	125
8. El efecto de la ausencia de la vinculina sobre el ciclo celular en el neuroepitelio no se reproduce en cultivos celulares	126
9. La sobreexpresión de la vinculina causa un aumento de la actina apical del neuroepitelio	128
9.1 Una sobreexpresión de la vinculina no altera la internalización de los centrosomas	132
10. La VCL-WT, pero no la VCL-A50I rescata el fenotipo de la ausencia de la vinculina	133
DISCUSIÓN	139
1. La vinculina y el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio	141
2. La vinculina y la INM	144
3. La vinculina y el ciclo celular	148
4. Papel de la interacción vinculina/β-catenina en el neuroepitelio	150
CONCLUSIONES	153
REFERENCIAS	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Neurulación primaria.....	5
Figura 2. Desarrollo anatómico del sistema nervioso.	6
Figura 3. Formación del patrón DV y neurogénesis en el tubo neural en desarrollo.	7
Figura 4. Estructura del tubo neural.....	10
Figura 5. Polaridad en el neuroepitelio	13
Figura 6. Estructura de los microtúbulos e inestabilidad dinámica.....	15
Figura 7. Estructura de los centrosomas	17
Figura 8. Polimerización de actina.....	19
Figura 9. Proteínas unidoras de actina	23
Figura 10. Adhesiones celulares	26
Figura 11. Adhesiones focales en el neuroepitelio.....	28
Figura 12. Uniones adherentes en el neuroepitelio	31
Figura 13. Ciclo celular	35
Figura 14. Migración nuclear intercinética.....	41
Figura 15. Modelos de INM.....	48
Figura 16. Estructura de la vinculina y sus interacciones.	52
Figura 17. Conformaciones de la vinculina.....	53
Figura 18. Papel de la vinculina en la migración polarizada.	56
Figura 19. Morfología de embriones de ratón en un estadio E10.5.....	59
Figura 20. Inmuntinción de neurofilamentos de embriones enteros a E10.5.....	59
Figura 21. Identificación de nuevas proteínas que interactúen con el complejo β -Catenina/N-Cadherina implicadas en la formación del complejo apical.	63
Figura 22. Electroporación <i>in ovo</i>	72
Figura 23. Constructos de la vinculina.....	75
Figura 24. Representación del cálculo de la velocidad media durante los vídeos.....	83
Figura 25. Representación del cálculo de la velocidad instantánea durante los vídeos.....	84
Figura 26. Representación del cálculo de la direccionalidad durante los vídeos.	84
Figura 27. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina en el neuroepitelio.	94
Figura 28. La vinculina se expresa en el tubo neural de pollo y se localiza en las membranas apical y basal.	96
Figura 29. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina a partir de las 36 hpe.	97
Figura 30. El efecto de la ausencia de la vinculina en el citoesqueleto de actina no es dependiente del estadio en el que se encuentren los embriones en el momento de la electroporación.	98
Figura 31. La vinculina es esencial para el mantenimiento del complejo apical.	99
Figura 32. El silenciamiento de la vinculina provoca alteraciones en la INM.	101

Figura 33. Diseño experimental de la captura de imágenes <i>in vivo</i> a lo largo del tiempo.	102
Figura 34. Movimiento apical → basal de un núcleo representativo del grupo control	104
Figura 35. Movimiento basal → apical de un núcleo representativo del grupo control	105
Figura 36. Movimiento apical → basal de un núcleo representativo del grupo blebistatina.....	107
Figura 37. Movimiento basal → apical de un núcleo representativo del grupo blebistatina.....	107
Figura 38. Movimiento apical → basal de un núcleo representativo del grupo shVCL.....	109
Figura 39. Movimiento basal → apical de un núcleo representativo del grupo shVCL.....	110
Figura 40. Trayectorias de los núcleos de los progenitores neurales cuantificados	111
Figura 41. Análisis de los parámetros cinéticos durante la INM.....	112
Figura 42. Resumen de la implicación del citoesqueleto de actina de la vinculina de la INM	114
Figura 43. La ausencia de la vinculina provoca una disminución del porcentaje de PH3 ⁺	115
Figura 44. La ausencia de la vinculina provoca una disminución en el porcentaje de mitosis.....	116
Figura 45. La ausencia de la vinculina no altera la fase S pero causa un retraso en el ciclo celular.	118
Figura 46. La ausencia de la vinculina produce un retraso en el ciclo celular.	119
Figura 47. La ausencia de la vinculina causa una menor internalización de los centrosomas de los progenitores neurales	120
Figura 48. La ausencia de la vinculina provoca un aumento en el porcentaje de células con el doble de ADN	121
Figura 49. La vinculina es necesaria para la supervivencia de los progenitores del tubo neural de pollo.	123
Figura 50. La vinculina provoca alteraciones en el ciclo celular y en la INM a pesar de la muerte celular.....	124
Figura 51. La ausencia de la vinculina no provoca alteraciones en la diferenciación de los progenitores neurales.....	125
Figura 52. El sh2VCL contra la vinculina humana disminuye su expresión en HEK293 y HeLa.....	127
Figura 53. La vinculina no participa en la regulación del ciclo celular en líneas celulares	128
Figura 54. Tanto la VCL-WT como la VCL-A50I se expresan en el tubo neural	129
Figura 55. La VCL-WT, pero no la VCL-A50I provoca acumulaciones apicales de actina	130
Figura 56. La VCL-WT, pero la VCL-A50I provoca acumulaciones de proteínas del complejo apical.....	131
Figura 57. La sobreexpresión de la VCL-WT no altera la internalización de los centrosomas.....	133
Figura 58. La VCL-WT y no la VCL-A50I rescata la acumulación de núcleos en la zona basal del neuroepitelio y el descenso del porcentaje de mitosis que provoca el shVCL	135
Figura 59. La VCL-WT y no la VCL-A50I rescata el incremento en células en fase G2 que provoca el shVCL.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

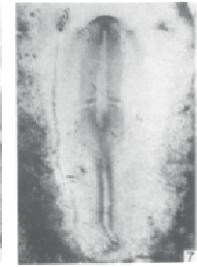
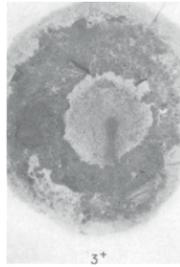
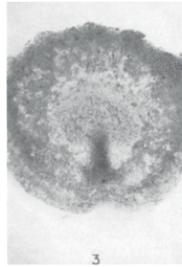
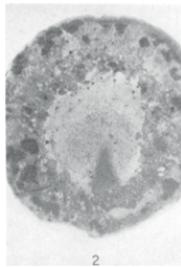
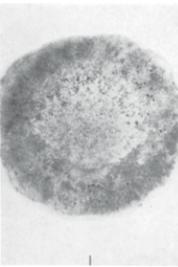
Tabla 1. Cebadores del clonaje de VCL-A50I	74
Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para generar los diferentes shRNAs	75
Tabla 3. Tampones para histología e inmunohistoquímica	76
Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia.....	77
Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia.....	77
Tabla 6. Lista de cebadores para la amplificación en RT-PCR	78
Tabla 7. Anticuerpo utilizado para hibridación <i>in situ</i>	80
Tabla 8. Tampones utilizados durante la hibridación <i>in situ</i>	80
Tabla 9. Productos y materiales utilizados en los métodos.....	85
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la INM en el tubo neural de pollo	117

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ABP	Proteína unidora de actina
ACTN4	Actinina 4
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
AP	Eje anteroposterior
aPKC	Proteína quinasa C atípica
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH	Factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico
BB	Blebistatina
BMP	Proteína morfogénica ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
Casp3	Caspasa 3
CEFs	Fibroblastos de embrión de pollo
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
DBNL	Debrin-like protein
DV	Eje dorsoventral
ECM	Matriz extracelular
F-actina	Filamento de actina
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
G-actina	Actina globular
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanosín trifosfato
HH	Hamburguer y Hamilton
HD	Factor de transcripción de homeodominio
hpe	Horas post-electroporación
INM	Migración nuclear intercinética
kDa	Kilo Dalton
NN	División neurona-neurona
MN	Motoneuronas
MTBP	Proteína de unión a microtúbulos
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
MZ	Zona del manto
PCM	Material pericentriolar

PFA	Paraformaldehído
PH3	Phospho Histona 3
PIP₂	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
PKCα	Proteína quinasa C α
PN	División progenitor-neurona
PP	División progenitor-progenitor
RFP	Proteína fluorescente roja
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR a tiempo real
Sh-RNA	Short hairpin de RNA
Shh	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TA	Temperatura ambiente
UA	Unidades arbitrarias
VCL	Vinculina
VCL-A50I	Mutante de la vinculina que no puede unirse ni a la Talina ni a la β -catenina
VCL-T12	Mutante de la vinculina constitutivamente activo
VCL-WT	Vinculina salvaje
Vh	Cabeza de la vinculina
Vt	Cola de la vinculina
VZ	Zona ventricular
ZO1	Zonula occludens-1
αCat	α Catenina
βCat	β Catenina
γ-TURC	Complejo del anillo de γ -tubulina

INTRODUCCIÓN





1. Desarrollo del sistema nervioso

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas que controla y regula la mayoría de las funciones críticas de los organismos y que está compuesto por una amplia variedad de células nerviosas. El sistema nervioso se subdivide en dos divisiones principales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNP está constituido por neuronas sensoriales que se encargan de recibir estímulos tanto internos como externos, y proporciona la información al SNC, donde se procesan todos los mensajes neuronales entrantes y se generan las respuestas correspondientes. Para que la formación del sistema nervioso sea funcional, es necesario que los diferentes tipos de células nerviosas se generen en el número, momento y lugar apropiados, a través de mecanismos finamente regulados durante el desarrollo.

1.1 Formación del tubo neural

El desarrollo ontogenético de los organismos multicelulares comienza en el momento de la fecundación del óvulo y no termina hasta la vida adulta, pasando por su desarrollo embrionario y postnatal. Una vez que el espermatozoide y el óvulo se fusionan, el óvulo fecundado sufre un periodo de sucesivas divisiones hasta formar un conjunto de células idénticas llamadas blástula o blastocisto. Al ser estas primeras divisiones por escisión, las células hijas tienen la mitad del tamaño que la célula madre, por ese motivo hasta el estado de blástula todo el embrión se mantiene del mismo tamaño. La blástula está constituida por el trofoblasto o blastodermo, que dará lugar a la placenta, y por el blastocele, una cavidad interna que se encuentra llena de líquido. El blastocele a su vez se divide en dos capas de células epiteliales: el epiblasto y el hipoblasto. El embrión proviene completamente del epiblasto, ya que el hipoblasto contribuye a la formación de membranas externas.

A medida que avanza el proceso se produce la gastrulación: en primer lugar, se forma un surco a lo largo de la línea media del epiblasto, la línea primitiva, y un grupo agrandado de células crece en la región rostral (el nodo u organizador de Hensen). Ambas estructuras actúan juntas para establecer la simetría bilateral del embrión, definir el eje rostro-caudal y organizar la gastrulación. Durante esta etapa se producen una cantidad significativa de movimientos y reordenamientos celulares en la línea primitiva, dando lugar a la formación de tres capas germinales primarias de las que derivan todos los tejidos del embrión: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. El endodermo es la capa germinal más interna y forma el sistema digestivo, respiratorio y otros órganos internos. El mesodermo es la capa germinal media y de ella derivan el sistema muscular, el esquelético, el secretor, el reproductor y el circulatorio. Finalmente, el ectodermo, la capa germinal más externa y da lugar a la piel, al sistema nervioso y a otros tejidos externos (**Figura 1.A**).

Conforme avanza el desarrollo, las señales moleculares enviadas por el mesodermo y la notocorda provocan que el ectodermo se divida en tres tipos celulares: el ectodermo epidérmico, localizado externamente; el ectodermo neural o neuroectodermo, localizado internamente y las células de la cresta neural, que se forman en la región que conecta el ectodermo epidérmico y el neuroectodermo. Las células de la cresta neural migrarán para generar una amplia variedad de tipos de células, y darán lugar al sistema nervioso periférico (SNP). Por otra parte, el neuroectodermo originará el SNC a partir de un proceso conocido como neurulación primaria (**Figura 1A**; Clarkson, 2019; Gilbert, 2005).

Al inicio de la neurulación, a partir del ectodermo neural, se forma la placa neural, una capa de células epiteliales que comienza a plegarse a lo largo del eje rostro-caudal del embrión. La flexión de la placa neural crea el surco neural y hace que los pliegues neurales laterales se eleven y se acerquen entre sí en la línea media dorsal; donde luego se fusionará para formar una estructura tubular llamada tubo neural, el cuál será el origen del SNC (**Figura 1B-C**). El cierre del tubo neural no ocurre simultáneamente en todo el ectodermo. En vertebrados como aves y mamíferos, el eje del cuerpo se alarga antes de la neurulación y comienza más temprano en la región rostral (anterior), mientras que la región caudal (posterior) del embrión todavía está experimentando gastrulación (Clarkson, 2019; Darnell & Gilbert, 2017; Gilbert, 2005; Sadler, 2005).

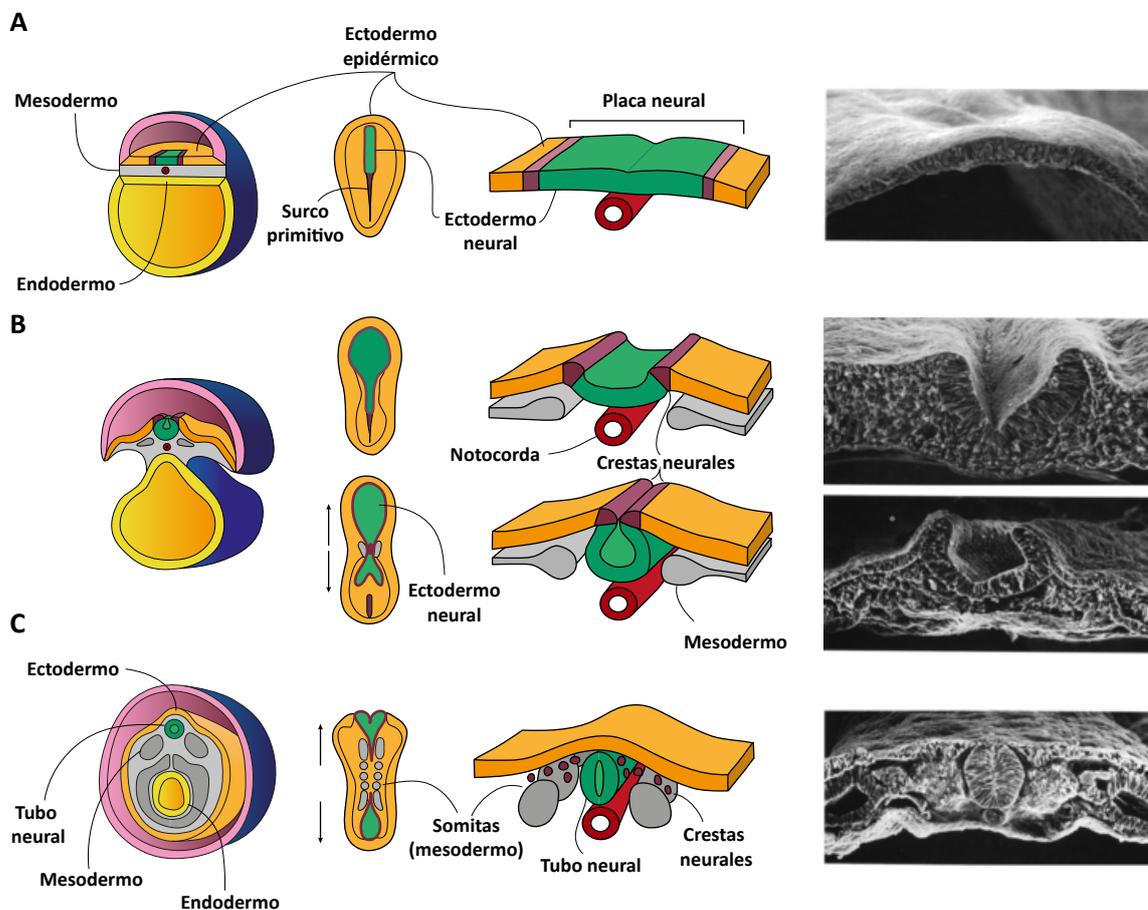


Figura 1. Neurulación primaria. Imágenes de microfotografía electrónica de barrido que muestran cada proceso de la neurulación en pollo y esquemas asociados que representan la neurulación en mamíferos. **(A)** La formación de la placa neural es el primer paso de la neurulación. A partir del ectodermo se inducen tres conjuntos de células: el ectodermo neural (verde), la cresta neural (lila) y la epidermis (naranja). La flexión de la placa neural forma el surco primitivo. **(B)** El plegamiento provoca que los pliegues neurales se acerquen a la línea media. **(C)** Los pliegues neurales contactan entre sí y se fusionan para general un tubo neural hueco. Las células de la cresta neural se dispersan. Adaptado de Neurocirugíacontemporánea.com, 2019. Microfotografías obtenidas de Gilbert, 2005.

A medida que avanza la neurulación, las células neuroepiteliales proliferan, asegurando así el crecimiento del tejido. Además, el sistema nervioso empieza a experimentar una regionalización en dos ejes principales, ortogonales entre ellos: el eje anteroposterior (AP) y el eje dorsoventral (DV). Esta regionalización se lleva a cabo a través de la expresión de diferentes factores de transcripción y moléculas de señalización mucho antes de que los diferentes segmentos sean morfológicamente visibles (Sagner & Briscoe, 2019).

1.2 Especificación AP del tubo neural

En los primeros estadios, el tubo neural es una estructura recta. A lo largo del eje AP, la proliferación celular heterogénea, las constricciones que surgen en la pared del tubo y las diferentes señales conducen a la formación de tres vesículas cerebrales distintas: el cerebro anterior (prosencefalo), el cerebro medio (mesencefalo) y el cerebro posterior (romboencefalo). Por otro lado, la región más posterior del tubo neural mantiene su forma tubular y será la encargada de formar la médula espinal.

La diferenciación del tubo neural continúa con la división de dos de las tres vesículas: el prosencefalo y el romboencefalo. Con estas divisiones se generan cinco vesículas, que junto a la médula espinal darán origen a las principales partes del SNC. El prosencefalo se subdivide en dos vesículas telencefálicas simétricas, que finalmente se convertirán en los hemisferios cerebrales, y en el diencefalo, que dará lugar al hipotálamo y regiones talámicas del cerebro. El mesencefalo no se subdivide, se convertirá en el cerebro medio. Por último, el romboencefalo se subdivide en el metencefalo, que dará lugar al cerebelo y al puente troncoencefálico, y en el mielencefalo, que acabará por convertirse en el bulbo raquídeo (**Figura 2**; Clarson, 2019; Darnell & Gilbert, 2017; Gilbert, 2005).

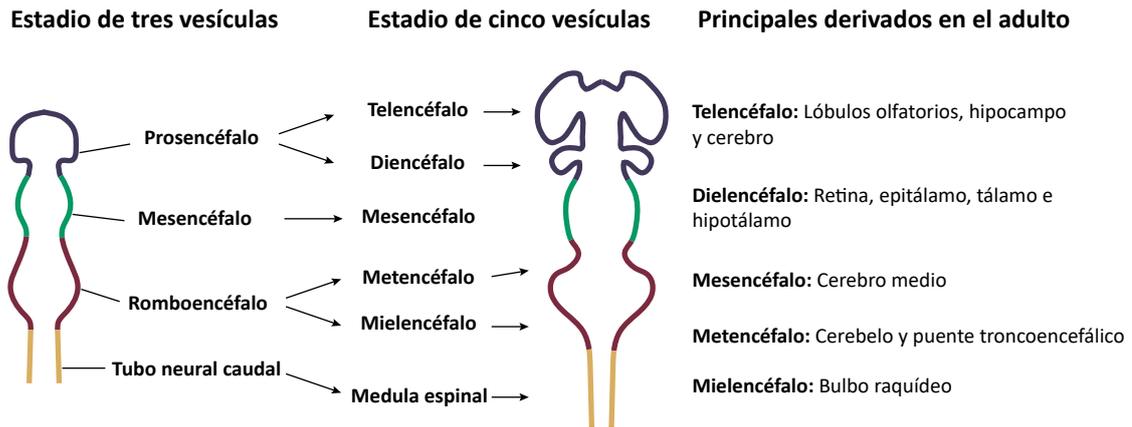


Figura 2. Desarrollo anatómico del sistema nervioso. Durante el desarrollo del sistema nervioso el tubo neural se subdivide en la parte más anterior en tres vesículas primarias que darán lugar a cinco vesículas y, finalmente, a las estructuras cerebrales adultas que forman el cerebro. Adaptado de Gilbert, 2005.

1.3 Especificación DV del tubo neural

Una vez que el tubo neural se ha cerrado, y al mismo tiempo que se produce la especificación AP, a nivel de médula espinal, el tejido neural en formación se divide en 11 dominios de progenitores neurales transcripcionalmente diferentes; cada uno de los cuales ocupa una posición concreta a lo largo del eje DV. El patrón resultante consta de seis dominios de progenitores neurales dorsales (dp1-6, de dorsal a ventral) y cinco ventrales (p0-p2, pMN y p3, de dorsal a ventral) (**Figura 3A**). Los progenitores neurales adquieren distintas identidades a lo largo del eje DV en respuesta a morfógenos como Sonic Hedgehog (Shh), proteínas de la familia Wnt y las proteínas morfogénicas óseas (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*) (**Figura 3**; Le Dréau & Martí, 2012; Ulloa & Martí, 2010). Los morfógenos son moléculas de señalización que difunden entre las células y generan respuestas específicas dependientes de concentración, que proporcionan información posicional a los progenitores neurales (Briscoe & Small, 2015).

Por una parte, tenemos a Shh que emana en primer lugar de la notocorda y posteriormente de la línea media ventral del tubo neural (o placa del suelo) e induce identidades ventrales. Por otra parte, Wnt (Wnt1 y Wnt3a) y BMP (BMP4 y BMP7) son secretadas por la línea media dorsal (o placa del techo), y promueven las identidades de los progenitores dorsales (**Figura 3A**; Le Dréau & Martí, 2012; Y. Muroyama et al., 2002). Es importante mencionar que, aunque estos morfógenos cumplen con las principales actividades de señalización requeridas para el establecimiento del patrón DV en el tubo neural, también se han atribuido actividades adicionales a factores de crecimiento fibroblásticos (FGF de inglés *fibroblast growth factor*), así como a los ácidos retinoicos en el establecimiento de este patrón (Diez del Corral & Morales, 2014, 2017; Wilson & Maden, 2005).

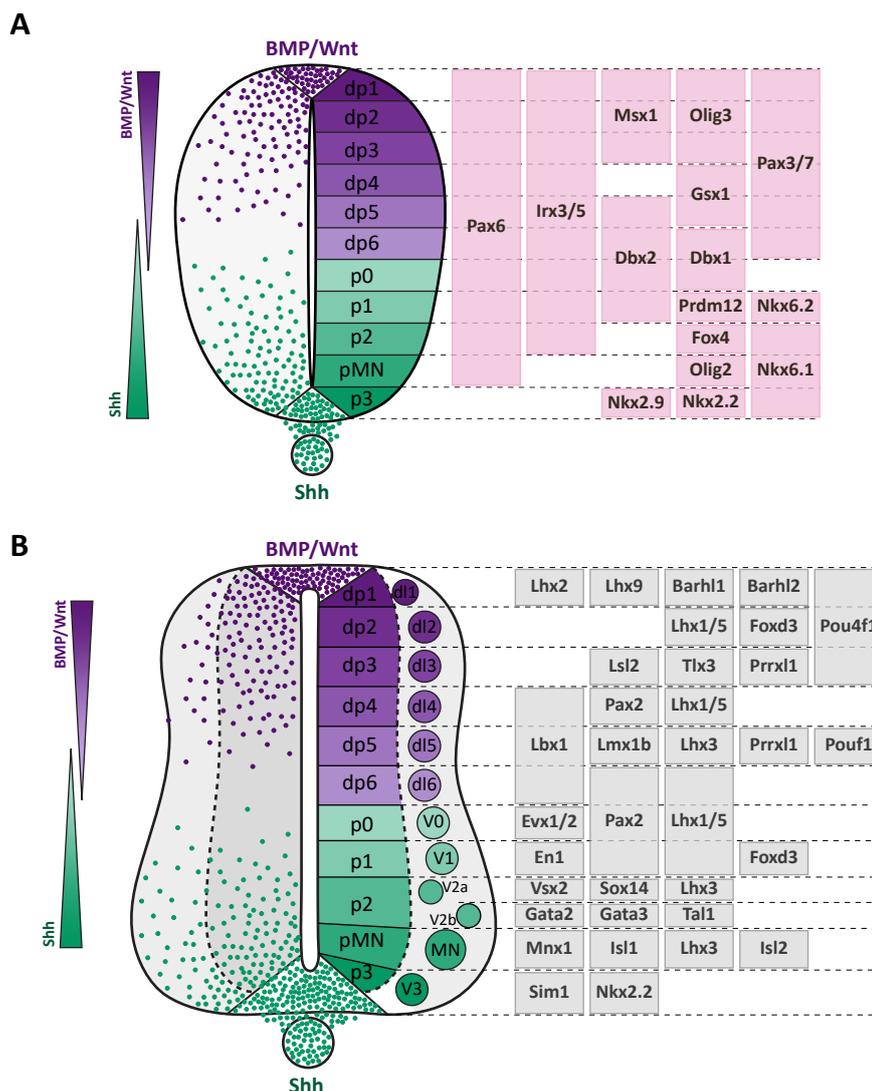


Figura 3. Formación del patrón DV y neurogénesis en el tubo neural en desarrollo. (A) Sección transversal esquemática de una médula espinal embrionaria. Los gradientes de morfógenos opuestos delimitan dominios de expresión de factores de transcripción específicos (recuadros rosas) a lo largo del eje DV. La coexpresión de los diferentes factores de transcripción define 11 dominios distintos de progenitores neurales (dp1-dp6, p0-p2, pMN y p3) a lo largo del eje DV. **(B)** A medida que avanza el desarrollo, cada uno de estos dominios de progenitores neurales da lugar a distintos subtipos neuronales (dl1-dl6, V0, V1, V2a, V2b, MN y V3) que se caracterizan por la expresión de factores de transcripción específicos (recuadros grises).

Estos morfógenos inducen la expresión de diferentes factores de transcripción de las familias homeodominio (HD) y hélice-bucle-hélice básico (bHLH, del inglés *basic helix-loop-helix*) en regiones discretas no superpuestas a lo largo del eje DV del tubo neural en función de la concentración de morfógeno. La identidad de los progenitores se basa en la combinación de los diversos factores de transcripción, que son diferentes en cada dominio. La mayoría de estos factores de transcripción actúan como represores transcripcionales de otros factores de transcripción y las interacciones cruzadas entre éstos, expresados en dominios adyacentes, contribuyen al refinamiento de los diferentes dominios (Fi-

gura 3.A). Una vez que se establecen los límites de estos dominios, los progenitores neuronales entran en la etapa de neurogénesis durante la cual, cada uno de los dominios progenitores da lugar a un tipo o varios subtipos de neuronas (**Figura 3.B;** Le Dréau & Martí, 2012; Sagner & Briscoe, 2019). La parte ventral del tubo dará lugar a la aparición de neuronas motoras (MN) y de 4 poblaciones de interneuronas ventrales (v0, 1, 2a, 2b y 3, de dorsal a ventral), varias de las cuales pueden subdividirse aún más en diferentes subtipos de neuronas. Las MN representan una clase altamente especializada de neuronas, que proyectan axones fuera del SNC y transmiten directamente señales a los músculos para controlar su actividad. En la parte dorsal del tubo neural se generan 6 poblaciones distintas de interneuronas dorsales (dl1-6, de dorsal a ventral) a partir de sus dominios progenitores correspondientes. Estas interneuronas se encargarán de recibir la información sensorial que llega desde las neuronas sensoriales periféricas (Sagner & Briscoe, 2019).

Mientras estas neuronas migran a lo largo del eje DV para llegar a su destino final, se inician los procesos de axonogénesis, dendritogénesis y sinaptogénesis. A medida que termina la neurogénesis, los progenitores neurales restantes, cuyo potencial de linaje se ha restringido de alguna manera, entran en la etapa de gliogénesis durante la cual se generan diversos tipos de células gliales: principalmente oligodendrocitos y astrocitos. Finalmente, este conjunto de células neuronales y gliales especializadas maduran para establecer la red funcional de conexiones intercelulares que se requieren para la actividad adecuada del SNC (Rowitch & Kriegstein, 2010).

1.4 Estructura del tubo neural

Una vez se ha cerrado el tubo neural, éste adopta la organización de un epitelio pseudoestratificado alrededor de un lumen. El tubo neural original está constituido por una única capa germinal de progenitores neurales que funcionan como células madre neurales. Estas células adoptan una forma alargada y extienden un proceso basal hacia la membrana basal y un proceso apical hacia la membrana apical, situada en el lumen de tubo neural. Además, sus núcleos adoptan diferentes posiciones a lo largo del eje apicobasal en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentran, a través de un movimiento conocido como migración nuclear intercinética (INM, del inglés *interkinetic nuclear migration*) (F. Sauer, 1935; Taverna & Huttner, 2010). El hecho de que los progenitores neurales no se encuentren sincronizados en la misma fase del ciclo celular proporciona al tejido una apariencia pseudoestratificada, al encontrarse los núcleos en diferentes posiciones dentro del eje apicobasal (**Figura 14**).

Durante el ciclo celular, la mitosis tiene lugar en la membrana apical. Una vez finalizada, el núcleo migra hacia una posición basal durante las fases G1 y S. Una vez allí, el núcleo continúa el ciclo celular y migra desde la membrana basal hacia la apical durante la fase G2 para que, finalmente, la mitosis

tenga lugar de nuevo en la membrana apical (Taverna & Huttner, 2010). La mitosis en el neuroepitelio, además de garantizar el nacimiento de nuevos progenitores, se ha propuesto como importante en la determinación del destino celular. Los progenitores neurales pueden dividirse simétricamente para enriquecer una población celular, o asimétricamente para generar una progenie diferenciada. En etapas tempranas del desarrollo predominan las divisiones autoexpandibles o proliferativas que generan dos progenitores (división progenitor-progenitor, PP) y que permite la expansión de los progenitores de manera simétrica. En este tipo de divisiones el plano de división forma un ángulo aproximadamente perpendicular a la membrana apical. A medida que avanza el desarrollo, después del inicio de la neurogénesis, los progenitores se dividen para poder generar neuronas y seguir manteniendo el número de progenitores neurales, donde los planos de escisión son oblicuos u horizontales. En este tipo de divisiones se generan dos células hijas que adoptan destinos diferentes, un progenitor neural y una neurona (división progenitor-neurona, PN), por lo que este tipo de divisiones es conocido como divisiones asimétricas. Al final de la neurogénesis, el número de progenitores disminuye como consecuencia de las divisiones planares simétricas neurogénicas, con un plano de escisión perpendicular, que dan lugar a dos neuronas (división neurona-neurona, NN). Diferentes estudios muestran como la orientación del huso mitótico, en los diferentes tipos de divisiones, está estrechamente relacionada con el destino celular. Esta orientación está regulada por mecanismos que involucran a los centrosomas, el posicionamiento de los microtúbulos astrales asociados a estos centrosomas y a las proteínas de polaridad (Marthiens & Ffrench-Constant, 2009; Paridaen & Huttner, 2014; Saade et al., 2017)

Tras una división neurogénica, las células post-mitóticas, migran hacia la región basal del tubo neural en un proceso llamado delaminación. Estas células generan una segunda capa de células alrededor del tubo neural original que va aumentando de volumen a medida que más células se van diferenciando. Esta nueva capa se conoce como zona del manto (MZ, del inglés *mantle zone*), y la capa celular más próxima al lumen del tubo neural sigue siendo epitelial y se denomina zona ventricular (VZ, del inglés *ventricular zone*). La VZ se convierte en el epéndimo, el conducto central del SNC. La MZ pasa a llamarse zona intermedia, que va incorporando los diferentes tipos de neuronas que formarán conexiones entre ellas y dan lugar a una región llamada zona marginal que contiene prolongaciones neuronales, pero no somas celulares. Cuando la médula espinal madura, la zona intermedia se convierte en la sustancia gris, donde están situados los cuerpos de las neuronas y la zona marginal da lugar a la sustancia blanca, constituida por las prolongaciones dendríticas y axónicas de las neuronas de la zona intermedia, encargadas de la transmisión de los impulsos nerviosos (Clarson, 2019).

Debido a sus características morfológicas conservadas durante todo el desarrollo, la médula espinal en desarrollo es un modelo ideal para el estudio de la regulación del desarrollo, la polaridad, la INM y la formación de patrones en el SNC.

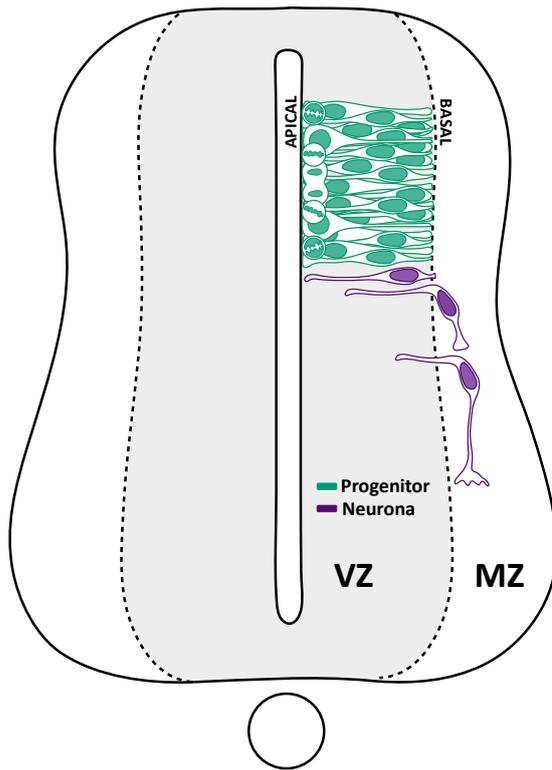


Figura 4. Estructura del tubo neural. En el tubo neural, los progenitores neurales extienden procesos hacia las membranas apical y basal a las que quedan anclados. La apariencia pseudoestratificada del neuroepitelio se adquiere como consecuencia de la INM; en la que los núcleos cambian su posición en el eje apicobasal en función de la fase del ciclo en la que se encuentran. A medida que avanza el desarrollo, las divisiones PN y NN producen neuronas que migran lateralmente hacia la zona de las neuronas diferenciadas en un proceso llamado delaminación y generan la VZ y la MZ.

1.5 Polaridad en el neuroepitelio

Las células neuroepiteliales muestran características epiteliales típicas y por ello están altamente polarizadas a lo largo de su eje apicobasal. La polaridad hace referencia a la organización espacial asimétrica de los componentes celulares y a las estructuras subcelulares que presentan estas células (Arai & Taverna, 2017). Por una parte, su membrana plasmática apical, también conocida como complejo apical, está constituida por proteínas de polaridad y por uniones adherentes que recubren el lumen del tubo neural (Arai & Taverna, 2017). Por otra parte, la membrana basal de estas células se caracteriza por la expresión localizada de integrinas que conectan con la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) y proporciona a las células una fuente rica en moléculas extracelulares (Figura 5.A; K. Long et al., 2016).

La polaridad apicobasal de los progenitores neuroepiteliales está regulada mediante la interacción de tres complejos proteicos conservados. En la membrana apical encontramos los complejos Crumbs-PALS1-PATJ y Cdc42-Par6-aPkc-Par3, que definen el dominio apical, mientras que el complejo Scribble-Lgl-Dlg define el dominio basolateral. Además, en su región apical estas células también presentan uniones adherentes basadas en cadherinas, a través de las cuales interaccionan con células vecinas (Figura 5.B; Chou et al., 2018). Dichas uniones se conectan a la red intracelular de actina que contribuye al mantenimiento de la tensión del citoesqueleto (Das & Storey, 2014). Junto a las cadherinas,

podemos encontrar proteínas como la ZO1, que suele vincularse a las uniones estrechas. Este tipo de uniones están presentes en estadios tempranos del desarrollo, pero después del cierre del tubo neural, estas uniones desaparecen y la ZO1 pasa a asociarse a las cadherinas (Aaku-Saraste et al., 1996). Estas células también poseen un cilio primario en cuya base se encuentra asociado el centrosoma. El cilio primario se localiza en la membrana apical y sobresale a la luz del lumen para recibir señales de él, como por ejemplo morfógenos (Arai & Taverna, 2017). En la membrana basal se forman adhesiones focales basadas en integrinas con la matriz extracelular de la que las células pueden obtener diferentes señales importantes en la polaridad celular (Long et al., 2016).

La polaridad celular está implicada en muchas funciones imprescindibles para los progenitores neurales como, por ejemplo: 1) la respuesta diferencial a señales del ventrículo y/o el polo basal, 2) la división celular, donde las señales de polaridad influyen en la generación de los diferentes tipos de células hijas (F. S. Chou et al., 2018; Paridaen & Huttner, 2014; Singh & Solecki, 2015), 3) el mantenimiento de la integridad y forma del tejido a través de las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina y 4) en la neurogénesis, donde la pérdida de estas uniones es necesaria para la delaminación celular (Arai & Taverna, 2017). Asimismo, una sobreexpresión de componentes del complejo apical como la β -catenina y la aPKC conducen a una estabilización del complejo apical. Esta estabilización conlleva al mantenimiento del estado progenitor y a una inhibición de la diferenciación, causando un crecimiento aberrante del neuroepitelio (Herrera et al., 2014).

La correcta coordinación entre los complejos de proteínas de polaridad es vital para un correcto desarrollo embrionario. La alteración forzada de la polaridad apicobasal al reducir la expresión de componentes esenciales, como son las uniones adherentes o las proteínas de polaridad conduce a la interrupción de uniones celulares que causan defectos en adhesión celular. Estos defectos conducen a alteraciones profundas en la arquitectura tisular, defectos en el desarrollo cerebral, alteraciones del ciclo celular que van desde la salida prematura del ciclo a cambios en la proporción de divisiones neurogénicas y proliferativas, que deriva en una diferenciación neuronal prematura (F. S. Chou et al., 2018). Además de las interacciones proteína-proteína, los lípidos fosfoinosítidos también están involucrados en el establecimiento de la polaridad epitelial. La interacción entre las proteínas de polaridad y los fosfolípidos a través de una maquinaria de tráfico polarizado es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad apicobasal. Una alteración de cualquier componente puede alterar la polaridad que ya está establecida (Gassama-Diagne et al., 2006; Martin-Belmonte et al., 2007).

A medida que avanza el desarrollo, como se ha mencionado anteriormente las neuronas recién nacidas deben separarse de las células vecinas en la superficie apical y delaminar para salir de la VZ y dirigirse a la MZ (**Figura 5.A**). Este proceso de desprendimiento apical implica la regulación negativa de las proteínas de las uniones adherentes como la N-cadherina. Después de la pérdida de la N-cadherina,

la futura neurona sufre una abscisión de su membrana apical; lo que provoca la pérdida de la polaridad. Este evento conocido como abscisión apical es impulsado por la constricción del anillo de actina subapical. Durante la abscisión apical se observa un desensamblaje del complejo centrosoma-cilio primario: la nueva neurona retiene el centrosoma, mientras que el cilio queda en la membrana apical, liberando a la célula de la influencia de las señales extracelulares mediadas por el cilio primario (Figura 5.C; Das & Storey, 2014). A partir de aquí, la neurona se repolariza y reorganiza su citoesqueleto de actina para la migración, la axonogénesis y la formación del cono de crecimiento (Kasioulis & Storey, 2018).

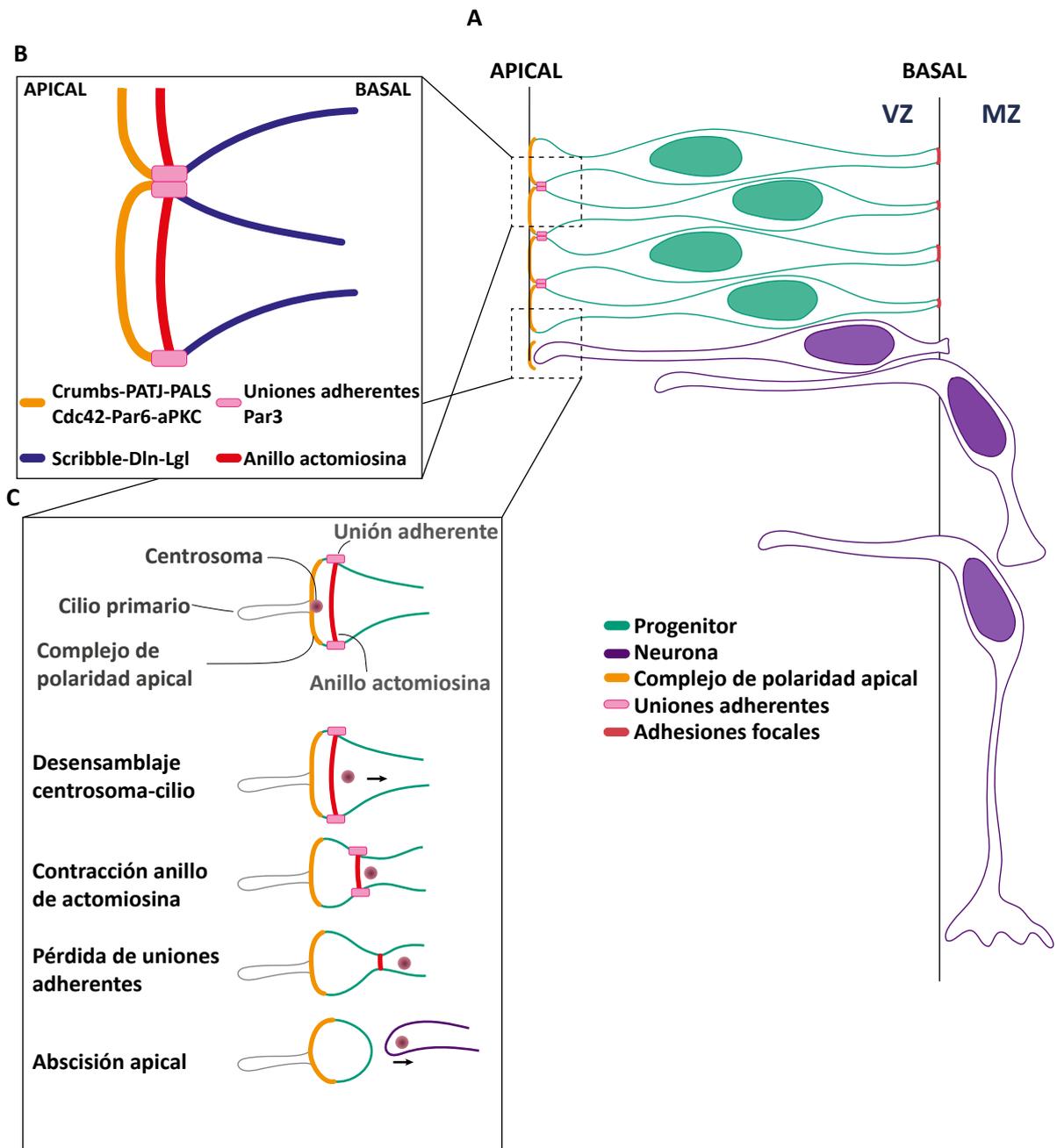


Figura 5. Polaridad en el neuroepitelio. **(A)** Los progenitores neurales (verde) muestran una polaridad apicobasal. En su membrana apical encontramos el complejo de polaridad apical (naranja) que contiene uniones adherentes (rosa) y otras proteínas de polaridad que mantienen la adhesión célula-célula. El proceso basal está en contacto con la ECM a través de adhesiones focales (coral). Cuando los progenitores se dividen y dan lugar a neuronas (lila), éstas pierden su dominio apical (naranja) en un proceso conocido como abscisión apical **(C)** y migran hacia la MZ. **(B)** Esquema de la disposición apicobasal de las diferentes proteínas de polaridad en el complejo apical. **(C)** Durante la abscisión apical tienen lugar diferentes eventos. En la membrana apical encontramos el cilio primario, el centrosoma, el complejo apical, las uniones adherentes que contienen N-cadherina y el anillo de actomiosina. Cuando una célula se diferencia, en primer lugar, el centrosoma se desensambla del cilio primario. A continuación, el anillo de actina se contrae y tras la pérdida de las uniones adherentes se produce la abscisión celular, quedando el complejo apical unido a la membrana apical y al cilio y el centrosoma en la neurona que va a migrar hacia la MZ.

Como hemos visto, un correcto establecimiento de la polaridad es imprescindible para el desarrollo embrionario. Aunque solemos estudiar estos procesos por separado, la división celular, la INM, la neurogénesis y la adhesión celular, están estrechamente relacionados. Entre otros aspectos, estos procesos tienen en común mecanismos de movilidad y tensión dependiente del citoesqueleto. La presente tesis se centra en el estudio del papel de las uniones adherentes en la regulación del ciclo celular y la INM a través del citoesqueleto de actina.

2. Citoesqueleto

Para que una célula funcione correctamente debe organizarse en el espacio y ser capaz de interactuar mecánicamente con su entorno. Debe adquirir la morfología correcta para cada situación y ser capaz de adaptarla ante situaciones cambiantes. Además, tiene que poder reorganizar y transportar sus componentes internos para afrontar situaciones como la migración, el crecimiento y la división celular. Todas estas funciones están reguladas por un citoesqueleto dinámico. Las diversas actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios, que constituyen el esqueleto celular y están presentes en todo tipo de células y organismos. Cada uno de los tres tipos de filamentos tiene una disposición diferente en la célula y una función distinta. El citoesqueleto, además, contiene una gran cantidad de proteínas accesorias que se vinculan a estos filamentos y median la interacción con otras estructuras intracelulares como la membrana plasmática, orgánulos, proteínas de membrana y cromosomas (Alberts, 2016). En este apartado se va a presentar una visión general de los microtúbulos y los microfilamentos de actina, centrandose especial atención en estos últimos.

2.1 Citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos se encuentran en todos los organismos eucariotas caracterizados. Estos filamentos participan en muchos procesos celulares y sus propiedades dinámicas son de vital importancia para llevar a cabo funciones celulares tan importantes como el ciclo celular, donde contribuyen a la formación del huso mitótico. Además, intervienen en procesos de movilidad formando el núcleo de cilios y flagelos, lo que hace que los microtúbulos sean esenciales para la motilidad de muchos organismos. Los microtúbulos mantienen la forma y la polaridad celular; además, proporcionan pistas para las proteínas motoras que promueven el movimiento de los orgánulos, las vesículas de transporte y otras estructuras celulares (Goodson & Jonasson, 2018). Todas estas funciones de los microtúbulos están reguladas por otros elementos tales como las proteínas unidoras de microtúbulos (MTBP, del inglés *microtubule binding proteins*) y otras proteínas asociadas (Bodakuntla et al., 2019).

2.1.1 Dinámica de los microtúbulos

La tubulina es una proteína globular de 55 kDa y es el componente principal de los microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras tubulares con un diámetro de 25 nm, compuestos generalmente por 13 protofilamentos rectos alineados lateralmente. Cada protofilamento está formado por heterodímeros de dos proteínas globulares, la α - y la β -tubulina, que interaccionan cabeza con cola entre sí. Estos protofilamentos se asocian de forma paralela y ligeramente desplazada, estableciendo contactos laterales entre ellos para formar la pared cilíndrica de los microtúbulos (Goodson & Jonasson, 2018). Los protofilamentos y, a su vez, los microtúbulos son estructuras polarizadas, es decir, con un extremo positivo (+), más dinámico, donde siempre se encuentra la β -tubulina, y otro negativo (-) donde se localiza siempre la α -tubulina, menos dinámico, que normalmente está protegido por otras proteínas o anclado a las superficies de la célula (**Figura 6**; Akhmanova & Steinmetz, 2019).

Los dímeros de tubulina pueden encontrarse solubles en el citoplasma o formando parte de los microtúbulos. Los dímeros libres en el citoplasma se encuentran unidos a una molécula de GTP. La estructura de los microtúbulos es muy dinámica, éstos se nuclean y luego se polimerizan y crecen mediante la adición de heterodímeros de α/β -tubulina en su extremo positivo. Cuando un dímero se incorpora al microtúbulo en crecimiento se produce la hidrólisis de GTP a GDP, por lo que la mayor parte del microtúbulo está constituida por α/β -tubulina-GDP. Si la velocidad con la que se produce la unión de nuevos dímeros es mayor que la hidrólisis de GTP siempre habrá un conjunto de dímeros en el extremo positivo que tendrán GTP unido. A este conjunto de dímeros-GTP polimerizados se le llama “casquete” de GTP. Esta estructura hace más estable el extremo positivo y bajo estas condiciones el microtúbulo crecerá en longitud. Sin embargo, si la hidrólisis de GTP ocurre más rápido que la tasa

de incorporación de tubulina en el extremo positivo, el cambio en la conformación de los dímeros en el extremo positivo hace que los microtúbulos se despolimericen y encojan rápidamente, proceso conocido como catástrofe. Los dímeros de tubulina-GDP que quedan libres en el citoplasma son convertidos rápidamente en dímeros de tubulina-GTP y, por lo tanto, pueden volver a unirse al extremo positivo de otro microtúbulo en crecimiento; a este proceso se le denomina rescate. Por lo tanto, dependiendo de la disponibilidad de heterodímeros de tubulina libres y de la tasa de hidrólisis de GTP, el extremo positivo de los microtúbulos puede alternar entre las fases de crecimiento y contracción, también pueden entrar en un estado de pausa donde ni crecen, ni se contraen, una propiedad conocida como inestabilidad dinámica (Figura 6; Brouhard & Rice, 2018; Dráber et al., 2012).

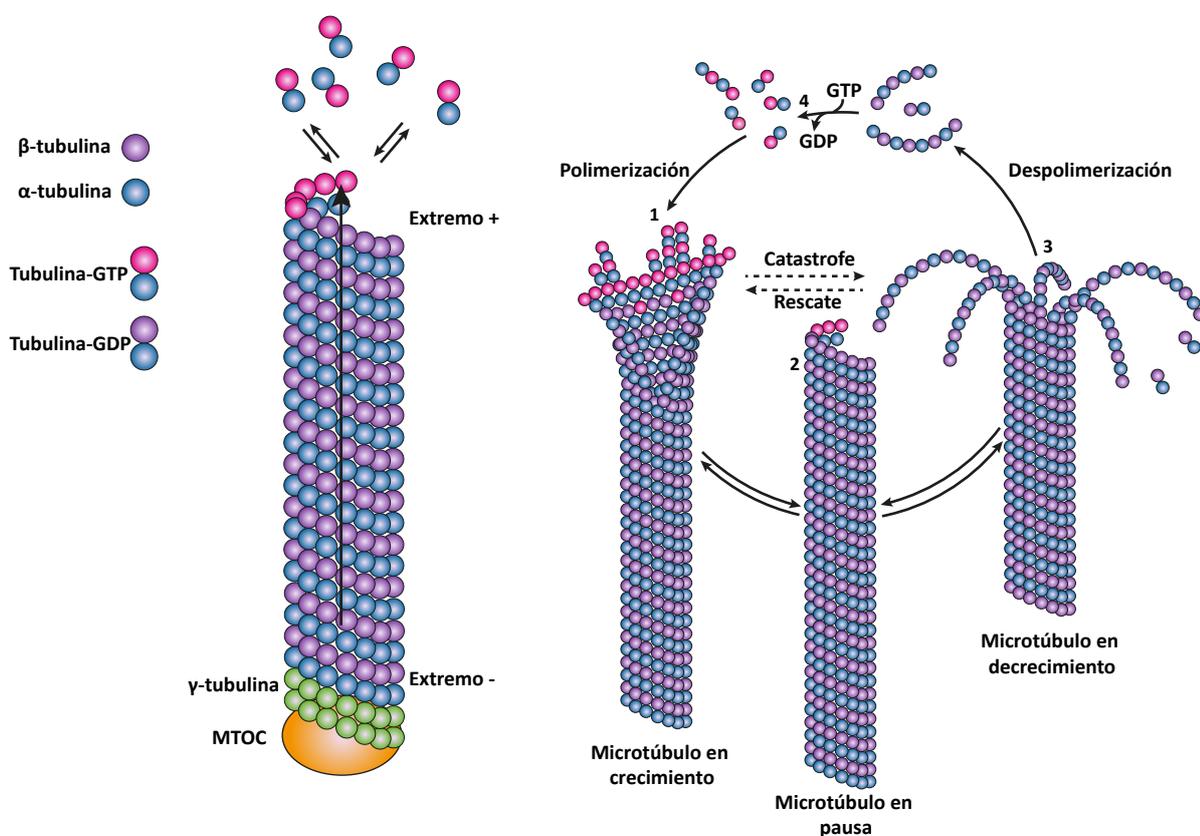


Figura 6. Estructura de los microtúbulos e inestabilidad dinámica. La α - y la β tubulina forman heterodímeros que son la base estructural de los microtúbulos. Los microtúbulos se componen de 13 protofilamentos y tienen un extremo positivo dinámico, mientras que el extremo negativo es más estable y normalmente está asociado a factores de nucleación y proteínas protectoras. La polimerización de los microtúbulos se lleva a cabo mediante la incorporación de heterodímeros de tubulina unidos a GTP que se encuentran en el citosol en el extremo positivo de los microtúbulos. Una vez incorporados estos dímeros, se produce la hidrólisis de GTP. El evento de catástrofe ocurre cuando un microtúbulo pasa de crecer a despolimerizarse. Esta despolimerización conduce a la liberación de dímeros de tubulina al citosol donde pueden cambiar su GDP por GTP e incorporarse a otros microtúbulos en crecimiento. Si un microtúbulo no está creciendo o encogiéndose, se dice que está en estado de pausa. Adaptado de Akhmanova & Steinmetz, 2008.

A pesar de la alta dinámica en el extremo positivo, los heterodímeros de tubulina también pueden agregarse o eliminarse en el extremo negativo de los microtúbulos. No obstante, el extremo negativo de los microtúbulos se asocia más a menudo con factores de nucleación y / o limitación. *In vivo*, la formación de nuevos microtúbulos por ensamblaje espontáneo no se ve favorecida a menos que las concentraciones de tubulina sean altas. La nucleación de la tubulina es un proceso desfavorable y altamente cooperativo, cuya tasa de nucleación depende de la concentración de tubulina. Esto suprime de manera natural la nucleación espontánea y permite que las células regulen cuándo y dónde se ensamblarán los nuevos microtúbulos (Goodson & Jonasson, 2018). El control cuidadoso de la localización y la actividad de los nucleadores de microtúbulos juega un papel importante en la generación de microtúbulos. El principal nucleador de microtúbulos es el complejo de anillo de γ -tubulina (γ -TuRC), una estructura en forma de anillo que actúa como plantilla para el ensamblaje de los microtúbulos y, a su vez, de estabilizador del extremo negativo (**Figura 6**). Además del γ -TuRC existen otros factores que se asocian y cooperan con el γ -TuRC para controlar el tiempo, la ubicación y la eficiencia de la nucleación de los microtúbulos (A. Muroyama & Lechler, 2017; Teixidó-Travesa et al., 2012).

En las células, la nucleación de los microtúbulos se controla espacialmente y se organiza mediante estructuras denominadas centros de organización de microtúbulos (MTOC, del inglés *microtubule organizing center*), donde comienza la polimerización y se anclan los extremos negativos de los microtúbulos, permitiendo que los extremos positivos crezcan en el citoplasma. En las células animales, el MTOC principal es el centrosoma, el cual controla el número, la localización y la orientación de estos polímeros en el citoplasma (Akhmanova & Steinmetz, 2019; A. Muroyama & Lechler, 2017). El centrosoma es un orgánulo formado por un par de centriolos (estructuras cilíndricas formada por 9 tripletes de microtúbulos), rodeados por una matriz de proteínas conocida como material pericentriolar o PCM (del inglés *pericentriolar material*) (**Figura 7**; Alieva & Uzbekov, 2008). El centrosoma modula diversos procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la forma celular, la polaridad, la adhesión y motilidad, el ensamblaje de los cilios, la respuesta al daño del ADN, el transporte intracelular, el posicionamiento de los orgánulos celulares y la formación del huso mitótico, entre otros (Doxsey, 2001; A. Muroyama & Lechler, 2017; Vertii et al., 2016). Además, los centrosomas son importantes en múltiples procesos durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario, incluida la migración neuronal, el establecimiento de la polaridad neural y la neurogénesis (Higginbotham & Gleeson, 2007).

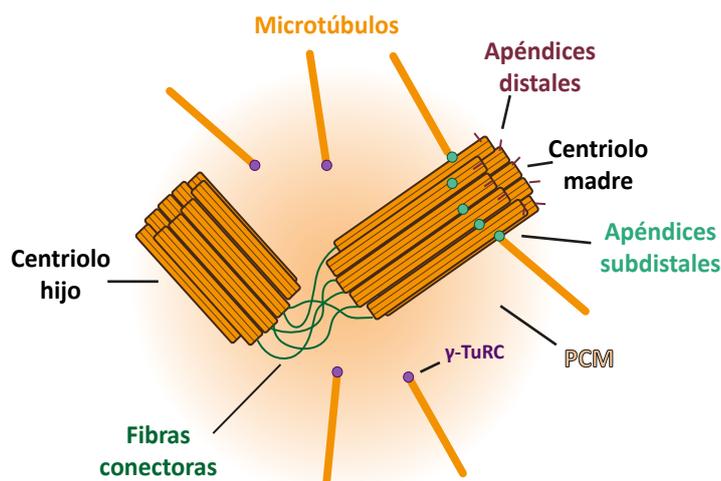


Figura 7. Estructura de los centrosomas.

Los centrosomas son pequeños orgánulos compuestos por dos centriolos perpendiculares, uno madre y otro hijo, ligados entre ellos a través de fibras conectoras. Los centriolos están envueltos la PCM, que participa en la nucleación y el anclaje de los microtúbulos citoplasmáticos. Al contrario que el centriolo hijo, el centriolo madre posee apéndices distales y subdistales, necesarios para el ensamblaje del cilio y los microtúbulos de anclaje, respectivamente.

Adaptado de (Barbelanne & Tsang, 2014).

2.1.2 Proteínas unidoras de microtúbulos

La dinámica y la función de los microtúbulos está regulada por las MTBP. Estas MTBP pueden clasificarse en diferentes categorías: 1) las **estabilizadoras y desestabilizadoras**, que promueven la polimerización y/o la despolimerización (incluido el corte) de los microtúbulos respectivamente; 2) las **proteínas protectoras o de capping** que tienen la capacidad de detener la incorporación de dímeros; 3) las **proteínas formadoras de estructuras superiores**, que estabilizan los microtúbulos y tienen actividad de agrupamiento. Adicionalmente están 4) las **proteínas de interacción con el citoesqueleto**, que promueven la interacción con otros filamentos del citoesqueleto y 5) las **proteínas de enlace citoplasmáticas**, que anclan los orgánulos a los microtúbulos para promover la organización celular. Finalmente encontramos 6) las **proteínas motoras**, que usan los microtúbulos como pistas para el transporte intracelular utilizando la energía derivadas de la hidrólisis de ATP (Bodakuntla et al., 2019; Goodson & Jonasson, 2018). Estas proteínas se unen a las cargas intracelulares como pueden ser orgánulos y vesículas u otros elementos del citoesqueleto y son transportados donde se requiera. Las dos principales familias de proteínas motoras asociadas a microtúbulos son las kinesinas y las dineínas. La mayoría de las kinesinas móviles se dirigen hacia el extremo positivo, mientras que las dineínas transportan su carga hacia el extremo negativo (Abraham et al., 2018).

2.2 Citoesqueleto de actina

La actina es la principal proteína en la mayoría de células eucariotas. El citoesqueleto de actina tiene múltiples funciones para contribuir a una correcta función celular: la integridad estructural, el movimiento y la localización, el agrupamiento y la estabilización de las proteínas transmembrana. Di-

Estas funciones son cruciales en procesos biológicos como la división celular, la motilidad, la endocitosis y la morfogénesis. Estos procesos se logran mediante el montaje y desmontaje de filamentos de actina, que se organizan en redes de orden superior funcionales como redes y haces. Toda esta regulación está altamente regulada por una variedad de proteínas unidoras de actina (ABP, del inglés *actin binding proteins*) (Pollard y Cooper, 2009, Domínguez y Holmes, 2011). La participación de actina en tantos procesos celulares está mediada por las interacciones íntimas y extensas entre estos filamentos de actina con la membrana celular y proteínas transmembranas, que pueden producir las fuerzas necesarias tanto para los movimientos de células enteras, como para el transporte intracelular de proteínas, vesículas y orgánulos.

2.2.1 Polimerización de la actina

La actina es una proteína citosólica muy abundante, constituye aproximadamente el 10 % del total de las proteínas citosólicas. Se trata de una proteína globular de 375 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 43 kDa. La actina está presente en dos formas: monómeros libres, conocidos como actina globular (G-actina), o formando parte de los filamentos poliméricos (F-actina) (Pollard, 2016; Winder & Ayscough, 2005). Los filamentos de actina consisten en una doble hélice con un diámetro de 7nm que se forma mediante la polimerización de los monómeros de actina. Estos filamentos son estructuras polares, con dos extremos dinámicamente diferentes: un extremo “menos” (o extremo en punta), relativamente inerte y de crecimiento lento y, un extremo “más” (o extremo ancho o barbado) (**Figura 8**; Blanchoin et al., 2014).

La dinámica de polimerización/despolimerización de los filamentos de actina depende de un ciclo de eventos que involucran la unión e hidrólisis de ATP. El primer paso para la polimerización de actina de *novo*, es la nucleación, que consiste en la formación de dímeros y trímeros de la G-actina-ATP (**Figura 8.A**). A continuación, se produce la elongación o polimerización del filamento de actina por la adición rápida de más monómeros de G-actina-ATP a ambos extremos. Se sabe que el crecimiento en el extremo “más” es 10 veces más rápido que en el extremo “menos” del filamento (**Figura 8.B**). Debido a que la polimerización de actina es reversible, los filamentos pueden despolimerizarse mediante la disociación de las subunidades de actina, lo que permite que los filamentos de actina se descompongan cuando sea necesario. Una vez la G-actina-ATP se ha incorporado en el filamento, la actina hidroliza al ATP para producir ADP y un grupo fosfato (Pi). Esto provoca que la afinidad de la G-actina para permanecer en el filamento disminuya, y, por lo tanto, los monómeros de G-actina-ADP-Pi sean susceptibles de disociarse o liberarse del polímero de F-actina en forma de G-actina-ADP. Una vez en el citosol, el ADP unido al monómero de G-actina se intercambia por el ATP y el monómero de G-actina-ATP puede volver a unirse en el extremo “más” del filamento (**Figura 8.C**).

Existe un equilibrio entre los monómeros de actina y los filamentos que depende de la concentración de monómeros libres. La velocidad a la que los monómeros de actina se incorporan a los filamentos es proporcional a su concentración, por lo que existe una concentración crítica de monómeros de actina donde la velocidad de su polimerización en filamentos es igual a la velocidad de disociación. A esta concentración crítica, los monómeros y los filamentos están en equilibrio aparente conocido como *treadmiling* (**Figura 8.C**). Al igualar la velocidad de polimerización y despolimerización, los filamentos se pueden mantener como estructuras estables pero dinámicas, ya que hay un reemplazo constante de los monómeros. Este dinamismo permite organizar los filamentos rápidamente en función de las necesidades celulares (Blanchoin et al., 2014; Pollard, 2016; Pollard & Cooper, 2009).

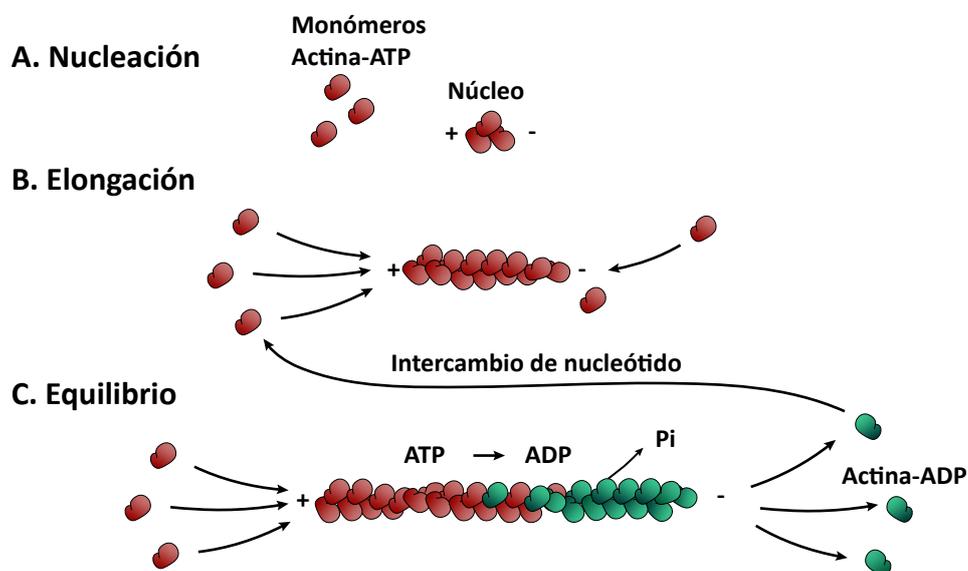


Figura 8. Polimerización de actina. (A) Nucleación. En un proceso en el que se forma un trímero a partir de monómeros actina-ATP. (B) Elongación. Una vez formado el núcleo, nuevos monómeros de actina-ATP se incorporan para formar un filamento. Se puede observar una mayor incorporación de monómeros por el extremo "más" que por el extremo "menos". (C) Equilibrio. En esta fase la velocidad de polimerización y despolimerización es igual, de manera que se mantiene la longitud del filamento. Los monómeros de actina-ADP que quedan libres en el citosol después de disociarse del filamento intercambian el nucleótido para poder volver a incorporarse de nuevo a un filamento. Adaptado de (Nürnberg et al., 2011).

Las células eucariotas utilizan más de 100 proteínas accesorias o ABPs para mantener el conjunto de monómeros de actina, iniciar la polimerización, restringir la velocidad de los filamentos, regular el ensamblaje, el recambio de los filamentos y entrecruzar los filamentos en redes o haces. De hecho, prácticamente no existen ni filamentos, ni monómeros de actina "desnudos" en el citosol, sino siempre unidos a alguna ABP (Pollard, 2016). Eso permite a la célula crear y modelar los filamentos únicamente allí donde se necesiten.

2.2.2 Proteínas unidoras de actina

Las ABPs regulan prácticamente todos los aspectos del ensamblaje de la actina. Estas proteínas tienen diferentes funciones, desde el mantenimiento de monómeros disponibles para la polimerización de los filamentos y la creación de éstos, hasta el desmontaje de los mismos; pasando por su estabilización, la formación de diferentes estructuras de orden superior y la interacción con la membrana y otras proteínas (Pollard, 2016). A continuación, hemos clasificado las diferentes ABPs según la función que realizan en la regulación del citoesqueleto de actina, sin embargo, es importante destacar que muchas veces estas funciones no son únicas, sino que diferentes ABPs pueden cumplir diferentes funciones dentro de la célula.

Proteínas de unión a monómeros de actina: Las proteínas que se unen a los monómeros de actina desempeñan un papel crucial en el control del conjunto de la actina no polimerizada, éstas actúan secuestrando los monómeros de actina y modulando así su asociación o disociación a los filamentos de actina. Un ejemplo de esto es la timosina, que actúa reteniendo a los monómeros de actina-ATP e impidiendo su incorporación a los filamentos (Pollard, 2016; Winder & Ayscough, 2005). Otra proteína, la profilina, que cataliza el intercambio de ADP / ATP en los monómeros de actina y aumenta la velocidad de polimerización. Además, esta proteína tiene una gran afinidad también por la actina-ATP por lo que inhibe la formación espontánea de dímeros y trímeros de actina que iniciarían un nuevo filamento. Los monómeros de actina unidos a la profilina sólo pueden usarse para el ensamblaje de un nuevo filamento de actina catalizada por los factores de nucleación (**Figura 9.A**; Blanchoin et al., 2014; Pollard, 2016).

Nucleación de los filamentos (síntesis). Las forminas tienen un papel importante estabilizando las uniones de las ABPs, favoreciendo la formación y la elongación del filamento no ramificado. El complejo Arp2/3 puede nuclear los filamentos desde un filamento existente. Esto es importante para permitir la ramificación de los filamentos de actina. Cuando se unen a un lado del filamento, el complejo Arp2/3 forma la base para el crecimiento de una rama de 70°. El extremo “más” libre se alarga con monómeros de actina, mientras que el complejo Arp2/3 ancla el extremo “menos” al filamento inicial (Blanchoin et al., 2014; Pollard, 2016; Winder & Ayscough, 2005). Las proteínas Ena/VASP no parecen nuclear la polimerización, pero contribuyen al crecimiento del filamento de actina (**Figura 9.B y F**; Pollard, 2016).

Factores promotores de nucleación: Además de un filamento de actina inicial, los factores promotores de nucleación de la familia WASP/SCAR/WAVE son necesarios para activar el complejo Arp2/3 a través de sus dominios de unión a la actina monomérica, y ayudan a la nucleación del filamento de actina (Winder & Ayscough, 2005). Por el contrario, la arpina inhibe la nucleación de las ramificaciones de los filamentos de actina promovidos por el complejo Arp2/3 (Pollard, 2016).

Corte y despolimerización del filamento: El desmontaje del filamento es especialmente importante para proporcionar la generación de nuevos filamentos y para reponer el conjunto de monómeros. Este proceso es impulsado por la cofilina que se une preferentemente a la actina unida a ADP en el extremo “menos” y promueve el corte de filamentos o la despolimerización. La interacción entre la gelsolina y el filamento de actina da como resultados el corte del filamento, dejando a la gelsolina asociada al extremo “más” después de haberlo cortado (**Figura 9.C**; Pollard, 2016).

Proteínas protectoras o de *Capping*: El largo de los filamentos está controlado por proteínas protectoras: como la proteína capping, la gelsolina y la tensina, que se unen al extremo “más” para bloquear la adición de nuevos monómeros e impedir así la elongación del filamento, limitando el número de extremos “más” disponibles para el crecimiento y estabilizando filamentos (Blanchoin et al., 2014; Pollard, 2016). Además, como se ha mencionado anteriormente, la gelsolina puede cortar los filamentos de actina después de protegerlos. Las proteínas protectoras en el extremo “menos” como la tropomodulina, por el contrario, reducen la pérdida de monómeros por lo que conducen a una rápida extensión del filamento (**Figura 9.D**; Pollard, 2016; Winder & Ayscough, 2005).

Proteínas estabilizadoras de los filamentos: Las ramificaciones de los filamentos de actina promovidos por el complejo Arp2/3 pueden estabilizarse mediante ABPs como la cortactina y la cofilina. La tropomiosina se une a lo largo de los filamentos de actina y estabiliza el filamento contra la despolimerización espontánea. Además, tiene un efecto protector contra el corte de otras ABPs. La nebulina, actúa para promover, estabilizar y determinar la longitud de filamentos delgados y la fascina es una proteína presente en las estructuras paralelas o entrecruzadas de filamentos y se encarga de la estabilización y endurecimiento de la estructura (**Figura 9.E**; Winder & Ayscough, 2005).

Proteínas que regulan estructuras de orden superior: Para poder cumplir su función en determinadas ocasiones, la célula necesita una agrupación de filamentos de actina para formar estructuras de orden superior. Esto se consigue, por ejemplo, gracias a proteínas con dos dominios de unión a actina como la fimbrina, que se encarga de la alineación paralela de la F-actina del borde frontal de las células. La α -actinina, se concentra en las fibras de estrés, donde es responsable del entrecruzamiento de haces contráctiles y de intervenir en el anclaje de estas fibras a las adhesiones focales. Proteínas como la filamina y la transgelina se encargan de la disposición de los filamentos en matrices ortogonales gracias a sus múltiples sitios de unión a actina. Las redes ramificadas pueden generar fuerza y funcionan cuando se ensamblan cerca de la superficie, además están asociadas a la forma celular (**Figura 9.G**; Pollard, 2016; Winder & Ayscough, 2005).

Proteínas enlazadoras de filamentos de citoesqueleto: Existen conexiones entre los diferentes polímeros del citoesqueleto para la función celular. En esta conexión, además de otras proteínas, las

ABPs como la espectrina se encargan de la unión del citoesqueleto de actina a los filamentos intermedios y la proteína tau y la proteína motora miosina 10 (Myo10), que median la interacción entre el citoesqueleto de actina y los microtúbulos (**Figura 9.H**; Winder & Ayscough, 2005; Woolner et al., 2008).

Proteínas de unión a otras proteínas: Este grupo incluye proteínas que se unen a la actina y además tienen dominios que les permiten interacciones con otras proteínas. Entre estas proteínas que funcionan dentro de redes de señalización de la célula para permitir la remodelación del citoesqueleto encontramos: la proteínas VASP, la vinculina, la vinexina, la ponsina, la proteína Dbn1 y la cortactina, entre muchas otras (**Figura 9.I**; Winder & Ayscough, 2005).

Proteínas de anclaje a la membrana y a proteínas de membrana: Diferentes proteínas conectan el citoesqueleto de actina a la membrana, para que funciones como la locomoción y la adhesión, entre otras, se puedan llevar a cabo. En este grupo encontramos a la distrofina, la utrofina, la talina, la vinculina y la anexina (**Figura 9.J**; Winder & Ayscough, 2005).

Proteínas motoras (miosinas): Como parte del citoesqueleto interconectado, los filamentos de actina no solo brindan soporte estructural y organización a las células, sino que también actúan como pistas para el movimiento de las proteínas motoras, las miosinas. Las miosinas son motores moleculares dependientes de actina que producen movimiento y fuerza a través de la hidrólisis de ATP y el posterior cambio conformacional. Por lo tanto, además de la polimerización de actina, las interacciones entre los motores de miosina y los filamentos de actina son esenciales para muchas funciones celulares. Las miosinas generan fuerzas entre los filamentos de actina produciendo contracciones para llevar a cabo diferentes funciones como la citocinesis, la contracción muscular y la migración. Además, las miosinas también contribuyen al transporte y/o al anclaje de orgánulos, vesículas y otros componentes intracelulares, utilizando los filamentos de actina como una pista a lo largo de la cual pueden moverse (**Figura 9.K**; Hartman & Spudich, 2012; Winder & Ayscough, 2005).

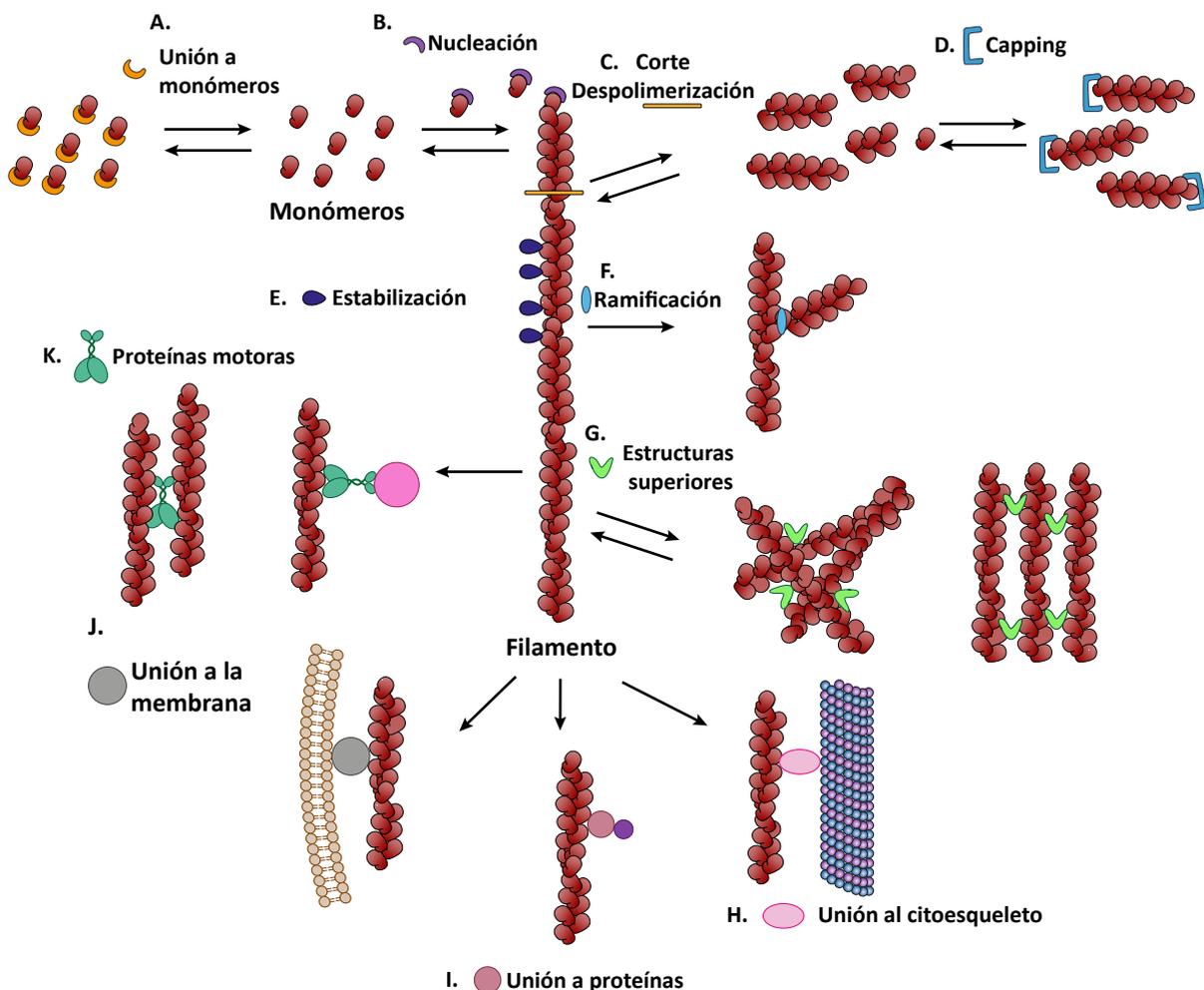


Figura 9. Proteínas unidoras de actina. Visión general de los diferentes tipos de proteínas unidoras de actina que hay. **(A)** Proteínas de unión a monómeros de actina. **(B)** Proteínas de nucleación del filamento. **(C)** Proteínas de corte o despolimerización del filamento. **(D)** Proteínas protectoras o de *capping*. **(E)** Proteínas estabilizadoras del filamento. **(F)** Proteínas ramificadoras. **(G)** Proteínas formadoras de estructuras superiores como haces y redes. **(H)** Proteínas que enlazan diferentes polímeros del citoesqueleto. **(I)** Proteínas que une el citoesqueleto a otras proteínas. **(J)** Proteínas de unión a la membrana plasmática. **(K)** Proteínas motoras.

2.2.3 Funciones del citoesqueleto de actina

Como se ha comentado en los apartados anteriores, la F-actina participa en numerosas interacciones proteína-proteína y tiene un papel central en muchas funciones celulares relacionadas entre sí que contribuyen a una homeostasis celular, entre las que se encuentran la motilidad, la endocitosis, el transporte de orgánulos, el mantenimiento de la forma, el ciclo celular y la INM (Pollard & Cooper, 2009).

Mantenimiento de la forma: La corteza celular es una red delgada de actina que se encuentra debajo de la membrana plasmática. Está constituida por diferentes ABPs que generan tensiones en la

red que determinarán la morfología celular. Además, la reorganización de esta actina permite que las células se adapten al entorno y a cambios internos que impliquen alteraciones en la morfología (Chalut & Paluch, 2016).

Motilidad: Los filamentos de actina son esenciales para la locomoción celular, un proceso implicado en gran variedad de funciones biológicas como el desarrollo embrionario, el cierre de heridas o la respuesta inmune (Pollard & Cooper, 2009). El ensamblaje de filamentos de actina puede ser suficiente para cambiar la forma celular y produce estructuras de locomoción como los filopodios, los lamelipodios y las ondulaciones de membrana; los cuales son las estructuras principales que impulsan la motilidad (Svitkina, 2018).

Endocitosis: La endocitosis incluye una serie de procesos por los cuales las células internalizan segmentos de su membrana plasmática, encerrando en vesículas una amplia variedad de material desde el exterior de la célula. La endocitosis puede contribuir a la absorción de nutrientes, la regulación de las moléculas de señalización, el control de la presión osmótica y la función de las sinapsis. El ensamblaje de actina contribuye a la creación de protuberancias que abarcan materiales extracelulares. La actina también puede apoyar los procesos de invaginación de un segmento de membrana hacia el citoplasma, el alargamiento de la invaginación, la escisión de la nueva vesícula desde la membrana plasmática y el movimiento de la vesícula fuera de la membrana (Mooren et al., 2012).

Transporte intracelular: Otra característica de las células es el movimiento dinámico de sus componentes internos. La motilidad intracelular se utiliza para organizar los orgánulos y colocarlos donde se necesiten, además de transportar otros contenidos celulares como vesículas intracelulares a través de las proteínas motoras, las miosinas. El citoesqueleto de actina se usa como pistas para el movimiento de carga celular a corta distancia (Titus, 2018).

Ciclo celular: El citoesqueleto de actina en las células eucariotas está sometido a cambios durante el ciclo celular. Normalmente, las células en interfase tienen una extensa red de actina que se desmantela y ajusta rápidamente cuando la célula entra en mitosis, dándole a las células su característica forma redonda. Al final de la mitosis, la actina forma un anillo contráctil, fundamental para la separación de la célula madre en dos células hijas (citocinesis). Además, el citoesqueleto de actina tiene un papel importante en la separación y condensación de cromosomas y en la orientación del huso mitótico durante la mitosis (Heng & Koh, 2010; Moore & Vartiainen, 2017).

Migración nuclear intercinética: En epitelios pseudoestratificados se conoce como INM a la migración del núcleo de los progenitores neurales en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentran a lo largo del eje apicobasal. Esta migración está regulada por el citoesqueleto de actina

en ambas direcciones, de apical→basal y de basal→apical (H. Lee & Norden, 2013; Taverna & Huttner, 2010).

Adhesión: La adhesión entre células epiteliales es esencial para el empaquetamiento y la respuesta celular de forma coordinada. Una correcta adhesión celular es requerida para el desarrollo embrionario; incluyendo el establecimiento de los límites de los tejidos, cambios en la forma de los tejidos, migración y formación de la sinapsis. En todos estos procesos la arquitectura de la dinámica celular es conseguida y mantenida a través de interacciones célula-célula y célula-matriz donde el citoesqueleto de actina tiene un importante papel (Bachir et al., 2017)

Como hemos visto, el citoesqueleto de actina está implicado en múltiples funciones celulares; sin embargo, en la presente tesis fijaremos nuestra atención en la implicación de la vinculina, una ABP implicada en la adhesión celular, en el ciclo celular y la INM durante el desarrollo del sistema nervioso en el embrión de pollo.

3. Adhesión celular

El desarrollo de cualquier organismo multicelular es imposible sin una adhesión adecuadamente regulada. Procesos como la compactación embrionaria, la determinación de destino celular, la morfogénesis y la organogénesis después del desarrollo temprano, están mediados por un equilibrio dinámico que depende de las uniones intercelulares (Jamora & Fuchs, 2002). La capacidad de las células para interactuar entre sí y con su entorno de manera coordinada depende de múltiples interacciones adhesivas entre células vecinas (uniones célula- célula) y con la ECM (uniones célula-matriz). Estas interacciones son vitales para la formación, la composición, la arquitectura y la función de los tejidos (McEver & Luscinskas, 2018).

Dentro de las uniones célula-célula, situadas en las superficies laterales de las células, encontramos: 1) las **uniones adherentes**, con las cadherinas clásicas como moléculas de adhesión y que se unen al citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras como las cateninas y la vinculina. 2) las **uniones estrechas o de oclusión**, que mantienen las células juntas, sellando la brecha entre ellas y evitando así que las moléculas se filtren a través del epitelio. Las proteínas transmembrana conocidas que forman uniones estrechas son las claudinas y las ocludinas, y están unidas al citoesqueleto de actina a través de proteínas ZO. Este tipo de uniones también proporcionan sitios de anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana citoplasmática. Dentro de las uniones célula-célula también están 3) los **desmosomas**, que están formados por las cadherinas desmosomales llamadas desmocolinas y desmogleínas, y que están unidas a los filamentos intermedios a través de la desmoplaquina y 4) las uniones comunicantes o **Gap junctions**, que conectan las células a través de canales intracelulares que

permiten la transferencia de iones y moléculas pequeñas. Por otra parte, dentro de las uniones célula-matriz encontramos: 1) las **adhesiones focales** con las integrinas como moléculas de adhesión, que fijan las células a la ECM a través de filamentos de actina usando proteínas adaptadoras como la talina, la filamina y la vinculina y 2) los **hemidesmosomas**, que también están formados por integrinas pero que se anclan a la ECM a través de filamentos intermedios (**Figura 10**; Alberts, 2016).

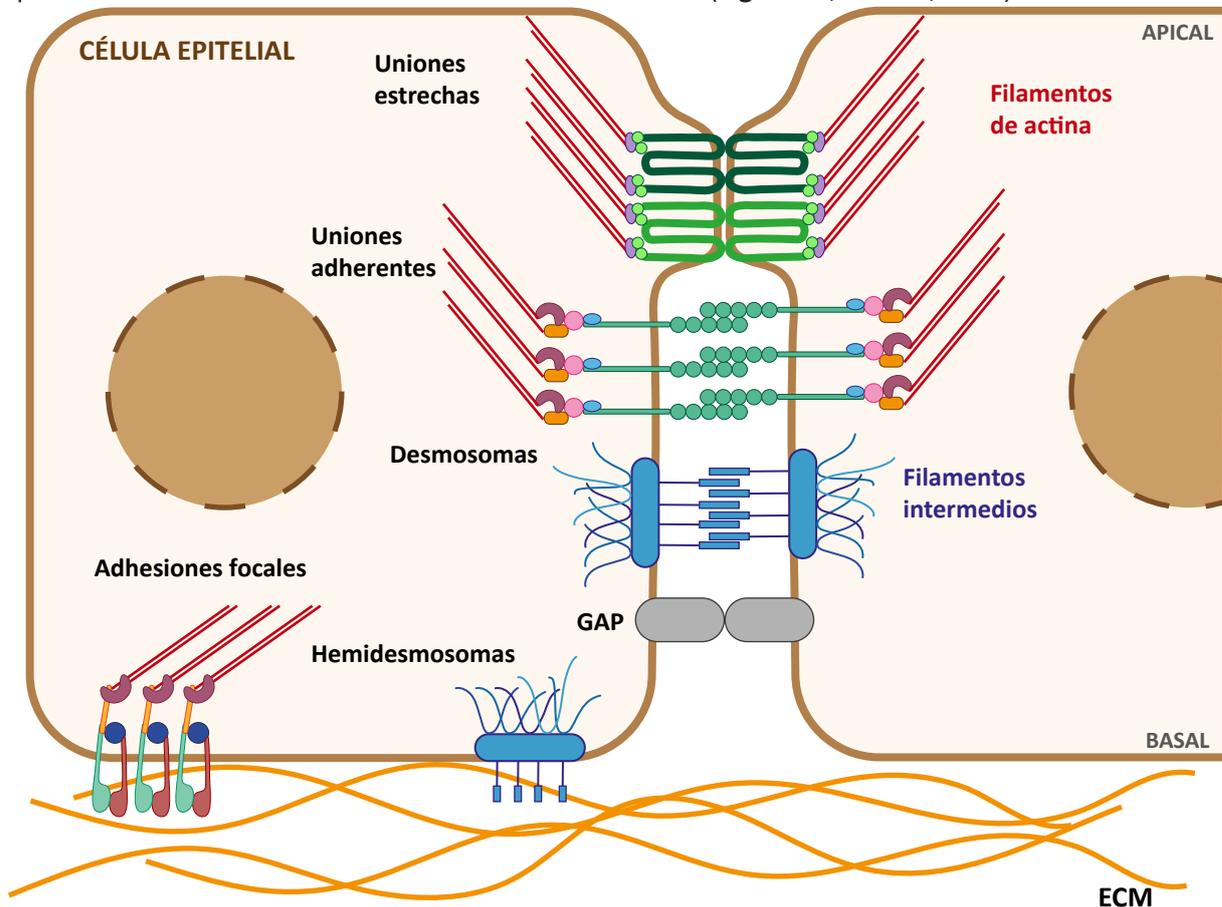


Figura 10. Adhesiones celulares. Los complejos de adhesión son especialmente abundantes en los tejidos epiteliales. La superficie apical del epitelio está expuesta al medio ambiente o al lumen, mientras que la superficie basal está en contacto con la ECM. En todas las uniones celulares hay proteínas transmembrana o receptores de adhesión que interactúan con proteínas similares en las células adyacentes o con los componentes de la ECM a través de su dominio extracelular. Seis tipos de uniones se muestran en esta figura. En primer lugar, las uniones estrechas sellan las células adyacentes y están conectadas al citoesqueleto de actina. En segundo lugar, las uniones adherentes son uniones célula-célula que están formadas por las cadherinas clásicas, también unidas al citoesqueleto de actina. Tercero, los desmosomas son uniones célula-célula que están formadas por las cadherinas desmosomales y se unen a los filamentos intermedios. Cuarto, las uniones comunicantes o *Gap junctions* que forma canales de comunicación entre células. Quinto, las adherencias focales son uniones célula-matriz que están formadas por las integrinas y que están unidas a los filamentos de actina a través de proteínas adaptadoras como la talina, la filamina y la vinculina. Y, en sexto lugar, los hemidesmosomas que son uniones célula-matriz que están formadas por las integrinas y están unidas a los filamentos intermedios.

Más concretamente, el desarrollo del sistema nervioso requiere un equilibrio complejo entre la proliferación de los progenitores neurales, la diferenciación de los tipos celulares correctos y la posterior migración de estas células. Esta coordinación es crucial para asegurar el desarrollo del sistema nervioso (Long & Huttner, 2019). Al igual que en otras células epiteliales, los progenitores neurales del tubo neural también presentan uniones célula-célula y uniones célula-matriz. En cuanto a las uniones asociadas al citoesqueleto de actina; en la membrana basal se encuentran las adhesiones focales y en la membrana apical están las uniones adherentes (Kasioulis & Storey, 2018). Es cierto que durante los primeros estadios del desarrollo los progenitores neurales también presentan uniones estrechas en el complejo apical, sin embargo, a medida que avanza el desarrollo, éstas se pierden y la ZO1 pasa a asociarse con las uniones adherentes (Aaku-Saraste et al., 1996). Por ese motivo vamos a profundizar en el papel de las adhesiones focales y sobretodo en las uniones adherentes, las cuales son el foco principal de la presente tesis.

3.1 Adhesiones focales

La ECM proporciona los andamios de soporte celular que están presentes en todos los órganos y tejidos. Esta matriz es una mezcla compleja de moléculas que incluyen fibronectinas, colágenos, lamininas, tenascinas, trombospondinas, proteoglicanos y proteínas no matriciales, incluidos los factores de crecimiento. La adhesión celular a la ECM media las interacciones directas de las células con su entorno (Berrier & Yamada, 2007; Wiese & Faissner, 2015). Durante el desarrollo neuronal temprano, se ha demostrado que la ECM y sus receptores celulares proporcionan soporte estructural al tejido, en forma de membrana basal, pero también regulan procesos como el mantenimiento del estado progenitor, la neurogénesis y la delaminación neuronal y por tanto juegan un importante papel en el desarrollo embrionario (Long & Huttner, 2019).

Como hemos visto anteriormente, hay diferentes tipos de uniones célula-matriz y, dentro de ellas, encontramos a las adhesiones focales, que son aquellas adhesiones que conectan la ECM y la célula a través del citoesqueleto de actina (Lock et al., 2008). Para unirse a la ECM, las células utilizan, principalmente, la familia de las integrinas como receptores de membrana; donde la interacción entre la integrina y la ECM promueve la formación de complejos de adhesión que unen la ECM y el citoesqueleto de actina. Todas las integrinas son moléculas heterodiméricas compuestas por una subunidad α y otra β , unidas de forma no covalente (Hynes, 1992). En los vertebrados se han identificado 18 subunidades α y 8 subunidades β que pueden dar lugar hasta a 24 heterodímeros diferentes (Conway & Jacquemet, 2019). Ambas subunidades son proteínas transmembrana que contienen grandes dominios extracelulares, a través de los que interaccionan con los diferentes componentes de la ECM, y dominios citoplasmáticos cortos, a través de los cuales forman complejos multimoleculares con proteínas involucradas

en la señalización celular y con proteínas involucradas en la conexión con el citoesqueleto de actina (Berrier & Yamada, 2007).

Las adhesiones focales están organizadas en diferentes dominios funcionales donde se distribuyen las diferentes proteínas que actúan como puente entre las integrinas y el citoesqueleto de actina. En primer lugar, encontramos las proteínas de unión a la integrina. En este grupo está la talina, que se une directamente a las integrinas y es importante para la activación y señalización de ésta. Además, la paxilina y la FAK contribuyen a la señalización de la integrina cerca de la membrana. En segundo lugar, están las proteínas adaptadoras o de andamiaje que enlazan las proteínas de unión a las integrinas con el citoesqueleto de actina. En este grupo también podría incluirse a la talina de nuevo, ya que, junto con la vinculina, se encarga de la transmisión de la fuerza de la adhesión a través de su unión al citoesqueleto de actina. Se ha observado que la vinculina refuerza la unión integrina-talina-actina. Finalmente, en las localizaciones más distales de la membrana las diferentes ABPs, entre las que se encuentra la α -actinina, se encargan de la estabilización de la agrupación de filamentos de actina, que también se encuentran en esa capa, y del fortalecimiento de la adhesión (Figura 10; Giannone, 2015; Kanchanawong et al., 2010).

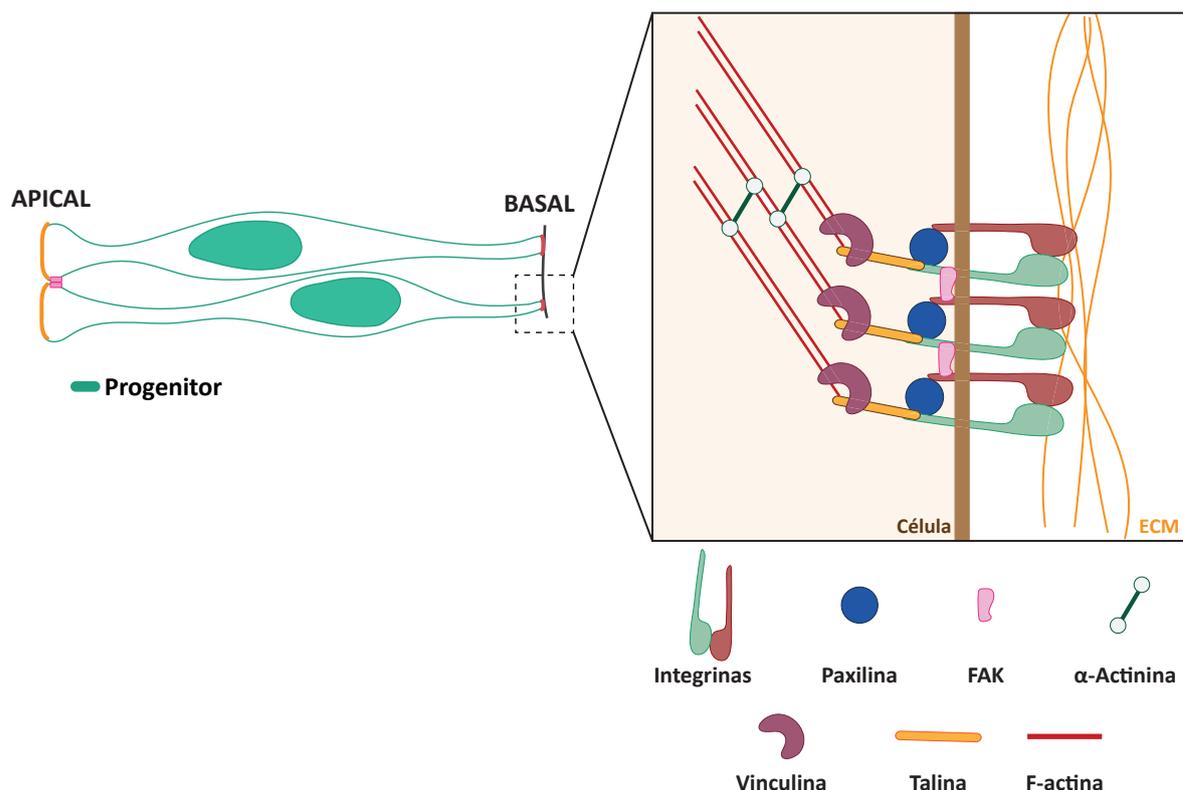


Figura 11. Adhesiones focales en el neuroepitelio. Las adherencias focales proporcionan un enlace tanto estructural como de señalización entre la ECM y el citoesqueleto de actina. Estas adhesiones se encuentran en la parte basal del neuroepitelio. La adhesión celular a la ECM, a través de heterodímeros de integrinas transmembrana, conduce a la activación de la integrina y al reclutamiento de diferentes proteínas intracelulares.

Las adhesiones focales son estructuras altamente dinámicas que aumentan o disminuyen de tamaño debido al recambio de sus proteínas en respuesta a las tensiones mecánicas cambiantes que se producen en la ECM. Las integrinas proporcionan un mecanismo de transmisión de información entre las células y la ECM. Las señales extracelulares son capaces de controlar la tensión interna promoviendo la formación de más uniones, la polimerización de actina y la contracción de la actomiosina. Inversamente, las señales intracelulares pueden inducir cambios en la conformación y activación de integrinas y remodelación de la ECM (Berrier & Yamada, 2007).

La ECM puede alterar la forma de los progenitores neurales y neuronas. Diferentes estudios muestran que alteraciones en proteínas de la ECM o en las integrinas provocan desprendimientos basales que derivan en la pérdida de bipolaridad de los progenitores (Haubst et al., 2006). La ECM no sólo contribuye a la regulación de la forma celular, sino que también interviene en el movimiento de las células durante la migración de las células de cresta (Perissinotto et al., 2000), así como en la delaminación neuronal (Franco & Müller, 2012). Además, diferentes estudios han relacionado el comportamiento celular de los progenitores neurales y las neuronas con la ECM y las integrinas (Long & Huttner, 2019). Se ha observado que alteraciones en algunos componentes de la ECM provoca alteraciones en la membrana basal que conduce a una sobreexpansión del neuroepitelio (Girós et al., 2007) e incluso controlan la proliferación de las células neuroepiteliales. Por ejemplo, una reducción en la proteína syndecan-4 (un proteoglicano de la ECM), provoca un incremento en la tasa de proliferación, mientras que su sobreexpresión causa un descenso en esta proliferación (Luo et al., 2016). Algo similar se observó con la integrina $\beta 1$, donde una delección resultó en una reducción de la proliferación de progenitores y a su vez un incremento en la expresión provocó un aumento en la proliferación (Long et al., 2016). La ECM también puede afectar a la morfología celular en diferentes escalas, desde células individuales hasta tejidos completos (Long & Huttner, 2019).

3.2 Uniones adherentes

Los contactos adhesivos entre las células proporcionan un sistema de anclaje físico que es esencial para una comunicación intercelular efectiva, la cual garantiza el desarrollo y la supervivencia de todo el organismo. Varios procesos dentro del desarrollo como el mantenimiento de la forma, la especificación celular, la morfogénesis y la organogénesis de los tejidos, dependen de una correcta adhesión celular (Stepniak et al., 2009). En los progenitores neurales podemos encontrar uniones adherentes, uniones célula-célula dependientes del citoesqueleto de actina, en la membrana lateral del complejo apical (Arai & Taverna, 2017).

Las uniones adherentes median una adhesión fuerte entre células y están formadas por interacciones complejas y altamente dinámicas entre tres clases de proteínas: 1) Receptores de adhesión, las cadherinas, que median la unión adhesiva entre células vecinas. 2) Una red de citoesqueleto de actina que ancla el complejo de adhesión y 3) complejos proteicos citoplasmáticos que unen los receptores a la actina y traducen la señal: las cateninas (α -catenina, β -catenina y catenina-p120) y las ABPs entre las que encontramos la α -actinina, la eplina y la vinculina, entre otras (Halbleib & Nelson, 2006).

Las cadherinas clásicas o de tipo I, son proteínas transmembrana que se clasifican en función del tejido donde presentan una mayor expresión. Dentro de este grupo de cadherinas que participan en las uniones adherentes encontramos: la N-cadherina (neural), la E-cadherina (epitelial), la P-cadherina (placenta), la VE-cadherina (vascular endotelial), la R-cadherina (retina) y la K-cadherina (riñón). Cada tipo celular puede presentar otros tipos de cadherina expresados en menor medida. Podemos encontrar un ejemplo de esto en el desarrollo del tubo neural, donde en sus primeros estadios se expresa la E-cadherina, pero a medida que se va formando el tubo neural los progenitores neurales expresan la N-cadherina (Stepniak et al., 2009). La N-cadherina está compuesta por una parte extracelular, que tienen 5 dominios extracelulares a través de los cuales forman homodímeros dependientes de Ca^{2+} con otras cadherinas de células adyacentes (Halbleib & Nelson, 2006).

A través de su dominio intracelular, la N-cadherina interacciona con una serie de proteínas que actúan como puente entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina. En este grupo de proteínas encontramos la catenina p120, que actúa para estabilizar las cadherinas en la superficie celular (Reynolds & Carnahan, 2004) y la β -catenina, que proporciona un enlace a la α -catenina que a su vez interacciona con el citoesqueleto de actina, promoviendo así la agrupación de proteínas en la unión adherente y la estabilización de la adhesión celular. Debido a que la unión de la α -catenina con la actina y con la β -catenina es excluyente, es poco probable que la α -catenina pueda unirse directamente y sin asistencia de otras ABPs con el citoesqueleto de actina (Yamada et al., 2005). En cambio, puede vincularse indirectamente a través de otras proteínas como la α -actinina, la eplina, la afadina y la vinculina, entre otras (**Figura 12**; Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). La capacidad de los componentes centrales de las uniones adherentes para reorganizar el citoesqueleto de actina hace que el ensamblaje de los complejos de adhesión y las proteínas asociadas sea un proceso dinámico, que permite la reorganización espacial de las células durante el desarrollo embrionario (Stepniak et al., 2009).

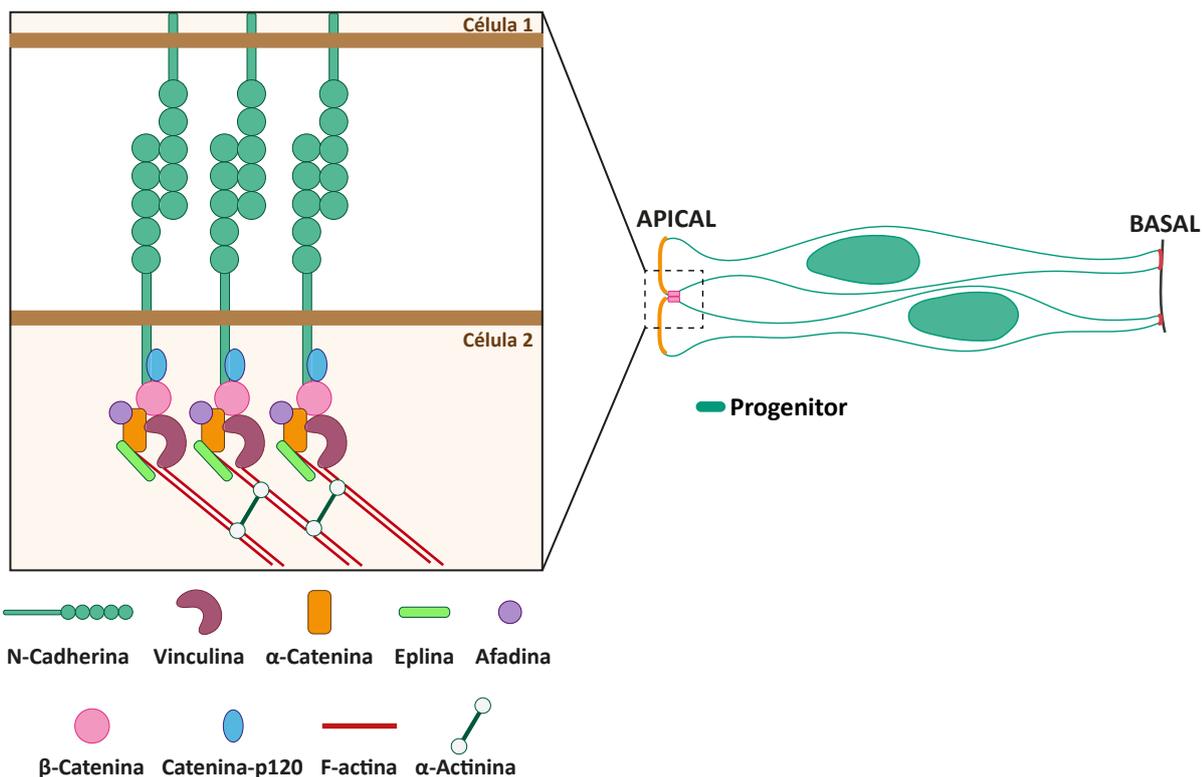


Figura 12. Uniones adherentes en el neuroepitelio. Las uniones adherentes median la interacción entre células adyacentes a través del citoesqueleto de actina. Estas adhesiones se encuentran en la membrana apical del neuroepitelio. Las cadherinas median esta adhesión uniéndose a las cadherinas de las células vecinas a través de su dominio extracelular. A través de su dominio intracelular, la N-cadherina, interacciona con diferentes proteínas que la conectan al citoesqueleto de actina.

La morfología altamente polarizada de los progenitores neurales es un requisito obligatorio para el desarrollo embrionario exitoso, ya que tiene funciones relevantes en la división celular, la producción neuronal, la especificación y la migración, además de en la integridad de la membrana apical (Veeraval et al., 2020). A lo largo del desarrollo, las uniones adherentes experimentan una remodelación constante a medida que los progenitores se dividen. Este proceso se acompaña de una remodelación dramática del citoesqueleto que facilita los cambios en la forma y la motilidad de las células, por lo que es esencial que las uniones resistan las tensiones mecánicas ejercidas como consecuencia de estos comportamientos (Jamora & Fuchs, 2002). Por ese motivo, alteraciones en el patrón de expresión de componentes de las uniones adherentes en el embrión en desarrollo, a menudo, conducen a defectos importantes, que reflejan su papel tanto en la señalización como en la adhesión mecánica (Stepniak et al., 2009). La ausencia o alteración de proteínas relacionadas con las uniones adherentes, como la N-cadherina, la α -catenina, la β -catenina y la afadina entre otras, provocan pérdidas de adhesión y de polaridad en los progenitores neurales, además de un incremento en la muerte celular, que conduce a

malformaciones en el sistema nervioso en embriones de ratón, (Gil-Sanz et al., 2014; Kadowaki et al., 2007; Lien, 2006; Machon et al., 2003; Radice et al., 1997; Schmid et al., 2014; Yamamoto et al., 2013)

Como en todos los epitelios, la fuerza adhesiva del neuroepitelio está determinada por la interacción entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina la cual también regula la tensión de la unión a través de la contractibilidad de la actomiosina (Yap et al., 2018). La fuerza adhesiva depende de la renovación continua del citoesqueleto de actina y la contractibilidad de la actomiosina regula la tensión de la unión y, por lo tanto, la resistencia al estrés (Priya & Yap, 2015; Yap et al., 2018). La presencia de defectos en la remodelación de actina o en la miosina II, impulsor de la contractibilidad, también conducen al desensamblaje de las uniones adherentes, pérdidas de morfología y perturbaciones en la citoarquitectura del neuroepitelio (Lian & Sheen, 2015). Además, la contractibilidad de actomiosina desempeña un papel esencial en el proceso de abscisión apical de las neuronas recién nacidas (Das & Storey, 2014).

Además de ser importantes para el mantenimiento del estado progenitor, manteniendo los contactos adhesivos entre los progenitores neurales, las uniones adherentes tienen un papel en la neurogénesis. La neurogénesis exitosa se basa en el equilibrio entre el ensamblaje y el desmontaje de las uniones adherentes. Durante la división simétrica y asimétrica, la adquisición de componentes de unión permite que las uniones adherentes se vuelvan a ensamblar en hijas progenitoras, manteniendo la polaridad y su integración en el neuroepitelio. Por el contrario, el compromiso con el destino neural está estrechamente coordinado con la regulación de los componentes adhesivos, lo que permite el desprendimiento de la superficie apical (Das & Storey, 2014; Veeraval et al., 2020). Por ese motivo, además de las alteraciones anteriormente mencionadas es frecuente observar fallos en la salida del ciclo celular y alteraciones en la neurogénesis al eliminar componentes de las uniones adherentes en el neuroepitelio (Lien, 2006; Stocker & Chenn, 2015; Woodhead et al., 2006).

Queda remarcada pues, la importancia de la adhesión celular en el desarrollo embrionario y su participación en procesos fundamentales como la morfogénesis, la migración, el mantenimiento del estado progenitor, la diferenciación, la apoptosis y el ciclo celular.

4. Ciclo celular

Uno de los principios básicos de la biología es que todas las células surgen de una célula preexistente, siendo la reproducción celular un proceso esencial para el sustento de la vida. El ciclo celular comprende una serie de eventos celulares coordinados que conducen a la duplicación del ADN y a la división celular con el objetivo de generar dos células hijas. En las células eucarióticas, el ciclo celular

consta de una serie de etapas por las que las células van pasando cronológicamente hasta que se produce la división.

Básicamente, el ciclo celular se divide en dos etapas funcionales: la interfase y la **fase M** (Morgan, 2007). La interfase se refiere a la etapa que tiene lugar entre dos fases M consecutivas. Es el tiempo que una célula necesita para crecer, duplicar su contenido y prepararse para la próxima división. La interfase se puede dividir en tres etapas: **G1**, **S** y **G2**. La **fase G1** comienza justo después de la división celular y se considera la primera fase del ciclo celular. Durante esta fase la célula desarrolla una intensa actividad metabólica, aumentando su tamaño y generando nuevos orgánulos y enzimas necesarias para la siguiente fase. Uno de los elementos importantes de ciclo celular son los centrosomas. Los centrosomas funcionan como centros organizadores de microtúbulos y están implicados en diferentes etapas del ciclo celular. Durante la fase G1, la célula tiene un solo centrosoma, formado por una pareja de centriolos y por la PCM (Nigg & Holland, 2018). Además de ser la primera fase de crecimiento, durante la fase G1, la célula comprueba que las condiciones para la división son favorables. Si la célula recibe señales desfavorables del entorno puede salir del ciclo celular y entrar en un estado de reposo conocido como **G0**. Si las señales son favorables, la célula pasa a la **fase S** o fase de síntesis del ADN, período en el que la célula duplica su contenido de ADN y los centriolos. Al final de esta fase, la célula contiene un conjunto duplicado de cromosomas en pares estrechamente asociados, llamados cromátidas hermanas, y cuatro centriolos. Cuando todo el material se ha duplicado, la célula entra en la **fase G2**, la segunda etapa del crecimiento celular y también el momento en que las células se preparan para la división y verifican se no se hayan producido errores ni daño en el ADN (Morgan, 2007).

El segundo período principal del ciclo celular, donde se lleva a cabo la división celular, es la **fase M**. Esta fase está constituida por dos eventos principales: la división nuclear, llamada **mitosis**, y la división celular, llamada **citocinesis**. La mitosis es una fase compleja en la que se produce la segregación equitativa de los cromosomas duplicados entre las dos células hijas. Para hacerlo, las células reorganizan sus microtúbulos para construir el huso mitótico. La mitosis es un proceso que se organiza en cinco etapas denominadas: **profase**, **prometafase**, **metafase**, **anafase** y **telofase**; que se clasifican en función del estado de los cromosomas y el comportamiento del huso mitótico, observables mediante microscopía. Durante la mitosis temprana, en la **profase**, los cromosomas replicados se condensan y los centrosomas, pierden su cohesión y se separan hacia los polos opuestos del núcleo, participando en la reorganización de los microtúbulos, en la formación del huso mitótico y en su orientación. La descomposición de la envoltura nuclear establece el punto de partida de la **prometafase**, donde los microtúbulos del huso mitótico se unen a las cromátidas hermanas en una estructura especializada, el cinetocoro, que se sitúa en el centrómero de los cromosomas y migran hacia su región central. La **metafase** es la etapa definida por la alineación de las cromátidas hermanas en el ecuador de la célula

y el huso muestra su simetría bipolar característica con centrosomas ubicados perpendicularmente a la placa metafásica o plano ecuatorial. La separación de los cromosomas señala el inicio de la **anafase**, las dos cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula guiadas por los microtúbulos que componen el huso mitótico. A continuación, los polos del huso se separan más uno del otro, completando la segregación de las cromátidas hermanas en las dos mitades de la célula en división. La mitosis concluye con la **telofase** cuando los cromosomas se descondensan y se empaquetan en dos núcleos hijos idénticos. El huso se desmonta, dejando un único centrosoma asociado con cada conjunto de cromosomas. Justo después de la mitosis, la célula se divide en dos, en un proceso llamado **citocinesis**, y cada célula hija hereda uno de los dos núcleos, un centrosoma único y una porción aproximadamente igual de macromoléculas y orgánulos citoplasmáticos. El primer signo visible de la citocinesis en células animales es la aparición de un pliegue en la membrana citoplasmática. Esta invaginación se produce en un plano perpendicular al eje longitudinal del huso mitótico. Durante la anafase se forma un anillo contráctil de actina unido a la cara interna de la membrana celular que está compuesto por haces contráctiles de actina y por la proteína motora miosina II. La contracción gradual de este anillo resulta en un surco de escisión que rodea la célula y finalmente la divide en dos (**Figura 13**; Morgan, 2007).

La duración de las distintas fases del ciclo varía considerablemente de unos tipos celulares a otros. Incluso en el tubo neural, la duración del ciclo varía en función de la posición dentro del tubo neural y la edad del neuroepitelio. En los estadios del tubo neural de pollo analizados en la presente tesis (HH19), la fase G1 tiene una duración de 6 ± 1 h; la fase S y la fase G2 tiene una duración conjunta de $5,5 \pm 1$ h y finalmente la fase M de 0.5h (Kicheva et al., 2014; Molina & Pituello, 2017). Este neuroepitelio es un epitelio pseudoestratificado y, como ya se ha mencionado anteriormente, los progenitores neurales presentan un movimiento nuclear oscilatorio sincronizado con la progresión del ciclo celular conocido como INM. Analizaremos este movimiento en detalle más adelante.

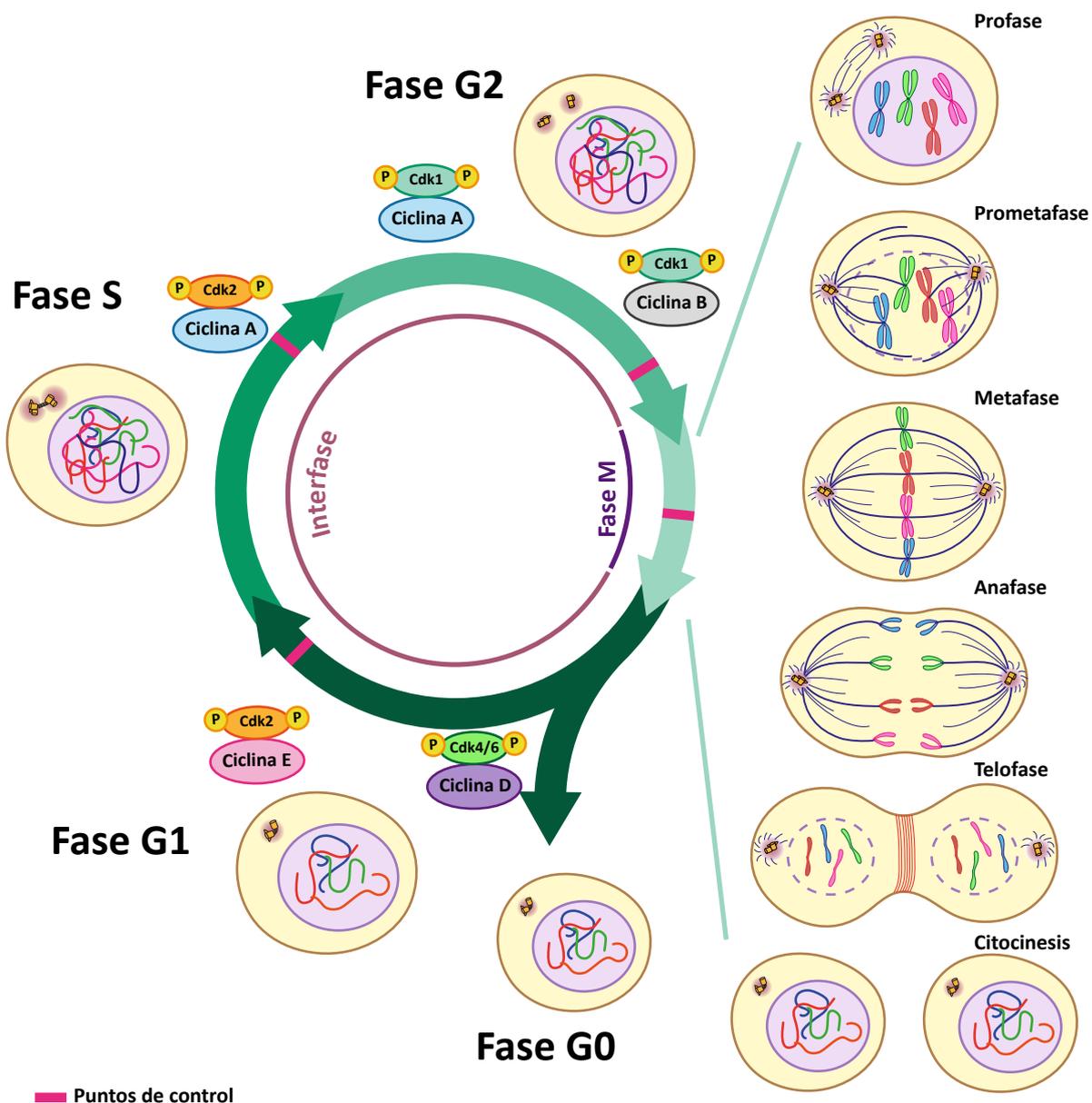


Figura 13. Ciclo celular. Resumen esquemático del ciclo celular. El ciclo celular se compone de 4 fases: G1, S y G2, correspondientes a la interfase celular, y la fase M o mitosis. La progresión del ciclo celular está controlada por complejos ciclina-Cdk específicos en las diferentes fases. El ciclo celular se controla en diferentes puntos de restricción. El punto de restricción en la fase G1 tardía se define como un punto sin retorno en G1, momento en el cual la célula se compromete a ingresar al ciclo celular. Los puntos de control de daños en el ADN detienen el ciclo celular para permitir la reparación del ADN antes de la replicación (punto de control G1 / S), durante la fase S (punto de control S) o antes de la mitosis (punto de control G2 / M). Durante la mitosis, otro punto de control ensamblaje del huso mitótico y la alineación de los cromosomas.

4.1 Regulación ciclo celular

El ciclo celular se controla de manera precisa en diferentes puntos de restricción y control para garantizar la integridad del material genómico y su distribución adecuada para una división celular correcta. Además de estos puntos de control, la transición entre las fases del ciclo celular ocurre de manera coordinada y está regulada por la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks, del inglés *cyclin-dependent protein kinases*), que se unen a las ciclinas para su activación. La unión de las Cdks a las ciclinas induce cambios conformacionales, permitiendo la activación de las Cdk por fosforilación. La actividad de las Cdks aumenta y disminuye a medida que la célula progresa a través del ciclo celular. Estas oscilaciones conducen directamente a cambios cíclicos en la fosforilación de componentes de la maquinaria del ciclo celular, lo que resulta en el inicio de eventos del ciclo celular. Además, estas oscilaciones impulsan procesos coordinados como la duplicación del centrosoma y el ADN. La activación de las Cdks se produce en puntos específicos del ciclo celular. Durante la fase G1 se activan las Cdk4 y Cdk6 tras su unión a ciclina D. El complejo ciclina D-Cdk4/6 promueve la expresión de genes necesarios para la transición de la fase G1 a S y la progresión a la fase S. La ciclina E se une a la Cdk2 a finales de la fase G1, donde tiene lugar el punto de control G1/S. En este punto de control se evalúa que la célula tenga el tamaño adecuado y que el entorno sea favorable para continuar con el ciclo celular. Una vez superado, las células se comprometen a entrar en la fase S y progresar irreversiblemente hacia la división celular. El complejo ciclina A-Cdk2 controla el inicio de la replicación y la progresión de la fase S. Durante la fase S las células pasan por otro punto de control donde se evalúa la correcta replicación del ADN y donde la activación de la ciclina A-Cdk1 controla la progresión hacia la fase G2. Durante G2 hay otro punto de control que se encarga de evaluar la correcta replicación del ADN antes de la fase M. La progresión hacia la mitosis requiere la activación del complejo ciclina B-Cdk1. Durante la fase M, hay un último punto de control donde se comprueba la correcta formación del huso mitótico y se degradan las ciclinas y proteínas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas por lo que se desencadena la separación y segregación de éstas. Una vez superado este punto de control la fase M finaliza con la citocinesis (**Figura 13**).

Además de la unión a la ciclina, las Cdks están reguladas por fosforilaciones y desfosforilaciones. Las fosforilaciones inhibitorias causadas por las quinasas Myt1 y Wee1 inactivan al complejo Cdk1-ciclina B que es requerido al inicio de la mitosis. Por otra parte, las fosfatasas Cdc25 juegan un papel importante en la activación de ciclina-Cdk al eliminar estos residuos de fosfato inhibitorios, asegurando así la progresión oportuna a través de las diferentes fases del ciclo celular. Hay tres fosfatasas Cdc25 en mamíferos: Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C cuya expresión y actividad están altamente reguladas por diferentes mecanismos, incluyendo la expresión y degradación controlada durante el ciclo celular, ciclos de fosforilación-desfosforilación y localización intracelular. Cdc25A está involucrado principalmente en la

transición G1 / S, mientras que Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C juegan un papel en la transición G2/M. Todos estos componentes, y muchos más, de la maquinaria del ciclo celular funcionan de manera coordinada para promover la progresión del ciclo celular (Molina & Pituello, 2017; Morgan, 2007).

4.2 Ciclo celular y el citoesqueleto de actina

En las células eucariotas el citoesqueleto de actina sufre cambios drásticos durante la división celular. Las células en interfase generalmente contienen una extensa red de actina, pero esta red se desmantela y se reorganiza rápidamente cuando las células entran en mitosis; dando a las células mitóticas su forma redonda característica. En este proceso se han implicado diferentes ABPs como la moesina (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Al final de la mitosis, la actina se reorganiza en el surco de escisión y forma parte del anillo contráctil, fundamental para la citocinesis (Heng & Koh, 2010).

Además de las funciones mecánicas que se han comentado en el apartado 2.2.3 *Funciones del citoesqueleto de actina*, la actina también juega un papel más sutil en la transducción de señales y controla la progresión del ciclo celular a través de su estado de organización en la célula (Heng & Koh, 2010). Diferentes estudios muestran como alteraciones en el citoesqueleto de actina provocan alteraciones en diferentes fases del ciclo celular. El tratamiento con blebistatina, un inhibidor específico de la miosina II no muscular, inhibe la contracción del anillo contráctil, provocando defectos en citocinesis (Straight et al., 2003). La despolimerización de los filamentos de actina por toxinas como la citocalasina D retrasa la progresión del ciclo celular en las fases G2/M; lo que indica que es necesario que el citoesqueleto de actina esté intacto para una eficiente progresión a lo largo del ciclo celular (Heng & Koh, 2010; K. Lee & Song, 2007; Shrestha et al., 2018). Por otra parte, la polimerización excesiva de F-actina por un mutante de WASP o por el fármaco Jasplakinolide, un estabilizador de actina que interfiere en su despolimerización, provocan un aumento de células multinucleadas, lo que sugiere un defecto en la citocinesis (Moulding et al., 2007). También se ha observado que la interrupción del citoesqueleto de actina a través de la sobreexpresión de la cofilina, una ABP implicada en la despolimerización de los filamentos de actina, provoca un arresto del ciclo celular en fase G1 (Y. J. Lee & Keng, 2005).

A parte del estado de organización del citoesqueleto de actina, se ha comprobado que diferentes ABPs están relacionadas con el ciclo celular y que cambian su localización en las diferentes fases del ciclo celular. Entre estas proteínas encontramos en primer lugar a la F-actina, la miosina II, la anilina y la septina que, durante la interfase, tienen una localización en las fibras de estrés pero que, posteriormente, durante la citocinesis pasan a localizarse en el anillo contráctil y son necesarias para que la citocinesis se realice adecuadamente (Heng & Koh, 2010; Joo et al., 2007; Piekny & Glotzer, 2008). También la cortactina, distribuida ubicuamente en la célula en interfase, cambia su localización durante

la mitosis donde se localizan en los centrosomas y tiene un papel esencial para la separación de los mismos (W. Wang et al., 2008). Las GTPasas pequeñas pertenecientes a la familia Rho están implicadas en la regulación y remodelación del citoesqueleto de actina y son importantes en procesos como la motilidad celular, la morfogénesis y la endocitosis (Sit & Manser, 2011). Además de estas funciones, las diferentes Rho GTPasas regulan la progresión del ciclo celular. La inhibición de Cdc42, Rac1 y RhoA da como resultado la detención del ciclo celular en la fase G1 (Olson et al., 2016; Villalonga & Ridley, 2006). También se ha demostrado la implicación de estas GTPasas en la citocinesis (Miller & Bement, 2009).

Hasta hace relativamente poco, se pensaba que el papel de la actina en la fisiología celular estaba relegado exclusivamente al citoplasma. Aunque hace bastante tiempo que se informó de la presencia de actina en el núcleo (Lane, 1969), esta afirmación fue controvertida durante años debido a varios estudios que indicaban que la faloidina no tiñe filamentos dentro del núcleo (Sanger et al., 1980). Sin embargo, numerosos estudios desde entonces han demostrado que la actina está presente en el núcleo de una variedad de organismos eucariotas (Clark & Merriam, 1977; Kapoor & Shen, 2014; Wada et al., 1998). Curiosamente, este conjunto de actina polimérica existe en una conformación no canónica que impide la unión a la faloidina, a diferencia de la F-actina citoplasmática (Gieni & Hendzel, 2009; Jockusch et al., 2006). Por ese motivo, un nuevo campo emergente ha comenzado a descubrir roles para la actina dentro de los límites del núcleo (Klages-Mundt et al., 2018). Ahora es evidente que la actina y las proteínas relacionadas con la actina son críticas para una amplia variedad de procesos nucleares, particularmente en aquellos que modulan varios aspectos de la dinámica de la cromatina (Castano et al., 2010; Klages-Mundt et al., 2018; Percipalle & Vartiainen, 2019).

La actina nuclear se une a factores de transcripción y está implicada en la regulación transcripcional; incluida la activación y el silenciamiento de genes, así como el procesamiento y empalme de ARN. Además, se ha demostrado que la actina nuclear se une a las tres clases de complejos de ARN polimerasa (Miralles & Visa, 2006). La actina nuclear actúa junto con la miosina nuclear I para impulsar estos procesos relacionados con la transcripción. De hecho, se ha observado que los fármacos que evitan la polimerización como citocalasina B y latrunculina interrumpen severamente la transcripción (Ye et al., 2008).

Investigaciones recientes han revelado que la actina nuclear también juega un papel importante en los procesos de reparación del ADN (Andrin et al., 2012; Belin et al., 2015; Caridi et al., 2019; Hurst et al., 2019; Schrank et al., 2018). Además, muchos factores de reparación como Mre11, Rad51 y Ku70/80 se asocian con la actina polimerizada *in vitro*, por lo que se ha sugerido que la actina puede ayudar a reclutar o estabilizar estos factores de reparación en el sitio del daño (Andrin et al., 2012). Aun a falta del mecanismo detallado subyacente a los filamentos de actina nuclear en la reparación del

ADN, se sabe que diversas ABP controlan la polimerización de la actina en respuesta al daño del ADN. Los factores de nucleación de actina como la formina y spire-1/spire-2 están vinculados a la reparación del ADN (Belin et al., 2015). También se ha demostrado que varias ABPs como la filamina-A y la cofilina interactúan con las proteínas de respuesta al daño del ADN. En conjunto, estos estudios sugieren que la actina nuclear, probablemente en su estado polimérico, juega un papel importante en varios procesos de reparación del ADN (Belin et al., 2015; Yuan & Shen, 2001).

Las proteínas relacionadas con la actina (Arps) son proteínas que muestran similitudes estructurales y funcionales con la actina convencional. Existen diez subfamilias de Arps que se han caracterizado en eucariotas, Arp1-Arp10, y se ordenan por el grado de similitud con la actina. Mientras que las subfamilias Arp 1–3 y 10 se encuentran típicamente en el citoplasma, las Arps 4–9 se localizan en el núcleo, donde desempeñan papeles vitales en una variedad de procesos metabólicos nucleares (Dion et al., 2010; Oma & Harata, 2011). Entre las funciones nucleares de las Arps, quizás las más notables incluyen el reconocimiento de nucleosomas, la regulación transcripcional y la organización de cromatina de nivel superior (Dion et al., 2010; Meagher et al., 2009; Oma & Harata, 2011). Aunque normalmente se localizan en el citoplasma, tanto Arp2 como Arp3, también puede desplazarse al núcleo donde, como nucleador de actina, el complejo Arp2/3 tienen funciones definidas en la regulación transcripcional, la dinámica de la polimerización de actina y la reparación del ADN (Caridi et al., 2019; Yoo et al., 2007).

De todas las Arps nucleares, es la Arp4 la que desempeña un papel destacado en la regulación de la expresión y transcripción génica (Dion et al., 2010; Meagher et al., 2009; Oma & Harata, 2011). Además, se ha encontrado que la Arp4 y la Arp8 se unen a las histonas centrales, lo que podría sugerir un papel en el control de la estructura de la cromatina, donde regularían la remodelación y la transcripción (Downs et al., 2004; Galarneau et al., 2000; Gerhold et al., 2012; Shen et al., 2003). La Arp4 también parece jugar un papel importante en la progresión adecuada del punto de control del ciclo celular G2 / M, probablemente al garantizar el ensamblaje completo del cinetocoro y la unión de la cohesina (Ogiwara et al., 2007). A pesar de todas estas funciones de Arp4, el resto de Arps nucleares también cumplen funciones dentro del núcleo (Klages-Mundt et al., 2018). La actina y las Arps son componentes clave en varios complejos modificadores de cromatina en diversos organismos donde tienen roles críticos en el establecimiento y ensamblaje del complejo, modulando la dinámica y estructura de la cromatina (Kapoor & Shen, 2014). Además, se han caracterizado combinaciones distintas de actina y Arps en remodeladores de cromatina dependientes de ATP como: INO80, SWR1, SWI / SNF, BAF y RSC (Klages-Mundt et al., 2018).

En la mitosis, los microtúbulos han acaparado toda la atención debido a sus cambios de organización en los diferentes eventos, desde el establecimiento del huso mitótico hasta la captura, alineación y segregación de los cromosomas. Hasta hace poco, los estudios sobre el citoesqueleto de actina durante

la mitosis se habían limitado a su papel durante la citocinesis, sin embargo, diversos estudios muestran su interacción con el huso mitótico y su participación en el ensamblaje de éste (Kita et al., 2019). Alteraciones en el citoesqueleto de actina y/o en miosina II provocan interrupciones en el ensamblaje del huso mitótico y alteraciones en la orientación del mismo (Kaji et al., 2008; Rosenblatt et al., 2004; Woolner et al., 2008). Estos estudios demuestran que la formación del huso mitótico depende en gran medida de las redes de actina dentro de la célula. De hecho, hace tiempo que se informó de la interacción entre los microtúbulos del huso y la F-actina (Maupin & Pollard, 1986). Más recientemente se ha visto que una isoforma de la miosina, la Myo10, interacciona tanto con los microtúbulos como con la F-actina y que la ausencia de la Myo10 causa defectos mitóticos, que incluyen la fragmentación de los polos del huso y el alargamiento de los mismo (Woolner et al., 2008). Estas observaciones sugieren que las estructuras de actina y microtúbulos pueden actuar sinérgicamente en el ensamblaje y posicionamiento del huso mitótico.

5. Migración nuclear intercinética

Las células madre del SNC de los vertebrados, las células neuroepiteliales, presentan dos características notables que están relacionadas: la pseudoestratificación y la INM. La pseudoestratificación hace referencia al hecho de que todas las células neuroepiteliales se extienden desde la superficie luminal (apical) del neuroepitelio a la lámina basal durante todo el ciclo celular, mientras que sus núcleos se encuentran repartidos a lo largo del eje apicobasal del epitelio. Esto le da al tejido la apariencia de tejido pseudoestratificado. INM se refiere al hecho de que los núcleos de los progenitores neurales ocupan posiciones específicas dentro del neuroepitelio, de acuerdo con la fase del ciclo celular en la que se encuentran: la mitosis ocurre en la superficie apical del neuroepitelio y a continuación, los núcleos migran basalmente en la fase G1, de modo que la fase S ocurre en el lado basal. A continuación, migran de basal a apical durante la fase G2, permitiendo que la mitosis ocurra de nuevo en la membrana apical. Por lo tanto, la INM es responsable de la pseudoestratificación del tejido (**Figura 14**; Taverna & Huttner, 2010).

La INM no es un proceso descubierto recientemente. Diferentes investigadores en el siglo XIX sugirieron que el neuroepitelio estaba formado por una población de neuroblastos que se movía hacia el ventrículo para su división (Schaper, 1897). Sin embargo, no fue hasta 1935 cuando Sauer acuñó el término de “migración nuclear intercinética”, a través de un estudio citológico detallado en neuroepiteliales de embriones de pollo y de cerdo (F. Sauer, 1935). A pesar de este hallazgo, tuvieron que transcurrir casi 25 años para que esas características de la INM se demostraran experimentalmente midiendo el contenido de ADN de los núcleos (M. Sauer & Chittenden, 1959) y marcando los núcleos con 3[H]-timidina (que se incorpora al ADN durante la fase S), seguido de una determinación de las posiciones nu-

cleares en el neuroepitelio en varios puntos de tiempo (Fujita, 1962; M. Sauer & Walker, 1959; Sidman et al., 1959). A partir de ahí, muchos laboratorios han contribuido al estudio de este movimiento hasta el concepto que tenemos actualmente de la INM (Spear & Erickson, 2012b).

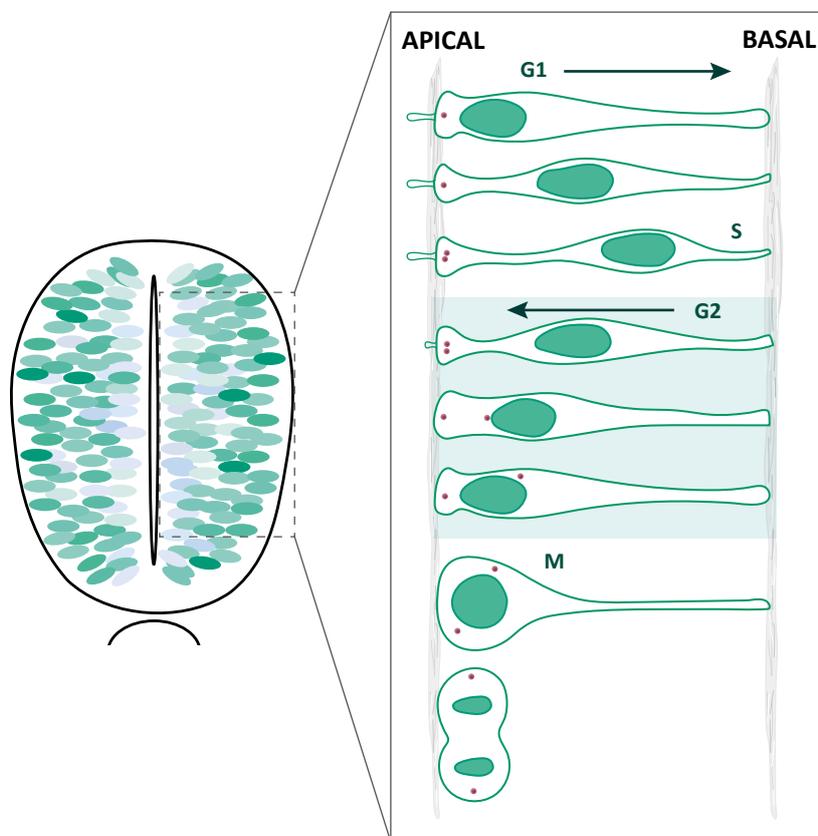


Figura 14. Migración nuclear intercinética. Diferentes localizaciones de los núcleos de los progenitores neurales en el eje apicobasal en una sección transversal de tubo neural. La parte de la derecha muestra el recorrido que experimentan los núcleos en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Los centrosomas y el cilio se encuentran en la superficie apical durante las fases G1-S. En la fase S el centrosoma se duplica y al entrar en fase G2 los centrosomas abandonan la superficie apical después de desmontar el cilio primario. Los centrosomas se mueven hacia el núcleo e inician la mitosis. Después de la mitosis el cilio se vuelve a ensamblar.

A pesar de que la INM fue descrita en el neuroepitelio de vertebrados, este movimiento no se limita a los organismos vertebrados, ni se observa únicamente en el tejido neurales como son el tubo neural (F. Sauer, 1935), la retina (Baye & Link, 2007; Zwaan et al., 1969) o la corteza cerebral (Taverna & Huttner, 2010). Este movimiento se ha observado en diferentes tejidos pseudoestratificados de organismos invertebrados como en los discos imaginales de *Drosophila* y en las capas ectodérmicas de *Nematostella* (una anémona) (Meyer et al., 2011). Además, se ha observado la INM en diferentes tejidos en embriones de vertebrados como el endodermo hepático (Bort et al., 2006) y el epitelio intestinal (Grosse et al., 2011). Diferentes estudios también muestran la presencia de la INM en tejidos adultos como la tráquea y el esófago (Kaneda et al., 2018), el epitelio intestinal (Grosse et al., 2011; Jinguji &

Ishikawa, 1992) y las células ciliadas del oído interno (Tsue et al., 1994). Aunque no todos ellos se han estudiado en detalle, se plantea que puedan existir diferencias significativas en la regulación y función de la INM entre tejidos (Spear & Erickson, 2012b).

5.1 Funciones de la INM

La función de la INM y la división apical durante el desarrollo de los tejidos pseudoestratificados siguen sin estar claros. La mitosis apical puede servir como un medio para organizar todas las células en división espacialmente y para garantizar una proliferación ordenada y eficiente. Por ejemplo, los núcleos de las células mitóticas ocupan más del doble del espacio que los núcleos de las células en interfase y pueden requerir un espacio designado para mantener el orden en los tejidos en crecimiento (Leung et al., 2011; F. Sauer, 1935). Por lo tanto, parece posible que la INM apical sea una forma de utilizar este espacio para la división celular. También se ha propuesto la INM como un mecanismo para la remodelación de diferentes tejidos como por ejemplo durante el cierre del tubo neural (Karfunkel, 1972; Spear & Erickson, 2012b).

Otra posibilidad es que los núcleos de los progenitores deban migrar hacia la membrana apical para alcanzar a los centrosomas, orgánulos clave para la formación del huso mitótico (Doxsey, 2001; Kasioulis et al., 2017; Spear & Erickson, 2012a, 2012b; Taverna & Huttner, 2010; Tsai et al., 2007). En Spear & Erickson, 2012a demuestran que la cromatina se empieza a condensar antes de que el núcleo llegue a la membrana apical. Después de que se inicie la mitosis, el redondeo celular promueve el movimiento rápido para que la célula recorra el resto del camino hacia la superficie apical (Spear & Erickson, 2012a; Strzyz et al., 2015).

Acorde con estos estudios, se ha observado que los centrosomas abandonan la superficie apical durante la fase G2 y alcanzan el núcleo antes de que éste llegue a la membrana apical, en ese momento empieza la condensación de la cromatina y se inicia la mitosis (**Figura 14**; Spear & Erickson, 2012a, 2012b; Taverna & Huttner, 2010). En las células neuroepiteliales, los centrosomas nuclean los cilios que se extienden hacia el lumen del tubo neural (Paridaen & Huttner, 2014; Saade et al., 2018). Se cree que los cilios retienen a los centrosomas en el polo apical hasta el final de la G2; durante G2, los cilios se reabsorben por la acción de la Aurora quinasa A, que se activa en el centrosoma (Portier et al., 2007; Pugacheva et al., 2007) y entonces uno de los dos centrosomas se puede mover lejos de la membrana apical hacia el núcleo (Spear & Erickson, 2012a; Tsai et al., 2010). Una vez cerca del núcleo, comienza la mitosis. Las células mitóticas se redondean y, al hacerlo, se mueven el resto del camino hacia la superficie apical. A continuación, el otro centrosoma también se mueve para localizarse en la posición

óptima para la mitosis. Después de la división celular, los centrosomas se mueven hacia la superficie apical y los cilios comienzan a crecer de nuevo (**Figura 14**; Spear and Erickson, 2012a).

En este contexto, es interesante observar que en la corteza en desarrollo existen diferentes tipos de progenitores neurales y que algunos de ellos, como los basales y subapicales, realizan la mitosis lejos de la membrana apical, aunque es cierto que éstas células no se encuentran ancladas a la membrana apical (Arai & Taverna, 2017). Aunque la función de la INM puede ser que el núcleo y los centrosomas se encuentren durante la mitosis, por otra parte, hay un estudio que demuestra que la localización de los centrosomas no regula la INM. Aquí utilizando el neuroepitelio de retina de pez cebra como modelo, demuestran que, la localización apical de los centrosomas no es un requisito para la migración nuclear apical, ya que, tras perturbar la localización apical de los centrosomas mediante la ablación láser, la migración y la mitosis apical no se ven alteradas (Strzyz et al., 2015). Una indicación de que los centrosomas podrían no ser esenciales para la migración nuclear apical en general proviene de un estudio previo en *Drosophila*. Este estudio mostró que las moscas sin centriolos debido a una mutación en la proteína centrosomal DSas-4, esencial para la replicación de centriolos, se desarrollan relativamente de manera normal (Basto et al., 2006) a pesar de presentar epitelios con INM (Meyer et al., 2011; Rujano et al., 2013).

La división apical también puede ser necesaria para mantener la estructura y / o la polaridad del epitelio. Las adherencias entre las células y las proteínas de polaridad se encuentran en el extremo apical de la célula y son necesarias para el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio (Arai & Taverna, 2017; F. S. Chou et al., 2018). El hecho de que las divisiones sucedan en la superficie apical también permite que las células hijas hereden las uniones adherentes y proteínas de polaridad y, por lo tanto, permanezcan unidas en la VZ (F. S. Chou et al., 2018).

Otros estudios han respaldado el papel de la INM en la determinación del destino celular de los progenitores neurales. La capacidad de las células neuroepiteliales para convertirse en neuronas se confiere por la expresión de genes proneurales. De hecho, es la expresión de estos genes lo que inicia el proceso de diferenciación neuronal. Aunque potencialmente todas las células neuroepiteliales pueden convertirse en neuronas, existe un control fino para asegurar que algunas células continúen dividiéndose mientras que otros precursores se retiran del ciclo celular y se diferencian. Este control es necesario para mantener una población de precursores con la capacidad de generar destinos neuronales tardíos, así como para optimizar el número final de neuronas producidas (Das & Storey, 2012; Del Bene et al., 2008; Latasa et al., 2009; Murciano et al., 2002).

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas derivan de los progenitores neurales y la vía de señalización Delta-Notch juega un papel importante en estas decisiones sobre el destino celular. Las neu-

ronas recién nacidas expresan el ligando Delta1, un modulador de la vía de señalización de Notch, y activan la vía de señalización de Notch en el tejido circundante, manteniendo así a las células vecinas en un estado proliferativo. En el SNC en desarrollo se observa un gradiente de Notch con una mayor expresión en la región apical. Por ese motivo en función de la zona en la que se encuentran los núcleos de los progenitores neurales éstos se encuentran expuesto a diferentes señales neurogénicas. Se ha propuesto que la INM cumple una función vital para una correcta exposición a las diferentes señales de diferenciación (Latasa et al., 2009; Murciano et al., 2002). En concordancia con esta teoría, diferentes estudios muestran como perturbaciones en la INM conducen a defectos en la diferenciación de los progenitores neurales. Tras el bloqueo de la INM con citocalasina B en retina de pez se produjo un aumento de la neurogénesis (Murciano et al., 2002). También la inhibición de la INM con blebistatina en corteza de ratón provoca un aumento en la diferenciación de los progenitores neurales (Schenk et al., 2009). Además, se ha observado que mutaciones en la dinactina, una proteína asociada a microtúbulos, perturba la INM y da como resultado una sobreproducción de neuronas de manera temprana en la retina del pez cebra (Del Bene et al., 2008).

Como ya se ha mencionado, durante la INM se producen dos movimientos diferentes. Inicialmente se lleva a cabo una migración apical (fase G1 y S) y, a continuación, una migración basal (fase G2-M). Al igual que para otros eventos migratorios, no hay duda de que las proteínas motoras asociadas al citoesqueleto cumplen una función vital; inicialmente, el tratamiento de embriones con drogas fue el método más común para perturbar la INM. El tratamiento con citocalasina B, un inhibidor de la polimerización de actina, reveló que la organización correcta de actina es importante para la INM en el tubo neural y en el neuroepitelio de la retina de pollo (Messier & Auclair, 1974; Murciano et al., 2002; Taverna & Huttner, 2010). Del mismo modo, el tratamiento con colchicina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, demostró un papel esencial del citoesqueleto de microtúbulos en la INM (Langman et al., 1966; Messier, 1978; Messier & Auclair, 1973; Spear & Erickson, 2012a). Por ese motivo, se propone que los sistemas motores asociados a los microtúbulos y a la actomiosina son los principales impulsores de la INM. Sin embargo, aún no está del todo claro el papel específico del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos en los diferentes tipos de movimientos (Kengaku, 2018; H. Lee & Norden, 2013; Spear & Erickson, 2012b; Taverna & Huttner, 2010).

5.2 Movimiento apical

La migración apical se puede observar cuando los núcleos de los progenitores neurales migran hacia el lumen durante la fase G2. Diferentes autores demuestran que los microtúbulos y las dineínas, proteínas motoras asociadas a los microtúbulos, son necesarios para la INM hacia la membrana apical. En este modelo, el núcleo de los progenitores neurales se mueve, como un cargo, a lo largo de la pista

de los microtúbulos, como se sabe que ocurre con otros orgánulos celulares (Alberts, 2016). Además, los microtúbulos extienden sus extremos negativos hacia el centrosoma, que como se ha mencionado se sitúa en la membrana apical durante la interfase del ciclo celular, por lo que este movimiento está mediado por las dineínas (**Figura 15.A**; Paridaen & Huttner, 2014; Spear & Erickson, 2012a).

Después de los ensayos iniciales con fármacos que demostraron la implicación de los microtúbulos en la INM (Langman et al., 1966; Messier, 1978; Messier & Auclair, 1973), otros estudios con experimentos de manipulación genética y, por tanto más precisos, han ayudado al estudio del papel de los microtúbulos en la INM. En corteza de ratón los estudios de pérdida de función de dineína y de algunas proteínas reguladoras de dineína como la proteínas Lis1, NudC mostraron una migración basal→apical alterada (Cappello et al., 2011; Tsai et al., 2005, 2010). También el neuroepitelio de la retina de pez cebra mostró alteraciones en este movimiento tras suprimir la expresión de dinactina (Del Bene et al., 2008). Estos resultados demuestran que cada una de éstas moléculas y, por tanto el citoesqueleto de microtúbulos, son esenciales para el movimiento basal→apical. El hecho de que la alteración de proteínas centrosomales en corteza de ratón como: Cep120, TACC, Hook3, PCM y BICD2 y proteínas relacionadas con los centrosomas como Tpx2 perturben la INM, lleva a concluir que la estabilidad del citoesqueleto del microtúbulos es importante para la migración basal→apical (Baffet et al., 2015; Ge et al., 2010; Hu et al., 2013; Kosodo et al., 2011; Xie et al., 2007). Se ha demostrado que la conexión entre la dineína y la envoltura nuclear se mantiene por las proteínas con dominios SUN (SUN1 y SUN2) y dominios KASH (Syne1/2 y Nesprina 1/2). Las proteínas con dominios SUN y KASH abarcan ambas membranas de la envoltura nuclear e interaccionan entre ellas para formar un puente que comunica el nucleoesqueleto con el citoesqueleto. Para formar este puente las proteínas con dominios SUN en la membrana nuclear interna interactúan con los componentes del núcleo y las proteínas con dominios KASH con el espacio perinuclear (Tapley & Starr, 2013). Estudios de pérdida de función de estas proteínas también alteran la INM (Del Bene et al., 2008; You et al., 2019; X. Zhang et al., 2009). Tomados en conjunto, estos estudios son consistentes con un modelo de migración nuclear apical donde los núcleos migran a lo largo de los microtúbulos a través de la dineína hacia la superficie apical (**Figura 15**).

La implicación del sistema dineína en la INM basal→apical no descarta el papel de otra clase de fuerzas como la de la actomiosina. Ya se ha comentado que los estudios con citocalasina B demostraron la implicación del citoesqueleto de actina en la INM (Messier, 1978; Messier & Auclair, 1974; Murciano et al., 2002). Estudios más recientes muestran que la inhibición de la GTPasa Rac1 da como resultado una INM basal→apical retardada y problemas en la citocinesis en telencéfalo de ratón (Minobe et al., 2009). Además de en vertebrados, el citoesqueleto de actina parece ser importante en la INM de *Drosophila* y *Nematostella* (Meyer et al., 2011)

Otra evidencia de que la actomiosina desempeña un papel en la INM se demuestra con la inhibición de la miosina II mediante los tratamientos con blebistatina y con el fármaco BDM (2-3 butanediona monoxima), que inhibe la interacción entre la actina y la miosina, detienen la migración apical en la retina de pez cebra (Norden et al., 2009). Además, demostraron que esta reducción en la dinámica de la INM se debe a la actividad específica de la miosina II ya que el fenotipo causado por la BDM pudo ser rescatado con la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de la cadena ligera reguladora de miosina II (MRLC2, del inglés myosin 2 regulatory light chain). En ese mismo trabajo también estudiaron el papel de los microtúbulos en la INM mediante diferentes estrategias. La despolimerización de microtúbulos tras un tratamiento con colcemida, la alteración en centrina por morfolinós y el uso de un dominante negativo de dinactina afectó levemente la INM. Por lo que concluyeron que los microtúbulos tienen una función en la migración apical de la INM, pero esta es menor y que en retina de pez es el citoesqueleto de actina el que tiene un papel central (Norden et al., 2009). Estos resultados difieren con los presentados anteriormente por Del Bene, donde concluyen que el citoesqueleto de microtúbulos es crucial para la migración apical en retina de pez cebra tras estudios en peces mutantes para la dinactina (Del Bene et al., 2008).

En el laboratorio de Caren Norden, años después, estudiaron la distribución de miosina II durante la INM en la retina de pez cebra y observaron que durante las fases G1 y S, los núcleos están rodeados por ésta simétricamente. Sin embargo, durante la fase G2 se observó una acumulación basal de miosina que parecía guiar el núcleo hacia el lado apical (**Figura 15.A**). Una vez que el núcleo alcanza una posición apical, la miosina se concentra en la parte basal, que constriñe el surco de escisión durante la citocinesis. Estos resultados también implican al citoesqueleto de actina durante la migración apical (Leung et al., 2011). Este modelo describiría que el núcleo de los progenitores se mueve mediante la contracción de actina que impulsaría el núcleo desde su parte más basal y lo conduciría hacia la membrana apical (**Figura 15.A**).

Finalmente, otros estudios proponen una combinación de ambos citoesqueletos para la progresión de la INM. En Spear & Erickson, 2012a, proponen que la INM es un proceso de dos pasos. Aquí postulan que, el movimiento apical durante la fase G2 en corteza de ratón depende de los microtúbulos, mientras que el redondeo apical durante la mitosis depende de actina. En este estudio, tras un tratamiento con colcemida se alteró la migración apical de los núcleos y, tras un tratamiento con citocalasina B que no afectó a la INM, observaron una alteración en el redondeo celular propio de la mitosis de la citocinesis. Estos resultados podrían explicar la controversia entre los diferentes estudios sobre la implicación de las diferentes moléculas del citoesqueleto en la migración apical. Sin embargo, es posible que las discrepancias sobre los mecanismos que controlan la INM sean consecuencia de las diferencias entre tejidos y modelos estudiados (Norden, 2017).

5.3 Movimiento basal

Al igual que con el movimiento nuclear apical, también hay desacuerdo con respecto al mecanismo del movimiento nuclear dirigido basalmente durante las fases G1-S. Una de las opciones es que las kinesinas, proteínas motoras de los microtúbulos que se dirigen hacia el extremo positivo de éstos, concretamente la kinesina 3, podrían estar involucradas en el transporte del núcleo desde la región apical a la basal (**Figura 15.B**; Tsai et al., 2010).

Por otra parte, otros estudios han centrado su atención en el papel del citoesqueleto de actina en el movimiento apical→basal. Tras el tratamiento con blebistatina a concentraciones bajas (12,5 µM) en corteza de ratón, no se observaron alteraciones en la citoarquitectura del epitelio, aunque debilitó levemente la actina apical. Con este tratamiento, la migración nuclear de basal a apical se alteró sin afectar la migración nuclear en la dirección opuesta (Schenk et al., 2009). Además, los autores muestran que la contracción de miosina se utiliza no solo para la INM en progenitores neurales apicales sino también para la translocación de progenitores basales de la corteza cerebral de ratón. Esta participación de la actina en la migración basal de progenitores basales también se demostró usando un ARNi contra de miosina II (**Figura 15.B**; Tsai et al., 2007, 2010).

Una tercera posibilidad inicialmente sugerida por Sauer, pero más recientemente apoyada experimentalmente por diferentes laboratorios, es que el movimiento nuclear basal durante la INM no es un proceso activo y autónomo (Kosodo et al., 2011; Leung et al., 2011; Norden et al., 2009). Cuando se implantan perlas magnéticas en corteza de ratón y se colocan en la superficie apical, se observa que éstas se mueven basalmente. Sin embargo, si la migración nuclear apical se bloquea al inhibir la fase S con hidroxiurea, las perlas no se mueven basalmente. Estos resultados fueron analizados a través de un modelo computacional y sugirieron que el desplazamiento basal es impulsado pasivamente por el movimiento nuclear apical activo (**Figura 15.B**; Kosodo et al. 2011).

A través de estudios *in vivo* de tejido de retina y cerebro posterior de pez cebra donde siguieron las trayectorias de los núcleos de los progenitores neurales, demostraron que los núcleos experimentan un movimiento estocástico y pasivo durante G1 y S. Después de la fase S, los núcleos son conducidos de manera persistente y altamente dirigida hacia la superficie apical donde entran en fase M. Aunque no descartan la posibilidad de que haya un mecanismo activo que pueda alejar el núcleo de la membrana apical en G1 temprana (Leung et al., 2011; Norden et al., 2009)

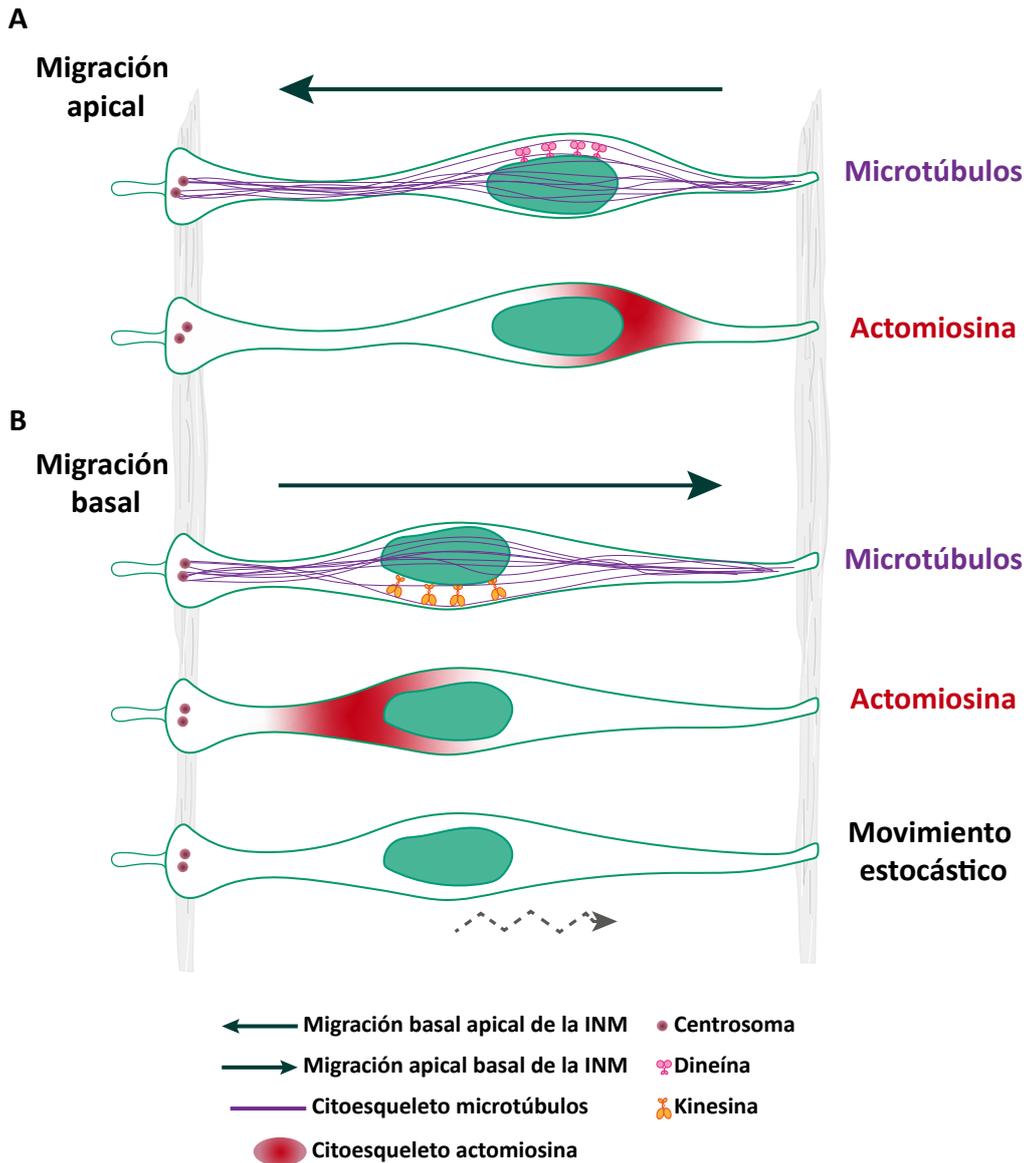


Figura 15. Modelos de la INM. Existen diferentes teorías sobre las fuerzas que controlan los diferentes movimientos de la INM. **(A)** Dentro de la migración apical diferentes estudios muestran la participación de los microtúbulos a través de dineína y del citoesqueleto de actomiosina. **(B)** Existen tres hipótesis para la migración basal de los núcleos durante la INM: la participación de los microtúbulos mediante la unión de kinesinas al núcleo, el citoesqueleto de actomiosina y, finalmente, que este sea un movimiento pasivo consecuencia del movimiento apical.

5.4 Relación entre la progresión del ciclo celular y la INM

Hemos visto que la progresión de la INM se coordina con el avance del ciclo celular en los progenitores neurales. En función de la fase del ciclo celular los núcleos de los progenitores neurales ocupan diferentes posiciones a lo largo del eje apicobasal. A pesar de esto, diferentes estudios han evidenciado que no se requiere la INM para la progresión del ciclo celular, que la progresión del ciclo celular

se puede desacoplar de la INM. Sin embargo, la progresión del ciclo celular sí que es necesaria para la progresión de la INM (H. Lee & Norden, 2013; Taverna & Huttner, 2010).

En primer lugar, el tratamiento con citocalasina B condujo a la detención de la INM en tubo neural y retina de pollo, sin embargo, se pudieron observar figuras mitóticas ectópicas en tubo neural y retina de pollo (Messier, 1978; Meyer et al., 2011; Murciano et al., 2002; Spear & Erickson, 2012a). Además, la alteración de la INM a través de alteraciones en proteínas centrosomales también dio lugar a mitosis lejos de la membrana apical (Ge et al., 2010; Xie et al., 2007). Aunque en retina de pez cebra tras la inhibición de la INM con blebistatina (100 μ M) y BDM (25 μ M) no se observaron mitosis fuera de sitio (Norden et al., 2009), tiempo después en el mismo laboratorio mostraron que el tratamiento con blebistatina (200 μ M) en retina de pez cebra sí da lugar a mitosis ectópicas después de inhibir la INM (Strzyz et al., 2015). Estos resultados sugieren que las moléculas que regulan la migración no controlan la progresión del ciclo celular. Resultados similares se obtuvieron tras el tratamiento con blebistatina en corteza de ratón, donde la progresión del ciclo celular continúa al inhibirse la INM (Schenk et al., 2009). Sin embargo, en este último estudio, la inhibición de la INM también resultó en la generación de progenitores basales, que carecen de INM puesto que no están anclados a la superficie apical y que de manera normal realizan las mitosis lejos de la membrana apical (Arai & Taverna, 2017); por lo que estos resultados no indicarían que la INM se puede desacoplar del ciclo celular, sino que alteraciones en la INM producen la diferenciación de los progenitores neurales. Por otra parte, la alteración de la migración apical a través de un shRNA contra la proteína LIS1 en corteza de ratón provoca la detención de la INM a través de los microtúbulos. En este estudio muestran que aún afectando a la INM las mitosis siguen ocurriendo en la superficie ventricular y que por lo tanto es necesario que los núcleos lleguen a la superficie apical para una correcta progresión del ciclo celular (Tsai et al., 2005).

Por otra parte, diferentes estudios donde se detuvo el ciclo celular mostraron la detención de la INM. En telencéfalo de ratón se provocó la detención del ciclo celular en diferentes fases a través de productos químicos como la 5-azacitidina (detención del ciclo celular en fase G2/M) y la ciclofosfamida (detención del ciclo celular en fase S). Tras los tratamientos se observó una inhibición también de la INM, indicando que la regulación del ciclo celular podría controlar la INM (Ueno et al., 2006). En concordancia con estos resultados, la sobreexpresión de p18Ink4c, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, que detiene las células en la fase G1 y provoca una acumulación basal de los núcleos de la corteza de ratón como consecuencia de la detención de la INM (Kosodo et al., 2011). En este mismo estudio, detuvieron el ciclo celular en la fase S con hidroxiaurea y la migración apical no se llevó a cabo. El tratamiento con una mezcla de hidroxiaurea y afidicolina, que detienen el ciclo celular en la fase S, también detuvo la INM (Leung et al., 2011). Curiosamente, en Murciano et al., 2002, se mostró que la inhibición

de la fase S con hidroximetilurea no inhibe la migración nuclear apical en la retina de pollo. No se explica la discrepancia entre sus resultados y otros detallados anteriormente.

El ciclo celular está controlado por la actividad de las Cdks y sus ciclinas asociadas. La actividad de la Cdk1 es necesaria para la entrada y la progresión a través de la mitosis y, en su ausencia, las células no pueden experimentar la transición G2/M (Molina & Pituello, 2017). En este estudio, tras el tratamiento con el inhibidor de la Cdk1, RO-3306, en retina de pez cebra las células completaron la fase S, pero se estancaron en la fase G2 sin iniciar la migración apical (Leung et al., 2011). En estudios posteriores del mismo laboratorio tras la activación de la Cdk1 con un inhibidor de Wee1 (quinasa que inhibe en condiciones normales la Cdk1 durante la fase S) y observaron que la activación temprana de la Cdk1 desencadenó una migración apical prematura. Estos resultados demuestran que, la activación de la Cdk1 es necesaria y suficiente para desencadenar el movimiento apical independientemente de la fase del ciclo celular y que por tanto, es necesaria la entrada a G2 para desencadenar la migración apical (Strzyz et al., 2015). El papel de la Cdk1 en la progresión de la migración apical se demostró también en corteza de ratón (Baffet et al., 2015). Además, la aceleración o ralentización de la progresión del ciclo celular por sobreexpresión o interferencia de las Cdks y sus correspondientes ciclinas no parece alterar la posición de los núcleos en función de la fase del ciclo en la que se encuentren, sino que la INM también se acelera o ralentiza en función de la fase del ciclo celular (Fousse et al., 2019; Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009). Un posible vínculo entre la transición de fase S a G2 y el movimiento nuclear apical es TPX2, que se localiza en el núcleo antes de la fase G2, y que se reubica en el proceso apical durante la fase G2 para finalmente localizarse en el huso mitótico durante la fase M. TPX2 es una proteína de unión a microtúbulos que reorganiza el citoesqueleto de microtúbulos y es esencial para el movimiento nuclear apical en corteza de ratón. En el estudio de falta de función con un RNAi de Tpx2 se observan alteraciones en la migración apical de la INM (Kosodo et al., 2011).

A partir de estos datos, la mayoría de las investigaciones concluyen que la migración nuclear no es esencial para la progresión del ciclo celular, sino que son los reguladores del ciclo celular los que ejercen un control estricto sobre la INM. Sin embargo, la mayoría de ellos ponen en relieve la necesidad de hacer más estudios.

6. Vinculina

En 1979, la vinculina se aisló por casualidad del músculo liso de molleja de pollo (Geiger, 1979). La vinculina se caracterizó como una proteína citosólica que se localizaba en regiones donde los haces de actina terminaban en los sitios de unión a la membrana (Geiger, 1979; Geiger et al., 1980). Al ser una proteína nueva con una función desconocida, se la denominó vinculina, de la palabra latina *vinculum*,

que significa enlace a una unión o unidad (Geiger et al., 1980); puesto que su localización apoyaba la propuesta de que la función de la vinculina podría ser la participación en el enlace de los filamentos de actina con la membrana. En los 40 años transcurridos desde su descubrimiento, el estudio de la vinculina se ha ampliado para incluir estudios funcionales animales, bioquímicos, estructurales e in vivo para determinar su papel en la biología.

La vinculina presenta un alto grado de conservación en humano, ratón, pollo, pez cebra, *Drosophila* y *C.elegans*. La vinculina humana es 99% idéntica a la vinculina de ratón y un 95% idéntica a la de pollo. Esta conservación a lo largo de varias especies sugiere la importancia funcional de esta proteína.

6.1 Estructura y activación de la vinculina

6.1.1 Estructura de la vinculina

La vinculina es una proteína citoplasmática de 116 kDa y 1066 aa. Diferentes estudios bioquímicos y estructurales muestran que la vinculina está compuesta por ocho haces de cuatro α -hélices antiparalelas separadas por una región rica en prolinas que se organizan en cinco subdominios (D1-D5). Estos subdominios se distribuyen en tres dominios diferentes conocidos como cabeza (Vh, del inglés *vinculin head*), cuello y cola (Vt, del inglés *vinculin tail*) (Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005; Coutu & Craig, 1988; Izard et al., 2004; Price et al., 1989). En primer lugar, en el extremo N-terminal, encontramos el dominio de la cabeza (aa 1-835) que está constituido por los subdominios D1-D4. A través del dominio D1, la vinculina se une a diferentes proteínas como son la talina, exclusiva de las adhesiones focales; la α -catenina y la β -catenina, ambas exclusivas de las uniones adherentes; la α -actinina, presente en ambos tipos de uniones e IpaA, una invasina de *Shigella* que está presente en células de mamífero tras la infección bacteriana, donde la vinculina facilita la entrada bacteriana (Bays & DeMali, 2017; Giannone, 2015; Halbleib & Nelson, 2006; Ziegler et al., 2006).

A continuación, se encuentra la región llamada cuello (aa 838-878), la región más pequeña. Esta región rica en prolinas proporciona a la vinculina una flexibilidad para la interacción entre la cabeza y la cola. A través del cuello, la vinculina interacciona con las proteínas VASP, el complejo Arp2/3, la vincixina y la ponsina; proteínas relacionadas con la remodelación de actina (Bays & DeMali, 2017; Pollard, 2016). El extremo C-terminal o dominio de la cola está constituido por el dominio D5 (aa 895-1066). Aquí, encontramos los sitios de unión a la paxilina componente de las adhesiones focales; la F-actina (polimerizada o monomérica), el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), un fosfolípido de membrana con diversas funciones celulares; la proteína quinasa C α (PKC α), una quinasa implicada en múltiples procesos celulares y la proteína Raver1, una ribonucleoproteína que participa en el procesamiento de ARN

cerca de las uniones celulares (Bays & DeMali, 2017; Czech, 2000; Giannone, 2015; Kant Singh et al., 2018; J. H. Lee et al., 2009). Curiosamente, todos los sitios de unión a ligandos están enmascarados por una interacción intramolecular entre los dominios de la cabeza y la cola de la vinculina (**Figura 16**; Ziegler et al., 2006).

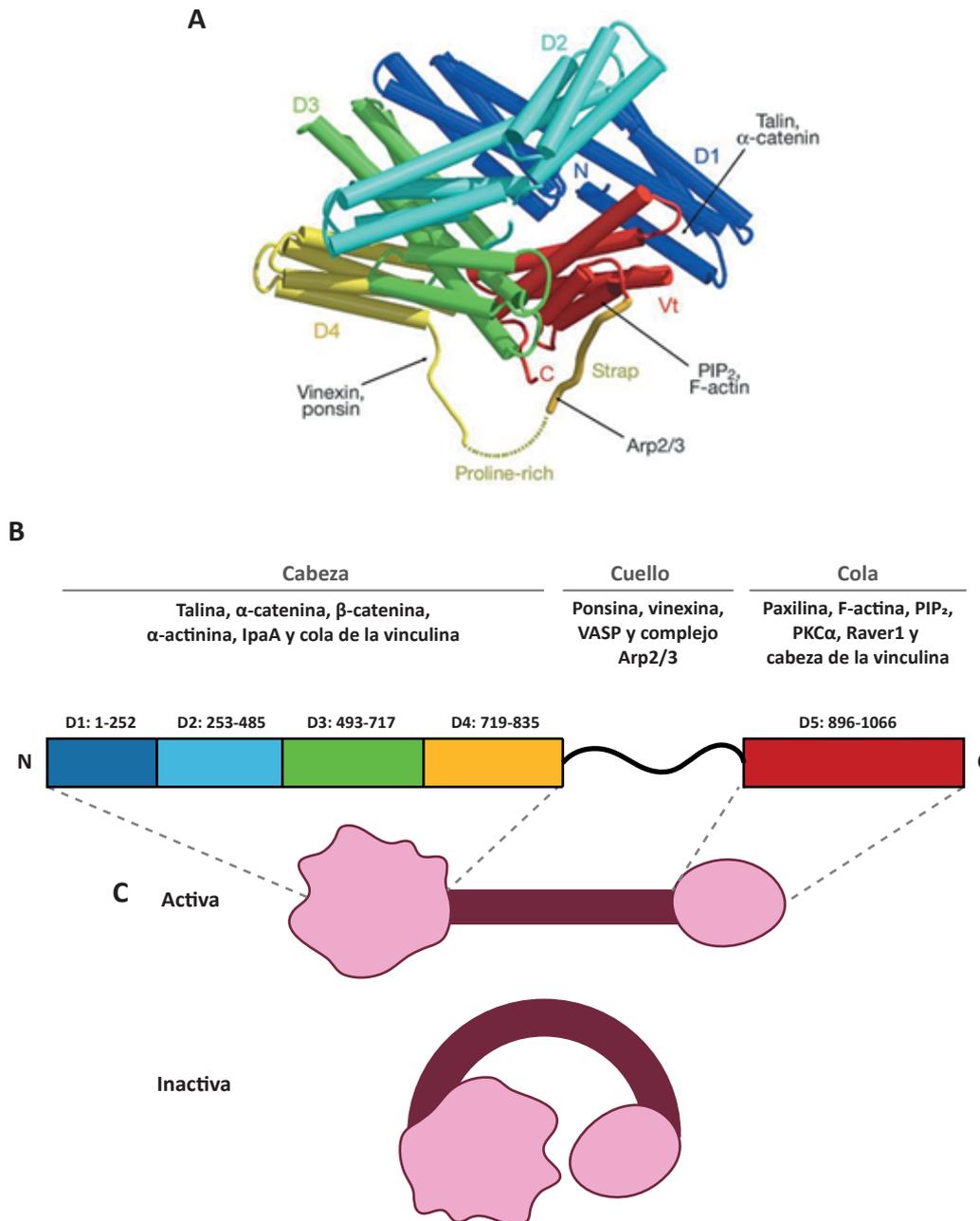


Figura 16. Estructura de la vinculina y sus interacciones. **(A)** Estructura de la vinculina en su conformación cerrada. Los dominios se muestran en diferente color: D1 (azul), residuo 1-252; D2 (celeste), 253-485; D3 (verde), 493-717; D4 (amarillo), 719-835; D5 (rojo), 896-1066. Los sitios de unión a los diferentes ligandos están en negro. La región Vt interacciona con los dominios D1 y D3 (Bakolitsa et al., 2004). **(B)** Representación de las interacciones de la vinculina con sus diferentes ligandos. Los dominios D1-D4 forman la cabeza de la vinculina mientras que el dominio D5 constituye el dominio de la cola. **(C)** Visión esquemática de la conformación abierta y cerrada de la vinculina.

6.1.2 Regulación y activación de la vinculina

La vinculina existe en dos conformaciones: una conformación autoinhibida o inactiva, conformación citoplasmática en la que los sitios de unión a los diferentes ligandos están enmascarados y una conformación activa donde los sitios de unión están expuestos, que se localiza en las uniones celulares. Es importante tener en cuenta que a pesar de que la vinculina no tiene actividad enzimática, normalmente se hace referencia a su conformación abierta como “conformación activa” y a su conformación cerrada como “conformación inactiva” (Bays & DeMali, 2017). Cuando la vinculina se encuentra en su conformación cerrada, los dominios en la cabeza D1-D3 forman un par de pinzas con el dominio D4, éstos hacen contacto con el dominio D5 y mantienen su estado autoinhibido (**Figura 17**; Ziegler et al., 2006). La interacción cabeza-cola de la vinculina se mantiene por diferentes tipos de interacciones. 1) Interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno formados entre los dominios D1-D5. 2) Interacciones polares entre D3-D5. 3) Puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre D4-D5. De estos, se cree que la interacción entre el dominio D1 y D5 es la más crítica para mantener el estado autoinhibido (Cohen et al., 2005).

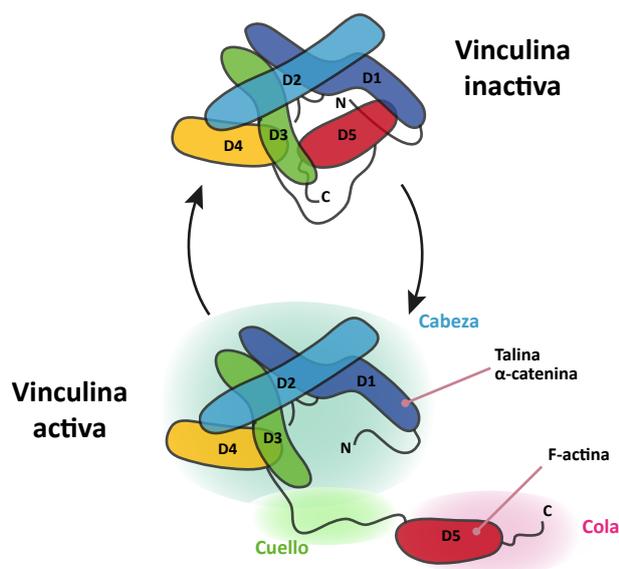


Figura 17. Conformaciones de la vinculina. Representación esquemática del ciclo de la vinculina entre conformaciones activas e inactivas. D1 – D5 corresponden a los dominios individuales de la vinculina. D1 – D4 se ensamblan para formar una región de la cabeza globular que está conectada por un cuello flexible rico en prolina a la cola de la vinculina, el dominio D5. En la parte que representa la vinculina activa se muestran los ligando de unión que se cree que controlan la activación de la vinculina. Adaptado de Carisey & Ballestrem, 2011.

Las estructuras cristalinas y los análisis bioquímicos demuestran que la vinculina se mantiene en una conformación autoinhibida por al menos dos interacciones cabeza-cola, y que los cambios conformacionales en la cabeza, la cola y el cuello de la vinculina están estructural y termodinámicamente unidos (Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005). No existe ningún ligando que pueda unirse a la vinculina con una fuerza mayor a la que se une la cabeza con la cola, por ese motivo para activar a la vinculina es necesaria la unión a ésta de al menos dos ligandos; uno que se una a la cabeza y otro a la cola (Bakolitsa et al., 2004; Bays & DeMali, 2017; Cohen et al., 2005). En este modelo, la unión de actina a la cola de la vinculina y la unión de la talina (en adhesiones focales) o de la α -catenina (en uniones adherentes) a la cabeza de la vinculina promueve una conformación abierta (**Figura 17**; Chen et al., 2006; Janssen et al., 2006; Peng et al., 2012). También se ha sugerido que la fosforilación de los residuos Y100, Y1065, por la quinasa Scr y de los residuos S1033 y S1045, por la PKC α , pueden afectar a la activación promoviendo cambios conformacionales y favoreciendo la unión de la vinculina a sus ligandos activadores (Golji et al., 2012).

En células en cultivo, la vinculina se localiza mayoritariamente en las uniones célula-célula y en las uniones célula-matriz, en una conformación activa. Sin embargo, se ha observado también que hay una proporción de la vinculina citoplasmática que se encuentra en una conformación cerrada. Podemos encontrar la fracción en la conformación cerrada en dos puntos de tiempo distintos: inmediatamente antes de que esté a punto de reclutarse en la adhesión y justo después del desensamblaje de ésta (Chen et al., 2005; Geiger, 1979; S. W. Lee & Otto, 1997). Otra evidencia indica que la fuerza ejercida por la actomiosina es esencial para la activación y localización de la vinculina en las adhesiones focales. Por una parte, la fuerza generada por la actomiosina promueve la activación de cambios conformacionales en la vinculina. Por el contrario, una pérdida de tensión hace que la vinculina se inactive rápidamente y deje las adhesiones focales (Carisey et al., 2013).

6.2 La vinculina modula la adhesión y la migración celular

Como hemos comentado anteriormente, la adhesión celular regula muchos procesos biológicos incluyendo el crecimiento celular, la migración, la diferenciación y la supervivencia (Alberts, 2016; McEver & Luscinskas, 2018). La vinculina ha sido identificada como componente de dos tipos de uniones celulares: las uniones adherentes y las adhesiones focales (Bays & DeMali, 2017)

6.2.1 La vinculina y las adhesiones focales

Las células migratorias presentan una polaridad estructural con diferencias obvias en las dinámicas de adhesión en la región frontal y en la región posterior. Durante todo el proceso de migración,

las células presentan una dinámica en la formación y destrucción de las adhesiones focales de manera coordinada. En el frente celular, los nuevos sitios de adhesión acoplan la red de filamentos de actina a las proteínas de la ECM. Simultáneamente, los sitios de adhesión ubicados en la parte posterior de las células en movimiento se disuelven mientras que la contracción de actina impulsada por miosina mueve el cuerpo celular hacia adelante (Blanchoin et al., 2014).

La función de la vinculina se ha estudiado mayoritariamente en las adhesiones focales, debido a su presencia en células cultivadas, donde la vinculina es necesaria para estabilizar estas adhesiones. Ésta media la unión del citoesqueleto de actina a la ECM a través de las integrinas y participa en procesos de adhesión celular y migración (Bays & DeMali, 2017; Carisey & Ballestrem, 2011). En las adhesiones focales la vinculina interacciona con la talina, la cual, como se ha mencionado anteriormente, participa en su activación (Chen et al., 2006). Diferentes estudios han demostrado que la presencia de la vinculina en las adherencias focales es crítica para la adhesión y migración celular mediada por integrinas.

En primer lugar, podemos encontrar a la vinculina en el borde de ataque (o leading edge) de las células en migración. Aquí se localiza con el complejo Arp2/3 promoviendo la polimerización de actina en las adherencias recién formadas (DeMali et al., 2002; Zimerman et al., 2004). La vinculina permite las conexiones entre las integrinas y la maquinaria de polimerización de actina y participa en el control de la fuerza de adhesión. El mutante de la vinculina que impide su unión al complejo Arp2/3 (VCL-P878A) presenta problemas en la formación del borde de ataque y por consecuencia, defectos en migración (Jannie et al., 2015). Además, el reclutamiento de la vinculina por parte de la talina estabiliza las adherencias focales y promueve el agrandamiento de éstas (Cohen et al., 2006). La sobreexpresión de un mutante de la vinculina constitutivamente activo (VCL-T12) provoca un aumento del número y tamaño de las adhesiones focales y un incremento en la adhesión y la transmisión de la fuerza (Dumbauld & García, 2014; Humphries et al., 2007). Por otra parte, la sobreexpresión de un mutante de la vinculina que no se une a la talina (VCL-A50I) provocó que la vinculina no fuera reclutada en la adhesión focal, por lo que concluyeron que el importante papel de la vinculina en las adhesiones focales depende del reclutamiento de ésta por parte de la talina (Humphries et al., 2007). Estas adherencias provocan una mayor protuberancia en el borde de ataque y transmiten la fuerza generada por la miosina desde el citoesqueleto de actina a la ECM, generando así fuerzas de tracción que empujan el cuerpo celular durante la migración celular (Blanchoin et al., 2014; Thievensen et al., 2015). También se ha observado que alteraciones en la fosforilación de la vinculina en el residuo 1065 están relacionadas con su estabilidad y capacidad de unión a ligandos. Estas alteraciones disminuyen la dinámica de la creación de nuevas adhesiones y tienen consecuencias negativas para la transmisión de la fuerza (Möhl et al., 2009).

Detrás del borde de ataque, la vinculina juega un papel en el mantenimiento de las adhesiones focales. Los fibroblastos aislados de embriones de ratón (E9.5) nulos para la vinculina se diseminan menos, tienen adhesiones focales más pequeñas y muestran una menor fuerza de adhesión a diferentes sustratos, pero migran más rápido que los fibroblastos salvajes (Saunders et al., 2006; Xu et al., 1998). Otros estudios mostraron observaciones similares con células de carcinoma embrionario F9 nulas para la vinculina (Volberg et al., 1995). Además, la sobreexpresión de la vinculina rescata estos defectos en las células nulas de la vinculina (Saunders et al., 2006; Volberg et al., 1995; Xu et al., 1998). Se cree que los cambios fenotípicos de la adhesión celular reducida y el aumento en la motilidad celular asociada con la pérdida de la vinculina impulsan la formación de metástasis tumorales. Diferentes estudios muestran que la expresión de la vinculina en líneas celulares tumorales, con niveles disminuidos de la proteína endógena, suprimen su capacidad tumorigénica y aumentan la fuerza de adhesión (Fernandez et al., 1992; Lifschitz-Mercer et al., 1997).

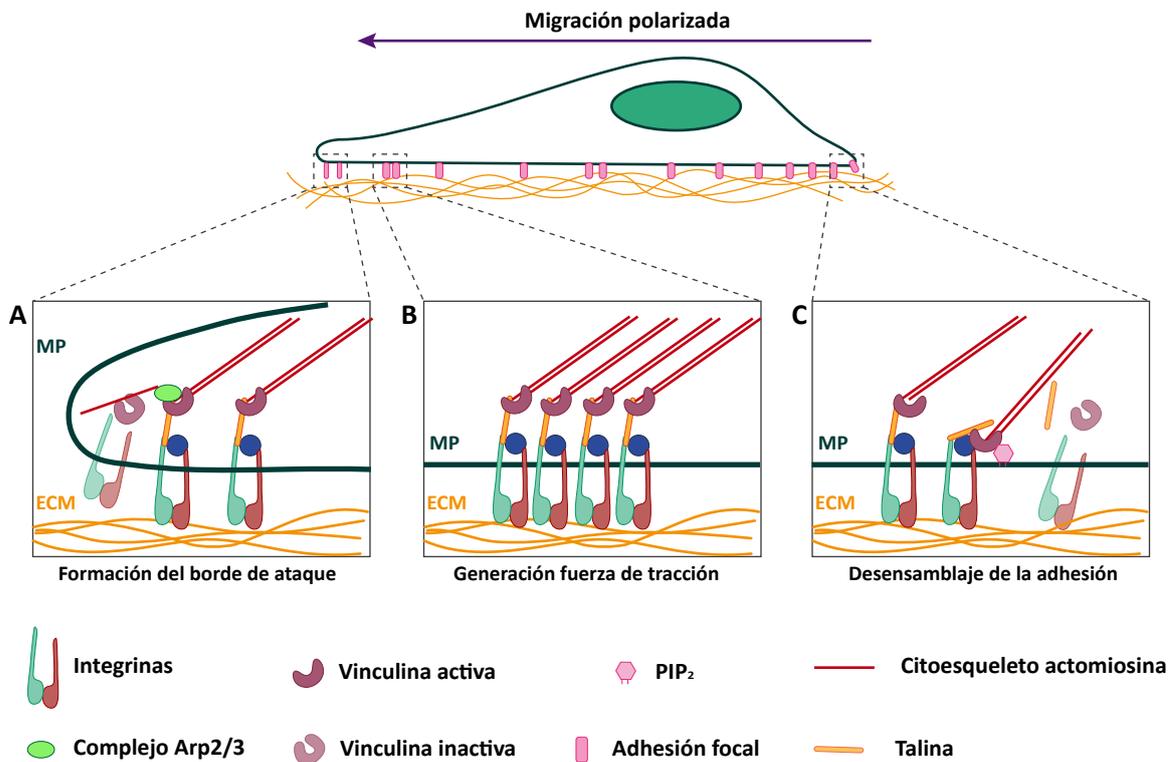


Figura 18. Papel de la vinculina en la migración polarizada. (A) La interacción de la vinculina con el complejo Arp2/3 en las adhesiones focales nacientes en el borde de ataque promueven la protrusión de la membrana. (B) Durante la generación de la fuerza de tracción, la vinculina une las integrinas al citoesqueleto de actina y soporta las fuerzas ejercidas durante la motilidad celular. (C) La interacción de la vinculina con PIP₂ induce un cambio de conformación que reduce la interacción de la vinculina con la actina, promoviendo así el desmontaje de las adherencias focales. MP: membrana plasmática.

Finalmente, puesto que la migración es un proceso dinámico y las adhesiones focales se ensamblan y desensamblan constantemente, una correcta función de la vinculina es necesaria para la destrucción de adhesiones focales no necesarias a través de una inactivación de ésta. De ésta manera, la vinculina inactiva puede contribuir a la formación de otra adhesión donde sea necesario. Parece que, tanto los cambios en la fuerza ejercida por el citoesqueleto de actina como la unión de la vinculina a PIP_2 , son importantes para la inactivación de la vinculina y el recambio de las adhesiones focales. El mutante de la vinculina que no puede unir a PIP_2 (VCL-LD) causa un retraso en la diseminación celular y una inhibición casi completa de la migración de las células como consecuencia de la falta de dinamismo en las adhesiones focales (Chandrasekar et al., 2005; Saunders et al., 2006). Todos estos estudios demuestran que la vinculina es vital en la formación del borde de ataque, la transmisión de la fuerza y la regulación que las adhesiones focales y, por tanto, es esencial para la migración celular.

6.2.2 La vinculina y las uniones adherentes

La vinculina es un componente bien conocido de las adhesiones célula-célula mediadas por cadherinas. La vinculina se une a la α -catenina y a la β -catenina, que también se unen entre sí (Halbleib & Nelson, 2006). Aunque el papel de la vinculina en las adhesiones focales está bien caracterizado, esta mayor atención hacia la vinculina en uniones célula-matriz, ha dejado un vacío en el conocimiento de su papel en las uniones adherentes. Sin embargo, algunos estudios proporcionan evidencias de que la vinculina modula la adhesión en los sitios de contacto célula-célula. Los primeros estudios demostraron que los ratones nulos para la vinculina mueren durante el desarrollo embrionario. La muerte resulta de anomalías severas en el desarrollo del corazón y de defectos cerebrales debidos a fallos en el cierre del tubo neural (Xu et al., 1998). Además, los ratones nulos para la vinculina experimentan la muerte súbita debido a uniones adherentes anormales que conducen a la alteración en el músculo cardíaco (Zemljic-Harpf et al., 2007). Estudios en células tumorales han indicado que la pérdida de la vinculina y la β -catenina está asociada con procesos metastásicos (Li et al., 2014). En concordancia con estos resultados, un aumento de la expresión de estas proteínas también se ha relacionado con un aumento de las adhesiones célula-célula y una prevención para la transición epitelio-mesénquima (Pal et al., 2019).

Otros estudios demuestran que la vinculina es necesaria para el mantenimiento de la integridad de las uniones adherentes. El silenciamiento de la vinculina mediante shRNA (short hairpin RNA) en cultivo celular provoca una pérdida de la N-cadherina, la β -catenina y la actina en la membrana plasmática y, por tanto, una alteración en las uniones entre células vecinas (Peng et al., 2010). En dicho estudio el fenotipo derivado del silenciamiento de la vinculina pudo rescatarse con la sobreexpresión de una vinculina salvaje pero no pudo rescatarse con la sobreexpresión de un mutante que no se une a la β -ca-

tenina, pero sí a la α -catenina (VCL-A50I) (Peng et al., 2010). Estudios anteriores ya habían demostrado que la mutación puntual en la isoleucina 50 de la vinculina, por una alanina, impedía la unión a otro ligando de la cabeza como es la talina y como he comentado anteriormente, esta mutación también es importante en la regulación del papel de la vinculina en las adhesiones focales (Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2006; Humphries et al., 2007). Estos resultados mostraron que la capacidad de la vinculina para localizar y estabilizar la E-cadherina en las uniones adherentes depende de su interacción con la β -catenina.

A pesar de la importancia de la interacción vinculina/ β -catenina, parece que es la α -catenina la que activa a la vinculina en las uniones adherentes, aunque tanto la α -catenina como la β -catenina sean necesarias para la localización de la vinculina (Barry et al., 2014; Peng et al., 2010, 2012; Sheikh et al., 2006). En conjunto, los resultados indican que la β -catenina podría tener un papel en el reclutamiento de la vinculina o incluso del complejo vinculina / α -catenina y en la estabilización de la interacción (Bays & DeMali, 2017). Otras proteínas como la eplina y la α -actinina también parecen contribuir a la localización de la vinculina en las uniones adherentes (Chervin-Pétinot et al., 2012; Kannan & Tang, 2015). Además, la vinculina se recluta en sitios que contienen cadherinas en respuesta a la contractilidad y a la tensión ejercida por el citoesqueleto de actina (Leerberg et al., 2014; Miyake et al., 2006). Junto con estos resultados, también se ha observado que al interactuar con la E-cadherina, la vinculina se fosforila en el residuo Y822. Mutantes de la vinculina que no pueden fosforilarse en este residuo no pueden unirse a la β -catenina y tampoco se localizan en las uniones adherentes, lo que sugiere que al igual que con otras fosforilaciones, la fosforilación en Y822 podría afectar a la conformación de la vinculina y a su localización (Bays et al., 2014; Bays & DeMali, 2017).

Aunque existen varios estudios que nos informan del papel de la vinculina en el mantenimiento de las uniones adherentes, éstos han sido llevados a cabo en cultivos *in vitro* de células no polarizadas, por lo cual, poco se sabe acerca de la función de la vinculina en un epitelio polarizado como es el tubo neural.

6.3 Función in vivo de la vinculina

La vinculina es una proteína asociada al citoesqueleto de actina que se expresa en la mayoría de las células y tejidos (Geiger et al., 1980). Esta proteína está altamente conservada y es necesaria para el desarrollo embrionario (Bakolitsa et al., 2004) en ratones (Xu et al., 1998) y nemátodos (Barstead & Waterston, 1991), pero no en *Drosophila* (Alatortsev et al., 1997).

Estudios en ratón muestran que embriones homocigotos nulos para la vinculina (-/-) no se desarrollan más allá del día 10 de gestación. Además, los embriones en E9.5 son aproximadamente un

tercio más pequeños que los embriones normales (**Figura 20.A**). La característica más destacada que presentan estos embriones es la presencia de fallos en el plegamiento neural en la región de la cabeza (**Figura 19.C, flecha superior**) y una cabeza aberrante. Además, los embriones presentan un escaso desarrollo de los nervios, así como fallos en la fusión de la línea media que dan un aspecto ondulado de las vías nerviosas de la medula espinal (**Figura 20.C**). Por otra parte, la falta de la vinculina en estos embriones provoca defectos en la formación del corazón. Las estructuras del corazón son pequeñas y están rodeadas por una cavidad pericárdica muy dilatada (Xu et al., 1998). Ambos fenotipos se pueden explicar por una adhesión celular inadecuada, lo que sugiere que la vinculina tiene un papel en el fortalecimiento de enlaces celulares y su entorno.

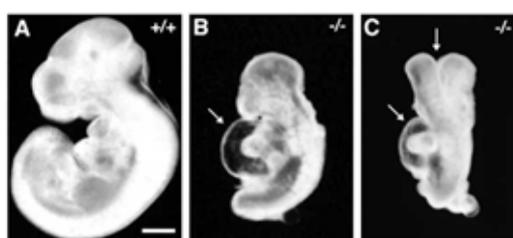


Figura 19. Morfología de embriones de ratón en un estadio E10.5. (A) Vista lateral de un embrión salvaje (+ / +) (B-C) Vista lateral y dorsal de un homocigoto nulo para la vinculina (- / -) en un estadio E10.5. Las flechas señalan los defectos en el tubo neural craneal (flecha superior) y la cavidad pericárdica dilatada (flechas inferiores) en los embriones mutantes (Xu et al., 1998).

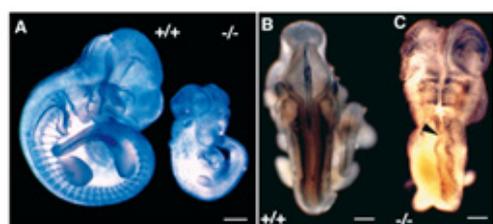


Figura 20. Inmunotinción de neurofilamentos de embriones enteros a E10.5. (A) Visión lateral de un embrión salvaje (+ / +), izquierda y uno mutante (- / -), derecha. (B) Visión dorsal de un embrión salvaje (+ / +) y (C) uno mutante (- / -) (Xu et al., 1998).

Se ha observado también que la vinculina es importante para el desarrollo de *C.elegans*. Mutantes de *deb-1* (homólogo de la vinculina en nemátodos) detienen su desarrollo en fase larval, siendo estas larvas más cortas. Además, estas larvas están paralizadas y tienen el músculo desorganizado; no logran conectar sus miofibrillas a la membrana plasmática y muere en una etapa larval temprana porque no pueden moverse para alimentarse (Barstead & Waterston, 1989, 1991). Estudios en *Drosophila* muestran que la ausencia de la vinculina da lugar a moscas viables y fértiles por lo que no parece que la vinculina sea vital para el desarrollo de *Drosophila* (Alatortsev et al., 1997). Sin embargo, aunque las moscas puedan tolerar la ausencia de la vinculina, se ha visto que una actividad de sobreexpresión de la vinculina activa es letal y causa defectos en el desarrollo muscular de éstas (Maartens et al., 2016). En conjunto, estos estudios indican que la vinculina es una proteína esencial en múltiples organismos.

7. Resultados previos del laboratorio

Estudios previos en el laboratorio demostraron que la interacción entre la β -catenina y la N-cadherina tiene una función fundamental en la regulación del complejo apical de los progenitores neuroepiteliales (Herrera et al., 2014). Dicho complejo es capaz de definir la morfología del epitelio mediante el anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana citoplasmática a través de un complejo de proteínas citoplasmáticas que hacen de puente entre dicho citoesqueleto y la N-Cadherina, estas proteínas son conocidas como proteínas unidoras de actina (ABPs).

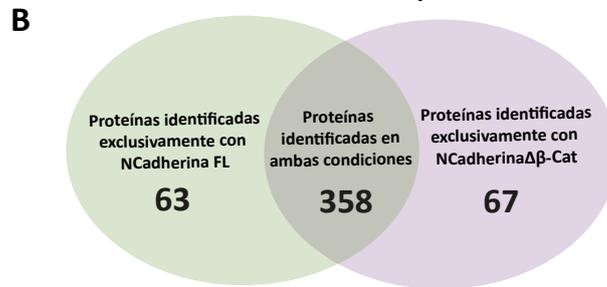
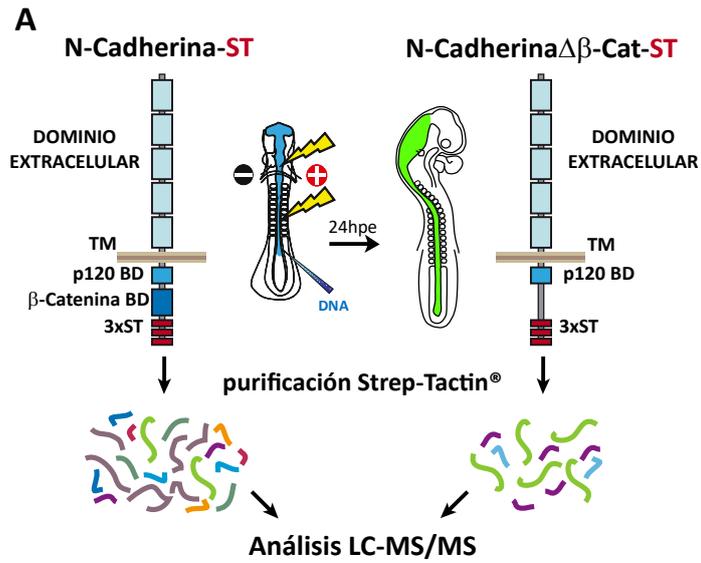
Con el objetivo de encontrar las ABPs implicadas en la formación y regulación del complejo apical en los progenitores neuroepiteliales que interaccionaban con la N-cadherina a través de su dominio de unión a la β -catenina se realizaron experimentos de espectrometría de masas (LCMS/MS del inglés, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Aquí se comparó el contenido proteico de las uniones adherentes constituidas por una forma entera de la N-Cadherina y de las uniones adherentes formadas por un mutante de la N-cadherina que carece del dominio de unión a la β -catenina (NCa-d $\Delta\beta$ Cat) mediante el sistema Strep-Tactin® (**Figura 21.A**). De esta forma, la diferencia cualitativa de las proteínas presentes en las purificaciones de ambos complejos mostró que 63 proteínas interaccionaban con el complejo N-cadherina/ β -catenina exclusivamente a través de la β -catenina (**Figura 21.B-C**). Las proteínas obtenidas de dicho análisis tienen diferentes funciones y distribuciones celulares (**Figura 21.C**). La presente tesis doctoral se centra en el papel de algunas de las ABPs obtenidas tras el análisis por espectrometría de masas. Estas proteínas son la α -actinina4, la α -E-catenina, la α -N-catenina, la cortactina, la proteína debrin-like (Dbnl) y la vinculina.

La interacción entre la α E-Catenina o la α -N-catenina y el complejo N-cadherina/ β -catenina en las uniones adherentes está bien definida. Ambas isoformas de la α -catenina interaccionan con la N-cadherina a través de su unión directa a la β -catenina (Drees et al., 2005; Pokutta & Weis, 2000). Sin embargo, durante la formación de las uniones adherentes la α -catenina no es capaz de interaccionar con los filamentos de actina y con la β -catenina a la vez, por lo que es necesario la interacción con otras proteínas para reforzar la adhesión como la α -actinina y la vinculina (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). También la cortactina funciona como una ABP de unión a la cadherina que participa en la nucleación de actina (El Sayegh et al., 2004; Helwani et al., 2004).

La Dbnl (también conocida como mAbp1) juega un papel importante en la reorganización del citoesqueleto de actina, la endocitosis y la formación de dendritas al interactuar con F-actina (Ghosh et al., 2020; Inoue et al., 2019). La interacción entre la β -catenina y la Dbnl era desconocida hasta ahora, sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la Dbnl es necesaria para la migración neuronal y la

polarización de neuronas al regular la expresión de la N-cadherina y la α -catenina en corteza de ratón (Inoue et al., 2019).

Aunque la mayoría de estas interacciones fueran conocidas, surge la necesidad de estudiar el papel de estas ABPs en epitelios polarizados como el tubo neural de pollo. Estos estudios proporcionarán una visión más global del papel de estas proteínas en un tejido vivo y no en cultivos celulares que es donde se han realizado la mayoría de estudios. Además, ayudará a comprender el papel de estas ABPs en la formación y el mantenimiento de la estructura del tubo neural y la implicación en diferentes procesos biológicos de los progenitores neurales como el ciclo celular y la INM.



C Interactoma del dominio de unión a la β -Catenina dependiente de la N-Cadherina

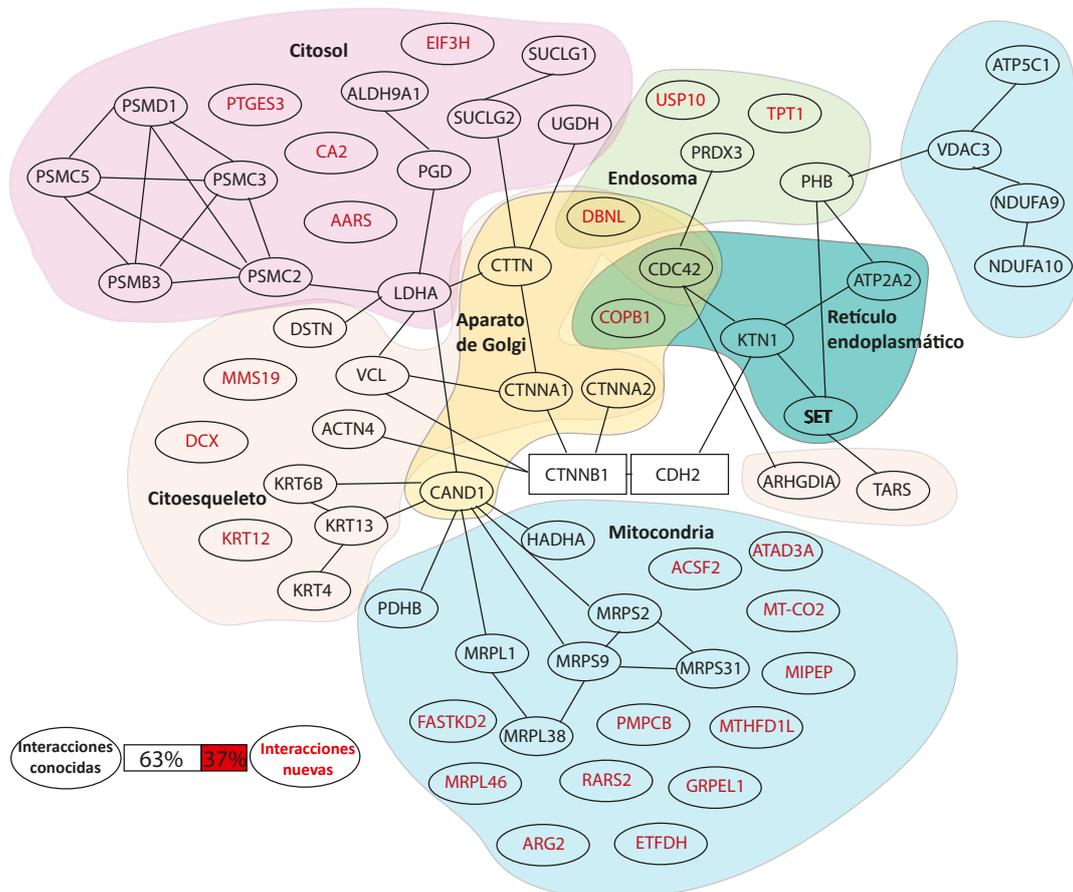
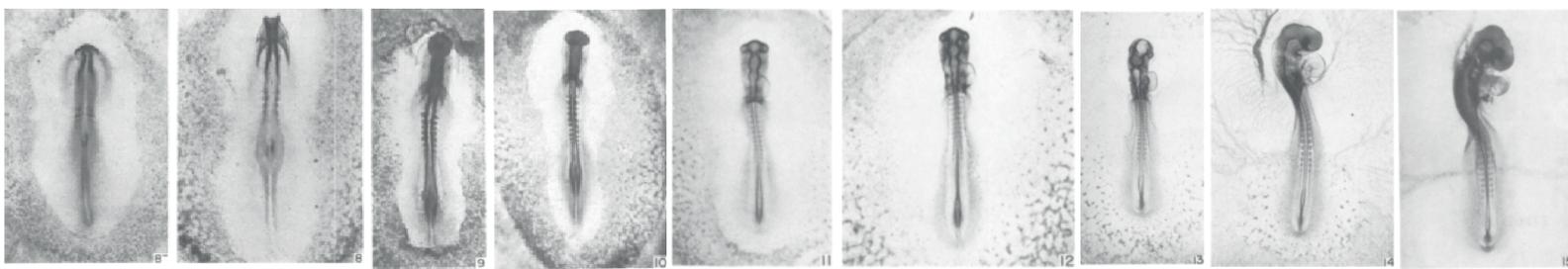


Figura 21. Identificación de nuevas proteínas que interaccionen con el complejo β -catenina/N-cadherina implicadas en la formación del complejo apical. (A) Esquema del diseño experimental. El tubo neural de los embriones de pollo fueron transfectados con la N-cadherina-ST o la N-cadherina $\Delta\beta$ Cat y se lisaron tras 24 horas en condiciones nativas. Las proteínas asociadas a la N-cadherina-ST y la N-cadherina $\Delta\beta$ Cat fueron aisladas mediante purificaciones con el sistema Strep-Tactin® y posteriormente identificadas por LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry). **(B)** Resultados de LC-MS/MS donde se encontraron 63 proteínas que interaccionan exclusivamente con la forma completa de N-cadherina. **(C)** Proteínas identificadas por LC-MS/MS que forman complejo con la N-cadherina exclusivamente a través de su interacción con la β -catenina.



OBJETIVOS



O

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido identificar proteínas unidoras de actina (ABPs) clave en la formación del complejo apical inducido por la β -catenina y esclarecer la relevancia de estas interacciones en los procesos dependientes de polaridad apicobasal.

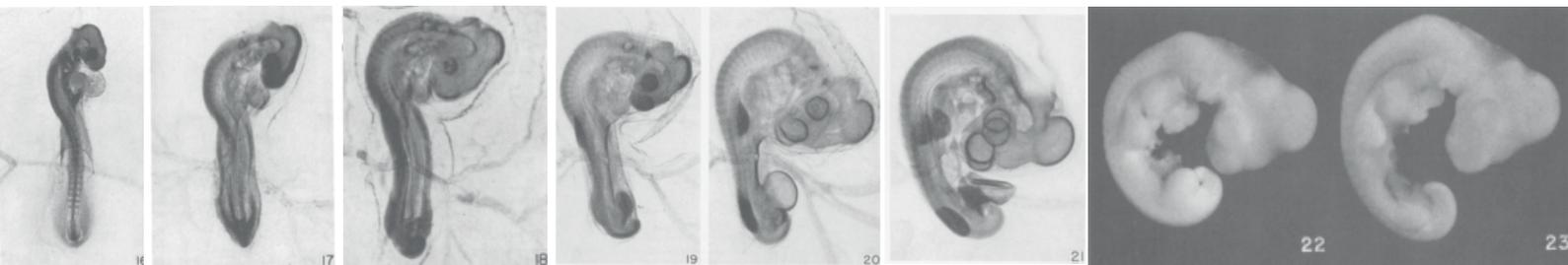
OBJETIVOS CONCRETOS

- Determinar la implicación de las diferentes ABPs que se unen a la N-cadherina a través de su dominio de unión a la β -catenina en el establecimiento y en el mantenimiento de la polaridad apicobasal de los progenitores neurales del tubo neural de pollo.
- Estudiar la expresión y la localización de la vinculina en el neuroepitelio de pollo.
- Analizar la implicación de la vinculina en la migración nuclear intercinética (INM) mediante experimentos *ex vivo* e *in vivo* en el tubo neural de pollo.
- Estudiar el papel de la vinculina en el ciclo celular de progenitores neurales.
- Determinar si el efecto del silenciamiento de la vinculina sobre el ciclo celular está conservado en líneas celulares no polarizadas.
- Estudiar la ganancia de función de la vinculina en la INM y el ciclo celular de los progenitores neurales.
- Descifrar el mecanismo por el cual la vinculina participa en la regulación de la INM y el ciclo celular de los progenitores neurales del tubo neural pollo.

O

MATERIALES Y MÉTODOS

M





1. Embrión de pollo como modelo de experimentación

La utilización del embrión de pollo como modelo experimental ha sido fundamental para el correcto desarrollo y avance de la presente tesis doctoral. Además de su sencilla, rápida y económica manipulación, este modelo proporciona una excelente visión del desarrollo. Al estar éste muy definido, nos permite manipular el embrión con precisión en los estadios del desarrollo de interés, además de poder seguir manteniéndolo en incubación hasta el final del experimento. El estudio utilizado para datar los diferentes estadios del desarrollo es el de Hamburger y Hamilton (HH) que se basa en signos externos apreciables en el embrión (Hamburger.V, 1951).

La electroporación *in ovo* es una de las diferentes técnicas que existen para manipular la expresión génica del embrión de pollo. En los primeros estadios de su desarrollo, éste empieza a desarrollar su sistema nervioso, además de otros como el circulatorio y el digestivo. En nuestro laboratorio, este desarrollo nos permite utilizar el tubo neural como ejemplo de epitelio polarizado, pudiendo así estudiar con detalle y de manera fiable procesos como la migración nuclear intercinética (INM) y el ciclo celular; temas de interés para nuestro grupo de investigación. Finalmente, el tubo neural del embrión de pollo nos proporciona un control interno dentro del mismo individuo, puesto que al electroporarlo el ADN plasmídico se introduce en un hemitubo quedando el otro hemitubo como control interno del mismo individuo.

2. Electroporación *in ovo* de embriones de pollo

La técnica de electroporación *in ovo* se utilizó en los experimentos donde fue necesario modular la expresión génica de proteínas en el tubo neural de pollo. Para ello se emplearon embriones de pollo de la raza White Leghorn de la granja Gibert (Tarragona, España) que incubamos a 37.5°C en una atmósfera de humedad del 45%.

Los constructos plasmídicos con el ADN de interés se inyectaron en el lumen del tubo neural de los embriones de pollo en estadios HH12-HH19 a una concentración de 0.5 – 3µg/µl en H₂O con un 5% de colorante *Fast Green* (para poder seguir la inyección). Una vez realizada la inyección, unos electrodos de platino se colocaron inmediatamente en paralelo a ambos lados del tubo neural y, utilizando un electroporador (TSS20 OVODYNE, intracell, England), se aplicó una serie de cinco pulsos de 20-25V y de 50 ms de duración creando una diferencia de potencial entre ambos lados del tubo neural. Puesto que el ADN, cargado negativamente, se desplaza hacia el lado positivo, sólo las células de un hemitubo se transfectan, quedando el otro lado del tubo sin transfección como control (**Figura 22**). Después de

la electroporación, los huevos se sellan y se dejan en el incubador hasta el estadio deseado para cada experimento (entre 24 y 48 horas).

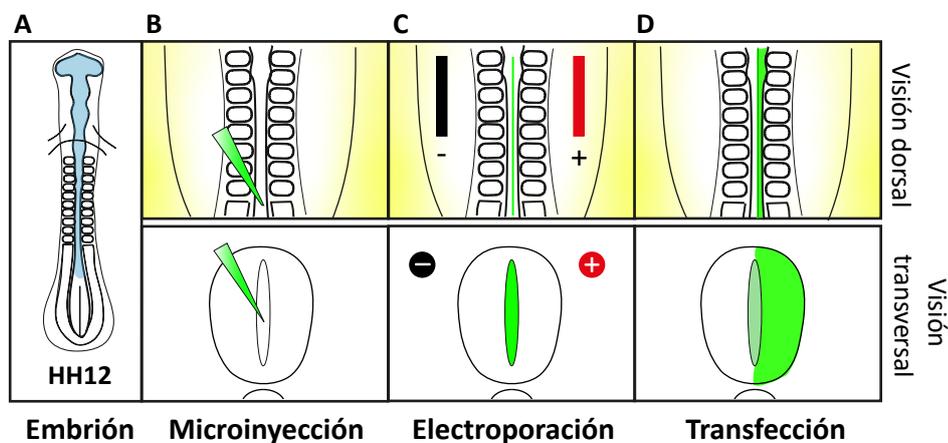


Figura 22. Electroporación *in ovo*. (A) Embrión de pollo en el estadio HH12. (B) Visión dorsal y transversal de la inyección del tubo neural. (C) Visión dorsal y transversal de la colocación de los electrodos. (D) Visión dorsal y transversal de la región del tubo neural electroporada.

3. Cultivos celulares

La línea celular HEK293 se cultivó en medio DMEM/F12, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) y 50mg/L de penicilina-estreptomicina en una atmósfera del 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. La línea celular HeLa se cultivó en medio DMEM (*high glucose pyruvate*) suplementado con un 10% de FBS y 50mg/L de penicilina-estreptomicina en una atmósfera del 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C.

4. Electroporación de cultivos celulares

La transfección transitoria de las distintas líneas celulares, así como la de los fibroblastos de embrión de pollo (CEFs, del inglés *chicken embryo fibroblast*) con vectores de expresión se llevó a cabo con un electroporador (Microporator MP 100, Digital Bio, Seoul, Korea) aplicando un pulso de 1200-1400V durante 20 ms. Finalmente, las células transfectadas se sembraron en función del experimento a realizar. Para los experimentos de PCR a tiempo real (RT-qPCR) se sembraron 1.5-3 millones de células por pocillo y condición en placas de cultivos de 6 pocillos y se dejaron crecer 24 horas. Para las inmunotinciones, se sembró 0.5-1 millón de células en placas de cultivos de 24 pocillos sobre cubres. Las células se dejaron crecer 24 horas hasta alcanzar una confluencia del 70 al 80% antes de lizarlas para continuar con los diferentes procedimientos.

5. Cultivo de los fibroblastos de pollo (CEFs)

Los CEFs se obtuvieron a partir de embriones en un estadio HH30-35 (7-9 días de desarrollo). En primer lugar, los embriones se disgregaron mecánicamente con pinzas. A continuación, se procedió a una disgregación de los fragmentos de tejido embrionario con tripsina-EDTA durante 15 minutos a 37°C y se añadió DNAsa I (concentración final 100U/ml) para digerir el ADN resultante del daño celular. Transcurrido ese tiempo, la tripsina se inactivó agregando un volumen igual al usado anteriormente de tripsina de medio con 10% de FBS. Tras centrifugar 5 minutos a 300 g para descartar agregados y tejido no disgregado, las células se resuspendieron en medio Optimen a una concentración de 15.000.000 células/ml para su electroporación (ver apartado 4 de *materiales y métodos: electroporación*)

6. Constructos de DNA

Para el estudio del papel de las diferentes proteínas de unión a la actina y en concreto de la vinculina en el neuroepitelio se utilizaron las siguientes construcciones de ADN:

Vectores vacíos:

- **pCDNA 3.0:** Vector con un promotor CMV sin GFP.
- **pCAGGS:** Vector con un promotor CAG sin GFP
- **pCIG:** Vector bicistrónico para una transfección transitoria de GFP que nos permite expresar nuestra proteína de manera independiente a la expresión de GFP.
- **pCMV:** Vector con un promotor CMV sin GFP.
- **pEGFP-C1:** Vector para fusiones con GFP en el extremo C-terminal.
- **pmCherry-C1:** Vector para fusiones con mCherry en el extremo C-terminal.
- **pSC2⁺:** Vector con un promotor CMV con GFP.
- **pSHIN:** Vector utilizado para clonar los shRNA, vector con un promotor H1-RNA polimerasa-III con GFP que nos permite monitorizar la expresión de las células transfectadas.
- **pSUPER:** Vector pSHIN sin GFP.

Constructos de la vinculina:

Diferentes investigadores que trabajan con la vinculina nos cedieron una serie de constructos de esta proteína (**Figura 23**).

pEGFP-C2-Vinculina-WT ratón: Forma salvaje de la vinculina de ratón (**Figura 23**). Esta sobreexpresión se subclonó en un vector pCIG para los estudios de ganancia de función a partir de las dianas de restricción EcoRI y SmaI. Vector cedido por el laboratorio del Dr. Wolfgang Ziegler

pmCherry-C1-Vinculina-T12: Forma constitutivamente activa de la vinculina de pollo (**Figura 23**). La mutación de los residuos D974, K975, R976, R978 a alanina interrumpe la interacción cabeza-cola de la vinculina, por lo cual este forma se acumula de forma constitutiva en sitios ricos en actina (Cohen et al., 2005). En este vector la vinculina-T12 está fusionada a la proteína fluorescente mCherry y fue utilizado para los estudios de localización de vinculina. Vector cedido por el laboratorio del Dr. Nicolás Borghi.

pEGFP-Vinculina-A50IΔC: Mutante de la vinculina de ratón con una mutación puntual en el aminoácido 50 (alanina por isoleucina) que impide su interacción con la talina y la β -catenina pero no con α -catenina (Peng et al., 2010) (**Figura 23**). Vector cedido por el laboratorio del Dr. Wolfgang Goldman. Este vector, además de la mutación A50I, tenía una delección del extremo C-terminal y fue usado de molde para generar una VCL-A50I completa. Para ello en primer lugar amplificamos por PCR el extremo N-terminal, que incluía la mutación A50I. En segundo lugar, amplificamos el extremo C-terminal a partir del vector VCL-WT y a continuación, mediante una PCR final, juntamos ambos fragmentos para general la VCL-A50I completa. Los cebadores externos tenían las dianas de restricción EcoRI y SmaI para poder introducirlo en el vector pCIG (**Tabla 1**).

Tabla 1 Cebadores del clonaje de VCL-A50I

Región amplificada	Cebadores
Extremo C-terminal VCL-A50I	D: ATGCCAGTGTTCATACGCG R: TTATCAATCCACCGTCGCGC
Extremo N-terminal VCL-WT	D: GCGCGACGGTGGATTGATAA R: CTA CTGGTACCAGGGAGTCT
VCL-A50I completo	D: ATGCCAGTGTTCATACGCG R: CTA CTGGTACCAGGGAGTCT

Todos los cebadores se utilizaron a una concentración de 10 μ M; D: Directo, R: Reverso.

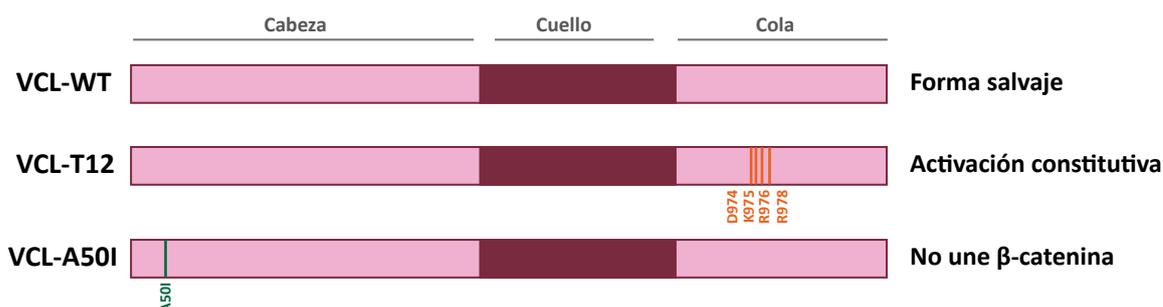


Figura 23. Constructos de la vinculina. Esquema representativo de los diferentes constructos de la vinculina utilizados. La forma salvaje de la vinculina (VCL-WT), la activación constitutiva de la vinculina (VCL-T12) con mutación en los residuos D974, K975, R976, R978 a alanina y el mutante de vinculina que no une a la β -catenina (VCL-A50I), con una mutación en el aa 50 de una alanina por una isoleucina.

Short hairpin RNA (shRNA)

Para interrumpir la expresión de las diferentes proteínas unidoras de actina (ABPs), se crearon shRNAs (del inglés short hairpin RNAs) de 19pb con la herramienta *Oligoengine, Seattle, WA, EEUU* y se clonaron en el vector pSHIN con las dianas BamH1 y HindIII (**Tabla 2**).

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para generar los diferentes shRNAs

ShRNA	Secuencia	Posición	Gen
ShControl	CCGGTCTCGACGGTTCGAGT		
Sh1VCL	GCAGACAACAGAAGACCAG	185	<i>Gallus gallus VCL</i>
Sh2VCL	GGAATGACAAAGATGGCGA	498	<i>Gallus gallus VCL</i>
Sh1CORT	AAGAACAGGAAGACCGAAG	1078	<i>Gallus gallus CTTN</i>
Sh2CORT	ACAAAGAATGGCACGGGAG	1118	<i>Gallus gallus CTTN</i>
Sh1ACTN4	CCCGACGAGAAGGCCATCA	732	<i>Gallus gallus ACTN4</i>
Sh1ACTN4	ATCAAAGTCCGGGAACA	1785	<i>Gallus gallus ACTN4</i>
Sh1DBNL	GAAATCAAGCGGGTCAACA	510	<i>Gallus gallus DBNL</i>
Sh2DBNL	GAATCAGTGGAGAAAGCCC	810	<i>Gallus gallus DBNL</i>
Sh1CTNNA1	AGAAGAAGCACGTCAACCC	2481	<i>Gallus gallus CTNNA1</i>
Sh2CTNNA1	ATGGCCTCGCTCAACCTCC	2366	<i>Gallus gallus CTNNA1</i>
Sh1CTNNA2	ATGGCAGACTCCTCGTGCA	776	<i>Gallus gallus CTNNA2</i>
Sh2CTNNA2	AGTAGCACAGGACAACATG	485	<i>Gallus gallus CTNNA2</i>
Sh1VCL human	TCAAACCACTGAGGATCAG	190	<i>Homo sapiens VCL</i>
Sh2VCL human	GCAGAATTATGTGATGATC	1255	<i>Homo sapiens VCL</i>

El shControl está constituido por una secuencia aleatoria que no codifica para ninguna proteína de pollo o humano. Todos los cebadores se utilizaron a una concentración de 10 μ M.

Otros constructos:

pCDNA 3.0 - Bcl2: Para realizar ensayos de rescate de muerte celular electroporamos un constructo codificante para la proteína antiapoptótica Bcl2 humana (Cayuso et al., 2006). Vector cedido por el laboratorio de la Dra. Elisa Martí.

pCMV-PACT-RFP: El dominio PACT es un motivo conservado de pericentrina y se usó como marcador de centriolos fusionada a RFP (Gillingham & Munro, 2000). Vector cedido por el laboratorio de la Dra. Elisa Martí

pEGFP-Cep152: CEP152 es un componente centriolar requerido para la duplicación del centrosoma (Dzhindzhev et al., 2010). Esta proteína se usó como marcador de centrosomas fusionada a GFP. Vector cedido por el laboratorio de la Dra. Elisa Martí.

pSC2⁺- GFP-membrana: Utilizado en los estudios que requirieron la visualización de la membrana plasmática.

pCAGGS-H2B-RFP: Para los estudios que requirieron la visualización de los núcleos de las células transfectadas se utilizó un vector de expresión codificante para la histona 2B fusionada a RFP.

7. Inmunotinción

A lo largo de la presente tesis se han realizado inmunotinciones tanto en líneas celulares como en secciones de tubo neural de embrión de pollo.

Para las inmunotinciones de líneas celulares, éstas se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubres hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se fijaron 15 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% y se procedió a las tinciones mediante inmunofluorescencia en el pocillo. En primer lugar, las células se permeabilizaron con PBT 0.1% durante 15 minutos, seguidamente se bloqueó con PBS-BSA durante otros 15 minutos y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario durante una noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS-BSA y se incubaron con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente (TA) en oscuridad durante 1 hora. Tras la incubación se realizaron tres lavados con PBS-BSA y las células se marcaron con hoechst o faloidina, si correspondía, durante 15 minutos a TA. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-BSA y se montaron en portas con mowiol como medio de montaje.

Para las tinciones sobre los cortes de los tubos neurales, los embriones se fijaron durante una noche a 4°C con un 4% de PFA, se incluyeron en bloques de un 10% de sacarosa y un 5% de agarosa en PBS y se cortaron en vibrátomo (VT 1000S, Leica) en secciones de entre 60 y 70µm de grosor.

La inmunotinción de las secciones de tubo neural se realizó en flotación siguiendo los mismos pasos que en la inmunotinción en células, explicada en este mismo apartado.

Tabla 3. Tampones para histología e inmunohistoquímica

PBS pH 7.4	Concentración final
NaCl	137mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
KH ₂ PO ₄	2mM

PBT	Concentración final
PBS	1X
Tritón-X100	0.1%-1%
PBS-BSA	Concentración final
PBS	1x
Tritón-X100	0.1%
Azida	0.05%

Los anticuerpos y reactivos utilizados se muestran a continuación:

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia:

Anticuerpo primario	Huésped	Dilución	Procedencia	Nº Referencia
aPKC	Ratón	1:500	Santa Cruz	Sc-1778
Caspasa	Conejo	1:1000	Millipore	AB3623
Fosfo histona H3 (PH3)	Rata	1:1000	Millipore	06-570
HuC/D	Ratón	1:500	Molecular probes	A21271
N-Cadherina	Rata	1:500	Invitrogen	13-2100
Rhodamina-Falloidina		1:1000	Invitrogen	R415
Sox2	Conejo	1:1000	Invitrogen	48-1400
Vinculina	Ratón	1:5000	Sigma	V9131
ZO-1	Ratón	1:1000	Invitrogen	339100
β -Catenin	Ratón	1:500	Sigma	C7207

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia:

Anticuerpo secundario	Huésped	Dilución	Procedencia	NºRef.
Alexa Fluor 488-conjugado anti-conejo	Burro	1:1000	Life Technologies	A21206
Alexa Fluor 488-conjugado anti-rata	Burro	1:1000	Life Technologies	A21208
Alexa Fluor 488-conjugado anti-ratón	Burro	1:1000	Life Technologies	A21202
Alexa Fluor 555-conjugado anti-conejo	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21428
Alexa Fluor 555-conjugado anti-rata	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21434
Alexa Fluor 555-conjugado anti-ratón	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21422
Alexa Fluor 633-conjugado anti-conejo	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21070
Alexa Fluor 633-conjugado anti-rata	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21050
Alexa Fluor 633-conjugado anti-ratón	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21052
Alexa Fluor 633(filtrado) -conjugado anti-ratón	Cabra	1:1000	Life Technologies	A21424

8. RT-qPCR

Para poder cuantificar la eficacia de los diferentes shRNAs se realizaron PCRs a tiempo real (RT-qPCR). Los CEFS fueron electroporados con los shRNAs de las diferentes ABPs o con el shControl (ver apartado 5 de materiales y métodos: *cultivo y electroporación de fibroblastos de embrión de pollo (CEFS)*) y tras 24 horas se lisaron. El RNA fue extraído con el kit High Pure RNA Isolation siguiendo las instrucciones del fabricante y el RNA total fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 Espectrofotómetro, ThermoScientific). A continuación, se retrotranscribieron cantidades equivalentes de RNA con el kit High-Capacity cDNA Reverse y la PCR se llevó a cabo en el termociclador LightCycler480 System (Roche) utilizando SYBr Green. Se utilizaron cebadores de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para la normalización de expresión.

Los cebadores utilizados para la RT-qPCR fueron los siguientes:

Tabla 6. Lista de cebadores para amplificación en RT-PCR

Gen	Cebador RT-PCR	Especie
VCL	D: CCCAGGAGGTGTCTGATGTT R: AAGCTCCCTTGCAGATTTGA	<i>Gallus gallus</i>
CTTN	D: GGAAGGCAGAAGCTGAGAGA R: CTGGTAGACTGGGCTTGAGG	<i>Gallus gallus</i>
ACTN4	D: ACAAGAACGTCAACGTGCAG R: CTTCTCTGCCACCTCAAAGG	<i>Gallus gallus</i>
DBNL	D: GACAGCACAGCCATCTACGA R: CCCTCGTCGATCATCTCAAT	<i>Gallus gallus</i>
CTNNA2	D: TAATAAATGCTGCGCTGACG R: TCCAGGGTATCGACATCTCC	<i>Gallus gallus</i>
GAPDH	D: CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG R: CATCTGCCCATTTGATGTTG	<i>Gallus gallus</i>
VCL	F: GCCAAGCAGTGCACAGATAA D: GCCTGCTCAGACTCCTCATC	<i>Homo sapiens</i>
GAPDH	D: GAGTCAACGGATTTGGTCGT R: TTGATTTGGAGGGATCTCG	<i>Homo sapiens</i>

Todos los cebadores se utilizaron a una concentración de 10 μ M; D: Directo, R: Reverso.

9. Hibridación *in situ*

Para llevar a cabo el estudio de expresión de RNA mensajero de la vinculina utilizamos la hibridación *in situ*. Los embriones de pollo se dejaron crecer hasta un estadio de HH16. Una vez transcurrido este tiempo, se diseccionaron en frío y fueron fijados con PFA al 4% durante una noche. Al día siguiente, se deshidrataron con concentraciones crecientes de metanol/PBT (25, 50, 75 y 100%) hasta el momento de realizar el procedimiento. Para el comienzo de la hibridación *in situ*, los embriones volvieron a ser rehidratados con concentraciones decrecientes de metanol/PBT (75, 50, 25 y 0%). A continuación, se blanquearon con 3% H₂O₂ en PBT durante una hora a TA y, tras tres lavados con PBT, se procedió a un tratamiento con proteinasa K de 15 min. Tras este tratamiento los embriones se lavaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con PBT y volvieron a fijar con un 4% de PFA y 0.2% de glutaraldehído durante 20 minutos a TA. Después de dos lavados más con PBT, se equilibró la muestra con el tampón de pre-hibridación durante 1h a 70°C y se añadió la sonda de vinculina a una concentración de 500 ng/ml durante toda la noche.

Al día siguiente, tras cuatro lavados de 30 minutos con la solución I a 60-70°, se realizaron cuatro lavados de 30 minutos con la solución II a 55-65 °C, seguidos de tres lavados de 5 min con tampón maleico fresco. Los embriones se bloquearon en tampón “blocking reagent” durante una hora a TA y, pasado este tiempo se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Durante el tercer día se realizaron 6 lavados de una hora con tampón maleico fresco a TA y durante el cuarto y último día se procedió a la detección de la sonda. Se realizaron tres lavados en NTMT en agitación durante 10 minutos y se incubó con la mezcla de reacción NBT/BCIP en NTMT durante 20 minutos. Una vez la señal fue apropiada, las muestras se lavaron con PBT pH 5.5 durante 10 minutos para parar la reacción y luego la dejamos en solución post-fijación 1h a TA. Finalmente, los embriones se incluyeron en un bloque de agarosa (5% agarosa, 10% sacarosa) y se cortaron con Vibrátomo en secciones de 60µm. Las secciones se fotografiaron con una cámara digital en color Olypues DP72 acoplada a un microscopio vertical Nikon E600.

Se utilizó una sonda de la vinculina diseñada a partir de la secuencia de ARNm de pollo. La sonda fue cedida por el laboratorio de la Dra. Elisa Martí.

Secuencia diana sonda de la vinculina: TTGCCGGGGGAAGGCGAGAGGGTACCGAGTTCGAGTCCCGCCCGGCCGGAACTGCCGGTCCGCACCGCCGCAGCCCGCTGAGGGGTGAGGAGTTCGGGGCGGCGTCTTTCTTATTTCTTTCTTTTCTCTCTCGGCGGAGGCTGCGGCTTTCTCGTGGGGCGCCAACCCGCAGGGACAGAGTTTTCCAGGAGTTGTGCGGACTTCGGGCTCCGGCCCCCTGCCCGCTGCCGCCATGCCGTCTCCACACGCGCACCATCGAGAGCATC-

TTGGAGCCCGTGGCTCAGCAGATCTCCACCTGGTCATCATGCACGAGGAGGGGGAGGTAGACGGCAAGGCCATCCCG-
 GACCTCACCGCCCCCGTGTGCGCCGTGCAGGCCGCTGTCAGCAACCTGGTGCGGGTTGGAAAAGAAACTGTGCAGACAA-
 CAGAAGACCAGATCTTGAAAAGGGATATGCCACCAGCATTTCATCAAAGTAGAGAATGCCTGCACCAAGCTCGTTCGAGCA-
 GCCCAGATGCTGCAAGCAGATCCTTATTTCAGTACCAGCTCGTGACTACCTAATTGATGGATCAAGAGGCATCCTTTCTGGAA-
 CATCAGACTTACTTCTGACATTTGATGAAGCGGAGGTAGGAATCTAACACGAGTGACTTAGGTCCGTAAAATCATCCGT-
 GTCTGCAAAGGAATATTGGATATCTGACTGTGGCAGAAGTAGTAGAGACTATGGAGGATTTGGTGACATATACCAAAGA

Tabla 7. Anticuerpo utilizado para hibridación *in situ*

Anticuerpo	Dilución	Procedencia	Referencia
Digoxigenina	1:1000	Boehringer Mannheim	1093274

Tabla 8. Tampones utilizados durante la hibridación *in situ*

Post-fijación. PBT	Concentración
Glutaraldehido	0.2%
PFA	4%
SSC 20X	Concentración
Citrato Na	0,3M
NaCl	3M
Pre-hibridación	Concentración
Formamida	50%
SSC pH 4,5	5X
tRNA	20mg/ml
SDS	1%
Heparina	0.1%
Solución I. H ₂ O	Concentración
Formamida	50%
SSC pH 4.5	5X
SDS	1%
Solución II. H ₂ O	Concentración
Formamida	50%
SCC pH 4.5	2X
SDS	0.2%
Tampón maleico pH:7.5	Concentración
Ácido maleico	100mM
NaCl	150mM
NTMT. H ₂ O	Concentración
NaCl	100mM
Tris pH 9.5	100mM
MgCl ₂	50mM
Tritón	0.1%

Todos los tampones en agua se hicieron con H₂O- DEPC

10. Ensayo incorporación EdU

En los ensayos de proliferación en los embriones de pollo electroporados a HH12, añadimos 200 μ l de EdU a 1mM sobre la membrana vitelina del embrión aún en el huevo 4 horas antes de la disección y fijación con PFA 4%. Las secciones de 60 μ m obtenidas con el vibrátomo fueron procesadas según las instrucciones del fabricante del kit Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging. Una vez acabado el protocolo las secciones fueron teñidas con Hoesch y montadas en portas para su posterior observación en el microscopio confocal SP5 (Laser-spectral scanning confocal, Leica).

11. Citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello, los embriones fueron electroporados a HH12 con los vectores de interés y tras 24 horas, la zona GFP⁺ fue diseccionada en medio neurobasal. La suspensión celular se obtuvo a través de la digestión de los tubos neurales con tripsina-EDTA, DNAsa previamente activada con Ca⁺/Mg durante 15 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó mediante la adición de medio con 10% de FBS y se centrifugaron 5 minutos a 300 rcf. Se resuspendieron en PBS, se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos y tras eliminar éste, se permeabilizaron con PBS-BSA y se marcaron con Hoechst.

La fluorescencia emitida por el Hoechst y la GFP fue determinada por citometría de flujo utilizando el citómetro *MoFlo* (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) y el contenido de DNA celular se analizó con el software *Multiciclo* (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

12. Imágenes *in vivo*

Ante la necesidad de realizar un estudio más profundo del comportamiento celular durante la INM procedimos a capturar imágenes a lo largo del tiempo en rodajas de tubo neural de embrión de pollo. Esto se hizo con una adaptación del protocolo descrito por el laboratorio de la Dra. Kate Storey (Das et al., 2012).

Todos los embriones se electroporaron con los vectores GFP-membrana y H2B-RFP que nos permitieron distinguir con facilidad la membrana plasmática y los núcleos de las células respectivamente (ver apartado 6 de materiales y métodos: *constructos de DNA*). En el grupo control, además de estos vectores, electroporados a una concentración de 0.2 μ g/ μ l, los embriones se electroporaron con el vector pSUPER-shControl (sin GFP) a una concentración de 2.5 μ g/ μ l en un estadio HH16 durante 8-10 horas en el incubador. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la disección de los embriones y a la

selección de la zona transfectada en medio L15. Las regiones de interés fueron embebidas en bloque hechos con un 3% de agarosa *low gelling* disuelta en medio neurobasal complementado con penicilina-estreptomicina al 1X para posteriormente ser cortadas en el vibrátomo en secciones de 250 μm . El tejido estuvo en hielo durante todo el proceso.

Una vez obtuvimos las rodajas se procedió a poner los cortes en una placa de Petri con fondo de vidrio embebidos en 2ml de agarosa *low gelling* al 0.5% disuelta en medio neurobasal. Una vez solidificada la agarosa se añadieron 2ml de medio neurobasal suplementado con B-27, L-glutamina y penicilina-estreptomicina al 1X. Para los embriones tratados con blebistatina se siguió el mismo procedimiento que con los embriones control. Una vez finalizado el proceso, y justo antes de empezar la captura de imágenes, se añadió una concentración final de 12,5 μM de blebistatina (para la condición de blebistatina) y 12,5 μM de DMSO (para la condición control) sobre los cortes. Para los embriones shVCL, electroporamos el vector pSUPER-shVCL a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y los vectores GFP-mb y H2B-RFP a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en embriones HH16 y se dejaron desarrollar durante 8-10 horas. Una vez diseccionados, se añadió una concentración de 12,5 μM de DMSO antes de empezar a capturar las imágenes. Las imágenes se adquirieron durante 10-14 horas, utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM-780 (*confocal and multiphoton microscope*) con un objetivo de 40X con aceite como medio de inmersión. Se tomaron imágenes de 20-25 secciones espaciadas 1.5 μm a intervalos de 5 minutos. Finalmente las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schindelin et al., 2015).

13. Adquisición de imágenes

Las imágenes de confocal fueron adquiridas usando el microscopio confocal SP5 (*Laser-spectral scanning confocal*, Leica) y el microscopio confocal Zeiss LSM-780 (*confocal and multiphoton microscope*). Las imágenes de un mismo experimento fueron adquiridas por el mismo microscopio para evitar variabilidad técnica. En ambos microscopios las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 40X con aceite como medio de inmersión. La proyección máxima de 5 secciones consecutivas (4 μm total Z) de los diferentes embriones fueron cuantificadas con el programa ImageJ (Schindelin et al., 2015).

14. Cuantificaciones con ImageJ

Para el análisis de los diferentes resultados se emplearon diversos métodos de cuantificación.

Cuantificación porcentaje de cortes con alteraciones en el citoesqueleto de actina: Consideramos como corte con alteraciones aquellos que presentaban una discontinuidad en la membrana apical de al menos un 10% de la zona electroporada.

Cuantificación distribución actina: Para poder cuantificar el efecto en la distribución de la actina en el eje apicobasal con los shRNAs de las diferentes ABPs y tras la sobreexpresión de la VCL-WT y la VCL-A50I, se realizaron unas medidas de intensidad de pixel de la región de interés con la herramienta *plot profile* del programa ImageJ. En primer lugar, se cuantificó la actina presente en el lumen del tubo neural (definimos la región del lumen como la región comprendida entre los dos polos apicales el tubo neural), dándole a dicha región un valor de 10 pixeles para poder normalizar y comparar todos los embriones entre sí. El mismo procedimiento se llevó a cabo con la región del tubo, región definida entre el lado apical del hemitubo electroporado y su lado basal (a la que se le dio un valor de 100 pixeles). Posteriormente, los valores absolutos fueron transformados en valores relativos dándole al valor máximo de cada cuantificación el valor de uno. Las gráficas representan los valores relativos medio de 6 embriones por condición a lo largo del eje apicobasal.

Cuantificación posición núcleos a lo largo del eje apicobasal: Para el estudio de la posición de los núcleos en el eje apicobasal se midió la distancia de cada núcleo celular con respecto al polo apical con la herramienta *Measure* del programa ImageJ. Todos los valores fueron normalizados para poder comparar los embriones entre sí. Se cuantificaron entre 500-600 células de 5-9 embriones por condición.

Cuantificaciones movimientos vídeos: Para poder interpretar los vídeos de las rodajas de los tubos neurales se han tenido en cuenta tres parámetros diferentes:

-Velocidad media: Cálculo de la velocidad durante todo el recorrido de la célula, expresada en $\mu\text{m}/\text{minutos}$ (Figura 24).

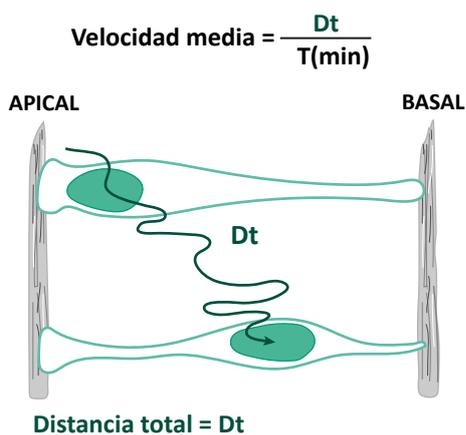


Figura 24. Representación del cálculo de la velocidad media durante los vídeos. Siendo Dt la distancia total recorrida por la célula, es decir el sumatorio de todos los desplazamientos individuales. Siendo T el tiempo total durante el que se ha seguido dicha célula.

-Velocidad instantánea: Velocidad media teniendo en cuenta únicamente la distancia entre el punto inicial y el punto final(Figura 25).

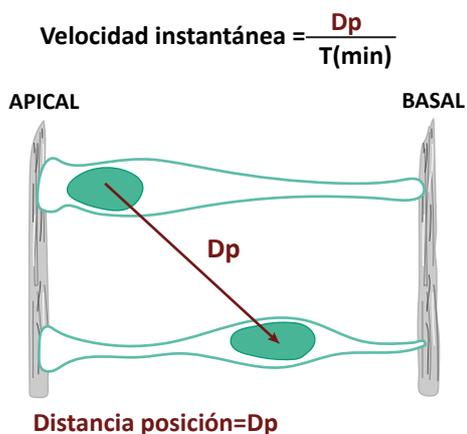


Figura 25. Representación del cálculo de la velocidad instantánea durante los vídeos. Siendo Pi la posición inicial y Pf, la posición final de un movimiento individual. Siendo Ti punto inicial en el tiempo y Tf el tiempo final de un movimiento individual.

-Direccionalidad: Cociente entre la distancia de posición y la distancia total. Nos indica cuán directo es un movimiento (Figura 26).

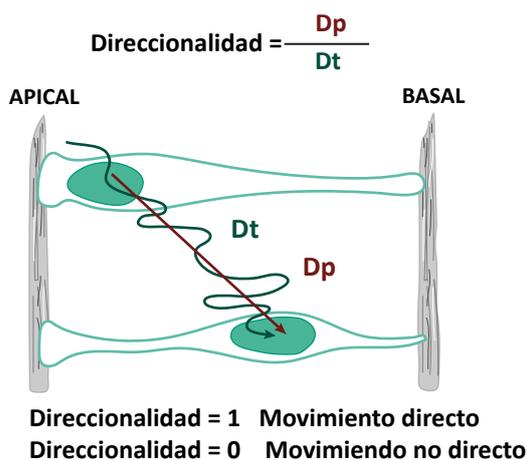


Figura 26. Representación del cálculo de la direccionalidad durante los vídeos. Siendo Dp, distancia de posición (diferencia entre la posición final e inicial) y Dt la distancia total recorrida por la célula en el movimiento a analizar.

Cuantificación mitosis videos: Para cuantificar el número de células en mitosis durante los videos, se procedió a contar todas las células que presentaban condensación de DNA, que pudimos visualizar gracias al marcador de núcleos H2B-RFP.

Cuantificación caspasa3: Para la cuantificación del marcador de muerte caspasa3 se realizaron medidas de intensidad del píxel en la zona electroporada, que se normalizaron con la intensidad de píxel de la región no electroporada. Las medidas de la intensidad de píxel del marcaje se llevaron a cabo con la herramienta *Measure* del programa ImageJ, teniendo en cuenta el valor *Mean* que nos indica la media de intensidad de píxel en la región y canal seleccionado.

Cuantificación distancia centrosomas: Para cuantificar la distancia entre los centrosomas y la membrana apical, esta distancia se midió con la herramienta *Measure* del programa ImageJ.

15. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 6 (Motulsky 1999). En todos los experimentos, se realizó un estudio de normalidad de los datos a través del test D'agostino & Pearson. En la mayoría de análisis los datos presentaron una distribución normal, por lo que las diferencias se analizaron mediante el test T-Student cuando se comparaban dos grupos y mediante ANOVA de una vía cuando se compararon tres grupos o más (seguida de un test de Tukey). En algunas situaciones, la distribución de los datos no fue normal; esto sucedió en las medidas de posición de núcleos a lo largo del eje apicobasal y en el análisis de los movimientos de las células durante las películas. En este caso los datos se analizaron mediante el test U Mann Whitney cuando se compararon dos grupos y mediante el test Kruskal-Wallis cuando se compararon tres grupos o más (Flores-Ruiz et al., 2017).

Los datos cuantitativos con distribución normal se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos cuantitativos con una distribución no normal, se expresan con la mediana. En todos los casos se estableció un grado de significancia <0.05 . p-valor < 0.05 : (*), p-valor < 0.01 (**), p-valor < 0.01 (***), p <0.0001 (****). Se estableció un límite de confianza mayor al 95%.

16. Productos y materiales

Tabla 13. Productos y materiales utilizados en los métodos

Producto	Casa comercial	Referencia
Ácido maleico	Sigma	M0375
Agarosa	Nzytech	MB05202
Agarosa Low Geling	Sigma	9045-10
Azida	Sigma	S2002-100
B27	Life technologies	211031049
Blebistatina	Sigma	B0560-1MG
BSA (albúmina suero bovino)	Sigma	A7906
Capilares	Narishige	GD-1
Citrato de Sodio	Sigma	1613859
Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging kit	Life technologies	C10340
Cubres	VWR	035-1000
Cubres células	VWR	631-0666
DEPC	Sigma	D-5758

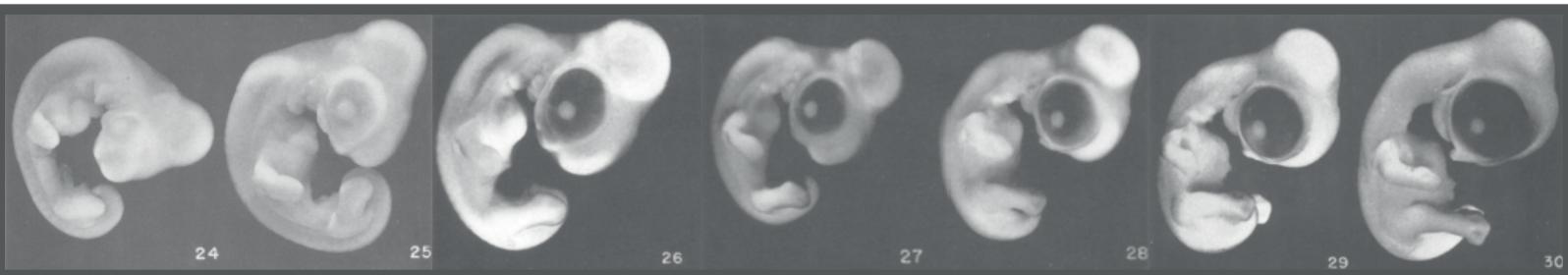
DNAsa	Sigma	D5025
Enzima de restricción BamH1	Takara	ER0055
Enzima de restricción EcoR1	Takara	ER0275
Enzima de restricción HindIII	Takara	ER0505
Enzima de restricción Sma1	Takara	ER0665
Fast Green	Sigma	F7258
FBS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Formamida	Merck	1096841000
Glutaraldehído	Sigma	G5882
H ₂ O ₂	Sigma	H-1009
Heparina	Sigma	H9267
High-Capacity cDNA reverse Kit	Life technologies	4368814
High Pure RNA Isolation Kit	Roche	11828665001
Hoeschst	Thermo scientific	R415
KCl	Merck	104936-1000
KH ₂ PO ₄	Merck	104877-1000
L-Glutamina	Life technologies	25030-024
Matraz T175	Cultek	15431080
Medio DMEM/F12, HEPES	Thermo Fisher Scientific	31330-038
Medio DMEM, high glucose, pyruvate	Thermo Fisher Scientific	4196-029
Medio L15	Sigma	L4386
Medio Neurobasal	Life Technologies	211031049
Medio Optimen	Life Technologies	31985-047
Metanol	Panreac	131091-1214
MgCl ₂	Merk	105833 0250
Mowiol	Calbiochen	475904
NaCl	Calbiochen	7760-5
NaF	Sigma	57920-100
Na ₂ HPO ₄	Merck	106580-1000
Nava	Sigma	56508
NZY qPCR Green	Nzytech	MB22102
Paraformaldehido (PFA)	Sigma	1040051000
Penicilina/Streptomycin	Life Technologies	15140-148
Phusion High Fidelity DNA Polimesasa	Life Technologies	F530L
Portaobjetos	VWR	631-1303
Proteinasa K	Sigma	3115887001
Tripsina-EDTA	Life technologies	25200-072
Tris	Sigma	T60661
Tritón-X100	Sigma	T9284
tRNA	Sigma	109223
Placa cultivos (6 pocillos)	Corning-Cultek	3516

Placa cultivos (24 pocillos)	Corning-Cultek	3526
Placa Petri fondo vidrio	IBIDI	81158
Sacarosa	Merk	107687 1000
SDS	Omnipur	7910-100



RESULTADOS

R



R

1. La vinculina controla el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio

El citoesqueleto de actina tiene un papel fundamental en la estabilidad de complejo apical y del neuroepitelio en general (Arai & Taverna, 2017). Por ese motivo, una vez obtenidos los resultados de espectrometría de masas seleccionamos algunas de las proteínas unidoras de actina (ABPs) que se unen a la N-cadherina a través de su dominio de unión a la β -catenina (**Figura 21**). Para estudiar el papel de estas proteínas en el mantenimiento del citoesqueleto de actina en el neuroepitelio de pollo, realizamos estudios de supresión génica de las ABPs mediante constructos generadores de shRNAs (short-hairpin RNA) para cada una de ellas.

En primer lugar, generamos dos shRNAs distintos para cada gen (**Tabla 2**), los electroporamos en fibroblastos de embrión de pollo (CEFS) y transcurridas 24 horas validamos la eficacia de estos shRNAs mediante una RT-qPCR. Después de esas 24 horas, la expresión de la α -actinina4 (ACTN4) se redujo un 55% (sh1ACTN4) y un 33% (sh2ACTN4) en comparación con el shControl (**Figura 27.D**). Con el sh1 de la α -E-catenina (CTNNA1) no se obtuvo una bajada significativa de la expresión (bajada del 13%), sin embargo, obtuvimos una bajada del 88% con el sh2CTNNA1 (**Figura 27.E**). La expresión de la α -N-catenina (CTNNA2) se redujo con los dos shRNAs de manera similar, con más de un 80% de bajada en ambos casos (**Figura 27.F**). Algo similar sucedió con los shRNA de la cortactina (CTTN) donde tanto el sh1CTTN como el sh2CTTN provocaron una bajada de expresión de más del 80% (**Figura 27.G**). La expresión de Dbnl disminuyó un 20% con el sh1DBNL y un 60% con el sh2DBNL (**Figura 27.H**). Finalmente, la expresión de la vinculina (VCL) se redujo un 76% con el sh1VCL y un 59% con el sh2VCL respecto al shControl (**Figura 27.I**). Es importante mencionar que la eficacia de electroporación no es del 100%, sino que es, aproximadamente, de entre el 60% y el 70%, por lo que la expresión cuantificada en la RT-qPCR incluiría también a las células no electroporadas, siendo de esta manera la eficiencia de los shRNAs aún mayor de lo que se muestra en las gráficas.

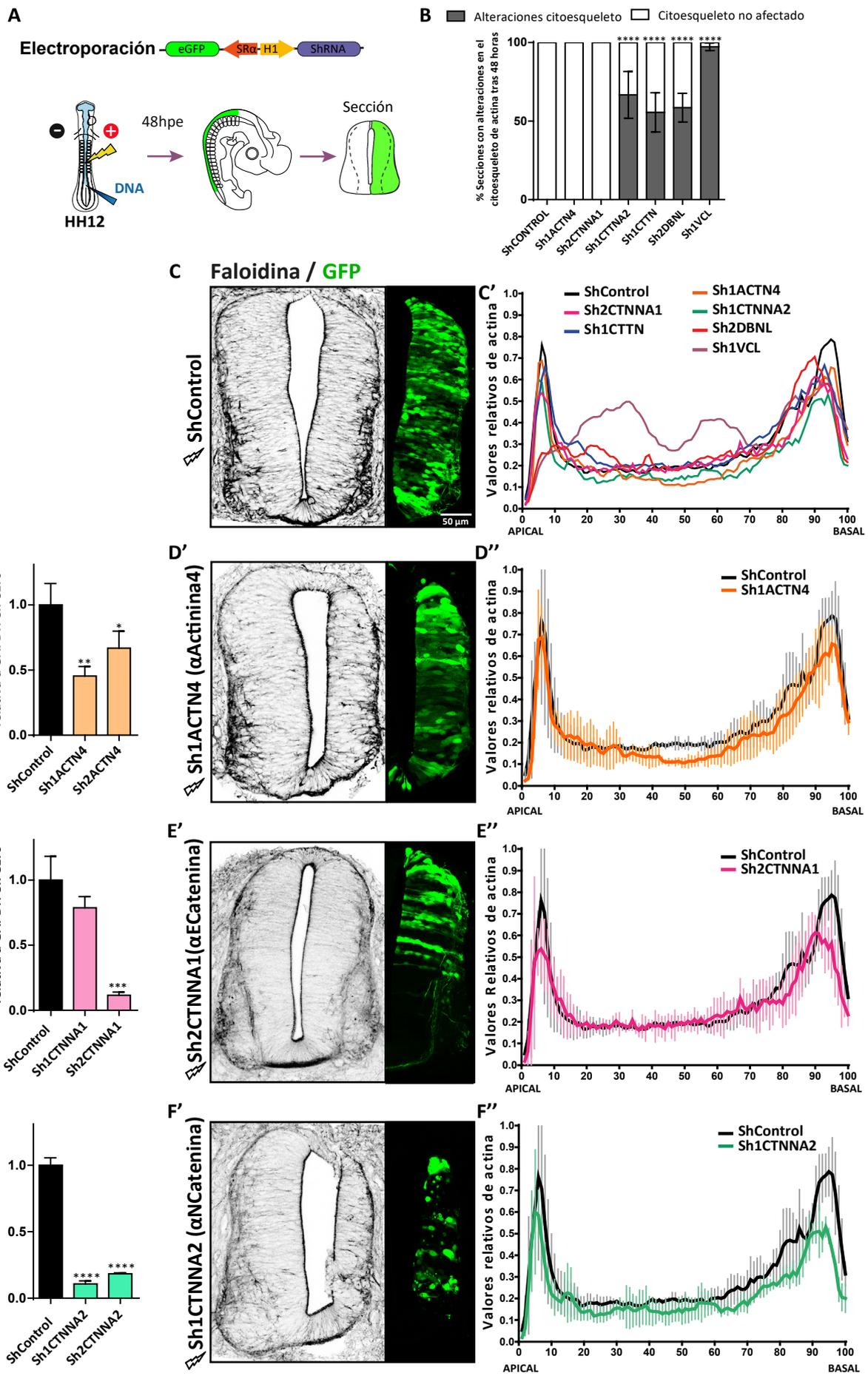
Una vez testados los shRNAs, procedimos a la electroporación *in ovo* de los shRNAs que presentaron una mayor bajada en la expresión para cada gen. Para ello electroporamos los constructos en el tubo neural de pollo de embriones en un estadio HH12 y, 48 horas post-electroporación (hpe) realizamos tinciones con faloidina (**Figura 27.A**) para comprobar cómo el silenciamiento de las diferentes ABPs afectaba al citoesqueleto de actina (**Figura 27.D, A'-I'**). Tras 48 horas, con la electroporación con el sh1VCL observamos una gran desestructuración del citoesqueleto de actina a lo largo de todo el hemitubo tratado. Además, como se puede comprobar en la imagen de la **Figura 27.I'** las células electroporadas con el shRNA contra la vinculina adoptaron una morfología redondeada, en comparación con las electroporadas con el shControl. El silenciamiento de la α -N-catenina (**Figura 27.F'**), la cortactina (**Figura**

27.G') y la Dbnl (**Figura 27.H'**) también alteró la distribución de la F-actina a lo largo del eje apicobasal, pero en menor medida que el silenciamiento de la vinculina.

Para poder evaluar las alteraciones en el citoesqueleto de actina debido a la ausencia de las diferentes ABPs en el neuroepitelio, cuantificamos el porcentaje de secciones con alteraciones en el citoesqueleto de actina del complejo apical. Consideramos secciones con alteraciones en el citoesqueleto de actina, aquellas que presentaron una discontinuidad en la membrana apical en al menos un 10% de la región electroporada (habiendo o no invasión de células al lumen) (**Figura 27.B**). Como se observa en la gráfica, el sh1VCL fue el que presentó un mayor porcentaje de secciones con alteraciones en el citoesqueleto; un 98% de las secciones analizadas. A éste, le siguieron el sh2CTNNA2 con un 65% de cortes con alteraciones, el sh2DBNL donde un 62% de las secciones presentaron alteraciones y el sh2CORT con un 55% de cortes con alteraciones. De los shACTN4 y shCTNNA1 probados, ninguno presentó alteraciones en el citoesqueleto de actina del neuroepitelio (**Figura 27.B**).

A continuación, analizamos la distribución de la actina a lo largo del eje apicobasal del tubo neural en los embriones transfectados con los shRNAs. Para ello, realizamos unas medidas de intensidad de pixel de la región de interés con la herramienta *plot profile* del programa ImageJ (**Figura 27. D''- I''**) y normalizamos los resultados para poder comparar los distintos embriones entre sí. Tras este análisis observamos que el silenciamiento de la vinculina fue el que presentó una mayor alteración en la distribución apicobasal de la actina en comparación con el control, que localiza la actina mayoritariamente en las membrana apical y basal (**Figura 27. I''**).

En conjunto, nuestros análisis indican que la vinculina tiene un papel relevante en la regulación del citoesqueleto de actina en el neuroepitelio. Por este motivo, decidimos profundizar más en el mecanismo por el cual la vinculina regula el mantenimiento de la integridad del neuroepitelio.



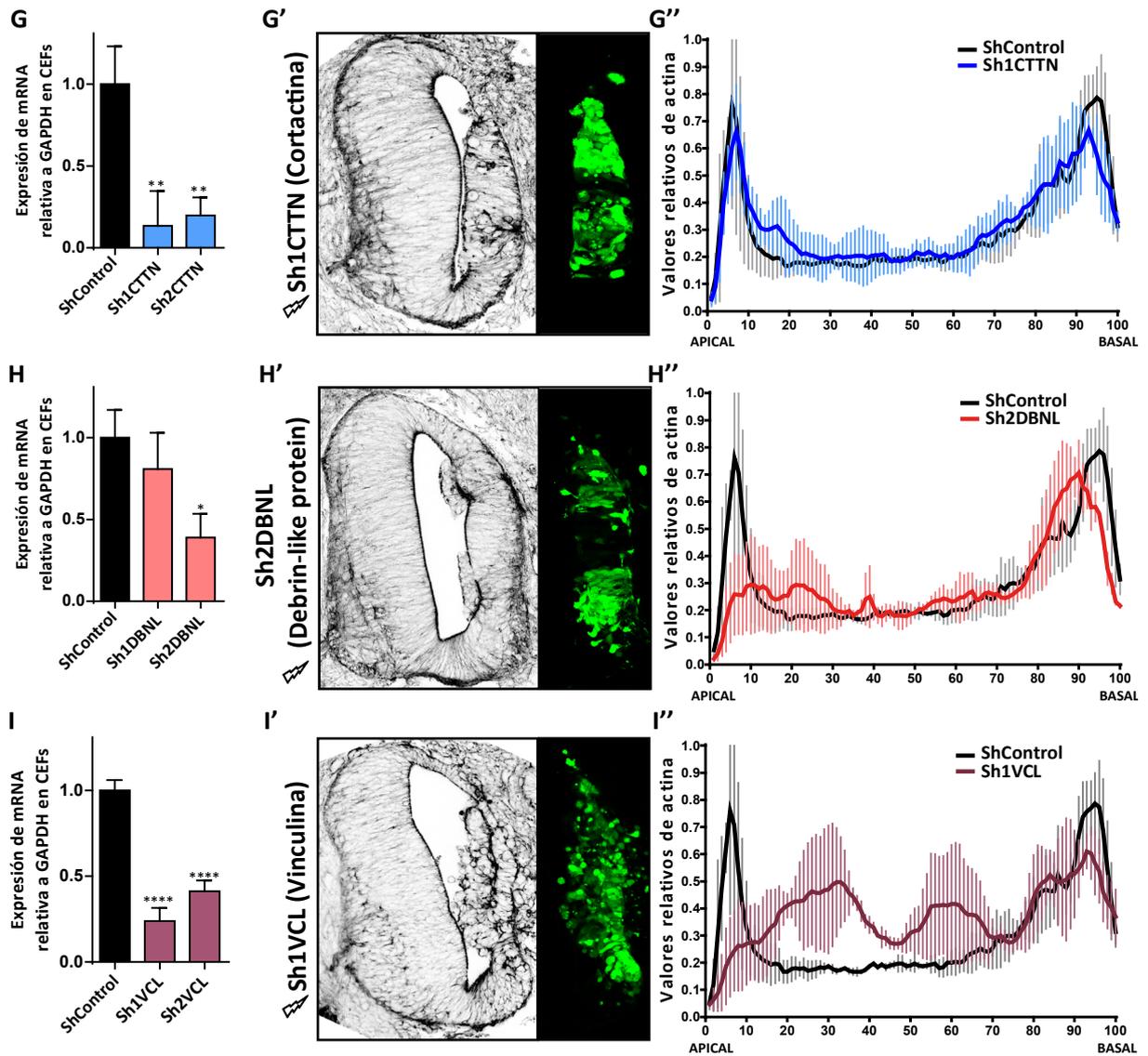


Figura 27. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina del neuroepitelio. (A) Diseño experimental. Los embriones de pollo HH12 (48h de incubación) fueron electroporados con los shRNAs de las diferentes ABPs durante 48hpe. (B) Cuantificación del porcentaje de secciones con alteraciones en el citoesqueleto de actina tras la electroporación de los diferentes shRNAs. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (**** = $p < 0.0001$). (D-I) Análisis de la expresión de ARNm de ACTN4 (D), CTNNA1 (E), CTNNA2 (F), CTTN (G), DBNL (H) y VCL (I) normalizadas con GAPDH tras la expresión de los diferentes shRNAs en CEFs durante 24 horas. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (*= $p < 0.005$, ** = $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$). (C, D'-I') Tinciones con faloidina (negro) de secciones transversales de embriones de pollo electroporados a HH12 con los diferentes shRNAs (transfección GFP, verde) durante 48hpe. ShControl (C), sh1ACTN4 (D'), sh2CTNNA1 (E'), sh1CTNNA2 (F'), sh1CTTN (G'), sh2DBNL (H') y sh1VCL (I') a 48 horas. (C', D''-I'') Distribución de actina tras la electroporación de los diferentes shRNAs en las diferentes secciones transversales a lo largo del eje apicobasal del neuroepitelio (C'-I'). Cada gráfica representa la media de la distribución de actina de tres experimentos diferentes, en cada uno de los cuales se cuantificaron 4-6 embriones.

2. La vinculina: expresión y localización

Los primeros estudios sobre la vinculina mostraron que esta proteína se localiza en las regiones de las células donde las terminaciones de los filamentos de actina se unen a la membrana (Geiger, 1979; Geiger et al., 1980). La vinculina es un componente esencial para la adhesión celular. Por una parte, podemos encontrar a la vinculina en las uniones adherentes, con la N-cadherina como molécula de adhesión y, por otro lado, la encontramos en las adhesiones focales con las integrinas como moléculas de adhesión (Bays & DeMali, 2017). En ambas situaciones, la vinculina ejerce una fuerza mecánica que ayuda a la estabilización de la adhesión. A día de hoy, existen pocos estudios sobre la localización de la vinculina en el neuroepitelio. A pesar de esto, cabría esperar que en el tubo neural de pollo, la vinculina se localizara en la membrana apical con las uniones adherente, como sucede en *Xenopus* (Roffers-Agarwal et al., 2008) y en la membrana basal, donde se localizan las adhesiones focales (Long et al., 2016).

Para comprender un poco más el papel de la vinculina en el tubo neural de pollo realizamos estudios de expresión y de localización. Basándonos en la secuencia ARNm de pollo (NCBI: NM_205441.2) usamos sonda de hibridación *in situ* marcada con digoxigenina y analizamos la expresión de la vinculina en este neuroepitelio después de 56 horas de incubación (estadio HH16) (**Figura 28.A**). En ese estadio, observamos que la vinculina tiene una expresión alta y homogénea a lo largo de todo el tubo neural (**Figura 28.A**).

En cuanto al estudio de localización, se realizó mediante la fusión de la vinculina a la proteína fluorescente mcherry, ya que no encontramos en el mercado ningún anticuerpo que detectara la vinculina endógena de pollo. Para este estudio utilizamos dos vectores de expresión: uno con la vinculina salvaje (VCL-WT) y otro con una forma de la vinculina constitutivamente activa (VCL-T12). Tras la transfección de ambos constructos, la vinculina presentó una localización similar, aunque con pequeñas diferencias en las membranas apical y basal y en el citoplasma. Por una parte, la VCL-T12 al estar ya activa y presentar más afinidad por la actina, se acumuló mayoritariamente en las membranas apical y basal, sitios donde también se acumula la F-actina. También se pudo observar presencia de la vinculina en el citoplasma de los progenitores neurales, aunque en menor concentración (**Figura 28.B**). Por otra parte, con la transfección de la VCL-WT se observó una distribución similar, aunque con una mayor presencia de la vinculina citoplasmática (datos no mostrados). Por ese motivo, concluimos que la vinculina tiene una localización mayoritaria en las membranas apical y basal.

Para estudiar la localización de la vinculina en la membrana apical realizamos una tinción contra N-cadherina y comprobamos que la vinculina colocaliza con esta proteína, por lo tanto, concluimos que

la vinculina se localiza en el subdominio de las en las uniones adherentes dentro del complejo apical (Figura 28 C).

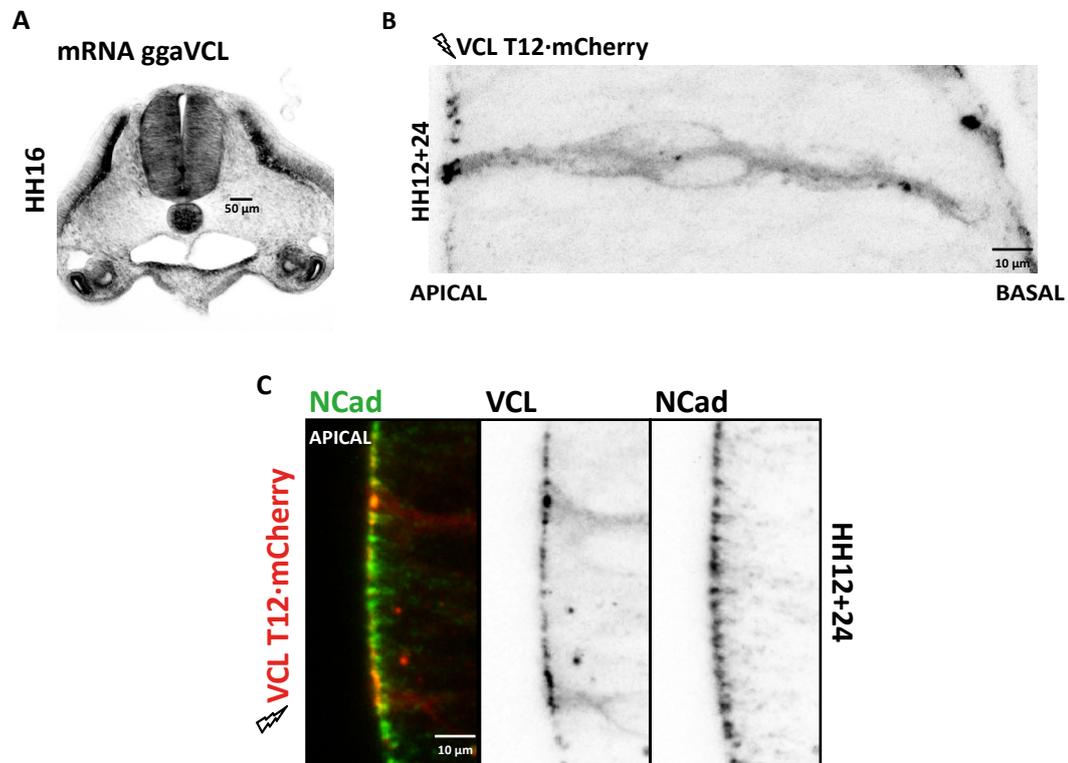


Figura 28. La vinculina se expresa en el tubo neural de pollo y se localiza en las membranas apical y basal. (A) Imagen de una sección transversal de tubo neural de pollo en el estadio HH16 (56 horas) mostrando la expresión de ARNm de la vinculina mediante hibridación *in situ*. (B) Ampliación de una sección transversal de tubo neural de pollo electroporado a HH12 con la VCL-T12-mCherry (negro). (C) Ampliación de una sección de tubo neural de pollo electroporados a HH12 con la VCL-T12-mCherry (transfección, rojo y negro) teñidas contra la N-cadherina (verde y negro), que muestra la membrana apical.

3. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en proteínas asociadas al complejo apical

Después de comprobar que la vinculina tiene un importante papel en el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio (Figura 27), decidimos estudiar en profundidad cómo se desarrolla éste fenotipo. Lo primero que hicimos fue evaluar el efecto de la ausencia de la vinculina sobre la integridad del citoesqueleto de actina a lo largo del tiempo. Una vez electroporamos el shVCL en un estadio HH12, dejamos a los embriones desarrollarse durante 24, 36 y 48hpe (Figura 29). Mediante la tinción con faloidina observamos que el silenciamiento de la vinculina provocaba alteraciones en el citoesqueleto de actina a partir de las 36 hpe (Figura 29).

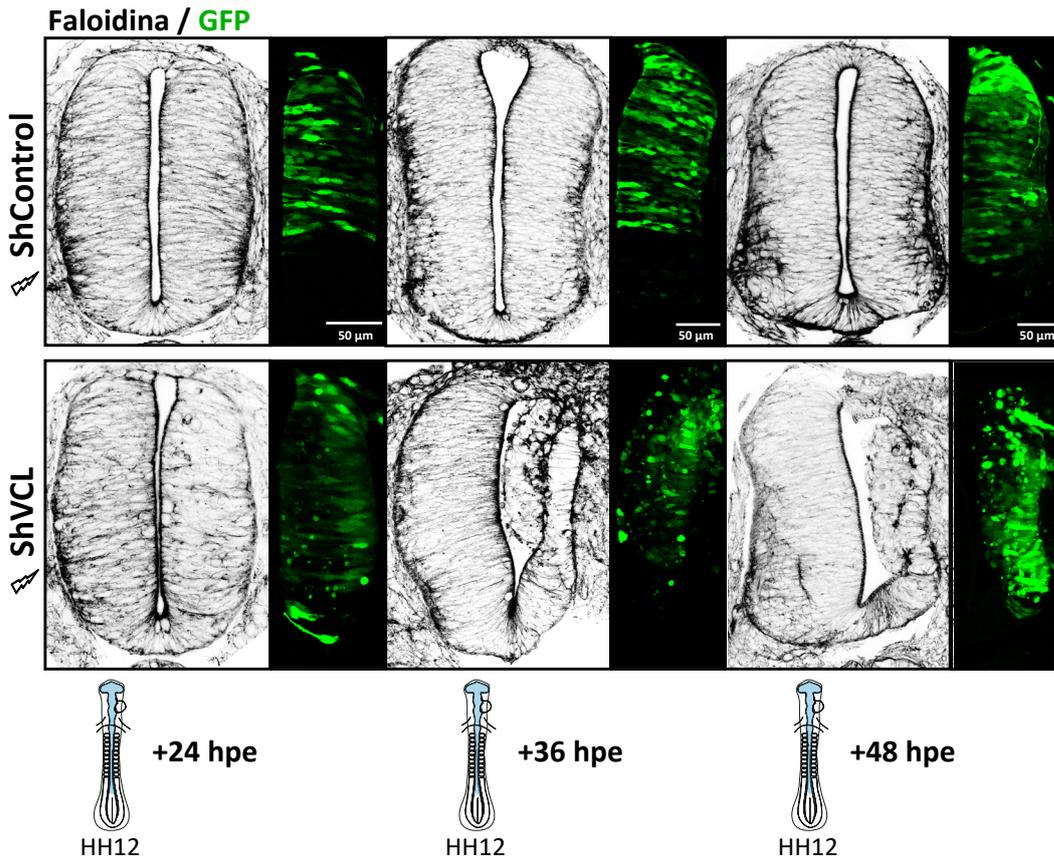


Figura 29. La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina a partir de las 36 hpe. Secciones transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12 con el shControl o el shVCL durante 24, 36 y 48 hpe (transfección GFP, verde), teñidos con faloidina (negro, F-actina).

Tras comprobar que pasadas 36 hpe los efectos del shVCL sobre el citoesqueleto de actina eran visibles, quisimos comprobar si este efecto era debido al tiempo post-electroporación o, si, por el contrario, era consecuencia del estadio de desarrollo en el que se encontraban los embriones. Para ello, electroporamos el shVCL a diferentes estadios del desarrollo (HH12, HH19 y HH24) (**Figura 30**) y los dejamos desarrollarse durante 24hpe. Transcurrido ese tiempo, en ninguno de los estadios estudiados se observaron alteraciones en el citoesqueleto de actina. Por lo tanto, 24 horas de silenciamiento de la vinculina no son suficientes para la aparición de alteraciones en el citoesqueleto de actina en el tubo neural de pollo. Estos resultados indican que el efecto de la depleción de la vinculina sobre el citoesqueleto de actina es dependiente del tiempo post-electroporación y no del estadio en el que se encuentran los embriones.

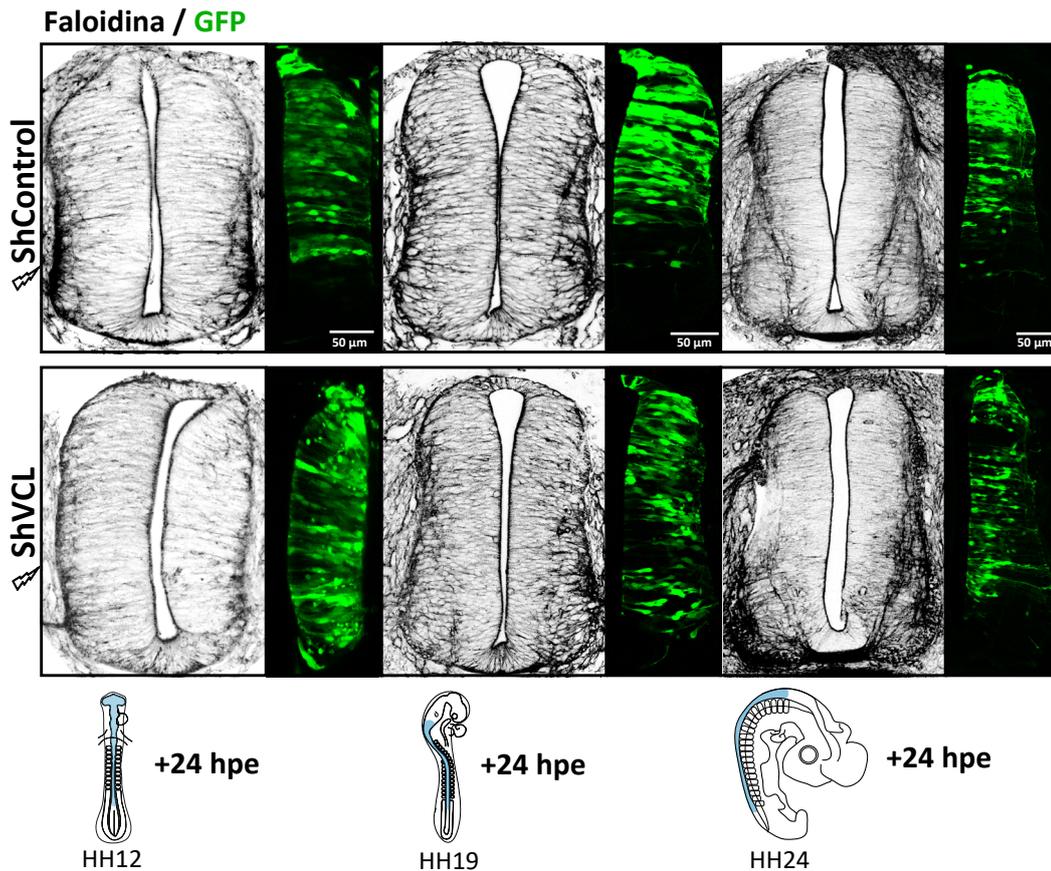


Figura 30. El efecto de la ausencia de la vinculina en el citoesqueleto de actina no es dependiente del estadio en el que se encuentren los embriones en el momento de la electroporación. Secciones transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12, HH19 y HH22 con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) durante 24 hpe, teñidos con faloidina (negro, F-actina).

El complejo apical está formado por diferentes dominios de proteínas que asumen funciones ligadas al estado progenitor y además colaboran en el mantenimiento del polo apical. Debido a la relación de la actina con las proteínas de polaridad en la membrana apical, quisimos observar las consecuencias de la falta de la vinculina en la localización de la N-cadherina, la aPKC y la ZO-1, proteínas presentes en el complejo apical (F. S. Chou et al., 2018). Al igual que pasaba con la actina apical, después de 48 hpe, la ausencia de la vinculina provocó alteraciones en la localización de la N-cadherina, la aPKC y la ZO1, además este fenotipo también era visible desde las 36 hpe (**Figura 31**).

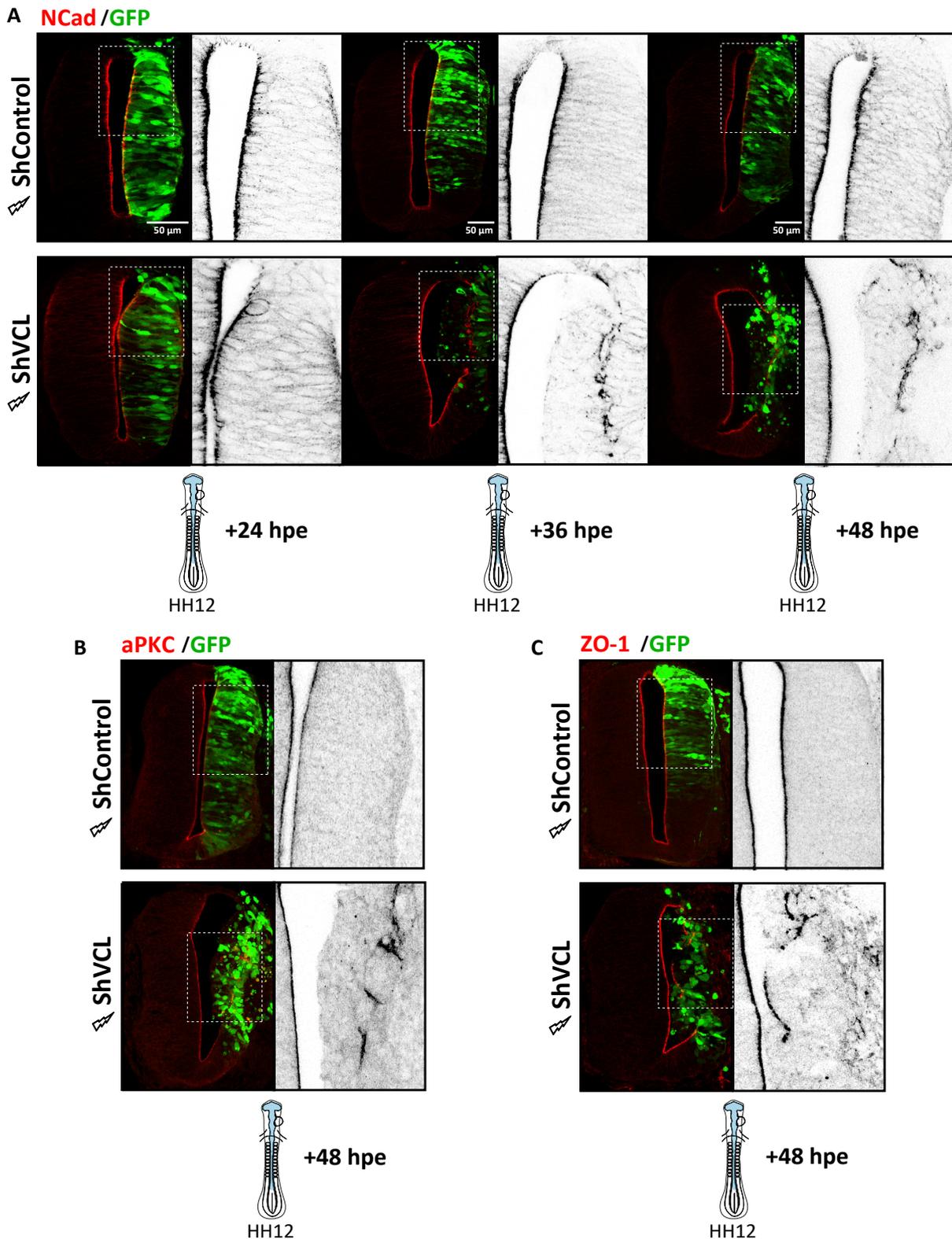


Figura 31. La vinculina es esencial para el mantenimiento del complejo apical. (A) Secciones transversales de tubo neural de pollo transfectadas a HH12 con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) y teñidas contra N-cadherina (rojo y negro) a 24, 36 y 48 hpe. (B) Secciones de tubo neural transfectadas con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) a HH12 y teñidas con aPKC (rojo y negro) 48 hpe. (C) Secciones de tubo neural transfectadas con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) a HH12 y teñidas con ZO-1 (rojo y negro) 48 hpe.

En conjunto, nuestros resultados muestran que un silenciamiento prolongado de la vinculina provoca alteraciones en la localización de proteínas apicales como la actina, la N-cadherina, la aPKC y la ZO-1 y por tanto en la integridad del neuroepitelio.

4. La vinculina regula la migración nuclear intercinética (INM)

4.1 La falta de la vinculina provoca una acumulación basal de núcleos en el tubo neural

Aunque los efectos del shVCL sobre el citoesqueleto de actina y las proteínas apicales no se apreciaron a 24 hpe, transcurrido este tiempo, pudimos observar una acumulación de los núcleos GFP⁺ en la parte basal del neuroepitelio (**Figura 29, Figura 30 y Figura 31** a 24hpe).

Una de las características de las células neuroepiteliales es la INM. La INM hace referencia al hecho de que la posición de los núcleos de los progenitores varía en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células, dando lugar a la pseudoestratificación del neuroepitelio. Durante la fase G1, los núcleos migran desde el polo apical hacia posiciones más basales donde realizan la fase S; posteriormente, durante la fase G2 retornan al polo apical donde tiene, finalmente, lugar la mitosis (fase M) (H. Lee & Norden, 2013; Taverna & Huttner, 2010) (**Figura 32.A**).

Para profundizar en la observación anterior, decidimos estudiar si la posición de los núcleos en el eje apicobasal se veía alterada en ausencia de la vinculina. Para ello, procedimos a medir la posición de los núcleos GFP⁺ con respecto a la membrana apical. La cuantificación de la posición de los núcleos GFP⁺ mostraba que, efectivamente, la falta de la vinculina producía una acumulación basal de los núcleos estadísticamente significativa en comparación con el control, donde la distribución de los núcleos era más homogénea a lo largo del eje apicobasal (**Figura 32.B**). Nuestros resultados muestran que la falta de la vinculina causa una acumulación significativa de núcleos en la zona basal del neuroepitelio que podría deberse a una alteración en la INM.

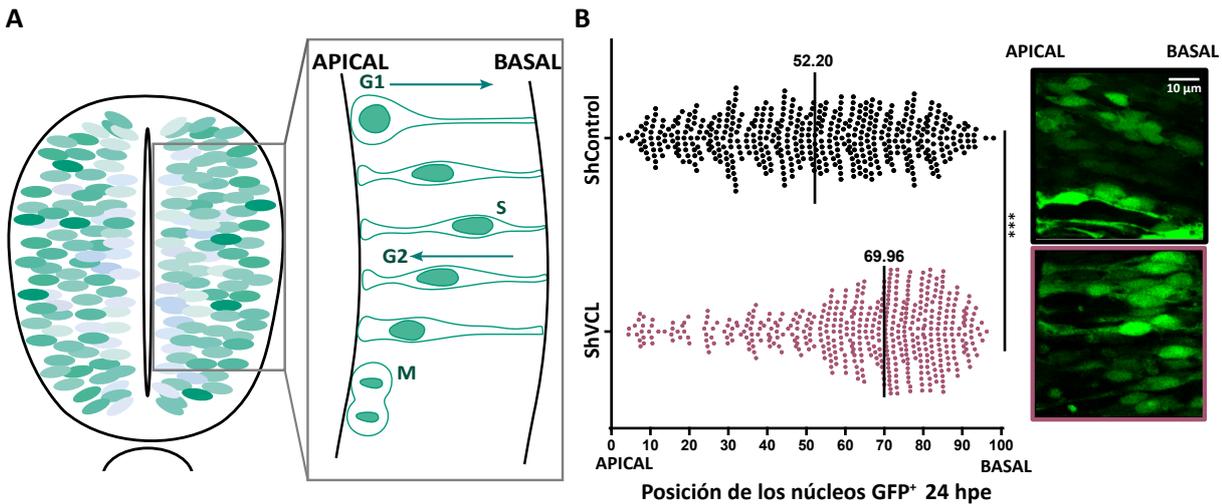


Figura 32. El silenciamiento de la vinculina provoca alteraciones en la INM. (A) Representación de la INM en el tubo neural. (B) Gráfica de puntos que representa la posición de los núcleos de secciones transversales de tubo neural transfectados a HH12 con el shControl o el shVCL en el eje apicobasal del neuroepitelio. Las barras centrales representan la mediana de los valores y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test U Mann Whitney (***) = $p < 0.001$). A la derecha, imágenes representativas de la posición de los núcleos tras la transfección con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) tras 24 horas de electroporación.

4.2 La vinculina es importante para la migración basal → apical durante la migración nuclear intercinética

El estudio de la posición de los núcleos en tejido fijado mostró una acumulación basal de los núcleos en ausencia de la vinculina, indicando que podría haber un problema en la INM. Estudios anteriores realizados en distintos epitelios pseudoestratificados sugieren que la actina tiene un papel relevante en la INM. Sin embargo, hay cierta controversia sobre la implicación de la actina en los dos tipos de movimientos que sufren los núcleos de los progenitores neurales durante la INM: apical → basal, a lo largo de las fases G1-S, y basal → apical, durante las fases G2-M (H. Lee & Norden, 2013; Taverna & Huttner, 2010).

Para poder entender la implicación del citoesqueleto de actina, y más en concreto la implicación de la vinculina en la INM del tubo neural de pollo procedimos a la obtención de imágenes de este tejido durante largos periodos de tiempo a través de cultivos *ex vivo* y microscopía confocal. Tras 4-8 hpe, los embriones transfectados con GFP-membrana, H2B-RFP, junto con los vectores shControl o shVCL que no expresan GFP, pSUPER-ShControl (condiciones control y blebistatina (BB)) o pSUPER-shVCL (condición shVCL) se cortaron transversalmente a 250 µm y se embebieron en agarosa y medio de cultivo. Una vez finalizado este proceso procedimos a la adquisición de imágenes confocales *in vivo* durante

10-14 horas en intervalos de 5 minutos. En el momento de empezar el *time-lapse*, se añadió blebistatina (condición BB) o DMSO (condición control y shVCL) (**Figura 33**).

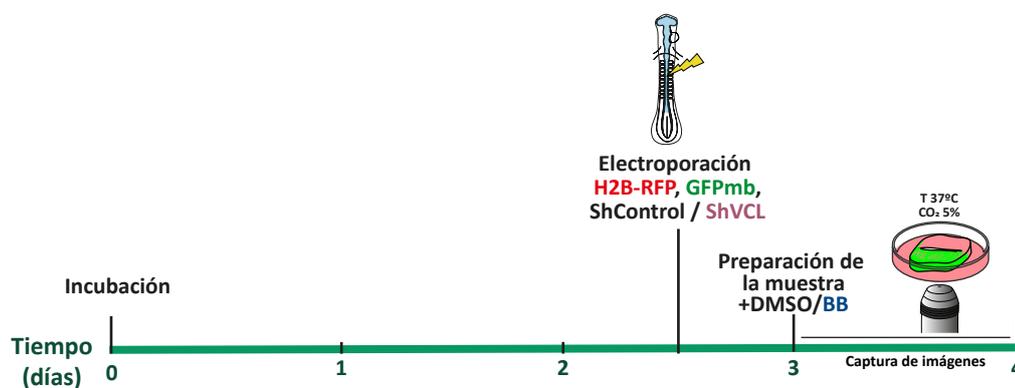


Figura 33. Diseño experimental de la captura de imágenes in vivo a lo largo del tiempo. Los embriones se electroporaron con H2B-RFP, GFP-membrana (GFP-mb) y pSUPER-shControl (condiciones Control y BB) o pSUPER-shVCL (condición shVCL) a un estadio HH14. Tras 8-10 hpe se procedió a la preparación de la muestra y justo antes de comenzar la captura de imágenes con el microscopio confocal, se añadió una concentración de 12,5 μ M de DMSO (condiciones shControl y shVCL) o 12,5 μ M de blebistatina (condición BB). Las imágenes se capturaron cada 5 minutos durante 10-14 horas en un microscopio confocal a 37°C y un 5% de CO₂.

Gracias al marcador de H2B-RFP, que nos permite visualizar los núcleos de los progenitores neurales transfectados, seguimos la trayectoria en el eje x-y de 36 núcleos por condición el mayor tiempo posible. De estas 36 células, 18 células se dirigen hacia la membrana apical y 18 lo hacían hacia la membrana basal (**Figura 40**). Una vez obtenidas las trayectorias, calculamos una serie de parámetros cinéticos (velocidad media, velocidad instantánea y direccionalidad) para ayudarnos a comprender las diferencias entre los diferentes movimientos y condiciones (**Figura 41**).

4.2.1 En condiciones normales el movimiento apical \rightarrow basal es estocástico mientras que el basal \rightarrow apical es directo

Para poder entender el papel del citoesqueleto de actina y de la vinculina en la INM en primer lugar, procedimos al estudio cinético de los núcleos de los progenitores neuroepiteliales en condiciones normales (grupo control: H2B-RFP, GFP-membrana y pSUPER-shControl). En la **Figura 34** (apical \rightarrow basal) y en la **Figura 35** (basal \rightarrow apical) podemos observar la trayectoria de los núcleos de células representativas para estos dos movimientos en una situación control. En esta condición pudimos identificar una serie de diferencias entre ambos movimientos. En las fase G1-S, durante la migración hacia la membrana basal, el movimiento parece no dirigido (**Figura 34, Figura 40.C**). Los núcleos de los progenitores neurales avanzan y retroceden en su recorrido a lo largo del eje apicobasal y aunque tras

12 horas muchas de las células no han llegado a la membrana basal, la gran mayoría ha avanzado considerablemente en su movimiento y están más cerca de su objetivo. Cuando las células se dirigen hacia la membrana apical durante la fase G2, cuando el objetivo es la mitosis, el movimiento pasa a ser más directo y rápido que el movimiento apical→basal (**Figura 35, Figura 40.D**). En la **Figura 40.D**, podemos observar que casi todas las células analizadas (17/18) llegaron a la membrana apical y que la mayoría de ellas realizó la mitosis en menos de 5 horas.

Para poder analizar en más detalle la diferencia entre estos dos movimientos, calculamos una serie de parámetros cinéticos. En primer lugar, calculamos la velocidad media, es decir, la velocidad a la que van los núcleos durante toda su trayectoria ($\mu\text{m}/\text{min}$) (**Figura 41.A**). Como se puede observar en la **Figura 41. A' y A''** y en la **Tabla 14**, la velocidad media de los núcleos del grupo control cuantificada durante la migración basal→apical ($0.45 \mu\text{m}/\text{min}$) es casi el doble que la migración apical→basal ($0.25 \mu\text{m}/\text{min}$). Esto mismo ocurre cuando analizamos la velocidad instantánea, es decir la velocidad de los núcleos teniendo en cuenta únicamente la distancia entre el punto inicial y el punto final (**Figura 41.B**). En este caso, la velocidad instantánea a la que va la célula en la migración basal→apical ($0.30 \mu\text{m}/\text{min}$) es 6 veces superior a la velocidad que alcanza cuando migra en la dirección apical→basal ($0.05 \mu\text{m}/\text{min}$) (**Figura 41. B' y B''** y **Tabla 14**). Esta reducción de la velocidad instantánea, en comparación con la velocidad media, nos indica que en ambos movimientos los núcleos retroceden en su trayectoria mientras están en movimiento (sobre todo en la dirección apical→basal). Finalmente calculamos la direccionalidad, un parámetro muy útil y preciso para cuantificar cuan directo es un movimiento. Para su cálculo se divide la distancia de posición (distancia entre el punto inicial y final) entre la distancia total. Cuanto más directo sea el movimiento, más cerca estará este valor de 1, inversamente, cuanto menos directo sea más se aproximará a 0 (**Figura 41.C**). Como se observa en la **Figura 41. C' y C''** y en la **Tabla 14** el movimiento basal→apical (direccionalidad = 0.58) es mucho más directo (más del doble) que el movimiento apical→basal (direccionalidad = 0.23).

En conjunto todos estos resultados nos indican que la migración apical→basal durante la fase G1-S de los núcleos de los progenitores neurales es un movimiento estocástico, no dirigido y más lento en comparación al movimiento contrario. Por otra parte, la migración basal→apical durante la fase G2 hasta la fase M es un movimiento más rápido y dirigido (**Figura 42.A**).

Control A→B

H2B-RFP/GFP-membrana

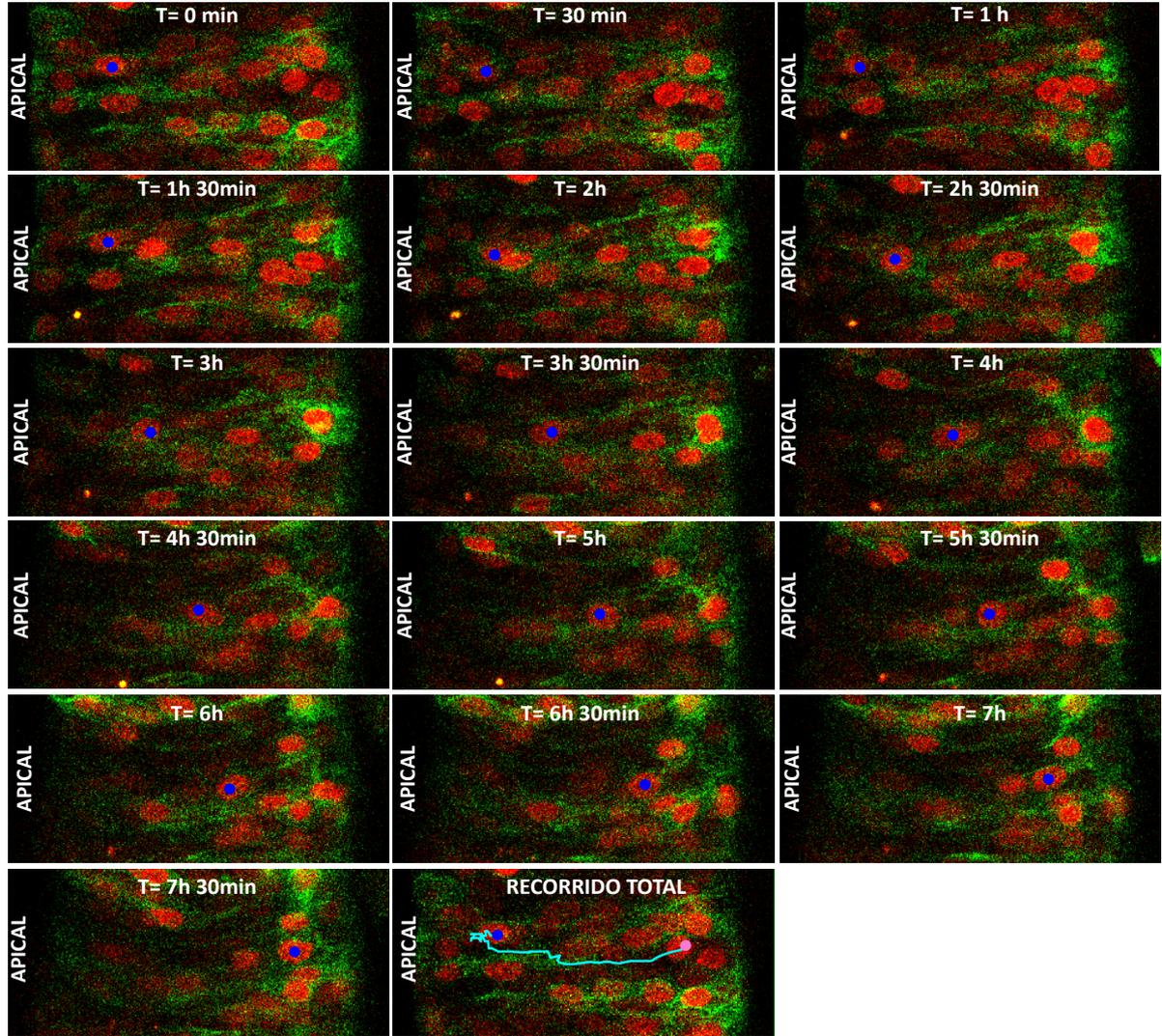


Figura 34. Movimiento apical→ basal de un núcleo representativo del grupo control. Imágenes representativas del movimiento apical→ basal de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shControl, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de DMSO de 12.5µM. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

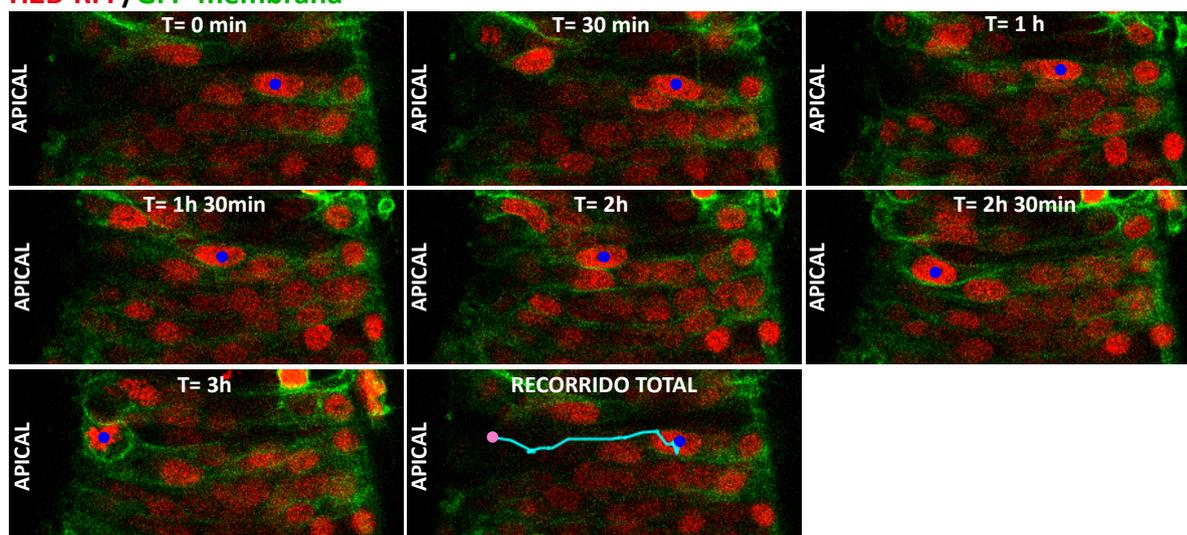
Control A ← B**H2B-RFP/GFP-membrana**

Figura 35. Movimiento basal → apical de un núcleo representativo del grupo control. Imágenes representativas del movimiento basal → apical de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shControl, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de DMSO de 12.5 μ M. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

4.2.2 El citoesqueleto de actina es importante en ambos movimientos de la INM

A continuación, estudiamos el papel del citoesqueleto de actina en la INM mediante un tratamiento de blebistatina (un inhibidor de miosina II) a una concentración de 12,5 μ M desde el momento en que se empezaron a capturar las imágenes. A esta concentración, al igual que en la corteza de ratón, el tratamiento con blebistatina nos permitió afectar la INM sin alterar la estabilidad del citoesqueleto de actina (Schenk et al., 2009) Tras este tratamiento, observamos notablemente que los núcleos de la mayoría de las células tratadas con blebistatina apenas se movían en ninguna de las dos direcciones en comparación al grupo control.

A medida que transcurría el tiempo las células no estaban mucho más cerca de su objetivo (membranas apical y basal en función del movimiento) (**Figura 36, Figura 37 y Figura 40. E-F**). Además, si comparamos la velocidad media durante la migración apical → basal del grupo control (0.25 μ m/min) con la del grupo blebistatina (0.17 μ m/min), observamos una disminución significativa de ésta (**Figura 41.A'** y **Tabla 14**). Durante la migración basal → apical se observa una disminución de la velocidad media aún mayor cuando comparamos el control (0.45 μ m/min) con el grupo blebistatina (0.19 μ m/min) (**Figura 41.A''** y **Tabla 14**). En cuanto a la velocidad instantánea, también se observa una disminución de

la misma tras el tratamiento con blebistatina. Durante la migración apical→basal $0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ y basal→apical $0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ en el grupo blebistatina frente a los valores obtenidos con el grupo control, $0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ y $0.29 \mu\text{m}/\text{min}$ respectivamente (**Figura 41.B'y B'' y Tabla 14**). La direccionalidad también se ve afectada tras el tratamiento con blebistatina, sobretodo en la migración basal→apical con un valor del 0.27 en blebistatina frente al 0.58 del grupo control. En la migración apical→basal se observó una disminución en la direccionalidad con valores del 0.157 en el grupo blebistatina, frente al valor de 0.23 del grupo control (**Figura 41.C'-C'' y Tabla 14**). Aunque las diferencias entre ambos grupos no es significativa en los valores de velocidad instantánea y direccionalidad en la dirección apical→basal, sí que podemos observar que la tendencia es una disminución en ambos parámetros tras el tratamiento con blebistatina en comparación con el control.

En conjunto estos resultados demuestran que el citoesqueleto de actina es importante para ambos movimientos durante la INM en el neuroepitelio de pollo, especialmente para el movimiento basal→apical (**Figura 42.B**).

Blebistatina A → B
H2B-RFP/GFP-membrana

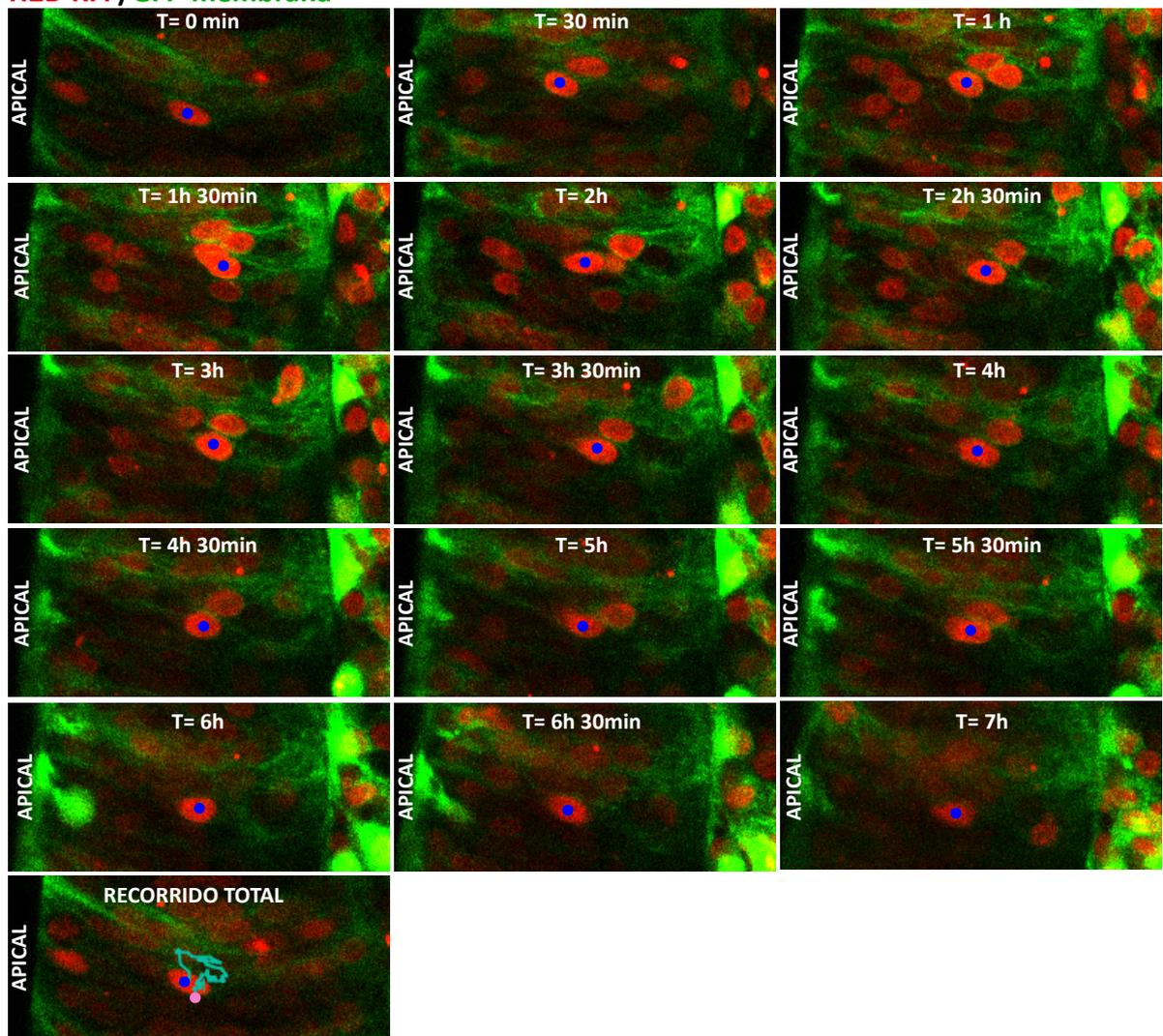


Figura 36. Movimiento apical→ basal de un núcleo representativo del grupo blebistatina. Imágenes representativas del movimiento apical→ basal de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shControl, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de blebistatina de 12.5μM. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

Blebistatina A ←B

H2B-RFP/GFP-mb

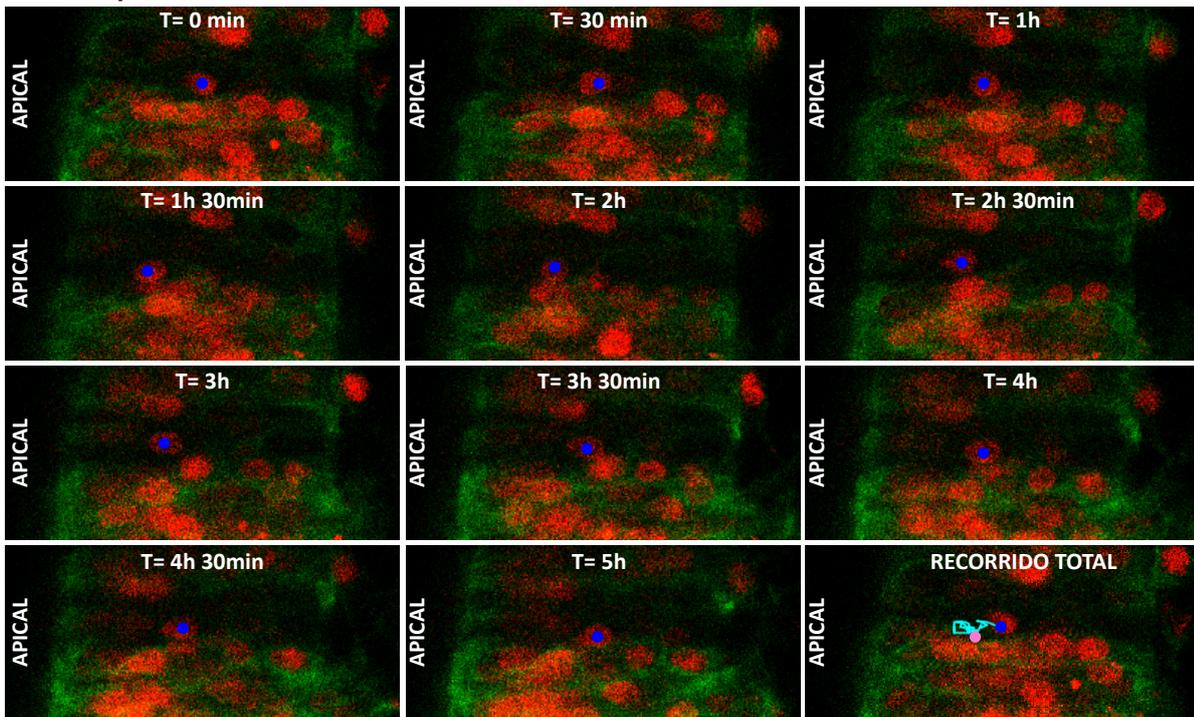


Figura 37. Movimiento basal→ apical de un núcleo representativo del grupo blebistatina. Imágenes representativas del movimiento basal→ apical de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shControl, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de blebistatina de 12.5μM. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

4.2.3 La ausencia de la vinculina altera la migración basal→apical de la INM

Finalmente, procedimos al estudio del efecto de la falta de la vinculina en la INM. En este caso, en lugar del vector pSUPER-shControl, transfectamos el vector pSUPER-shVCL junto con los vectores GFP-membrana y H2B-RFP. Los resultados obtenidos fueron muy interesantes; tras el silenciamiento de la vinculina, el movimiento que más se vio afectado fue el movimiento basal → apical (**Figura 39**).

Durante la migración de los núcleos hacia el polo basal (**Figura 38, Figura 40.G**), vemos que, al igual que pasaba con el control (**Figura 34, Figura 40.C**), hay progresión del movimiento hacia el polo

basal a media que pasa el tiempo. Además, al observar la velocidad media no se encontraron diferencias significativas entre el grupo shVCL (0.21 $\mu\text{m}/\text{min}$) y el grupo control (0.25 $\mu\text{m}/\text{min}$) (**Figura 41.A'** y **Tabla 14**). Algo similar pasa con los valores de velocidad instantánea siendo para shVCL 0.056 $\mu\text{m}/\text{min}$ y para el control 0.052 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figura 41.B'**). En cuanto a la direccionalidad, ambos grupos presentaron la misma, 0.23.

En lo que respecta al movimiento basal→apical, la situación varió considerablemente con respecto al control. La falta de la vinculina provocó una disminución en la velocidad media de este movimiento; 0.23 $\mu\text{m}/\text{min}$, en comparación al control, que presentó una velocidad media de 0.45 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figura 41.A''** y **Tabla 14**). La velocidad instantánea también se vio afectada con una disminución significativa de unas 6 veces en ausencia de la vinculina 0.05 $\mu\text{m}/\text{min}$, en comparación con el control , 0.293 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figura 41.B''** y **Tabla 14**). Finalmente, observamos una disminución significativa de la direccionalidad con el shVCL (0.22), en comparación con el control (0.58) (**Figura 41.C''** y **Tabla 14**). Esto derivó en una acumulación basal de núcleos al no poder éstos avanzar normalmente hacia la membrana apical. Es cierto que hay algunas células que consiguen llegar al lado apical, sin embargo éstas, además de ser menos numerosas que en la situación control, tardaron mucho más tiempo en llegar a la membrana apical y hacer la mitosis (**Figura 40.H**). Un ejemplo claro de ello se muestra en la **Figura 39**, donde el núcleo de la célula marcada tarda 10 horas en llegar de la membrana basal a la membrana apical para hacer la mitosis.

En conjunto, los resultados muestran, que la ausencia de la vinculina no tiene repercusiones considerables en la migración apical→basal ya que presenta valores muy similares al grupo control. Sin embargo, en el movimiento basal→apical, durante la fase G2, la vinculina tiene un papel importante, puesto que su ausencia provoca alteraciones considerables en dicho movimiento. En los progenitores sin vinculina, los núcleos disminuyen su velocidad y direccionalidad con respecto al control y, por consiguiente, este movimiento o no se lleva a cabo o necesita de mucho más tiempo para realizarse correctamente para que el núcleo consiga alcanzar la membrana apical y realizar la mitosis. La alteración de este movimiento, provoca una acumulación de células de la parte basal del neuroepitelio de pollo (**Figura 42.C**).

ShVCL A → B

H2B-RFP/GFP-membrana

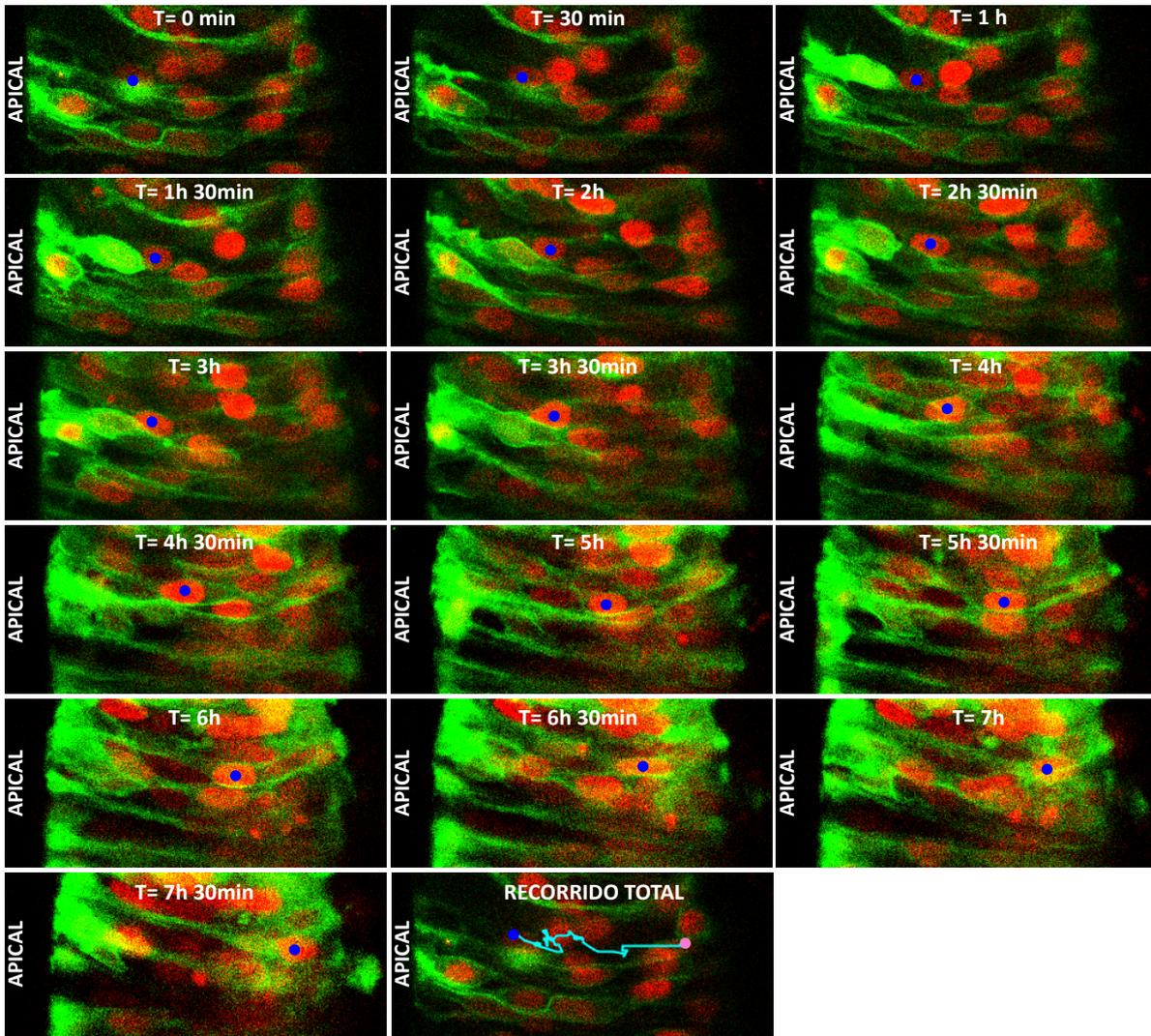


Figura 38. Movimiento apical → basal de un núcleo representativo del grupo shVCL. Imágenes representativas del movimiento apical → basal de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shVCL, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de DMSO de 12.5 μM. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

ShVCL A ←B
H2B-RFP/GFP-membrana

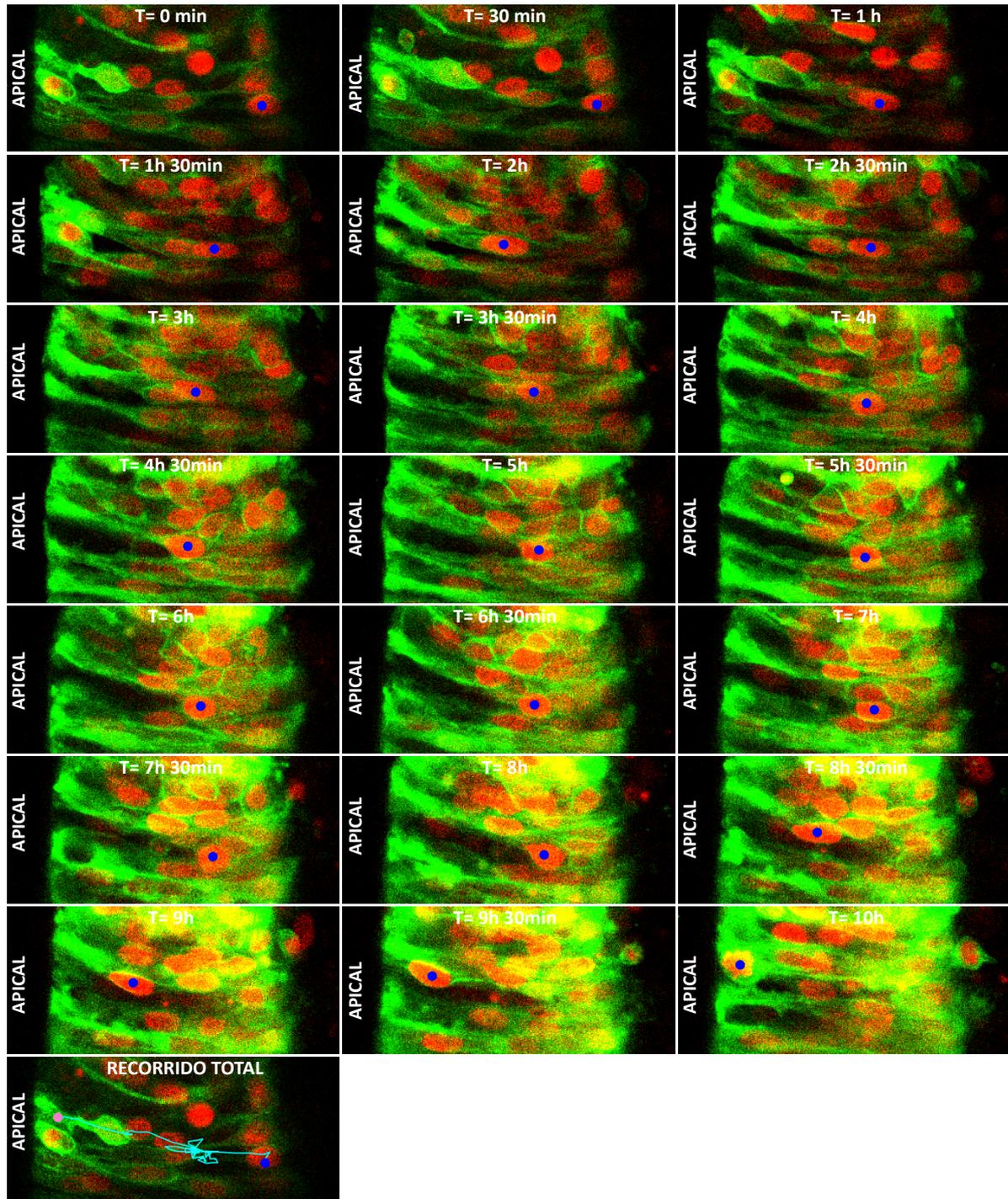


Figura 39. Movimiento basal→ apical de un núcleo representativo del grupo shVCL. Imágenes representativas del movimiento basal→ apical de un núcleo de un progenitor neural (punto azul) en un tubo neural de pollo transfectado con el shVCL, H2B-RFP (marcador de núcleos, rojo) y GFP-membrana (marcador de membranas celulares, verde) y un tratamiento de DMSO de 12.5µM. Entre cada imagen hay un lapso de 30 minutos. En la última imagen se muestra el recorrido total del núcleo durante todo el vídeo (azul claro), siendo el punto azul la posición inicial del recorrido y el punto rosa la posición final de éste.

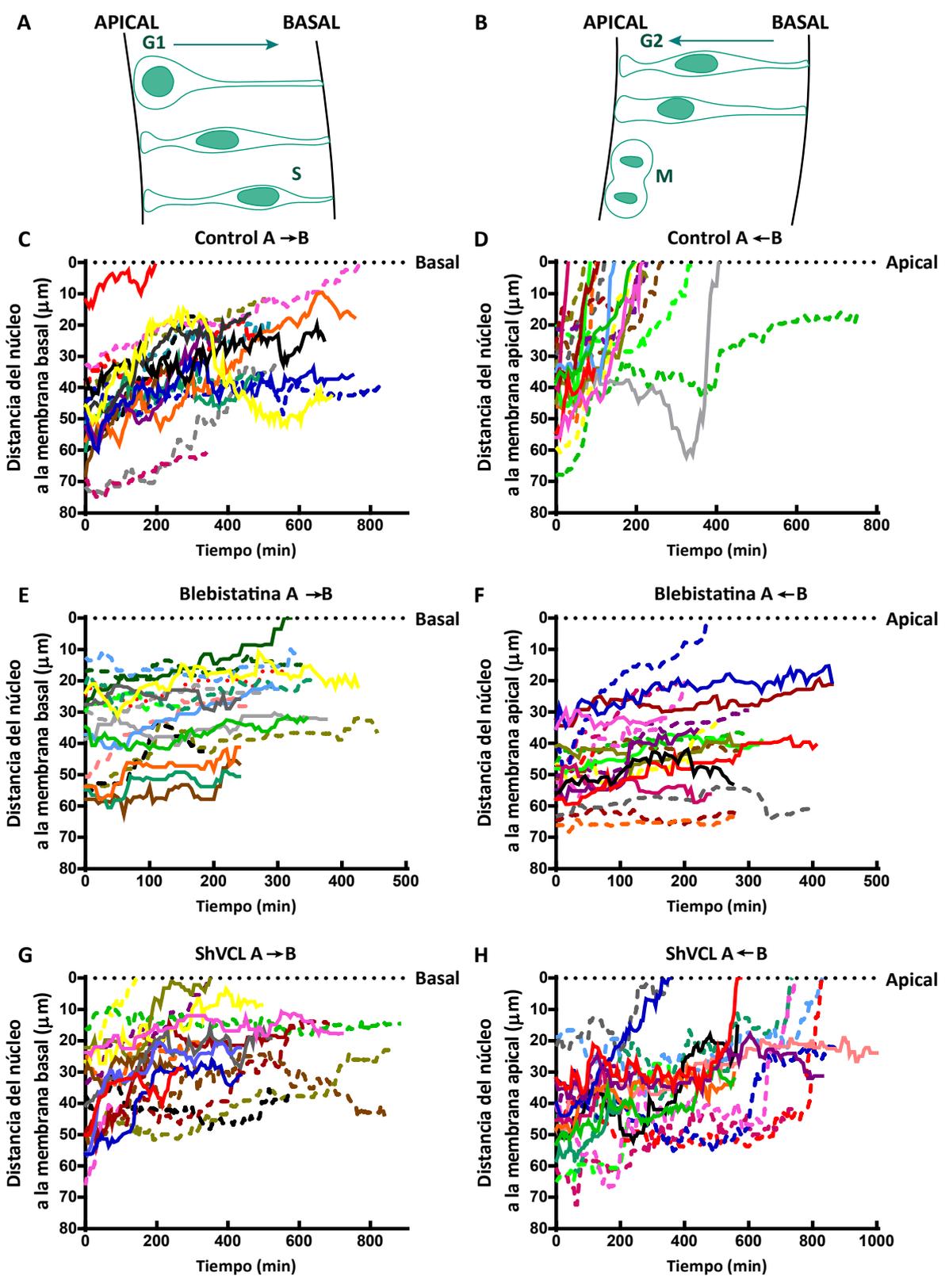


Figura 40. Trayectorias de los núcleos de los progenitores neurales cuantificados. (A) Esquema representativo del movimiento apical→basal durante la INM. (B) Esquema representativo del movimiento basal→apical durante la INM. (C-H) Representación de las trayectorias de los núcleos cuantificados en los grupos control (shControl + 12.5μM DMSO) (C-D), Blebistatina (shControl + 12.5μM de blebistatina) (E-F) y shVCL (shVCL + 12.5μM DMSO) (G-H). Trayectorias de migración basal (C, E y G). Trayectorias de migración apical (D, F y H).

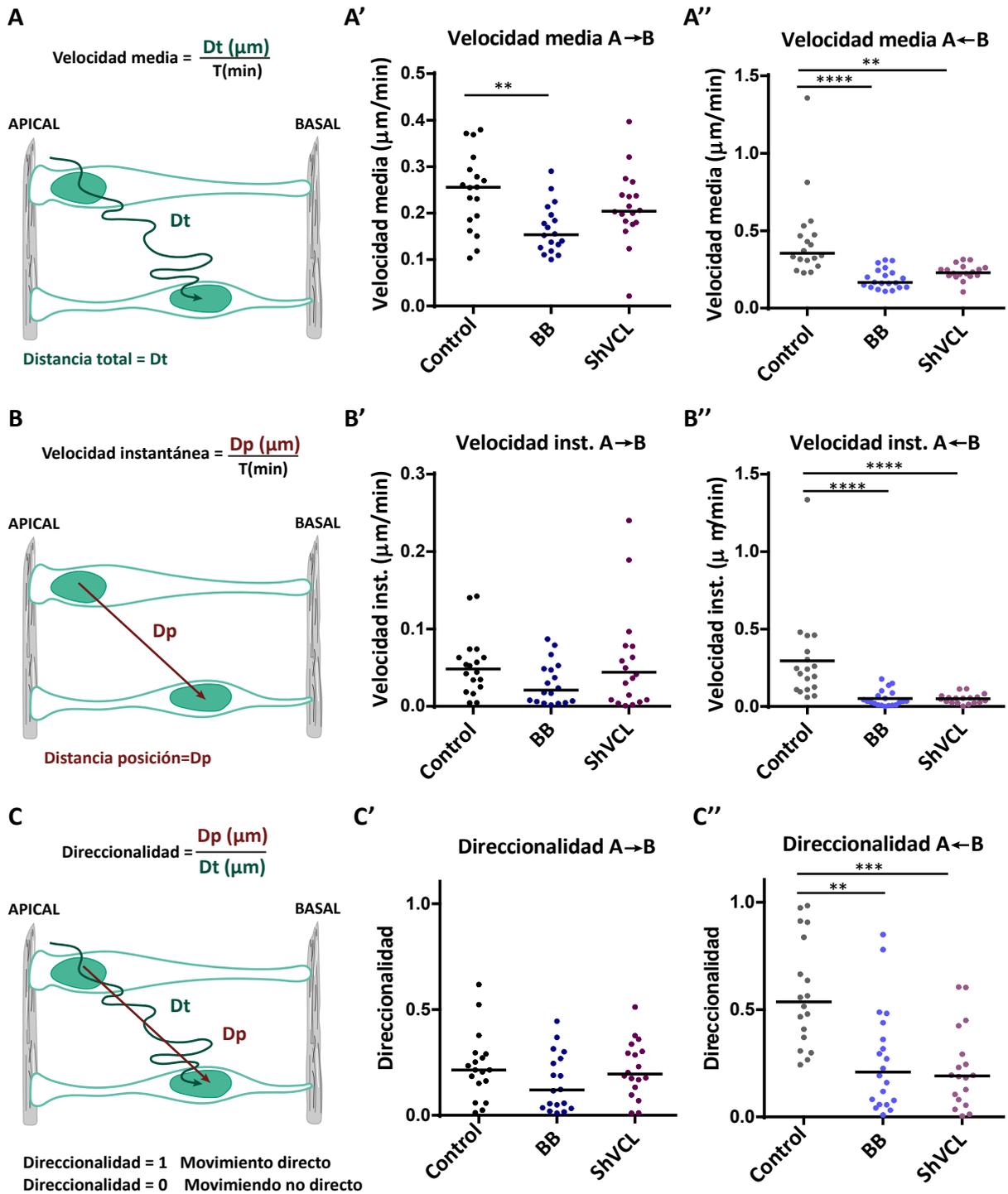


Figura 41. Análisis de los parámetros cinéticos durante la INM. Representación gráfica del cálculo de la velocidad media (A), velocidad instantánea (B) y direccionalidad (C) Gráfica de puntos que representan la velocidad media (A'-A''), velocidad instantánea (B'-B'') y direccionalidad (C'-C'') de los núcleos de las células cuya trayectoria se siguieron *in vivo* en ambas direcciones de la INM. Control (shControl + DMSO), blebistatina (shControl + 12.5 μM blebistatina), shVCL (shVCL + DMSO). Dirección apical→basal (A'-C'). Dirección basal → apical (A''-C''). Las nubes de puntos representan resultados de dos experimentos independientes donde cada punto es una célula y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Kruskal-Wallis (**= $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la INM en el tubo neural de pollo

	Migración basal → apical			Migración apical → basal		
	Control	Blebistatina	ShVCL	Control	Blebistatina	ShVCL
V. media	0.45 ± 0.27	0.19 ± 0.005	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.21 ± 0.08
V. instantánea	0.29 ± 0.19	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.038	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.07
Direccionalidad	0.58 ± 0.15	0.23 ± 0.24	0.21 ± 0.12	0.23 ± 0.16	0.16 ± 0.13	0.23 ± 0.17

Los valores representan la media ($\mu\text{m}/\text{min}$) \pm SD. La **Figura 41** aparece la representación y estadística de estos datos.

Los experimentos *in vivo* nos han ayudado a comprender un poco más la INM en una situación control y la implicación del citoesqueleto de actina y de la vinculina en esta migración en el tubo neural de pollo. En resumen, nuestros resultados muestran que en una situación control los núcleos migran desde la membrana apical a la basal de una manera estocástica y desde la membrana basal a la apical a una manera más directa y rápida (**Figura 42.A**). El citoesqueleto de actina tiene una función vital en la INM puesto que la inhibición de la miosina II, a través de un tratamiento de blebistatina, causa alteraciones en ambos movimientos, impidiendo el avance de los núcleos sobretodo en la dirección basal → apical (**Figura 42.B**). Finalmente, la ausencia de la vinculina causa una alteración en la migración basal → apical acumulando los núcleos en una posición basal del neuroepitelio. Parece ser que el movimiento desde la membrana basal a la apical, que es el movimiento más dirigido, es más dependiente de la vinculina que el movimiento que va desde la membrana apical al basal (**Figura 42.C**).

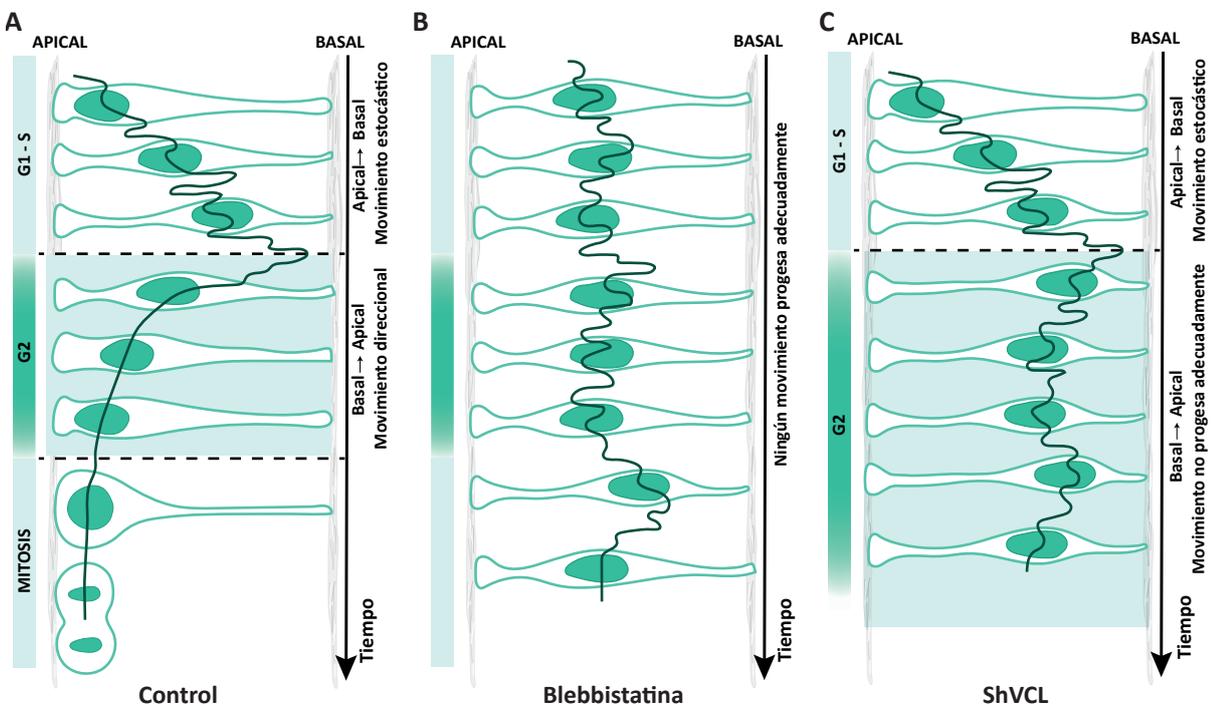
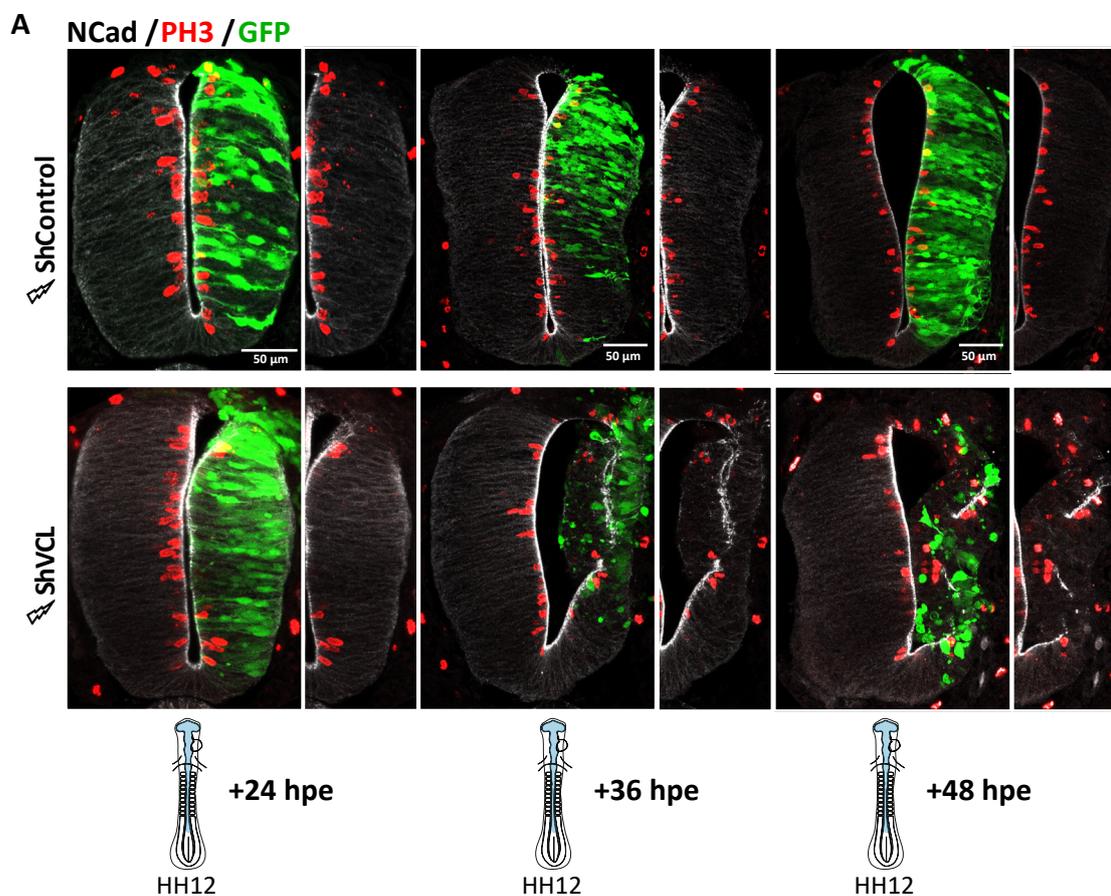


Figura 42. Resumen de la implicación del citoesqueleto de actina y de la vinculina en la INM. (A) En una situación control el movimiento apical→basal es estocástico, mientras que el movimiento basal→apical es directo y más rápido. **(B)** Al inhibir la miosina II con blebistatina se observan alteraciones en ambos movimientos. **(C)** La ausencia de la vinculina provoca alteraciones en el movimiento apical→basal, que acaba derivando en la acumulación de núcleos en la zona basal del neuroepitelio.

5. La falta de la vinculina produce un retraso en el ciclo celular y una acumulación de células en fase G2

5.1 La falta de la vinculina provoca un descenso en el número de células en mitosis

Debido a la estrecha relación que existe entre la INM y el ciclo celular y, después de observar las alteraciones causadas en la INM tras la eliminación de la vinculina, procedimos a evaluar el impacto del silenciamiento de la vinculina en la progresión del ciclo celular. Mediante tinciones con fosfohistona 3 (PH3), un marcador de mitosis, cuantificamos el número de mitosis con respecto a las células transfectadas con el shVCL a HH12+24/+36/+48 hpe (**Figura 43.A**). En todos los estadios estudiados se observó una reducción significativa de más del 65% en el número de mitosis en las células electroporadas con el shVCL en comparación con el shControl (**Figura 43.B**).



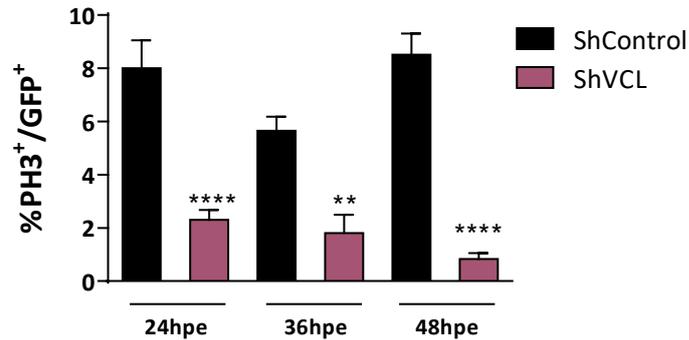
B

Figura 43. La ausencia de la vinculina provoca una disminución en el porcentaje de PH3⁺. (A) Cortes transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12 con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) y teñidos con N-cadherina (negro) y PH3 (rojo) a 24, 36 y 48hpe. (B) Cuantificación del porcentaje de PH3 con respecto a la GFP tras las transfección del shControl y el shVCL. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$).

Además de cuantificar el porcentaje de mitosis en tejido fijado, procedimos a cuantificar el porcentaje de mitosis que se produjeron en todos los grupos durante las películas (grupos control, blebistatina y shVCL). En este caso, gracias al vector H2B-RFP que marca los núcleos transfectados, cuantificamos el número total de mitosis que se llevaron a cabo durante 10 horas con respecto al total de células transfectadas. Como podemos observar en la **Figura 44.A**, cuando la célula entra en mitosis se da lugar la condensación de los cromosomas (muy apreciable con la fusión H2B-RFP). Además, la célula pierde su anclaje basal provocando el redondeo de la misma, que podemos visualizar gracias al marcador GFP-membrana (**Figura 44.A**). Al igual que en el experimento sobre el tejido fijado (**Figura 43**), en las películas podemos apreciar un descenso significativo, en este caso de un 80 %, del número de mitosis con respecto al total de células transfectadas tras electroporar el shVCL. Lo mismo ocurrió tras el tratamiento con blebistatina, donde se observó una baja en el número de mitosis del 70% (**Figura 44.B**).

En conjunto, estos resultados muestran que el citoesqueleto de actina y, especialmente la vinculina además de participar en la INM, colaboran en la progresión el ciclo celular y que la alteración del citoesqueleto de actina a través de blebistatina o la ausencia de la vinculina disminuyen el número de mitosis.

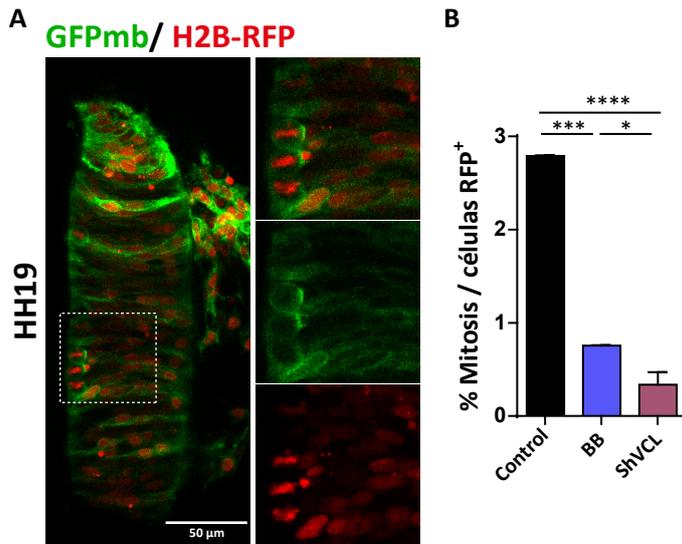


Figura 44. El tratamiento con Blebistatina y la ausencia de la vinculina provocan una disminución en el porcentaje de PH3⁺. **(A)** Corte transversal de tubo neural de un embrión de pollo transfectado a HH12 con H2B-RFP (rojo) y GFPmb (verde). En la ampliación podemos apreciar la morfología redondeada y la condensación del ADN en las mitosis apicales. **(B)** Cuantificación del porcentaje de mitosis durante 10 horas en los grupos Control, blebistatina (BB) y shVCL. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey

(*= $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

5.2 La vinculina es necesaria para la correcta progresión del ciclo celular de la fase S a la M.

Después de observar la disminución en el porcentaje de células en fase M como consecuencia de la ausencia de la vinculina, comprobamos la tasa de proliferación mediante un ensayo de incorporación de EdU. Para eso, transfectamos el shControl o el shVCL en embriones en HH12 y los dejamos desarrollarse durante 24 horas. 4 horas antes de diseccionar los embriones añadimos la EdU (**Figura 45.A**).

Los núcleos incorporan la EdU en fase S. Una vez incorporada, los núcleos se dirigen hacia el lado apical para continuar el ciclo celular en la fase G2 y finalmente, en la membrana apical se lleva a cabo la fase M. En el tubo neural de pollo a un estadio HH19 (HH12 + 24 hpe), la suma de las fases S y G2 tienen una duración aproximada de 4-6 horas (Kicheva et al., 2014; Molina & Pituello, 2017), por ese motivo tras nuestro pulso de EdU se esperaba que gran parte de las células EdU⁺ estuvieran ya en fase M. En una situación control esto sí sucede; se puede observar un número considerable de células EdU⁺ cerca de la membrana apical (**Figura 45. B y C**). Sin embargo, en ausencia de la vinculina los núcleos EdU⁺ difícilmente alcanzan la membrana apical, lo que provoca una acumulación de los núcleos EdU⁺ en el lado basal del neuroepitelio (**Figura 45.B y C**). Además, aunque no se observaron diferencias en el porcentaje de células que incorporaron la EdU entre ambas condiciones (**Figura 45. D, izq**), sí que se observaron diferencias al analizar el porcentaje de células PH3⁺ que a su vez eran EdU⁺. En el control, aproximadamente el 100% de las células PH3⁺ habían incorporado EdU en las 4 horas previas. Sin embargo, con el shVCL este porcentaje fue significativamente menor, únicamente el 65% de las células

PH3⁺ habían incorporado la EdU. Lo que significa que en ausencia de la vinculina las células necesitan más de 4 horas para completar el recorrido que va desde la fase S a la mitosis (**Figura 45. D, drcha**).

En conjunto estos resultados muestran que aunque la fase S no se ve comprometida en ausencia de la vinculina (**Figura 45.D, drcha**), las células no progresan en la INM hacia la membrana apical después de esta fase, lo que provoca una acumulación de núcleos EdU⁺ en la parte basal del neuroepitelio (**Figura 45 B y C**). Además, aunque dicha acumulación provoca que la mayoría de las células no consigan hacer la mitosis (**Figura 43.B, Figura 44.B y Figura 46**), las pocas células que lo consiguen utilizan más tiempo en llegar desde la fase S a la fase M (**Figura 45. D, izq**), lo que indica una mayor duración de la fase G2 (**Figura 46**).

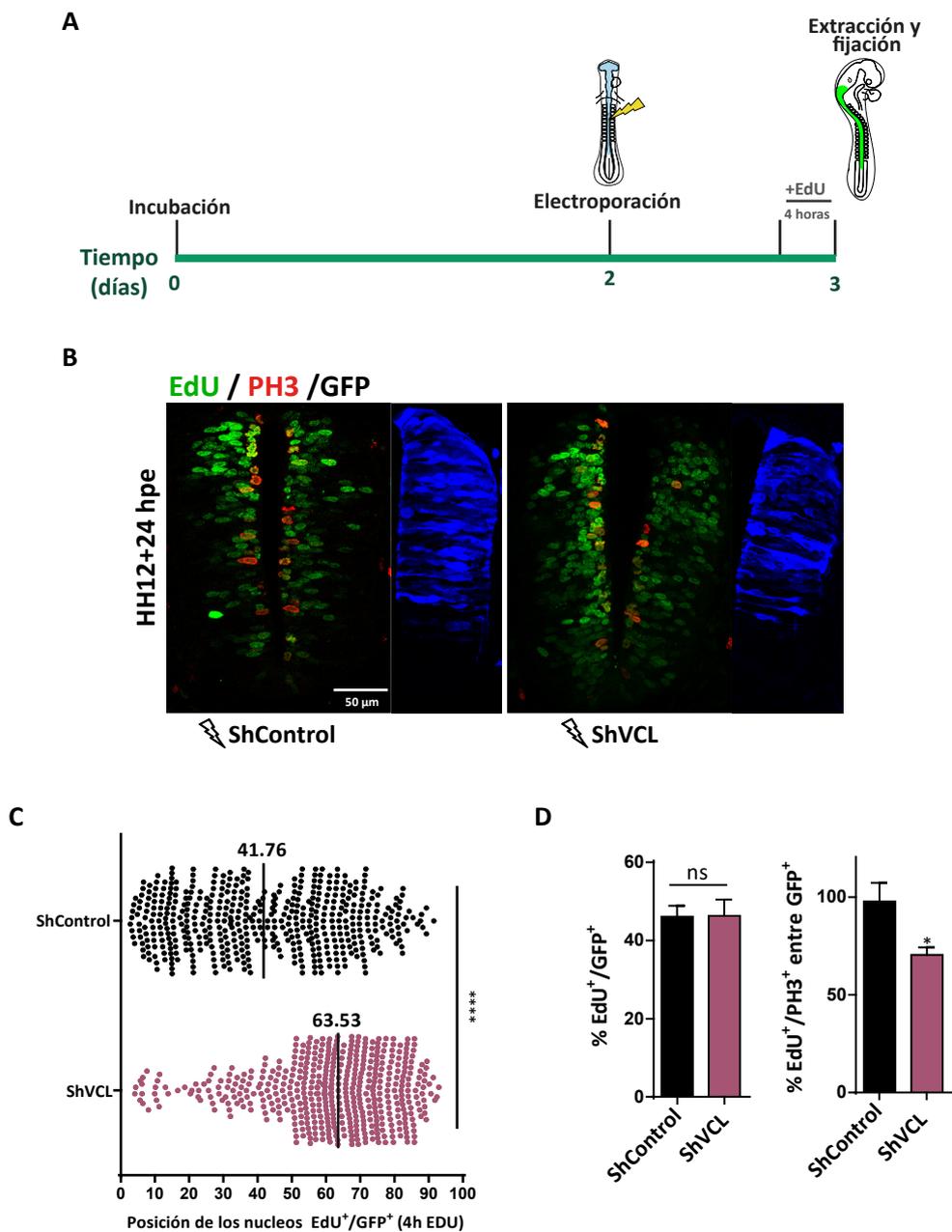


Figura 45. La ausencia de la vinculina no altera la fase S pero causa un retraso en el ciclo celular. (A) Esquema del desarrollo del ensayo de incorporación de EdU. **(B)** Cortes transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12 con el shControl o el shVCL (transfección GFP, azul) con una incorporación de EdU de 4 horas (verde) y teñidos con PH3 (rojo), a 24 horas. **(C)** Gráfica de puntos que representa la posición de los núcleos EdU⁺ transfectados con el shControl o el shVCL en el eje apicobasal del neuroepitelio. Las barras centrales representan la mediana de los valores y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test U Mann Whitney (**** = $p < 0.0001$). **(D)** Cuantificación del porcentaje de incorporación de EdU con respecto a la GFP tras las transfección con el shControl o el shVCL y cuantificación del porcentaje de células PH3⁺ que incorporaron EdU con respecto a la GFP tras la transfección del shControl y el shVCL. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (ns= no significativo, * = $p < 0.05$).

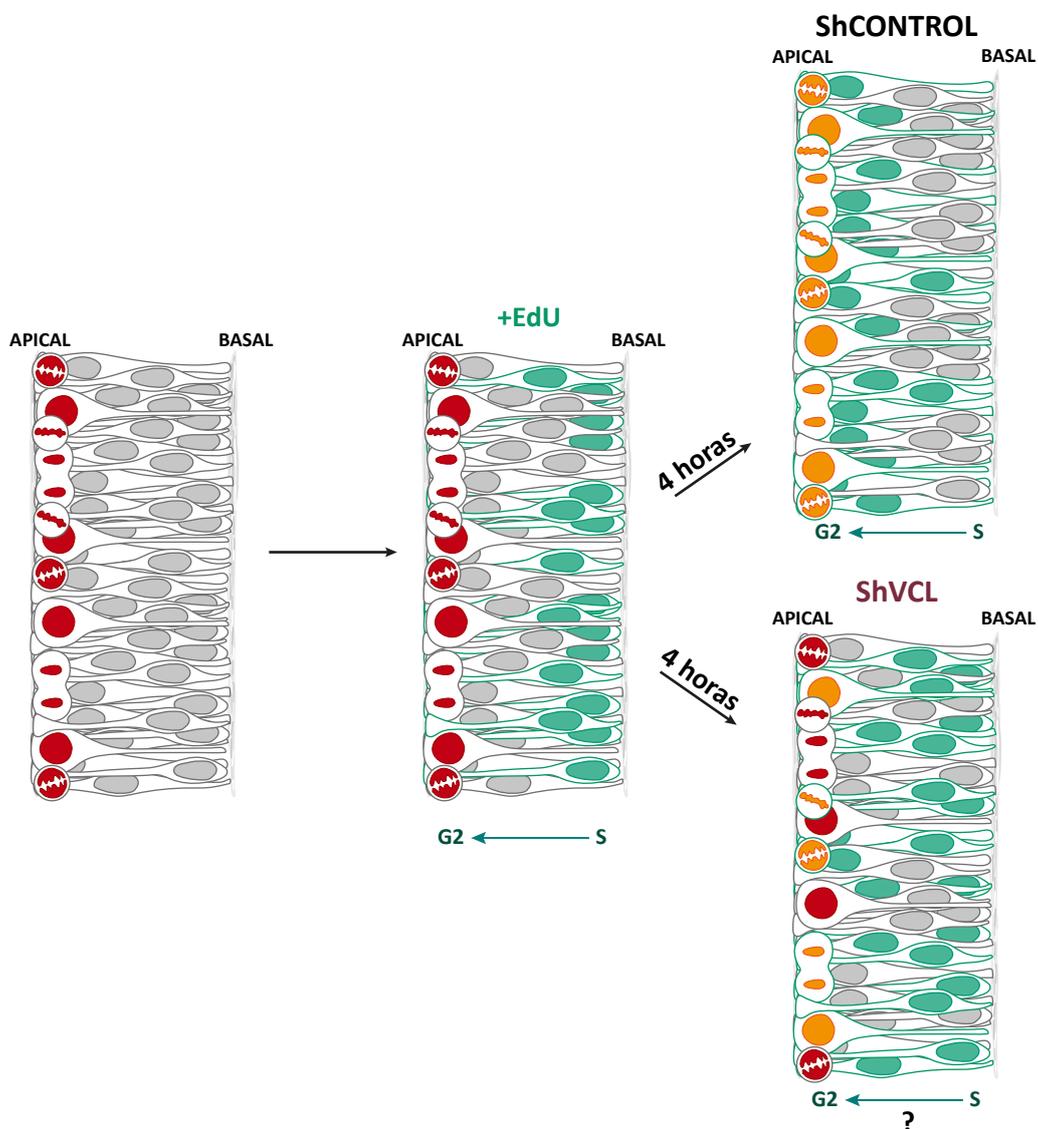


Figura 46. La ausencia de la vinculina produce un retraso en el ciclo celular. Esquema representativo del experimento de incorporación de la EdU. En el tubo neural las células se sitúan en el eje apicobasal en función de la fase del ciclo en la que se encuentran. Las mitosis tienen lugar en la membrana apical mientras que la fase S sucede en una región más basal. En la región central se pueden encontrar células en las fases G1 y G2. Tras el pulso de EdU, que se incorpora en las células en fase S, situadas cerca de la membrana basal. En una situación control, estas células migran apicalmente en fase G2 y tras 4 horas todas las mitosis son EdU⁺. En ausencia de la vinculina, después del pulso de EdU se puede observar que no todas las células migran hacia una posición apical y que no todas las mitosis son EdU⁺, por lo que concluimos que la ausencia de la vinculina produce un retraso en la progresión del ciclo celular.

5.3 La ausencia de la vinculina provoca una menor internalización del centrosoma en G2

En los epitelios pseudoestratificados como el tubo neural, los centrosomas, orgánulos importantes durante el ciclo celular, se localizan en la superficie apical durante las fases G1, S y parte de G2. A medida que la célula entra en la fase G2 y se aproxima a la membrana apical, uno de los dos centrosomas se desplaza lejos de la membrana apical, se internaliza, hasta alcanzar el núcleo (Spear & Erickson, 2012a). Al comenzar la mitosis la célula adquiere una morfología redondeada y, al hacerlo, se mueve en su trayectoria restante hacia la superficie apical. Durante este proceso el otro centrosoma también se mueve para alcanzar su posición correcta para que la mitosis se lleve a cabo. Después de la división celular, los centrosomas se mueven hacia la superficie apical (**Figura 14**; Spear and Erickson, 2012a).

Para comprobar si la falta de la vinculina provocaba alguna alteración en los centrosomas procedimos a la electroporación del vector pEGFP-Cep152, componente centriolar requerido para la duplicación del centrosoma (Dzhindzhev et al., 2010). Este vector se electroporó junto con los vectores pSUPER-ShControl y pSUPER-shVCL (**Figura 47**). Tras 24 horas, observamos que en los embriones electroporados con el shControl, alrededor del 18 % de las células transfectadas internalizaban uno de sus centrosomas (**Figura 47.C**). Sin embargo, en los embriones transfectados con el shVCL sólo un 9% de las células presentaba uno de sus centrosomas internalizado (**Figura 47.C**). Consideramos que había internalización del centrosoma siempre que el centrosoma estuviera a más de 2 μm de la membrana apical (**Figura 47.B, flechas**). Además de observar una menor internalización del centrosoma en ausencia de la vinculina, en comparación con el shControl, los centrosomas internalizados con el shVCL estaban más cerca de la membrana apical (**Figura 47.B, flechas y D**). En conjunto estos resultados contribuyen a los resultados anteriores en los que concluimos que la ausencia de la vinculina afecta a la progresión de ciclo celular, ya que la ausencia de la vinculina reduce la internalización del centrosoma característica de la fase G2, aunque no se puede descartar un efecto directo de la vinculina sobre la separación de los centrosomas.

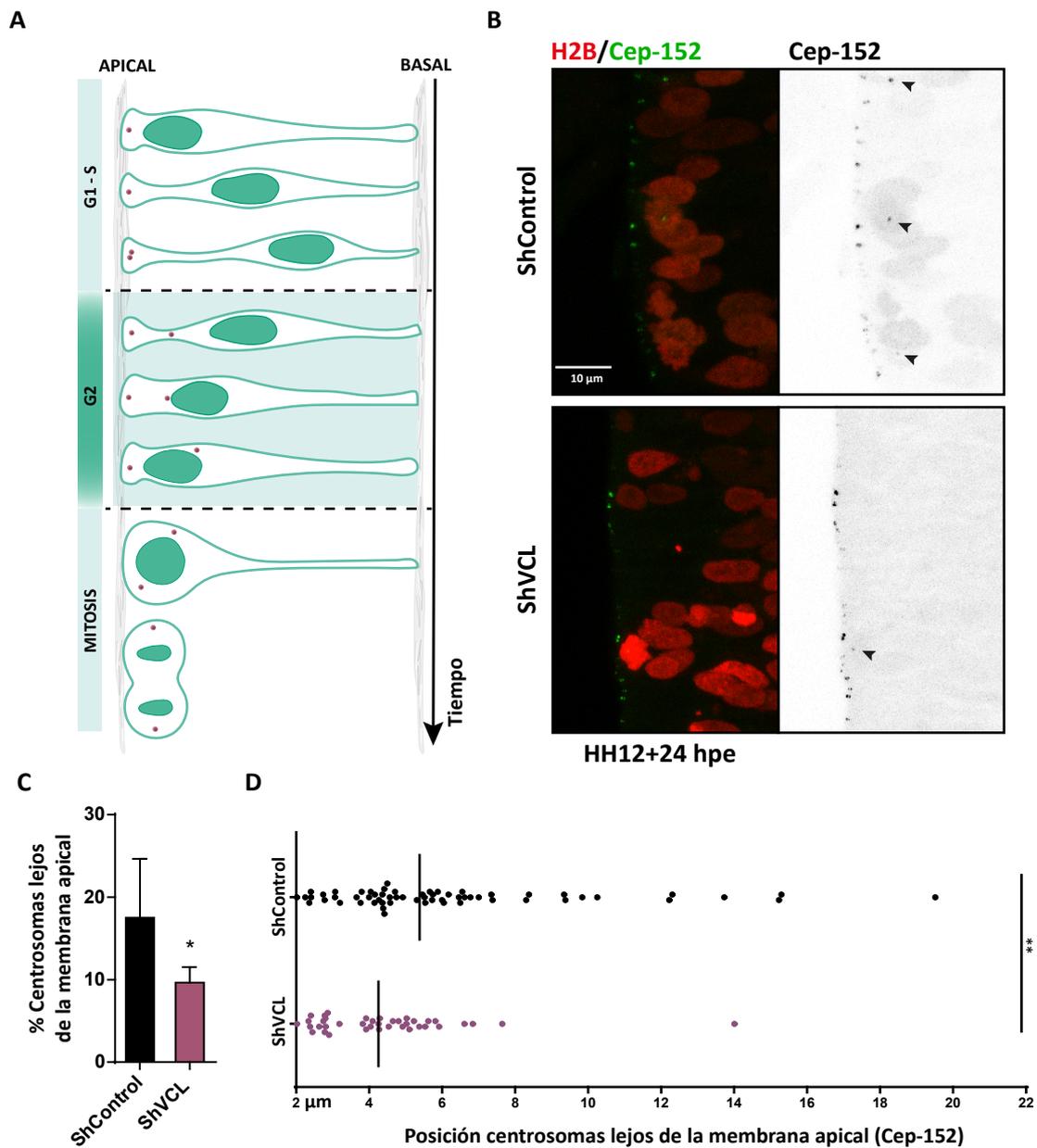


Figura 47. La ausencia de la vinculina causa una menor internalización de los centrosomas de los progenitores neurales. (A) Esquema representativo del ciclo celular de los centrosomas de progenitores neurales en el tubo neural. (B) Cortes transversales tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12 con H2B-RFP (rojo), Cep152 (transfección GFP, verde y negro) y pSUPER-shControl o pSUPER-shVCL (sin GFP), a 24 horas. (C) Cuantificación del porcentaje de centrosomas localizados lejos de la membrana apical ($>2\mu\text{m}$) tras la transfección de peGFP-Cep152 y pSUPER-shControl o pSUPER-shVCL. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Tukey (* = $p < 0.05$). (D) Gráfica de puntos que representa la posición de los centrosomas situados a más de $2\mu\text{m}$ de la membrana apical tras las transfección de peGFP-Cep152 y pSUPER-shControl o pSUPER-shVCL. Las barras centrales representan la mediana de los valores de tres experimentos independientes y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test U Mann Whitney (** = $p < 0.01$).

5.4 La falta de la vinculina provoca una acumulación de células en fase G2

Para profundizar en la cinética del ciclo celular, analizamos el contenido de ADN mediante citometría de flujo (GFP⁺ - Hoechst) de tubos neurales de pollo electroporados con el shControl o el shVCL a HH12 para determinar qué porcentaje de células se encontraba en las diferentes fases del ciclo celular (**Figura 48.A**). Tras el análisis, en los embriones control, aproximadamente un 57% de las células se encontraban en fase G1, un 26% en fase S y un 17% en fase G2/M. Los embriones transfectados con el shVCL presentaron un porcentaje significativamente mayor en las células en fase G2/M en comparación con las células transfectadas con el shControl. Tras la electroporación con el shVCL, un 43% de las células estaban en fase G1, un 26% en fase S y un 31% en fase G2/M (**Figura 48.B**).

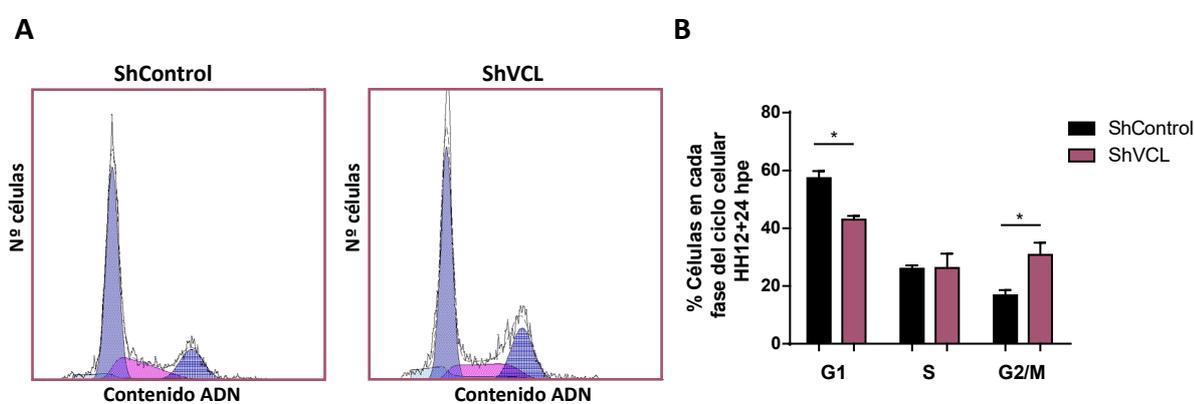


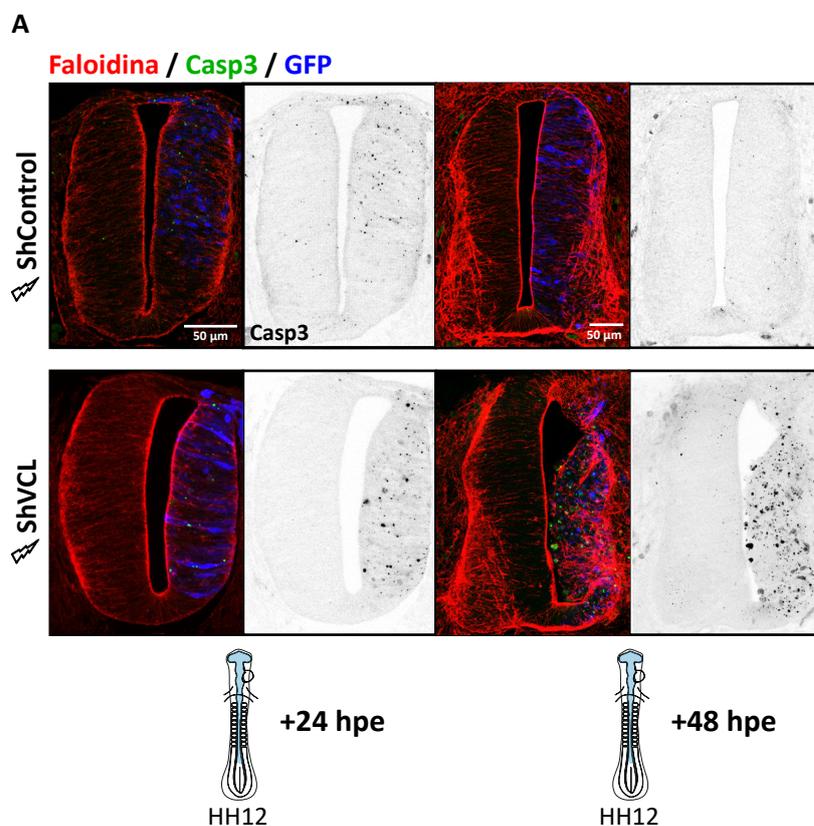
Figura 48. La ausencia de la vinculina provoca un aumento en el porcentaje de células con el doble de ADN. (A) Perfiles representativos del contenido de ADN después del análisis por citometría de flujo de la incorporación de Hoechst en embriones de pollo transfectado con el shControl y el shVCL. **(B)** Análisis cuantitativo del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras electroporar el shControl y el shVCL y analizar el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Se analizó un mínimo de 2000 células por cada condición. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (* = $p < 0.05$).

Estos resultados nos indican que la ausencia de vinculina provoca un aumento en las células que contienen el doble de ADN (**Figura 48**). Esto, junto con los resultados previos que indicaban que la ausencia de la vinculina provocaba un descenso en el porcentaje de células en mitosis (**Figura 43.B** y **Figura 44.B**), y los resultados del ensayo de incorporación de EdU donde observamos que las células transfectadas con el shVCL incorporan EdU de la misma manera que las células control (**Figura 45.D, drcha**) pero se acumulan en el lado basal del neuroepitelio (**Figura 45.C**), nos hace concluir que la ausencia de la vinculina provoca una acumulación basal de células que quedan arrestadas en fase G2.

6. La vinculina es necesaria para la supervivencia de los progenitores neurales

Tras observar el efecto del shVCL a lo largo del tiempo, nos planteamos que tal vez el efecto tan agresivo que se observa después de 48 horas de silenciamiento de la vinculina se debiera a un aumento en la muerte celular (**Figura 29 y Figura 31**). Para ello se realizó inmunotinciones con un anticuerpo contra la forma activa de la caspasa 3 (Casp3), un marcador de muerte celular, en cortes transfectados con el shControl o el shVCL. Posteriormente se realizaron medidas de intensidad de píxel del lado electroporado con la herramienta *Measure* del programa ImageJ y se normalizaron con la intensidad de píxel del lado no electroporado. Después de 24 y 48 horas, pudimos observar que la transfección del shVCL provocó un incremento en la muerte celular; siendo ésta especialmente alta a 48hpe. Tras ese tiempo, la falta de la vinculina causó un aumento de la intensidad media de Casp3 de aproximadamente 35 veces en comparación con el shControl (**Figura 49.A y Figura 50.A**).

Para descartar que los efectos observados sobre el citoesqueleto de actina, la INM y el ciclo celular tras eliminar la vinculina con el shVCL fueran consecuencia del incremento en la muerte celular, procedimos a transfectar el shVCL junto a un vector que contenía la proteína antiapoptótica Bcl2 (**Figura 49.B**). La transfección de este vector provocaba una disminución significativa de muerte celular tanto a 24 como a 48 hpe (**Figura 50.A**).



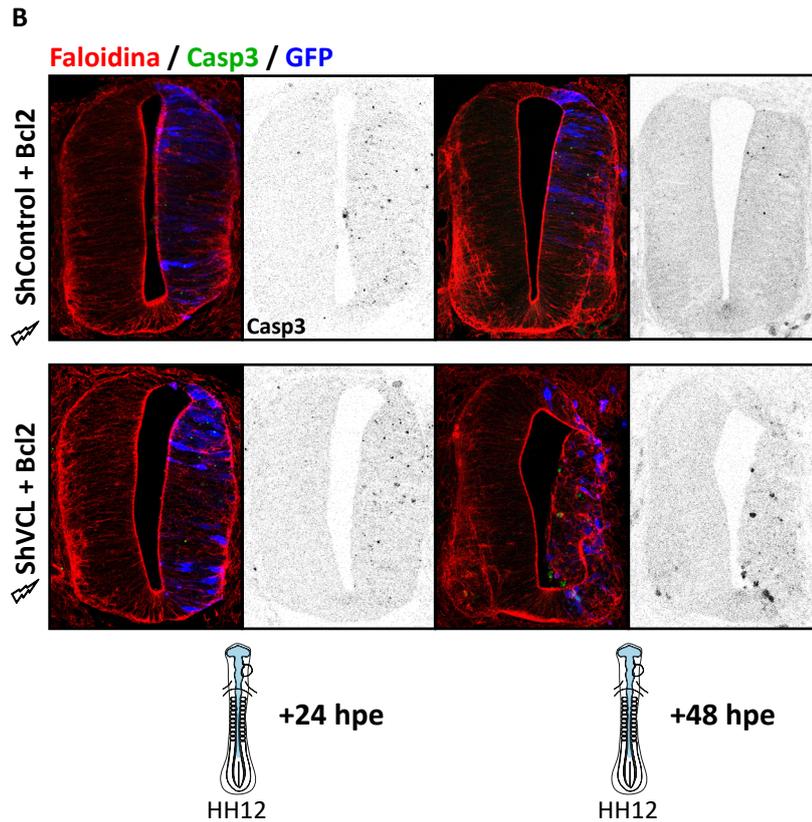


Figura 49. La vinculina es necesaria para la supervivencia de los progenitores del tubo neural de pollo. (A) Imágenes representativas de tubos neurales de pollo transfectados en HH12 con el shControl y el shVCL (transfección GFP, azul), teñidos con faloidina (rojo, F-actina) y Casp3 (azul/negro, marcador de apoptosis) a 24 y 48hpe. **(B)** Imágenes representativas de tubos neurales de pollo transfectados en HH12 con el shControl + Bcl2 (proteína antiapoptótica) y el shVCL + Bcl2 (azul), teñidos con faloidina (rojo, F-actina) y Casp3 (azul/negro, marcador de apoptosis) a 24 y 48hpe.

Tras comprobar que el vector Bcl2 provocaba una disminución en la muerte celular, procedimos a hacer los experimentos de análisis de la INM y del ciclo celular al co-transfectar Bcl2 con el shControl o el shVCL. En primer lugar, observamos que la ausencia de la vinculina seguía provocando alteraciones en el citoesqueleto de actina tras 48 horas al inhibir la muerte celular (**Figura 49.B**). Además, seguimos observando la disminución en el porcentaje de mitosis a través de tinciones con PH3 después de 24 y 48 horas (**Figura 50.B**). Al inhibir la muerte celular, también pudimos comprobar la acumulación de núcleos en la parte basal del neuroepitelio provocadas por las alteraciones en la INM seguían estando presentes (**Figura 50.B y C**).

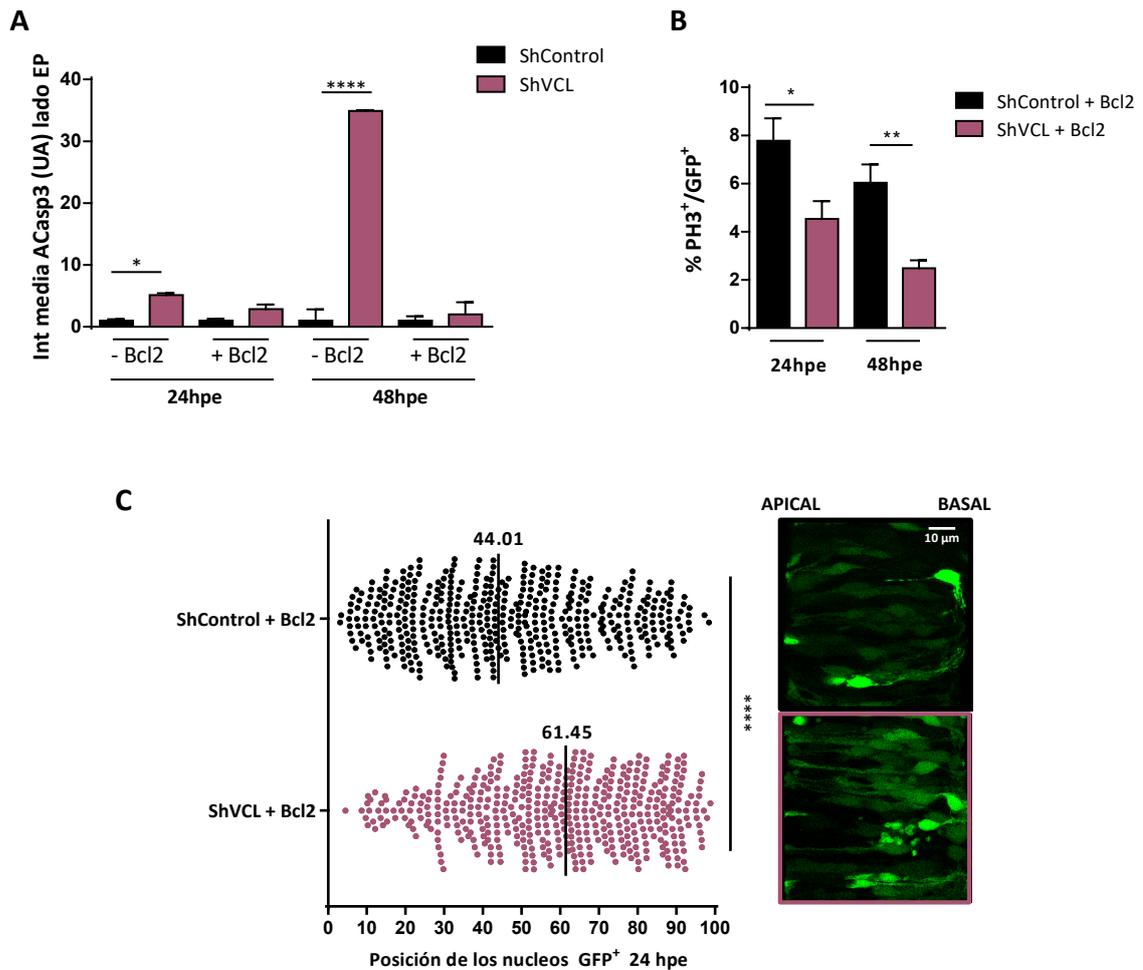


Figura 50. La vinculina provoca alteraciones en el ciclo celular y en la INM independientemente de la muerte celular. **(A)** Cuantificación del porcentaje de Casp3 activa en secciones transversales de tubo neural de pollo después de una transfección de 24 y 48 h del shControl o el shVCL a HH12. La Casp3 activa fue evaluada comparando el lado electroporado de cada embrión con su lado no electroporado en tres experimentos independientes. **(B)** Cuantificación del porcentaje de PH3 con respecto a la GFP tras la transfección del shControl + Bcl2 y del shVCL + Bcl2 a 24 y 48 hpe. Los gráficos de barra con las cuantificaciones de los porcentajes de Casp3 y PH3 muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (*= $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$). **(C)** Gráfica de puntos que representa la posición de los núcleos GFP⁺ transfectados con el shControl + Bcl2 y el shVCL + Bcl2 en el eje apicobasal del neuroepitelio a 24hpe. Las barras centrales representan la mediana de los valores y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test U Mann Whitney (**** = $p < 0.0001$). A la derecha, imágenes representativas de la posición de los núcleos transfectados (GFP⁺) en el eje apicobasal en cada condición tras 24 horas de electroporación.

Nuestros resultados muestran que el efecto de la falta de la vinculina sobre el citoesqueleto de actina, la INM y el ciclo celular no se deben a la muerte celular.

7. La ausencia de la vinculina no promueve una diferenciación neuronal prematura

Puesto que el estado progenitor y el mantenimiento del ciclo celular son dos procesos estrechamente relacionados, barajamos la posibilidad de que la acumulación basal de núcleos que observábamos tras el silenciamiento de la vinculina se debiera a un desequilibrio en los procesos de proliferación y diferenciación. Para descartar esta posibilidad, cuantificamos el porcentaje de células Sox2⁺ (expresado en progenitores) y HuC/D⁺ (marcador de diferenciación) con respecto a las células GFP⁺ en embriones transfectados con el shVCL y el shControl (**Figura 51. A**). Observamos que a 24 hpe no había diferencias en la proporción de células Sox2⁺ y HuC/D⁺ en ambas condiciones (**Figura 51.B**), por lo que concluimos que la acumulación basal de núcleos tras la electroporación del shVCL a 24 hpe no se debe a una alteración en los procesos de proliferación/diferenciación.

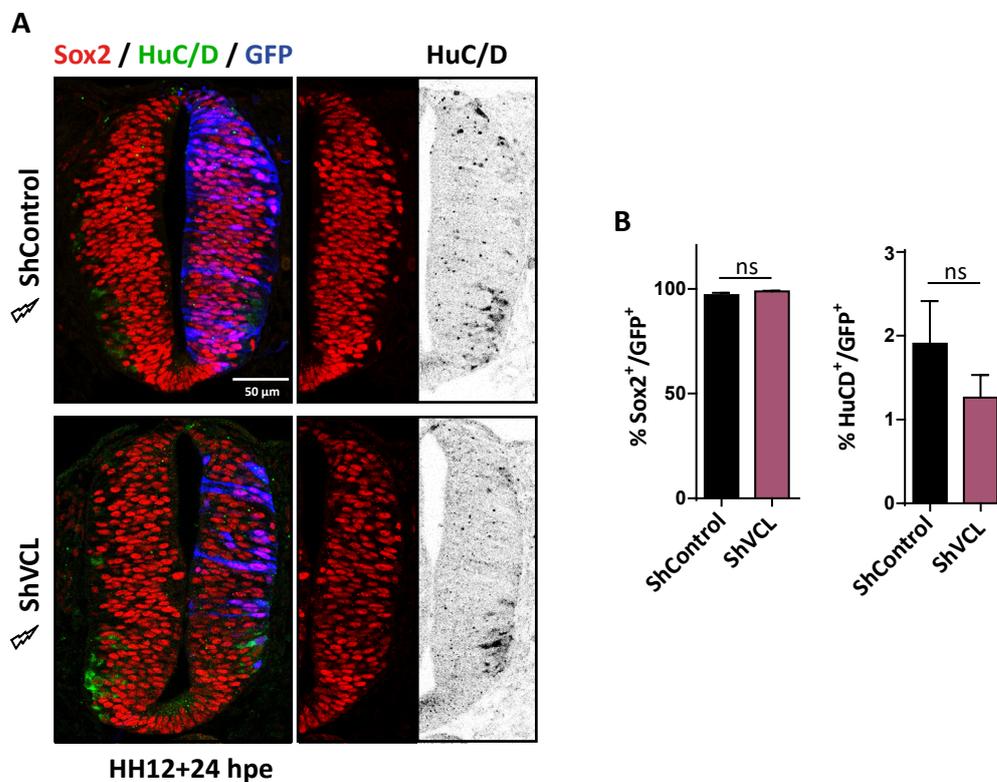
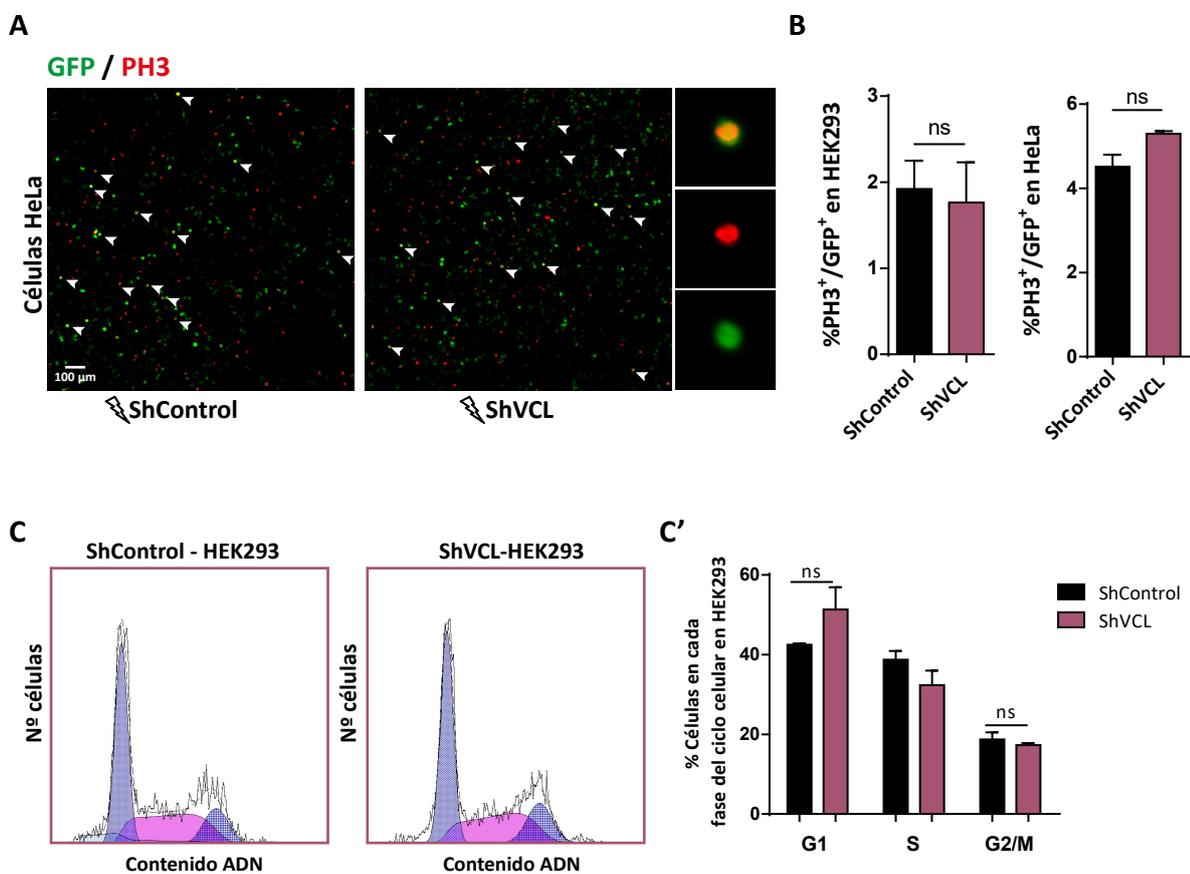


Figura 51. La ausencia de la vinculina no provoca alteraciones en la diferenciación de los progenitores neurales. (A) Secciones transversales de tubo neural tras 24 hpe con el shControl o el shVCL (azul) teñidas con anticuerpos contra Sox2 (marcador de progenitores) y HuC/D (marcador de diferenciación (verde/negro)). (B) Cuantificación del porcentaje de células Sox2⁺ o HuC/D⁺ con respecto a la GFP tras la transfección del shControl y el shVCL. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Tukey para cada marcaje (ns: no significativo).

Figura 52. El sh2VCL contra la vinculina humana disminuye su expresión en HEK293 y HeLa. (A) Esquema de la electroporación en cultivo celular. **(B)** Cuantificación de la efectividad de los shRNA contra la vinculina humana mediante RT-qPCR. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey **** = $p < 0.0001$. Tinción contra la vinculina (rojo/negro) de cultivos celulares de HEK293 **(C)** y HeLa **(D)** transfectados con el shControl o el shVCL (transfección GFP, verde) a 24 hpe.

Una vez comprobado que el sh2VCL funcionaba en las líneas celulares, procedimos a hacer los análisis de ciclo celular, al igual que hicimos en las secciones de tubo neural de pollo. En primer lugar, mediante una tinción PH3 de células, comprobamos el porcentaje de células en fase M **(Figura 53.A)**. El análisis mostró que, en ninguna de las líneas celulares testadas, la ausencia de la vinculina causaba una alteración en el porcentaje de células PH3⁺ **(Figura 53.B)**. También analizamos por citometría de flujo el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de las HEK293 y las HeLa transfectadas con el shControl y el sh2VCL. No se observaron diferencias en los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular entre el grupo shControl y el grupo shVCL **(Figura 53C-C' y D-D')**. Estos resultados muestran que el efecto de la ausencia de la vinculina sobre el ciclo celular que observábamos en las secciones del tubo neural de pollo no se reproduce en cultivos de células no polarizadas.



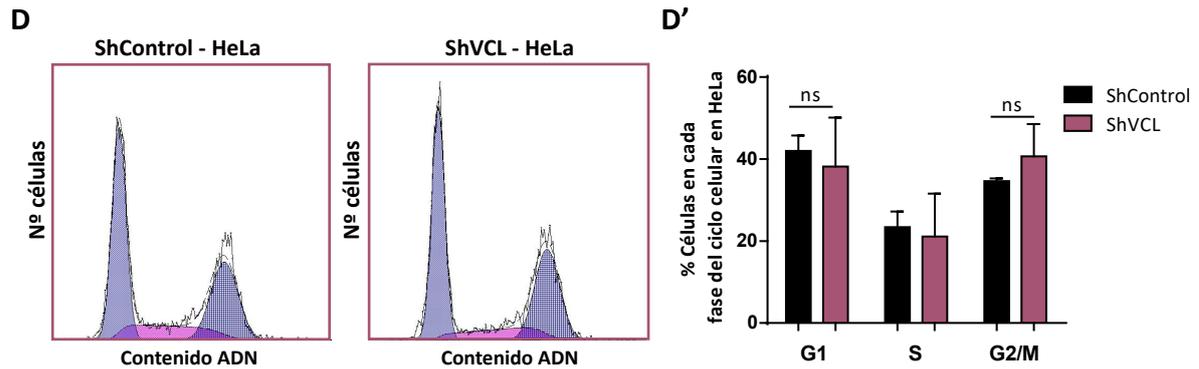


Figura 53. La vinculina no participa en la regulación del ciclo celular en líneas celulares. (A) Tinción con PH3 (rojo) de cultivos celulares de HeLa transfectadas con el shControl o el sh2VCL (transfección GFP, verde). **(B)** Cuantificación del porcentaje de PH3 con respecto a la GFP tras las transfección del shControl o el shVCL en las HEK293 y las HeLa. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Tukey (ns = no significativo). Perfiles representativos del contenido de ADN después del análisis por citometría de flujo de la incorporación de Hoechst en cultivos celulares de HEK293 **(C)** y HeLa **(D)** transfectados con el shControl y el shVCL. Análisis cuantitativo del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras electroporar el shControl y el shVCL y analizar el contenido de ADN mediante citometría de flujo en las HEK293 **(C')** y las HeLa **(D')**. Un mínimo de 5000 células se analizó por cada condición. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (ns= no significativo).

9. La sobreexpresión de la vinculina causa un aumento de la actina apical del neuroepitelio

Una vez estudiada la falta de función de la vinculina en el neuroepitelio, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de la vinculina salvaje (VCL-WT) en el mantenimiento de la integridad del neuroepitelio, el ciclo celular y la migración nuclear intercinética. Además, estudiamos los procesos anteriormente mencionados con el mutante de la vinculina A50I, mutación que impide la unión a la β -catenina y a la talina (VCL-A50I) (**Figura 54.B**; Peng et al., 2010).

En primer lugar electroporamos las dos formas de la vinculina a una concentración baja (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para observar su localización y su expresión mediante una inmunotinción contra la vinculina. Como podemos observar en la (**Figura 54.C**) en ambas condiciones la vinculina se expresa correctamente y se localiza a lo largo de toda la célula, especialmente en los polo basales y apicales, de una forma similar a la forma constitutivamente activa (VCL-T12) (**Figura 28.B**).

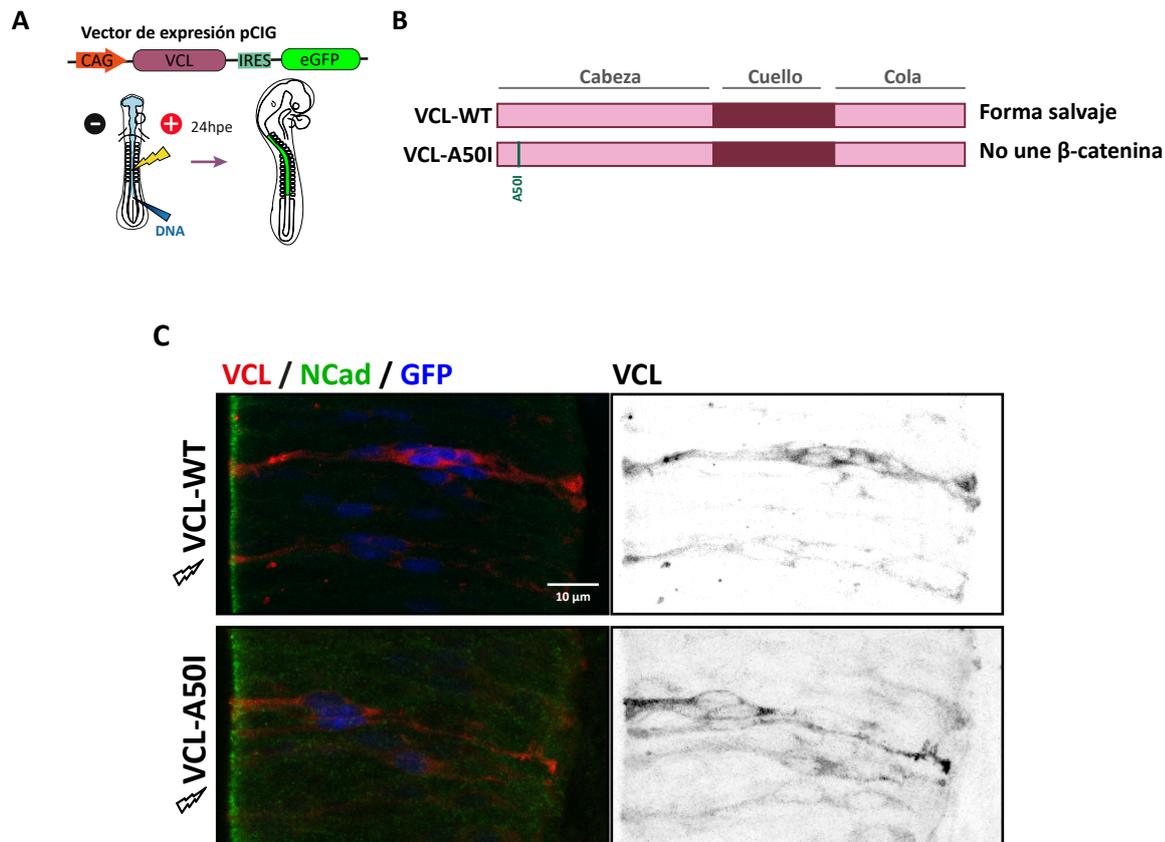


Figura 54. Localización de la VCL-WT y la VCL-A50I se expresan en el tubo neural. (A) Modelo de la electroporación *in ovo* de embriones de pollo a HH12 fueron electroporados con los diferentes constructos de la vinculina 24 hpe. (B) Esquema representativo de los diferentes constructos de la vinculina. La forma salvaje de la vinculina (VCL-WT) y el mutante de la vinculina que no une a la β -catenina (VCL-A50I), con una mutación en el aa 50 de una alanina por una isoleucina. (C) Secciones transversales de tubo neural tras 24 hpe con el VCL-WT y VCL-A50I (transfección GFP, azul) y teñidas con anticuerpos contra la vinculina (rojo/negro) y N-cadherina (blanco).

Después de comprobar que ambas formas de la vinculina se expresaban correctamente y presentaban una localización similar, electroporamos la VCL-WT y la VCL-A50I a una concentración más elevada ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para observar su fenotipo. Tras sobreexpresar ambas formas de la vinculina durante 24 horas, observamos que la VCL-WT provocaba alteraciones en el citoesqueleto de actina, en comparación con el control. Se produjeron acumulaciones de actina en la membrana apical (**Figura 55.B**). Lo mismo se pudo observar cuantitativamente a partir de un análisis de la distribución de actina a lo largo del eje apicobasal con la herramienta *plot profile* de ImageJ. En este caso la distribución de actina se cuantificó tanto en el neuroepitelio como en el lumen.

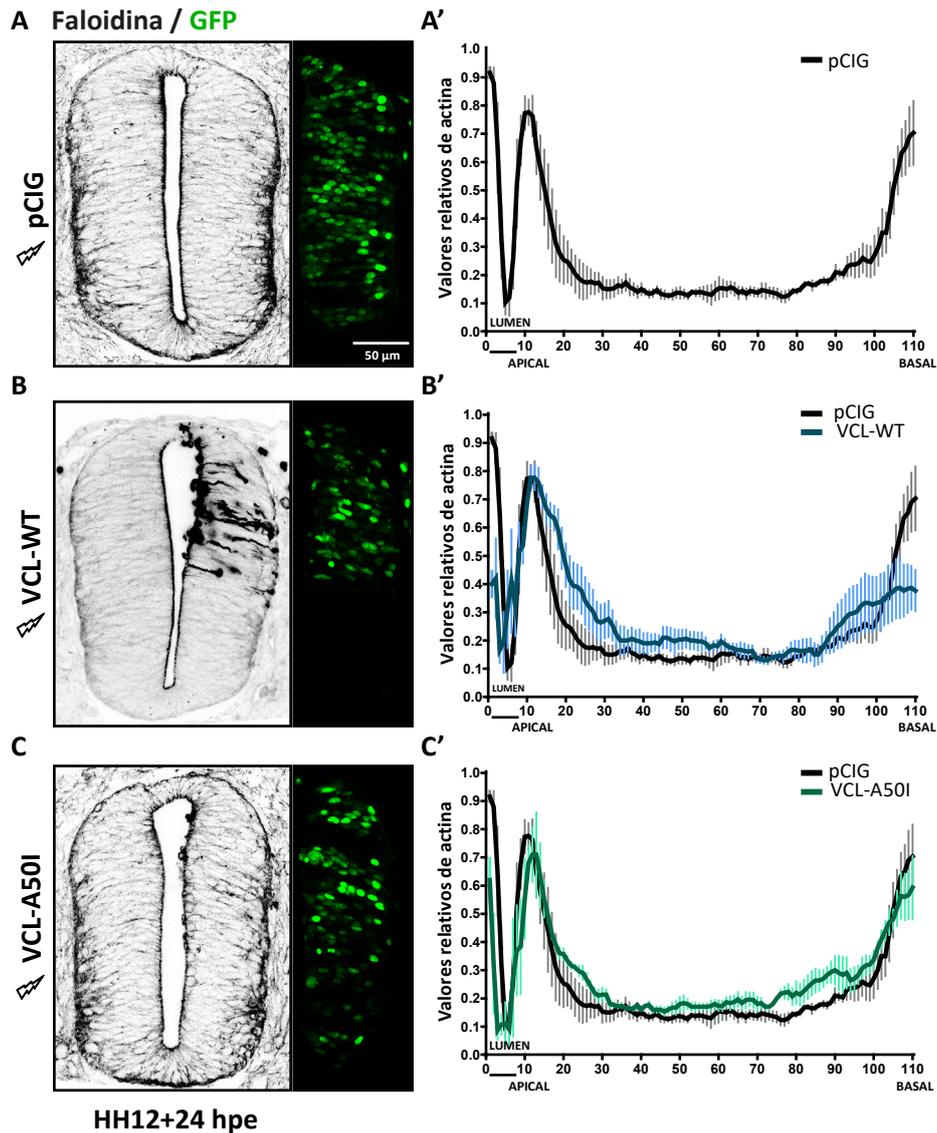


Figura 55. La VCL-WT, pero no la VCL-A50I provoca acumulaciones apicales de actina. Secciones transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados a HH12 con el vector Control (A), VCL-WT (B) y VCL-A50I (C) (transfección GFP, verde) a 24 horas y teñido con faloidina (negro). Cuantificación después de 24 horas de transfección de la distribución en el eje apicobasal de actina en los embriones transfectados con el vector control (A'), VCL-WT (B') y VCL-A50I (C').

Si observamos con mayor detalle el fenotipo de la VCL-WT, además de las acumulaciones de actina apicales, muchos embriones presentaron actina en el lumen del neuroepitelio, posiblemente como consecuencia de la acumulación de actina y de la rotura de la membrana apical. Además, estas acumulaciones de actina colocalizaban con otras proteínas del polo apical como la ZO-1 y la propia vinculina (Figura 56). Por el contrario, el mutante VCL-A50I, no provocaba ni la acumulación apical de actina ni la de otras proteínas del polo apical (Figura 56.A). Esto nos lleva a concluir que la interacción vinculina/ β -catenina es esencial para la acumulación apical de la actina inducida por la vinculina en los progenitores neuroepiteliales.

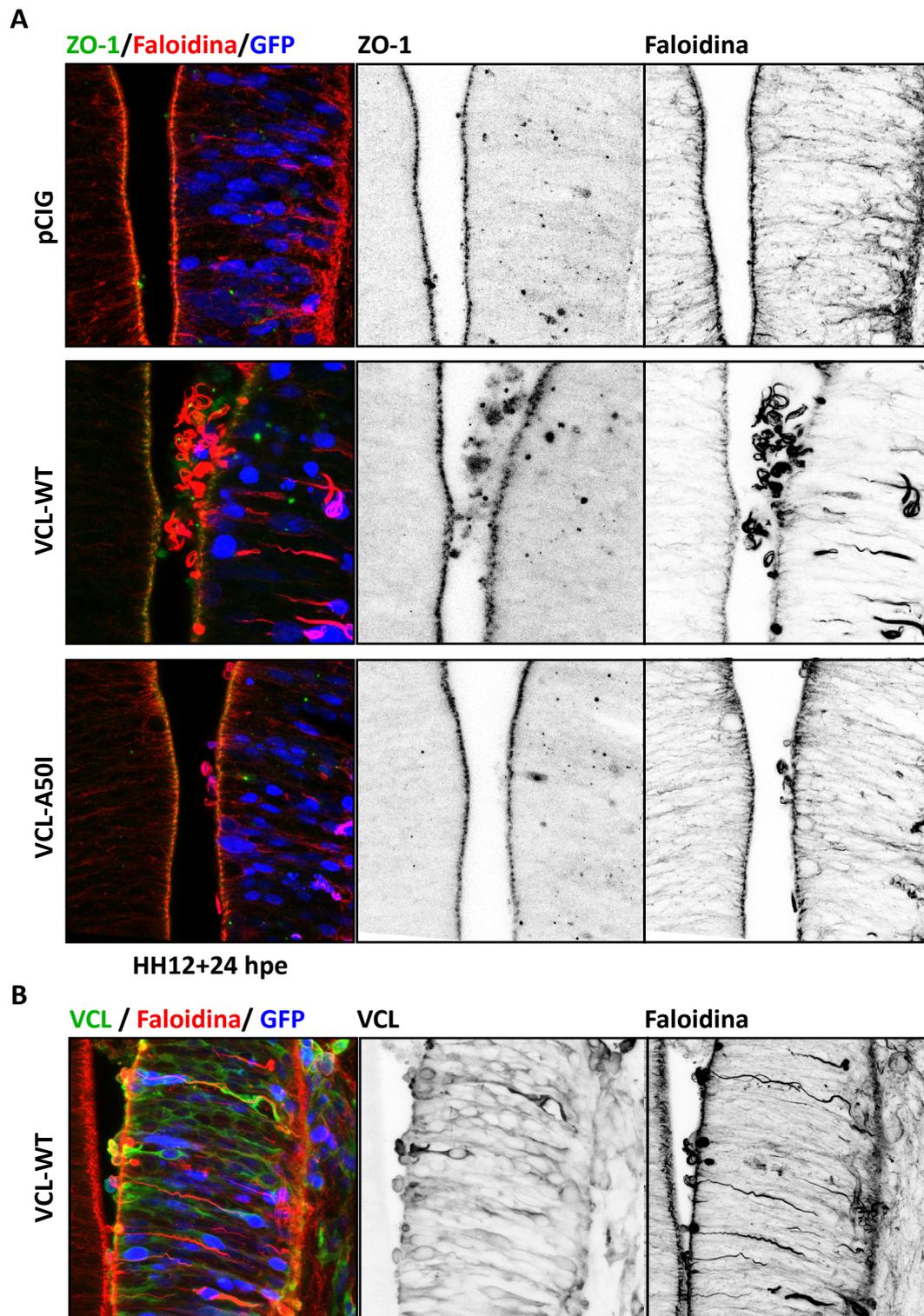


Figura 56. La VCL-WT, pero no la VCL-A50I provoca acumulaciones de proteínas del complejo apical. **(A)** Ampliación de secciones transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectado a HH12 con el vector control, VCL-WT y VCL-A50I (transfección GFP, azul), teñidas con faloidina (rojo y negro) y con ZO1 (verde y negro) a 24 hpe. **(B)** Ampliación de secciones transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectado a HH12 con la VCL-WT (transfección GFP, azul), teñidas con faloidina (rojo y negro) y con vinculina (verde y negro) a 24 hpe.

9.1 Una sobreexpresión de la vinculina no altera la internalización de los centrosomas

Anteriormente habíamos observado que la ausencia de la vinculina provocaba una menor internalización de los centrosomas durante la fase G2 de los progenitores neurales (**Figura 47**). Para comprobar si esto era debido a un efecto directo de la vinculina sobre la separación de los centrosomas, o en cambio era debido a una consecuencia del arresto de la INM y del ciclo celular, observamos el comportamiento de los centrosomas tras la sobreexpresión de la VCL-WT. Para ello procedimos a la electroporación del vector pCMV-PACT-RFP, un marcador de centrosomas (Gillingham & Munro, 2000). Este vector se electroporó junto con el control o con la VCL-WT (**Figura 57.A**). Tras 24 horas observamos que no hubo diferencias significativas entre los embriones control y los embriones VCL-WT en el porcentaje de centrosomas internalizados (**Figura 57. B**). Después de cuantificar la distancia entre los centrosomas internalizados en ambos grupos, tampoco observamos diferencias (**Figura 57.C**). Este resultado demuestra que la ganancia de función de la vinculina no afecta a la internalización de los centrosomas.

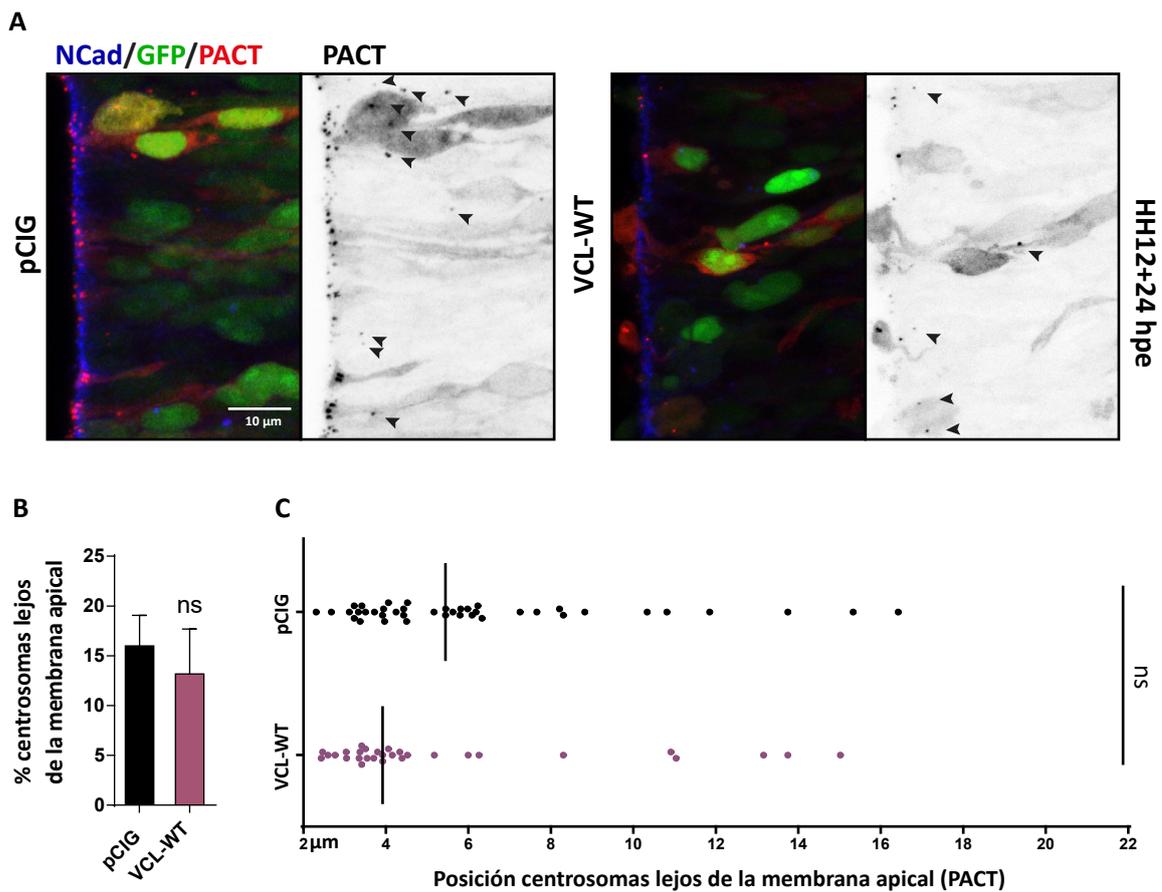


Figura 57. La sobreexpresión de la VCL-WT no altera la internalización de los centrosomas. (A) Ampliación de cortes transversales de tubo neural de embriones de pollo transfectados en HH12 con el vector PACT-RFP (rojo y negro) y VCL-WT (transfección GFP, verde) a 24 hpe con una inmunotinción de N-Cad (azul). **(B)** Cuantificación del porcentaje de centrosomas localizados lejos de la membrana apical ($>2\mu\text{m}$) tras la transfección de PACT-RFP y VCL-WT. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Tukey (* = $p < 0.05$). **(C)** Gráfica de puntos que representa la posición de los centrosomas situados a más de $2\mu\text{m}$ de la membrana apical tras la transfección de PACT-RFP y VCL-WT. Las barras centrales representan la mediana de los valores de tres experimentos independientes y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test U Mann Whitney (ns = no significativo).

10. La VCL-WT, pero no la VCL-A50I rescata el fenotipo de la ausencia de la vinculina

Al igual que en los estudios de supresión génica, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de VCL-WT y VCL-A50I sobre la INM y la progresión del ciclo celular. Además, se realizaron experimentos de rescate del efecto del shVCL a 24 hpe en el neuroepitelio (**Figura 58.A**). En primer lugar estudiamos la INM y pudimos observar que la transfección de la VCL-WT era capaz de rescatar la acumulación basal de núcleos que producía la supresión de la vinculina con el shVCL (**Figura 58.B**). Sin embargo, tras realizar el experimento de rescate con la VCL-A50I, observamos que éste no era capaz de rescatar la alteración en la INM por el shVCL (**Figura 58.B y C**). Por otro lado, tanto la sobreexpresión de shControl + VCL-WT como de shControl + VCL-A50I no causada una alteración significativa en la distribución de los núcleos a lo largo del eje apicobasal (**Figura 58.B y C**). También quisimos observar el efecto de la sobreexpresión de shControl + VCL-WT y shControl + VCL-A50I en la progresión del ciclo celular después de la supresión de la vinculina, mediante el estudio de la fase M con tinciones con PH3. (**Figura 58.C**). En este caso la transfección de shControl + VCL-WT no provocó alteraciones en el porcentaje de mitosis, pero sí observamos un descenso en el porcentaje de mitosis con el shControl + VCL-A50I. Al igual que ocurría con el estudio de la posición de los núcleos en el eje apicobasal, la VCL-WT pudo rescatar la disminución del porcentaje de células en mitosis (PH3⁺) causada por el shVCL. Sin embargo este fenotipo no pudo rescatarse con la VCL-A50I (**Figura 58.C**).

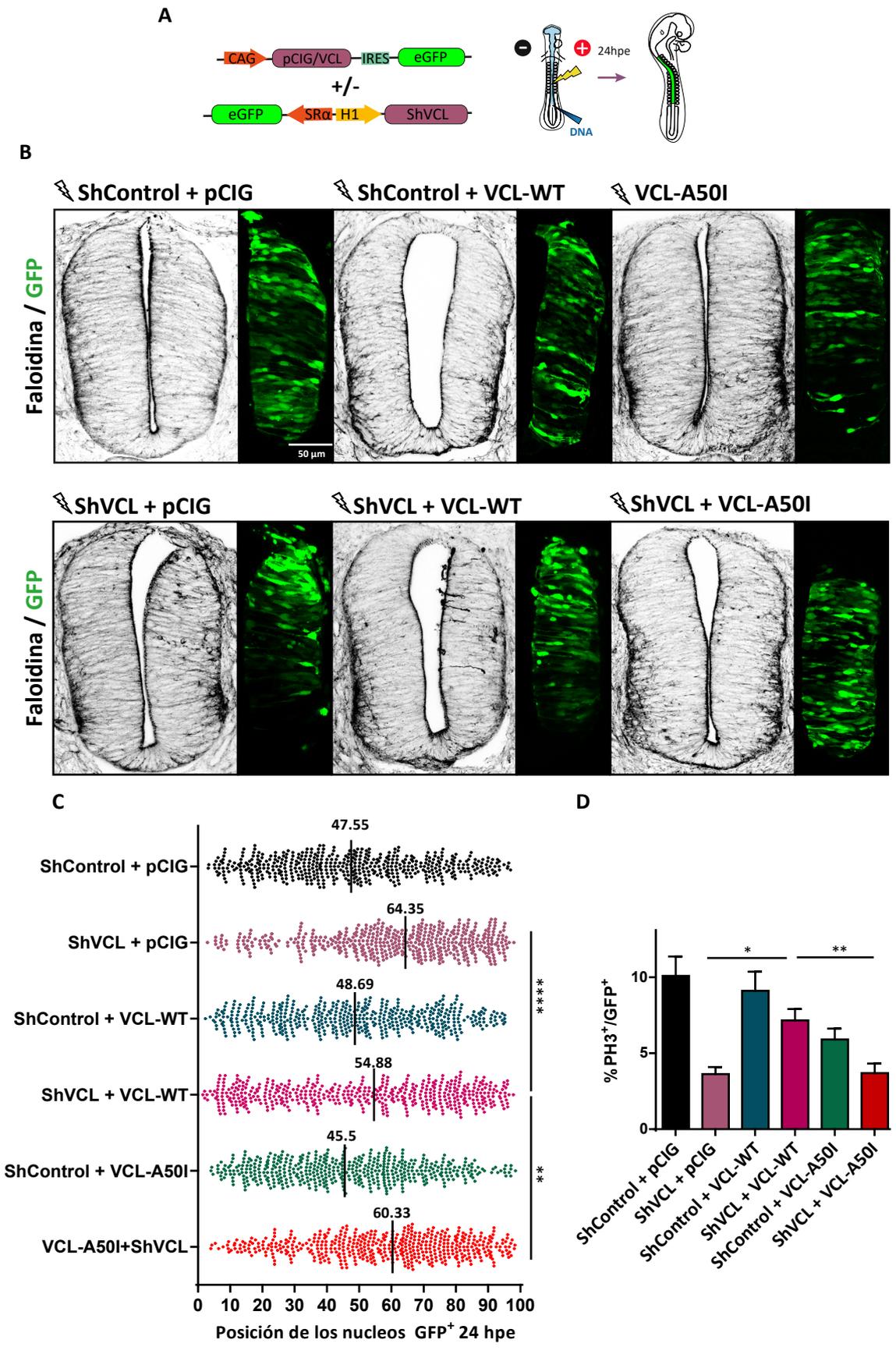


Figura 58. La VCL-WT y no la VCL-A50I rescata la acumulación de núcleos en la zona basal del neuroepitelio y el descenso del porcentaje de mitosis que provoca el shVCL. (A) Modelo de la electroporación *in ovo* del tubo neural de embriones de pollo a HH12 (48h de incubación) que fueron electroporados con el shControl o shVCL con los diferentes constructos de sobreexpresión de la vinculina, VCL-WT y VCL-A50I, o con el correspondiente vector vacío (transfección GFP, verde) a 24hpe. **(B)** Gráfica de puntos que representa la posición de los núcleos GFP⁺ transfectados con shControl + pCIG, shVCL + pCIG, ShControl + VCL-WT, shVCL+ VCL-WT, shControl + VCL-A50I y shVCL+VCL-A50I en el eje apicobasal del neuroepitelio. Las barras centrales representan la mediana de los valores y las diferencias significativas se evaluaron a través de un test Kruskal Wallis (** = $p<0.01$, **** = $P<0.0001$). **(C)** Cuantificación del porcentaje de PH3 con respecto a la GFP tras las transfección de shControl + pCIG, shVCL + pCIG, ShControl + VCL-WT, shVCL+ VCL-WT, shControl + VCL-A50I y shVCL+VCL-A50I. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (* = $p<0.05$, ** = $p<0.01$).

Finalmente, a través del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo (**Figura 59**) comprobamos si la sobreexpresión de VCL-WT era capaz de rescatar la acumulación de células en G2. Al igual que ocurría con los resultados previamente mostrados, la VCL-WT pudo rescatar el incremento de células en fase G2 detectada por citometría, consecuencia de la transfección con el shVCL (**Figura 59**). Una vez más, este fenotipo no se consiguió rescatar con el mutante VCL-A50I, que no es capaz de unirse a la β -catenina ni a talina (**Figura 59**). El resto de condiciones no presentaban diferencias significativas respecto al control (**Figura 59**). Estos resultados nos llevan a concluir que la interacción de vinculina con las adhesiones celulares a través de la β -catenina o la talina es esencial para la INM basal \rightarrow apical y como consecuencia para la correcta progresión del ciclo celular desde la fase S a la M durante el desarrollo del tubo neural de pollo. El efecto de la ausencia de la vinculina sobre la INM y el ciclo celular es debido directamente a la ausencia de la vinculina puesto que sus consecuencias sobre estas funciones biológicas se pueden rescatar al sobreexpresar una vinculina salvaje (VCL-WT). Además, estos resultados muestran que la interacción entre la vinculina y las moléculas de adhesión es necesaria para una correcta INM y un ciclo celular adecuado en el neuroepitelio de pollo.

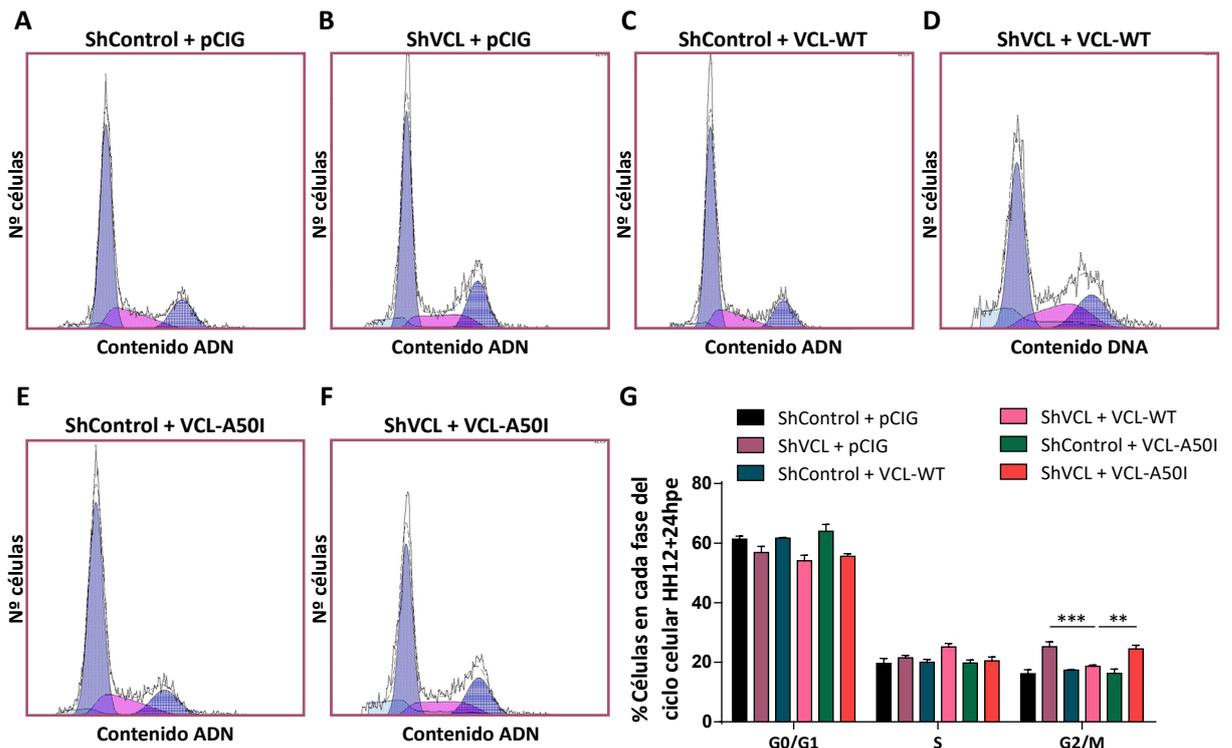
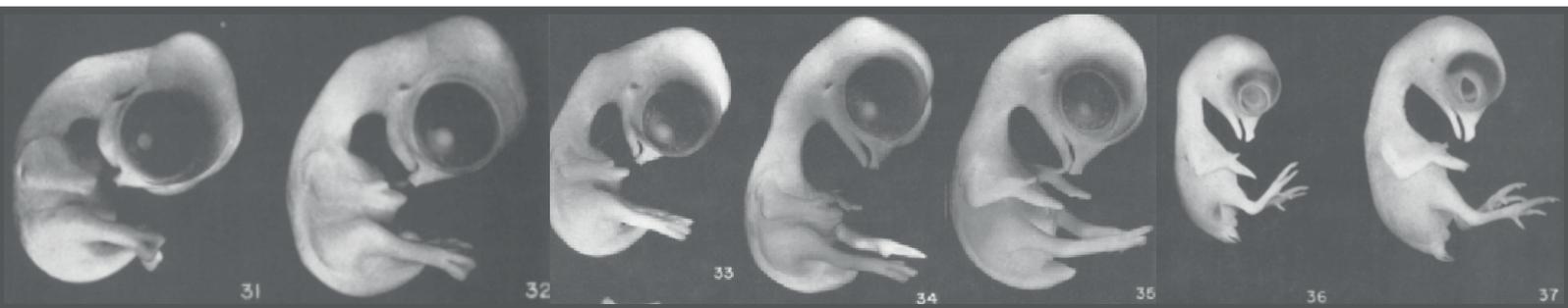


Figura 59. La VCL-WT y no la VCL-A50I rescata el incremento en células en fase G2 que provoca el shVCL. Perfiles representativos del contenido de ADN después del análisis por citometría de flujo de la incorporación de Hoechst en embriones de pollo transfectado con shControl + pCIG (A), shVCL + pCIG (B), shControl + VCL-WT (C), shVCL + VCL-WT (D), shControl + VCL-A50I (E) y shVCL + VCL-A50I (F). (G) Análisis cuantitativo del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras electroporar shControl + pCIG, shVCL + pCIG, ShControl + VCL-WT, shVCL+ VCL-WT, shControl + VCL-A50I y shVCL+VCL-A50I, y analizar el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Se analizó un mínimo de 2000 células por cada condición. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias significativas se evaluaron a través de una ANOVA de una vía seguida de un test Tukey (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

R

DISCUSIÓN

D



D

El citoesqueleto de actina es un componente fundamental de las células eucariotas y contribuye a una correcta función celular, regulando procesos básicos para los tejidos como la morfología celular, la migración, la división celular, la endocitosis y la migración nuclear intercinética (INM) entre otros (Moore & Vartiainen, 2017; Mooren et al., 2012; Svitkina, 2018; Taverna & Huttner, 2010).

Durante el desarrollo del tubo neural, el organismo está sometido a una dinámica celular coordinada, a una señalización extracelular y a reordenamientos tisulares, donde el citoesqueleto de actina tiene un papel importante. Los progenitores del tubo neural son células madre embrionarias que presentan una polaridad apicobasal. Estas células presentan una morfología alargada con anclajes en la membrana basal, a través de uniones basadas en integrinas, y en la membrana apical, a través de uniones basadas en cadherinas (Arai & Taverna, 2017; F. S. Chou et al., 2018; Long et al., 2016). La polaridad apicobasal es vital para funciones biológicas tan importantes como la división celular, la neurogénesis, el mantenimiento de la morfología y la forma del tejido a través de las adhesiones celulares (Arai & Taverna, 2017). En esta tesis, hemos identificado diferentes proteínas unidoras de actina (ABPs) que interactúan en el complejo apical con la N-cadherina a través de su dominio de unión a la β -catenina, centrándonos en el papel de la vinculina durante el desarrollo del neuroepitelio. Este estudio se ha enfocado en las primeras etapas del desarrollo del tubo neural, que es anatómicamente la región más simple y conservada del sistema nervioso central de los vertebrados y, por lo tanto, es un buen modelo para el estudio de la polaridad neural, la división celular, la neurogénesis y la INM.

Aunque hace tiempo que se sabe que la vinculina es importante para el establecimiento de las uniones adherentes y las adhesiones focales, la mayoría de estudios se han centrado en el papel de ésta en las adhesiones focales. Los pocos trabajos que han priorizado su atención en el papel de la vinculina en las uniones adherentes, lo han hecho en cultivos de células no polarizadas, por lo que no se había descrito hasta la fecha su patrón de expresión ni sus funciones moleculares en tejidos polarizados como el tubo neural. En este trabajo, proporcionamos evidencias de la participación de la vinculina en 1) el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio, 2) el ciclo celular y 3) el movimiento apical durante la INM.

1. La vinculina y el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio

Estudios previos en el laboratorio demostraron que, en la membrana apical, la interacción entre la β -catenina y la N-cadherina tiene una función fundamental en la regulación del complejo apical de los progenitores neuroepiteliales (Herrera et al., 2014). Este complejo interactúa con el citoesqueleto de actina, también importante en el mantenimiento del complejo apical, a través de un conjunto de ABPs que interactúan con la β -catenina (Arai & Taverna, 2017; Bays & DeMali, 2017). Con el objetivo

de encontrar proteínas que interaccionaran con la N-cadherina a través de la β -catenina, se realizaron experimentos de espectrometría de masas, comparando los complejos aislados de una forma entera de la N-cadherina y los obtenidos con un mutante de N-cadherina que carece del dominio de unión a la β -catenina. De las 63 proteínas encontradas, en la presente tesis se ha estudiado el papel en la regulación de la estructura del neuroepitelio de pollo de 6 ABPs encontradas en el análisis: la α -actinina4, la α -E-catenina, la α -N-catenina, la cortactina, la Dbnl y la vinculina.

Para el estudio del papel de estas proteínas en el tubo neural de pollo, llevamos a cabo experimentos de falta de función donde demostramos que la vinculina cumple una función esencial en la distribución de la actina a lo largo del eje apicobasal y, por tanto, en el mantenimiento de la estructura del neuroepitelio. Aunque también la α N-catenina, la cortactina y la Dbnl contribuyen a la estabilidad de la actina apical, parece que, en este modelo en concreto y con las herramientas utilizadas, es la vinculina la que regula en mayor medida la formación/mantenimiento del anillo apical de actina. Nuestros resultados muestran que la pérdida de la vinculina en el tubo neural de pollo provoca una gran desestructuración del neuroepitelio y alteraciones en la distribución de la actina después de 48 horas. Además de afectar al citoesqueleto de actina, la ausencia de la vinculina provoca alteraciones en la localización de proteínas apicales como la N-cadherina, la aPKC y la ZO1. Estos resultados concuerdan con los resultados de otros estudios donde la falta de función de proteínas del complejo apical relacionadas con la vinculina como la N-cadherina, la α -catenina, la β -catenina y el complejo Arp2/3 causan alteraciones de la adhesión de los progenitores neurales de la corteza de ratón, además de pérdidas de polaridad y defectos en la morfología tisular (F. Chou & Wang, 2016; Kadowaki et al., 2007; Machon et al., 2003; Schmid et al., 2014; P. S. Wang et al., 2016).

En concordancia con estos resultados, también demostramos que la vinculina se localiza mayoritariamente en las membranas apical y basal del tubo neural de pollo, aunque también está presente en el citoplasma de los progenitores neurales en menor medida. Estos resultados no sorprenden, ya que se había observado previamente una localización apical de la vinculina en el tubo neural de *Xenopus* (Roffers-Agarwal et al., 2008). Además, diferentes estudios sobre esta proteína indican que la vinculina se localiza en las uniones adherentes y en las adhesiones focales de células en cultivo, por lo tanto, era de esperar en el tubo neural de pollo se localizara en las membranas apical y basal (Bays & DeMali, 2017).

Finalmente, observamos que la sobreexpresión de VCL-WT causa un incremento apical de actina y otras proteínas apicales como la ZO1, acompañado de interrupciones en la continuidad de la membrana apical y de invasiones del lumen por parte de los progenitores neurales. La vinculina es una proteína que, además de mantener y reforzar las uniones adherentes a través de su unión a la actina y la α -catenina, tiene un papel en la polimerización de actina. La vinculina es capaz de iniciar la formación de filamentos de actina o remodelar los filamentos existentes de manera directa o a través de

alguno de sus ligandos (Wen et al., 2009). Por ese motivo, tiene sentido pensar que al sobreexpresar la vinculina, ésta pueda provocar la polimerización de nuevos filamentos de actina que incrementaría la tensión del anillo apical de actina y este aumento de tensión acabaría rompiendo la membrana apical. En esta tesis demostramos por tanto que la vinculina se localiza en las uniones adherentes del tubo neural, que es un regulador del complejo apical y que es crucial para el mantenimiento de la morfología de este neuroepitelio.

Por otro lado, como consecuencia derivada de la supresión de la vinculina después de 48 horas observamos un importante incremento en la muerte celular del tejido, probablemente debido a la pérdida de adhesión de los progenitores neurales. Se ha demostrado que tanto las adhesiones célula-matriz, como las adhesiones célula-célula, protegen de la muerte celular y, una pérdida de las uniones adherentes causan un aumento de la muerte celular (Gagnoux-Palacios et al., 2018; Grossmann, 2002; Hofmann et al., 2007). Además, se ha demostrado que la E-cadherina juega un papel crítico en la regulación de la señalización de muerte celular por la proteína Fas (Gagnoux-Palacios et al., 2018), por lo que sería plausible que el aumento en la muerte celular que observamos tras silenciar la vinculina se deba a una activación de esta vía de señalización apoptótica.

De todas formas, para comprobar que el efecto de la ausencia de la vinculina sobre el citoesqueleto de actina fuera causa y no consecuencia de un incremento en la muerte celular, procedimos a la electroporación del shVCL junto con un vector que expresa la proteína antiapoptótica Bcl2 (Cayuso et al., 2006). Tras inhibir la muerte celular, comprobamos que los efectos de la ausencia de la vinculina sobre el citoesqueleto de actina y la estructura del neuroepitelio seguían apareciendo y, por tanto, no eran consecuencia del incremento en apoptosis. Este fenotipo desestructurante era evidente a partir de las 36 horas de la ausencia de la vinculina. Antes de ese tiempo las células que expresaban el shVCL conservaban las uniones adherentes, el anclaje apical y la localización apical de los centrosomas, manteniéndose por tanto la correcta estructura del neuroepitelio. Por ese motivo decidimos centrar nuestra investigación en un estadio más temprano y estudiar el papel de la vinculina después de suprimir su expresión durante 24 horas; donde también demostramos que la muerte celular no contribuye a ninguno de los fenotipos observados. Por lo tanto, el aumento de la muerte celular es probablemente una consecuencia de las diferentes alteraciones provocadas por la ausencia de la vinculina durante el desarrollo del tubo neural

2. La vinculina y la INM

Durante el desarrollo de los neuroepitelios pseudoestratificados, los núcleos de los progenitores neurales están densamente empaquetados y ocupan diferentes posiciones a lo largo del eje apicobasal durante el ciclo celular en un movimiento conocido como INM (H. Lee & Norden, 2013; F. Sauer, 1935; Taverna & Huttner, 2010). En la presente tesis hemos demostrado, a través de un tratamiento con blebistatina, que el citoesqueleto de actina regula la INM en el tubo neural de pollo. Además, tras la eliminación de la vinculina se produce una acumulación de los núcleos de los progenitores neurales en la zona basal del neuroepitelio después de 24 horas, consecuencia de una alteración en la migración apical de la INM, durante la fase G2.

A medida que avanza el desarrollo, comienza el proceso de diferenciación. Durante este proceso, las células colocan su núcleo en la zona del manto (MZ) y, a continuación, de forma coordinada, se produce una regulación negativa de proteínas del complejo apical como la N-cadherina seguida de una abscisión apical, que permitirá a la neurona migrar hacia la MZ (Das & Storey, 2014). En nuestro estudio demostramos que la acumulación basal de núcleos tras eliminar la vinculina no se debe a una diferenciación prematura de los progenitores neurales. Sin embargo, no podemos descartar que la ausencia de la vinculina pueda producir un aumento en la diferenciación una vez la neurogénesis ya ha comenzado (Le Dréau & Martí, 2012). Sería interesante comprobar si la ausencia de la vinculina en un estadio con más diferenciación provoca un incremento en la diferenciación celular, puesto que diferentes estudios muestran que la supresión de proteínas del complejo apical, además de producir defectos en la morfología tisular, aumentan la diferenciación celular (Machon et al., 2003; Schmid et al., 2014; Stocker & Chenn, 2009; Woodhead et al., 2006; J. Zhang et al., 2010). Además, por otro lado, diferentes estudios han demostrado que alteraciones en la INM también causan un incremento en la diferenciación (Del Bene et al., 2008; Murciano et al., 2002; Schenk et al., 2009). Sin embargo, la consecuencia de la falta de la vinculina en nuestras células es un aumento de la apoptosis y no un incremento de la diferenciación. Este incremento de la apoptosis es evidente a 24 hpe, antes de que se detecte la pérdida de las proteínas apicales y una vez la afectación de la progresión de la INM y el arresto en fase G2 ya ha ocurrido. En nuestro trabajo las células en estudio son progenitores neurales que se encuentran en fase de expansión, es decir, están realizando divisiones proliferativas progenitor-progenitor, a diferencia de los estudios antes citados en los que las células se encuentran ya realizando divisiones neurogénicas. Por tanto, la diferencia entre tomar la decisión de morirse o diferenciarse ante el bloqueo de la INM podría depender del tipo de división.

Siguiendo en la línea del estudio de la función de la vinculina en la INM, la captura de imágenes de los cultivos *ex vivo* a lo largo del tiempo nos ha permitido estudiar la INM en diferentes condiciones.

En condiciones normales, los núcleos presentan una migración basal estocástica claramente diferente a la migración apical, que es un movimiento más rápido y dirigido. Estos resultados coinciden con los resultados observados en corteza de ratón y retina de pez cebra donde proponen que esta migración es simplemente consecuencia del incremento de presión local provocado por la migración apical (Kosodo et al., 2011; Leung et al., 2011; Norden et al., 2009). El tratamiento con blebistatina a una concentración de 12,5 μM , nos permitió comprobar que, en el tubo neural de pollo el citoesqueleto de actina es fundamental para la INM. Tras el tratamiento observamos una ralentización de la velocidad media en ambos movimientos de la INM. Sin embargo, la migración apical es la que se ve claramente alterada ya que además de ser más significativo el descenso de la velocidad media, también se ven afectados otros parámetros como la velocidad instantánea o la direccionalidad. A partir de los estudios *ex vivo* también demostramos el papel de la vinculina en la migración apical de la INM, al observar que en algunas células esta migración no se lleva a cabo y que las células que consiguen migrar desde la membrana basal a la apical tardan más tiempo en alcanzar su objetivo. Además, el movimiento es menos directo como indican los descensos en la velocidad media, velocidad instantánea y direccionalidad durante la migración apical. A pesar de esto, no parece que la vinculina tenga un papel en la migración basal, ya que apenas se observan cambios en los parámetros analizados.

El hecho de observar diferencias en la afectación de ambos movimientos de la INM entre el tratamiento de blebistatina y la transfección del shVCL puede deberse a cómo afectan ambas condiciones a los progenitores neurales. Por una parte, aunque es cierto que con el tratamiento de blebistatina observamos una afectación de ambos movimientos, en la migración basal estas diferencias son menores que en la migración apical y únicamente se observaron diferencias significativas al analizar la velocidad media. No observamos diferencias significativas ni en la velocidad instantánea ni en la direccionalidad. Además, no se observaron diferencias significativas con el grupo shVCL. Si tenemos en cuenta los estudios donde demuestran que la migración basal es consecuencia de la migración apical, es posible que debido a que el tratamiento con blebistatina afecta a todas las células del tejido veamos afectada la migración basal como consecuencia de la parada de todas las células que migran apicalmente. A diferencia de esto, con la transfección del shVCL no llegamos a afectar al 100% de las células, con lo cual estaremos alterando la migración apical sólo de una parte de la población, con lo cual es lógico que la migración basal de la mayoría de las células no este afectada.

Aunque diferentes estudios muestran el importante papel del citoesqueleto de actina en la INM (Leung et al., 2011; Messier & Auclair, 1974; Meyer et al., 2011; Minobe et al., 2009; Murciano et al., 2002; Norden et al., 2009; Schenk et al., 2009; Spear & Erickson, 2012a; Strzyz et al., 2015), también son numerosos los estudios que relacionan a los microtúbulos con la INM (Baffet et al., 2015; Cappello et al., 2011; Del Bene et al., 2008; Hu et al., 2013; Kosodo et al., 2011; Messier, 1978; Messier & Auclair,

1973; Spear & Erickson, 2012a; Tsai et al., 2005, 2010; Webster & Langman, 1978; Xie et al., 2007). No hay dudas sobre que ambos citoesqueletos tienen una función esencial en la regulación de la INM, sin embargo, aún no se ha llegado a un acuerdo sobre la función concreta de cada uno de ellos.

La evidencia actual indica que los mecanismos que regulan la INM (microtúbulos vs actomiosina) varían en función del organismo o del tejido estudiado, por lo que es probable que la mecánica de INM no sea idéntica en todos los epitelios pseudoestratificados. Las células en los tejidos pseudoestratificados comparten muchas características biológicas celulares; sin embargo, éste es un grupo heterogéneo de tejidos. Aunque es cierto que en todos los tejidos pseudoestratificados los progenitores neurales mueven sus núcleos a lo largo del eje apicobasal, éstos varían en longitud, abarcando distancias que van desde micrómetros a milímetros (Norden, 2017).

Los epitelios pseudoestratificados se pueden clasificar en función de la longitud de la célula en epitelios pseudoestratificados cortos, intermedios y largos (Norden, 2017). Dentro de los epitelios cortos, estarían aquellos de menos de 30 μm tanto en invertebrados como en vertebrados. Por ejemplo, las células en el lóbulo óptico en *Drosophila*, que dan lugar a partes del ojo de la mosca tienen menos de 30 μm de longitud, lo que corresponde a dos capas de núcleos, es decir, al espacio ocupado por dos núcleos consecutivos. Dentro de este grupo encontraríamos también epitelios de vertebrados como las vesículas ópticas y la placa neural. Los epitelios pseudoestratificados intermedios, abarcan una distancia apicobasal de entre 30 μm y 60 μm , con núcleos apilados en cuatro-seis capas. A su vez, los procesos apicales y basales son más delgados que en los epitelios cortos y presentan menos citoplasma. Algunos ejemplos de epitelios intermedios son los discos imaginales de mosca, el ectodermo de *Nematostella*, la retina y el cerebro posterior de pez cebra, el intestino de ratón y el tubo neural de los vertebrados. Finalmente encontramos los epitelios pseudoestratificados largos, que miden ~ 100 μm y presentan de ocho a nueve capas nucleares, pero son menos comunes. Los ejemplos son el tubo neural más desarrollado y el neuroepitelio de retina en mamíferos (Norden, 2017). Un caso particular de un epitelio pseudoestratificado largo es la corteza de mamíferos que está compuesto por células de glia radial. Estas células son extremadamente alargadas, y miden aproximadamente 250 μm en ratones y hasta 1 mm en primates (Miyata, 2008; Rakic, 1972). En estas células, la única región voluminosa es el núcleo, mientras que los procesos son extremadamente delgados y casi desprovistos de cualquier citoplasma. A diferencia de otros epitelios pseudoestratificados, aquí los núcleos no se encuentran a lo largo de todo el eje apicobasal, sino que residen en una zona restringida que abarca ~ 150 μm de la superficie apical, la zona ventricular, donde se disponen en diez o más capas.

Diversos autores postulan que es posible que las arquitecturas de los tejidos específicos y las diferentes etapas de desarrollo pueden requerir diferentes mecanismos para dirigir el movimiento de los núcleos. Aunque muchos de estos aspectos necesitan más investigación, se han podido encontrar al-

gunas correlaciones con respecto a los vínculos observados entre la longitud epitelial y las maquinarias que impulsan la dinámica nuclear durante la INM. Por ejemplo, los epitelios que dependen predominantemente de las fuerzas de la actomiosina presentan progenitores con longitudes apicobasales más cortas, formas más gruesas y pertenecen a tejidos más primitivos en comparación con el neocorteza cerebral de mamíferos, en la que los microtúbulos parecen ser los principalmente responsables de los movimientos nucleares (Kosodo, 2012; H. Lee & Norden, 2013; Spear & Erickson, 2012b; Taverna & Huttner, 2010). Estos estudios van en la misma línea de nuestros resultados, donde hemos visto que, en el tubo neural de pollo, considerado un epitelio pseudoestratificado de tamaño intermedio, el citoesqueleto de actomiosina y la vinculina tienen un papel crucial en la INM.

También el hecho de que la INM dependiente de actomiosina se observe en sistemas filogenéticamente diversos, mientras que los motores basados en microtúbulos son cruciales en la INM de las células de la neocorteza de mamíferos, sugiere que la INM dependiente de actomiosina puede representar un modo de pseudoestratificación y de INM evolutivamente anterior. Tomados en conjunto, parece posible que, durante la evolución del cerebro, surgieran nuevas características especializadas, como un mayor alargamiento celular y movimientos dependientes de los microtúbulos para llevar a cabo esta migración de mayor distancia (Norden, 2017).

Además de sus diferencias en la longitud, los epitelios pseudoestratificados también pueden variar en su forma y arquitectura general. La mayoría de estos epitelios tienen una superficie recta y una morfología rectangular, como en el ectodermo, en el tubo neural y en la corteza cerebral. Sin embargo, algunos epitelios pseudoestratificados están doblados apical o basalmente, por ejemplo, partes del disco del ala *Drosophila* y la retina de los vertebrados (Norden, 2017). Aún no se ha explorado en profundidad si éstas diferencias en la arquitectura de los tejidos podrían estar relacionada con la fuerza que domina la INM. Un estudio interesante en la retina y en el cerebro posterior de pez cebra muestra cómo en estos dos epitelios pseudoestratificados, la actina tiene un papel central en el control de la INM, sin embargo, lo hace a través de diferentes mecanismos (Yanakieva et al., 2019). En este estudio demuestran que en la retina la contracción de actomiosina que permite la migración apical está controlada por la MLCK (del inglés *myosin light-chain kinase*), mientras que en cerebro posterior la migración apical depende de la activación de miosina dependiente de ROCK. Los autores atribuyen estas diferencias entre ambos tejidos a una diferente localización de actina en ellos y a la distinta arquitectura de los tejidos (Yanakieva et al., 2019). Basándonos en este estudio y puesto que hemos demostrado que la INM en el tubo neural de pollo es dependiente de actomiosina, podría ser que, en el tubo neural de pollo, un epitelio recto, la migración apical fuera dependiente de la señalización de ROCK.

En nuestro trabajo demostramos que el citoesqueleto de actomiosina es importante en la correcta progresión de la INM, sin embargo, no podemos descartar una participación de los microtúbulos en la

INM del tubo neural de pollo. Además de la implicación de los microtúbulos en la INM en otros epitelios pseudoestratificados, existen muchas proteínas que interaccionan tanto con el citoesqueleto de actina como con el de microtúbulos por lo que sería plausible que ambos citoesqueletos actuaran de manera coordinada para dirigir la INM. Una posible pista proviene de los estudios sobre las proteínas de la envoltura nuclear con dominios SUN y dominios KASH. Se ha informado que el complejo que se forma entre las proteínas de dominio SUN y las de dominio KASH, que actúan como puente para conectar el núcleo con el citoesqueleto, interacciona no solo con el sistema de dineína (Del Bene et al., 2008; X. Zhang et al., 2009), sino también con el citoesqueleto de actina (Tapley & Starr, 2013). Esto plantea la posibilidad de que estas proteínas puedan constituir un punto de convergencia entre la actomiosina y el sistema de dineína durante la INM. Sería interesante comprobar el estado del citoesqueleto de actina en aquellos estudios donde se suprimió la expresión de las proteínas con dominios SUN (SUN1 y SUN2) y las proteínas con dominios KASH (Syne 1/2 y Nesprina 1/2) en los cuales se atribuyeron los defectos en la INM al citoesqueleto de microtúbulos (Del Bene et al., 2008; You et al., 2019; X. Zhang et al., 2009). Del mismo modo un análisis del citoesqueleto de los microtúbulos en nuestro trabajo nos aportaría información sobre la relación entre ambos citoesqueletos y la participación de ambos en la INM del tubo neural de pollo.

3. La vinculina y el ciclo celular

La INM se coordina con el avance del ciclo celular y, en función de la fase del ciclo en la que se encuentran los progenitores neurales sus núcleos adquieren distintas posiciones en el eje apicobasal del neuroepitelio. En nuestro trabajo demostramos que el silenciamiento de la vinculina provoca un descenso en el número de células que realizan la mitosis. Además, el estudio de la fase S mediante la incorporación de EdU y el análisis por citometría del contenido de ADN, nos llevó a concluir que no hay alteraciones en esta fase del ciclo celular, sin embargo, sí que observamos un retraso en el ciclo celular a partir de esta fase del ciclo. Un mayor porcentaje de células transfectadas con el shVCL presentan su contenido de ADN duplicado (4n) al mismo tiempo que no son positivas para la PH3, una fosforilación que marca el inicio de la fase M, por lo que concluimos que estas células se encuentran bloqueadas en fase G2. Estos resultados indican que tras inhibir la INM también se detiene el ciclo celular. Algo muy similar encontramos tras observar el efecto de la blebistatina en el tubo neural de pollo donde disminuye el número de mitosis. La ausencia de mitosis ectópicas y la acumulación de células en fase G2 tras la inhibición de la INM basal → apical no sigue la línea de lo observado en la mayoría de estudios sobre la relación entre la INM y el ciclo celular, en los cuales muestran que el ciclo celular progresa en ausencia de la INM (Baye & Link, 2007; H. Lee & Norden, 2013; Schenk et al., 2009; Taverna & Huttner, 2010). En estos estudios la detención de la INM tanto a través del citoesqueleto de microtúbulos como por

el citoesqueleto de actina dio lugar a mitosis lejos de la membrana apical, indicando que la progresión del ciclo celular es independiente a la INM (Ge et al., 2010; Messier, 1978; Meyer et al., 2011; Spear & Erickson, 2012a; Xie et al., 2007). A pesar de esto, nuestros resultados concuerdan con los resultados que se presentan en Norden et al., 2009, donde tras un tratamiento con blebistatina de 100 μM en retina de pez no se observaron mitosis ectópicas. Sin embargo, en el mismo laboratorio mostraron tiempo después que tras un tratamiento de blebistatina de 200 μM sí se observaron mitosis ectópicas tras detener la INM. Teniendo en cuenta que una concentración más alta aumenta la posibilidad de efectos inespecíficos, no podemos descartar que la aparición de mitosis ectópicas pueda ser debido a efectos independientes de la inhibición de miosina.

En nuestro trabajo la inhibición de la INM a través del tratamiento con blebistatina se realizó a partir de un tratamiento de blebistatina a 12.5 μM , que nos permitió alterar la INM sin afectar en la morfología del neuroepitelio o la citocinesis, donde el citoesqueleto de actina es tan importante. Es posible que estas diferencias metodológicas marquen la diferencia y que tal vez una afectación en mayor grado del citoesqueleto de actina, mediante un incremento en la concentración de blebistatina, conlleve a una deslocalización de las mitosis. También es cierto que los tratamientos con fármacos son más inespecíficos que la manipulación genética a través de un shRNA. En ese sentido la alteración más específica del citoesqueleto de actomiosina a través del shVCL demuestra la relación íntima entre el ciclo celular y la INM dependiente de actina en el tubo neural de pollo. En concordancia con nuestros resultados, también cabe destacar un estudio en corteza de ratón en el que, mediante la utilización de un shRNA, esta vez contra la proteína LIS, un componente fundamental del citoesqueleto de tubulina, la migración apical se veía alterada y sin embargo no se observaban mitosis fuera de sitio (Tsai et al., 2005).

Muchos estudios han demostrado que las detenciones del ciclo celular siempre derivan en una detención de la INM o incluso que un retraso en el ciclo celular conlleva a una adaptación de la INM a éste (Fousse et al., 2019; Kosodo et al., 2011; Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009; Ueno et al., 2006) neural progenitor cells in the ventricular zone (VZ). Además, tratamientos con citocalasina D retrasan la progresión del ciclo celular en las fases G2/M, demostrando una relación del citoesqueleto de actina con la progresión del ciclo celular (Heng & Koh, 2010; K. Lee & Song, 2007; Shrestha et al., 2018). Por otro lado, a pesar de que en el estudio de localización de la vinculina no detectamos vinculina en el núcleo de los progenitores neurales, se sabe que existe actina nuclear y que cumple diversas funciones importantes durante el ciclo celular. Existen diferentes ABPs que participan en la reparación del ADN, como el complejo Arp2/3, que, aunque se localice normalmente en el citoplasma, podemos encontrarlo también en el núcleo controlando la regulación transcripcional, la dinámica de la polimerización y la reparación del ADN (Caridi et al., 2019; Yoo et al., 2007). Teniendo en cuenta todos estos datos, tal

vez la hipótesis más plausible era pensar que el bloqueo de la INM inducido por la falta de la vinculina fuera consecuencia de un efecto directo de ésta sobre el ciclo celular. Sin embargo, aunque hay muchos estudios sobre la vinculina, no hay trabajos que relacionen su ausencia con una afectación del ciclo celular. A pesar de ello, quisimos ver si las alteraciones en el ciclo celular por la ausencia de la vinculina se reproducían en otros sistemas donde las células no realizan la INM. Nuestros resultados muestran que los estudios de falta de función de vinculina no afectan al ciclo celular en células en cultivo no polarizadas como las HEK y las HeLa por lo que probablemente el efecto sobre el ciclo celular observado tras la eliminación de la vinculina en los progenitores neurales se deba a alteraciones en la INM y no a efectos directos sobre el ciclo celular.

Es cierto que se ha observado que alteraciones en el citoesqueleto de actina provoca defectos en la citocinesis así como en la remodelación de la cromatina, formación del huso mitótico y separación de los cromosomas durante la mitosis (Downs et al., 2004; Galarneau et al., 2000; Gerhold et al., 2012; Kapoor & Shen, 2014; Shen et al., 2003; Straight et al., 2003; Woolner et al., 2008). Aunque es posible que la ausencia de la vinculina afecte a estos procesos celulares, ha sido difícil estudiar el papel de la vinculina aquí puesto que el fenotipo observado sucede antes de la fase M, sin embargo, a través de los resultados de citometría no encontramos poliploidías que pudieran indicar que la ausencia de vinculina afecte a la citocinesis.

A partir de los análisis de la posición de los centrosomas descartaríamos la implicación de la vinculina en la separación de éstos como sucede con la cortactina (W. Wang et al., 2008). Aunque es cierto que al expresar el shVCL observamos una menor internalización de los centrosomas durante G2, el hecho de que al sobreexpresar VCL-WT no haya diferencias significativas en la internalización de los centrosomas, nos lleva a concluir que la vinculina no regula la separación de los centrosomas. El hecho de que al disminuir su expresión a través del shVCL observemos una menor internalización de los centrosomas podría deberse a que las células no progresan en el ciclo celular y como consecuencia no se lleva a cabo la internalización, que se produce al final de G2, cuando el núcleo está cerca de la membrana apical.

4. Papel de la interacción vinculina/ β -catenina en el neuroepitelio

En las uniones adherentes la vinculina se une a la N-cadherina a través de su unión a la α -catenina y a la β -catenina. En este escenario, la función de la vinculina es reforzar y fortalecer la unión entre la N-cadherina y el citoesqueleto de actina. Después de observar el efecto del silenciamiento de la vinculina a través del shVCL quisimos comprobar si, como se ha visto en las uniones adherentes de cultivos celulares, la unión vinculina- β -catenina era importante para la estabilización de las uniones adherentes

del tubo neural. Para ello utilizamos un mutante ya descrito, VCL-A50I, una vinculina que no se une ni a β -catenina ni a talina, pero sí a α -catenina (Peng et al., 2010).

Aunque es cierto que en el tubo neural la vinculina se localiza tanto en la membrana apical por su unión al complejo N-cadherina/ β -catenina/ α -catenina, como en la membrana basal mediante su unión a integrinas/talina, en nuestro sistema, el silenciamiento de vinculina durante 48 horas afecta principalmente a la actina y a las proteínas de adhesión apical. Por otra parte, prácticamente no observamos alteraciones en la continuidad de la actina basal del neuroepitelio después del silenciamiento de vinculina. Un dato interesante es que los estudios de afinidad de la vinculina demuestran que la vinculina tiene una afinidad mucho mayor por las adhesiones focales que por las uniones adherentes (Bakolitsa et al., 2004). Aprovechando estos resultados, en Peng et al., 2010 utilizaron un shRNA contra la vinculina en células epiteliales en cultivo que afectaba la función de la vinculina en las adhesiones célula-célula mientras que las adhesiones célula-matriz estaban intactas, demostrando así que las uniones adherentes son más sensibles que las adhesiones focales al silenciamiento de la vinculina.

Además, nuestros resultados demuestran que, tras sobreexpresar la forma salvaje de la vinculina (VCL-WT), la actina se acumula de forma pronunciada en el dominio apical de los progenitores neurales, sin observarse acumulación alguna de nueva actina en el dominio basal. Curiosamente, la sobreexpresión del mutante VCL-A50I no es capaz de reproducir dicha acumulación de actina, por lo que empezamos a considerar que la unión directa entre la vinculina y la β -catenina es importante para el papel de la vinculina en el complejo apical de los progenitores del tubo neural. Estos resultados se confirmaron con los experimentos de rescate. Aquí, una vez más, cuando la VCL-WT era capaz de rescatar tanto los defectos en la INM como los defectos en el ciclo celular, incluyendo el descenso en el porcentaje de mitosis y la acumulación de las células en fase G2 producidos por el shVCL, el mutante VCL-A50I no era capaz de rescatar dicho fenotipo. Poniendo todos estos resultados en conjunto, podemos considerar que la función de la vinculina en el tubo neural de pollo regulando la INM y el ciclo celular de los progenitores neurales depende de su unión a la β -catenina.

Han pasado más de 85 años desde que se acuñó el término de INM, y desde entonces la comprensión sobre este proceso ha aumentado enormemente. Se han identificado diferentes moléculas que afectan a la INM. Sin embargo, el mecanismo de cómo estos componentes trabajan juntos para mantener la homeostasis del tejido; las fuerzas que dirigen estos movimientos; la relación con el ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular; el mantenimiento de la morfología del tejido; así como las diferencias comparativas entre especies y tejidos, son aspectos que quedan aún por desentrañar, por lo que habrá que seguir trabajando en alcanzar un entendimiento más claro de esta migración nuclear.

D

CONCLUSIONES

C



Conclusiones

- La vinculina se localiza mayoritariamente en las membranas apical y basal del tubo neural de pollo, aunque también está presente en el citoplasma de los progenitores neurales.
- El silenciamiento de la vinculina causa alteraciones en la distribución del citoesqueleto de actina y de las proteínas del complejo apical, que consecuentemente provocan la desestructuración del neuroepitelio.
- El citoesqueleto de actina regula la migración nuclear intercinética (INM) en el tubo neural de pollo.
- La vinculina regula la migración apical de la INM en el tubo neural de pollo.
- El silenciamiento de la vinculina provoca un retraso en el ciclo celular en células polarizadas, con una acumulación de células en la fase G2.
- La vinculina tiene un papel en la INM y el ciclo celular a través de su interacción con las proteínas de adhesión.

REFERENCIAS

R



R

Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1996). Loss of Occludin and Functional Tight Junctions, but Not ZO-1, during Neural Tube Closure—Remodeling of the Neuroepithelium Prior to Neurogenesis. *Developmental Biology*, 180(2), 664–679.

Abraham, Z., Hawley, E., Hayosh, D., Webster-Wood, V. A., & Akkus, O. (2018). Kinesin and Dynein Mechanics: Measurement Methods and Research Applications. *Journal of Biomechanical Engineering*, 140(2), 1–11.

Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2008). Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 309–322.

Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2019). Microtubule minus-end regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, 132(11), 1–7.

Alatortsev, V. E., Kramerova, I. A., Frolov, M. V., Lavrov, S. A., & Westphal, E. D. (1997). Vinculin gene is non-essential in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 413(2), 197–201.

Alberts, B. (2016). *Biología molecular de la célula* (6a). Omega.

Alieva, I. B., & Uzbekov, R. E. (2008). The centrosome is a polyfunctional multiprotein cell complex. *Biochemistry (Moscow)*, 73(6), 626–643.

Andrin, C., McDonald, D., Attwood, K. M., Rodrigue, A., Ghosh, S., Mirzayans, R., Masson, J. Y., Dellaire, G., & Hendzel, M. J. (2012). A requirement for polymerized actin in DNA double-strand break repair. *Nucleus (United States)*, 3(4), 384–395.

Arai, Y., & Taverna, E. (2017). Neural progenitor cell polarity and cortical development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(December), 1–11.

Bachir, A. I., Horwitz, A. R., Nelson, W. J., & Bianchini, J. M. (2017). Actin-based adhesion modules mediate cell interactions with the extracellular matrix and neighboring cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7).

Baffet, A. D., Hu, D. J., & Vallee, R. B. (2015). Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, 33(6), 703–716.

Bakolitsa, C., Cohen, D. M., Bankston, L. A., Bobkov, A. A., Dadwell, G. W., Jennings, L., Crithcley, D. R., Craig, S. W., & Liddington, R. C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*, 430(6999), 583–586.

Barbelanne, M., & Tsang, W. Y. (2014). Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *BioMed Research International*, 2014.

Barry, A. K., Tabdili, H., Muhamed, I., Wu, J., Shashikanth, N., Gomez, G. A., Yap, A. S., Gottardi, C. J., De Rooij, J., Wang, N., & Leckband, D. E. (2014). α -Catenin cytomechanics - role in cadherin-dependent adhesion and mechanotransduction. *Journal of Cell Science*, 127(8), 1779–1791.

Barstead, R. J., & Waterston, R. H. (1989). The basal component of the nematode dense-body is vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 10177–10185.

Barstead, R. J., & Waterston, R. H. (1991). Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *Journal of Cell Biology*, 114(4), 715–724.

Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A., & Raff, J. W. (2006). Flies without Centrioles. *Cell*, 125(7), 1375–1386.

Baye, L. M., & Link, B. A. (2007). Nuclear migration during retinal development. *Brain Research*, 1192, 29–36.

Bays, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2999–3009.

Bays, J. L., Peng, X., Tolbert, C. E., Guilluy, C., Angell, A. E., Pan, Y., Superfine, R., Burridge, K., & DeMali, K. A. (2014). Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions. *Journal of Cell Biology*, 205(2), 251–263.

Belin, B. J., Lee, T., & Mullins, R. D. (2015). DNA damage induces nuclear actin filament assembly by formin-2 and spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *ELife*, 4(AUGUST2015), 1–21.

Berrier, A., & Yamada, K. M. (2007). Cell–matrix adhesion. *Journal Cellular Physiology*, 213, 565–573.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263.

Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., & Janke, C. (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 29(10), 804–819.

Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Barbera, J. P. M., & Zaret, K. S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology*, 290(1), 44–56.

Briscoe, J., & Small, S. (2015). Morphogen rules: Design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development (Cambridge)*, 142(23), 3996–4009.

Brouhard, G. J., & Rice, L. M. (2018). Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 451–463.

Cappello, S., Monzo, P., & Vallee, R. B. (2011). NudC is required for interkinetic nuclear migration and neuronal migration during neocortical development. *Developmental Biology*, 357(2), 326–335.

Caridi, C. P., Plessner, M., Grosse, R., & Chiolo, I. (2019). Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics. *Nature Cell Biology*, 21(9), 1068–1077.

Carisey, A., & Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *European Journal of Cell Biology*, 90(2–3), 157–163.

Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A. M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., & Ballestrem, C. (2013). Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Current Biology*, 23(4), 271–281.

Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E. S., Fuller, M. T., Echard, A., & Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *Journal of Cell Biology*, 180(4), 739–746.

Castano, E., Philimonenko, V. V., Kahle, M., Fukalová, J., Kalendová, A., Yildirim, S., Dzijak, R., Dingová-Krásna, H., & Hozák, P. (2010). Actin complexes in the cell nucleus: New stones in an old field. *Histochemistry and Cell Biology*, 133(6), 607–626.

Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J., & Marti, E. (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development*, 133(3), 517–528.

Chalut, K. J., & Paluch, E. K. (2016). The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Developmental Cell*, 38(6), 571–573.

Chandrasekar, I., Stradal, T. E. B., Holt, M. R., Entschladen, F., Jockusch, B. M., & Ziegler, W. H. (2005). Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *Journal of Cell Science*, 118(7), 1461–1472.

Chen, H., Choudhury, D. M., & Craig, S. W. (2006). Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40389–40398.

Chen, H., Cohen, D. M., Choudhury, D. M., Kioka, N., & Craig, S. W. (2005). Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 459–470.

Chervin-Pétinot, A., Courçon, M., Almagro, S., Nicolas, A., Grichine, A., Grunwald, D., Prandini, M. H., Huber, P., & Gulino-Debrac, D. (2012). Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) interacts with α -catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7556–7572.

Chou, F. S., Li, R., & Wang, P. S. (2018). Molecular components and polarity of radial glial cells during cerebral cortex development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(6), 1027–1041.

Chou, F., & Wang, P. (2016). The Arp2/3 complex is essential at multiple stages of neural development. *Neurogenesis*, 3(1), e1261653.

Clark, T. G., & Merriam, R. W. (1977). Diffusible and bound actin in nuclei of xenopus laevis oocytes. *Cell*, 12(4), 883–891.

Clarson, B. M. (2019). *Embriología humana y biología del desarrollo* (6a). Elsevier.

Cohen, D. M., Chen, H., Johnson, R. P., Choudhury, B., & Craig, S. W. (2005). Two distinct head-tail interfaces cooperate to suppress activation of vinculin by talin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17109–17117.

Cohen, D. M., Kutscher, B., Chen, H., Murphy, D. B., & Craig, S. W. (2006). A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 16006–16015.

Conway, J. R. W., & Jacquemet, G. (2019). Cell matrix adhesion in cell migration. *Essays in Biochemistry*, 63(5), 535–551.

Coutu, M. D., & Craig, S. W. (1988). c-DNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Cell Biology*, 85(November), 8535–8539.

Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: Complex roles at the cell surface. *Cell*, 100(6), 603–606.

Darnell, D., & Gilbert, S. F. (2017). *Neuroembryology*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol., 6(1), 41–50.

Das, R. M., & Storey, K. G. (2012). Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube. *EMBO Reports*, 13(5), 448–454.

Das, R. M., & Storey, K. G. (2014). Apical abscission, a novel cell biological mechanism regulating neurogenesis. *Neurogenesis*, 1(1), e29555-1-e29555-4.

Das, R. M., Wilcock, A. C., Swedlow, J. R., & Storey, K. G. (2012). High-resolution live imaging of cell behavior in the developing neuroepithelium. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 4–7.

Del Bene, F., Wehman, A. M., Link, B. A., & Baier, H. (2008). Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell*, 134(6), 1055–1065.

DeMali, K. A., Barlow, C. A., & Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: Coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *Journal of Cell Biology*, 159(5), 881–891.

Diez del Corral, R., & Morales, A. V. (2014). Retinoic acid signaling during early spinal cord development. *Journal of Developmental Biology*, 2(3), 174–197.

Diez del Corral, R., & Morales, A. V. (2017). The multiple roles of FGF signaling in the developing spinal cord. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(JUN), 1–18.

Dion, V., Shimada, K., & Gasser, S. M. (2010). Actin-related proteins in the nucleus: Life beyond chromatin remodelers. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3), 383–391.

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., & Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell*, 16(6), 979–990.

Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(9), 688–698.

Dráber, P., Sulimenko, V., & Dráberová, E. (2012). Cytoskeleton in mast cell signaling. *Frontiers in Immunology*, 3(130).

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005). α -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123(5), 903–915.

Dumbauld, D. W., & García, A. J. (2014). A helping hand: How vinculin contributes to cell-matrix and cell-cell force transfer. *Cell Adhesion and Migration*, 8(6), 550–557.

Dzhindzhev, N. S., Yu, Q. D., Weiskopf, K., Tzolovsky, G., Cunha-Ferreira, I., Riparbelli, M., Rodrigues-Martins, A., Bettencourt-Dias, M., Callaini, G., & Glover, D. M. (2010). Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly. *Nature*, 467(7316), 714–718.

El Sayegh, T. Y., Arora, P. D., Laschinger, C. A., Lee, W., Morrison, C., Overall, C. M., Kapus, A., & McCulloch, C. A. G. (2004). Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 117(21), 5117–5131.

Fernandez, J. L. R., Geiger, B., Salomon, D., Sabanay, I., Zoller, M., & Ben-Ze'ev, A. (1992). Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *Journal of Cell Biology*, 119(2), 427–438.

Flores-Ruiz, E., Miranda-Novales, M. G., & Villasís-Keever, M. Á. (2017). El protocolo de investigación VI: cómo elegir la prueba estadística adecuada. *Estadística inferencial. Revista Alergia México*, 64(3), 364.

Fousse, J., Gautier, E., Patti, D., & Dehay, C. (2019). Developmental changes in interkinetic nuclear migration dynamics with respect to cell-cycle progression in the mouse cerebral cortex ventricular zone. *Journal of Comparative Neurology*, 527(10), 1545–1557.

Franco, S. J., & Müller, U. (2012). ECM Functions During Neuronal Migration and Lamination in the Mammalian Central Nervous System. *J. Glaucoma.*, 71(11), 889–900.

Fujita, S. (1962). Kinetics of cellular proliferation. *Experimental Cell Research*, 28(1), 52–60.

Gagnoux-Palacios, L., Awina, H., Audebert, S., Rossin, A., Mondin, M., Borgese, F., Planas-Botey, C., Mettouchi, A., Borg, J. P., & Hueber, A. O. (2018). Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial Fas cell death receptor signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(11), 3839–3852.

Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A. A., Zhang, Y., Héliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Stillman, D. J., & Côté, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Molecular Cell*, 5(6), 927–937.

Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., & Mostov, K. (2006). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 8(9), 963–970.

Ge, X., Frank, C. L., Calderon de Anda, F., & Tsai, L. H. (2010). Hook3 Interacts with PCM1 to Regulate Pericentriolar Material Assembly and the Timing of Neurogenesis. *Neuron*, 65(2), 191–203.

Geiger, B. (1979). A 130K Protein from Chicken Gizzard : Its Localization at the Termini of Microfilament Bundles in Cultured Chicken Cells. *Cell*, 18(1), 193–205.

Geiger, B., Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., & Singer, S. J. (1980). Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7 II), 4127–4131.

Gerhold, C. B., Winkler, D. D., Lakomek, K., Seifert, F. U., Fenn, S., Kessler, B., Witte, G., Luger, K., & Hopfner, K. P. (2012). Structure of Actin-related protein 8 and its contribution to nucleosome binding. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 11036–11046.

Ghosh, A., Enderlein, J., & Butkevich, E. (2020). Dimerization of Human Drebrin-like Protein Governs Its Biological Activity. *Biochemistry*.

Giannone, G. (2015). Super-resolution links vinculin localization to function in focal adhesions. *Nature Cell Biology*, 17(7), 845–847.

Gieni, R. S., & Hendzel, M. J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: Moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 283–306.

Gil-Sanz, C., Landeira, B., Ramos, C., Costa, M. R., & Müller, U. (2014). Proliferative defects and formation of a double cortex in mice lacking Mltt4 and Cdh2 in the dorsal telencephalon. *Journal of Neuroscience*, 34(32), 10475–10487.

Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo* (7th ed.). Panamericana.

Gillingham, A. K., & Munro, S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Reports*, 1(6), 524–529.

Girós, A., Morante, J., Gil-Sanz, C., Fairén, A., & Costell, M. (2007). Perlecan controls neurogenesis in the developing telencephalon. *BMC Developmental Biology*, 7, 1–17.

Golji, J., Wendorff, T., & Mofrad, M. R. K. (2012). Phosphorylation primes vinculin for activation. *Biophysical Journal*, 102(9), 2022–2030.

Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). *Microtubules and Microtubule-Associated Proteins*. 10.

Grosse, A. S., Pressprich, M. F., Curley, L. B., Hamilton, K. L., Margolis, B., Hildebrand, J. D., & Gumucio, D. L. (2011). Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: Implications for intestinal growth and morphogenesis. *Development*, 138(20), 4423–4432.

Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis - Anoikis.” *Apoptosis*, 7(3), 247–260.

Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development*, 20(23), 3199–3214.

Hamburger, V., & Hamilton, H. (1951). A series of Normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1).

Hartman, M. A., & Spudich, J. A. (2012). The myosin superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(7), 1627–1632.

Haubst, N., Georges-Labouesse, E., De Arcangelis, A., Mayer, U., & Götz, M. (2006). Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Development*, 133(16), 3245–3254.

Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Paterson, A. D., Verma, S., Ali, R. G., Fanning, A. S., Weed, S. A., & Yap, A. S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *Journal of Cell Biology*, 164(6), 899–910.

Heng, Y. W., & Koh, C. G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(10), 1622–1633.

Herrera, A., Saade, M., Menendez, A., Marti, E., & Pons, S. (2014). Sustained Wnt/ β -catenin signalling causes neuroepithelial aberrations through the accumulation of aPKC at the apical pole. *Nature Communications*, 5(May), 1–13.

Higginbotham, H. R., & Gleeson, J. G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends in Neurosciences*, 30(6), 276–283.

Hofmann, C., Obermeier, F., Artinger, M., Hausmann, M., Falk, W., Schoelmerich, J., Rogler, G., & Grossmann, J. (2007). Cell-Cell Contacts Prevent Anoikis in Primary Human Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology*, 132(2), 587–600.

Hu, D. J. K., Baffet, A. D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., & Vallee, R. B. (2013). Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell*, 154(6), 1300.

Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J., & Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *Journal of Cell Biology*, 179(5), 1043–1057.

Hurst, V., Shimada, K., & Gasser, S. M. (2019). Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair. *Trends in Cell Biology*, 29(6), 462–476.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11–25.

Inoue, S., Hayashi, K., Fujita, K., Tagawa, K., Okazawa, H., Kubo, K. I., & Nakajima, K. (2019). Drebrin-like (Dbrn1) controls neuronal migration via regulating N-cadherin expression in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 39(4), 678–691.

Iwasaki, T., Murata-Hori, M., Ishitobi, S., & Hosoya, H. (2001). Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells. *Cell Structure and Function*, 26(6), 677–683.

Izard, T., Evans, G., Borgon, R. A., Rush, C. L., Bricogne, G., & Bois, P. R. J. (2004). Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature*, 427(6970), 171–175.

Jamora, C., & Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, 4(4), 101–108.

Jannie, K. M., Ellerbroek, S. M., Zhou, D. W., Chen, S., Crompton, D. J., García, A. J., & DeMali, K. A. (2015). Vinculin-dependent actin bundling regulates cell migration and traction forces. *Biochemical Journal*, 465, 383–393.

Janssen, M. E. W., Kim, E., Liu, H., Fujimoto, L. M., Bobkov, A., Volkmann, N., & Hanein, D. (2006). Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Molecular Cell*, 21(2), 271–281.

Jinguji, Y., & Ishikawa, H. (1992). Electron Microscopic Observations on the Maintenance of the Tight Junction during Cell Division in the Epithelium of the Mouse Small Intestine. *Cell Structure and Function*, 17(1), 27–37.

Jockusch, B. M., Schoenenberger, C. A., Stetefeld, J., & Aebi, U. (2006). Tracking down the different forms of nuclear actin. *Trends in Cell Biology*, 16(8), 391–396.

Joo, E., Surka, M. C., & Trimble, W. S. (2007). Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Non-muscle Myosin II and Its Kinases. *Developmental Cell*, 13(5), 677–690.

Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., & Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*, 304(1), 22–33.

Kaji, N., Muramoto, A., & Mizuno, K. (2008). LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4983–4992.

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323), 580–584.

Kaneda, R., Saeki, Y., Getachew, D., Matsumoto, A., Furuya, M., & Ogawa, N. (2018). Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo: Possible implications for tracheo-esophageal anomalies. *Congenit Anom (Kyoto)*, 58(2), 62–70.

Kannan, N., & Tang, V. W. (2015). Synaptopodin couples epithelial contractility to α -actinin-4-dependent junction maturation. *Journal of Cell Biology*, 211(2), 407–434.

Kant Singh, R., Kumar, S., Singh Tomar, M., Kumar Verma, P., Pratap Singh, S., Kumar, A., Kumar Gautam, P., & Acharya, A. (2018). PKC α : regulation and implication for cellular transformation PKC- α . 1(2), 42–45.

Kapoor, P., & Shen, X. (2014). Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends in Cell Biology*, 24(4), 238–246.

Karfunkel, P. (1972). The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. *Journal of Experimental Zoology*, 181(3), 289–301.

Kasioulis, I., Das, R. M., & Storey, K. G. (2017). Inter-dependent apical microtubule and actin dynamics orchestrate centrosome retention and neuronal delamination. *ELife*, 6, 1–31.

Kasioulis, I., & Storey, K. G. (2018). Cell biological mechanisms regulating chick neurogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1–3), 163–171.

Kengaku, M. (2018). Cytoskeletal control of nuclear migration in neurons and non-neuronal cells. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 94(9), 337–349.

Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Pérez Valle, H., Lovell-Badge, R., Episkopoi, V., & Briscoe, J. (2014). Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Neural Development*, 345(6204).

Kita, A. M., Swider, Z. T., Erofeev, I., Halloran, M. C., Goryachev, A. B., & Bement, W. M. (2019). Spindle-F-actin interactions in mitotic spindles in an intact vertebrate epithelium. *Molecular Biology of the Cell*, 30(14), 1645–1654.

Klages-Mundt, N. L., Kumar, A., Zhang, Y., Kapoor, P., & Shen, X. (2018). The Nature of Actin-Family Proteins in Chromatin-Modifying Complexes. *Frontiers in Genetics*, 9(September), 1–16.

Kosodo, Y. (2012). Interkinetic nuclear migration: Beyond a hallmark of neurogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(16), 2727–2738.

Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S. A., Kimura, A., & Matsuzaki, F. (2011). Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *EMBO Journal*, 30(9), 1690–1704.

Kunda, P., Pelling, A. E., Liu, T., & Baum, B. (2008). Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis. *Current Biology*, 18(2), 91–101.

Lane, N. J. (1969). Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *The Journal of Cell Biology*, 40(1), 286–291. <https://doi.org/10.1083/jcb.40.1.286>

Lange, C., Huttner, W. B., & Calegari, F. (2009). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. *Cell Stem Cell*, 5(3), 320–331.

Langman, J., Guerrant, R. L., & Freeman, B. G. (1966). Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *Journal of Comparative Neurology*, 127(3), 399–411.

Latasa, M. J., Cisneros, E., & Frade, J. M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 53(7), 895–908.

Le Dréau, G., & Martí, E. (2012). Dorsal-ventral patterning of the neural tube: A tale of three signals. *Developmental Neurobiology*, 72(12), 1471–1481.

Lee, H., & Norden, C. (2013). Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. *Trends in Cell Biology*, 23(3), 141–150.

Lee, J. H., Rangarajan, E. S., Yogesha, S. D., & Izard, T. (2009). Raver1 Interactions with Vinculin and RNA Suggest a Feed-Forward Pathway in Directing mRNA to Focal Adhesions. *Structure*, 17(6), 833–842.

Lee, K., & Song, K. (2007). Actin dysfunction activates ERK1/2 and delays entry into mitosis in mammalian cells. *Cell Cycle*, 6(12), 1486–1494.

Lee, S. W., & Otto, J. J. (1997). Vinculin and talin: Kinetics of entry and exit from the cytoskeletal pool. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 36(2), 101–111.

Lee, Y. J., & Keng, P. C. (2005). Studying the effects of actin cytoskeletal destabilization on cell cycle by cofilin overexpression. *Molecular Biotechnology*, 31(1), 1–10.

Leerberg, J. M., Gomez, G. A., Verma, S., Moussa, E. J., Wu, S. K., Priya, R., Hoffman, B. D., Grashoff, C., Schwartz, M. A., & Yap, A. S. (2014). Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Current Biology*, 24(15), 1689–1699.

Leung, L., Klopper, A. V., Grill, S. W., Harris, W. A., & Norden, C. (2011). Apical migration of nuclei during G2 is a prerequisite for all nuclear motion in zebrafish neuroepithelia. *Development (Cambridge)*, 139(14), 2635.

Li, T., Guo, H., Song, Y., Zhao, X., Shi, Y., Lu, Y., Hu, S., Nie, Y., Fan, D., & Wu, K. (2014). Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–15.

Lian, G., & Sheen, V. L. (2015). Cytoskeletal proteins in cortical development and disease: Actin associated proteins in periventricular heterotopia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(APR), 1–13.

Lien, W. (2006). α -E-Catenin controls cerebral cortical size by regulating the Hedgehog signaling pathway. *Science*, 311(2006), 1609–1612.

Lifshitz-Mercer, B., Czernobilsky, B., Feldberg, E., & Geiger, B. (1997). Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: Relationship to invasiveness and metastatic potential. *Human Pathology*, 28(11), 1230–1236.

Lock, J. G., Wehrle-Haller, B., & Strömblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes: Master control machinery of cell migration. *Seminars in Cancer Biology*, 18(1), 65–76.

Long, K. R., & Huttner, W. B. (2019). How the extracellular matrix shapes neural development. *Open Biology*, 9(1).

Long, K. R., Moss, L., Laursen, L., Boulter, L., & Ffrench-Constant, C. (2016). Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via Wnt7a and Decorin. *Nature Communications*, 7(May 2015), 1–14.

Luo, N., Li, H., Xiang, B., Qiao, L., He, J., Ji, Y., Liu, Y., Li, S., Lu, R., Li, Y., Meng, W., Wu, Y., Xu, H., & Mo, X. (2016). Syndecan-4 modulates the proliferation of neural cells and the formation of CaP axons during zebrafish embryonic neurogenesis. *Scientific Reports*, 6(June 2015), 1–12.

Maartens, A. P., Wellmann, J., Wictome, E., Klapholz, B., Green, H., & Brown, N. H. (2016). *Drosophila* vinculin is more harmful when hyperactive than absent, and can circumvent integrin to form adhesion complexes. *Journal of Cell Science*, 129(23), 4354–4365.

Machon, O., Van Den Bout, C. J., Backman, M., Kemler, R., & Krauss, S. (2003). Role of β -catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience*, 122(1), 129–143.

Marthiens, V., & Ffrench-Constant, C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Reports*, 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), 383–397.

Maupin, P., & Pollard, T. D. (1986). Arrangement of actin filaments and myosin-like filaments in the contractile ring and of actin-like filaments in the mitotic spindle of dividing HeLa cells. *Journal of Ultrastructure Research and Molecular Structure Research*, 94(1), 92–103.

McEver, R. P., & Luscinskas, F. W. (2018). Cell Adhesion. In *Hematology: Basic Principles and Practice* (Seventh Ed). Elsevier Inc.

Meagher, R. B., Kandasamy, M. K., McKinney, E. C., & Roy, E. (2009). Chapter 5 Nuclear Actin-Related Proteins in Epigenetic Control. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 277, Issue C). Elsevier Inc.

Messier, P. (1978). Microtubules, interkinetic nuclear migration and neurulation. *Developmental Biology*, 2(3), 377–389.

Messier, P., & Auclair, C. (1974). Effect of cytochalasin B on interkinetic nuclear migration in the chick embryo. *Developmental Biology*, 36(1), 218–223.

Messier, P. E., & Auclair, C. (1973). Inhibition of nuclear migration in the absence of microtubules in the chick embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30(3), 661–671.

Meyer, E. J., Ikmi, A., & Gibson, M. C. (2011). Interkinetic nuclear migration is a broadly conserved feature of cell division in pseudostratified epithelia. *Current Biology*, 21(6), 485–491.

Miller, A. L., & Bement, W. M. (2009). Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux. *Nature Cell Biology*, 11(1), 71–77.

Minobe, S., Sakakibara, A., Ohdachi, T., Kanda, R., Kimura, M., Nakatani, S., Tadokoro, R., Ochiai, W., Nishizawa, Y., Mizoguchi, A., Kawauchi, T., & Miyata, T. (2009). Rac is involved in the interkinetic nuclear migration of cortical progenitor cells. *Neuroscience Research*, 63(4), 294–301.

Miralles, F., & Visa, N. (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(3), 261–266.

Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., Hosoya, H., & Yonemura, S. (2006). Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Experimental Cell Research*, 312(9), 1637–1650.

Miyata, T. (2008). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular “community.” *Development Growth and Differentiation*, 50.

Möhl, C., Kirchgeßner, N., Schäfer, C., Küpper, K., Born, S., Diez, G., Goldmann, W. H., Merkel, R., & Hoffmann, B. (2009). Becoming stable and strong: The interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(6), 350–364.

Molina, A., & Pituello, F. (2017). Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology*, 432(1), 14–23.

Moore, H. M., & Vartiainen, M. K. (2017). F-actin organizes the nucleus. *Nature Cell Biology*, 19(12), 1386–1388.

Mooren, O. L., Galletta, B. J., & Cooper, J. A. (2012). Roles for Actin Assembly in Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 661–686.

Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle. Principles of control.* Oxford.

Moulding, D. A., Blundell, M. P., Spiller, D. G., White, M. R. H., Cory, G. O., Calle, Y., Kempinski, H., Sinclair, J., Ancliff, P. J., Kinnon, C., Jones, G. E., & Thrasher, A. J. (2007). Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2213–2224.

Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J., & Frade, J. M. (2002). Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(2), 285–300.

Muroyama, A., & Lechler, T. (2017). Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development (Cambridge)*, 144(17), 3012–3021.

Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., & Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev*, 16(5), 548–553.

Neurocirugíacontemporánea.com. (2019). Neurocirugía contemporánea. http://www.neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=placa_neural

Nigg, E. A., & Holland, A. J. (2018). Once and only once: Mechanisms of centriole duplication and their deregulation in diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 297–312.

Norden, C. (2017). Pseudostratified epithelia - cell biology, diversity and roles in organ formation at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(11), 1859–1863.

Norden, C., Young, S., Link, B. A., & Harris, W. A. (2009). Actomyosin Is the Main Driver of Interkinetic Nuclear Migration in the Retina. *Cell*, 138(6), 1195–1208.

Nürnberg, A., Kitzing, T., & Grosse, R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nature Reviews Cancer*, 11(3), 117–187.

Ogiwara, H., Ui, A., Kawashima, S., Kugou, K., Onoda, F., Iwahashi, H., Harata, M., Ohta, K., Enomoto, T., & Seki, M. (2007). Actin-related protein Arp4 functions in kinetochore assembly. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3109–3117.

Olson, M. F., Ashworth, A., & Hall, A. (2016). An Essential Role for Rho , Rac , and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression Through G1. *Science*, 269(5228), 1270–1272.

Oma, Y., & Harata, M. (2011). Actin-related proteins localized in the nucleus: From discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus*, 2(1), 38–46. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.1.14510>

Pal, I., Rajesh, Y., Banik, P., Dey, G., Dey, K. K., Bharti, R., Naskar, D., Chakraborty, S., Ghosh, S. K., Das, S. K., Emdad, L., Kundu, S. C., Fisher, P. B., & Mandal, M. (2019). Prevention of epithelial to mesenchymal transition in colorectal carcinoma by regulation of the E-cadherin- β -catenin-vinculin axis. *Cancer Letters*, 452(January), 254–263.

Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*, 15(4), 351–364.

Peng, X., Cuff, L. E., Lawton, C. D., & DeMali, K. A. (2010). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to β -catenin. *Journal of Cell Science*, 123(4), 567–577.

Peng, X., Maier, J. L., Choudhury, D., Craig, S. W., & DeMali, K. A. (2012). α -Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7728–7737.

Percipalle, P., & Vartiainen, M. (2019). Cytoskeletal proteins in the cell nucleus: A special nuclear actin perspective. *Molecular Biology of the Cell*, 30(15), 1781–1785.

Perissinotto, D., Iacopetti, P., Bellina, I., Doliana, R., Colombatti, A., Pettway, Z., Bronner-Fraser, M., Shinomura, T., Kimata, K., Mörgelein, M., Löfberg, J., & Perris, R. (2000). Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. *Development*, 127(13), 2823–2842.

Piekny, A. J., & Glotzer, M. (2008). Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Current Biology*, 18(1), 30–36.

Pilaz, L. J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R. J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., Kennedy, H., & Dehay, C. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21924–21929.

Pokutta, S., & Weis, W. I. (2000). Structure of the dimerization and β -catenin-binding region of α -catenin. *Molecular Cell*, 5(3), 533–543.

Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(8), 1–18.

Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957), 1208–1212.

Portier, N., Audhya, A., Maddox, P. S., Green, R. A., Dammermann, A., Desai, A., & Oegema, K. (2007). A Microtubule-Independent Role for Centrosomes and Aurora A in Nuclear Envelope Breakdown. *Developmental Cell*, 12(4), 515–529.

Price, G. J., Jones, P., Davison, M. D., Patel, B., Bendori, R., Geiger, B., & Critchley, D. R. (1989). Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochemical Journal*, 259(2), 453–461.

Priya, R., & Yap, A. S. (2015). Active tension: The role of cadherin adhesion and signaling in generating junctional contractility. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 112). Elsevier Inc.

Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P., & Golemis, E. A. (2007). HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell*, 129(7), 1351–1363.

Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M., & Hynes, R. O. (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology*, 181(1), 64–78.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, 145(1), 61–83.

Reynolds, A. B., & Carnahan, R. H. (2004). Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: Implications in disease and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(6 SPEC. ISS.), 657–663.

Roffers-Agarwal, J., Xanthos, J. B., Kragtorp, K. A., & Miller, J. R. (2008). Enabled (Xena) regulates neural plate morphogenesis, apical constriction, and cellular adhesion required for neural tube closure in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 314(2), 393–403.

Rosenblatt, J., Cramer, L. P., Baum, B., & McGee, K. M. (2004). Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell*, 117(3), 361–372.

Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468(7321), 214–222.

Rujano, M. A., Sanchez-Pulido, L., Pannetier, C., Le Dez, G., & Basto, R. (2013). The microcephaly protein Asp regulates neuroepithelium morphogenesis by controlling the spatial distribution of myosin II. *Nature Cell Biology*, 15(11), 1294–1306.

Saade, M., Blanco-Ameijeiras, J., Gonzalez-Gobartt, E., & Martí, E. (2018). A centrosomal view of CNS growth. *Development (Cambridge, England)*, 145(21).

Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S., & Martí, E. (2017). Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nature Cell Biology*, 19(5), 493–503.

Sadler, T. W. (2005). Embryology of neural tube development. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 135 C(1), 2–8.

Sagner, A., & Briscoe, J. (2019). Establishing neuronal diversity in the spinal cord: A time and a place. *Development (Cambridge)*, 146(22).

Sanger, J. W., Sanger, J. M., Kreis, T. E., & Jockusch, B. M. (1980). Reversible translocation of cytoplasmic actin into the nucleus caused by dimethyl sulfoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(9 II), 5268–5272.

Sauer, F. (1935). Mitosis in the neural tube. *Journal of Comparative Neurology*, 62(2), 377–405.

Sauer, M., & Chittenden, A. (1959). Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo: Evidence for intermitotic migration of nuclei. *Experimental Cell Research*, 16(1), 1–6.

Sauer, M., & Walker, B. (1959). Radioautographic Study of Interkinetic Nuclear Migration in the Neural Tube. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 101(3), 557–560.

Saunders, R. M., Holt, M. R., Jennings, L., Sutton, D. H., Barsukov, I. L., Bobkov, A., Liddington, R. C., Adamson, E. A., Dunn, G. A., & Critchley, D. R. (2006). Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *European Journal of Cell Biology*, 85(6), 487–500.

Schaper, A. (1897). The earliest differentiation in the central nervous system of vertebrates. *Science*, 5, 430–433.

Schenk, J., Wilsch-Bräuninger, M., Calegari, F., & Huttner, W. B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16487–16492.

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82(7–8), 518–529.

Schmid, M. T., Weinandy, F., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W. B., Cappello, S., & Götz, M. (2014). The role of α -E-catenin in cerebral cortex development: Radial glia specific effect on neuronal migration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG), 1–10.

Schrank, B. R., Aparicio, T., Li, Y., Chang, W., Chait, B. T., Gundersen, G. G., Gottesman, M. E., & Gautier, J. (2018). Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature*, 559(7712), 61–66.

Sheikh, F., Chen, Y., Liang, X., Hirschy, A., Stenbit, A. E., Gu, Y., Dalton, N. D., Yajima, T., Lu, Y., Knowlton, K. U., Peterson, K. L., Perriard, J. C., & Chen, J. (2006). α -E-catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture. *Circulation*, 114(10), 1046–1055.

Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., & Wu, C. (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Molecular Cell*, 12(1), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00264-8)

Shrestha, D., Choi, D., & Song, K. (2018). Actin dysfunction induces cell cycle delay at G2/M with sustained ERK and RSK activation in IMR-90 normal human fibroblasts. *Molecules and Cells*, 41(5), 436–443.

Sidman, R. L., Miale, I. L., & Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental Neurology*, 1(4), 322–333.

Singh, S., & Solecki, D. J. (2015). Polarity transitions during neurogenesis and germinal zone exit in the developing central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(March), 1–8.

Sit, S. T., & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 124(5), 679–683.

Spear, P. C., & Erickson, C. A. (2012a). Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Developmental Biology*, 370(1), 33–41.

Spear, P. C., & Erickson, C. A. (2012b). Interkinetic nuclear migration: A mysterious process in search of a function. *Development Growth and Differentiation*, 54(3), 306–316.

Stepniak, E., Radice, G. L., & Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5).

Stocker, A., & Chenn, A. (2009). Focal reduction of α E-catenin causes premature differentiation and reduction of β -catenin signaling during cortical development. *Developmental Biology*, 328(1), 66–77.

Stocker, A., & Chenn, A. (2015). The role of adherens junctions in the developing neocortex. *Cell Adhesion and Migration*, 9(3), 167–174.

Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., & Mitchison, T. J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*, 299(5613), 1743–1747.

Strzyz, P. J., Lee, H. O., Sidhaye, J., Weber, I. P., Leung, L. C., & Norden, C. (2015). Interkinetic Nuclear Migration Is Centrosome Independent and Ensures Apical Cell Division to Maintain Tissue Integrity. *Developmental Cell*, 32(2), 203–219.

Svitkina, T. (2018). The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), 1–21.

Tapley, E., & Starr, D. (2013). Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*, 25(1), 57–62.

Taverna, E., & Huttner, W. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*, 67(6), 906–914.

Teixidó-Travesa, N., Roig, J., & Lüders, J. (2012). The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *Journal of Cell Science*, 125(19), 4445–4456.

Thievensen, I., Fakhri, N., Steinwachs, J., Kraus, V., Mclsaac, R. S., Gao, L., Chen, B. C., Baird, M. A., Davidson, M. W., Betzig, E., Oldenbourg, R., Waterman, C. M., & Fabry, B. (2015). Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3D collagen. *FASEB Journal*, 29(11), 4555–4567.

Titus, M. A. (2018). Myosin-Driven Intracellular Transport. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–16.

Tsai, J. W., Bremner, K. H., & Vallee, R. B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nature Neuroscience*, 10(8), 970–979.

Tsai, J. W., Chen, Y., Kriegstein, A. R., & Vallee, R. B. (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *Journal of Cell Biology*, 170(6), 935–945.

Tsai, J. W., Lian, W. N., Kemal, S., Kriegstein, A. R., & Vallee, R. B. (2010). Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 13(12), 1463–1472.

Tsue, T. T., Watling, D. L., Weisleder, P., Coltrera, M. D., & Rubel, E. W. (1994). Identification of hair cell progenitors and intermitotic migration of their nuclei in the normal and regenerating avian inner ear. *Journal of Neuroscience*, 14(1), 140–152.

Ueno, M., Katayama, K. ichi, Yamauchi, H., Nakayama, H., & Doi, K. (2006). Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Research*, 1088(1), 57–67.

Ulloa, F., & Martí, E. (2010). Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Developmental Dynamics*, 239(1), 69–76.

Veeraval, L., O’Leary, C. J., & Cooper, H. M. (2020). Adherens Junctions: Guardians of Cortical Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(January), 1–17.

Vertii, A., Hehnlly, H., & Doxsey, S. (2016). The centrosome, a multitasking renaissance organelle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12), 1–14.

Villalonga, P., & Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors*, 24(3), 159–164.

Volberg, T., Geiger, B., Kam, Z., Pankov, R., Simcha, I., Sabanay, H., Coll, J. L., Adamson, E., & Ben-Ze’ev, A. (1995). Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2253–2260.

Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M., & Nishida, E. (1998). Nuclear export of actin: A novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO Journal*, 17(6), 1635–1641.

Wang, P. S., Chou, F. S., Ramachandran, S., Xia, S., Chen, H. Y., Guo, F., Suraneni, P., Maher, B. J., & Li, R. (2016). Crucial roles of the Arp2/3 complex during mammalian corticogenesis. *Development (Cambridge)*, 143(15), 2741–2752.

Wang, W., Chen, L., Ding, Y., Jin, J., & Liao, K. (2008). Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin. *Journal of Cell Science*, 121(8), 1334–1343.

Webster, W., & Langman, J. (1978). The effect of cytochalasin B on the neuroepithelial cells of the mouse embryo. *American Journal of Anatomy*, 152(2), 209–221.

Wen, K. K., Rubenstein, P. A., & DeMali, K. A. (2009). Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30463–30473.

Wiese, S., & Faissner, A. (2015). The role of extracellular matrix in spinal cord development. *Experimental Neurology*, 274, 90–99.

Wilson, L., & Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology*, 282(1), 1–13.

Winder, S. J., & Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118(4), 651–654.

Woodhead, G. J., Mutch, C. A., Olson, E. C., & Chenn, A. (2006). Cell-autonomous β -catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12620–12630.

Woolner, S., O'Brien, L. L., Wiese, C., & Bement, W. M. (2008). Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *Journal of Cell Biology*, 182(1), 77–88.

Xie, Z., Moy, L. Y., Sanada, K., Zhou, Y., Buchman, J. J., & Tsai, L. H. (2007). Cep120 and TACCs Control Interkinetic Nuclear Migration and the Neural Progenitor Pool. *Neuron*, 56(1), 79–93.

Xu, W., Baribault, H., & Adamson, E. D. (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*, 125(2), 327–337.

Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123(5), 889–901.

Yamamoto, H., Maruo, T., Majima, T., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., Mandai, K., & Takai, Y. (2013). Genetic deletion of afadin causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10.

Yanakieva, I., Erzberger, A., Matejčić, M., Modes, C. D., & Norden, C. (2019). Cell and tissue morphology determine actin-dependent nuclear migration mechanisms in neuroepithelia. *The Journal of Cell Biology*, 218(10), 3272–3289.

Yap, A. S., Duszyc, K., & Viasnoff, V. (2018). Mechanosensing and mechanotransduction at cell–cell junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(8).

Ye, J., Zhao, J., Hoffmann-Rohrer, U., & Grummt, I. (2008). Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes and Development*, 22(3), 322–330.

Yoo, Y., Wu, X., & Guan, J. L. (2007). A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7616–7623.

You, M. S., Wang, W. P., Wang, J. Y., Jiang, Y. J., & Chi, Y. H. (2019). Sun1 Mediates Interkinetic Nuclear Migration and Notch Signaling in the Neurogenesis of Zebrafish. *Stem Cells and Development*, 28(16), 1116–1127.

Yuan, Y., & Shen, Z. (2001). Interaction with BRCA2 Suggests a Role for Filamin-1 (hsFLNa) in DNA Damage Response. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48318–48324.

Zemljic-Harpf, A. E., Miller, J. C., Henderson, S. A., Wright, A. T., Manso, A. M., Elsherif, L., Dalton, N. D., Thor, A. K., Perkins, G. A., McCulloch, A. D., & Ross, R. S. (2007). Cardiac-Myocyte-Specific Excision of the Vinculin Gene Disrupts Cellular Junctions, Causing Sudden Death or Dilated Cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7522–7537.

Zhang, J., Woodhead, G. J., Swaminathan, S. K., Noles, S. R., McQuinn, E. R., Pisarek, A. J., Stocker, A. M., Mutch, C. A., Funatsu, N., & Chen, A. (2010). Cortical Neural Precursors Inhibit Their Own Differentiation via N-Cadherin Maintenance of β -Catenin Signaling. *Developmental Cell*, 18(3), 472–479.

Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., & Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. *Neuron*, 64(2), 173–187.

Ziegler, W. H., Liddington, R. C., & Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends in Cell Biology*, 16(9), 453–460.

Zimmerman, B., Volberg, T., & Geiger, B. (2004). Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 58(3), 143–159.

Zwaan, J., Bryan, P. R., & Pearce, T. L. (1969). Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 21(1), 71–83.

