



**Universidad de Concepción**

**Dirección de Postgrado**

**Facultad de Ciencias Biológicas- Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Área Biología Celular y Molecular**

**ROL DE IIIG9 EN LA MANTENCIÓN DE UNIONES ADHERENTES Y LA  
POLARIDAD DE CÉLULAS EPENDIMARIAS NORMALES.**

POR

MARÍA JOSÉ OVIEDO ITURRA

Tesis de Doctorado presentada en la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción  
como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área  
Biología Celular y Molecular.

Profesor Guía: Katterine Salazar Martínez

Octubre, 2023

Concepción, Chile

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

**Dra. Katterine Salazar**  
Profesora Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas.

**Dra. Marcela Torrejón.**  
Profesor Evaluador Interno  
Facultad de Ciencias Biológicas

**Dr. Leonardo Guzmán.**  
Profesor Evaluador Interno  
Facultad de Ciencias Biológicas.

**Dr. Federico Bátiz.**  
Profesor Evaluador Externo  
Facultad de Ciencias Biológicas.

**Dr. Ariel Castro.**  
Director  
Programa Doctorado en  
Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular.

**Tesis de doctorado financiada por:**

Beca de Doctorado Nacional ANID (2018-2021)

Beca de Extensión por Escritura de Tesis ANID (2022)

Proyecto Fondecyt Regular #1190848

Proyecto PIA-Conicyt ECM-12

Beca Décimo semestre EDPG (2022-2023)

*A mis Padres, Jorge y María Teresa*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Katterine Salazar por su compromiso en mi formación durante todos estos años. Estoy muy agradecida de todos los conocimientos adquiridos y la experiencia vivida en el laboratorio.

Al Dr. Francisco Nualart, por su apoyo en la obtención de imágenes de microscopía y minuciosidad científica al momento de discutir los resultados.

Al Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción, y a sus profesionales, por facilitar el equipamiento necesario para la obtención de los datos presentados en esta tesis.

A la profesora Ximena Koch, por su alegría y buena disposición en ayudarme durante el procesamiento de las muestras.

A Fernando Martínez, por su compañerismo y apoyo en el manejo de los animales.

A mis compañeros de laboratorio que ya se han ido, por las risas y buenos momentos compartidos: Natalia Saldivia, Francisca Espinoza, Luciano Ferrada y Victor Baeza.

A las nuevas generaciones: Fernanda Smith y Isabelle de Lima; y a quienes continúan en el laboratorio: Rocío Magdalena y Eder Ramirez, por su calidez humana y valiosa amistad, sobretodo en los momentos más difíciles que nos tocó vivir durante la pandemia y crisis social. A Eder por su minuciosidad y experiencia científica, fue un gran apoyo para el desarrollo de esta tesis.

Finalmente agradezco a Roberto Gajardo, por su apoyo e innovación en generar nuevos modelos de análisis que contribuyeron al desarrollo de esta tesis. Gracias por tu dedicación y paciencia.

## TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Glia Radial y sus funciones en el desarrollo del sistema nervioso central.....	1
2. Células endoteliales: estructura, funciones y su diferenciación a partir de RGCs.....	5
3. Cadherinas y alteraciones en la Polaridad Celular en RGCs y células endoteliales.....	7
4. ZO-2, Proteína reguladora 32 de la proteína fosfatasa-1 (PP1), cadherinas y efectos sobre la polaridad celular.....	9
5. Proteínas fosfatasa-1 (PP1), proteínas reguladoras (PIP) y su participación en las uniones adherentes.....	14
6. Reguladores maestros de la polaridad celular (Par-3) y la mantención de las uniones adherentes durante el neurodesarrollo.....	17
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Animales de experimentación y aspectos de bioética.....	21
2. Cultivo celular.....	21
2.1 Cultivo de Células MDCK (riñón canino Madin- Darby).....	21
2.2 Cultivo de células HEK293T.....	22
3. RT-PCR convencional.....	22
3.1 Extracción de ARN.....	22
3.2 Transcripción reversa del ARN (RT).....	23
3.3 Amplificación de ADNc por PCR.....	23
4. qRT-PCR y Microdissección Láser.....	24
5. Hibridación <i>in situ</i> .....	27
6. Procesamiento histológico.....	29
6.1 Fijación de tejidos.....	29
6.2 Inclusión y corte.....	29
6.3 Preparación tisular " <i>Whole Mount en-Face</i> ".....	30
7. Inmunofluorescencia.....	30
8. Estudios de colocalización.....	34
9. Análisis de Entropía de Shannon.....	35
10. Microscopía.....	36

11. Microscopía electrónica de transmisión e inmunotinción con oro.....	37
12. Detección de proteínas.....	37
12.1 Obtención de extractos totales de proteínas.....	37
12.2 Electroforesis de poliacrilamida y transferencia.....	38
12.3 Inmunodetección de proteínas.....	39
13. Construcción de proteínas de fusión fluorescentes para IIIIG9 y PP1 alfa humano.....	40
13.1 Subclonamiento.....	40
13.2 Amplificación de los ADNc por PCR y clonamiento al vector pCR4Blunt- TOPO.....	40
13.3 Subclonamiento de hIIIIG9L y hPP1alfaL, digestión de vectores y purificación de fragmentos.....	42
13.4 Ligación de los fragmentos.....	43
13.5 Transformación en bacterias competentes.....	43
13.6 Purificación del ADN plasmidial.....	43
13.7 Verificación del subclonamiento por ensayo de restricción.....	44
13.8 Elaboración de los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar.....	45
14. Transfección de células HEK293T para realizar los ensayos de FRET.....	45
15. Análisis de FRET.....	46
16. Inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v) de adenovirus en animales embrionarios, postnatales y adultos.....	47



17. Análisis de ligadura por proximidad ( <i>PLA</i> ).....	48
IV. RESULTADOS.....	50
CAPITULO 1. Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de IIIIG9, respecto a la expresión de PP1 $\alpha$ y Par-3, durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.....	50
1.1 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 en el epéndimo adulto.....	50
1.2 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 durante el desarrollo del cerebro.....	80
1.3 Efecto de la inhibición de IIIIG9 en el estadio embrionario E16 ( <i>in utero</i> ).....	100
CAPITULO 2. Evaluar la interacción de IIIIG9 con PP1 $\alpha$ y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.....	121
2.1 Caracterización del modelo <i>in vitro</i> de células MDCK.....	121
2.2 Análisis de interacción de IIIIG9, Par-3 y PP1 $\alpha$ , en las uniones adherentes.....	132
V. DISCUSIÓN.....	145
CAPITULO I: Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de IIIIG9, respecto a la expresión de PP1 $\alpha$ y Par-3, durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.....	145
1.1 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 en el epéndimo adulto.....	145

1.2	Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 durante el desarrollo del cerebro.....	149
1.3	Efecto de la inhibición de IIIIG9 en el estadio embrionario E16 ( <i>in utero</i> ).....	154
CAPITULO 2. Evaluar la interacción de IIIIG9 con PP1 $\alpha$ y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.....		162
2.1	Caracterización del modelo <i>in vitro</i> de células MDCK.....	162
2.2	Análisis de interacción de IIIIG9, Par-3 y PP1 $\alpha$ , en las uniones adherentes.....	166
VI. CONCLUSIONES.....		171
VII. REFERENCIAS.....		172

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores específicos para RT-PCR convencional y qRT-PCR cuantitativo.....	26
Tabla 2. Anticuerpos primarios.....	31
Tabla 3. Anticuerpos secundarios.....	33

## INDICE DE FIGURAS

Esquema 1. Corticogénesis a partir de la glia radial embrionaria hasta la formación de células gliales durante la primera semana postnatal.....	4
Esquema 2. Modelo de estructura refinada por dinámica molecular de IIIIG9 humano.....	11
Figura 1. El ARNm de IIIIG9 se expresa en la pared ventricular en las células endimarias del ventrículo lateral del cerebro adulto.....	52
Figura 2. El ARNm de IIIIG9 se localiza en las células endimarias del ventrículo lateral y en neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral adulta.....	54
Figura 3. PP1 $\alpha$ es la subunidad mayormente expresada en las células endimarias de la pared ventricular del cerebro adulto.....	58
Figura 4. IIIIG9 y PP1 $\alpha$ se expresan en la pared ventricular adulta y se codistribuyen en la región apical y lateral de las células endimarias.....	60
Figura 5. IIIIG9 se localiza en un patrón puntiforme en el citosol y en cercanía a las uniones adherentes de las células endimarias.....	63
Figura 6. La proteína de polaridad Par-3 se expresa en la pared ventricular adulta y se codistribuye en cercanía a las cadherinas de las células endimarias.....	67
Figura 7. Análisis ultraestructural e inmunogold para IIIIG9 en los cilios y las uniones adherentes de células endimarias adultas.....	72
Figura 8. La inhibición <i>in vivo</i> de IIIIG9 induce una denudación endimaria parcial en el ventrículo lateral del cerebro adulto.....	74

Figura 9. La pérdida de función <i>in vivo</i> de IIIG9 en células endimarias del tercer ventrículo induce denudación parcial sin alterar a los astrocitos.....	76
Figura 10. La pérdida de función <i>in vivo</i> de IIIG9 en células endimarias del VL induce una morfología de células no polarizadas con una menor y deslocalizada distribución de cadherinas.....	79
Figura 11. El ARNm de IIIG9 se localiza en la glía radial embrionaria.....	81
Figura 12. El ARNm de IIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 se expresa en el desarrollo embrionario y postnatal del cerebro.....	83
Figura 13. IIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y cadherinas, se expresan en la pared ventricular embrionaria y postnatal temprana.....	86
Figura 14. IIIG9 y Par-3 se localizan tempranamente en la pared ventricular, durante el estadio embrionario E11.....	89
Figura 15. IIIG9 y Par-3 colocalizan con cadherinas en la zona ventricular, zona intermedia y placa cortical de la corteza cerebral, en el estadio embrionario E13.....	91
Figura 16. IIIG9 y Par-3 tienen una mayor polarización en la zona ventricular durante el estadio E16.....	92
Figura 17. IIIG9 se localiza en las uniones adherentes de las glías radiales ventriculares.....	95
Figura 18. IIIG9 y Par-3 colocalizan con cadherinas en células de la pared ventricular postnatal 1 día.....	98
Figura 19. IIIG9 se distribuye en las cercanías de las uniones adherentes en los estadios postnatales PN5 y PN7.....	99

Figura 20. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria induce la presencia de acúmulos de células en la zona ventricular.....	103
Figura 21. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria induce una distribución alterada de las cadherinas.....	104
Figura 22. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria indica un mayor grado de entropía en las cadherinas.....	107
Figura 23. Las células transducidas con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en la pared ventricular muestran un linaje astrogliar.....	109
Figura 24. La inhibición <i>in vivo</i> de IIIIG9 en E16 genera un aumento la población de la glía radial en la pared ventricular al día PN4.....	112
Figura 25. Las células transducidas con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en la pared ventricular muestran un compromiso neuronal.....	115
Figura 26. La inhibición de IIIIG9 en cerebros E16 induce la presencia de cúmulos de células positivas a Tbr2/DCX y negativas a GFAP/caspasa 3 activa en la corteza cerebral.....	117
Figura 27. La inhibición de IIIIG9 induce una disminución en la población astrocítica de la zona ventricular y la corteza cerebral marginal.....	120
Figura 28. Las células MDCK expresan IIIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y E-cadherina.....	122
Figura 29. IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 se localizan en las cercanías de los complejos de unión en cultivos confluentes de células MDCK.....	123
Figura 30. Caracterización del cultivo 3D de células MDCK.....	126

Figura 31. IIIG9 y PP1 $\alpha$ se distribuyen junto a las cadherinas en cultivo 3D monocapa de células MDCK.....	127
Figura 32. IIIG9 y PP1 $\alpha$ se distribuyen junto a las cadherinas en cistos 3D de células MDCK.....	129
Figura 33. Par-3 y PP1 $\alpha$ se distribuyen junto a $\beta$ -catenina en cistos 3D de células MDCK.....	132
Figura 34. IIIG9 y E-cadherina interactúan en la región basal del cisto de células MDCK.....	134
Figura 35. IIIG9 y E-cadherina interactúan en las uniones celulares de las células MDCK.....	136
Figura 36. Par-3 y E-cadherina interactúan en las uniones celulares de las células MDCK.....	137
Figura 37. IIIG9 y PP1 $\alpha$ interactúan en la porción basal del cisto de células MDCK.....	138
Figura 38. IIIG9/E-cadherina, IIIG9/PP1 $\alpha$ y Par-3/E-cadherina interactúan en la pared ventricular endimaria del cerebro adulto.....	141
Figura 39. Análisis de FRET para la interacción <i>in vitro</i> entre las proteínas IIIG9 y PP1 $\alpha$ .....	143
Figura 40. Modelo final del estudio.....	170

## ABREVIATURAS

3V	:	Tercer ventrículo
3Vd	:	Tercer ventrículo dorsal
3Vv	:	Tercer ventrículo ventral
3-PGDH	:	3-fosfoglicerato deshidrogenasa ( <i>3-Phosphoglycerato Dehydrogenase</i> , en inglés)
4V	:	Cuarto ventrículo
AAV	:	Virus adeno-asociado
aPKC	:	Proteína quinasa atípica C ( <i>Atypical Protein Kinase C</i> , en inglés)
ADNc	:	ADN complementario
ARNm	:	ARN mensajero
ASPP1	:	Estimulación de la apoptosis de la proteína P53 ( <i>Apoptosis Stimulated Protein of p53 Protein 1</i> en inglés)
B1	:	Astroцитos tipo B1 subventriculares
BSA	:	Albúmina de Suero de Bovino
C11ORF66	:	Marco de lectura abierto 66, del cromosoma 11 ( <i>chromosome 11, open Reading frame 66</i> , en inglés)
CAMSAP3/Nezha	:	Proteína 3 asociada a Espectrina, regulada por Calmodulina ( <i>Calmodulin regulated spectrin associated protein 3</i> , en inglés)



cDNA	:	DNA copia
CE	:	Célula ependimaria
CP	:	Plexos coroídeos
Cy2	:	Cianina 2
Cy3	:	Cianina 3
Cy5	:	Cianina 5
DCX	:	Doblecortina ( <i>Doblecortin</i> , en inglés)
DEPC	:	Dietilpirocarbonato
DIV	:	Días <i>in vitro</i>
DMEM	:	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	:	Dimetil-sulfóxido
dNTPs	:	Desoxinucleótidos trifostato
E	:	Estadio embrionario
E1	:	Ependimocitos multiciliados
EDTA	:	Ácido Etilendiaminotetracético
EGFP	:	Proteína fluorescente verde ( <i>enhanced Green fluorescent protein</i> en inglés)
FRET	:	Transferencia de Energía por Resonancia de fluorescencia ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> , en inglés)
GFAP	:	Proteína Ácida Fibrilar de la Glia
i.c.v	:	Inyección intracerebroventricular.
IF	:	Inmunofluorescencia

IgG	:	Inmunoglobulina G
IHQ	:	Inmuno-histoquímica
iPCS	:	Células madres pluripotentes inducibles ( <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> , en inglés)
IPC	:	Células progenitoras intermedias ( <i>Intermediate Progenitor cells</i> en inglés)
IIIIG9L	:	Isoforma larga de IIIIG9
IIIIG9s	:	Isoforma corta de IIIIG9
KDa	:	Kilodalton
LB	:	Medio Luria-Bertani
LCR	:	Líquido Cefalorraquídeo
LMD	:	Microdissección láser ( <i>laser microdissection</i> , en inglés)
MDCK	:	<i>Madin Darby Canine Kidney Cells</i>
NSC	:	Células madre neurales ( <i>neural stem cell</i> , en inglés)
pAAV	:	Plásmido para la generación de virus adenoasociado
Pb	:	Pares de bases
Par-3	:	Proteína de partición defectuosa-3 ( <i>Partitioning defective protein 3</i> , en inglés)
PBS	:	Tampón fosfato salino
PC	:	Placa cortical
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	:	p-Formaldehído
PLA	:	Ensayo de ligadura por proximidad ( <i>Proximity ligation assay</i> , en inglés)

PN	:	Días post-natal
PP	:	Pre-Placa
PP1	:	Proteína fosfatasa-1
PP1 $\alpha$	:	Proteína fosfatasa- 1 alfa
PPP1R32	:	Subunidad regulatoria 32 de la fosfoproteína fosfatasa 1
PV	:	Pared ventricular
PVDF	:	Fluoruro de polivinilideno
RGc	:	Células gliales radiales ( <i>Radial glial cells</i> , en inglés)
ROI	:	Región de interés ( <i>Region of interest</i> , en inglés)
RT	:	Transcripción Reversa
SAXO 4	:	Estabilizador de microtúbulos 4 ( <i>Stabilizer of axonemal microtubules 4</i> , en inglés)
SBF	:	Suero Bovino Fetal
Ser	:	Serina
SIM	:	Microscopía de iluminación estructurada
SLiMS	:	Motivos lineales cortos ( <i>Short linear motifs</i> , en inglés)
SNC	:	Sistema Nervioso Central
TAE	:	Tampón Tris Acetato EDTA
TEM	:	Microscopía electrónica de transmisión
Tm	:	Temperatura de fusión
Tris	:	Tris(hidroximetil)amino-metano
T $\alpha$	:	Tanicitos alfa

Tβ1d	:	Tanicitos β1 dorsales
Tβ1v	:	Tanicitos β1 ventrales
Tbr2	:	<i>T-brain gene-2</i>
Tbr1	:	<i>T-brain gene-1</i>
Tub-β3	:	Tubulina beta 3 ( <i>beta-3-tubulin</i> , en inglés)
VL	:	Ventrículo lateral
YAP	:	<i>Yes-associated protein 1</i>
ZI	:	<i>Zona Intermedia</i>
ZO-1	:	Proteína zonula occludens-1
ZM	:	Zona Marginal
ZSV	:	Zona Subventricular
ZV	:	Zona Ventricular

## RESUMEN

IIIIG9 (PPP1R32/SAXO4) es la subunidad regulatoria 32 de la proteína fosfatasa-1 (PP1) de la cual existe escasa información sobre su función. En el sistema nervioso central (SNC) adulto, presenta una localización restringida a cilios móviles, en las uniones adherentes y el citosol de las células endoteliales. Reportes preliminares de esta tesis indicaron que la inhibición *in vivo* de IIIIG9 en la pared ventricular adulta genera denudación endotelial parcial y presencia de células no polarizadas que internalizan las cadherinas. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce un mecanismo molecular que explique la acción de IIIIG9 en los complejos proteicos que estabilizan las uniones adherentes. Además, es desconocida la relevancia de IIIIG9 en la mantención de las uniones adherentes en las células progenitoras de la pared ventricular, llamadas glías radiales (RGC), y sus efectos en la formación de neuronas y otros tipos de células gliales, como astrocitos. En esta tesis postulamos que IIIIG9 forma un complejo con la proteína fosfatasa-1 alfa y Par-3 (proteína de polaridad celular), promoviendo la mantención de las uniones adherentes durante la polarización y diferenciación de las células endoteliales. En el primer objetivo determinamos que IIIIG9 se induce tempranamente en el periodo embrionario (E11), con una distribución polarizada hacia el cuerpo de la glia radial, junto a las cadherinas, PP1 alfa y Par-3. La distribución polarizada de estas proteínas se mantiene en la etapa postnatal (PN) y en el epéndimo adulto. Mediante análisis de inhibición *in vivo* en animales embrionarios (inyección adenoviral en E16 y análisis en cerebros PN4) reportamos un fenotipo de heterotopia ventricular, representado por cúmulos celulares que expresan marcadores de diversos linajes (glías radiales, precursores neurales y gliales). Este efecto fue acompañado de cambios en el patrón de distribución de las cadherinas respecto a la

condición control. En zonas marginales de la corteza cerebral, se observaron cúmulos celulares sugiriendo la presencia de heterotopia cortical, rodeada de astrogliosis reactiva. Además, se observa una reducción del área inmunoreactiva para GFAP que sugiere una reducción en la población de astrocitos marginales. En nuestro segundo objetivo, reportamos la interacción entre IIIIG9/E-cadherina, IIIIG9/PP1 $\alpha$  y Par-3/E-cadherina a nivel de los cilios y las regiones basolaterales de las células endimarias. Similar a lo que observamos en un modelo *in vitro* de células MDCK polarizadas. Finalmente, mediante análisis de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) determinamos la interacción entre IIIIG9 y PP1 alfa en células HEK292T. En conclusión, nuestros hallazgos indican que IIIIG9 (PPP1R32/SAXO4) promueve la mantención de la polaridad de la glía radial (célula troncal) y de las células endimarias, a través de las uniones adherentes. Esta función podría ser dependiente de la interacción de IIIIG9 con cadherinas, PP1 $\alpha$  y posiblemente con Par-3. Así la correcta función de IIIIG9 podría limitar la aparición de patologías del desarrollo cerebral como la dislexia, la epilepsia, el autismo, entre otras; y del cerebro adulto como la hidrocefalia.

## ABSTRACT

IIIIG9 (PPP1R32/SAXO4) is the regulatory subunit 32 of protein phosphatase-1 (PP1), with limited functional information. In the adult CNS, this protein specifically localizes to motile cilia, adherens junctions and ependymal cells cytosol. Preliminary reports of this thesis indicated that *in vivo* inhibition of IIIIG9 in the adult ventricular wall generates partial ependymal denudation and the presence of non-polarized cells that internalize cadherins. These findings indicate that IIIIG9 plays a crucial role in maintaining adherens junctions in ependymal cells; however, a molecular mechanism explaining its key role in the stabilization of these junctions has not been reported to date. Additionally, the significance of IIIIG9's maintenance role is currently unknown for ventricle wall progenitor cells, known as radial glia, nor during the formation of neurons and other types of glial cells, such as astrocytes. In this thesis, we postulate that IIIIG9 forms a complex with PP1 $\alpha$  (protein phosphatase 1 alpha) and Par-3 (a cell polarity protein), contributing to the maintenance of adherens junctions during the polarization and differentiation of ependymal cells. In the first objective, we report that IIIIG9 is induced early at the embryonic stage (E11), having a polarized distribution towards the body of the radial glia, along with cadherins, PP1 $\alpha$  and Par-3. This polarized distribution is maintained during the postnatal stage and in the adult ependyma. Through *in vivo* inhibition analysis in embryonic animals (adenoviral injection at E16 and analysis in PN4 brains) we report a phenotype of ventricular heterotopia, represented by cell clusters that express markers of various lineages (radial glia, neural and glial precursors). In these animals, we observe changes in the distribution pattern of cadherins compared to the control. In marginal zones of the cerebral cortex, cell clusters were observed, suggesting the presence of cortical heterotopia, surrounded by reactive astrogliosis. Moreover, it was observed a reduction

in the immunoreactive zone for GFAP, suggesting a drop in the marginal astrocyte population. In our second objective, we report the interaction between IIIIG9/E-cadherin, IIIIG9/PP1 $\alpha$  and Par-3/E-cadherin at the ciliary level and on the basolateral regions of ependymal cells. These observations were similar to the polarized model of MDCK cells *in vitro*. Finally, using FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) we inform the interaction between IIIIG9 and PP1 $\alpha$  in HEK292T cells. In conclusion, our findings indicate that IIIIG9 (PPP1R32/SAXO4) promotes the maintenance of radial glial (truncal cell) and ependymal cell polarity, via adherens junctions. This function could depend on the interaction of IIIIG9 with cadherins, PP1 $\alpha$  and possibly with Par-3. The correct functioning of IIIIG9 could be a key factor in limiting the emergence of brain development pathologies such as dyslexia, epilepsy, autism, during development, and at the adult brain such as hydrocephalus.



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. **Glia Radial y sus funciones en el desarrollo del sistema nervioso central.**

En el neurodesarrollo de animales vertebrados se genera un epitelio pseudoestratificado con progenitores altamente polarizados, que apicalmente presentan uniones celulares y en su dominio basal toman contacto con la lámina basal. Los principales complejos de unión apical en las células neuroepiteliales son las uniones adherentes basadas en cadherinas, que desempeñan un rol estructural en la mantención y la integridad epitelial a través de la polaridad celular (Chou y col., 2018).

Aproximadamente en el día embrionario 11 (E11) del desarrollo del ratón, las células neuroepiteliales se transforman en células gliales radiales (RGCs) (Kriegstein y col., 2009; Breunig y col., 2010). Estas células constituyen una población heterogénea y mitóticamente activa; su morfología es bipolar ya que posee un proceso apical corto que se extiende a la superficie ventricular y un proceso radial largo que se extiende hacia la superficie pial (Kriegstein y Gotz, 2003). Las RGCs se extienden y adquieren microtúbulos y filamentos intermedios, expresando vimentina, el transportador de glutamato astrocítico (GLAST), la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP), tenascina C (TN-C) y los epítopes RC1 y RC2 (Campbell y Gotz, 2002; Malatesta y col., 2008; Kriegstein y col., 2009).

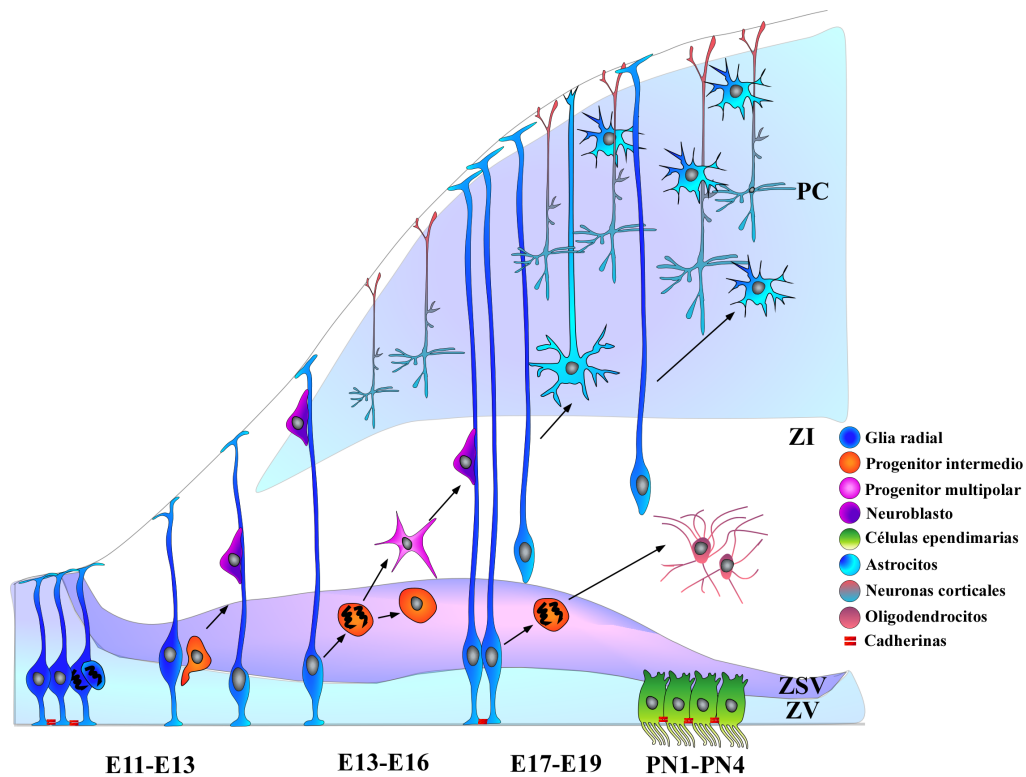
Las RGCs se dividen en la superficie ventricular y experimentan en su mayoría divisiones proliferativas simétricas para amplificar el número de progenitores. Sin embargo, también pueden experimentar divisiones asimétricas, que le permiten autorenovarse y producir

células amplificadoras transitorias (IPCs), que residirán en la zona subventricular (ZSV) (Gotz y Huttner, 2005; Taverna y col., 2014). Estas células darán origen a los principales linajes del SNC: células neuronales, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (Merkle y col., 2004).

Durante la neurogénesis, las neuronas recién nacidas desde la RGCs migran hacia la preplaca, dividiéndola en dos zonas: subplaca y zona marginal (Greig y col., 2013). Luego de este evento, las neuronas continúan migrando, en una disposición “de adentro hacia afuera”, de esta forma durante las primeras etapas (E11.5-E13.5), las neuronas de proyección cortical migran hacia capas profundas de la corteza (V-VI). Mientras que las neuronas nacidas tardíamente (E14.5-E16.5), migran hacia las capas superiores o superficiales de la corteza (II-IV) (Franco y Muller, 2013; De Agustín-Duran y col., 2021). De esta forma, la corteza cerebral se compone de siete capas de neuronas que se generan mediante olas de migración, que es dependiente de los procesos basales de la glía radial (Greig y col., 2013).

La inestabilidad de las uniones adherentes (ver sección 3) conduce a una pérdida de la morfología radial, que se asocia con defectos en la laminación de la corteza, por fallas en la migración celular (Guarnieri y col., 2018). Posteriormente, hacia los estadios E16-E18 en roedores, se inicia el compromiso de los progenitores por el linaje gliogénico (Gao y col., 2014). Recientemente, utilizando la estrategia de marcaje combinatorio y microscopía serial multifotónica 3D (*ChroMS*), se analizó el desarrollo de los astrocitos en la corteza cerebral del ratón, junto al rastreo de los clones, ya que existen algunas controversias respecto a la migración de progenitores gliales embrionarios a través del proceso glial, y de esta manera poblar la corteza cerebral (Gao y col., 2014; Schiweck y col., 2018; Clavreul y col., 2019). Sin embargo, ha sido demostrado que los astrocitos corticales de ratón se originan a partir de una

contribución dual desde progenitores apicales embrionarios y postnatales, que se delaminan y generan los astrocitos piales y protoplasmáticos indistintamente (Clavreul y col., 2019). Posteriormente, durante la primera semana postnatal se dispersan por la pared neocortical mientras proliferan (P0-P7), entremezclándose con clones vecinos e intercalándose con precursores recientemente delaminados. Tanto los precursores embrionarios como postnatales colonizan la neocorteza aparentemente al azar, hasta que el espacio cortical se restringe y forman una matriz astrogial compleja. La morfología de los astrocitos se complejiza mientras progresan hacia una etapa madura (hasta PN21), independiente de su estado mitótico (Clavreul y col., 2019). Los astrocitos desarrollan tres a seis procesos largos durante su maduración, además de ramificaciones finas que nacen desde los procesos principales. Cuando los astrocitos alcanzan la tercera a cuarta semana postnatal, alcanzan su diferenciación terminal con procesos espongiiformes densos (Schiweck y col., 2018), expresando principalmente, la proteína acida fibrilar (GFAP), S100 $\beta$ , Aldh1L1, Sox9, GLUT-1 y glutamina sintasa y adoptan su morfología estrellada (Molofsky y col., 2012). Los oligodendrocitos surgen tardíamente durante el estadio embrionario y postnatalmente, similar a lo observado para los astrocitos (Naruse y col., 2017).



**Esquema 1. Corticogénesis a partir de la glia radial embrionaria hasta la formación de células gliales durante la primera semana postnatal.**

Se observa un esquema del neurodesarrollo desde el estadio E11, hasta el día postnatal 4 (PN4). Las glías radiales (azul), que forman un epitelio en la zona ventricular (celeste), entran al proceso de división asimétrica, dando origen a un progenitor intermedio (naranja) y un neuroblasto migrante (morado) en la zona subventricular (lila), que utiliza el proceso basal de la glía radial hasta alcanzar las porciones altas de la corteza cerebral. Las cadherinas anclan las glías radiales a la superficie ventricular (rojo). Los astrocitos embrionarios y postnatales se delaminan (celeste) y forman los astrocitos piales y protoplasmáticos de la corteza. Los oligodendrocitos (rojo) nacen postnatalmente desde progenitores intermedios de la zona subventricular. Finalmente podemos observar las células ependimarias en la pared ventricular

postnatal (verde) con uniones adherentes basadas en cadherinas (rojo). (Adaptado de Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

## **2. Células endoteliales: estructura, funciones y su diferenciación a partir de ECs.**

Las células endoteliales forman un epitelio cuboidal simple con polaridad planar, que recubren las paredes de los ventrículos cerebrales y el canal central de la médula espinal. De esta forma, actúan como barrera entre el líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral, controlando el paso bidireccional de solutos y de células inmunitarias (Del Bigio, 2010; Deng y col., 2023).

Las células endoteliales se caracterizan por poseer grandes interdigitaciones con sus células vecinas, núcleo redondo, cromatina fina y punteada, y en su superficie contiene microvellosidades que son acompañadas de largos cilios centrales (Del Bigio, 2010). Estas células son post-mitóticas, es decir, no proliferan en un estado fisiológico normal. Sin embargo, si lo hacen al producirse daño en el cordón espinal y frente a accidentes vasculares cerebrales, generando nuevas células en el SNC de mamíferos (Spassky y col., 2005; Carlén y col., 2009; Lacroix y col., 2014).

En humanos la diferenciación endotelial comienza en la cuarta semana de gestación y culmina en la veintidosava semana (Sarnat y col., 1992; Rodríguez y col., 2012), mientras que en roedores aparece tardíamente en el desarrollo del SNC, desde la primera semana postnatal y se completa durante el día postnatal 20 (Guirao y col., 2010). La diferenciación endotelial no es un proceso sincronizado en las paredes de los ventrículos cerebrales, ya que

comienza desde la zona caudal a rostral y ventrodorsalmente, regulada por diversos factores de acuerdo a la región del cerebro (Spassky y col., 2005. Silva-Álvarez y col., 2005). Si bien la polarización de las células endimarias es un proceso que ocurre durante los primeros días postnatales, se ha demostrado que la especificación de las RGCs, que postnatalmente se transformarán en células endimarias, es un proceso que se inicia durante el periodo embrionario E14 - E16 (Spassky y col 2005).

Durante la ciliogénesis de las células endimarias debe ocurrir una serie de procesos ordenados, que involucran la regulación del ciclo celular, tráfico vesicular y ensamblaje de los cilios (Avasthi y Marshall, 2012), donde los cuerpos basales migran simétricamente hacia la cara apical anterior de las células endimarias, evento que es conocido con el nombre de polaridad translacional. En este proceso, mediante estudios farmacológicos y genéticos, se demostró que la miosina no muscular (NMII), es un regulador clave en el anclaje de cuerpos basales en los endimocitos (Hirota y col., 2010). Luego que los cilios se anclan y se establecen como cilios funcionales, ocurre la polaridad rotacional que es estimulada por el movimiento pasivo del LCR, orientando los cuerpos basales hacia la dirección del mismo, a través de una estructura llamada pie basal (Mitchell, 2007). Los endimocitos al alcanzar el desarrollo postnatal en ratas, activan una diversa maquinaria de genes. En los datos transcriptómicos de célula única proveniente de células endimarias del prosencéfalo neonatal, se ha observado un programa transcripcional relacionado con la simetría derecha/izquierda (MacDonald y col., 2021). Posteriormente, estas células se activan metabólicamente, lo que conlleva a la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 y a un aumento de la presencia de mitocondrias (Nualart y col., 1999; Silva-Álvarez y col., 2005),

junto a los marcadores ependimarios CD24+, SOX2+, FOXJ1+, S100 $\beta$ +, Meig1+, Lrcc1+ y CD133+ (Tucker y Caspary, 2013; MacDonald y col., 2021).

### **3. Cadherinas y alteraciones en la Polaridad Celular en RGCs y células ependimarias.**

Las cadherinas median la adhesión y el reconocimiento célula-célula dependiente de Ca<sup>2+</sup>, a través de interacciones cis y trans de ectodominios altamente conservados. En las cadherinas clásicas, los miembros de la subfamilia tipo I/II, que se expresan en mamíferos, poseen un dominio transmembrana y una región intracelular que incluye el dominio yuxtamembrana (JMD) y de unión a catenina (CBD). De esta forma las cateninas permiten el anclaje entre ellas y el citoesqueleto de actina (Agustín-Durán y col., 2021). Durante el desarrollo, las uniones adherentes experimentan una constante remodelación a medida que las RGCs se multiplican, las células progenitoras amplificadoras se apartan del neuroepitelio y las RGCs vuelven a restablecer sus uniones (Veeraval y col., 2020).

Se ha reportado que N-cadherina es relevante en la migración de neuronas corticales *in vivo*, ya que su inhibición conduce a graves defectos en migración neuronal. En este contexto, se ha analizado que la supresión de la endocitosis por Rab5 o Rab11, aumenta los niveles de N-cadherina en la superficie, perturbando la migración neuronal (Shikanai y col., 2011). La ausencia de uniones celulares genera disrupción de la zona ventricular, con pérdida de la polaridad y desprendimiento de las células de glía radial. Esto conduce a graves defectos del desarrollo, que pueden incluir cambios en el tipo de división celular y problemas en la laminación (Cappello y col., 2012).

Se ha reportado que la perturbación de genes asociados a las uniones adherentes como Cdh2 (N-cadherina), afadina y  $\alpha$ E-catenina, conducen a un aumento en la proliferación, que genera una corteza cerebral más gruesa en etapas postnatales (Gil-Sanz y col., 2014). Por otro lado, también puede producirse una reducción en la población de neuronas, donde algunas de estas se acumulan en zonas ectópicas de la corteza cerebral, proceso que conduce a la aparición de heterotopias (Liu y col., 2018). Otros eventos celulares han sido descritos durante la depleción de proteínas de polaridad como Pals1, introduciendo una mutación condicional en embriones de ratón en donde se pierden las uniones adherentes y la morfología de glía radial, incrementándose la formación de progenitores intermediarios, con neurogénesis prematura e inducción de muerte cerebral rápida y masiva, conduciendo a la formación de microcefalia (Kim y col., 2010).

Por otro lado, la pérdida de función *in vivo* de la proteína de polaridad Llg1 en ratones Nestina-Cre/Llg1<sup>fl</sup>, genera malformaciones corticales semejantes a la heterotopia periventricular severa (PH), debido a la pérdida de los complejos de unión apical, donde Llg1 participa en la internalización de N-cadherina desde la región basal, favoreciendo la acumulación de N-cadherina en el límite apical-basolateral (Jossin y col., 2017). Es por esto, que las vías moleculares que promueven la adhesión de cadherinas y la remodelación de actina, son factores importantes en el desarrollo cortical.



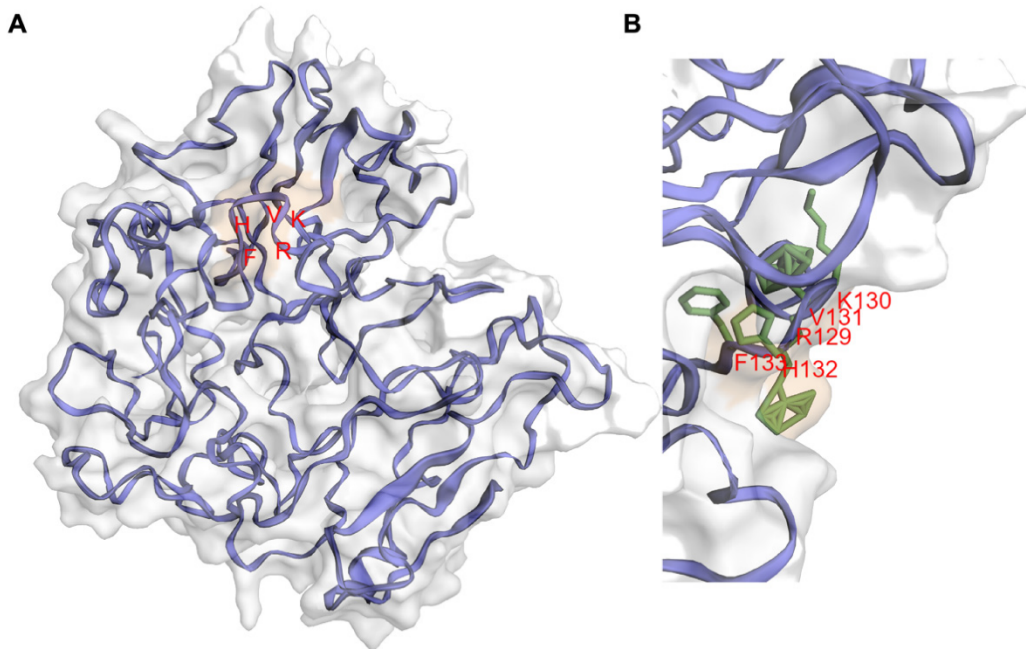
#### **4. IIIG9, Proteína reguladora 32 de la proteína fosfatasa-1 (PP1), cadherinas y efectos sobre la polaridad celular.**

IIIG9 es una proteína escasamente caracterizada. Esta proteína está codificada por el gen *PPP1R32*, también conocido como *C11orf66*, *FLJ32771*, *4930579J09Rik*, *AU015816* y *MGC144717*, que se localiza en el locus 11q12.2. La expresión de su mRNA fue reportada por primera vez el año 2002, con una alta expresión en la pared endimaria y el cuarto ventrículo cerebral (Danielson y col., 2002). Existen dos transcritos en rata, IIIG9L (1491 bp) y IIIG9S (1355 bp), los cuales dan origen a una proteína de 426 y 381 aminoácidos, respectivamente. Ambas isoformas difieren en 44 aminoácidos, que se encuentran en la región N-terminal de IIIG9L y que se encuentra ausente en IIIG9S (Oviedo y col., 2022). En humanos existen ambas isoformas de 425 (1532 bp) y de 405 (1472 bp) aminoácidos. La isoforma corta no posee la secuencia que se encuentra entre los aminoácidos 230-249 de la isoforma IIIG9L (Oviedo y col., 2022).

La localización de IIIG9 se ha reportado en cilios de la tráquea, epitelio de la trompa de Falopio, cola espermática y epéndimo adulto (Ivliev y col., 2012; Uhlen y col., 2015; Cifuentes y col., 2018), sugiriendo un rol en la regulación de la motilidad ciliar. Recientemente, con la ayuda de mapas de contacto de residuos e inteligencia artificial, se han generado modelos estructurales tridimensionales de IIIG9 (Zheng y col., 2021). Se ha descrito una estructura globular estable con ausencia de grandes estructuras secundarias y ausencia de cortas hélices  $\alpha$ , donde la secuencia RKVHF puede ser localizada. Además, se observan algunas hojas beta a nivel de la región N-terminal y una región desestructurada en la región C-terminal (Figura 2) (Oviedo y col., 2022).

En humanos, se ha encontrado que IIIIG9 está dentro de los 200 genes más regulados en las células endoteliales (MacDonald y col., 2021), además se ha reportado la presencia del ARNm de IIIIG9 en diferentes áreas del SNC, como la sustancia negra (pars compacta) (Wu y col., 2016), los núcleos anterodorsal y anteroventral del tálamo, el núcleo de Barrington, y el núcleo del lecho de la estra terminal (Kuleshov y col., 2016; Chen y col., 2013, Enrichr).

Realizando ensayos de hibridación *in situ* se ha observado que el mensajero de IIIIG9 se localiza en las células endoteliales de los ventrículos laterales, el tercer ventrículo dorsal y cuarto ventrículo dorsal (*Allen Brain Atlas*), así como también en neuronas del hipocampo y en menor medida en células de Purkinje del cerebelo (Danielson y col., 2002). En nuestro laboratorio hemos reportado la distribución ciliar de IIIIG9 en las células endoteliales de los diferentes ventrículos cerebrales, observando una distribución punteada y discontinua en un borde del cilio, mediante SIM de superresolución (Cifuentes y col., 2018). En este contexto, se ha reportado que PP1 posee una distribución similar en flagelo de *Chlamydomonas*, donde PP1 forma parte estructural y funcional del axonema ciliar, localizándose principalmente en el par central (en menor medida) y en los pares externos en las cercanías de IC138 y dineína (Elam y col., 2009).



**Esquema 2. Modelo de estructura refinada por dinámica molecular de IIIIG9 humano.**

**A** Dibujo representativo del mejor modelo humano de IIIIG9 de acuerdo al Z-score generado por el servidor ProSA después de 700 nanosegundos de simulaciones por dinámica molecular. En el modelo de la proteína PPP1R32, el motivo RKVHF (letras rojas) es accesible al solvente. **B** Fotografía del motivo RKVHF que representa un residuo de histidina (H132) completamente accesible al solvente (Oviedo y col., 2022).

La ausencia de estructuras secundarias en proteínas intrínsecamente desordenadas y la presencia de la secuencia RRVHF caracteriza a más del 70% de las proteínas reguladoras de la proteína fosfatasa 1 (PP1), permitiéndoles adoptar estructuras altamente flexibles y conformaciones transientes que promueven la interacción con la superficie de PP1 (*AlphaFold: Protein Structure Database*) (Varadi y col., 2022, Jumper y col., 2021). La interacción de IIIIG9 con PP1 ha sido validada *in vitro* y utilizando ensayos *in silico* para proteínas que presentan los dominios de unión RVXF (Hendricks y col., 2009; Heroes y col., 2013).

La identificación de nuevas proteínas ciliares como IIIIG9, estarían relacionadas con el desarrollo de patologías como la infertilidad femenina y masculina, la protección y función de las vías aéreas y también la circulación del líquido cefalorraquídeo a través del sistema ventricular (Wirschell y col., 2011). Es importante mencionar que las proteínas ciliares también poseen funciones extraciliares que incluyen la regulación del ciclo celular, el citoesqueleto y el tráfico intracelular de proteínas (Oviedo y col., 2022). En un análisis funcional del genoma, se analizaron 24373 genes empobrecidos de forma independiente utilizando un siRNA en la línea celular U2OS (células de osteosarcoma). En este análisis, se identificó a IIIIG9 como un regulador del ciclo celular debido a que su subregulación conduce a células en la etapa G<sub>2</sub>/M que se caracterizan por núcleos grandes (Mukherji y col., 2006). Sin embargo, el mecanismo subyacente es desconocido.

Los datos generados en esta tesis y previamente publicados (Baeza y col., 2021), han propuesto una nueva función de IIIIG9 que se relaciona con la mantención de las uniones adherentes en el epitelio endimario. Se observó que la inhibición de IIIIG9, genera resultados similares a lo descrito cuando se pierden las uniones adherentes, al incubar con péptidos

inhibidores de las cadherinas en el receso colicular bovino (dilatación del acueducto de Silvio). Dicho efecto se acompaña de una redistribución citoplasmática de N-cadherina y activación de caspasa 3-clivada (Oliver y col., 2013).

Los resultados publicados por nuestro laboratorio indican que *IIIG9* es imprescindible para la mantención y supervivencia de la célula endimaria, conduciendo el desarrollo de ventriculomegalia y alteraciones en los cilios móviles (Baeza y col., 2021).

Por esta razón, considerando los antecedentes descritos, estamos interesados en analizar los efectos de inhibición en la expresión de *IIIG9* en etapas tempranas del desarrollo embrionario, cuando aún es posible encontrar la glía radial. La base de datos CORTECON, que es un repositorio de la expresión génica del desarrollo cortical, muestra que existen niveles de ARNm de *IIIG9* en distintas etapas de la diferenciación neural y de la especificación cortical de las capas corticales superiores (Van der Leemput y col., 2014, CORTECON). Además, observaciones previas nos indican que *IIIG9* posee una ubicación polarizada en la pared ventricular embrionaria que podría indicar un rol en los mecanismos de polarización celular y la mantención de las uniones adherentes (Oviedo y col., 2022). En este contexto, la mantención de la integridad epitelial en la glía radial, es relevante para la correcta migración de los neuroblastos a través del proceso basal de la glía radial, y también para determinar el destino celular de los progenitores.

Así no solo se puede relacionar a *IIIG9* con ciliopatías como la hidrocefalia, sino también con alteraciones en el neurodesarrollo, como lo son las heterotopias corticales y ventriculares (Oviedo y col., 2022).

## 5. Proteínas fosfatasas-1 (PP1), proteínas reguladoras (PIP) y su participación en las uniones adherentes.

Las proteínas fosfatasas-1 (PP1) son serina/treonina fosfatasas altamente conservadas y ubicuas que pertenecen a la superfamilia de fosfoproteínas fosfatasas (PPP) y actúan clivando el enlace éster de fosfatos unidos a serinas y treoninas (Casamayor y Arino, 2020). Son metaloproteasas que poseen dos sitios de unión a hierro (II) y zinc (II) que participan en múltiples funciones celulares, como lo son el control del ciclo celular, síntesis proteica y transcripción (Cohen, 2002). Respecto a las patologías implicadas en su desregulación, se puede mencionar el cáncer, enfermedad al corazón, pérdida de memoria, diabetes tipo 2 e infecciones virales, por tanto, poseen un amplio potencial terapéutico (Figueiredo y col., 2014, Felgueiras y col., 2020, Ferreira y col., 2019).

Poseen una amplia especificidad de sustrato *in vitro*, sin embargo, *in vivo* la selectividad es mucho más estrecha y estrictamente regulada (Bollen y col., 2010). En mamíferos existen tres genes que codifican para tres subunidades catalíticas: *Ppp1ca*, *Ppp1cb* y *Ppp1cc* que se localizan en los cromosomas 1, 6 y 12, respectivamente (*Rattus Norvegicus*) y, *PPPICA*, *PPPICB*, *PPPICC* se localizan en los cromosomas 11, 2 y 12 respectivamente (*Homo sapiens*) (base de datos, NCBI).

Las proteínas PP1 alfa (37 kDa), PP1 beta (36 kDa) y PP1 gamma (35 kDa), son altamente conservadas y difieren fundamentalmente en las regiones N- y C- terminales (MacMillan y col., 1999; Terry-Lorenzo y col., 2002; Ortiz, 2006). Las subunidades catalíticas se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro (da Cruz e Silva y col., 1995; Strack y col., 1999; Bordelon y col., 2005; Esteves y col., 2012; 2013); en mamíferos como la rata, la

subunidad PP1 alfa y PP1 gamma 1, se encuentran en el cuerpo estriado, hipocampo y corteza cerebral (da Cruz e Silva y col., 1995; Strack y col.,1999). Hasta la fecha, no existe ningún reporte acerca de las isoformas de PP1 presentes en células endoteliales del cerebro adulto, como tampoco en la glía radial durante el desarrollo del SNC.

La alta especificidad de PP1 se debe a su asociación con una amplia gama de proteínas reguladoras (PIP), formando más de 200 complejos diferentes (Heroes y col., 2013; Peti y col., 2013). La unión de PP1 con proteínas reguladoras (PIP) se genera mediante motivos lineales cortos (SLiMs) de 4-8 aminoácidos que interactúan con los surcos superficiales de PP1 (Verbinnen y col., 2017). El dominio de interacción ampliamente conocido para PP1 es el dominio llamado RVxF, que se encuentra presente en el 90% de las proteínas de unión a PP1: [KR]-X(0,1)-[VI]-{P}-[FW], donde X es cualquier residuo distinto de Phe, Ile, Met, Tyr, Asp o Pro (Wakula y col., 2003; Ceulemans y col., 2004; 2006; Hendrickx y col., 2009; Brautigan y col.,2013). Se describe como un motivo específico, universal, degenerado, dinámico y no exclusivo que interacciona con una región hidrofóbica lejana al sitio catalítico (20 Å), favoreciendo interacciones secundarias con motivos de reclutamiento de menor afinidad, sin afectar la actividad enzimática de PP1 (Egloff y col.,1997; Barford y col., 1998; Terrak y col., 2004).

En este contexto se ha descrito que los eventos de fosforilación y defosforilación son cruciales en el ensamblaje y estabilidad de las uniones, regulando la interacción entre la cadherina y el citoesqueleto (Bertocchi y col., 2012). PP1 ha mostrado participación en este proceso, en el cual se ha observado que el tratamiento con ácido okadaico y caliculina A (inhibidores de PP1) en fibroblastos y queratinocitos humanos, produce cambios morfológicos asociados a la pérdida de uniones celulares (Serres y col., 1997), aumentando el estado de

fosforilación de proteínas del citoesqueleto como vimentina, microtúbulos y actina. Por otra parte, el estado de hiperfosforilación en residuos serina/treonina de  $\beta$ -catenina induce la pérdida de las adhesiones célula-célula, ya que se pierde su unión al dominio citoplasmático de E-cadherina y al citoesqueleto de actina, afectando negativamente a la cohesión de las células epiteliales (Peifer y col., 1992; Jou y col., 1995).

Se ha reportado que PP1 alfa regula las uniones celulares mediante su interacción con la proteína de polaridad Par-3, un regulador maestro de la polaridad celular. La sobreexpresión de PP1 alfa (mRFP-PP1 alfa) y Par-3 (EYFP-Par-3) en células MDCK II, muestra que ambas proteínas colocalizan en los contactos celulares; y mediante ensayos de coimmunoprecipitación, se ha demostrado que estas interaccionan mediante el dominio RVXF de Par-3 presente en la región terminal de su dominio PDZ1 (Traweger y col., 2008).

Además, se observó que la mutación del dominio RVXF no elimina por completo la interacción de Par-3 con PP1 alfa, por lo que se sugieren dominios de interacción secundarios que podrían estar dados por proteínas reguladoras de PP1 alfa. Respecto al mecanismo presente, se informa que PP1 alfa desfosforila la Ser144 y Ser824 de Par-3, promoviendo la formación de uniones estrechas (Traweger y col., 2008) y además de uniones adherentes al identificarse la interacción de Par-3 con E-cadherina (Guo y col., 2014). Otro evento relevante en la regulación de Par-3, es el mecanismo inverso llevado a cabo por Par-1, que al fosforilar a Par-3 resulta en la exclusión de Par-3 de la membrana lateral en células de *Drosophila* y la pérdida de las uniones célula-célula (Benton y col., 2003).

Recientemente, existen nuevos antecedentes de la regulación por eventos de desfosforilación de Par-3, a través de la fosfatasa PP1 alfa y su interacción con una proteína reguladora ASPP2 (TP53BP2). Los experimentos fueron realizados en células MDCK II y



HEK293T, en donde los mutantes no fosforilables de la Ser 852 y/o Ser 889 (S852A y -S889A) de Par-3, promovían la localización citosólica de esta proteína (Yamashita y col., 2020). El evento de fosforilación de Par-3 en la Ser 852 o Ser 889 por ASPP2-PP1 hace que Par-3 sea difuso y más accesible a la unión célula-célula recién formada. Cuando una molécula individual de Par-3 libre alcanza la unión célula-célula por difusión, puede ser desfosforilada por ASPP2-PP1 que ya está unido al grupo de Par-3 localizado y oligomerizado. Las moléculas de Par-3 desfosforiladas pueden concentrarse y promover la formación del dominio apical, sin embargo, al ser menos difusa pueden quedar atrapadas en algunas estructuras celulares como microtúbulos y vesículas, sin lograr una reconstrucción rápida de la unión célula-célula. Por esta razón, el estado fosforilado y desfosforilado son esenciales para el reclutamiento rápido y la integridad funcional de Par-3, respectivamente (Yamashita y col., 2020).

## **6. Reguladores maestros de la polaridad celular (Par-3) y la mantención de las uniones adherentes durante el neurodesarrollo.**

Respecto al rol de Par-3 en la formación de uniones adherentes, se ha reportado que su inhibición en *Drosophila*, conduce a una localización errada de E-cadherina e interrupción de uniones septadas (Pinheiro y Montell, 2004). Por otra parte, en células de mamíferos como MDCK, se ha demostrado que el dominio CR1, encargado de anclar a Par-3 a la membrana apical, interrumpe la distribución de E-cadherina, ZO-1 y F-actina (Mizuno y col., 2003). Este efecto fue recreado en células MDCK II en donde se altera el patrón de tinción de E-cadherina

y beta-catenina, junto a perturbaciones en la reorganización del citoesqueleto de actina (Chen y Macara, 2005).

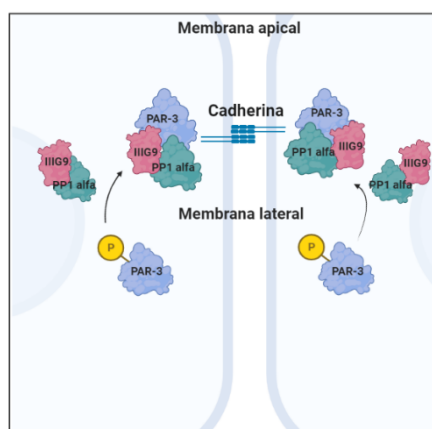
En el contexto del SNC, Par-3 posee una distribución dinámica en los progenitores gliales radiales. Se enriquece en la membrana lateral de los pies apicales que contactan la superficie ventricular durante la interfase, sin embargo, cuando progresa el ciclo celular mPar-3 se dispersa y muestra una distribución asimétrica (Haubensak y col., 2004). Los niveles de expresión de Par-3 genera un impacto sobre la señalización de Notch, que promueve señalizaciones proliferativas durante la neurogénesis. Las células hijas que heredan una mayor cantidad de mPar-3 desarrolla una mayor actividad de la vía Notch, mientras que las progenitoras que heredan una menor cantidad de Par-3, conduce a una menor actividad de Notch, adoptando un destino neuronal o de células progenitoras intermedias (IPC) (Bultje y col., 2009).

Se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína de polaridad Par-3 en cerebros de embrión de pollo, genera una dramática alteración del neuroepitelio. Dichas alteraciones se observan a la forma de rosetas en la región basal de las células neuroepiteliales, formando grupos de células organizadas concéntricamente alrededor de un lumen. Es posible observar a Par-3 en este pseudo dominio apical, respaldado por la localización del centrosoma y con la co-localización con N-cadherina y beta-catenina (Afonso y Henrique, 2006).

Estos resultados son consistentes con lo observado por co-inmunoprecipitación, en donde Par-3 y N-cadherina están presentes en el mismo complejo macromolecular en células neuroepiteliales. De esta forma, las células que sobreexpresan Par-3 pueden reorganizar su polaridad y definir un solo dominio apical, iniciando el posicionamiento de las uniones adherentes (Afonso y Henrique, 2006).

Se ha reportado que las RGCs que carecen de Par-3 muestran efectos anormales dependientes de la etapa del desarrollo, en donde inicialmente se observa una sobreproducción masiva de RGCs que se ubican fuera de la zona ventricular a expensas de neuronas de capas profundas. Luego, estas RGCs experimentan una neurogénesis acelerada y excesiva que conducen a la formación de una corteza agrandada con heterotopia masiva, que refleja una mayor susceptibilidad a las convulsiones (Liu y col., 2018).

Los antecedentes mencionados nos permiten proponer un mecanismo de mantención de las uniones adherentes durante el neurodesarrollo, ya que la mantención de las uniones adherentes no solo permite mantener la integridad de la pared ventricular, sino que también la migración de progenitores que conformarán el cerebro adulto, desde la etapa embrionaria. Además, es relevante mencionar que existe una inherente relación entre los mecanismos de adhesión y de polaridad celular, que aún necesitan ser dilucidados. Por tanto, la presente tesis doctoral propone que el estado de defosforilación de Par-3 (celestes) que se caracteriza por promover las adhesiones célula-célula, es promovido por acción de la fosfatasa PP1 alfa (verde), a través de la interacción con la proteína IIIG9 (rojo), en el contexto de las células ependimarias (postnatal y adulto) y progenitores gliales (embrionario).



Creado en Biorender

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **HIPÓTESIS**

IIIIG9 interactúa con PP1 alfa y Par-3, promoviendo la mantención de las uniones adherentes y la consecuente polarización de las células endimarias.

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión espacio-temporal de IIIIG9 y la pérdida de función con su interacción con Par-3 y PP1 alfa durante la diferenciación y la polarización de células endimarias.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar el patrón de expresión espacio-temporal de IIIIG9 respecto a la expresión de PP1 alfa y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.
2. Evaluar la interacción de IIIIG9 con PP1 alfa y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 1. Animales de experimentación y aspectos de bioética.

Se utilizó la cepa de ratones Sprague Dawley de estadios embrionarios, postnatales y adultos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20- 24°C), ciclos de luz/oscuridad (12 horas) y recibieron una dieta estándar y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron bajo el protocolo aprobado por la Comisión para animales de experimentación de la Universidad de Concepción. En cada procedimiento los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina/Pacifor™ (40%, 40%, 20%) y fueron sacrificados por dislocación cervical. Respecto a los residuos biológicos, fueron manejados según lo estipulado por MATPEL (Universidad de Concepción).

#### 2. Cultivo celular.

Los cultivos celulares se realizaron en una incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. La manipulación de los cultivos celulares fue realizada en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron congeladas a -80°C para su posterior utilización y expansión.

**2.1 Cultivo de Células MDCK (riñón canino Madin- Darby).** Las células fueron utilizadas para inmunocitoquímica en cultivo 2D/3D y ligadura por proximidad (*PLA*). Se cultivaron en DMEM alto en glucosa, 5% v/v de suero bovino fetal (SBF), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (NEAA), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y

fungizona 2.5 µg/mL. El cultivo 3D de células MDCK se realizó sembrando las células en geles de Matrigel® (Corning) pre-gelificados (1:10) y se mantuvieron durante 10 días *in vitro* en cámaras Nunc Lab-Tek (8000 células por pocillo). Posteriormente, los cistos se sembraron en vidrios tratados con poli-L-lisina. Cuando se adhirieron a los vidrios (6 horas, aproximadamente), los cistos se fijaron en PFA 4%, para posteriormente proceder con el protocolo de inmunocitoquímica. Mientras que, los cistos que se mantuvieron dentro del matrigel, igualmente fueron fijados para su posterior análisis,

**2.2 Cultivo de células HEK293T.** Las células se utilizaron para generar proteínas de fusión fluorescentes para FRET e inmunocitoquímica. Se cultivaron en DMEM alto en glucosa, 5% v/v de suero bovino fetal (SBF), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (NEAA), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y fungizona 2.5 µg/mL. Las células se subcultivaron de acuerdo a lo requerido.

### **3. RT-PCR convencional.**

**3.1 Extracción de ARN.** El ARN fue extraído desde corteza cerebral total y pared ventricular adulta de rata Sprague Dawley. Se disgregaron los tejidos extraídos con 500 µL de Trizol® durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15-20 segundos. Luego, se dejó reposar por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos y a 4°C. Posteriormente se extrajo la fase acuosa que contiene el ARN y se trasladó a nuevos tubos. Enseguida, se adicionaron 250 µL de isopropanol a cada tubo y se homogenizó por inmersión y se reservaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se

centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet el cual se resuspendió en 1 mL de etanol 70%, se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se mantuvo a temperatura ambiente para eliminar los restos de etanol. La cuantificación del ARN se realizó mediante absorbancia a 260 nm y la pureza del mismo se evaluó a través de la razón 260nm/280 nm.

**3.2 Transcripción reversa del ARN (RT).** La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit RevertAid® H Minus First Strand cADN Synthesis (Fermentas International Inc). En un volumen de reacción final de 20 µL, se utilizaron 2 µg de ARN de cada muestra. Primero se incubaron las muestras con ADNasa I y tampón para ADNasa a 37°C durante 30 minutos. Luego, se adicionó EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, se adicionó a la reacción 0.5 µg de Oligo dT a 70°C por 5 minutos, reservando en hielo para luego adicionar el tampón de transcripción reversa 5X M-MuLV (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 10 mM), Inhibidor de ARNasa (20U) y mezcla de dNTP (1 mM de cada uno) siendo incubado a 37°C por 5 minutos. Finalmente, se agregó 200 U de RevertAid™ H minus M -MuLV transcriptasa reversa (Fermentas International Inc), y se incubó a 42°C durante 1 hora. En paralelo se realizaron reacciones en ausencia de transcriptasa reversa para controlar la contaminación con ADN.

**3.3 Amplificación de ADNc por PCR.** Para la amplificación del ADNc se utilizó el termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) con un volumen final de reacción de 12.5 µL, que contiene el tampón Taq 10X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno), Taq ADN polimerasa 0,31U (Fermentas), partidores específicos 0.2 µM (Tabla I) y 1 µL de ADNc. Los ciclos de amplificación comenzaron con una incubación de 95°C por 5 minutos. En seguida, se realizaron 30-35 ciclos que comprenden, 95°C por 30

segundos, temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) por 30 segundos y  $72^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Finalizada esta etapa, se concluyó con una incubación de  $72^\circ\text{C}$  por 5 minutos para luego almacenar los productos de PCR a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **4. qRT-PCR y Microdissección Láser.**

Los animales fueron anestesiados con mezcla de Ketamina/Xilacina/Pacifor<sup>TM</sup> (40%, 40%, 20% v/v, respectivamente) y sacrificados por perfusión transcardial con suero fisiológico NaCl 0,9 p/v y luego con el fijador metacarn (metanol 60% v/v, cloroformo 30% v/v y ácido acético 10% v/v), que permitieron una mejor preservación de los ARNm. Los cerebros fueron disectados en las porciones anteriores y posteriores para facilitar el ingreso del fijador hacia los ventrículos cerebrales, en donde se mantuvieron durante las próximas 3 horas. Todos los procedimientos realizados a continuación, se realizaron en el Centro de Microscopía Avanzada CMA BIOBIO de la Universidad de Concepción. Luego, los tejidos fueron cortados en el vibrátomo Leica VT1000S (80-120  $\mu\text{m}$ ) para ser montados en portaobjetos con membrana de tereftalato de polietileno PET (11505151, Leica). La microdissección se realizó con el equipo LMD 7000, (Leica) que posee un láser ultravioleta de 349 nm y, además una cámara digital Leica DFC310FX (1.4 megapíxeles) para captura de imágenes de epifluorescencia y campo claro. Los tejidos microdisectados fueron recogidos en solución RNA later (Ambion) y almacenados a  $-80^\circ\text{C}$ . La extracción del ARN mensajero se realizó con el kit Ambion RNAqueous-Micro TotalRNA Isolation (Ambion) y se evaluó la expresión por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para las subunidades catalíticas de PP1 alfa (204 pb), PP1 beta (240 pb; el partidor de 124 pb solo se utilizó en PCR convencional), PP1 gamma (262



pb), IIIIG9 (277 pb) y Par-3 (176 pb) (Tabla 1). La cuantificación del ARNm de las subunidades se realizó en forma relativa al gen de referencia ciclofilina utilizando un par de partidores que permitieron amplificar un fragmento de 239 pb (Tabla 1). Para la cuantificación se adoptaron los protocolos que se utilizaron para los partidores de RT-PCR convencional y se aplicó el kit” Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Stratagene) con SYBR Green para la detección de amplicones. Se utilizó el termociclador MX3005P (Stratagene). Se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas de una de las muestras para determinar la eficiencia de cada una de las reacciones. La cuantificación se llevó a cabo comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un gen de referencia sobre su umbral. Como gen endógeno se comparó la expresión de ciclofilina para asegurar que no hay variaciones del gen de referencia. Los resultados fueron expresados aplicando el método  $\Delta\Delta C_t$ s en los cuales la cantidad de ARN fue expresada como veces sobre lo amplificado en el estadio embrionario 13 (E13).

Para cada estadio del desarrollo se utilizó un n=3 y para cada uno de ellos la cuantificación fue realizada por triplicado.

**Tabla 1. Partidores específicos para RT-PCR convencional y qRT-PCR cuantitativo.**

Nombre	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Producto
partidor	(5'- 3')	(3'- 5')	PCR (pb)
rPP1 alfa	ATTCATGCTGCCATGGG TCA	CCCACAATCTGGTCTGCC AT	204
rPP1 beta	GGCGAGTTTGACAATGC TGG	GACGTCCAGAATTCAGCC CA	124
rPP1 beta3	TTTGTGCGAGCCCATCAG GTG	GATTAGCTGTTCGAGGCG GA	240
rPP1 gamma	AGCCCATCAGGTGGTTG AAG	GTCCCACTAGGCAGTGTC AA	262
Ciclofilina	TGGAGATGAATCTGTAG GAGGAG	TACCACATCCATGCCCTCT AGAA	239
rIIIIG9	ACAACCCCGAGCTATGTT CGG	GGCACGTCTCGATAGAAG GG	277
Par-3	GCCACGAATCATCCGAG GAA	AAGGCTGATCACTGGAC GTG	176
hIIIIG9- HindIII	CCCAAGCTTATGATGGGGAAACTCCC		1275
hPP1 alfa-	CCCAAGCTTATGTCCGACAGCGAGAAG		1023

---

HindIII		
hPPI1 alfa-	CGGTACCGTCGACCCTTTCTTGGCTTTGGCGGA	858
Sall		

---

## 5. Hibridación *in situ*.

Los cerebros obtenidos de estadios embrionarios y adultos fueron fijados en formalina al 10%, incluidos en parafina, cortados y montados en portaobjetos con Vectabond® (Vector Laboratories, Inc, CA, USA), para esto se utilizó un baño termoregulado en H<sub>2</sub>O-DEPC al 0.1% v/v. Luego los cortes histológicos montados se mantuvieron en estufa humificada a 60°C. Los cortes histológicos desparafinados fueron tratados con proteinasa K (1µg/µL, Sigma) por 5 minutos a 37 ° C. Para detener la reacción se realizaron dos lavados de 3 minutos con PBS-DEPC al 0.1% v/v. Posteriormente, las muestras se fijaron nuevamente en PFA frío al 4% en PBS-DEPC por 5 minutos y se volvió a repetir el proceso de lavado descrito anteriormente para retirar el exceso de fijador. A continuación, los tejidos fueron acetilados con una solución de trietanolamina 120 mM (pH 8.0) (Sigma Aldrich Co, St. Louis, USA), HCl 36% v/v (Merck, Darmstadt, Germany) y anhídrido acético 0.26% v/v (Merck, Darmstadt, Germany) en PBS-DEPC al 0.1% v/v por 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente, se realizaron tres lavados de tres minutos cada uno con PBS-DEPC al 0,1%. Los cortes histológicos fueron pre-hibridados con una solución de pre-hibridación, que contenía una solución salina (0.28M NaCl, 0.001M Tris-Base, 0,009 M Tris-HCl; 0,0034M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,005M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 1µL de ARNt (100 mg/mL) (Roche Applied Science),

formamida 50% v/v, DTT 10 mM, dextran sulfato 10% p/v, solución Denhart 1X (ficoll 0.2% v/v, polivinilpirrolidona 0.2% v/v y BSA 0.2% p/v) y H<sub>2</sub>O-DEPC 0.1% v/v por 30 minutos a 37°C. Luego, las muestras pasaron por el proceso de hibridación utilizando las sondas correspondientes (sentido y anti-sentido) en una dilución previa 1:100 en la solución de hibridación que contenía formamida 50% v/v, NaCl 0.6 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, solución Denhart 1X, DTT 10 mM, tARN 500 µg/mL, heparina 50 µg/mL y ADN carrier 500 µg/mL. Los portaobjetos fueron incubados con la solución de hibridación en cámara humificada a 42°C, durante toda la noche. Luego del proceso de hibridación, las muestras fueron sometidas a lavados astringentes con solución salina de citrato (SSC) en concentraciones decrecientes: 2X SSC a 42°C, dos veces por 5 minutos cada uno; 1X, 0.2X y 0.03X a 37°C, 2 veces cada uno por 15 minutos, que permitió disminuir la unión inespecífica de la sonda. Las soluciones de citrato SSC, se realizaron utilizando una solución madre 20X (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio, pH 7.0). El revelado de la reacción fue realizado de la siguiente manera: las muestras fueron lavadas en tampón 1 (Tris-HCl 400 mM pH 7.5, NaCl 300 mM) por 10 minutos a temperatura ambiente y luego incubadas en suero de oveja normal (SON) al 2% v/v en tampón 1 por 20 minutos. El anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (FA) fue incubado por 2h en una dilución 1:500 en tampón 1 más SON al 0,1% v/v en oscuridad. Luego de la incubación, las muestras fueron lavadas en tampón 1 dos veces por 10 minutos y tampón 3 (Tris-HCl pH 9.5 200 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM), tres veces por 10 minutos cada lavado, para posteriormente revelar la actividad de la FA, utilizando como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y azul de nitrotetrazolio (NBT) (NTB/BCIP tablets, Roche Applied Science). Las muestras fueron incubadas en la solución de revelado hasta los primeros indicios de reactividad en la muestra control (con sonda sentido), deteniendo la reacción con agua corriente. A la forma de control se utilizó la

sonda sentido y la omisión de la sonda. Finalmente, las muestras fueron montadas en medio acuoso y observadas por microscopía en campo claro, utilizando el microscopio óptico Zeiss, modelo Axioplan 2.

## **6. Procesamiento histológico.**

**6.1 Fijación de tejidos.** Se utilizaron tejidos cerebrales de animales en diversos estadios del desarrollo embrionario, postnatal y adulto. En el caso de los estadios embrionarios, las ratas preñadas fueron anestesiadas con Ketamina, Xilacina y Pacifor™ (40%, 40%, 20% respectivamente), luego de verificar la ausencia de reflejos, se realizó una incisión en la zona abdominal y se expuso los cuernos uterinos para extraer los embriones (E11, E13, E15 y E17), rápidamente utilizando el material de disección bajo una lupa se extrajeron los cerebros y se fijaron por inmersión en PFA al 4% por 24 horas a 4°C.

**6.2 Inclusión y corte.** Se realizó el proceso de inclusión que comprende el paso de los tejidos en concentraciones crecientes de alcohol (70°, 96° y 100°), luego en HistoClear (I, II y III) y posteriormente en parafinas (I, II, III, IV) mantenidas en estufa termoregulada a 60°C. Finalmente, se obtuvo un bloque de parafina con el tejido en su interior que fue cortado frontalmente en micrótopo rotatorio (Reichert-Jung 2040) con un grosor de 7 µm que luego fueron montados en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. El mismo procedimiento fue realizado para ratas postnatales y adultas, sin embargo, el sacrificio se realizó mediante perfusión transcardial.

**6.3 Preparación tisular "Whole Mount en-Face".** Con el fin de analizar la distribución de las proteínas de estudio en las regiones de adhesión celular apical mediante análisis de

inmunofluorescencia y microscopía confocal, se desarrolló la técnica conocida como "*Whole Mount en-Face*" que permitió exponer la cara apical o luminal de la pared ventricular postnatal y adulta. Para ello se utilizó el protocolo descrito por Grondona y col., 2013. Para este procedimiento, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas por dislocación cervical (descrito anteriormente). Se extrajo el cerebro completo y se realizaron cortes transversales a nivel del quiasma óptico y en la porción más caudal de los ventrículos cerebrales, utilizando un bisturí. El cerebro disectado es fijado en PFA al 4% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, se retiró del fijador y se lavó con PBS frío para continuar con el proceso de disección, esta vez utilizando una lupa estereoscópica. Se realizaron dos cortes en forma perpendicular a los realizados en la primera etapa, uno a través del telencéfalo (región dorsal) y el otro en la región caudal del ventrículo lateral (región ventral). De esta forma se expuso la pared ventricular septal y estriatal, ambas con células endoteliales en su superficie. Finalmente, se diseccionó solo la pared endotelial, con cuidado de no dañar la cara apical con el material de disección. Se eliminó el exceso de tejido (parénquima cerebral), dejando un explante de aproximadamente 0,5 mm de grosor, para facilitar su manipulación en las técnicas descritas posteriormente.

## **7. Inmunofluorescencia.**

Los cortes histológicos montados fueron desparafinados y rehidratados con baños sucesivos en HistoClear (I, II y III), etanol (100%, 96%, 70% y 50%) y luego un lavado en agua destilada por 5 minutos. En seguida fueron tratados con citrato de sodio 2N (pH 6.0) a intervalos de ebullición durante 10 minutos con el objetivo de exponer los antígenos presentes en los tejidos.

Al enfriarse, se realizaron tres lavados por 10 minutos con Tris-fosfato 10 mM (Tris 10 mM, NaCl 120 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 mM, pH 7.8). Se incubaron los anticuerpos primarios (Tabla 2) en Tris-BSA 1% p/v en cámara húmeda por 16 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) para luego incubar los anticuerpos secundarios, que en el caso de PP1 alfa (ratón) se utilizó el kit de amplificación de señal biotina - estreptavidina. El anticuerpo DSBx<sup>TM</sup>biotin se incubó durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego, las muestras se lavaron en Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) y se incubó con Streptavidin- AlexaFluor 568 junto a los demás anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3), junto al marcador nuclear Hoescht 33258 (1:1000, Sigma-Aldrich) durante 2-4 horas en oscuridad, temperatura ambiente y en cámara húmeda. Finalmente, se lavaron los tejidos tres veces por 10 minutos con tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) y se montaron con medio de fluorescencia (Dako), utilizando cubreobjetos.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios.**

<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>
Anti-PP1 $\alpha$ (N-19)	Cabra	1:20 (IHQ)	Santa Cruz
		1:1000 (WB)	Biotechnology, USA.
Anti-PP1 $\alpha$ (10C6-3)	Ratón	1:250 (IHQ)	BD Transduction
		1:2500 (WB)	Laboratories
Anti-PP1 $\beta$ (C-20)	Cabra	1:20 (IHQ)	Santa Cruz

		1:200 (WB)	Biotechnology
Anti-PP1 $\gamma$ (C-19)	Cabra	1:20 (IHQ)	Santa Cruz
		1:1000 (WB)	Biotechnology
Anti-III G9	Conejo	1:1000 (IHQ)	Cifuentes <i>et al.</i> , 2017
Anti-III G9	Conejo	1:1000 (IHQ, PLA)	Protein Atlas
Anti-Par-3	Conejo	1:200 (IHQ, PLA)	Merck
Anti-Pan cadherina	Ratón	1:5000 (IHQ)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Anti-E cadherina	Ratón	1:1000 (IHQ, PLA)	BD Transduction Laboratories™
Anti- N cadherina	Ratón	1:200 (IHQ)	Life Technologies
Anti-beta catenina (E-5)	Ratón	1:200 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology, USA.
Anti-vimentina #AB5733	Pollo	1:400 (IHQ)	Millipore, CA, USA.
Anti-Tbr2	Pollo	1:100 (IHQ)	Millipore, CA, USA.
Anti-caspasa 3 clivada	Conejo	1:50 (IHQ)	Millipore, CA,



activa #AB3623			USA.
Anti-GFAP	Conejo	1:200 (IHQ)	Dako, CA, USA.
#Z0334			
Anti- $\alpha$ -tubulina acetilada	Ratón	1:4000 (IHQ)	Sigma-Aldrich
#T6793			
Anti- $\beta$ -actina-HRP	Ratón	1:10000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios.**

Nombre	Especie	Dilución	Origen
DSBx™Biotin	Burro	1:200	Life Technologies
Anti- Cabra			
DSBx™Biotin	Burro	1:200	Life Technologies
Anti-Ratón			
Streptavidin-Alexa Fluor-568	-	1:200	Life Technologies
Anti-IgG de ratón Cy <sup>5</sup>	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de conejo Cy <sup>2</sup>	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de cabra-HRP	Conejo	1:5000	Jackson Immunoresearch
		(WB)	

## **8. Estudios de colocalización.**

Se realizaron análisis de doble y triple marcaje utilizando dos a tres anticuerpos primarios diferentes, preparados en diferentes especies animales para evitar reactividad cruzada (Tabla II). De este mismo modo, los anticuerpos secundarios (Tabla III) que se encuentran dirigidos contra especies específicas, están acoplados a diferentes fluoróforos para detectar individualmente las proteínas en cuestión. Los anticuerpos se prepararon en una misma solución de Tris-BSA 1% p/v, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se realizó un análisis del coeficiente de Manders, entre los canales fluorescentes verde (IIIG9/Par-3) y magenta/rojo (cadherinas) en diversos estadios del desarrollo y en cistos 3D de células MDCK, en donde se utilizó el software Imaris 7.4 (BitPlane) con un umbral de señal determinado de forma manual o automática dentro de la región de interés (ROI), que corresponde a las uniones adherentes en los diversos contextos tisulares y celulares. Respecto a la cuantificación del área en  $\mu\text{m}^2$  en las imágenes obtenidas por microscopía confocal utilizando diversos fluoróforos, se realizó utilizando el software de edición de imágenes de microscopía, ImageJ. Este servicio se encuentra disponible en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA-BioBio) de la Universidad de Concepción.

## 9. Análisis de Entropía de Shannon.

Las imágenes obtenidas desde las inmunofluorescencias con el anticuerpo para cadherinas (pan-cadherinas, Cy5) en los animales tratados con los adenovirus (AdsiIIIIG9-GFP o Adsiβgal-GFP), fueron utilizadas para analizar la entropía de Shannon. Primero se cargaron tres imágenes de cada condición en el programa Python, utilizando la librería opencv, desde cada imagen se definieron tres áreas de interés (ROI), con una dimensión 100 x 100 píxeles. Luego se generó una representación visual para mostrar cada ROI en el contexto de la imagen. Posteriormente se realizó un proceso de limpieza y contraste de imagen, que consistió en una ecualización, umbral adaptativo y escala de grises, para homologar contrastes. Cada ROI fue sometido a un agrupamiento por bins o cestas, que consiste en agrupar cada pixel en un rango de intensidad, contando cuantos píxeles hay en un rango de intensidad definido. En este caso fueron definidos 128 bins o cestas. Posteriormente, se calcula la probabilidad de distribución para cada celda o cesta, contabilizando el número de ocurrencias de valores de intensidad agrupados dentro de un rango, dividido por el número total de celdas. Finalmente, estas probabilidades de distribución fueron utilizadas para calcular la entropía de Shannon, mediante la siguiente fórmula:

$$H(s) = - \sum_z P_z \log_2(P_z)$$

El índice obtenido es utilizado como métrica indicadora de entropía de información, es decir que tan diferente o inesperado es el valor observado entre rangos. A mayor homogeneidad, menor índice de Shannon, indicando menor información, mientras que, a mayor heterogeneidad, mayor índice de Shannon, indicando mayor desorden y por lo tanto mayor información (Shannon, 1948).

## **10. Microscopía.**

Las muestras fueron visualizadas por microscopio óptico Zeiss, modelo Axioplan 2 y las imágenes fueron obtenidas con el software Nikon ACT-1 en campo claro. Por otro lado, los análisis por fluorescencia se realizaron con microscopía confocal espectral en el equipo LSM-780 NLO (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipado con láser Diodo DPSS (405 nm), láser de argón (458 – 488– 514 nm), láser Diodo DPSS (561 nm) y láser de helio-neón (633 nm). Las imágenes y reconstrucciones tridimensionales fueron analizadas y procesadas con el software Zeiss 2012 (Zeiss). Además, se utilizó el microscopio confocal de alta resolución espacio-temporal SP8 Lightning, Leica, que se encuentra equipado con cuatro líneas de láser (405, 488, 561 y 633 nm) y cuatro detectores espectrales. Los servicios de microscopía confocal espectral se encuentran disponibles en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción.

## **11. Microscopía electrónica de transmisión e inmunotinción con oro.**

Se analizaron muestras de pared ventricular embrionaria, postnatal y adulto. Los animales fueron perfundidos transcárdialmente o fijados por inmersión con PFA al 2% y glutaraldehído al 0.5% en tampón fosfato 0.1 M. Luego, los cerebros fueron disectados y mantenidos en PFA al 2% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se cortaron secciones semifinas de 1 µm usando el vibrátomo. Las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-IIIIG9 (1:1000, policlonal de conejo) a 4°C durante 4 días, se lavaron y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con las partículas coloidales ultrapequeñas de oro (EMS-#25801) en una dilución 1:50 durante 24 horas a 4°C. Después de la etapa de mejoramiento con plata, las secciones se lavaron y post fijaron con glutaraldehído al 2,5% durante 20 minutos, se lavaron y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1%. Los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo (BSA al 0.5%, gelatina de pescado al 0.1% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4). Posteriormente, las secciones de tejido se deshidrataron y se incluyeron en Araldita 502 (EMS). Las secciones ultrafinas (60 nm de espesor) se tiñeron ligeramente en acetato de uranilo para su análisis en un microscopio electrónico (Philips CM100).

## **12. Detección de proteínas.**

**12.1 Obtención de extractos totales de proteínas.** Los extractos totales de proteínas se obtuvieron desde pared ventricular, corteza cerebral y tráquea (control) de ratas embrionarias, postnatales y adultas de la cepa Sprague-Dawley. Las muestras fueron obtenidas, trozadas y homogenizadas en solución inhibidora de proteasas (Roche, Mannheim, Germany) que

contiene EDTA 1 mM y PBS 1X (KCl 0.02% p/v, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02%, NaCl 0.802 % p/v, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O 0.286 % p/v, pH 7.4). Se sonicaron en hielo y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las proteínas se obtuvieron del sobrenadante, cuya concentración fue determinada por método de Bradford (Bradford., 1976).

**12.2 Electroforesis de poliacrilamida y transferencia.** Los equivalentes de proteínas totales de cada muestra fueron separados por SDS-PAGE utilizando geles en gradiente de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador se prepara desde dos soluciones independientes, al 5% y al 15% de acrilamida/bis-acrilamida. Los geles contienen los siguientes reactivos: acrilamida 45%- bisacrilamida 1.2 % p/v, SDS 0.1% p/v, persulfato de amonio 0.01% p/v, TEMED 0.0015% v/v y Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8). La solución al 15% de acrilamida/bisacrilamida difiere en que posee sacarosa al 60%. Ambas soluciones se adicionaron a cámaras comunicantes que permiten que ambas se mezclen y generen un gradiente de concentración en el gel separador, permitiendo una mayor resolución de bandas de proteínas. Por otro lado, el gel apilador está compuesto por acrilamida 10%-bisacrilamida 0.25% p/v, SDS 0.1% p/v, TEMED 0.0015% v/v, persulfato de amonio 0.01% y Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8). Se sembraron concentraciones variables de proteínas, entre 25-100 µg que fueron preparadas en tampón de carga 1X (Tris-HCl 250 mM, pH 6.8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1.25 M, azul de bromofenol 0.04% p/v). Se utilizó el tampón de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v, pH 6.8) dentro de la cámara electroforética y fueron aplicados 60 Volts de forma constante durante 3 horas. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (IPVH00010, Merck Millipore Corp), aplicando 40 Ampere de forma constante durante 14 horas. La membrana de PVDF fue previamente activada en metanol por 19 segundos, H<sub>2</sub>O

destilada por 2 minutos y tampón de transferencia (Tris-glicina 1X, metanol 20%, pH 8.8) por 10 minutos.

**12.3 Inmunodetección de proteínas.** Luego de la transferencia y para corroborar la presencia de las proteínas en la membrana de PVDF, las membranas se trataron con rojo Ponceau-S 0,2% en agitación durante 3 minutos. Luego las membranas fueron lavadas con TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7.4, Tween-20 0.05% v/v) y posteriormente con TBS-TL que contiene leche descremada al 5% p/v. A continuación, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 2) en TBS-TL, en cámara húmeda y por 14-16 horas. Se realizaron seis lavados por 5 minutos con TBS-T y luego con TBS-TL. Luego se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (Tabla 3). Los anticuerpos secundarios se incuban en oscuridad y agitación durante 2 horas. Se lavaron nuevamente las membranas y se revelaron por quimioluminiscencia de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Western Lightning Plus-ECL, Perkin-Elmer). Las bandas de inmunoreactividad fueron observadas por quimioluminiscencia en el equipo ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 500 (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA). Posteriormente, se realizó el control de carga, removiendo los anticuerpos de la membrana con la solución Restore<sup>TM</sup>PLUS Western blot Stripping Buffer (46430, Thermo Scientific, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación intensa. Se incubó con el anticuerpo  $\beta$ -actina-HRP (Tabla II) en TBS-TL por 2 horas. Luego las membranas se lavaron con TBS-TL y TBS-T, para ser finalmente reveladas de la manera descrita anteriormente.

### **13. Construcción de proteínas de fusión fluorescentes para IIIIG9 y PP1 alfa**

**humano.**

La secuencia humana de IIIIG9 disponible en el plásmido pET28 (Novagen, Nottingham, UK), gentilmente donado por Margarida Fardilha (Fardilha et al.,2011), se amplificó por PCR con los partidores hIIIIG9-HindIII y hIIIIG9-SalI (Tabla 1) y se subclonó la secuencia para IIIIG9 largo (1275 pb) en el vector pCR4Blunt-TOPO, utilizando el kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen). Por otra parte, para PP1 alfa se utilizó cDNA de células AF22 (neuroepiteliales humanas) (Falk y col., 2012), donde se amplificaron dos variantes de 858 pb (secuencia corta) y de 1023 pb (secuencia larga) con los partidores hPP1a-HindIII y hPP1a-SalI (Tabla 1) las cuales fueron clonados en el vector pCR4Blunt-TOPO. Sin embargo, se utilizó solo la secuencia larga para los análisis posteriores.

**13.1 Subclonamiento.** Los oligonucleótidos utilizados para ambos genes contienen las secuencias de restricción en los extremos 5' HindIII (New England Biolabs), para el oligonucleótido sentido, y SalI (New England Biolabs), para el oligonucleótido anti-sentido (Tabla I). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) y luego subclonados a los vectores fluorescentes (Clontech).

**13.2 Amplificación de los ADNc por PCR y clonamiento al vector pCR4Blunt-TOPO.** La amplificación del ADNc obtenido, se realizó en un termociclador ProFlex PCR System by Life Technologies®. La presencia de los oligonucleótidos degenerados para hIIIIG9L y hPP1alfaL, amplificaron productos de PCR de 1275 pb y 1023 pb, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron con una mezcla de Taq ADN polimerasa/Pfu polimerasa en



una relación 9 unidades/1 unidad, respectivamente. El volumen de reacción utilizado fue de 50  $\mu\text{L}$ , y contenía: 500 ng de cada plásmido de forma independiente, Tris- HCl 10 mM (pH 8.8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8%,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno) y partidores específicos (0.5  $\mu\text{M}$  de cada uno). Para IIIIG9 y PP1 alfa se utilizaron las mismas condiciones de mezcla para la amplificación. El programa utilizado para la obtención de los fragmentos fue: 5 minutos a 95°C, se adicionó una mezcla de enzimas polimerasas Taq/Pfu (9:1), seguido de 30 ciclos de: 60 segundos de denaturación a 95°C, 60 segundos de alineamiento a 55°C y 3 minutos de extensión a 72°C, más una extensión final de 20 minutos. Un 10% del volumen de la mezcla de reacción fue analizado en un gel de agarosa al 0,8% p/v.

Para el subclonamiento del cADN de IIIIG9 y PP1 alfa humano, el producto de PCR purificado y cuantificado por gel, fue clonado en el vector pCR®4Blunt-TOPO® utilizando el kit Zero Blunt® TOPO® PCR cloning (Invitrogen). Para la reacción de clonamiento se agregaron 10 ng del vector TOPO pCR Cloning, 1.5 ng del producto de PCR, 200 mM de NaCl y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y se completaron a un volumen final de 6  $\mu\text{L}$ . La mezcla fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó en hielo. El producto ligado al vector TOPO, fue transformado en bacterias químicamente competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  T1 (Top Ten One shot® Chemically Competent cells *E.coli* DH5 $\alpha$  T1, Invitrogen), para lo cual se descongelaron 50  $\mu\text{L}$  de las bacterias mencionadas a las que se le agregaron 3  $\mu\text{L}$  de la mezcla de clonamiento TOPO/hIIIIG9L o TOPO/hPP1alfaL. Como control positivo de la reacción se utilizó 0.5  $\mu\text{L}$  del plásmido pUC19. El protocolo de transformación fue realizado como se describió anteriormente. A continuación, las bacterias fueron sembradas en placas con agar LB/kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las placas fueron incubadas toda la noche en una estufa a 37°C. Las colonias obtenidas después de la incubación fueron aisladas y crecidas en medio

LB/kanamicina (50 µg/mL) para proceder a seleccionar los clones obtenidos y purificar los plásmidos. Las purificaciones de los diferentes clones fueron obtenidos mediante el kit E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep (Omega Bio-Tek). La selección de los clones se realizó mediante ensayos de restricción con la enzima HindIII y Sall y análisis mediante PCR con partidores específicos.

**13.3 Subclonamiento de hIIIG9L y hPP1alfaL, digestión de vectores y purificación de fragmentos.** Para el subclonamiento de los fragmentos hacia los vectores de expresión eucarionte pEYFP-N1 o pECFP-N1 (Clontech) se realizó la digestión sucesiva de 3 µg de los plásmidos TOPO-hPP1alfaL, TOPO-hIIIG9L, pEYFP-N1 y pECFP-N1 con las enzimas de restricción HindIII y Sall (10 U, cada una) en tampón 10X NEB3.1 y BSA 100 µg/mL en un volumen final de 30 µL durante 4-5 horas a 37°C. En todos los casos, la digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa al 0,8% p/v. Posteriormente, los productos de cada ensayo de restricción (plásmidos pEYFP-N1, pECFP-N1 digeridos y los fragmentos que contenían los cADN para hIIIG9L y hPP1 alfaL) fueron purificados desde un gel de agarosa al 0,8% que contenía GelRed<sup>TM</sup> (Biotium) para la visualización del ADN mediante Wizard SV Gel and PCR Clean Up System® (Promega). Se realizó la purificación de las bandas mediante el kit E.Z.N.A® Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek). Una vez determinado el volumen se agregó un volumen del buffer XP2 y se incubó a 60°C por 7 minutos hasta la disolución completa del gel, agitando en vórtex. La mezcla ADN/gel obtenida fue filtrada en una columna HiBind® DNA Mini columns (Omega Bio-tek) por centrifugación a 13000xg por 1 minutos. El ADN es eluido en 30 µL de agua libre de nucleasas. La cuantificación de los productos de digestión se realizó mediante un gel de agarosa semicuantitativo (utilizando el 10% del volumen de la elución, 3 µL), comparando las bandas con un estándar de ADN.

**13.4 Ligación de los fragmentos.** Los vectores e insertos purificados se mezclaron en una relación molar de 1:3 con la T4ADN ligasa 1U y el tampón de ligación 5X de la enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción fue incubada a 4°C por 16 horas.

**13.5 Transformación en bacterias competentes.** Para el procedimiento de transformación se utilizó *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competente (Invitrogen). Se descongelaron 25  $\mu$ L de las bacterias en hielo, y se les agregó 5  $\mu$ L de la mezcla de ligación. La mezcla fue incubada por 30 minutos en hielo y luego fue sometida a un golpe de calor a 42°C por 30 segundos. Se dejó la mezcla en hielo y se agregaron 250  $\mu$ L de medio S.O.C (Invitrogen). El tubo fue incubado en agitación (225 rpm) a 37°C por 1 hora. A continuación, se sembraron las bacterias en placa de agar LB con kanamicina 50  $\mu$ g/mL. Las placas se incubaron toda la noche en una estufa a 37°C. Las colonias obtenidas después de la incubación fueron aisladas y crecidas en 3 mL de medio LB con kanamicina 50  $\mu$ g/mL a 37°C, en agitación, toda la noche para proceder a purificar el ADN plasmidial de los diferentes clones.

**13.6 Purificación del ADN plasmidial.** El ADN plasmidial de cada colonia aislada se purificó utilizando el kit E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit II (Omega Bio-tek). Previo a la purificación, se guardó un stock de los cultivos de bacterias en glicerol 15% v/v a -80°C. Se aisló una colonia desde una placa seleccionada y se inoculó en 1 a 5 mL de medio LB que contenga el antibiótico selectivo apropiado. Se incubó por 12-16 horas a 37°C en agitación vigorosa (300 rpm, aproximadamente). Luego se centrifugó a 10000  $\times$ g por 1 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró y descartó el sobrenadante que contenía el medio de cultivo. Se adicionó 250  $\mu$ L de la solución I/RNasa A, se mezcló muy bien, ya que la resuspensión completa es relevante para obtener buenos rendimientos. La mezcla se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se agregaron 250  $\mu$ L de solución II. El tubo se invirtió hasta obtener

un lisado claro y se incubó por 2 a 3 minutos. Se mezcló con cuidado. Se agregaron 350  $\mu$ L de la solución III, inmediatamente se invirtió el tubo varias veces hasta que se observó un floculado blanco. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad (13000 xg por 10 minutos), formándose un precipitado blanco compacto. Se insertó una columna de ADN HindBind® en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto, se desechó el filtrado y se reutilizó el tubo de recolección. Luego, se agregaron 500  $\mu$ L del tampón HBC. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad por 10 minutos y se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Se adicionaron 700  $\mu$ L de buffer de lavado de ADN, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto, se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Luego se centrifugó la columna de ADN HiBind® vacía durante 2 minutos a máxima velocidad, para secar la matriz de la columna. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga limpio y se agregaron 30-100  $\mu$ L de tampón de elusión al centro de la membrana, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto (se puede repetir proceso).

**13.7 Verificación del subclonamiento por ensayo de restricción.** Los ADN plasmidiales purificados fueron analizados por ensayos de restricción con endonucleasas. En el caso de los subclonamiento de hIIIIG9L y hPPP1 alfaL se analizaron 800 ng de los ADN purificados, los que fueron incubados con 3U de HindIII y 3U de SalI en un volumen final de 10  $\mu$ L. Los resultados fueron analizados en un gel de agarosa 1% p/v teñido con GelRed™ (Biotium). Uno de los clones que liberó los fragmentos correspondientes fueron seleccionados. Se obtuvo un inóculo inicial desde el stock del glicerol guardado a -80°C y se dejaron creciendo 250 mL de medio LB más kanamicina 50  $\mu$ g/mL. Los plásmidos fueron purificados mediante

NucleoBond® Xtra Maxi EF Macherey-Nagel, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos plásmidos se denominaron pECFP-N1/hPP1 alfaL y pEYFP-N1/hIIIG9L.

**13.8 Elaboración de los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar.** El medio de cultivo líquido se preparó utilizando 20 g/L de medio LB, esterilizado mediante autoclave. Para la preparación de placas con agar LB, se utilizó una solución autoclavada que contenía 20 g/L de medio LB y 15 g/L de agar. Luego fue transferida una alícuota adecuada de esta solución junto a 100 µg/mL de ampicilina o 50 µg/mL de kanamicina a las placas de Petri estériles.

#### **14. Transfección de células HEK293T para realizar los ensayos de FRET.**

Para la transfección con Lipofectamina 3000® (Invitrogen) en células HEK293T, las células fueron cultivadas y sembradas sobre cubres de vidrio en placa de 24 pocillos por 24 horas. Los cultivos en adhesión deben alcanzar una confluencia cercana al 70-90%, luego de esto, se procedió a realizar la transfección. Primero se diluyó el reactivo Lipofectamina 3000® en Opti-MEM™ (Invitrogen) en un volumen final dependiente del área a transfectar (1 µL para un pocillo de 24). Se preparó el mix de reacción de ADN (0.5 µg de cada plásmido) en Opti-MEM™ (sin suero ni antibióticos) y luego se adicionó el reactivo P3000™. La mezcla se homogenizó muy bien. Luego se adicionó el ADN diluido en cada tubo de Lipofectamina™ 3000 diluida (1:1) y se dejó incubar entre 10-15 minutos a temperatura ambiente. Previamente, a las células en adherencia se les realizó un cambio de medio y se les agregó por goteo la mezcla de transfección. Finalmente, las células se incuban por 48 o 72 horas en la cámara de

cultivo, hasta que son fijadas en PFA 4% y fueron procesadas para inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal.

## 15. Análisis de FRET.

Para los análisis de FRET se co-transfectaron los plásmidos hIIIIG9L-EYFP y hPP1alfaL-ECFP. Como control positivo se transfectó el vector pECFP-N1-7aa-pEYFP-N1. Como controles negativos se utilizó el par “pECFP y hIIIIG9L-EYFP” y el par “pEYFP y hPP1alfaL-ECFP”. Luego de 48 h, las células fueron lavadas con PBS 100 mM (pH 7.4) y fijadas en PFA 4% p/v durante 30 minutos y finalmente fueron analizadas en el microscopio multifotón espectral, LSM780 Zeiss. La señal medida en el canal de FRET ( $\lambda$  excitación a 436 nm,  $\lambda$  emisión a 528 nm) fue corregida respecto al traspaso de señal inespecífica proveniente del canal del dador CFP ( $\lambda$  excitación a 436 nm,  $\lambda$  emisión a 488 nm) y del canal de aceptor ( $\lambda$  excitación a 517 nm,  $\lambda$  emisión a 528 nm), usando la siguiente ecuación:

$$T_{NE} = S_{FRET} - (\alpha + \beta)$$

Donde  $T_{NE}$  es la Transferencia neta de energía (FRET neto),  $S_{FRET}$  corresponde a la señal de FRET,  $\alpha$  corresponde a la señal del dador y  $\beta$  es la señal del aceptor, las cuales son determinados por el traspaso inespecífico de señales de CFP e YFP, respectivamente en células que expresan cada proteína de fusión por sí sola. En nuestro sistema, aproximadamente el 50-70% de la señal de CFP y un 20-30% de la señal de YFP fue detectada en el canal de FRET. Por su parte, la eficiencia de FRET fue calculada como la razón entre FRET neto/FRET

entregado por el software del equipo. Los resultados corresponden al promedio y desviación estándar de un experimento realizado por triplicado.

## **16. Inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v) de adenovirus en animales embrionarios, postnatales y adultos.**

Para la inyección i.c.v. en cerebros embrionarios E16, se anestesió la rata preñada, se dispuso en una cama termoregulada para realizar la cirugía. Para ello, se rasuró el pelo y la piel fue desinfectada con alcohol 70%. Posteriormente, se realizó una incisión en la parte media baja del abdomen y se expusieron los cuernos uterinos y a contraluz utilizando una lámpara se identificó la cabeza de cada embrión. En esta región, se realizó la inyección en un ventrículo lateral de los respectivos adenovirus AdsiIIIIG9-GFP o Adsiβgal-GFP (control), utilizando un capilar de punta fina. Los embriones fueron regresados a la cavidad uterina para continuar con su desarrollo, para lo cual se suturó la abertura abdominal, se limpió con povidona yodada 10% p/v, y la madre se recuperó en su jaula. Los embriones inyectados fueron llevados a término a la edad de 4 días postnatales para ser sacrificados por perfusión transcardial utilizando PFA al 4%. Los cerebros fueron mantenidos por inmersión en el fijador durante 24 horas a 4°C. Finalmente, los tejidos se cortaron en vibrátomo (Leica) obteniendo cortes de 80 μm que fueron utilizados para realizar análisis inmunohistoquímicos.

## 17. Análisis de ligadura por proximidad (PLA).

Para analizar interacción de proteínas *in situ* se utilizó el kit Duolink® PLA fluorescence (Merck) en células MDCK en cultivo 2D, 3D y cortes histológicos frontales de cerebro adulto de rata Sprague Dawley que fueron previamente fijados con PFA 4%. En esta técnica, se utilizaron los anticuerpos primarios estandarizados previamente hechos en conejo (anti-IIIG9 y anti-Par-3) y ratón (E-cadherina), ya que el kit cuenta con sondas específicas PLUS (conejo) y MINUS (ratón), que reconocen las especies mencionadas. Si las sondas están lo suficientemente cercanas (20 nm) se genera fluorescencia roja a la forma de puntos discretos.

Las células en ambas condiciones fueron lavadas 3 veces por 10 minutos con Tris-P 1X para retirar el exceso de fijador y luego se permeabilizó con Tritón X-100 por 10 minutos. Las células nuevamente fueron lavadas y se incubó la solución de bloqueo Duolink® (40 µL/ 1 cm<sup>2</sup>) dentro de una cámara húmeda a 37°C durante 60 minutos. Al finalizar la incubación, se incubaron las mezclas de anticuerpos en las diluciones estandarizadas, (anti-IIIG9 y anti-E-cadherina) y (anti-Par-3 y anti-E-cadherina) utilizando el diluyente de anticuerpos Duolink®. Los anticuerpos son incubados utilizando una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiran los anticuerpos primarios y las muestras se lavan en solución de lavado A 1X a temperatura ambiente, 2 veces por 5 minutos. Se retira el exceso de buffer y se incuban las sondas PLUS y MINUS, cada una en una dilución 1:5 en el diluyente de anticuerpos Duolink® (40 µL por cada reacción). Las muestras se incuban en cámara de humificada durante 1 hora a 37°C. Luego, durante el proceso de ligación de las sondas se prepara el buffer de ligación 5X en una dilución 1:5 en agua purificada, se retiran la solución que contiene las sondas y se lavaron las muestras con solución de lavado A 1X, dos veces por



5 minutos a temperatura ambiente. Durante el proceso de lavado, se retira la ligasa (-20°C) y se agrega el buffer previamente preparado en una solución 1:40 (40 µL por cada reacción). La solución de ligación se incuba en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se realiza la etapa de amplificación de la señal en donde se diluye el buffer de amplificación 1:5 en agua purificada. Luego, se retiró la solución de ligación y se lavaron las muestras dos veces por 5 minutos con buffer de lavado A 1X a temperatura ambiente. Durante el lavado se retira la polimerasa del congelador (-20°C) y se agrega al buffer de amplificación 1X en una dilución 1:80 y se incuba en cámara húmeda por 100 minutos a 37°C. Finalmente se realizaron dos lavados por 10 minutos con el buffer de lavado B 1X a temperatura ambiente y luego por 1 minuto con el buffer de lavado B 0.001X. Las muestras se montaron utilizando el medio de montaje *in situ* con DAPI Duolink® que corresponde a un medio de montaje líquido y los cubreobjetos fueron sellados con esmalte de uñas transparente. Al secarse, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis mediante microscopía confocal. Cabe destacar que se utilizaron controles negativos de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios.

## IV. RESULTADOS

### **CAPITULO 1. Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de IIIIG9, respecto a la expresión de PP1 $\alpha$ y Par-3, durante la polarización y diferenciación del epitelio ependimario.**

#### **1.1 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 en el epéndimo adulto.**

Utilizando microdissección laser de la pared ventricular, aislamiento del ARNm y RT-PCR cuantitativo, confirmamos la expresión de IIIIG9 en muestras de pared ependimaria de 15 días post-natal (PN) y en el cerebro adulto (Figura 1A-B). Observamos un incremento en la expresión de IIIIG9 entre PN15 y adulto (Figura 1B).

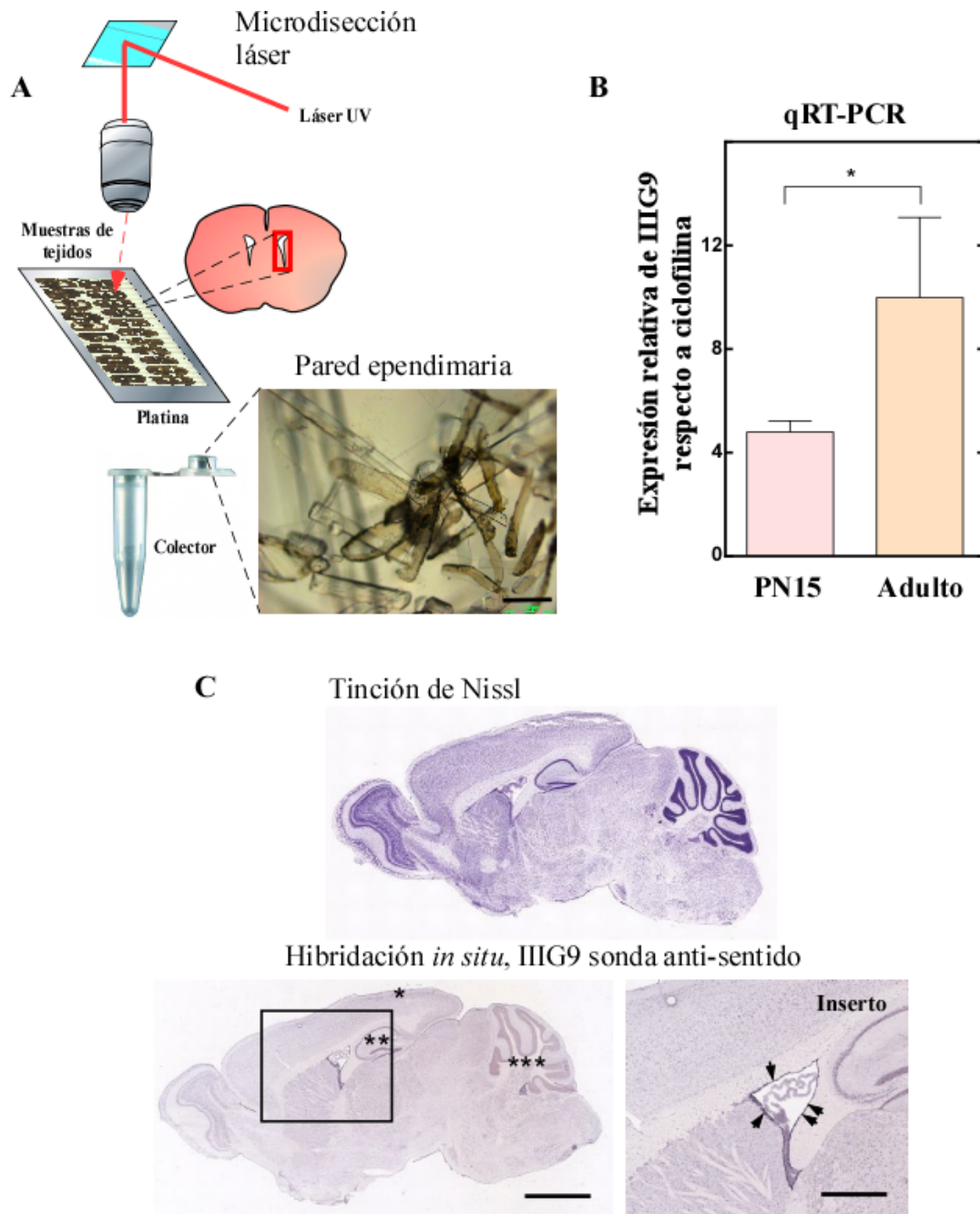
Antes de montar un método de hibridación *in situ* para IIIIG9, utilizamos herramientas de exploración para la búsqueda de mensajeros a nivel cerebral, tales como la base de datos de hibridación *in situ*, *Allen Brain Atlas* para definir el patrón de expresión del ARNm de IIIIG9. Confirmamos que IIIIG9 está ampliamente expresado en el epitelio ependimario de los diferentes ventrículos cerebrales (Figura 1C, inserto y flechas). Adicionalmente observamos que IIIIG9 está expresado en neuronas del hipocampo (\*\*), del cerebelo (\*\*\*) y levemente en neuronas de la corteza cerebral (\*) (Figura 1C, imagen con menor aumento).

Para una aproximación con mayor definición espacio-tisular y celular, montamos la técnica de hibridación *in situ*, en cortes frontales del cerebro adulto (Figura 2A-B). De esta forma, se sintetizaron sondas sentido y anti-sentido marcadas con digoxigenina (DG), para ser reconocidas con un anticuerpo anti-DG. Así, se analizaron las células ependimarias que

tapizan los ventrículos laterales (VL), las neuronas del hipocampo (HC) y las neuronas de la corteza cerebral (CC) (Figura 2B, esquema).

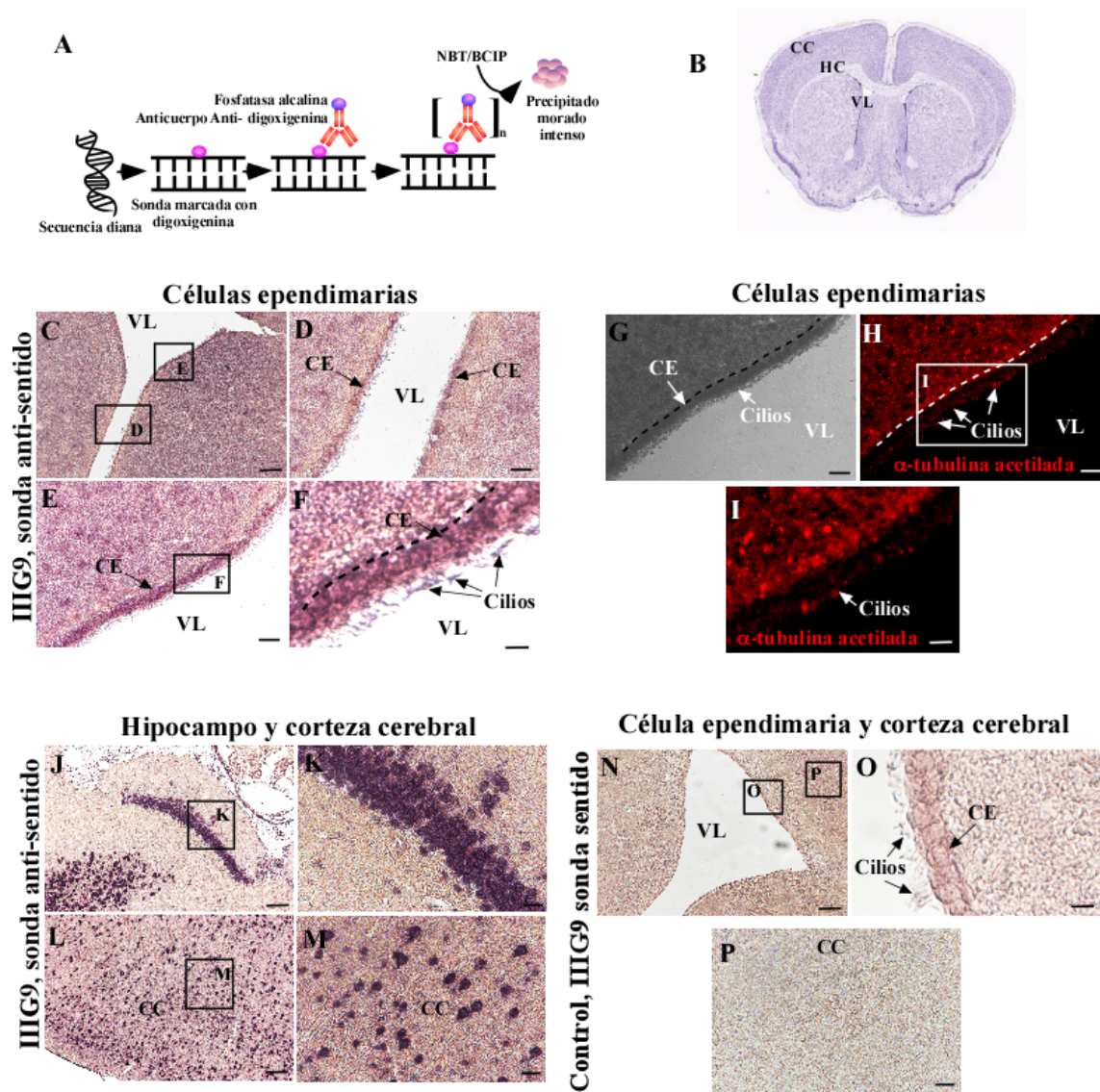
El ARNm para IIIIG9 fue detectado en la pared del ventrículo lateral (Figura 2C, zonas demarcadas), específicamente en el citoplasma y en los cilios de las células endoteliales (CE) (Figura 2D-F). Los cilios fueron también identificados con microscopía de campo claro (Figura 2G) e inmunofluorescencia para  $\alpha$ -tubulina acetilada (Figura 2H-I).

Además, observamos la presencia del ARNm para IIIIG9 en otras regiones del cerebro, como en el soma de las neuronas del hipocampo (Figura 2J, K) y en la corteza cerebral (Figura 2L-M). Como control de la técnica se realizó hibridación *in situ* con una sonda sentido (Figura 2N-P), donde no observamos reactividad positiva en las células endoteliales o neuronas de la corteza cerebral.



**Figura 1. El ARNm de IIIG9 se expresa en la pared ventricular en las células endimarias del ventrículo lateral del cerebro adulto.**

**A.** Esquema de la técnica de microdissección láser (LMD) mostrando el aislamiento de la pared ventricular adulta mediante un láser UV. **B.** Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de IIIIG9 respecto a la expresión de ciclofilina en muestras de pared ventricular de cerebro postnatal 15 (PN15) y adulto, utilizando microdissección láser y qRT-PCR. Análisis estadístico t-student se utilizó para comparar el estadio PN15 día versus adulto ( $*P < 0.1$ ), N= 3. **C.** Imagen de tinción de Nissl y de análisis de hibridación *in situ* obtenidas desde la base *in situ Allen Brain Atlas*, donde se observa la localización del ARNm de IIIIG9 en células endoteliales del ventrículo lateral (flechas), en neuronas del hipocampo (\*\*), el cerebelo (\*\*\*) y levemente en neuronas de la corteza cerebral externa (\*). Barras de tamaño: 3 mm en imagen C de menor aumento y 800  $\mu\text{m}$  en imagen C de mayor aumento.



**Figura 2. El ARNm de IIIG9 se localiza en las células endimarias del ventrículo lateral y en neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral adulta.**

**A.** Esquema de la técnica de hibridación *in situ*. **B.** Esquema de un corte histológico frontal de cerebro adulto, en los cuales se indica la corteza cerebral (CC), el hipocampo (HC) y el ventrículo lateral (VL). **C-F.** Localización del ARNm de IIIG9 en el citoplasma y cilios de

células endoteliales del VL. Análisis de imágenes con diferentes aumentos hibridadas con sonda anti-sentido. N= 3. **G-I.** Pared ventricular analizada con microscopía de campo claro e inmunofluorescencia para  $\alpha$ -tubulina acetilada (Cy3, rojo). Se observan cilios positivos (flechas blancas). N= 1. **J-K y L-M.** Localización del ARNm de IIIIG9 en neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral. N= 3. **N-P.** Corte de corteza cerebral y pared endotelial hibridada con sonda sentido (control). N=3. CE: células endoteliales. CC: corteza cerebral. VL: ventrículo lateral, HC: hipocampo. Barras de tamaño: 100  $\mu\text{m}$ , en C, J, L y N; 30  $\mu\text{m}$  en D, E, G y H; 10  $\mu\text{m}$  en F, I y O y 20  $\mu\text{m}$  en K, M y P.

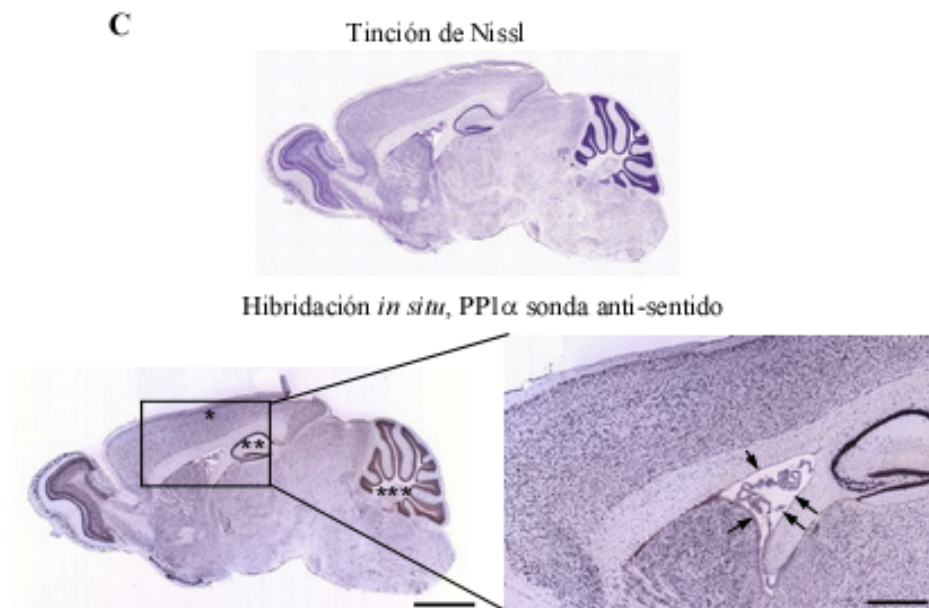
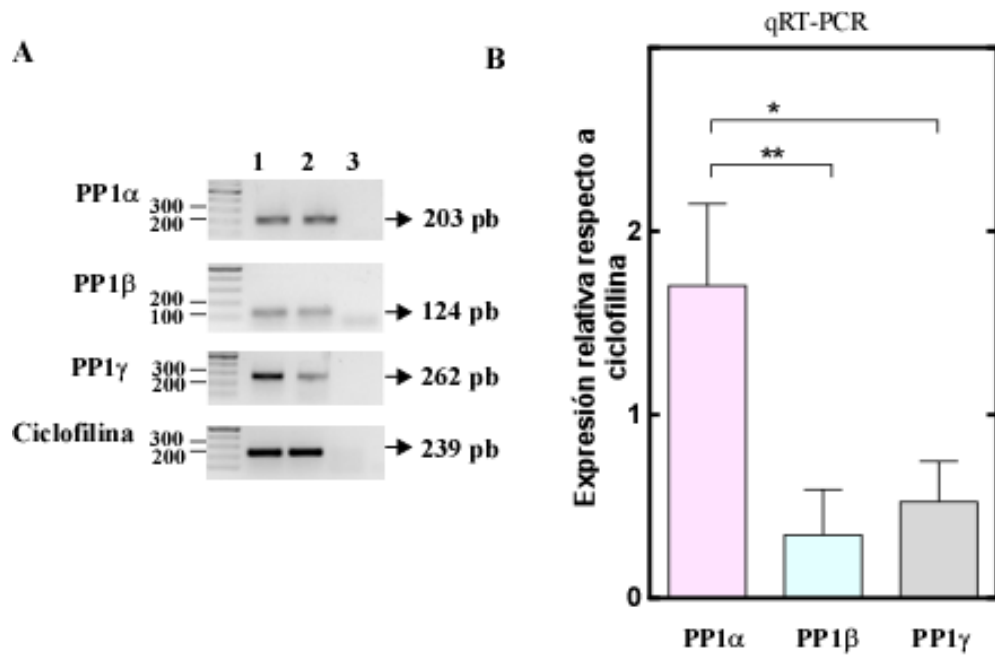
Luego, analizamos la expresión del ARNm de PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  (subunidades catalíticas de PP1), mediante la técnica de RT-PCR convencional. El ARN total fue aislado de explantes de la pared ventricular adulta (Grondona y col., 2013), donde se observó que PP1 $\alpha$ , es eventualmente la subunidad más expresada (Figura 3A, carril 2). Como control positivo se utilizó un extracto de ARN total de corteza cerebral (Figura 3A, carril 1). Para cuantificar los niveles de ARNm codificantes para PP1, se realizó la técnica de microdissección láser, junto con el aislamiento del ARNm y RT-PCR cuantitativo, sólo en la zona de células endoteliales del ventrículo lateral (Figura 3B). Este análisis confirmó que la subunidad PP1 $\alpha$  (al ser comparada con las subunidades beta y gamma), es la subunidad más expresada (Figura 3B). Todos los datos de expresión fueron calculados tomando como referencia la expresión de ciclofilina.

Estos datos confirman lo señalado en las imágenes del *Allen Brain Atlas*, donde se observa por medio de hibridación *in situ*, una amplia expresión de PP1 $\alpha$  en el cerebro, y en células endoteliales (Figura 3C).

Debido a que los estudios previamente presentados sugieren la expresión de IIIIG9 y fundamentalmente de PP1 $\alpha$  en células endoteliales, confirmamos estos resultados en explantes de pared ventricular, por medio de análisis de *Western blot* (Figura 4A), utilizando un anticuerpo específico para estas proteínas. Para la detección de IIIIG9, se utilizó un anticuerpo previamente generado y caracterizado por nuestro laboratorio (Cifuentes y col., 2018; Baeza y col., 2021).

Observamos tres bandas de 53, 51 y 42 kDa para IIIIG9 (Figura 4B), similar a lo reportado previamente (Baeza y col., 2021). La banda más pequeña representa a la isoforma corta de IIIIG9, y las bandas más grandes corresponden a la isoforma más larga (51 kDa), y a una isoforma menos representada de 53 kDa, que se genera por una modificación postraduccional adicional. Como control de carga, se detectó la proteína  $\beta$ -actina; y como control negativo en la técnica inmunológica, se omitió la incubación del anticuerpo primario (Figura 4B). Posteriormente, analizamos la expresión de PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  (Figura 4C-E, carril 2, respectivamente). Como control positivo se analizó un extracto de proteínas aisladas de corteza cerebral (Figura 4C-E, carril 1). Para PP1 $\alpha$  observamos en ambas muestras, una banda de 37 kDa; PP1 $\beta$  fue detectada muy débilmente (36 y 60 kDa); y PP1 $\gamma$  mostró una banda de 35 kDa y otra de 60 kDa, con niveles muy similares en ambas muestras (Figura 4E).

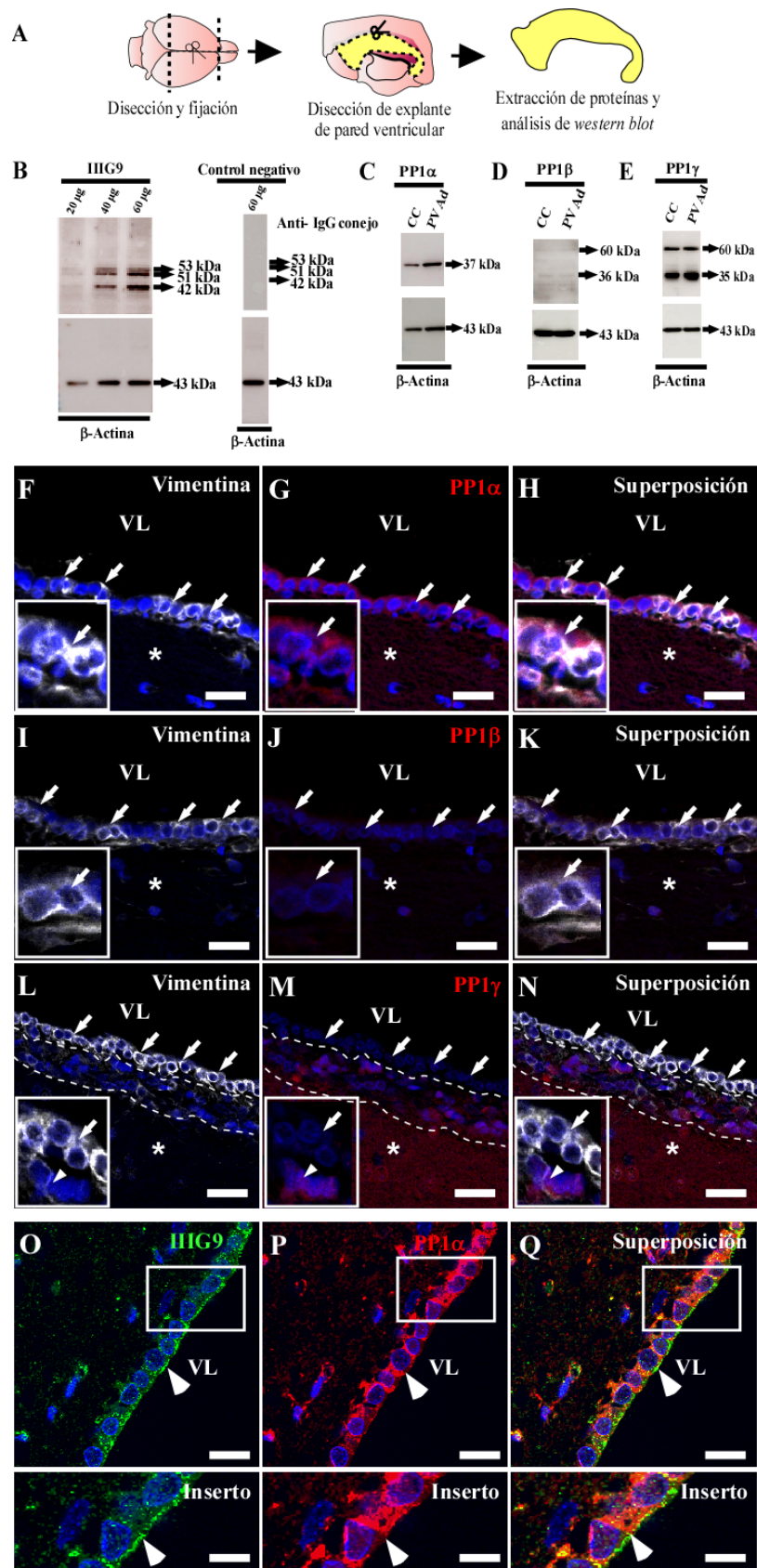




**Figura 3. PP1 $\alpha$  es la subunidad mayormente expresada en las células endimarias de la pared ventricular del cerebro adulto.**

**A.** RT-PCR para PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  utilizando extractos de pared ventricular adulta. Carril 1-2: ADNc de corteza cerebral (control positivo) y pared endimaria adulta, respectivamente. Carril 3: Agua (control negativo). La detección de ciclofilina, corresponde al control interno.

**B.** Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$ , respecto a la expresión del gen para ciclofilina en la pared endimaria adulta, utilizando microdissección láser y qRT-PCR. Análisis estadístico t-student se utilizó para comparar la expresión de PP1 $\alpha$  versus PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  (\* $P < 0.1$ ; \*\* $P < 0.01$ ), N= 3. **C.** Imagen de tinción de Nissl y análisis de hibridación *in situ* obtenidas desde la base *Allen Brain Atlas*, donde se observa la localización del ARNm de PP1 $\alpha$  en células endimarias del ventrículo lateral (flechas), en neuronas de la corteza cerebral (\*), del hipocampo (\*\*), y el cerebelo (\*\*\*). Barras de tamaño: 3 mm en imagen C de menor aumento y 800  $\mu\text{m}$  en imagen C de mayor aumento.



**Figura 4. IIIIG9 y PP1 $\alpha$  se expresan en la pared ventricular adulta y se codistribuyen en la región apical y lateral de las células endimarias.**

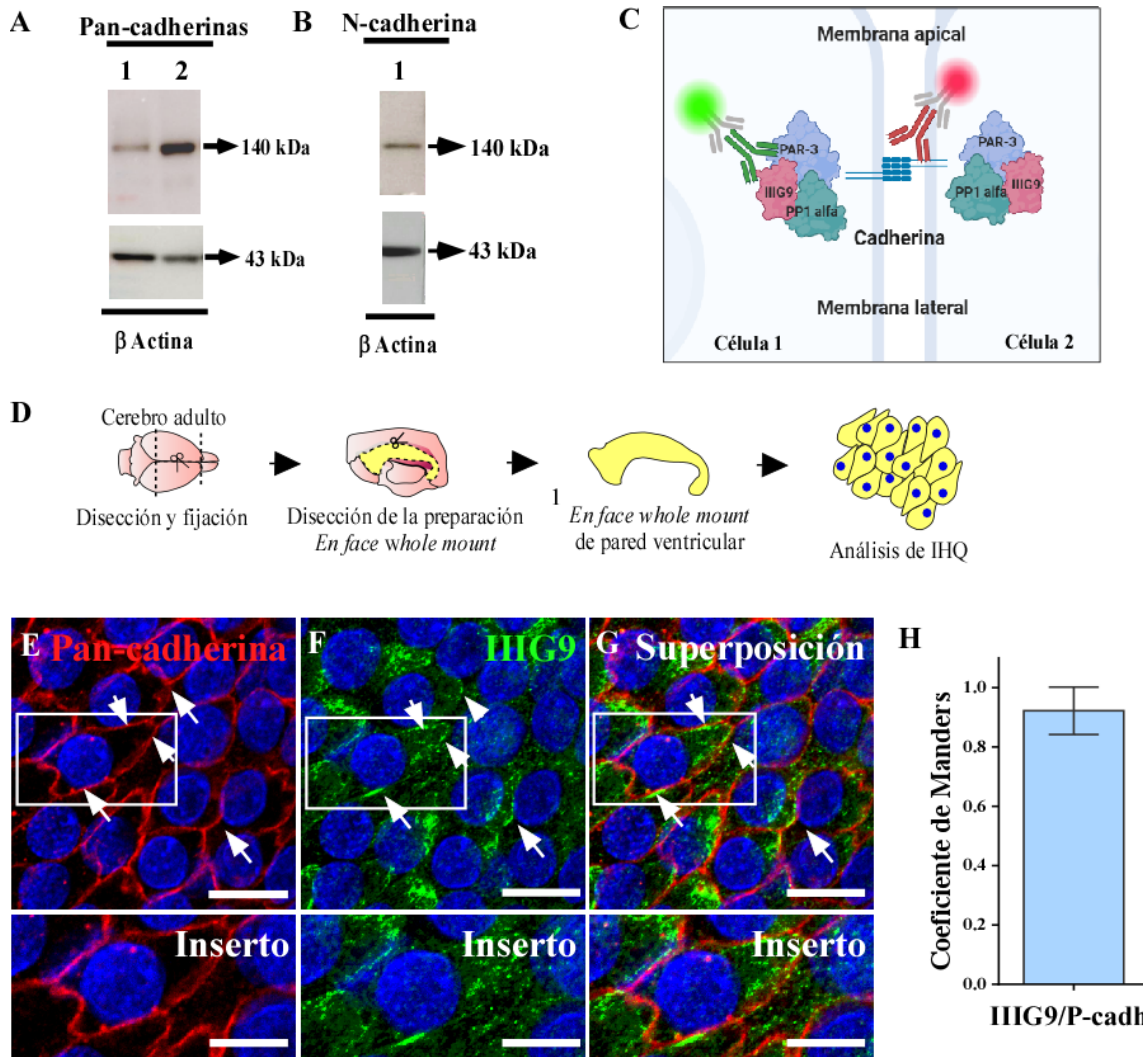
**A.** Esquema representativo del procedimiento de disección de explantes de pared ventricular adulta para la obtención de extractos totales de proteínas para *Western blot*. **B.** Inmunodetección de IIIIG9 utilizando concentraciones crecientes de proteínas (20, 40 y 60  $\mu$ g) donde se observaron bandas de 42, 51 y 53 kDa. La detección de  $\beta$ -actina, se utilizó como control de carga. Para el control negativo, se omitió la incubación con el anticuerpo primario. N= 3. **C-E.** Análisis de *Western blot* para PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  en muestras aisladas de corteza cerebral (carril 1) y de pared ventricular adulta (carril 2). N= 3. **F-N.** Análisis inmunohistoquímico para vimentina y las subunidades PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  y PP1 $\gamma$  donde se observa que solo PP1 $\alpha$  se localiza en células endimarias (flechas) del ventrículo lateral (VL). El área demarcada con líneas discontinuas en L-N muestran la región del nicho neurogénico del VL. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht (azul). N= 3. **O-Q.** Análisis inmunohistoquímico para IIIIG9 y PP1 $\alpha$  donde se observa la localización punteada de IIIIG9 a nivel apical y lateral de las células endimarias del VL. La colocalización entre ambas marcas se observa principalmente a nivel de la región apical (flechas). Los núcleos fueron teñidos con Hoescht (azul). N= 3. Los insertos (cuadro inferior izquierdo) corresponden a aumentos de F-N y O-Q, respectivamente. Barra de tamaño: 30  $\mu$ m en F-N, 20  $\mu$ m en O-Q, 10  $\mu$ m en insertos.

Mediante inmunohistoquímica observamos inmunoreactividad para PP1 $\alpha$  en el citosol de las células endimarias adultas positivas a vimentina (Figura 4F-H, flechas e inserto) y también una reacción difusa en el parénquima cerebral. Para PP1 $\beta$  no detectamos inmunoreactividad en las células endimarias vimentina positivas (Figura 4 I-K, flechas e inserto) como tampoco a nivel parenquimal. Por su parte, PP1 $\gamma$  también mostró una reacción negativa en las células endimarias (Figura 4L-N, flechas e inserto), pero si una intensa señal en el citoplasma de algunas células del nicho neurogénico (área demarcada con líneas discontinuas) que son débilmente positivas a vimentina (cabeza de flecha en inserto), además se observa una difusa inmunoreactividad en el parénquima cerebral (asterisco). Estos resultados pueden explicar las diferencias en las intensidades de las bandas detectadas en los análisis de *Western blot*.

Con los análisis previos confirmamos la expresión de IIIIG9 y PP1 $\alpha$  en la pared ventricular adulta. De esta forma desarrollamos un detallado análisis de microscopía de fluorescencia y confocal, para definir la distribución subcelular de IIIIG9 y su codistribución con PP1 $\alpha$ . Utilizando cortes gruesos generados con un vibrátomo, observamos que IIIIG9 se detecta en las células endimarias de los ventrículos laterales (Figura 4O). Un análisis más detallado sugiere un grado de polarización, siendo más intenso en la zona apical (Figura 4O, flechas), donde se observó un patrón focalizado o puntiforme (insertos). Además, en algunas células se observó en la región lateral (Figura 4O, inserto). En los mismos análisis, detectamos PP1 $\alpha$  en las células endimarias (Figura 4P), sin embargo, su patrón de distribución fue mucho más ubicuo en la célula (Figura 4P, flechas). El análisis de codistribución, mostró una preferente colocalización de ambas proteínas, en la zona apical de las células endimarias (Figura 4Q, inserto y flechas).

Debido a la distribución apical y basolateral de IIIIG9 (en algunas células), realizamos estudios de inmunofluorescencia y codistribución con cadherinas. Inicialmente, caracterizamos dos anticuerpos para cadherinas: anti-pan-cadherinas y anti-N-cadherina (Figura 5A-B). El anticuerpo anti-pan-cadherinas presentó la mejor afinidad, por lo que se utilizó para el análisis de localización (Figura 5C-G).

En este análisis utilizamos la técnica de "*En face whole mount*" de la pared del ventrículo lateral adulto (Figura 5D). Con esta aproximación de análisis tisular, obtenemos una visión más amplia del epitelio a nivel apical. Las cadherinas son proteínas entrecruzantes (ver esquema en Figura 5C), de esta forma la inmunoreactividad observada con el anticuerpo para pan-cadherina muestra una línea continua de inmunoreacción en las células analizadas (Figura 5E, flechas e inserto), lo que corresponde a una estructura de tipo zonula. IIIIG9, posee un patrón puntiforme con ubicación intracelular, cercano a los complejos de unión (Figura 5F y G, flechas e insertos). El coeficiente de Manders indica un valor de  $0.922 \pm 0.079$  (valor promedio  $\pm$  desviación estándar), entre ambas proteínas (N=9) (Figura 5G). Realizando un cálculo general, IIIIG9 debería estar fácilmente a 500 nm distante de la posición central de cadherinas, de esta forma, la distribución y el coeficiente de Manders parecen adecuados.



**Figura 5. IIIG9 se localiza en un patrón puntiforme en el citosol y en cercanía a las uniones adherentes de las células endimarias.**

**A-B.** Análisis de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-Pan cadherinas y anti-N-cadherinas en muestras aisladas de corteza cerebral (carril 1) y de pared ventricular adulta (carril 2), donde se detectó una intensa banda de 140 kDa con ambos anticuerpos. N= 3. **C.** Esquema para la inmunoreactividad de IIIG9 y cadherinas en las regiones de contacto celular.

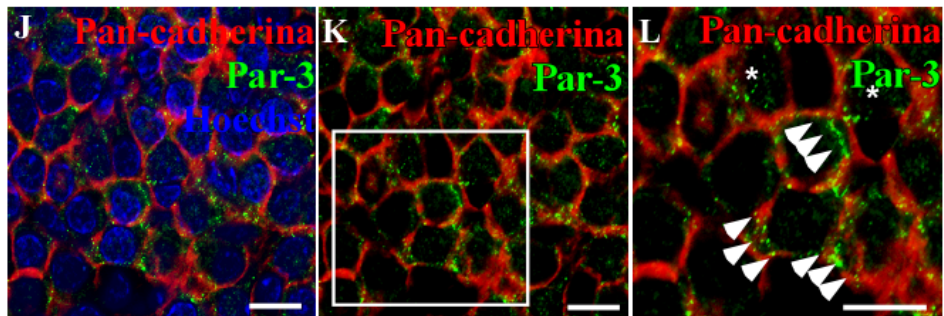
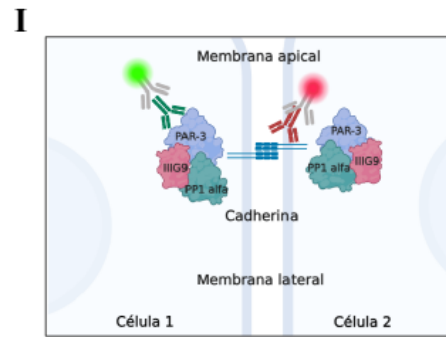
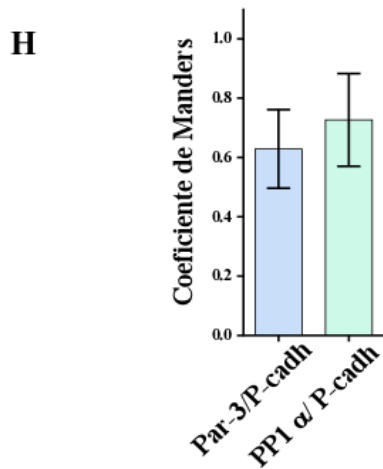
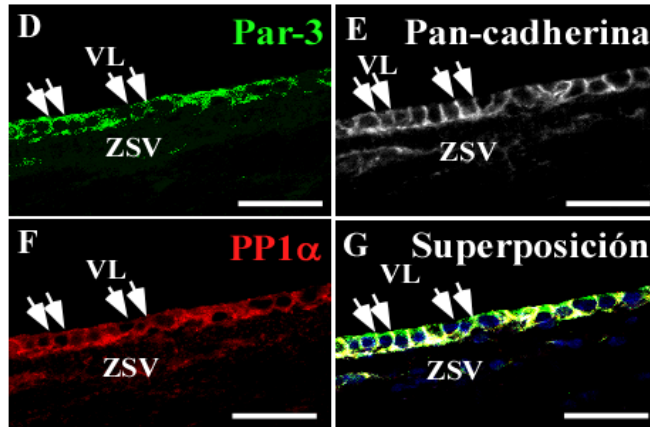
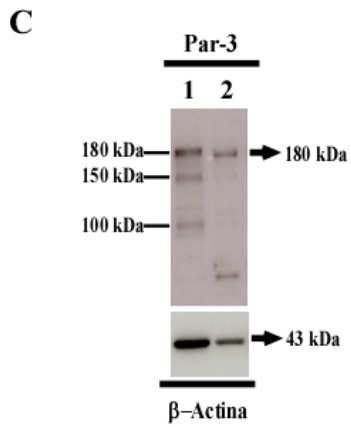
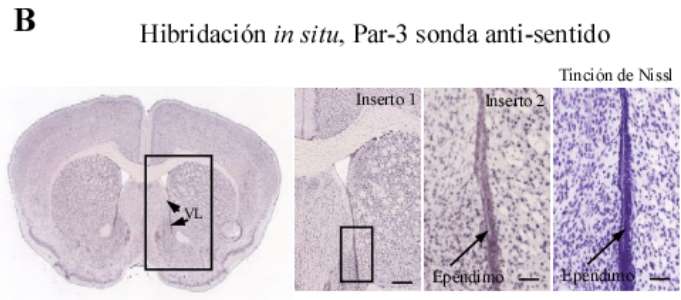
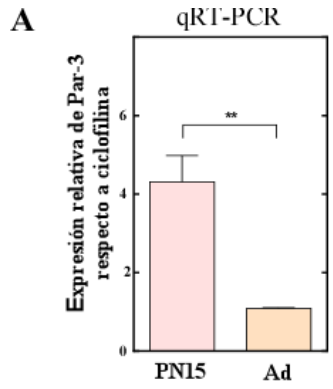
**D.** Esquema para la obtención de la preparación "*En face whole mount*" de la pared ventricular. **E-G.** Análisis inmunohistoquímico para IIIIG9 y Pan-cadherinas en la superficie apical de la pared ventricular adulta (*En face wholemount*), donde se observa la localización punteada de IIIIG9 en el citosol y en cercanía a las uniones adherentes positivas a cadherinas (flechas). Los núcleos fueron teñidos con Hoescht (azul). N= 3. Los insertos corresponden a aumentos de los cuadros en E-G. **H** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIIG9 y pan-cadherinas en la PV adulta (valor promedio  $\pm$  desviación estándar). Barra de tamaño: 10  $\mu$ m en F-G, 5  $\mu$ m en insertos.

Se ha establecido que existe una amplia correlación entre la mantención de las uniones adherentes y la polaridad celular (Coopman & Djiane, 2016). De esta forma, la proteína Par-3, es considerada el organizador maestro de polaridad. Por esta razón, hemos propuesto que el complejo IIIIG9 -PP1 $\alpha$ , mantiene el estado desfosforilado de Par-3, que promueve la mantención de uniones adherentes en células endoteliales. Si la hipótesis planteada es factible, Par-3 debería ser expresada en células endoteliales, manteniendo un patrón similar a IIIIG9.

Utilizando qRT-PCR, hemos detectado Par-3 en muestras de pared ventricular, con una mayor expresión en muestras aisladas a los 15 días post-natal al comparar con el cerebro adulto (Figura 6A). Nuevamente, analizamos la expresión del ARNm y distribución de Par-3, utilizando la información dispuesta en el *Allen Brain Atlas*. Se observó una hibridación positiva en diferentes zonas del cerebro, incluyendo las células endoteliales (Figura 6B, inserto). Además, confirmando su expresión mediante análisis de *Western blot* de muestras aisladas de la pared ventricular. Como control positivo, utilizamos muestras aisladas de células



MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*), estas células expresan las tres isoformas de Par-3 (180, 150 y 100 kDa) (Figura 6C, carril 1), en la muestra de la pared ventricular adulta se detectó fundamentalmente la isoforma de 180 kDa (Figura 6C, carril 2), que ha sido previamente reportada como una de las isoformas más abundante en el SNC (Lin y col., 2000; Atashrazm, 2021).



**Figura 6. La proteína de polaridad Par-3 se expresa en la pared ventricular adulta y se codistribuye en cercanía a las cadherinas de las células endoteliales.**

**A.** Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de Par-3, respecto a la expresión del gen para ciclofilina en la pared endotelial adulta, utilizando microdissección láser y qRT-PCR. Se utilizó un análisis estadístico de t-student para comparar el estadio PN15 días versus el adulto (\*\* $P < 0.01$ ), N= 3. **B.** Imagen de tinción de Nissl y de análisis de hibridación *in situ* obtenidas desde la base de datos *Allen Brain Atlas*, donde se observa la localización del ARNm de Par-3 en células endoteliales del ventrículo lateral (VL) (inserto y flecha). **C.** Análisis de *Western blot* para Par-3 en la pared ventricular (carril 2), donde se observa principalmente la forma de 180 kDa. Como control positivo se utilizó la corteza cerebral (carril 1) y como control de carga la detección de  $\beta$ -actina. N= 3. **D-G.** Análisis inmunohistoquímico utilizando cortes frontales de cerebro adulto para detectar Par-3, pan-cadherinas y PP1 $\alpha$  en células endoteliales del VL. N=3. **H.** Cuantificación del coeficiente de Manders para Par-3/pan-cadherinas y PP1 $\alpha$ /pan-cadherinas en células endoteliales de la PV. **I.** Esquema para la inmunoreactividad de Par-3 y cadherinas en las regiones de contacto celular. **J-L.** Análisis inmunohistoquímico para Par-3 y Pan-cadherinas en la superficie apical de la PV (*En face wholemount*), donde se observa la localización punteada de Par-3 en el citosol (asteriscos) y en cercanía a las uniones adherentes positivas a cadherinas (cabezas de flechas). Los núcleos fueron teñidos con Hoescht (azul). N= 3. La imagen L es un aumento del cuadro en K. ZSV: zona subventricular. Barra de tamaño: 800  $\mu$ m en B en imagen de menor aumento y 240  $\mu$ m en imagen de mayor aumento; 10  $\mu$ m en J-L.

Posteriormente, analizamos la distribución de Par-3 en la pared ventricular adulta (Figura 6D). En el análisis inmunohistoquímico, utilizando cortes histológicos frontales de rata adulta, observamos que Par-3 se distribuye en las células endoteliales a nivel citoplasmático, pero también con una distribución apical y basolateral en algunas células (Figura 6D, flechas). En las zonas con menor tinción, se observa un patrón puntiforme, preferentemente en áreas que pueden corresponder a la membrana apical y lateral de las células (Figura 6D, flechas). De esta forma, en las mismas muestras, realizamos la detección de cadherinas y PP1 $\alpha$  (Figura 6E-F). Se observó que las tres proteínas presentan una co-distribución en el dominio lateral de las células endoteliales. Además, Par-3 y PP1 $\alpha$  se colocan a nivel apical (Figura 6G). En estas muestras realizamos un análisis del coeficiente de Manders para Par-3 y Pan-cadherinas con un valor de  $0.628 \pm 0.132$  (N=9), y para PP1 $\alpha$  y Pan-cadherinas de  $0.726 \pm 0.156$  (N=6) (Figura 6I).

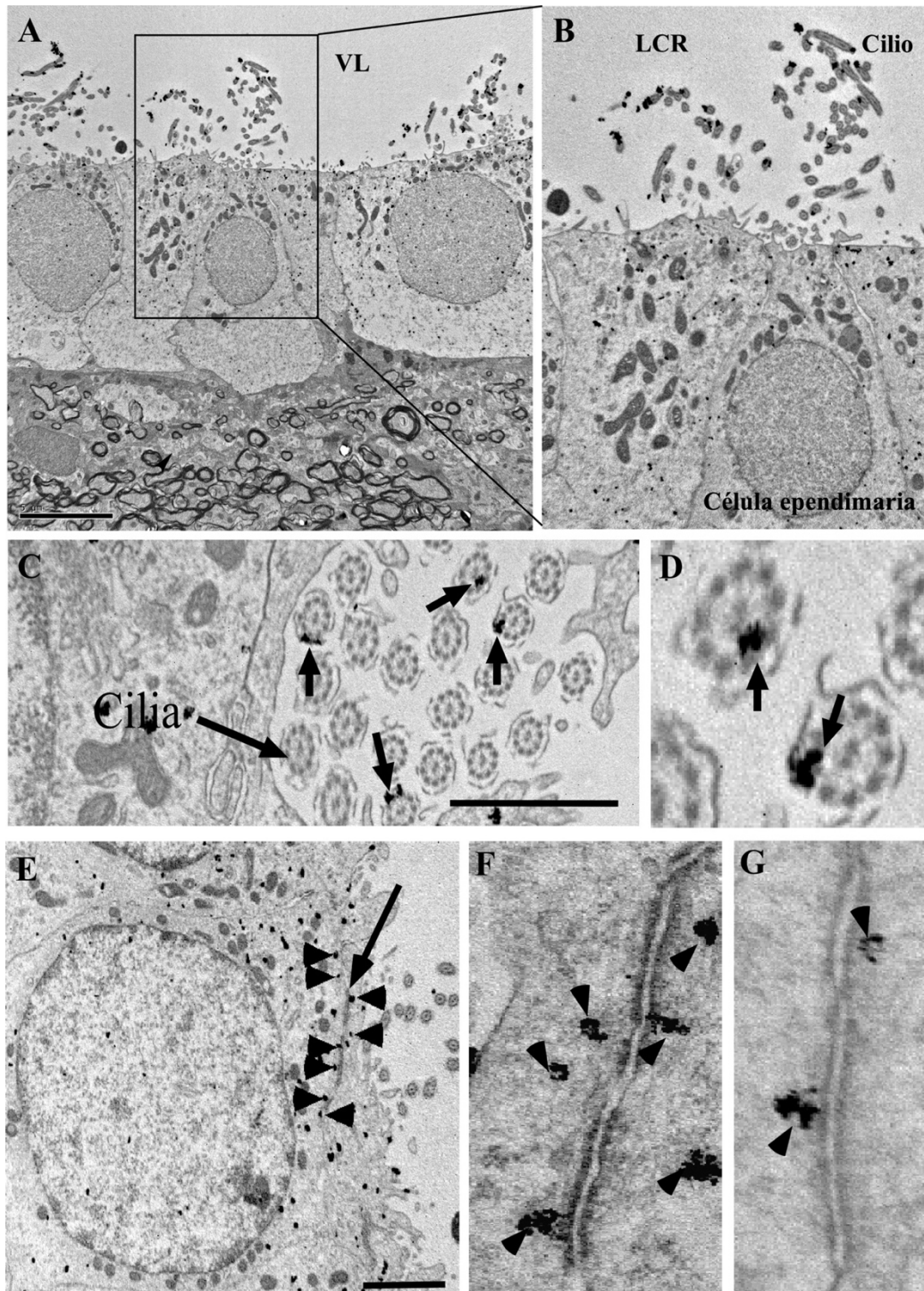
Utilizamos *En face whole mount* para observar la distribución más apical de las uniones adherentes y Par-3 (Figura 6J-L), los resultados indicaron que Par-3 posee una distribución puntiforme, especialmente co-distribuida con las cadherinas. También Par-3 se observó a nivel citoplasmático (Figura 6L, cabezas de flechas y asteriscos, respectivamente).

En resumen, en esta sección hemos definido que IIIIG9 y Par-3, muestran una distribución puntiforme en células endoteliales, que se relaciona focalmente con la presencia de PP1 $\alpha$  y cadherinas. Para profundizar en la distribución de IIIIG9 y su relación con la zonula adherente, realizamos estudios de microscopía electrónica y marcaje inmunohistoquímico ultraestructural. La señal positiva se define observando la señal electrodensa de oro coloidal

unido al anticuerpo secundario, que ha sido amplificado en su tamaño con el depósito de plata, de esta forma las partículas de oro y plata son de formas y tamaños diversos. Confirmamos que la marca positiva para IIIIG9 se distribuye en la región más apical de las células endoteliales (Figura 7A-B), observando una señal citoplasmática basal muy leve y una ausencia de señal en el parénquima cerebral. Además, confirmamos la marca positiva de IIIIG9 a nivel ciliar (Figura 7C-D, flechas). La presencia del marcaje fue consistente a la cercanía con la zonula de adherencia, con una señal concentrada en diversas zonas al azar (Figura 7E-G, cabezas de flecha).

Finalmente, con el fin de definir la función *in vivo* de IIIIG9 en la mantención de las uniones adherentes de células endoteliales adultas, realizamos una inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de adenovirus inhibidores de IIIIG9, los cuales expresan un shRNA específico bajo el promotor H1 y la proteína fluorescente verde (GFP), bajo el promotor de ubiquitina humano (AdsiIIIIG9-GFP). Como control, se inyectaron adenovirus que expresan el shRNA para  $\beta$ -galactosidasa y la proteína GFP (Adsi $\beta$ Gal-GFP). En ambos casos, los efectos celulares fueron evaluados 6 días después de efectuar la inyección adenoviral. Mediante *western blot* se detectó una disminución de todas las bandas de IIIIG9 (42, 51 y 53 kDa) en muestras de explantes de pared ventricular de cerebros tratados con AdsiIIIIG9-GFP versus el control (cerebros inyectados con Adsi $\beta$ Gal-GFP) (Figura 8A). La expresión relativa de IIIIG9 respecto de  $\beta$ -actina fue cuantificada en ambas condiciones observándose un valor de  $0.6 \pm 0.15$  en el knock-down para IIIIG9 versus un valor de  $1.0 \pm 0.25$  en el control (Figura 8B). Mediante análisis inmunohistoquímicos y de microscopía confocal en el control, se observó la presencia de células endoteliales expresando GFP, inmunomarcadas para vimentina y con numerosos cilios positivos al marcador ciliar  $\alpha$ -

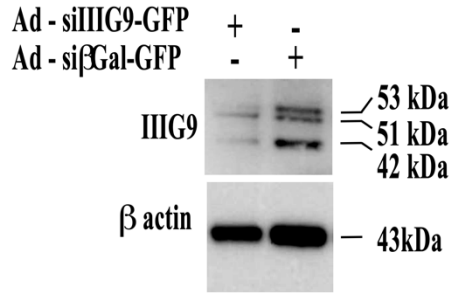
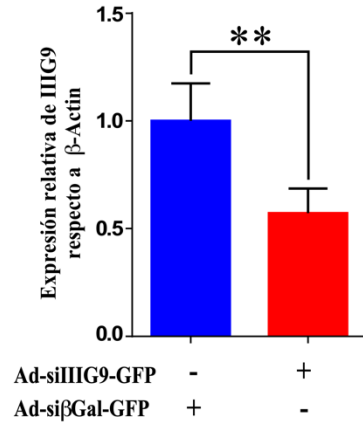
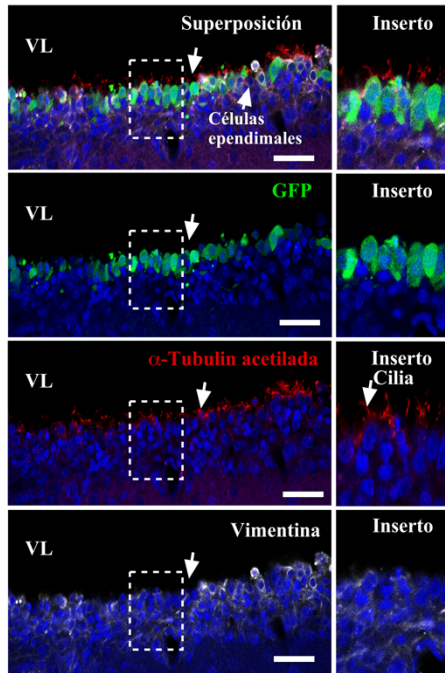
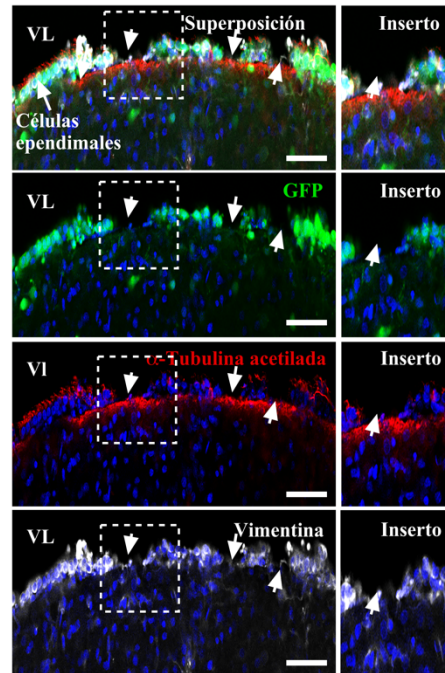
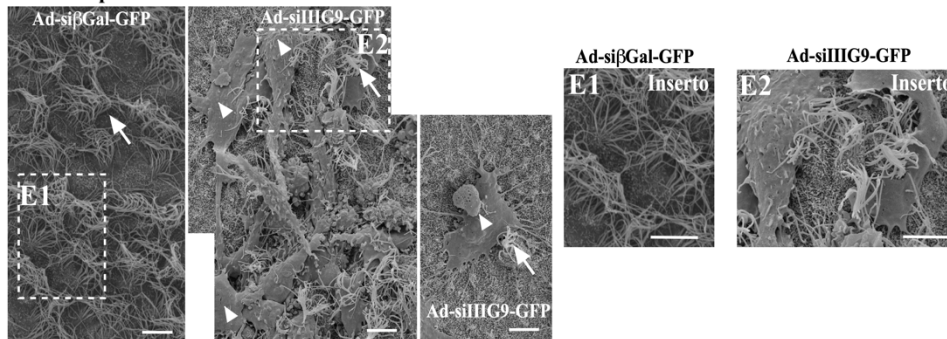
tubulina acetilada (Figura 8C, flechas e insertos). Por el contrario, la inhibición de IIIIG9 mostró algunas áreas de la pared ventricular con ausencia de expresión de GFP, que a su vez fueron negativas para la inmunotinción contra vimentina y  $\alpha$ -tubulina acetilada (Figura 8D, flechas e insertos). Esta condición también se analizó usando microscopía electrónica de barrido, observándose restos celulares y células con prolongaciones alargadas que se entremezclan entre unas pocas células ependimarias multiciliadas en animales knock-down para IIIIG9 (Figura 8E, cabezas de flechas e inserto E2). Las células ependimarias del animal control confirmaron la estructura celular normal (Figura 8E, flecha e inserto E1). Estos resultados muestran que la pérdida de función de IIIIG9 (durante 6 días) induce una denudación ependimaria parcial a nivel del ventrículo lateral.



**Figura 7. Análisis ultraestructural e inmunogold para III G9 en los cilios y las uniones adherentes de células ependimarias adultas.**

**A.** Inmunogold para IIIIG9 muestra partículas de oro en el citoplasma apical y los cilios de las células ependimarias. N=2. **B.** Imagen de mayor aumento del recuadro en A. **C-D.** Imágenes de mayor aumento para observar la inmunogold de IIIIG9 en los dupletes periféricos de microtúbulos del axonema ciliar (flechas). **E-G.** Imágenes de mayor aumento para observar la inmunogold de IIIIG9 en cercanía de las uniones adherentes (cabezas de flechas). VL: ventrículo lateral; LCR: líquido cefalorraquídeo. Barra de aumento: 5  $\mu\text{m}$  en A; 3  $\mu\text{m}$  en B; 1  $\mu\text{m}$  en C y E, 300 nm en D, 60 nm en F-G.



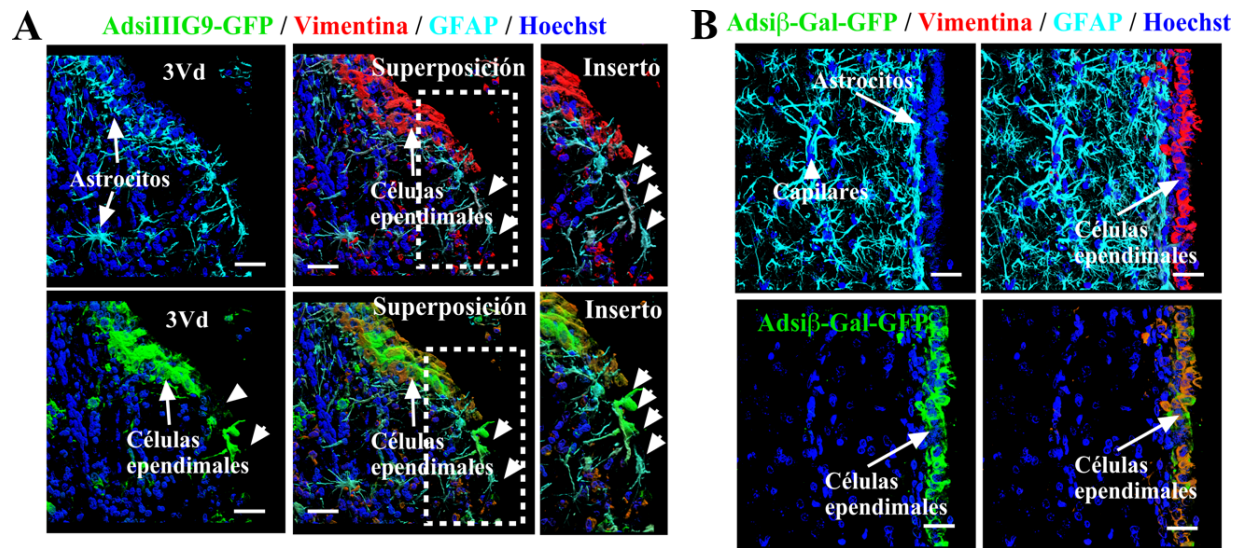
**A****Inhibición de IIG9 *in vivo*****B****C****Ad-siβGal-GFP****D****Ad-siIIG9-GFP****E****Microscopía electrónica de barrido**

**Figura 8. La inhibición in vivo de IIIIG9 induce una denudación endimaria parcial en el ventrículo lateral del cerebro adulto.**

**A.** Análisis de *Western blot* para la inhibición de IIIIG9 *in vivo*. Se muestra un *Western blot* representativo para extractos de proteínas totales aislados de explantes de pared ventricular de ratas adultas después de 6 días de i.c.v. con AdsiIIIIG9-GFP o Adsiβgal-GFP. N= 3. **B.** Análisis cuantitativo de la expresión de IIIIG9 por densitometría. Análisis estadístico t-student del valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\*\* $P < 0.05$ ), N= 3. **C.** Expresión de Adsiβgal-GFP y análisis inmunohistoquímico. Se observan células endimarias intactas que expresan GFP y son positivas para la detección de vimentina y  $\alpha$ -tubulina acetilada. N= 3. **D.** Expresión de AdsiIIIIG9-GFP y análisis inmunohistoquímico. Se observan algunas áreas de la pared ventricular con ausencia de expresión de GFP y de la inmunotinción para vimentina y  $\alpha$ -tubulina acetilada (flechas e insertos). Los núcleos fueron teñidos con Hoescht (azul). N= 3. **E.** Microscopía electrónica de barrido de la pared ventricular lateral mostrando células multiciliadas en animales controles (flecha e inserto E1) y una escasa presencia de estas células (flechas) dispuestas entre células elongadas (cabezas de flechas) en animales inyectados con AdsiIIIIG9-GFP (6 días) (inserto E2). N= 2. Todas las imágenes son representativas de diferentes muestras biológicamente independientes. VL: ventrículo lateral. Barras de tamaño: 40  $\mu\text{m}$  en C y D; 5  $\mu\text{m}$  en E.

Similares resultados fueron observados en análisis de microscopía confocal y de renderización 3D en muestras de cerebros inyectados con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en el tercer ventrículo e inmunoteñidos para vimentina y GFAP (Figura 9A). Observamos que las células endimarias vimentina positivas pierden su continuidad (flechas pequeñas) sin alterar los astrocitos periventriculares GFAP positivos (Figura 9A, astrocitos en color celeste). Cuando el adenovirus control fue inyectado, las células endimarias vimentina positivas no fueron alteradas (Figura 9B, flechas). De igual forma, no se observaron diferencias estructurales en los astrocitos subependimarios, parenquimales y que contactan los capilares sanguíneos en animales controles (Figura 9B, flechas). Debido a que la denudación endimaria observada fue parcial, evaluamos si las células remanentes en la pared ventricular que fueron transducidas con el adenovirus inhibidor presentaban cambios morfológicos que pudieran ser atribuidos a una pérdida de la polaridad celular y/o a una pérdida o redistribución citosólica de las cadherinas. En animales controles, observamos células endimarias expresando GFP y vimentina con forma cúbica formando una monocapa celular que tapiza la pared ventricular y que localizan las cadherinas alrededor de los contactos célula-célula principalmente en la regional apical y lateral, pero también en la región basolateral (Figura 10A, flechas en inserto). En animales inhibidos para IIIIG9, observamos pequeñas células endimarias remanentes en la pared ventricular expresando GFP y vimentina que presentan una morfología redondeada característica de células no polarizadas con una localización principalmente citosólica de las cadherinas (Figura 10B-C, flechas). El análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia para la inmunoreactividad de las cadherinas mostró niveles menores en animales inhibidos para IIIIG9 ( $46.5 \pm 6.2$ ) respecto de los animales controles ( $68.2 \pm 6.4$ ) (Figura 10D). Por su parte, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de GFP en ambas condiciones (Figura 10D). En conjunto, estos resultados indican que la pérdida

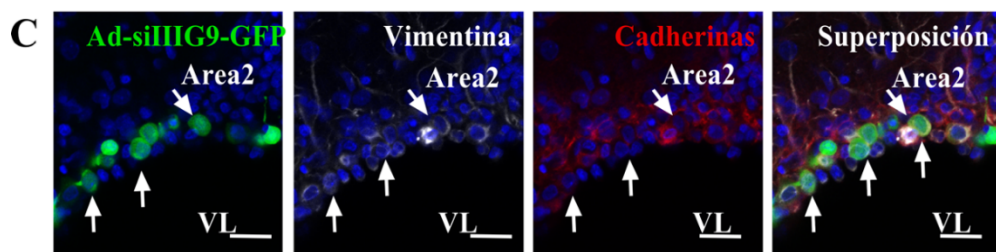
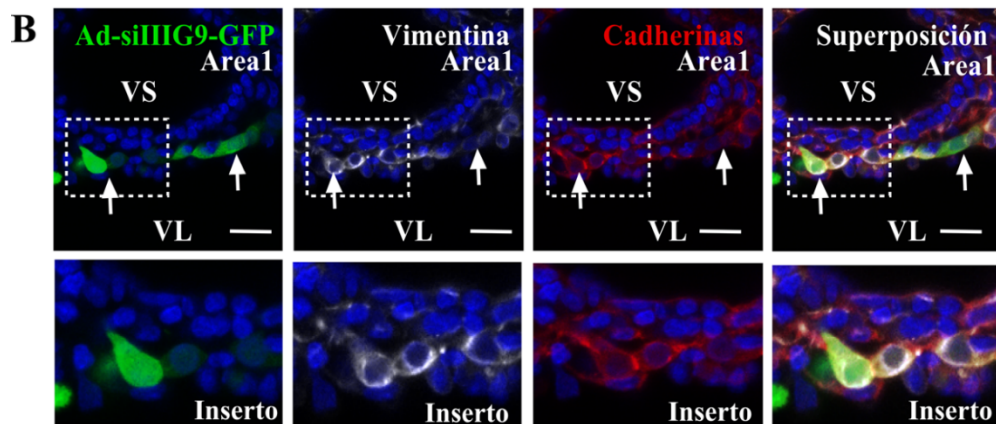
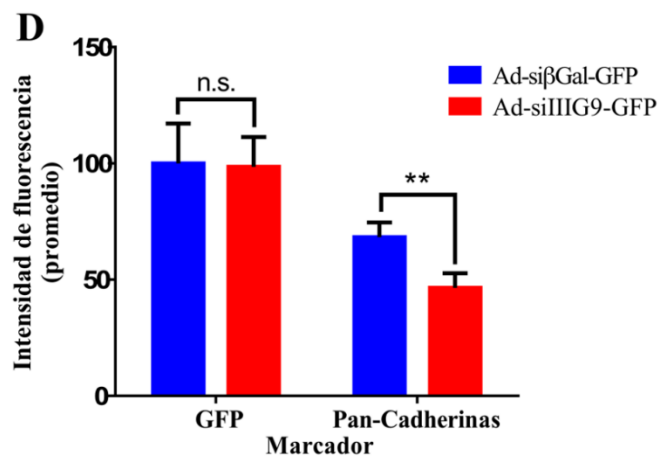
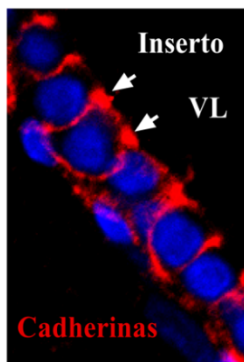
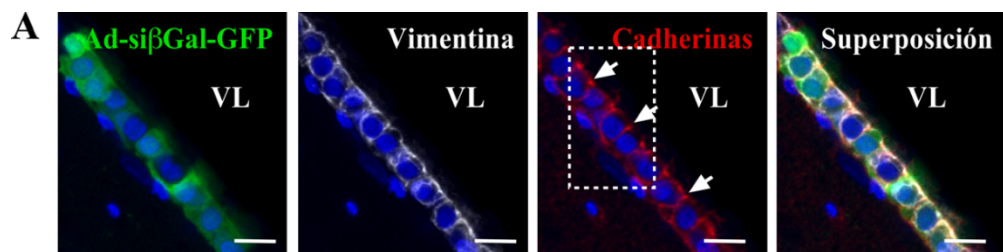
de función de IIIIG9 induce una denudación parcial de células endimarias adultas, donde las células que permanecen en la pared ventricular muestran una morfología de células no polarizadas con una menor expresión de cadherinas y una deslocalización de estas proteínas desde las uniones célula-célula hacia el citosol.



**Figura 9.** La pérdida de función *in vivo* de IIIIG9 en células endimarias del tercer ventrículo induce denudación parcial sin alterar a los astrocitos.

A. Expresión del AdsiIIIIG9-GFP y análisis inmunohistoquímico para la detección de vimentina y GFAP en células endimarias del tercer ventrículo después de 6 días de la inyección con AdsiIIIIG9-GFP. N= 3. B. Expresión del AdsiβGal-GFP (control) y análisis inmunohistoquímico para la detección de vimentina y GFAP. N= 3. En ambos casos, se realizó el apilamiento en Z (Z-stack) de imágenes confocales y renderización usando el programa

ZEN de Leica. La denudación de células ependimarias fue observada (flechas pequeñas e insertos en A) en animales inhibidos para IIIIG9 y no en el animal control (flechas en B). Los capilares sanguíneos fueron observados por sus contactos con procesos GFAP positivos (flecha en B). 3dV: tercer ventrículo dorsal. Barra de tamaño: 10  $\mu\text{m}$  en A-B.



**Figura 10. La pérdida de función in vivo de IIIIG9 en células endimarias del VL induce una morfología de células no polarizadas con una menor y deslocalizada distribución de cadherinas.**

**A-C.** Expresión de AdsiβGal-GFP o AdsiIIIIG9-GFP y análisis inmunohistoquímico para la detección de vimentina y cadherinas en células endimarias del VL, después de 6 días de la respectiva inyección adenoviral. N= 4. En el caso del animal inhibido para IIIIG9 se muestran dos áreas diferentes de la pared del VL (B y C). En animales controles, se observan células endimarias cuboidales expresando GFP, vimentina y cadherinas (flechas en A). Estas últimas fueron detectadas principalmente en los contactos célula-célula (flechas, inserto en A). Por su parte, los animales inhibidos para IIIIG9 mostraron una capa alterada de células endimarias redondeadas y pequeñas expresando GFP, vimentina y cadherinas (flechas en B-C). Estas últimas fueron detectadas principalmente en el citosol (flechas e inserto). **D.** Cuantificación del promedio de intensidad de fluorescencia para GFP y cadherinas en animales controles e inhibidos para IIIIG9. Análisis estadístico t-student del valor promedio ± desviación estándar (n.s.: no significativo,  $**P < 0.01$ ). N= 4. VS: vaso sanguíneo; VL: ventrículo lateral. Barras de tamaño: 10 μm en A-C.

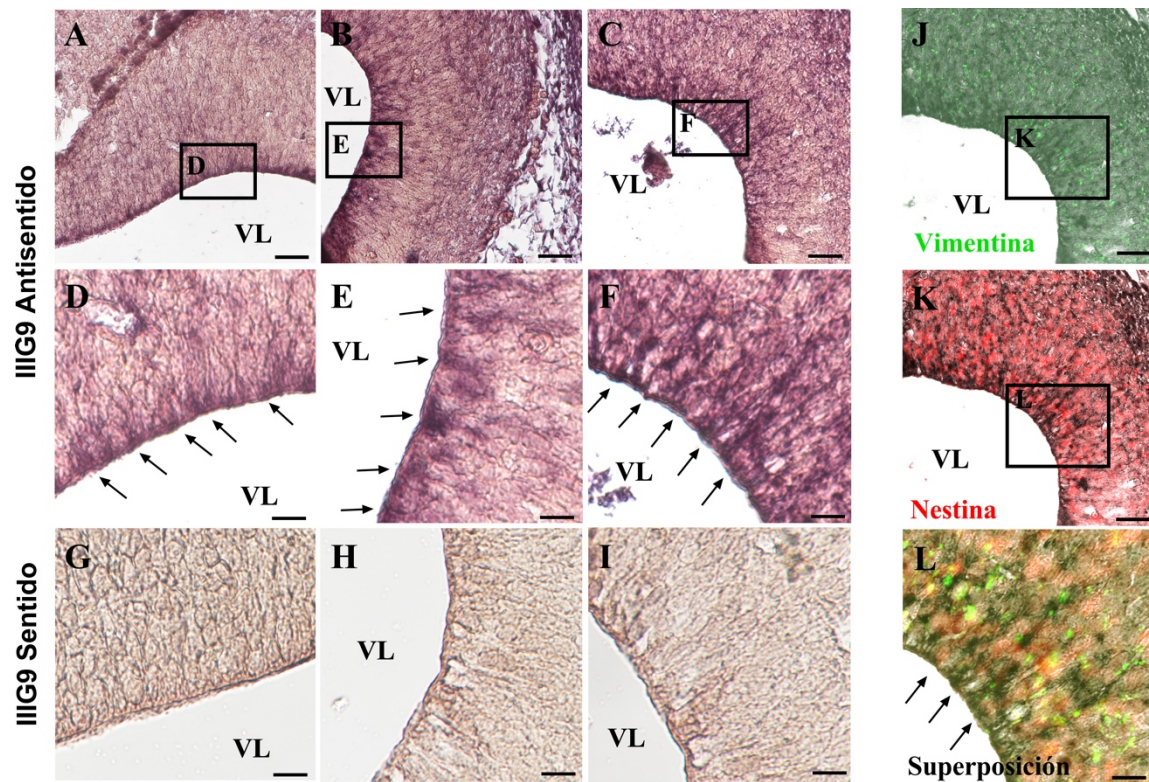
## 1.2 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 durante el desarrollo del cerebro.

Luego de conocer la expresión y distribución de IIIIG9, PP1 $\alpha$  y Par-3 en el estadio adulto, nos enfocamos en realizar los mismos análisis descritos anteriormente en etapas más tempranas del desarrollo. A continuación, realizamos un análisis de localización del ARNm de IIIIG9 por medio de hibridación *in situ*, utilizando cerebros obtenidos desde embriones con 16 días de gestación. Observamos que el ARNm de IIIIG9 tiene una localización mayormente polarizada hacia la pared ventricular (Figura 11A-C, insertos), donde se encuentran los cuerpos de la glía radial (Figura 11D-F, flechas). La reactividad positiva también se observa en los procesos que se extienden hacia la superficie pial (Figura 11C y 11F). Utilizando los mismos cortes histológicos previamente hibridados, realizamos un análisis inmunohistoquímico, utilizando anticuerpos específicos para vimentina y nestina, que permiten observar la glía radial (Figura 11J-K). En general existe una correlación entre la distribución del ARNm de IIIIG9 y los marcadores de glía radial señalados (Figura 11L, flechas). Como control de la técnica, se hibridaron cortes paralelos con la sonda sentido donde no se observó reacción positiva (Figura 11G-I).

Luego analizamos la expresión del ARNm utilizando la técnica de qRT-PCR acoplado a microdissección láser, para lo cual utilizamos tejidos obtenidos desde la pared ventricular embrionaria (E13, E15 y E17) y postnatal (PN1, PN15, PN20) (Figura 12). Para el procesamiento de los tejidos, los cerebros de animales embrionarios fueron fijados por



inmersión en el fijador Metacarn, mientras que los animales de los estadios postnatales fueron sacrificados por perfusión transcardial, utilizando el mismo fijador.



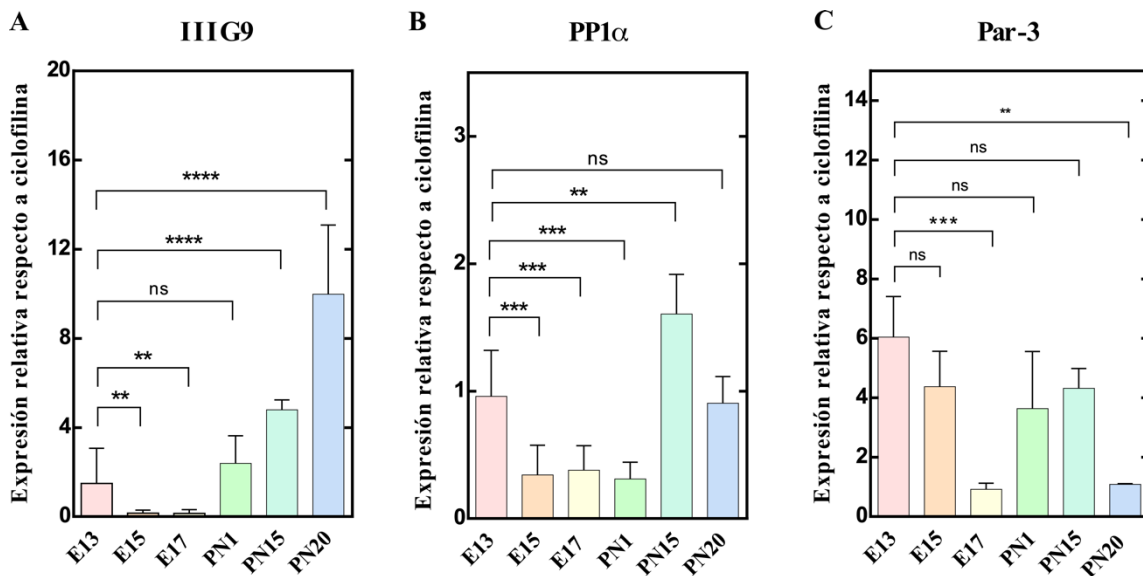
**Figura 11. El ARNm de IIIIG9 se localiza en la glía radial embrionaria.**

Hibridación *in situ* y análisis inmunofluorescencia-microscopía confocal en cortes histológicos frontales de cerebro E16. **A-C.** Localización del ARNm de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria (PV) del ventrículo lateral (VL), utilizando la sonda anti-sentido. Los cuadros indican las zonas donde se realizó un mayor aumento. N= 3. **D-F.** Aumento de A-C. Las flechas indican la reactividad a nivel del cuerpo de la glía radial, que se extiende a través de los procesos basales (morado). **J.** Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra vimentina (verde). **K.** Se observa la misma zona de la PV, esta vez utilizando un anticuerpo anti-nestina

(rojo). **L.** Superposición de los canales verde y rojo, junto con la microscopía de Nomarski en la PV para observar la localización de ambas proteínas junto con la señal de la sonda antisentido (color oscuro). N= 3. **G-I.** Control de reacción con la sonda sentido de IIIIG9 en la PV. N= 3. VL: ventrículo lateral. Barra de tamaño: 100  $\mu\text{m}$  en A-C y J, 30  $\mu\text{m}$  en D-I y K-L.

Los cortes histológicos fueron obtenidos por vibrátomo y procesados a través del microdisector láser para obtener la pared ventricular. Posteriormente, se realizó la extracción de ARNm y la cuantificación por qRT-PCR (Figura 12).

El ARNm de IIIIG9 se expresa tempranamente en la pared ventricular en el estadio E13. Sin embargo, los niveles de ARNm decrecen significativamente al comparar con los estadios E15 y E17 (Figura 12A). En el estadio PN1, los niveles de ARNm para IIIIG9 aumentan, observándose la mayor expresión en PN20 (Figura 12A). Todos los análisis estadísticos están realizados respecto al estadio E13. Utilizando las mismas muestras se estudió la expresión de PP1 $\alpha$  y Par-3. El ARNm de PP1 $\alpha$  muestra niveles de expresión inferiores a IIIIG9, sin embargo, siguen una tendencia similar durante los estadios E13-E17 (Figura 12 B), sin embargo, su nivel de expresión en estadios postnatales PN1-PN20 es relativamente menor al de IIIIG9 (Figura 12B). Al cuantificar el ARNm para Par-3, observamos que esta tempranamente expresado en el estadio E13 (Figura 12C) y su nivel de expresión decrece significativamente al estadio E17. En los estadios postnatales, Par-3 está mayormente expresado durante las dos primeras semanas (Figura 12C), con un nivel similar al detectado en E15. Podemos concluir que las tres proteínas están expresadas durante el desarrollo del cerebro, con cambios en sus niveles, dependiendo de la edad analizada.

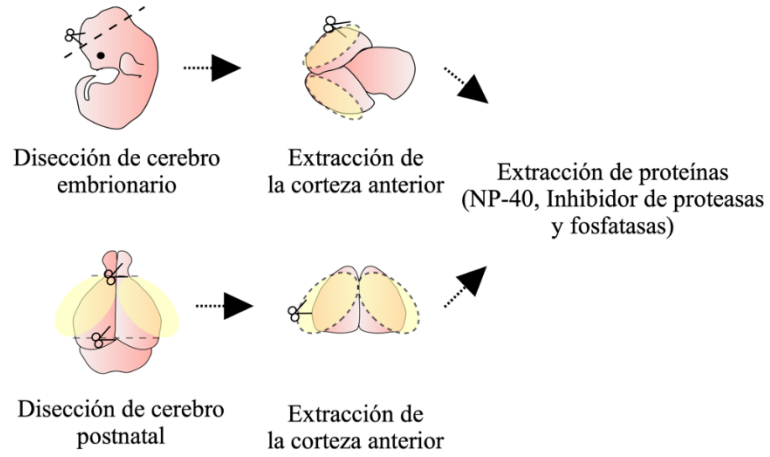
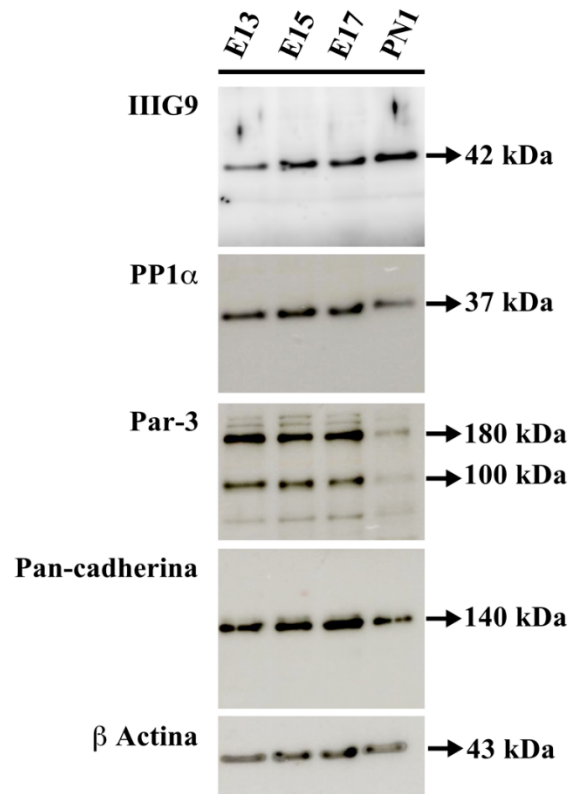


**Figura 12. El ARNm de IIIG9, PP1 $\alpha$  y Par-3 se expresa en el desarrollo embrionario y postnatal del cerebro.**

Análisis qRT-PCR para IIIG9, PP1 $\alpha$  y Par-3, en la pared ventricular embrionaria E13, E15 y E17; como también, en estadios postnatales PN1, PN15 y PN20. Se indica que el mensajero de IIIG9 se induce tempranamente, sin embargo, este incremento se acentúa en los estadios postnatales. La expresión del ARNm de PP1 $\alpha$  presenta bajos niveles en todos los estadios analizados. Por otro lado, Par-3 decrece en los estadios embrionarios y aumenta levemente durante las primeras semanas postnatales. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, junto a un test de comparación múltiple de Dunnett. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de las proteínas a través de *Western blot*, en los estadios embrionarios E13, E15 y E17 y en el estadio postnatal PN1. Los extractos de proteínas se obtuvieron de la porción anterior del telencéfalo; en el caso de las muestras postnatales, fue eliminada parte de la corteza cerebral (Figura 13A). Al analizar IIIIG9, detectamos una banda de 42 kDa (E13, E15, E17 y PN1), es decir, solo observamos la presencia de la isoforma corta de IIIIG9, en la pared ventricular embrionaria y postnatal temprana.

Al analizar la fosfatasa PP1 $\alpha$ , observamos una banda de 37 kDa, y para Par-3 detectamos dos bandas de 180 y de 100 kDa. La isoforma de 100 kDa de Par-3 solo se expresa en la pared ventricular embrionaria y postnatal temprana, ya que en el adulto no fue observada (Figura 13B). Al estudiar las cadherinas se observa una banda de 140 kDa en todos los estadios (Figura 13B). Por lo tanto, podemos concluir que durante el proceso de diferenciación y polarización del epitelio endimario, la proteína IIIIG9, PP1 $\alpha$  y Par-3 se expresan junto a las cadherinas en la pared ventricular temprana (Figura 13B).

**A****B**

**Figura 13. IIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y cadherinas, se expresan en la pared ventricular embrionaria y postnatal temprana.**

**A.** Esquema representativo de la extracción de la pared ventricular desde los diversos estadios.

**B.** Análisis de *Western blot* utilizando extractos totales de proteínas obtenidas desde la pared ventricular embrionaria (E13, E15 y E17) y postnatal (PN1). Para cada muestra se sembraron 30  $\mu$ g de proteínas. Se utilizó como control de carga  $\beta$ -actina.

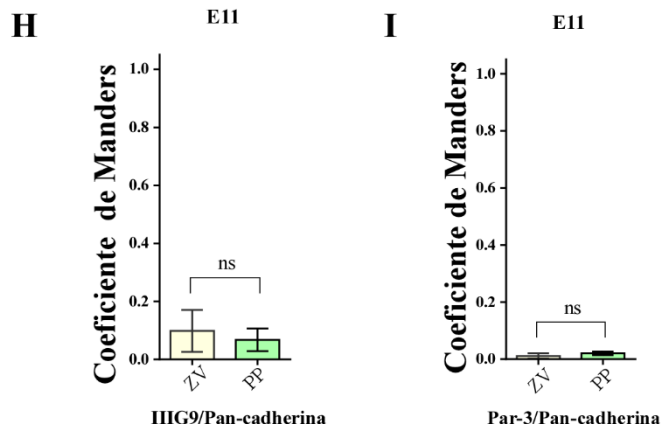
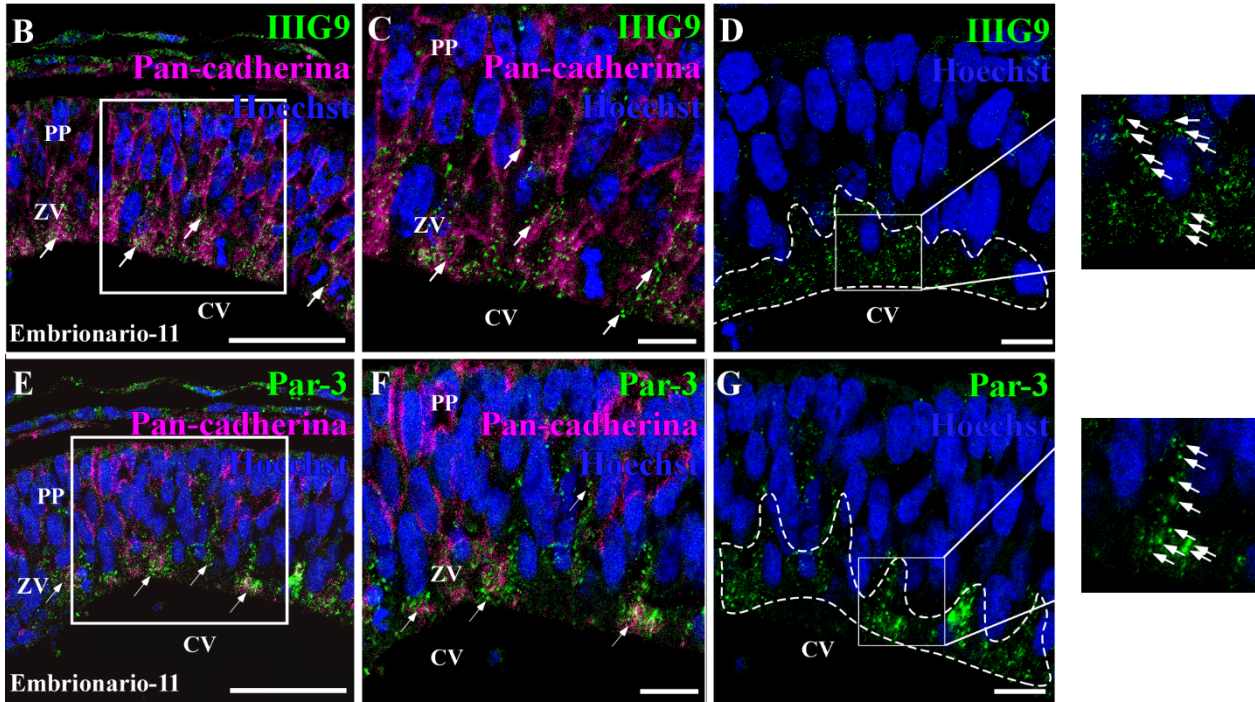
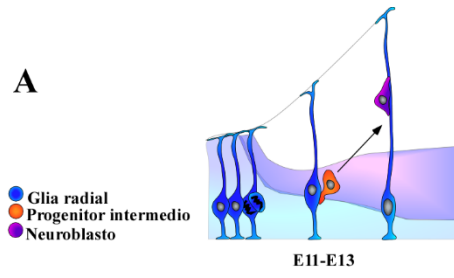
A continuación, realizamos un estudio inmunohistoquímico en cortes histológicos obtenidos de los diversos estadios del desarrollo embrionario y postnatal. Durante el estadio E11, la glía radial comienza el proceso de división simétrica y asimétrica, que permite la autorenovación y la formación de neuroblastos y células amplificadoras transitorias (Kriegstein y Álvarez Buylla, 2009). Durante este periodo, se diferencian la zona ventricular (ZV) y la pre-placa cortical (PP). En estas muestras observamos que las cadherinas se extienden desde la ZV hasta la PP (Figura 14 B y C, magenta). IIIG9 se detecta en la ZV con un patrón punteado (Figura 14B-D, verde) y en una disposición ascendente hacia la PP (Figura 14D, flechas). El mismo patrón de distribución se observa para Par-3 (Figura 14 E-G, verde).

Finalmente, obtuvimos un bajo coeficiente de Manders (valor promedio  $\pm$  desviación estándar) entre IIIG9 y cadherinas en la ZV ( $0.098 \pm 0.072$ ) (N=3) y PP ( $0.067 \pm 0.039$ ) (N=3) (Figura 14H); similar al observado para Par-3 y cadherinas en ambas zonas descritas ( $0.011 \pm 0.008$ ;  $0.020 \pm 0.006$ , respectivamente) (N=3) (Figura 14I).

El mismo análisis inmunohistoquímico se realizó en cortes histológicos obtenidos del estadio embrionario E13 (Figura 15). En esta etapa del desarrollo, ya es posible observar la placa cortical (PC), la zona intermedia (ZI) y la zona ventricular (ZV), antes descrita. Las cadherinas se extienden desde la ZV, pasando por la ZI y la PC, sin embargo, se encuentran más concentradas en la ZV, donde se localizan los pies apicales de las glías radiales (Figura 15A y C).

Mientras que IIIIG9 y Par-3 ya no se encuentran solo en la ZV, sino que también en el PC (Figura 15B y D). A diferencia del estadio E11, en el estadio E13 se observa que el coeficiente de Manders entre IIIIG9 y cadherinas, aumenta considerablemente en la ZV, alcanzando un coeficiente cercano a  $0.579 \pm 0.039$  (N=3). Este aumento también se puede observar en la ZI y la PC, alcanzando un coeficiente de Manders cercano al  $0.379 \pm 0.069$  (N=3) y  $0.297 \pm 0.104$  (N=3), respectivamente (Figura 15E), siendo significativamente mayor en la ZV, respecto a la ZI y PC.

Por otro lado, para Par-3 y cadherinas se observa un coeficiente de Manders ( $0.729 \pm 0.086$ , N=3) similar al observado para IIIIG9, ya que este aumenta significativamente en la ZV, respecto a la ZI y la PC ( $0.487 \pm 0.085$ ;  $0.549 \pm 0.055$ , respectivamente) (Figura 15F). Por tanto, IIIIG9 y Par-3 poseen un solapamiento significativo con las cadherinas en la ZV, en comparación con la ZI y la PC, donde las neuronas terminan su migración.





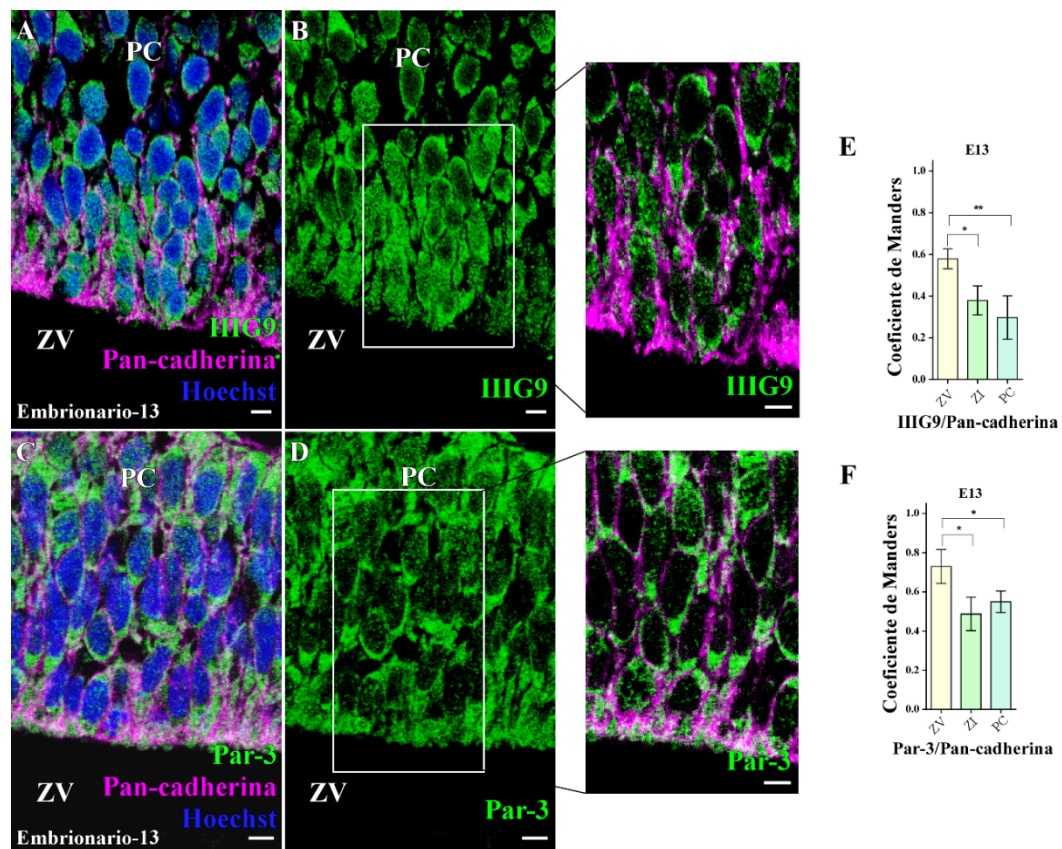
**Figura 14. IIIG9 y Par-3 se localizan tempranamente en la pared ventricular, durante el estadio embrionario E11.**

**A.** Esquema representativo del neurodesarrollo. Las glías radiales embrionarias (azul) pasan por sucesivas divisiones simétricas y asimétricas, que dan origen a progenitores intermedios (naranja) y neuroblastos (morado). Las neuronas recién nacidas migran hacia capas superiores de la corteza cerebral. **B-D.** Inmunofluorescencia en cortes histológicos frontales de E11. Se utilizaron anticuerpos específicos para IIIG9 (Cy2, verde), pan-cadherina (Cy5, magenta) y tinción de núcleos (azul). El inserto indica un zoom digital de la zona ventricular, mostrando a IIIG9 en un patrón punteado ascendente. N= 3. **E-G** Inmunofluorescencia en cortes histológicos frontales de E11. Se utilizaron anticuerpos específicos para Par-3 (Cy2, verde), pan-cadherina (Cy5, magenta) y tinción de núcleos (azul). El inserto indica un zoom digital de la zona ventricular, mostrando a Par-3 en un patrón punteado similar al observado para IIIG9. N= 3. **H-I** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIG9/pan-cadherina y Par-3/pan-cadherina en la ZV y PP, respectivamente. ns: no significativo. Análisis estadístico t-student del valor promedio  $\pm$  desviación estándar (ns: no significativo). N= 3. PP: Pre-Placa, ZV: zona ventricular, CV: cavidad ventricular. Barra de tamaño: 50  $\mu$ m en B y E, 10  $\mu$ m en C-D y F-G.

Finalmente analizamos la pared ventricular en el estadio E16 (Figura 16), donde observamos una distribución polarizada de IIIG9 en la ZV (Figura 16A y D; puntas de flechas), mientras que, en la ZI, IIIG9 se distribuye de forma puntiforme en el núcleo de neuroblastos migrantes. Respecto a la ZV, IIIG9 se codistribuye junto a las cadherinas (Figura 16C y F). El coeficiente de Manders entre IIIG9 y cadherinas en la ZV es de  $0.882 \pm 0.038$

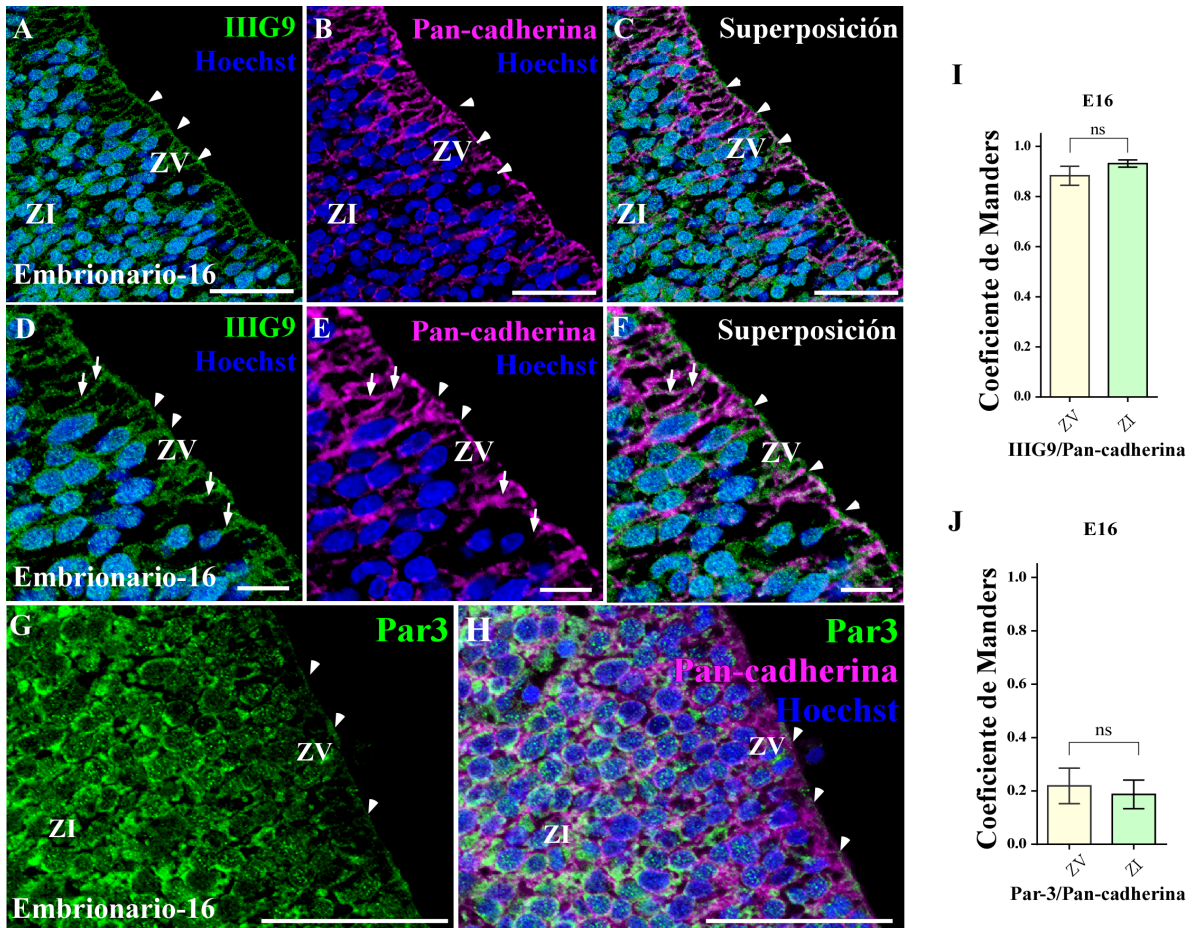
(N=3). Mientras que, en la ZI, detectamos un coeficiente de  $0.931 \pm 0.014$  (N=3) (Figura 16I). Por tanto, durante el estadio E16 es donde se alcanza el mayor grado de polarización de IIIIG9 en la ZV, con un alto grado de solapamiento con las cadherinas, en comparación al estadio E11 y E13.

Mientras tanto, Par-3 se distribuye en la ZV y la ZI, con un menor grado de polarización hacia la ZV (Figura 16G). Entre Par-3 y cadherinas observamos que el coeficiente de Manders en la ZV fue de  $0.218 \pm 0.066$  (N=3) y de  $0.186 \pm 0.053$  (N=3) en la ZI, sin diferencias significativas (Figura 16J). Sin embargo, la inmunohistoquímica nos indica que Par-3 se encuentra polarizado en la ZV, con una importante expresión en otras zonas de la corteza cerebral (Figura 16G).



**Figura 15. IIIIG9 y Par-3 colocalizan con cadherinas en la zona ventricular, zona intermedia y placa cortical de la corteza cerebral, en el estadio embrionario E13.**

**A-D.** Inmunofluorescencia en cortes histológicos frontales de E13. Se utilizaron anticuerpos específicos para IIIIG9 (Cy2, verde), Par-3 (Cy2, verde) y pan-cadherina (Cy5, magenta). Los núcleos fueron teñidos con hoescht (azul). Se observa la distribución de IIIIG9 y Par-3 en glías radiales ventriculares y neuroblastos migrantes. Los insertos corresponden a aumentos digitales que muestran la codistribución de IIIIG9 y Par-3 con las cadherinas. **E-F** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIIG9/Pan-cadherina y Par-3/Pan-cadherina, respectivamente. Análisis estadístico t-student del valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ), N= 3. ZV: zona ventricular, PC: placa cortical, CV: cavidad ventricular. Barra de tamaño: 5  $\mu\text{m}$  en todas las imágenes.



**Figura 16. IIIIG9 y Par-3 tienen una mayor polarización en la zona ventricular durante el estadio E16.**

**A-H.** Inmunofluorescencia en cortes histológicos frontales de E16. Se utilizaron anticuerpos específicos para IIIIG9 (Cy2, verde), Par-3 (Cy2, verde), pan-cadherina (Cy5, magenta) y tinción de núcleos (azul). Se observa una mayor polarización de IIIIG9 en la zona ventricular (puntas de flecha), siendo menor en el caso de Par-3. **I-J.** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIIG9/Pan-cadherina y Par-3/Pan-cadherina. Análisis estadístico t-student del valor promedio  $\pm$  desviación estándar (ns: no significativo). N= 3. ZV: zona ventricular, ZI:

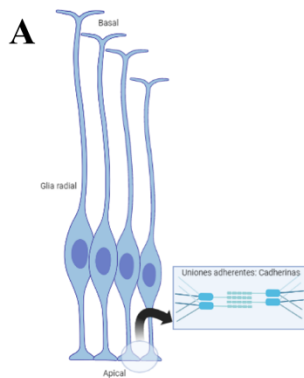
zona intermedia, PC: placa cortical, CV: cavidad ventricular. Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en A-C y G-H, 10  $\mu\text{m}$  en D-F.

Considerando los datos obtenidos, definimos que la expresión y distribución de IIIIG9, Par-3 y cadherinas es similar durante el desarrollo de la ZV embrionaria. Sin embargo, para definir a nivel ultraestructural la distribución de IIIIG9 y su relación con las uniones adherentes, utilizamos microscopía electrónica de transmisión e inmunohistoquímica con partículas de oro, en cortes de cerebros E13 y E16 (Figura 17).

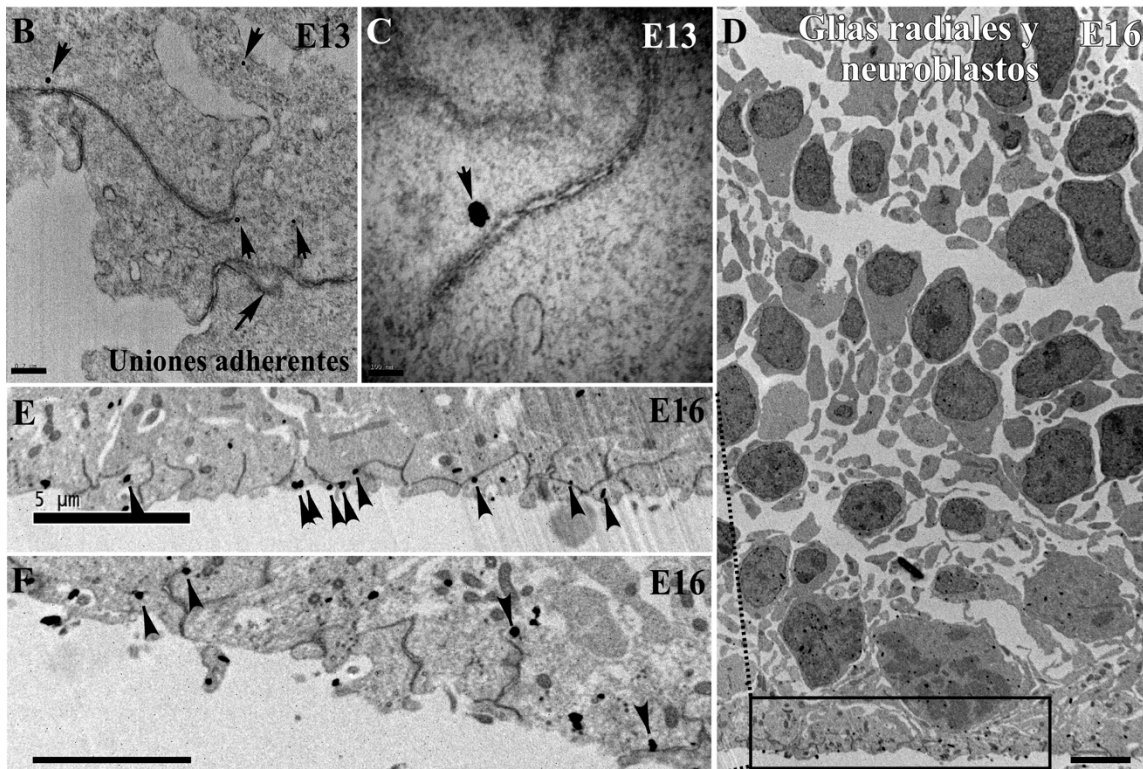
Las uniones adherentes en la glia radial se localizan en los pies apicales, como se observa en el esquema adjunto (Figura 17A), sin embargo, en los cortes ultrafinos, estas estructuras se pueden localizar lateralmente, como también orientadas transversalmente a nivel apical (Figura 17B y E). Esta distribución es solamente generada debido al plano de seccionamiento, pero una vez entendiendo esta situación, se puede comprender la tinción de cadherinas a nivel apical y transversal a las células de la glia radial, tanto a nivel óptico como electrónico. En el estadio E13, detectamos inmunoreactividad positiva para IIIIG9, que se observa como puntos electrodensos en las placas de adhesión, localizadas en las membranas laterales de la glía radial (Figura 17B y C, flechas).

En el estadio embrionario E16, observamos que se mantiene el patrón de distribución de IIIIG9 en la ZV, con puntos electrodensos que asociados a los complejos de unión de las glías radiales (Figura 17D, E y F, puntas de flechas). Además, detectamos que las glías radiales y los neuroblastos también muestran reactividad positiva para IIIIG9 a nivel nuclear (Figura 17D).

Nuestros resultados nos indican que IIIIG9 se localiza en las uniones adherentes de la ZV en estadios tempranos del desarrollo, correlacionándose con la distribución en el estadio adulto. La principal diferencia es que en el estadio embrionario no podemos observar cilios móviles en la ZV. Considerando estos antecedentes indagamos en la distribución de IIIIG9 en estadios postnatales utilizando las herramientas descritas previamente.



### Inmuno-gold Anti-IIIIG9



**Figura 17. IIIG9 se localiza en las uniones adherentes de las glías radiales ventriculares.**

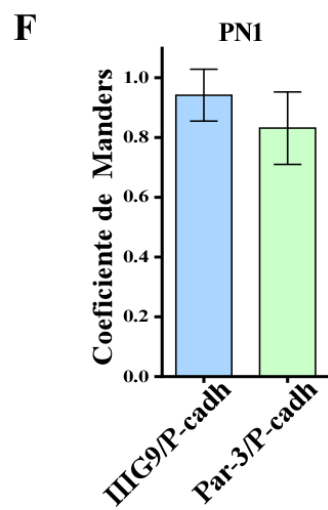
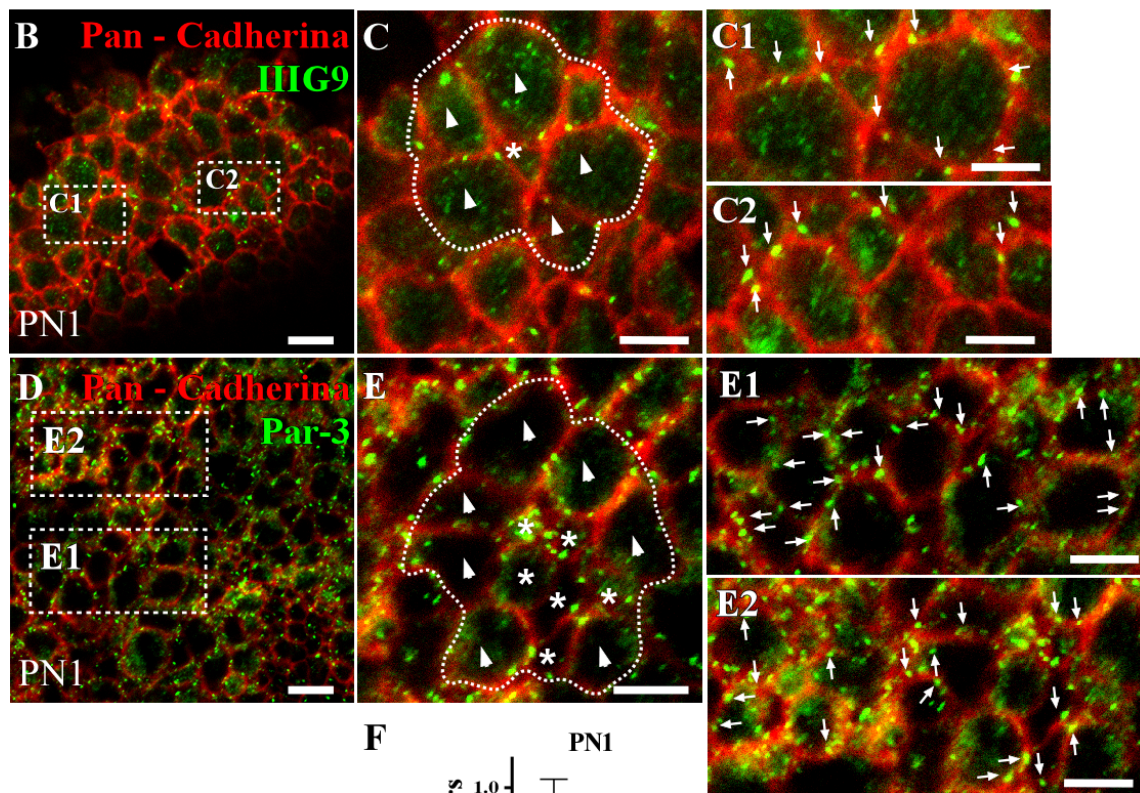
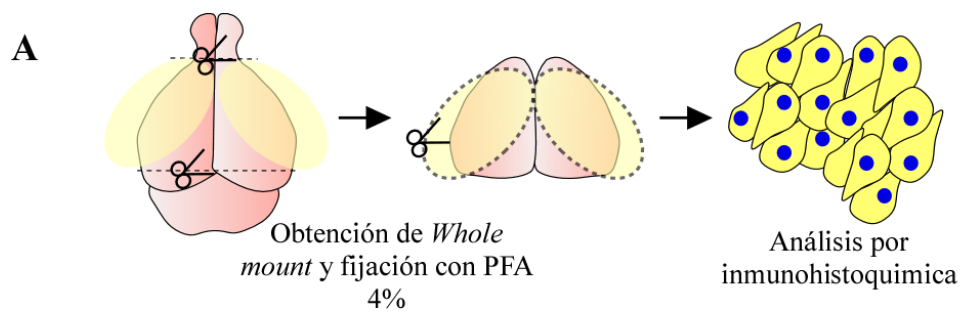
**A.** Esquema representativo de la morfología de la glía radial, en donde se indican los pies apicales que contactan la zona ventricular y se encuentran adheridos mediante uniones adherentes de tipo cadherinas. **B-D.** Inmunohistoquímica ultraestructural utilizando anticuerpos específicos para IIIG9 en los estadios embrionarios E13 y E16. **B.** Análisis de diferentes uniones adherentes en la glía radial. **C.** Mayor aumento una zona adherente con inmunoreactividad positiva para IIIG9, en el estadio embrionario E13. **D.** Se observa la zona ventricular y la zona intermedia en el estadio embrionario E16, compuesto por glía radial y neuroblastos migrantes, respectivamente. **E y F.** Análisis con mayor aumento de la zona apical de la glía radial. La reacción positiva en zonulas adherentes se indica con flechas negras. Barra de tamaño: 200 nm en B; 100 nm en C; 5  $\mu$ m en D, E y F.

Realizamos un análisis por microscopía confocal de la ZV en estadio PN1. Para esto utilizamos la técnica de disección descrita previamente, para obtener el tejido en *Whole mount- en face*, que nos permite observar los dominios apicales de la ZV (Figura 18A). Utilizando anticuerpos para IIIG9 (verde), Par-3 (verde) y pan-cadherinas (rojo), observamos que se mantiene la distribución en los contactos celulares (Figura 18 B). Respecto a IIIG9, podemos observar un patrón puntiforme que se codistribuye con las cadherinas (Figura 18 C1 y C2, flechas), también se observa este patrón a nivel citoplasmático (Figura 18C, puntas de flecha). En esta misma imagen, observamos una estructura propia del nicho neurogénico de la ZV, que recibe el nombre de “*pinwheel*”. El “*pinwheel*” se encuentra formado por células

troncales monociliadas (tipo B1), en el centro, y rodeadas por células ependimarias multiciliadas (tipo E1) (Rodríguez-Jiménez y col., 2019). Esta estructura se indica con una línea blanca discontinua que circunscribe la forma descrita, con células ependimarias (puntas de flecha) y B1 (asteriscos) (Figura 18C). Utilizando estas imágenes, cuantificamos el coeficiente de Manders entre IIIIG9 y cadherinas con un valor de  $0,941 \pm 0.086$  (N=9) (valor promedio  $\pm$  desviación estándar) (Figura 18F).

Finalmente, analizamos en estas muestras la distribución de Par-3 y cadherinas, detectando una distribución punteada para Par-3, que colocaliza con las cadherinas (Figura 18 D-E), junto a una leve inmunotinción en el citoplasma de las células ventriculares (Figura 18E1 y E2). El coeficiente de Manders entre Par-3 y cadherinas muestran un valor de  $0.832 \pm 0.121$  (N=7) (Figura 18F). En conclusión, IIIIG9 y Par-3 se codistribuyen con cadherinas en el estadio PN1, cuando aún existen glías radiales en la ZV (Tramontin y col., 2003).



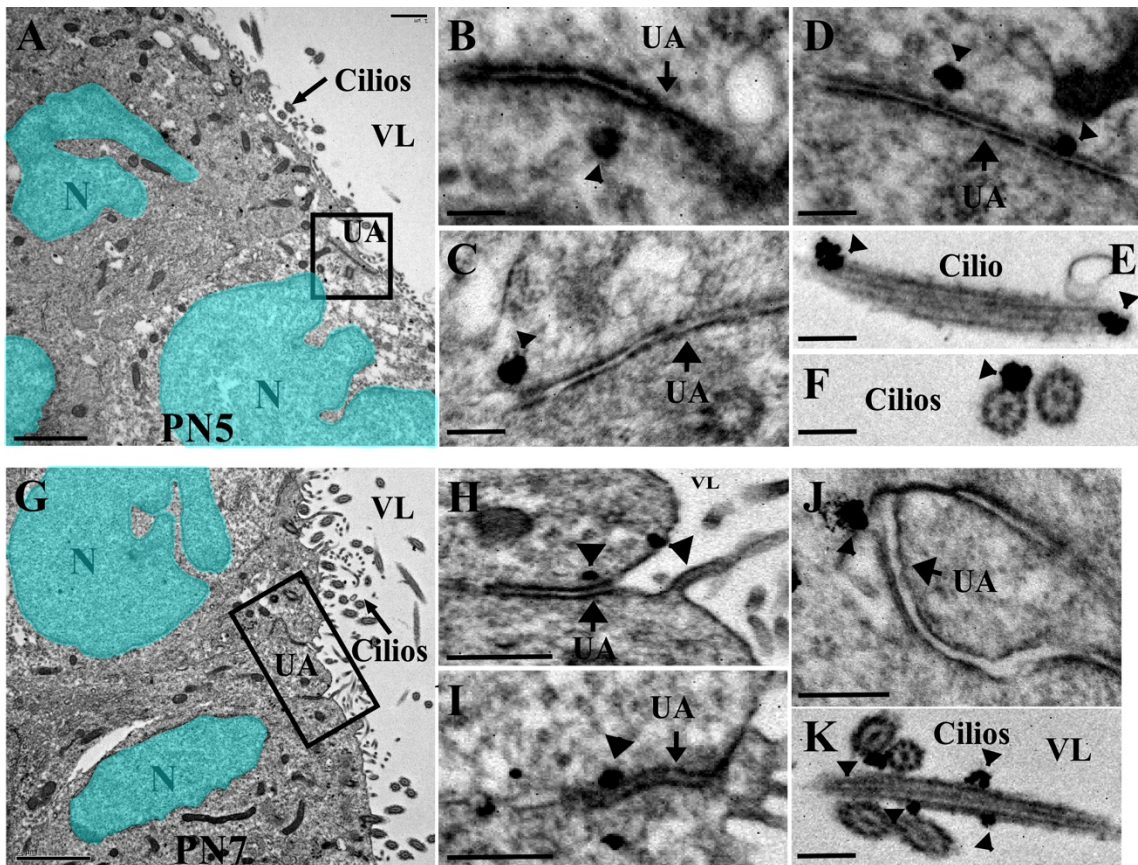


**Figura 18. IIIG9 y Par-3 colocalizan con cadherinas en células de la pared ventricular postnatal 1 día.**

**A.** Esquema representativo de la disección de *whole mount- en face* de la pared ventricular PN1, que nos permite observar la porción superficial del ventrículo por microscopía confocal. **B-C, C1-C2, D, E1-E2.** Inmunohistoquímica en *whole mount- en face* de la pared ventricular en el estadio PN1. Se utilizaron anticuerpos específicos para IIIG9 (Cy2, verde), Par-3 (Cy2, verde) y pan-cadherinas (Cy3, rojo). Se observa la distribución de cadherinas en un patrón reticulado sobre la pared ventricular, junto a un patrón punteado de IIIG9 (flechas) y Par-3 (flechas). N= 3. **C y E.** Se observa un “*pinwheel*” (línea discontinua blanca) formada por al menos cuatro células E1 (puntas de flecha) y una célula B1 (asterisco). **F.** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIG9/Pan-cadherina y Par-3/Pan-cadherina, respectivamente. Barra de tamaño 10  $\mu\text{m}$ . en B y D; 5  $\mu\text{m}$  en C, C1-C2, E, E1-E2.

Luego de analizar la distribución de IIIG9 y Par-3 utilizando *Whole mount-en face*, realizamos un análisis de microscopía electrónica de transmisión e inmunotinción con partículas de oro en estadios postnatales más avanzados (PN5 y PN7). En la pared ventricular del estadio PN5, observamos las uniones adherentes (UA, recuadro y flechas negras) (Figura 19A) junto a la inmunoreactividad positiva para IIIG9, con una señal electrodensa (punta de flecha negra) (Figura 19 B-D). Además, en dicho estadio ya es posible detectar la presencia de IIIG9 en los cilios móviles de las células endimarias (Figura 19 E-F, cilios, punta de flechas).

Para el estadio PN7, observamos nuevamente la zona ventricular con las células endoteliales (Figura 19G). En las ampliaciones observamos la reactividad positiva de III G9 en las uniones adherentes, que se replica en las células vecinas (Figura 19 H-J). Además, su distribución se mantiene en los cilios móviles (Figura 19 K).



**Figura 19. III G9 se distribuye en las cercanías de las uniones adherentes en los estadios postnatales PN5 y PN7.**

A-F y G-K. Inmunohistoquímica ultraestructural utilizando anticuerpos específicos para III G9, en el estadio postnatal PN5 y PN7, respectivamente. En el panel se muestra la zona

ventricular, con los núcleos de las células ependimarias destacadas en color (Cyan). Se observan cilios móviles. En los insertos se muestran uniones adherentes (flechas) y la inmunoreacción positiva para IIIIG9 (puntas de flechas) que se replica en los cilios. UA: unión adherente, VL: ventrículo lateral. Barra de tamaño: 2  $\mu\text{m}$  en A y G; 50 nm en B-F; 200 nm en H-K.

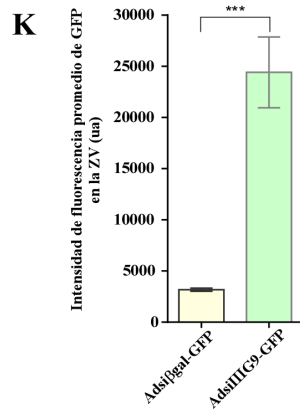
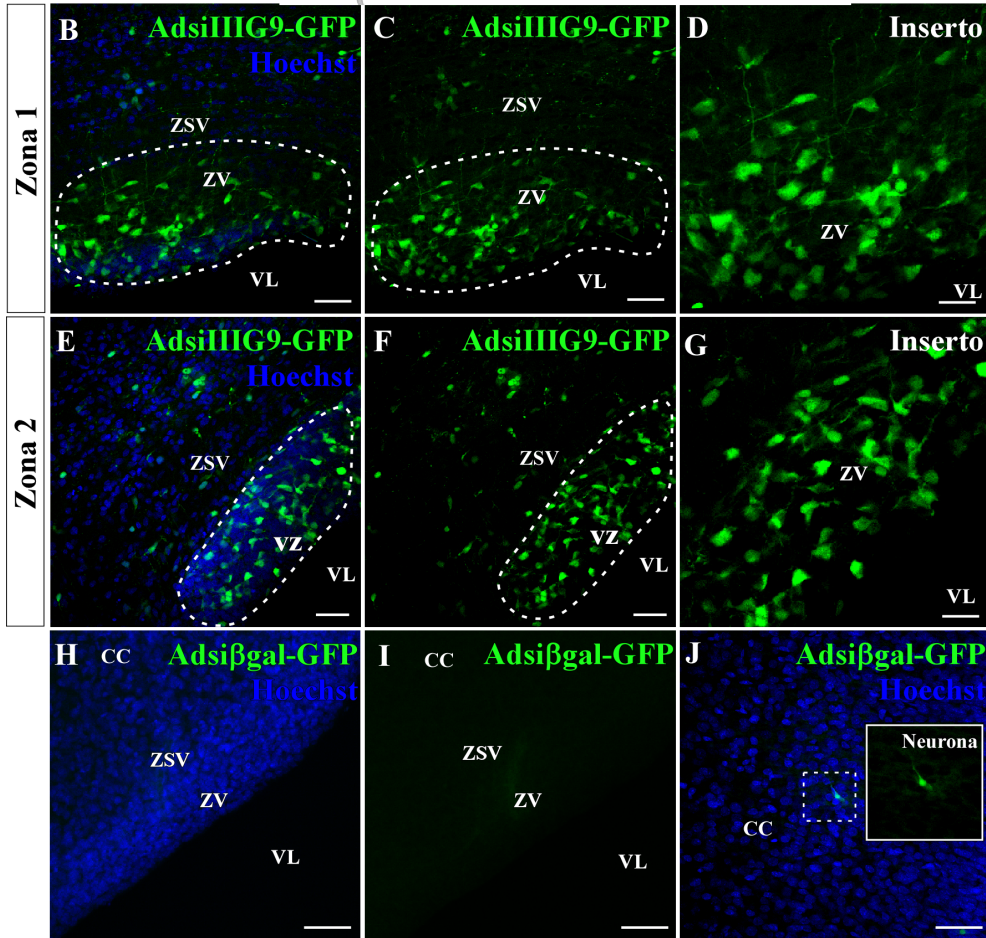
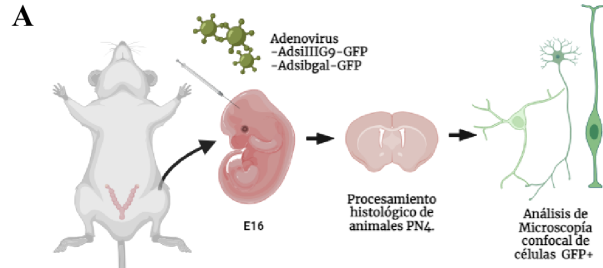
### 1.3 Efecto de la inhibición de IIIIG9 en el estadio embrionario E16 (*in utero*).

Hemos analizado la expresión y distribución de IIIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y cadherinas en la zona ventricular del cerebro embrionario, postnatal y adulto. Nuestros antecedentes sugieren que estas proteínas estarían participando en mantención de la integridad de la pared ventricular. De esta forma, los antecedentes previos indican que la inhibición de la expresión de IIIIG9 en un cerebro adulto, genera denudación ependimaria, astrogliosis parenquimatosa y ventriculomegalia (presente tesis y Baeza y col.,2021). Sin embargo, se desconocen los efectos de la inhibición de IIIIG9 en estadios embrionarios.

Para alcanzar este objetivo, hemos utilizado la técnica de inyección intracerebroventricular (i.c.v) del adenovirus inhibidor de IIIIG9 *in utero* (AdsiIIIIG9-GFP) en cerebros del estadio embrionario E16, y que fueron analizados al día post-natal 4 (Figura 20A), al analizar los cortes histológicos observamos la acumulación de células GFP-positivas en la zona ventricular (Figura 20B-G, demarcado con línea punteada). Las células GFP-positivas se disponen en diversas direcciones, eventualmente indicando una pérdida de la polaridad celular (Figura 20D y G). En las zonas externas de la corteza cerebral, igualmente se observan células GFP-positivas (ver más adelante). Respecto a los cerebros inyectados con Adsi $\beta$ gal-GFP (adenovirus control), no observamos células GFP-positivas en la zona

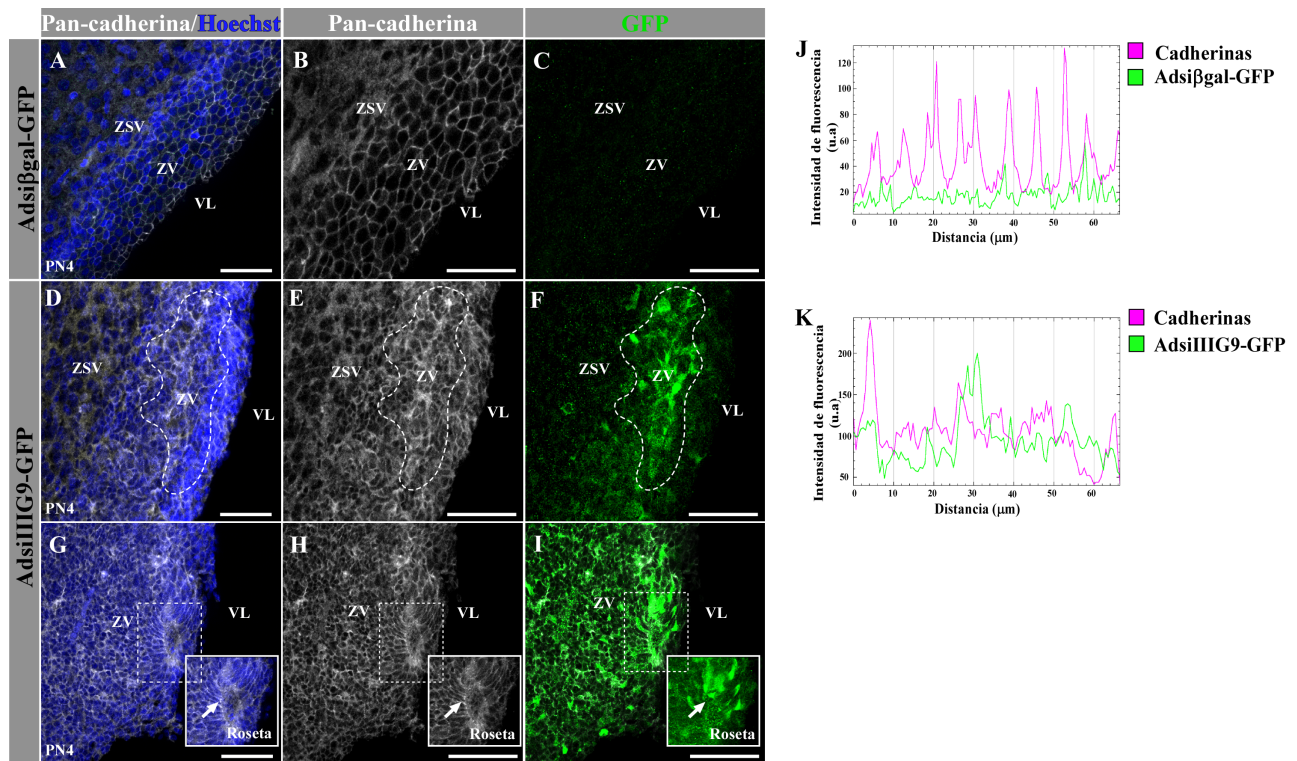
ventricular (ZV). Solo detectamos células GFP-positivas con morfología neuronal, en las zonas externas de la corteza cerebral (CC) (Figura 20H-J, inserto). Los análisis cuantitativos (N=3) indicaron que la intensidad de fluorescencia promedio para GFP fue significativamente mayor en la zona ventricular tratada con el adenovirus inhibidor de IIIIG9, al ser comparada con su control (Figura 20K). Podemos inferir que la inhibición de la expresión IIIIG9 a nivel ventricular podría afectar la migración de las células generadas a nivel ventricular.

En una siguiente etapa, definimos si el tratamiento con AdsiIIIIG9-GFP afecta la distribución normal de cadherinas. Los análisis realizados al día post-natal 4, mostraron la presencia de cadherinas menos localizadas en la pared ventricular tratada con AdsiIIIIG9-GFP, en comparación a los cerebros tratados con el adenovirus control (Figura 21 J y K). Se observa una mayor alteración en el patrón de distribución de las cadherinas en aquellas zonas en donde se encuentran las células GFP positivas (Figura 21 E-F, línea punteada, J y K). Por otro lado, podemos observar la presencia de rosetas ventriculares, que corresponden a pequeños lúmenes con células polarizadas que se generan por la pérdida de la polaridad celular en la línea endimaria (Figura 21 G-I).



**Figura 20. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria induce la presencia de acúmulos de células en la zona ventricular.**

**A.** Esquema representativo del procedimiento de inyección de adenovirus *in utero*. Los embriones fueron inyectados i.c.v con el adenovirus inhibidor (AdsiIIIIG9-GFP, N= 10) y en paralelo otro grupo de animales con el adenovirus control (Adsiβgal-GFP, N= 10) en el estadio E16 y fueron sacrificados al estadio PN4. **B-G.** Detección de GFP en cerebros inyectados con el adenovirus inhibidor. Los núcleos fueron marcados con Hoescht. Se observa a nivel ventricular acúmulos de células GFP positivas cuyos procesos se disponen en distintas direcciones. **H-J.** Detección de GFP en cerebros inyectados con el adenovirus control. Los núcleos fueron marcados con Hoescht. No se observa señal fluorescente en la zona ventricular, pero si se detectaron neuronas GFP positiva en la corteza cerebral. **K** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de GFP, en la zona ventricular, en cerebros tratados con Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP. El análisis estadístico t-student se realizó con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\*\* $P < 0.001$ ), N= 6. ua: unidades arbitrarias, ZSV: zona subventricular, ZV: zona ventricular, VL: ventrículo lateral, CC: corteza cerebral. Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en B-C, E-F y H-J; 15  $\mu\text{m}$  en D y G.



**Figura 21. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria induce una distribución alterada de las cadherinas.**

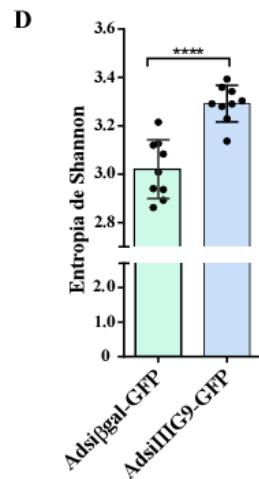
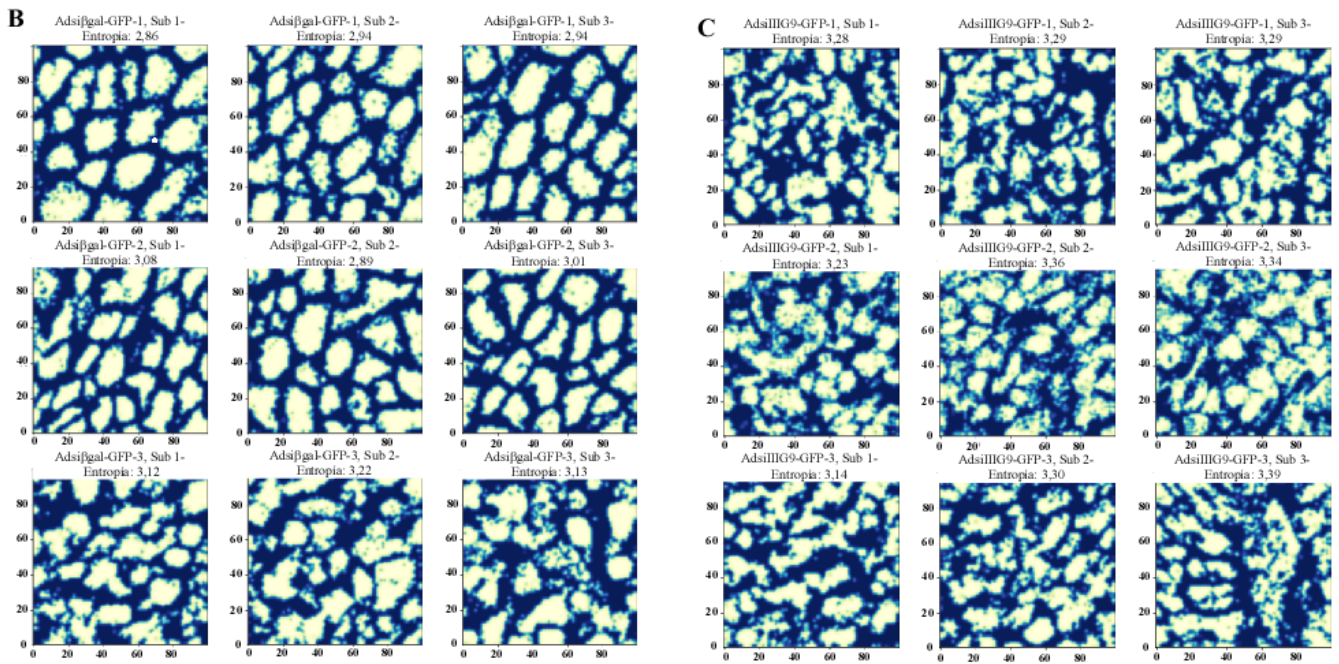
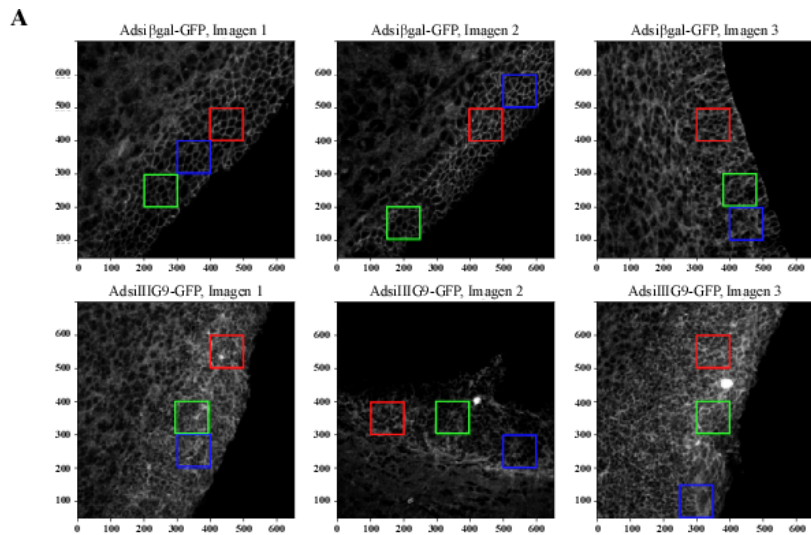
Los embriones fueron inyectados i.c.v con el adenovirus inhibidor (AdsiIIIIG9-GFP, N= 10) y en paralelo otro grupo de animales con el adenovirus control (Adsiβgal-GFP, N= 10) en el estadio E16 y fueron sacrificados al estadio PN4. **A-C.** Detección de cadherinas y -GFP en cerebros inyectados con el adenovirus control. Los núcleos fueron marcados con Hoescht. No se observa señal fluorescente en la zona ventricular. **D-I.** Detección de cadherinas y -GFP en cerebros inyectados con el adenovirus inhibidor. Los núcleos fueron marcados con Hoescht. Se observa señal fluorescente a nivel ventricular. **G-I** En el inserto se observa una roseta ventricular con un lumen central. **J.** Perfil de intensidad de fluorescencia entre las cadherinas (magenta) y el adenovirus control (verde), trazando un ROI. **K.** Perfil de intensidad de



fluorescencia entre las cadherinas (magenta) y el adenovirus inhibidor (verde), trazando un ROI. ZSV: zona subventricular, ZV: zona ventricular, VL: ventrículo lateral. Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en A-I. Aumento: 400X.

Realizamos un análisis de entropía de Shannon (Shannon, 1948), usando las imágenes de la pared ventricular en ambas condiciones adenovirales (AdsiIIIIG9-GFP y Adsi $\beta$ gal-GFP) que fueron obtenidas por microscopía confocal y con el marcador para pan-cadherinas (Cy5). Se utilizaron tres imágenes por condición, y en cada una de ellas se seleccionaron tres áreas diferentes (Figura 22 A, Cuadros: rojo, verde y azul). A partir de los cuadros seleccionados de la zona ventricular, se obtuvieron imágenes invertidas de alto contraste (Figura 22 B y C). Luego, utilizando los valores numéricos de la imagen, se agruparon los datos según intervalos de intensidad de brillo. Posteriormente, se calculó la probabilidad de distribución para cada intervalo de intensidad para aplicar el  $\text{Log}_2$  de este valor.

Finalmente, se calculó la entropía de Shannon, sumando el producto de las probabilidades de cada nivel de brillo por el  $\text{Log}_2$  del valor de probabilidad obtenido previamente (ver en Materiales y Métodos). Los valores nos indican que existen diferencias significativas entre ambas condiciones, ya que la pared ventricular tratada con el adenovirus inhibidor muestra una mayor entropía que la condición control (Figura 22 D).



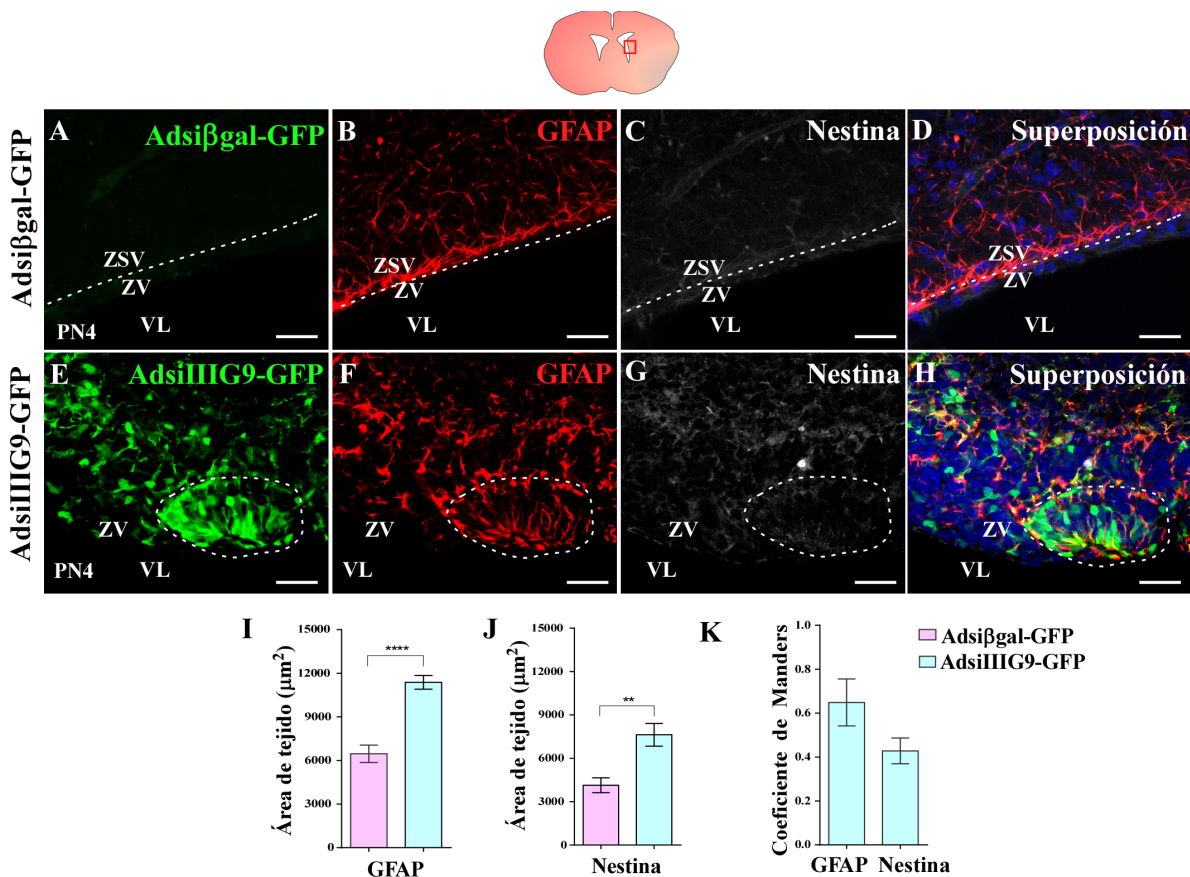
**Figura 22. La inhibición de IIIIG9 en la pared ventricular embrionaria indica un mayor grado de entropía en las cadherinas.**

Se utilizaron imágenes de la pared ventricular inyectada i.c.v con el AdsiIIIIG9-GFP (N=3) y con el Adsiβgal-GFP (N=3) durante el estadio E16 y posteriormente sacrificados al estadio PN4. Se utilizó el marcador para pan-cadherinas (Cy5, blanco). **A** Cada imagen fue analizada en triplicado, seleccionando tres áreas diferentes (Cuadros: Rojo, verde y azul). **B** Imágenes de alto contraste para el análisis de entropía de Shannon en la condición tratada con el Adsiβgal-GFP (N=3). **C** Imágenes de alto contraste para el análisis de entropía de Shannon en la condición tratada con el AdsiIIIIG9-GFP (N=3). **D** Gráfica de entropía de Shannon, en ambas condiciones analizadas (N=3). El análisis estadístico t-student nos indica que existen diferencias significativas entre ambas condiciones (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Aumento: 400X.

Con el fin de identificar el linaje celular asociado a los cúmulos ventriculares, los animales postnatales inyectados con los respectivos adenovirus fueron analizados por medio de inmunohistoquímica. En la pared ventricular transducida con el adenovirus control (Adsiβgal-GFP) (Figura 23A-D), se observó una distribución normal de células positivas para GFAP en la región subependimaria (Figura 23B) y una reacción levemente positiva a nestina (Figura 23C) en la región endependimaria y subependimaria, que fueron negativas para GFP. En los cerebros tratados con AdsiIIIIG9-GFP (Figura 23E-H), se observó marca positiva para GFP a nivel de la pared ventricular (Figura 23E), cuyas células fueron además GFAP y nestina

positivas (Figura 23F y G, respectivamente). Estos resultados sugieren la presencia en la pared ventricular post-natal, de células progenitoras con compromiso astrogliar.

Las cuantificaciones nos indican que el área marcada con GFAP en la pared ventricular analizada (Figura 23I), es significativamente superior en la condición de inhibición de IIIIG9 ( $11378 \pm 470.42$ , N=3), respecto a la condición control ( $6462 \pm 598.62$ , N=3), similar a lo observado para el marcador nestina con AdsiIIIIG9-GFP ( $7627 \pm 789.52$ , N=3), respecto a la condición control ( $4135 \pm 511.37$ , N=3) (Figura 23J). El coeficiente de Manders entre GFAP y la señal de AdsiIIIIG9-GFP es alto ( $0.648 \pm 0.106$ , N=3), similar a lo observado entre nestina y el AdsiIIIIG9-GFP ( $0.428 \pm 0.058$ , N=3) (Figura 23K).

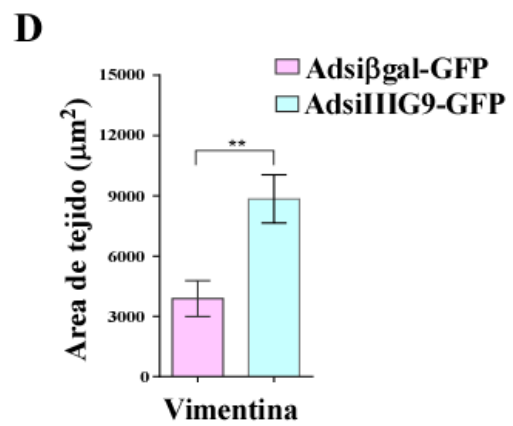
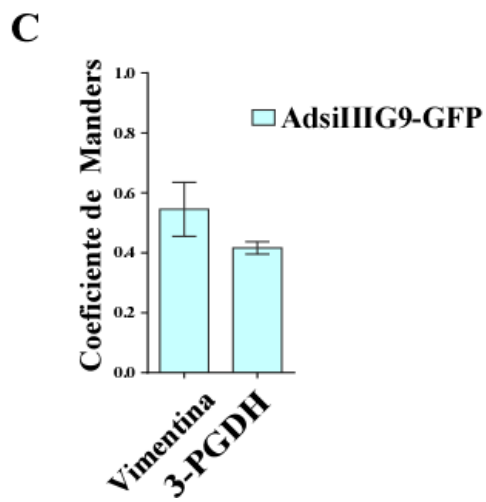
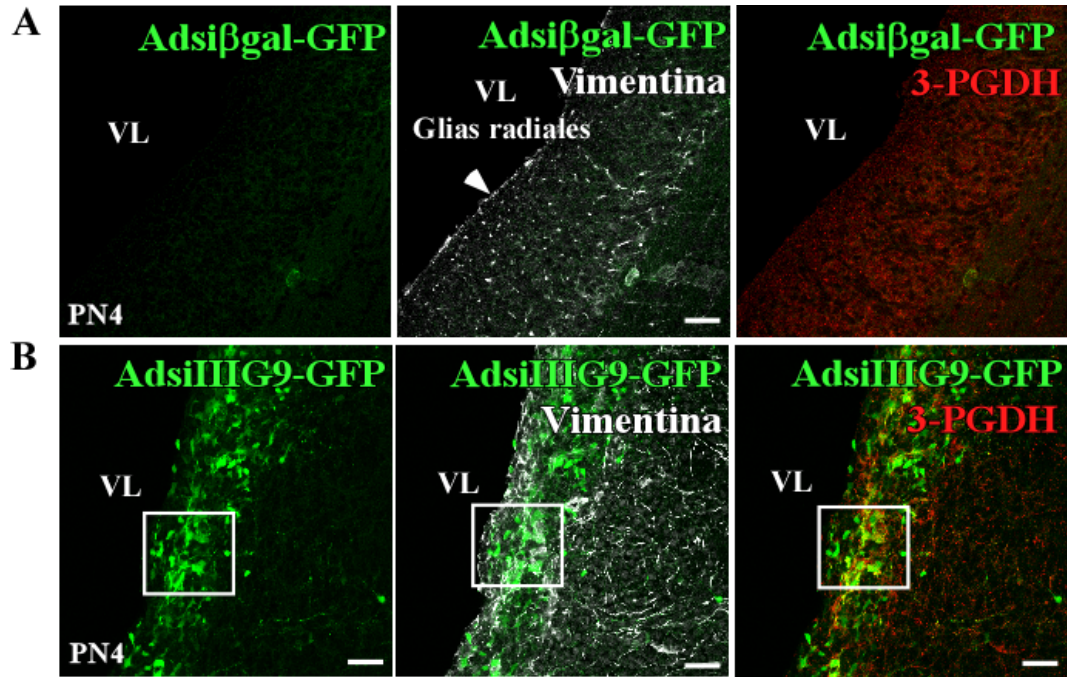


**Figura 23. Las células transducidas con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en la pared ventricular muestran un linaje astrogial.**

**A-H.** Inmunofluorescencia para GFAP (marcador de astrocitos, rojo) y Nestina (marcador de progenitores, blanco) en cortes histológicos de los animales inyectados con los respectivos adenovirus (Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). **E-H** Se observa un *pinwheel*, que corresponde a una estructura del nicho neurogénico (línea punteada). **I-J** Área de tejido analizado positivo a GFAP o nestina en animales inyectados con AdsiIIIIG9-GFP o Adsiβgal-GFP. El análisis estadístico t-student se realizó con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ),  $N = 3$ . **K.** Cuantificación del coeficiente de Manders en las muestras AdsiIIIIG9-GFP y marcadas para GFAP (rojo) o nestina (blanco). Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en A-H.

Para corroborar la presencia de células gliales en la población de células transducidas por el AdsiIIIIG9-GFP, utilizamos el marcador de filamento intermedio vimentina (Cy5) o 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (3-PGDH), que corresponde a una enzima altamente expresada en la glía radial (Yamasaki *et al.*, 2001). Nuestros resultados indican que ambas proteínas se localizan a nivel ventricular, tanto en cerebros tratados con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 y con el adenovirus control (Figura 24A-B). Sin embargo, observamos que en la condición control los pies apicales de la glía radial se disponen de forma ordenada y polarizada (Figura 24A), en cambio en la condición de inhibición la disposición de las glías radiales es aleatoria y escasamente polarizada, como previamente hemos observado (Figura 24B).

El coeficiente de Manders entre el marcaje del adenovirus inhibidor y vimentina fue de  $0.544 \pm 0.090$  (N=3) y entre el marcaje del adenovirus inhibidor y 3-PGDH fue de  $0.416 \pm 0.020$  (N=3) (Figura 24C), mostrando una importante colocalización. Cuantificamos el área de la pared ventricular, que fue positiva a vimentina, observando diferencias significativas entre la condición de inhibición adenoviral de IIIIG9 ( $8843 \pm 1199.59$ , N=3) o control ( $3882 \pm 893.25$ , N=3) (Figura 24D). Podemos concluir que el efecto de inhibición de IIIIG9 genera un aumento en la población de células gliales en la pared ventricular, con una disposición no polarizada.



**Figura 24. La inhibición *in vivo* de IIIG9 en E16 genera un aumento la población de la glía radial en la pared ventricular al día PN4.**

**A-B.** Inmunofluorescencia para los marcadores de glia radial vimentina (Cy5, blanco) y 3-PGDH (Cy3, rojo) en cortes histológicos de los animales inyectados con los respectivos adenovirus (Adsiβgal-GFP y AdsiIIIG9-GFP). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Se observa la presencia de células que expresan GFP (AdsiIIIG9-GFP) y que son positivas a ambos marcadores gliales. Las células se disponen en diversas direcciones en los animales tratados con el AdsiIIIG9-GFP, en ausencia de una disposición radial como se observa en la situación control. **C.** El coeficiente de Manders indica codistribución entre el adenovirus inhibidor de IIIG9 y los marcadores de glía radial (3-PGDH y vimentina). **D.** El área ocupada por el marcador vimentina en la pared ventricular, es significativamente superior en la condición de inhibición de IIIG9. El análisis estadístico t-student se realizó con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\*\* $P < 0.01$ ), N= 3. Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en A-B y 10  $\mu\text{m}$  en insertos.

Finalmente utilizamos anticuerpos específicos para tubulina-βIII (Tub-β3) y el factor de transcripción de dominio T-2 (Tbr2), que corresponden a marcadores de neuronas maduras y de progenitores intermedios, respectivamente. Los progenitores intermedios comúnmente pueblan la zona subventricular (ZSV). Observamos que en ambas condiciones (Figura 25A y E), se expresa Tub-β3 a nivel de la pared ventricular (Figura 25B y F), sin embargo, en la condición de inhibición de IIIG9 se observa una intensa inmunoreacción a nivel ventricular (Figura 25F-F1, flechas blancas). Por otro lado, Tbr2 se expresa en la pared ventricular, tratada

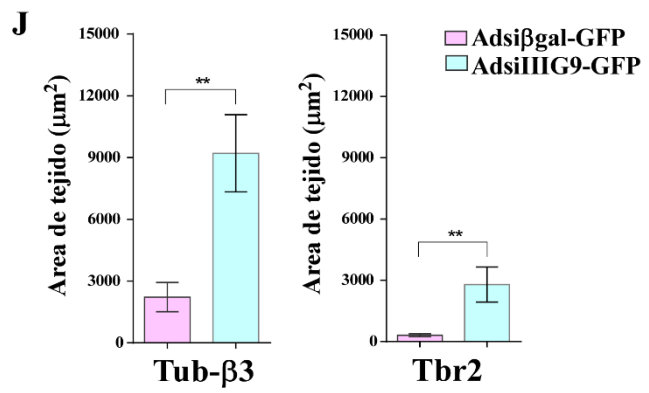
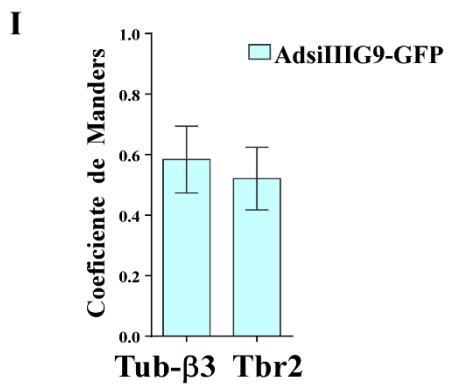
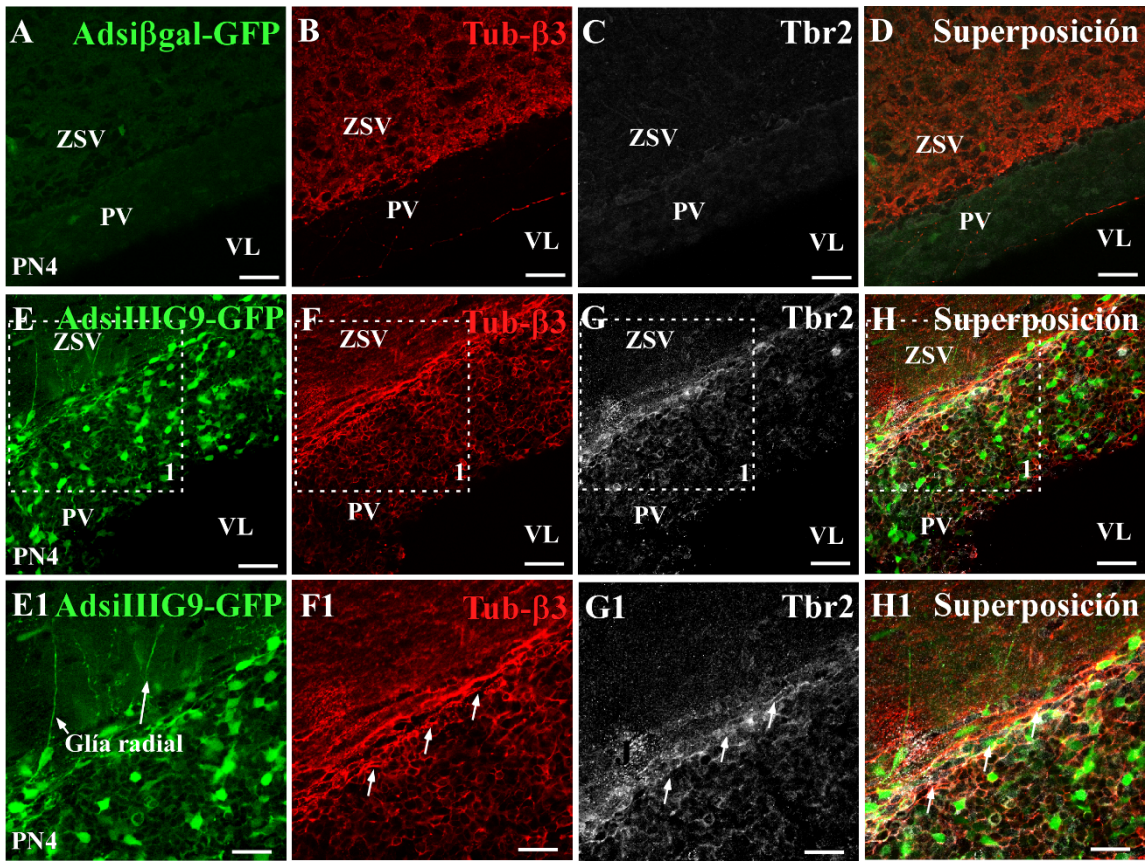


con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 (Figura 25G-G1) y no en la condición control (Figura 25C).

El coeficiente de Manders entre GFP y Tub- $\beta$ 3 fue de  $0.583 \pm 0.110$  (N=3) y entre GFP y Tbr2 fue de  $0.520 \pm 0.103$  (N=3) (Figura 25I), indicando que ocurre colocación en los cerebros inyectados con el AdsiIIIIG9-GFP.

Cuantificamos el área en los tejidos ( $\mu\text{m}^2$ ) en donde se distribuyen los marcadores Tub- $\beta$ 3 y Tbr2 en la pared ventricular, en ambas condiciones adenovirales (AdsiIIIIG9-GFP y Adsi $\beta$ gal-GFP), con un valor de  $9205 \pm 1873 \mu\text{m}^2$  (N=3) para Tub- $\beta$ 3 y  $2787 \pm 857.1 \mu\text{m}^2$  para Tbr2 (N=3), en la condición de inhibición de IIIIG9. En la condición control, se observó un valor de  $2220 \pm 710.3$  (N=3) y de  $310.5 \pm 71.98$  (N=3), respectivamente (Figura 25J).

Con los resultados presentados previamente, proponemos que cierta parte de la población de células presentes en los cúmulos ventriculares corresponden a progenitores intermedios que poseen un compromiso neuronal y que aún residen en la zona ventricular, a diferencia de lo observado en la condición control (Figura 25 E-H1 versus Figura 25A-D). De acuerdo a los resultados, podemos concluir que las células que forman parte de los cúmulos celulares transducidos con el adenovirus inhibidor poseen una mezcla de linajes, que comprenden glías radiales, progenitores intermedios, astrocitos y neuronas.



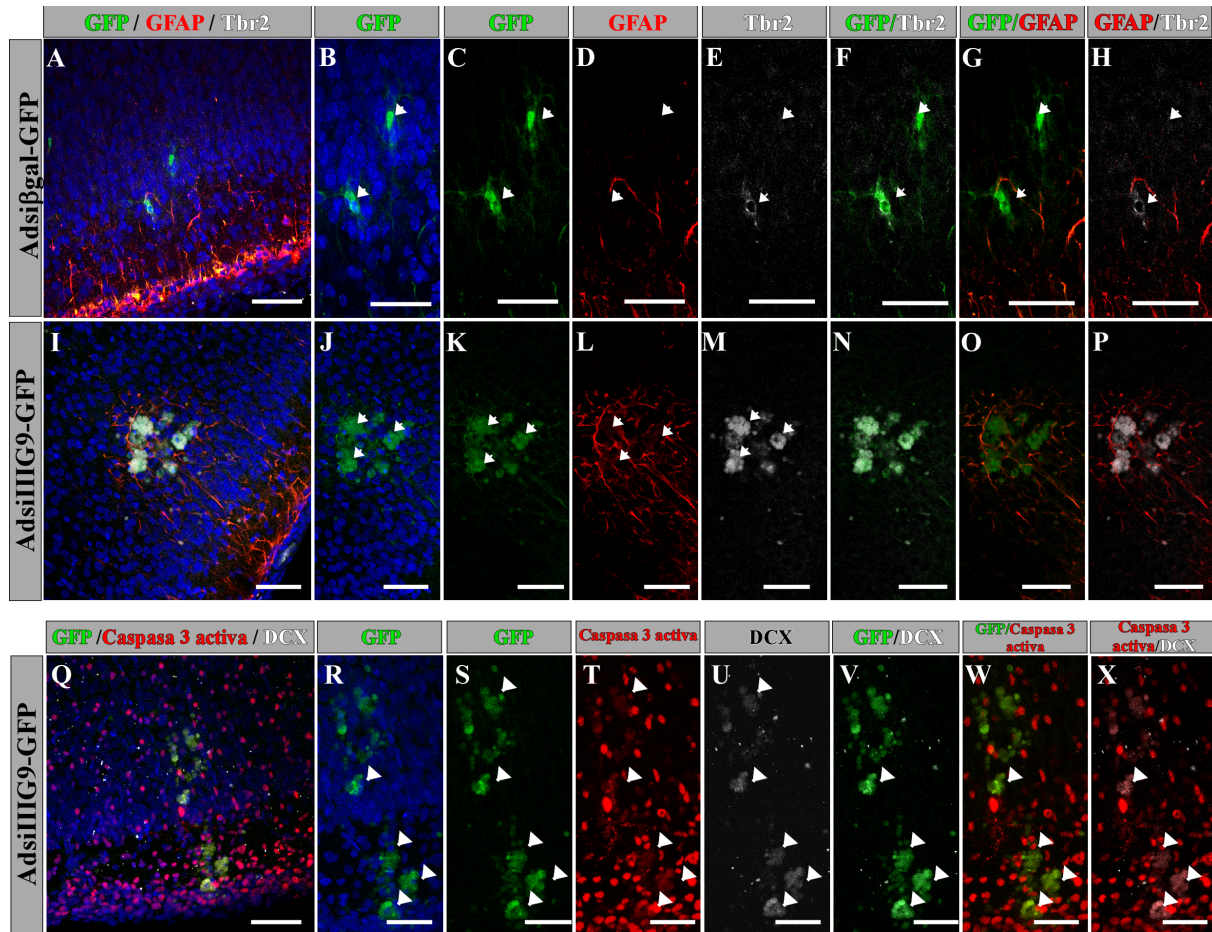
**Figura 25. Las células transducidas con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en la pared ventricular muestran un compromiso neuronal.**

**A-H1.** Inmunofluorescencia para Tub- $\beta$ 3 (marcador de neuronas, rojo) y Tbr2 (marcador de progenitor intermedio, blanco) en cortes histológicos de los animales inyectados con los respectivos adenovirus (Adsi $\beta$ gal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Se observa la presencia de células que expresan GFP y son positivas a ambos marcadores en los animales con IIIIG9 inhibido a diferencia de la situación control. **I.** El coeficiente de Manders indica codistribución entre el adenovirus inhibidor de IIIIG9 junto a Tub- $\beta$ 3 y Tbr2 (valor promedio  $\pm$  desviación estándar). **J.** El área ocupada por el marcador Tub- $\beta$ 3 y Tbr2 en la condición de inhibición, es significativamente superior respecto al adenovirus control. El análisis estadístico t-student se realizó con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\*\* $P < 0.01$ ), N= 3. Barra de tamaño: 30  $\mu$ m en A-H

Por otra parte, y como se indicó previamente, en los cerebros tratados con Adsi $\beta$ gal-GFP o AdsiIIIIG9-GFP, observamos la presencia de células GFP-positivas en diferentes zonas de la corteza cerebral (Figura 26A). En los cerebros tratados con el adenovirus control, se detectaron células individuales con morfología neuronal, que fueron negativas para GFAP, y donde solo algunas de ellas fueron positivas para el marcador Tbr2 (progenitor intermedio) (Figura 26A-H). GFP y Tbr2 presentaron co-localización (Figura 26F). En los cerebros tratados con AdsiIIIIG9-GFP, se observaron celulares agrupadas con morfología redondeada,

negativas a GFAP y con señal positiva para Tbr2 (Figura 26I-P). GFP y Tbr2 presentaron co-localización (Figura 26N).

Finalmente, en estas muestras analizamos la expresión de caspasa-3-clivada y doblecortina, que corresponden a marcadores de apoptosis y de migración neuronal, respectivamente (Figura 26Q-X). Los resultados indicaron que las células tratadas con AdsiIIIG9-GFP, expresan doblecortina, pero no expresan caspasa 3-clivada (Figura 26V-W, cabezas de flechas). En este contexto debemos considerar que durante el desarrollo de la corteza cerebral se expresa ampliamente la caspasa-3-clivada, no solamente como marcador de muerte por apoptosis, sino también debido a procesos de plasticidad neuronal. Nuestros resultados nos indican que las células Tbr2 y GFP-positivas en la corteza cerebral de los cerebros inyectados con el adenovirus inhibidor de IIIG9, corresponde a un progenitor intermedio que se localizan comúnmente en la zona subventricular.

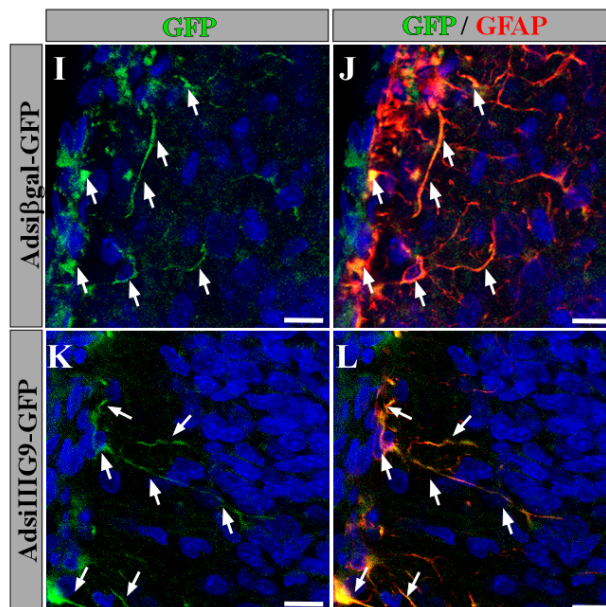
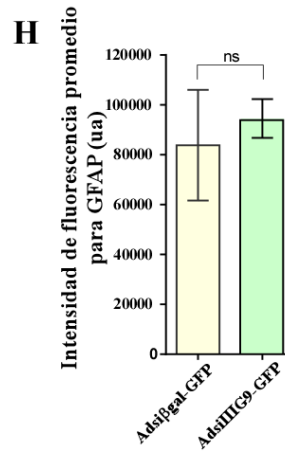
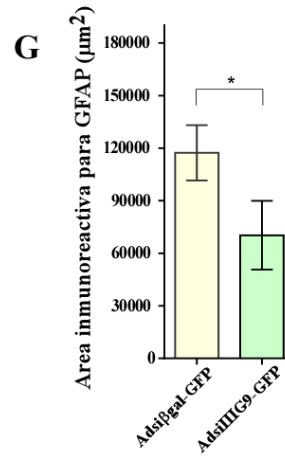
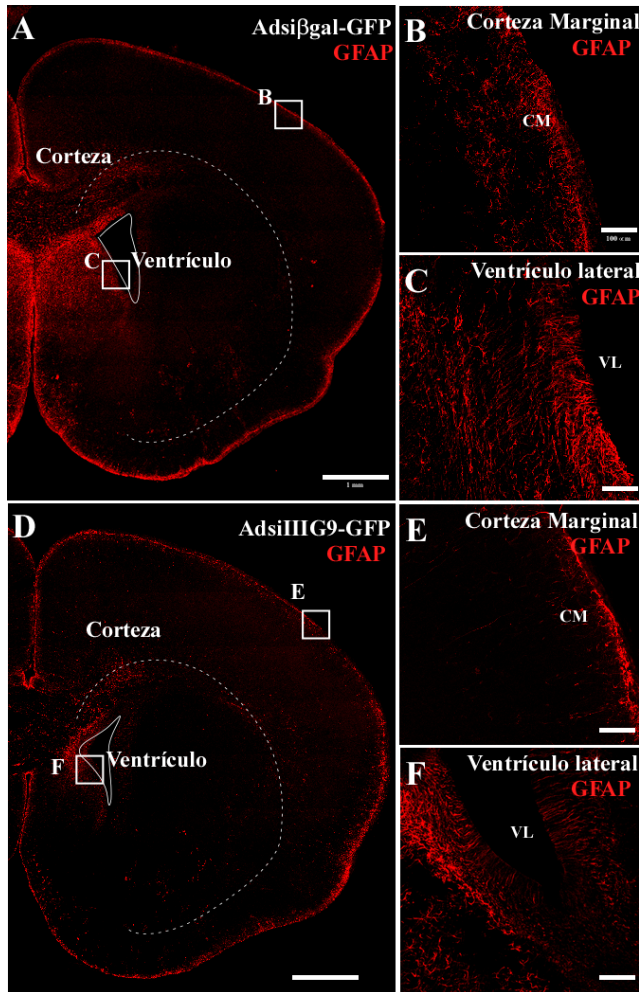


**Figura 26.** La inhibición de IIIIG9 en cerebros E16 induce la presencia de cúmulos de células positivas a Tbr2/DCX y negativas a GFAP/caspasa 3 activa en la corteza cerebral.

A-H y I-P. Inmunofluorescencia para detectar las proteínas GFAP (rojo) y Tbr2 (blanco) en cortes histológicos frontales de los animales inyectados con los adenovirus Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9, respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. En los insertos hacia la derecha se observan aumentos digitales de las células positivas a GFP con diversas

combinaciones de anticuerpos. **Q-X.** Inmunofluorescencia para detectar las proteínas Caspasa-3 activa (rojo) y doblecortina (DCX) (blanco) en cortes histológicos frontales de los animales inyectados con el AdsiIIIIG9-GFP. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barra de tamaño: 150  $\mu\text{m}$  en A, I, Q; 80  $\mu\text{m}$  en B-C, J-P y R-X.

Debido a que el inhibidor de IIIIG9 fue inyectado i.c.v en una etapa embrionaria donde comienza la diferenciación astrocítica, consideramos pertinente analizar en mayor detalle la formación cerebral de estas células. De esta forma, estudiamos la expresión del marcador astrocítico GFAP (Figura 27). En ambas condiciones (Adsi $\beta$ gal-GFP o AdsiIIIIG9-GFP), se muestra una imagen a bajo aumento y un aumento de la corteza cerebral y ventrículo lateral (Figura 27A-C y 27D-F, respectivamente). En el control, se observó una intensa reacción positiva para GFAP a nivel periventricular y en las regiones más externas de la corteza cerebral (Figura 27B-C). En la corteza externa, los astrocitos se concentraron en el borde de la corteza marginal, con una gradiente de migración hacia el interior de la corteza. El análisis de los animales inyectados con AdsiIIIIG9-GFP, mostró una menor reacción positiva para GFAP a nivel ventricular y subventricular (Figura 27F), una intensa tinción positiva en la región marginal, pero una reducida reacción positiva en las regiones submarginales de la corteza cerebral (Figura 27E), lo cual fue confirmado con el análisis cuantitativo (N=3) (Figura 27G-H). Finalmente, observamos que los astrocitos presentes en el borde de la corteza cerebral (zona marginal) presentaron señal positiva para GFP (señal de infección adenoviral), que, a su vez, presenta colocalización con GFAP (Figura 27I-L, flechas).



**Figura 27. La inhibición de IIIIG9 induce una disminución en la población astrocítica de la zona ventricular y la corteza cerebral marginal.**

**A-C y D-F.** Inmunofluorescencia para el marcador astrocítico GFAP (Cy3, rojo) en cortes histológicos frontales de los animales inyectados con los adenovirus Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9, respectivamente. **A y D.** La imagen corresponde a una reconstrucción en mosaico del espécimen (análisis de Tile Scan), en donde podemos observar la corteza cerebral y el ventrículo lateral en los cerebros inyectados. **B-C y E y F.** Aumento digital de la corteza marginal y ventrículo lateral en cerebros inyectados con Adsiβgal-GFP o AdsiIIIIG9-GFP, respectivamente. **G.** Cuantificación del área inmunoreactiva para GFAP ( $\mu\text{m}^2$ ) en cerebros inyectados con Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP. **H.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de la tinción de GFAP entre cerebros inyectados con Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP. El análisis estadístico t-student se realizó con el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (\* $P < 0.1$ ; ns: no significativo), N= 3. ua: unidades arbitrarias. **I-L.** Análisis de colocalización para la fluorescencia de GFP y la inmunotinción para GFAP en cerebros inyectados con Adsiβgal-GFP y AdsiIIIIG9-GFP, N= 3. VL: ventrículo lateral. CM: corteza marginal. Barra de tamaño: 1 mm en A y D; 100  $\mu\text{m}$  en B-C y E-F; 10  $\mu\text{m}$  en I-L.

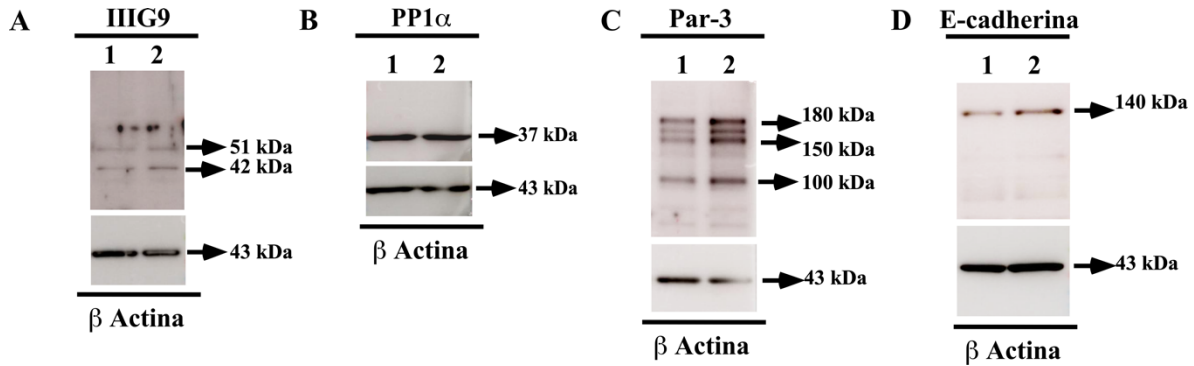


## **CAPITULO 2. Evaluar la interacción de IIIG9 con PP1 $\alpha$ y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.**

### **2.1 Caracterización del modelo *in vitro* de células MDCK.**

En el primer capítulo, hemos analizado la distribución de las proteínas IIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y cadherinas en la pared ventricular de animales adultos, post-natales y embrionarios. Proponemos que estas proteínas forman un complejo en las uniones adherentes que mantienen la integridad de la pared ventricular en desarrollo.

En este capítulo estudiaremos la interacción entre las proteínas, utilizando diferentes métodos de análisis *in vitro* e *in situ*. En una primera fase, hemos estudiado las células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells), un tipo celular ampliamente utilizado para realizar análisis de morfogénesis epitelial y polaridad celular. Analizamos la expresión de las proteínas utilizando la técnica de *Western blot*, donde IIIG9 fue detectada con dos bandas de 51 y 42 kDa (Figura 28A). Posteriormente, analizamos la expresión de PP1 $\alpha$ , con una banda de 37 kDa (Figura 28B). Además, en células MDCK detectamos las tres bandas de Par-3 reportadas previamente, de 100, 150 y 180 kDa (Figura 28C). Finalmente, analizamos la expresión de E-cadherina, observando una banda de 140 kDa en células MDCK (Figura 28D).

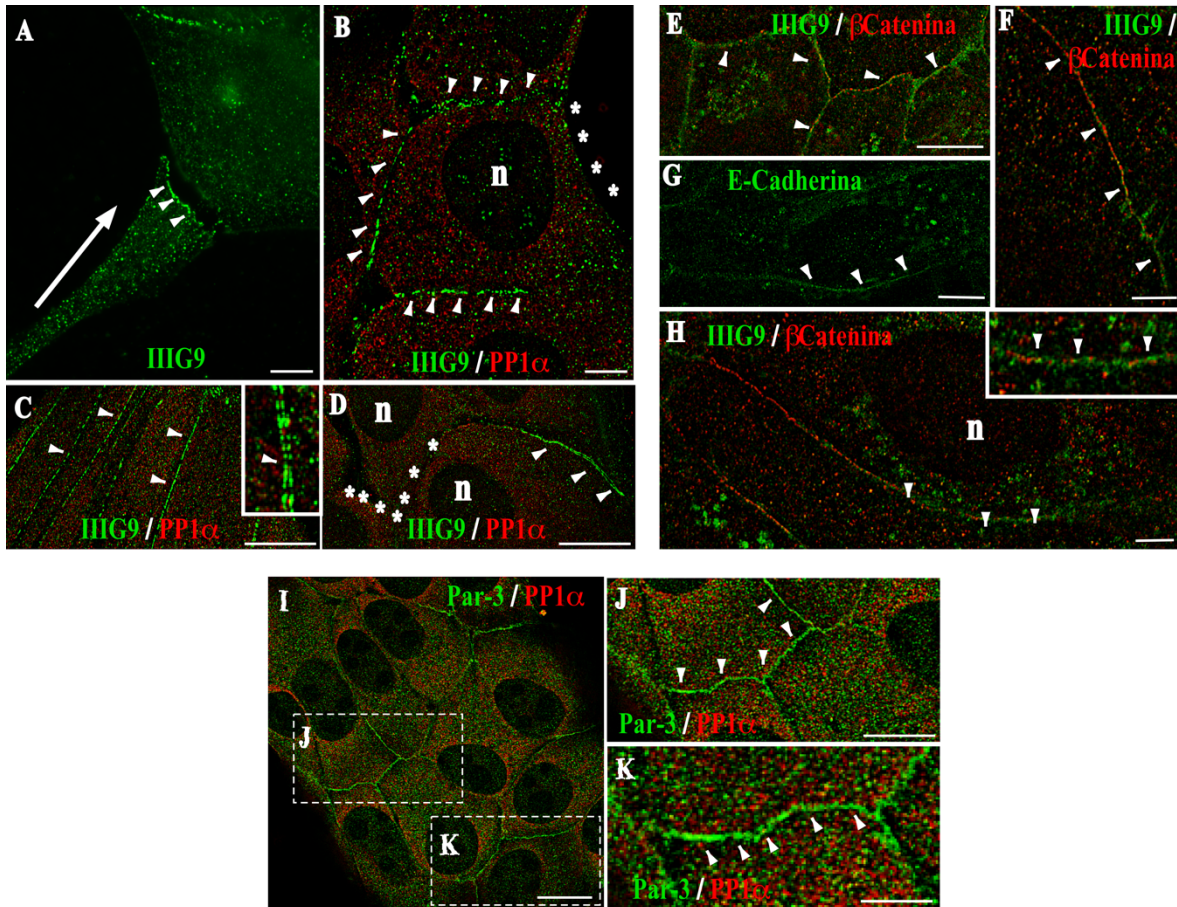


**Figura 28. Las células MDCK expresan IIIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 y E-cadherina.**

**A-D.** Análisis de *Western blot* para utilizando extractos totales de proteínas (ETP) obtenidos desde células MDCK. **A.** Inmunodetección de IIIIG9. Carril 1-2: 5  $\mu$ g y 10  $\mu$ g de ETP. N=3. **B.** Inmunodetección de PP1 $\alpha$ . Carril 1-2: 100  $\mu$ g y 200  $\mu$ g de ETP. N=3. **C.** Inmunodetección de Par-3. Carril 1-2: 10  $\mu$ g y 15  $\mu$ g de ETP. N=3. **D** Inmunodetección de E-cadherina. Carril 1-2: 50  $\mu$ g y 80  $\mu$ g de ETP. N=3. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

En una segunda fase, realizamos un análisis de distribución utilizando microscopía SIM de superresolución (resolución, 110 nm lateral, xy). Los resultados indicaron que IIIIG9 (verde) se distribuye de forma polarizada en la porción distal de filopodios, cuando estos se aproximan a una célula vecina (Figura 29A, puntas de flecha). Además, IIIIG9 se distribuye en un patrón punteado a nivel citoplasmático. Cuando las uniones adherentes están establecidas, detectamos que IIIIG9 se localiza en esa región (Figura 29B-D, puntas de flechas), mientras que PP1 $\alpha$  (Cy3) muestra una distribución ubicua en todo el citoplasma (Figura 29B-D). En

algunas muestras, fue posible observar a IIIIG9 generando un efecto de doble membrana celular (Figura 29C, inserto), concentrado en “parches intermitentes”.



**Figura 29. IIIIG9, PP1 $\alpha$  y Par-3 se localizan en las cercanías de los complejos de unión en cultivos confluentes de células MDCK.**

**A-D.** Análisis de microscopía de superresolución SIM para detectar IIIIG9 (verde) y PP1 $\alpha$  (rojo) en células MDCK. N=3. **A.** Se muestra un proceso celular (filopodia, flecha larga) acercándose a una célula vecina (cabezas de flechas). **B-C.** IIIIG9 presenta un patrón punteado y se localiza en los contactos entre células vecinas (flechas) y no en las membranas celulares

libres (cabezas de flechas). **E-H.** Análisis de microscopía de superresolución SIM para detectar IIIIG9 (verde),  $\beta$ -Catenina (rojo) y E-Cadherina (verde) en células MDCK (N=3). **I-K.** Análisis de microscopía de superresolución SIM para detectar Par-3 (verde) y PP1  $\alpha$  (rojo) (N=3). Barra de tamaño: 2  $\mu\text{m}$  en A-B y F-G; 5  $\mu\text{m}$  en C-D e I-K; 10  $\mu\text{m}$  en E; 1  $\mu\text{m}$  en H.

Utilizando la misma técnica de microscopía de superresolución, analizamos la distribución de IIIIG9 y  $\beta$ -catenina en cultivos de células MDCK confluentes (Figura 29E-H). Se observó que IIIIG9 mantiene su distribución en parches en la membrana celular, con una colocación parcial con  $\beta$ -catenina (Figura 29E-F y H, puntas de flecha), similar a lo observado para E-cadherina (verde) (Figura 29G).

Finalmente analizamos la distribución de Par-3 y PP1  $\alpha$  (Figura 29I-K), donde Par-3 se localiza en la membrana plasmática (posiblemente en uniones adherentes) en condición de confluencia (Figura 29I-K, puntas de flecha), y, además, observamos un patrón punteado a nivel citoplasmático. Por otro lado, PP1  $\alpha$  posee una distribución mayormente citoplasmática y también se encuentra cercana a las uniones celulares (Figura 29I-K).

Nuestros resultados obtenidos mediante microscopía de superresolución en células MDCK, nos indican que Par-3 y IIIIG9 se distribuyen en los complejos de unión, al colocalizar con marcadores específicos de uniones adherentes (E-cadherina y  $\beta$ -catenina). Sin embargo, PP1  $\alpha$  tiene una distribución preferentemente ubicua, sin descartar, que su detección en la membrana sea un problema de concentración relativa de la proteína.

Considerando que el modelo *in vitro* de células MDCK es sumamente versátil para recrear el proceso de polarización de los epitelios de mamíferos, estandarizamos el cultivo de

cistos (Guo y col., 2008). Para ello, probamos dos condiciones de cultivo descritas en la literatura donde las células MDCK fueron sembradas en cámaras Lab Tek sobre una cubierta de matrigel® o fueron mezcladas directamente con el matrigel® (N=3 en cada condición) (Figura 30A). En el primer caso obtuvimos cultivos 3D en monocapa (Figura 30A, B y E) y en el segundo caso, luego de 10 días *in vitro*, observamos que las células crecen formando cistos polarizados, con un lumen central en contacto directo con el dominio apical y un dominio basolateral que se encuentra en contacto directo con la matriz extracelular (Figura 30C-D, y F-G). El grado de polarización de los cistos puede ser observado con facilidad utilizando un microscopio óptico invertido. Las células MDCK crecieron formando cistos y, además, formaron una condición mixta entre redes 3D y cistos al interior del matrigel (Figura 30D y G). Todas las formas de crecimiento fueron positivas a E-cadherina (cian), localizada en la membrana celular (Figura 30B-G).

A

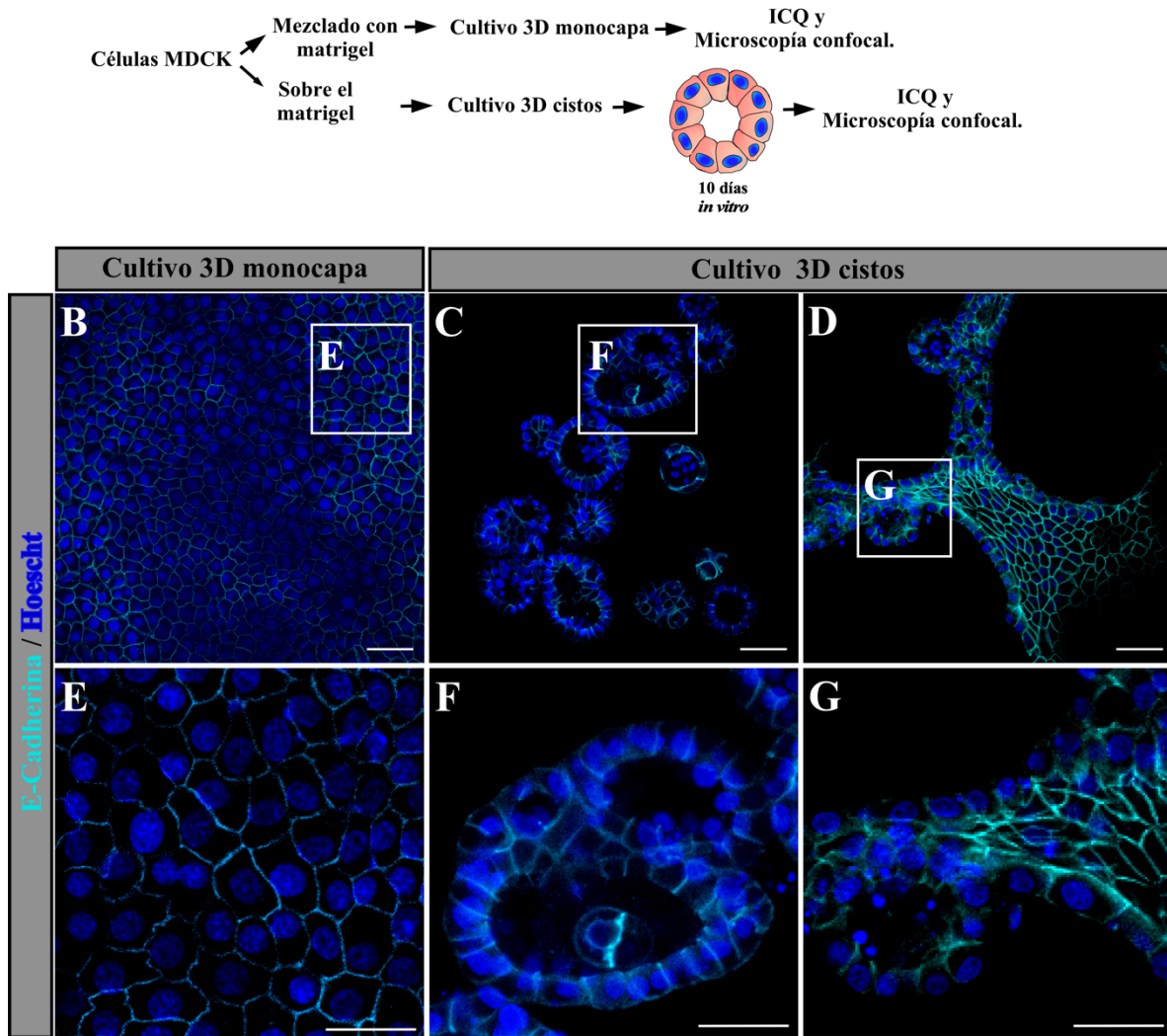
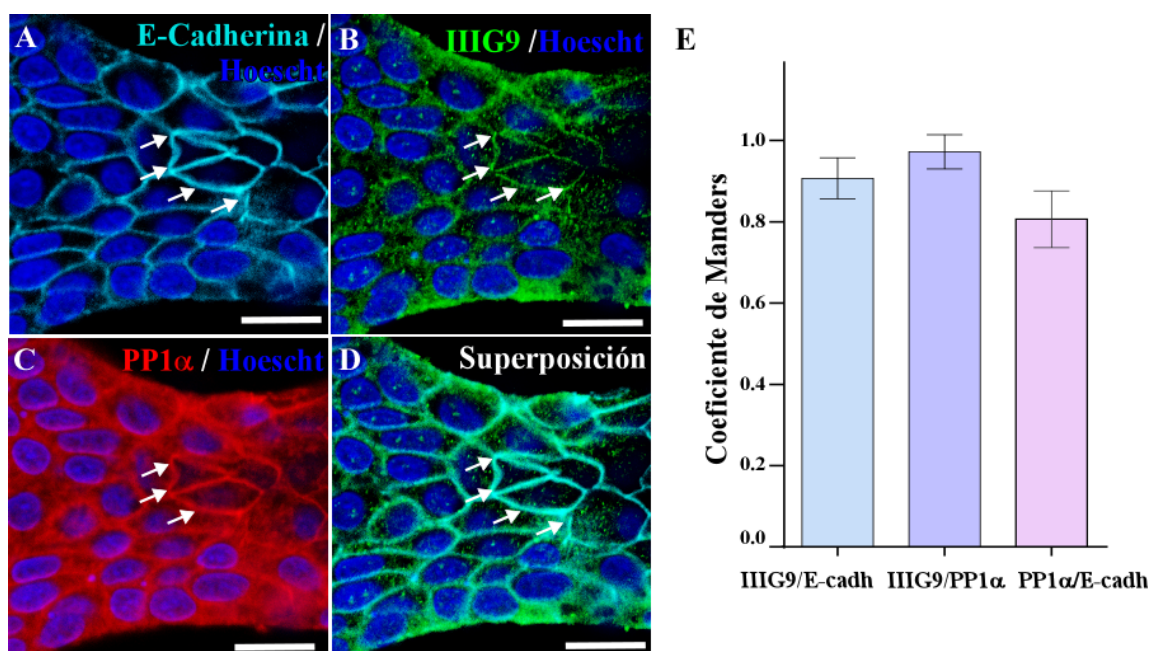


Figura 30. Caracterización del cultivo 3D de células MDCK.

A. Protocolo para la generación de cistos 3D de células MDCK en matrigel. **B y E.** Inmunofluorescencia para E-cadherina (Cy5, Cian) en cultivos 3D en monocapa. **C-D y F-G.** Inmunofluorescencia para E-cadherina (Cy5, Cian) en cultivo de cistos 3D. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. **E-G.** Corresponden a aumentos digitales de los cuadros respectivos en B-D. Barra de tamaño: 30  $\mu\text{m}$  en B-D y F-G; 15  $\mu\text{m}$  en E.

Los análisis inmunocitoquímicos en cultivos 3D en monocapa mostraron que las cadherinas se distribuyen en las uniones intercelulares (Figura 31A, flechas), colocalizando con IIIIG9 y PP1 $\alpha$  (Figura 31B-D, flechas). Realizamos un análisis del coeficiente de Manders (Figura 31E), donde definimos un valor para IIIIG9 y E-cadherina de  $0.906 \pm 0.050$  (N=6), para IIIIG9 y PP1 $\alpha$  es de  $0.971 \pm 0.042$  (N=7) y para PP1 $\alpha$  y E-cadherina de  $0.806 \pm 0.069$  (N=9).



**Figura 31. IIIIG9 y PP1 $\alpha$  se distribuyen junto a las cadherinas en cultivo 3D monocapa de células MDCK.**

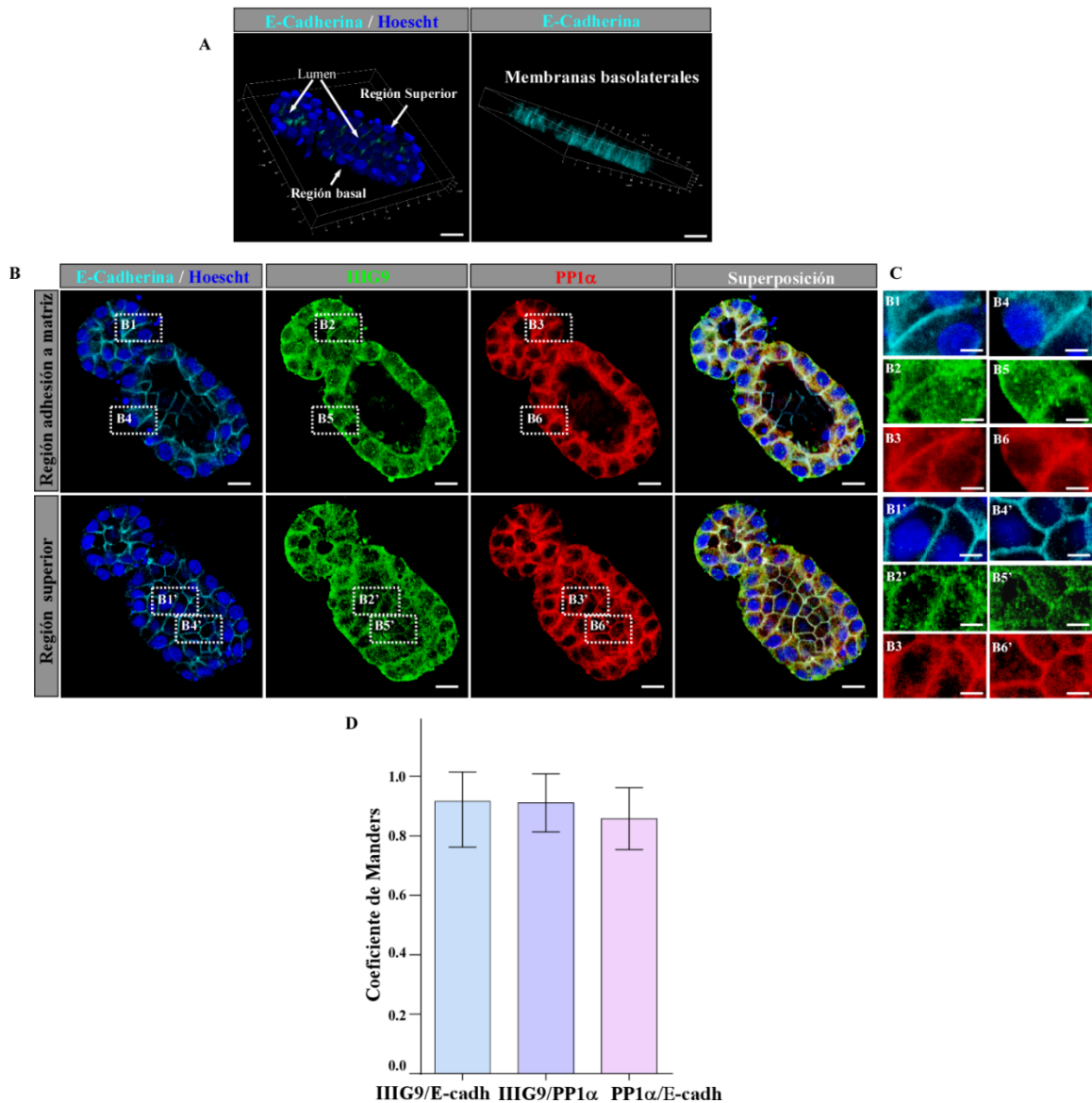
**A-D.** Inmunofluorescencia para detectar Cadherinas (Cy5, Cian) utilizando un pan anticuerpo, IIIIG9 (Cy2, verde), PP1 $\alpha$  (Cy3, rojo) en cultivos 3D en monocapa de células MDCK. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Se observa que las proteínas mencionadas se

codistribuyen en las uniones adherentes (flechas blancas). **E.** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIIG9/E-Cadherina, IIIIG9/PP1 $\alpha$  y PP1 $\alpha$ /E-Cadherina. Barra de tamaño: 15  $\mu$ m en A-D.

Por otro lado, analizamos la distribución de IIIIG9 y PP1 $\alpha$ , respecto a la localización de las cadherinas en los cistos 3D de células MDCK. Para esto, realizamos inicialmente una reconstrucción 3D y análisis ortogonal del cisto, que nos muestra la distribución de las cadherinas en los dominios basolaterales de la estructura, con un lumen central (Figura 32A). La distribución de IIIIG9 y PP1 $\alpha$  se realizó considerando la región de adhesión a la matriz y la zona superior o superficial del cisto (Figura 32B). En ambos casos se observa que la distribución de las proteínas es similar, colocalizando con E-cadherina cuando se superponen los canales. En los insertos se observa con un mayor aumento la distribución de las proteínas (Figura 32C).

El coeficiente de Manders (Figura 32D) entre IIIIG9 y E-Cadherina fue de  $0.916 \pm 0.154$  (N=6), entre IIIIG9 y PP1 $\alpha$  de  $0.910 \pm 0.097$  (N=9) y entre PP1 $\alpha$  y E-Cadherina de  $0.857 \pm 0.103$  (N=7). Por lo tanto, el modelo de cultivo 3D (monocapa o cistos polarizados), nos permiten observar que IIIIG9 y PP1 $\alpha$  se localizan en las uniones adherentes.





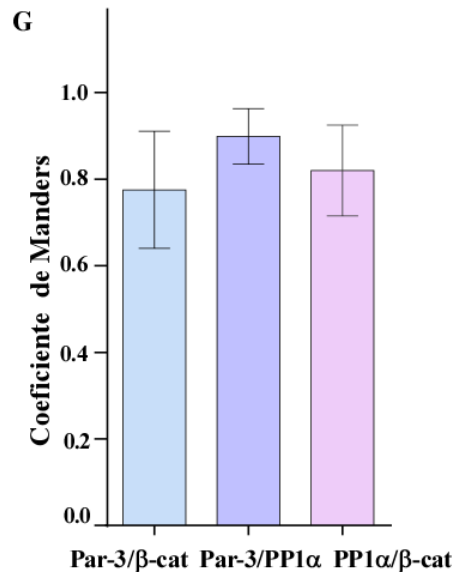
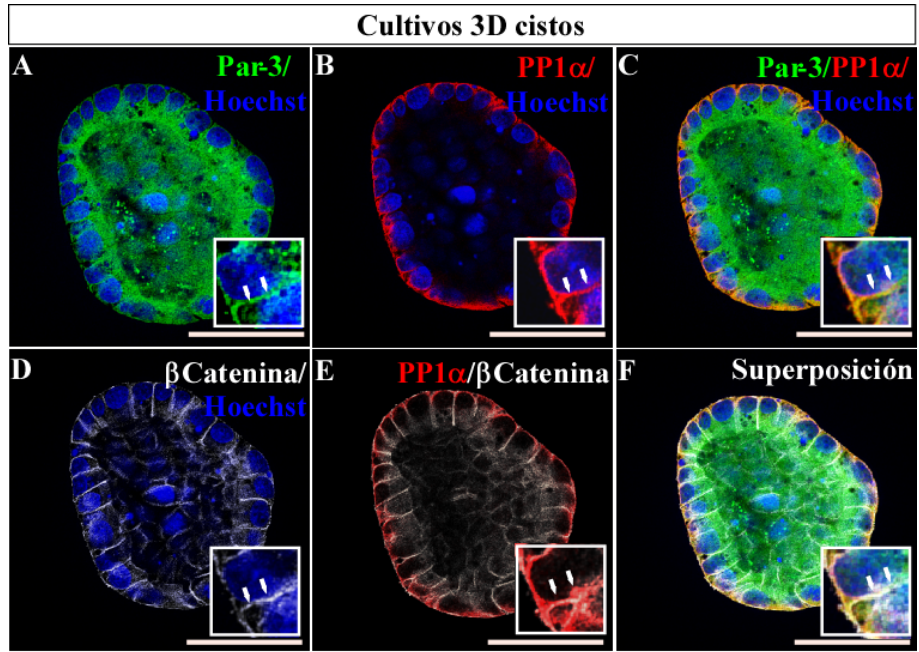
**Figura 32. IIIG9 y PP1 $\alpha$  se distribuyen junto a las cadherinas en cistos 3D de células MDCK.**

**A-B.** Inmunofluorescencia para detectar Cadherinas (Cy5, Cian) utilizando un pan anticuerpo, IIIG9 (Cy2, verde), PP1 $\alpha$  (Cy3, rojo) en cultivos 3D cistos de células MDCK. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Se observa que las proteínas mencionadas se codistribuyen

en las uniones adherentes (flechas blancas). **C.** Corresponden a imágenes de mayor aumento de los recuadros en **B.** **D.** Cuantificación del coeficiente de Manders entre IIIIG9/E-Cadherina, IIIIG9/PP1 $\alpha$  y PP1 $\alpha$ /E-Cadherina. Barra de tamaño: 7  $\mu\text{m}$  en **A**; 10  $\mu\text{m}$  en **B**; 2  $\mu\text{m}$  en **C**.

Utilizando los cistos polarizados analizamos la distribución de Par-3, PP1 $\alpha$  y  $\beta$ -catenina (Figura 33). Par-3 se encuentra enriquecido en el dominio apical y, además, en los dominios basolaterales (Figura 33A, puntas de flechas en inserto), igual que lo observado con PP1 $\alpha$  (Figura 33B). Par-3 y PP1 $\alpha$  se superponen en las regiones mencionadas (Figura 33C). Finalmente observamos la localización de  $\beta$ -catenina en los dominios laterales (Figura 33D), colocalizando con PP1 $\alpha$  (Figura 33E), por tanto, podemos observar que Par-3, PP1 $\alpha$  y  $\beta$ -catenina se localizan en las uniones intercelulares en el modelo de cistos 3D (Figura 33F).

Finalmente realizamos la cuantificación del coeficiente de Manders (Figura 33G), para Par-3 y  $\beta$ -catenina el valor fue de  $0.775 \pm 0.135$  (N=5), para PP1 $\alpha$  y Par-3 con un valor de  $0.898 \pm 0.064$  (N=5) y entre PP1 $\alpha$  y  $\beta$ -catenina de  $0.819 \pm 0.105$  (N=5). Por lo tanto, podemos concluir que efectivamente Par-3 y PP1 $\alpha$ , colocalizan con las uniones adherentes en este modelo 3D.



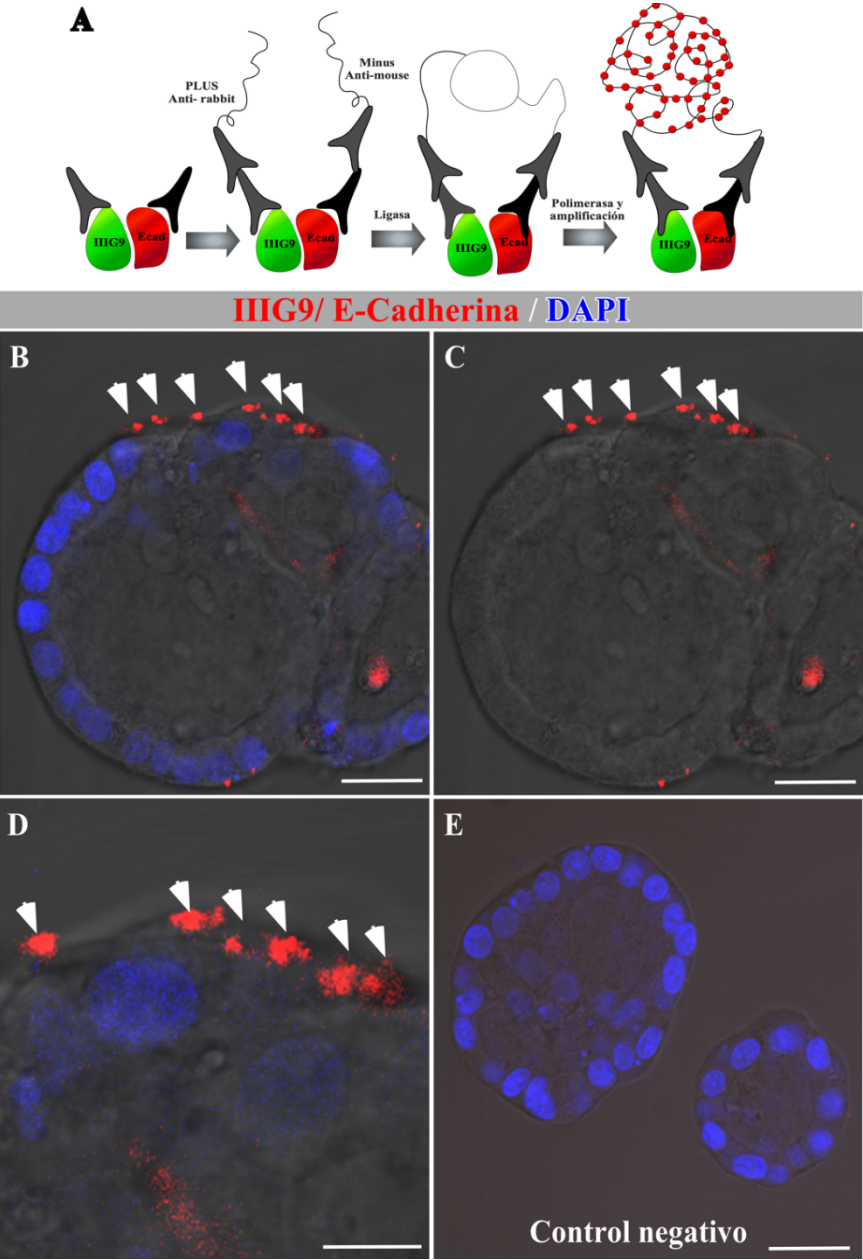
**Figura 33. Par-3 y PP1 $\alpha$  se distribuyen junto a  $\beta$ -catenina en cistos 3D de células MDCK.**

**A-F.** Inmunofluorescencia para detectar  $\beta$ -Catenina (Cy5, Cian), IIIIG9 (Cy2, verde), PP1 $\alpha$  (Cy3, rojo) en cultivos 3D cistos de células MDCK. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Se observa que las proteínas mencionadas se localizan junto a  $\beta$ -catenina en las uniones adherentes. Los insertos corresponden a aumentos digitales y las puntas de flechas indican la distribución de las proteínas. **G.** Cuantificación del coeficiente de Manders entre Par3/ $\beta$ -catenina, PP1 $\alpha$ /Par-3 y PP1 $\alpha$ / $\beta$ catenina. Barra de tamaño: 30  $\mu$ m en A-F.

**2.2 Análisis de interacción de IIIIG9, Par-3 y PP1 $\alpha$ , en las uniones adherentes.**

Finalmente analizamos la interacción de IIIIG9 y Par-3 respecto a las cadherinas, utilizando el modelo de cistos 3D de células MDCK. Para esto utilizamos el ensayo de ligadura por proximidad (*Proximity ligation assay, PLA*) que permite observar *in situ* la interacción de proteínas en una resolución de 40 nm (Figura 34A). La técnica implica la utilización de los mismos anticuerpos, previamente utilizados para inmunocitoquímica, pero incorporando anticuerpos secundarios acoplados a sondas fluorescentes. Si las proteínas están lo suficientemente cerca, se genera una reacción en cadena de la polimerasa que se refleja cómo puntos que emiten fluorescencia (Cy3, rojo) (Figura 34A). Observamos las muestras mediante microscopía confocal utilizando contraste de fase para identificar las estructuras. Las imágenes nos indicaron que la interacción de IIIIG9 con cadherinas ocurre en las regiones

basales de los cistos polarizados (Figura 34B-D, flechas). Podemos observar que la reacción es negativa, en ausencia de anticuerpos primarios (Figura 34E).

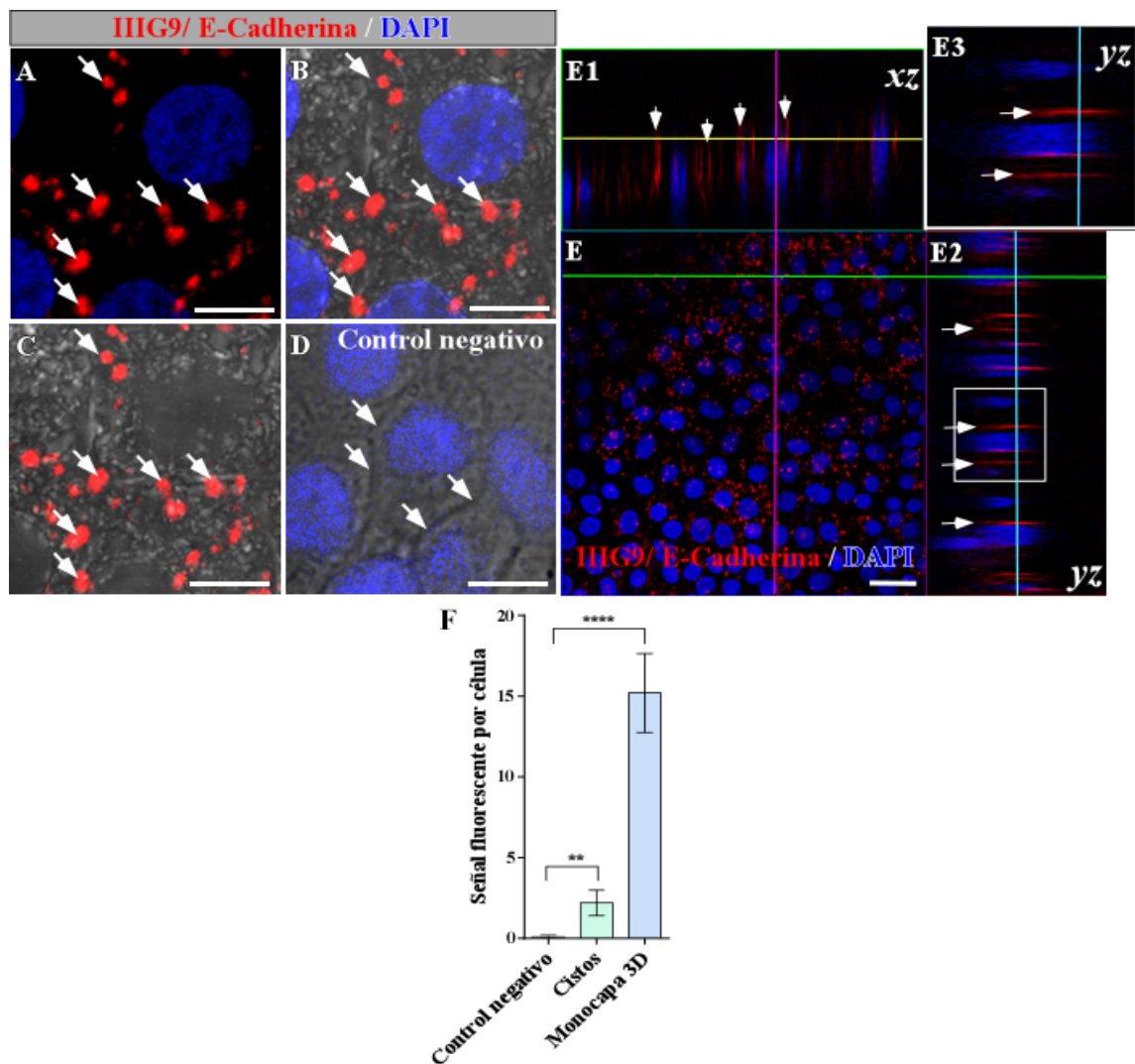


**Figura 34. IIIIG9 y E-cadherina interactúan en la región basal del cisto de células MDCK.**

**A** Esquema representativo del ensayo de ligadura por proximidad para evaluar interacción entre ambas proteínas. **B-D**. Imágenes de contraste de fases para el ensayo de ligadura por proximidad en cistos 3D de células MDCK utilizando sondas específicas para reconocer anticuerpos hechos en conejo (IIIIG9) y ratón (E-cadherina). La interacción positiva entre ambas sondas se observa como puntos de fluorescencia roja en las membranas basales (flechas blancas). **E**. Control negativo de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios. Barra de tamaño: 20  $\mu\text{m}$  en B-E.

Luego analizamos la interacción entre IIIIG9 y E-cadherina en las redes tridimensionales que crecen dentro del matrigel (Figura 35), en los cuales utilizamos microscopía de fluorescencia y el contraste de fase para diferenciar las uniones intercelulares (Figura 35A-C, flechas). En estas muestras observamos que la fluorescencia roja que revela la interacción entre ambas proteínas, se localiza principalmente en las uniones celulares (Figura 35B-C, flechas). En el control negativo no se observó señal (Figura 35D). Al realizar análisis de los diferentes planos confocales en plano Z, y proyección ortogonal en XZ e YZ (Figura 35E), se observa que la reacción generada por la interacción de IIIIG9 y E-cadherina, se extiende en forma paralela en las uniones intercelulares (Figura 35E1-E2, flechas), lo cual se observa más aumentado en el inserto (Figura 35E3). Para concluir, cuantificamos la señal positiva de *PLA* según la condición de cultivo de las células MDCK, incluyendo el control negativo (en ausencia de anticuerpos primarios) (Figura 35 F), observamos que los cistos y el

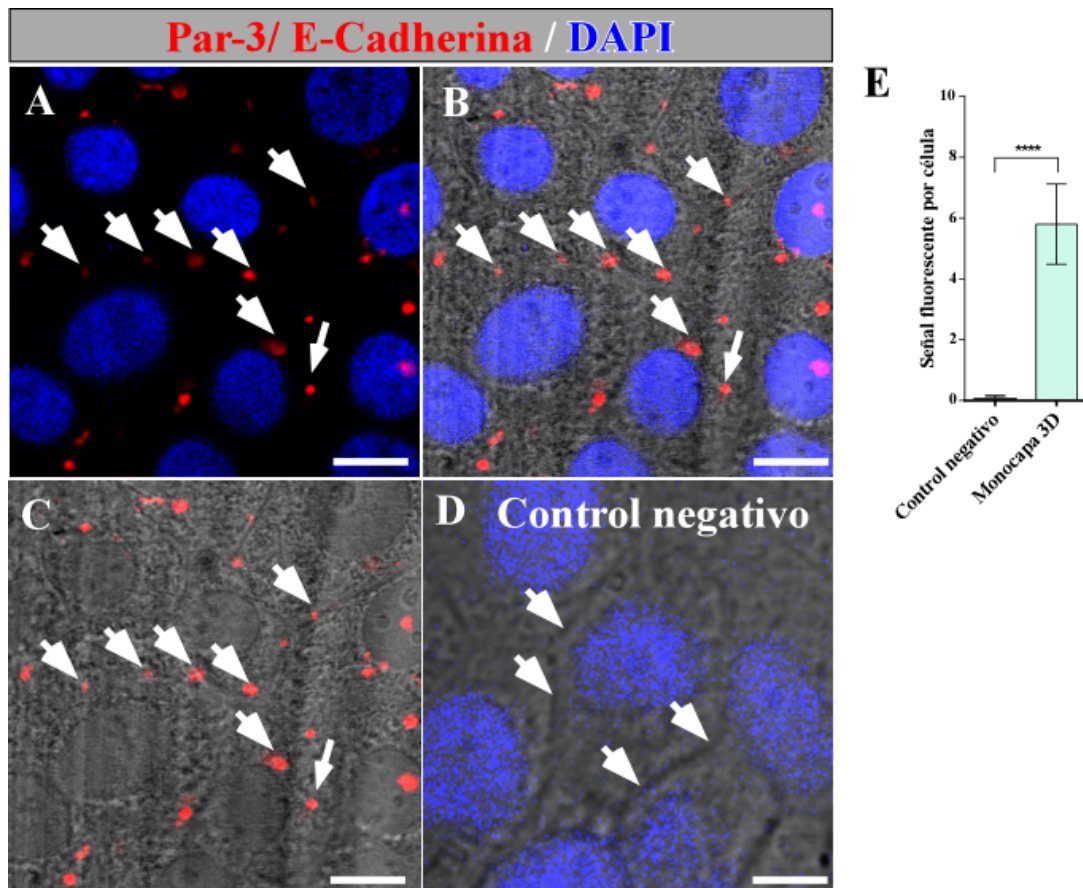
cultivo en monocapa 3D muestra una mayor cantidad de señales positivas para *PLA*, respecto al control negativo. La señal de *PLA* es mucho mayor en la condición de monocapa 3D (Figura 35 F). Posteriormente, realizamos el mismo ensayo de *PLA* para Par-3 y E-cadherina, utilizando el cultivo en monocapa 3D (Figura 36). Podemos observar reacción positiva en las uniones intercelulares (Figura 36A-C, flechas), que se pueden distinguir a través de la imagen generada por contraste de fase (Figura 36B-C, flechas). En el control negativo, no se observa señal (Figura 36D, flechas). Finalmente, cuantificamos la señal roja positiva de *PLA* en células individuales (N=10) entre Par-3/E-cadherina y la condición control, observando diferencias significativas (Figura 36 E).



**Figura 35. IIIIG9 y E-cadherina interactúan en las uniones celulares de las células MDCK.**

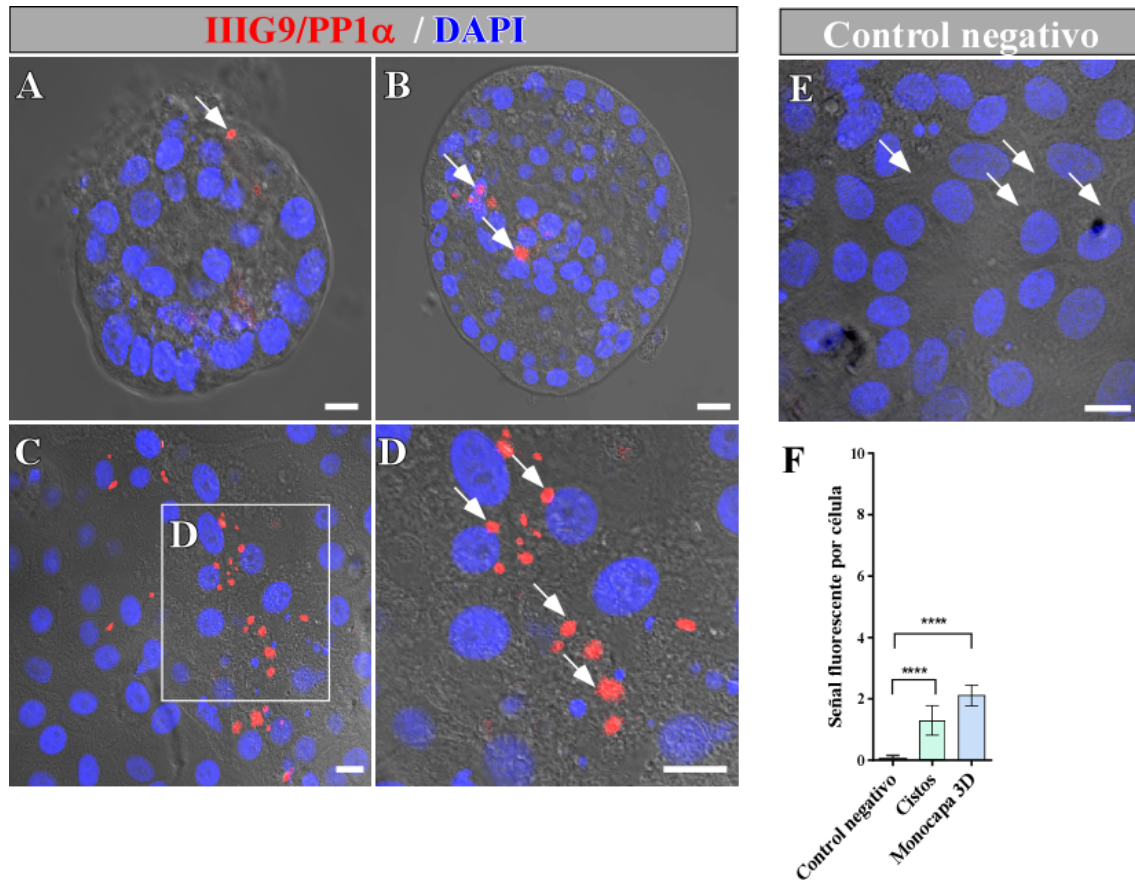
**A-C.** Imagen de fluorescencia y contraste de fases para el ensayo de ligadura por proximidad en cultivos 3D monocapa de células MDCK utilizando sondas específicas para reconocer anticuerpos hechos en conejo (IIIIG9) y ratón (E-cadherina). Se observa la reacción positiva entre la interacción de IIIIG9 y E-cadherina en las uniones intercelulares (flechas blancas). **D.** Control negativo de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios. **E-E2.** Análisis de los diferentes planos confocales en plano Z y proyección ortogonal en XZ e YZ. **E3.** Imagen de mayor aumento que muestra la reacción positiva en las uniones intercelulares, vista en el plano YZ. **F** Cuantificación de la señal positiva de PLA por célula en el control negativo, cistos y monocapa 3D (N=10). Análisis estadístico Anova- One way con análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Barra de tamaño: 5  $\mu\text{m}$  en A-D; 10  $\mu\text{m}$  en E. Aumento: 400X.





**Figura 36. Par-3 y E-cadherina interactúan en las uniones celulares de las células MDCK.**

A-C. Imagen de fluorescencia y contraste de fases para el ensayo de ligadura por proximidad en cistos 3D de células MDCK utilizando sondas específicas para reconocer anticuerpos hechos en conejo (Par-3) y ratón (E-cadherina). Se observa la reacción positiva entre la interacción de Par-3 y E-cadherina en las uniones intercelulares (flechas blancas). **D.** Control negativo de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios. Barra de tamaño: 5  $\mu$ m en A-D. Aumento: 400X.



**Figura 37. IIIIG9 y PP1  $\alpha$  interactúan en la porción basal del cisto de células MDCK.**

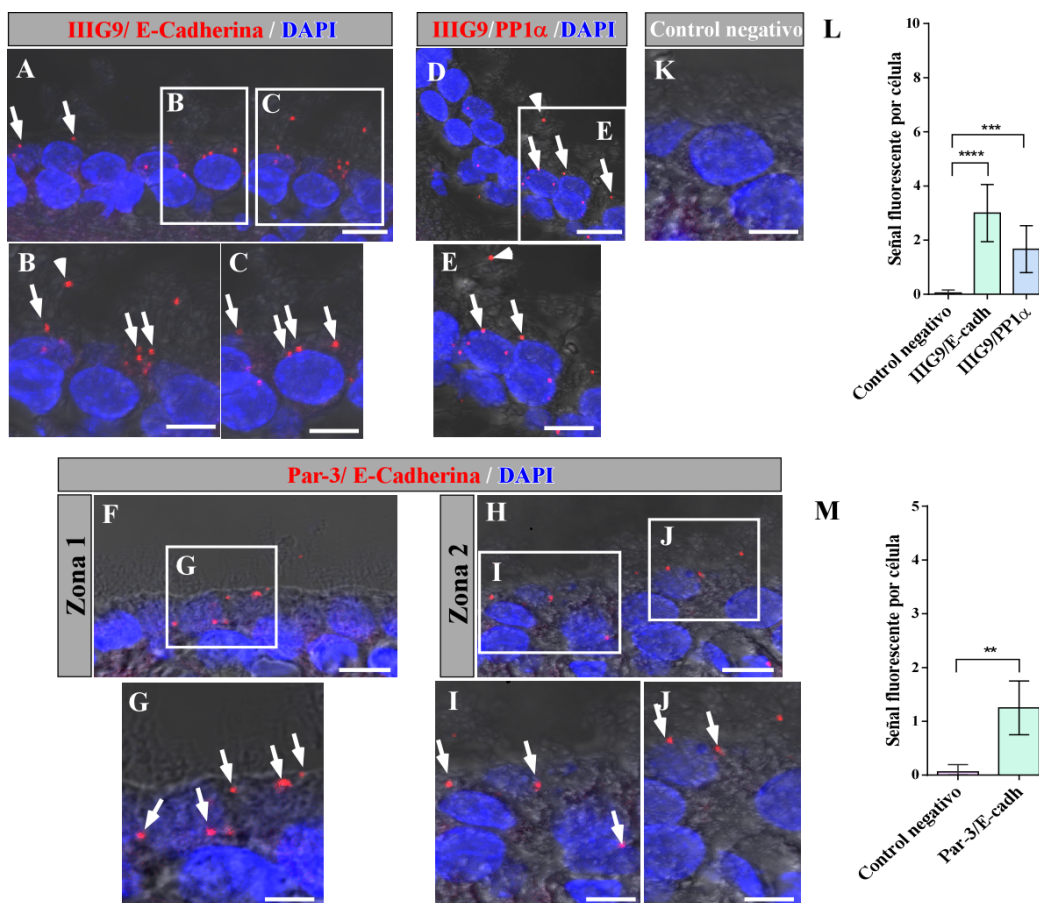
**A-D** Imágenes de contraste de fases para el ensayo de ligadura por proximidad en cistos 3D de células MDCK utilizando sondas específicas para reconocer anticuerpos hechos en conejo (IIIIG9) y ratón (PP1 $\alpha$ ). La interacción positiva entre ambas sondas se observa como puntos de fluorescencia roja (flechas blancas). **E** Control negativo de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios. **F** Cuantificación de la señal positiva de *PLA* por célula en el control negativo, cistos y monocapa 3D (N=10). Análisis estadístico Anova- One way con análisis de

comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Barra de tamaño: 5  $\mu\text{m}$  en A-E. Aumento: 400X.

Por otro lado, analizamos la interacción entre IIIIG9 y PP1 alfa utilizando el modelo 3D de células MDCK, en donde la fluorescencia roja se distribuye en las porciones más basales de los cistos y en las cercanías de las uniones adherentes en cultivos 3D en monocapa (Figura 37A–D). El control negativo no muestra señal positiva para *PLA* (Figura 37E).

Luego de evaluar la interacción de las proteínas a través de un modelo *in vitro*, realizamos el mismo ensayo de interacción de proteínas, esta vez utilizando un corte histológico sagital de cerebro adulto (Figura 38). En estas muestras nos enfocamos en el epéndimo, donde observamos que las células se disponen como un epitelio cuboidal simple, con señal positiva para la interacción de IIIIG9 y E-cadherina, fundamentalmente en el dominio apical y lateral de las células endimarias (Figura 38A-C), así como también en algunos cilios móviles (Figura 38 B, puntas de flechas). Por otro lado, realizamos el mismo análisis de interacción utilizando anticuerpos específicos para IIIIG9 y PP1 $\alpha$ , con una señal positiva similar a la distribución de IIIIG9 y E-cadherina, previamente analizada (Figura 35). A diferencia de lo observado en cultivos monocapa 3D de células MDCK, donde fue posible observar claramente las zonas de contactos celulares por microscopía de contraste de fases; en los cortes de cerebro adulto, no pudimos observar claramente las membranas laterales entre las células endimarias. De la misma forma, analizamos la interacción entre Par-3 y E-cadherina en el epéndimo adulto, donde observamos señal positiva, eventualmente en los dominios basolaterales de las células endimarias (Figura 38 F-J, flechas). Por el contrario, no se

detectó señal positiva en el control negativo (Figura 38 K). Finalmente, cuantificamos la señal roja positiva para *PLA* en células endimarias individuales para IIIG9/E-cadherina y IIIG9/PP1 $\alpha$ , en donde observamos en ambos casos diferencias significativas respecto al control de reacción (Figura 38 L), similar a lo observado para Par-3/E-cadherina (Figura 38 M). En conclusión, nuestros resultados sugieren que IIIG9 y Par-3 interactúan con E-cadherina en el epéndimo adulto.



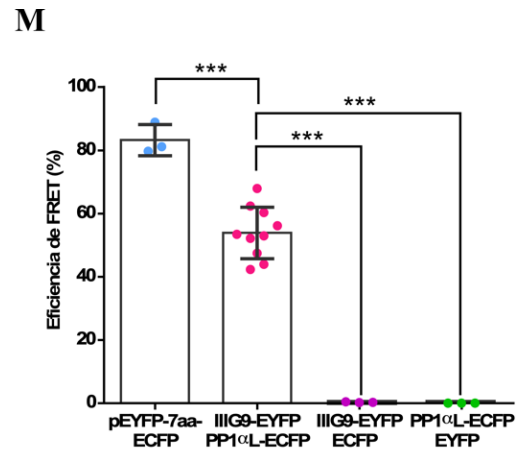
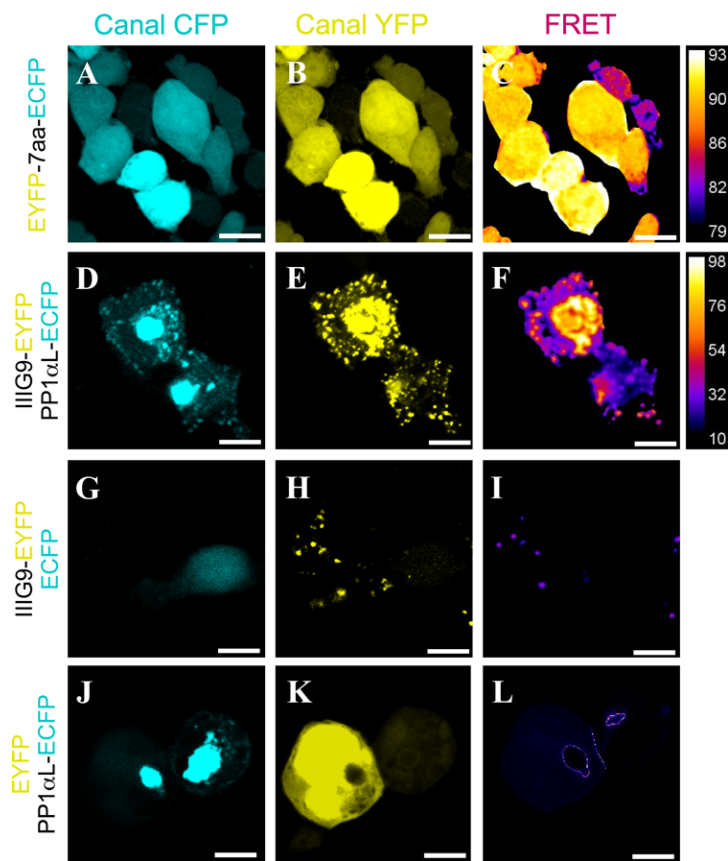
**Figura 38. IIIIG9/E-cadherina, IIIIG9/PP1 $\alpha$  y Par-3/E-cadherina interactúan en la pared ventricular endimaria del cerebro adulto.**

**A-C, D-E y F-J.** Imagen de contraste de fases para el ensayo de ligadura por proximidad (*PLA*) en cortes histológicos coronales de cerebro adulto, utilizando sondas específicas para reconocer anticuerpos hechos en conejo (IIIIG9 y Par-3) y ratón (PP1 $\alpha$  y E-cadherina). Se observa la reacción positiva entre la interacción de IIIIG9/E-cadherina, IIIIG9/PP1 $\alpha$ , Par-3/E-cadherina en la región apical, citosol y región basolateral de las células endimarias (flechas) y en algunos cilios (puntas de flechas). **K.** Control negativo de la reacción, en ausencia de anticuerpos primarios. **L** Cuantificación de la señal positiva de *PLA* por célula en el control negativo, IIIIG9/E-cadherina y IIIIG9/PP1 alfa (N=10). **L** Cuantificación de la señal positiva de *PLA* por célula en el control negativo y Par-3/E-cadherina (N=10). Análisis estadístico Anova-One way con análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Barra de tamaño: 5  $\mu\text{m}$  en A-J.

Finalmente, para complementar los análisis de ligadura por proximidad, realizamos un análisis de FRET, sobreexpresando hIIIIG9L y hPP1 $\alpha$ L en células HEK293T mediante el método de lipofectamina (Figura 39). Luego de 24 horas, las células fueron fijadas y utilizadas para el análisis. Como control positivo, sobreexpresamos el vector EYFP-7aa-ECFP (Figura 39 A-C) y como control negativo, se cotransfectaron los vectores vacíos (pECFP y pEYFP) con los vectores de las proteínas de fusión de IIIIG9 y PP1 $\alpha$ , respectivamente (Figura 39 G-L). Además, realizamos un análisis cuantitativo de la eficiencia de FRET (FRET<sub>eff</sub>) en cada

condición experimental, mediante el método descrito por Trinkle-Mulcahy y col (2001) (Figura 39 M).

Como era de esperar, un alto nivel de colocalización de CFP e YFP fue observado en el control positivo (Figura 39 A-C), con una alta eficiencia de FRET ( $83.23 \pm 4.9$ ) en una escala de 0 a 100% (Figura 39 M) (N=20). Por su parte, en los análisis para la interacción entre IIIG9 y PP1 $\alpha$  se observó la colocalización de ambas proteínas en un patrón punteado cercano a la membrana celular y a nivel del citosol (Figura 39 D-F) y una eficiencia de FRET de  $53.89 \pm 8.1$  (Figura 39 M) (N=20). Finalmente, los controles negativos mostraron una escasa a nula colocalización entre las proteínas testeadas (IIIG9-EYFP/ECFP o PP1 $\alpha$ L-ECFP/EYFP) y una baja eficiencia de FRET de  $0.3260 \pm 0.1157$  y  $0.00493 \pm 0.007510$ , respectivamente (Figura 39 G-M).



**Figura 39. Análisis de FRET para la interacción *in vitro* entre las proteínas IIIIG9 y PP1 $\alpha$ .**

Las células HEK293T fueron transfectadas con los vectores correspondientes durante 48 horas y luego fueron fijadas para proceder con el análisis de FRET mediante microscopía confocal. **A-C.** Fluorescencia emitida para ECFP (donador), EYFP (aceptor) y el canal de FRET para la sobreexpresión del vector pEYFP-7aa-CFP (control positivo). **D-F.** Fluorescencia emitida para ECFP (donador), EYFP (aceptor) y el canal de FRET para la coexpresión de las proteínas

ECFP-hPP1 $\alpha$ L y EYFP-hIIIIG9L. **G-L.** Fluorescencia emitida para ECFP (donador), EYFP (aceptor) y el canal de FRET para la co-expresión de las proteínas EYFP-hIIIIG9L/ECFP y ECFP-hPP1 $\alpha$ L/EYFP (controles negativos). Las imágenes fueron tomadas en una escala de 0 a 100 píxeles y cada valor fue asociado a una intensidad de color. **M.** Cuantificación de la eficiencia de FRET en las distintas condiciones experimentales analizadas. Los resultados corresponden al promedio y desviación estándar que fue realizado con el test de comparación múltiple de Tukey (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).



## V. DISCUSIÓN

### **CAPITULO I: Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de IIIG9, respecto a la expresión de PP1 $\alpha$ y Par-3, durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.**

#### **1.1 Análisis del patrón de expresión de IIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 en el epéndimo adulto.**

En esta tesis doctoral hemos analizado el patrón de expresión y localización de IIIG9 durante el desarrollo de la pared ventricular (embrionario, postnatal y adulto) y su rol en la mantención de las uniones adherentes que permiten mantener la integridad y polaridad del epitelio ventricular. Proponemos que esta función se llevaría a cabo mediante la interacción de IIIG9 con la proteína fosfatasa-1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$ ) y la proteína de polaridad Par-3 (Coopman y Djianne, 2016).

Realizamos una caracterización de la distribución y expresión de IIIG9, PP1 $\alpha$ , Par-3 respecto a las cadherinas en el estadio adulto, postnatal y embrionario. Los análisis en la etapa adulta fueron realizados como control positivo, ya que el ARNm de IIIG9 se expresa en la pared ventricular (qRT-PCR acoplado a microdissección láser) y se detecta donde se localizan las células endimarias y sus cilios móviles ( $\alpha$ -tubulina acetilada +) (hibridación *in situ* y microscopía confocal). Respecto a la distribución del ARNm en los cilios, se ha reportado recientemente que cilios son capaces de transportar los ARNm y sintetizar localmente proteínas que son relevantes para su integridad y mantención estructural, derribando el dogma de que las proteínas son solo sintetizadas en el citoplasma. En dicho estudio, se destaca a

PPP1R32 (IIIIG9) como un ARNm local que forma parte del cuerpo basal de los cilios móviles en células endoteliales, siendo consistente con nuestros hallazgos (Hao y col., 2021). Además, observamos la presencia del ARNm a nivel de las neuronas de la corteza cerebral y el hipocampo, que nos permite especular sobre nuevas funciones de IIIIG9 fuera de la pared ventricular.

Las serina/treonina fosfatasa fueron ampliamente estudiadas hace treinta años atrás en el SNC (Da Cruz e Silva y col., 1995; Strack y col., 1999, Bordelon y col., 2015). Actualmente se ha retomado su estudio, debido a la capacidad que tienen de formar holoenzimas únicas con proteínas reguladoras, con roles específicos a nivel celular, que las convierten en potenciales blancos terapéuticos. Utilizando la base de datos de *Allen Brain Atlas*, observamos que la principal fosfatasa que se expresa en la pared ventricular, es la subunidad catalítica PP1 alfa, con una localización polarizada hacia el ventrículo lateral del ratón. Además, PP1 alfa es una de las fosfatasas previamente reportada para la mantención de las uniones adherentes (Guo y col., 2014). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún reporte de la expresión de una subunidad catalítica de PP1 en células endoteliales o en células de la pared ventricular en desarrollo (embrionaria y postnatal).

Nuestros resultados nos indican que PP1 alfa y IIIIG9 se expresan a nivel de proteína en la pared ventricular adulta y, además se codistribuyen en el epitelio endotelial, principalmente a nivel apical. Para IIIIG9, observamos tres isoformas: una isoforma larga (51 kDa), una isoforma corta (42 kDa), y una tercera de mayor tamaño (53 kDa), para la cual proponemos la presencia de modificaciones postraduccionales que comúnmente se encuentran en la tubulina y otras proteínas ciliares, como por ejemplo las fosforilaciones y acetilaciones (Sloboda, 2009).

Por otro lado, utilizando *whole mount en face*, observamos la distribución de IIIIG9 junto a las cadherinas en los dominios apicales de las células endimarias, con preferencia hacia la cara citoplasmática de la unión intercelular. Estos resultados, sugerirían que podría IIIIG9 formar parte de los complejos proteicos citoplasmáticos que permiten regular y mantener la estabilidad de las uniones adherentes, siendo consistente con nuestra hipótesis.

Par-3 se expresa en la pared ventricular adulta y postnatal (qRT-PCR acoplado a microdissección láser) y su ARNm se muestra polarizado hacia la pared endimaria adulta. Mediante *western blot* observamos una isoforma de 180 kDa. Respecto a este dato en bibliografía se indica que las bandas representativas de Par-3 en el SNC de ratón adulto es de 180 y 100 kDa (Lin y col., 2000). Sin embargo, nuestro lisado de proteínas al ser obtenido específicamente desde la pared endimaria adulta mediante disección, nos muestra la isoforma específica ubicada en esa región, que corresponde a la isoforma de extensión completa de Par-3 (180 kDa).

Esta isoforma se caracteriza por poseer los tres dominios PDZ, el dominio de interacción con aPKC y una cola citoplasmática (Lv y col., 2022), de esta forma, podemos concluir que no corresponde a la isoforma de Par-3 con exclusiva función en la adhesión celular, recientemente reportada (Pard3B) (Gao y col., 2002; Thompson, 2002). Sin embargo, eso no descarta que Par-3 de longitud completa no participe en eventos de polaridad y en la mantención de las uniones célula-célula (Thompson, 2022). En este contexto, nuestros análisis realizados en *whole mount* e inmunohistoquímica indican que Par-3 colocaliza con cadherinas y PP1 alfa en la pared ventricular adulta, al igual que IIIIG9. Estos antecedentes son relevantes para comprobar nuestra hipótesis.

A nivel ultraestructural, confirmamos que IIIIG9 se distribuye en las uniones adherentes y además en cilios móviles, posicionándose en los dupletes de microtúbulos del axonema periférico (Baeza y col., 2022).

El estudio de las proteínas presentes en cilios móviles tiene una gran relevancia médica, debido a que la identificación de estas proteínas, por ejemplo, ayudará a comprender las bases moleculares de la infertilidad masculina y femenina y permitirá identificar nuevos objetivos para la anticoncepción (Leung y col., 2023). En este contexto, recientemente, mediante el uso de la técnica de crio microscopía electrónica se ha reportado a PPP1R32 (IIIIG9) como una proteína de localización interna de los microtúbulos axonemales (MIPs) presente en el flagelo de los espermios de bovinos (Leung y col., 2023). Específicamente, se ha descrito que PPP1R32 se ubica en la cara interna del protofilamento 1 del microtúbulo A de cada uno de los 9 dupletes periféricos (Leung y col., 2023). Esto, gracias a la presencia de varios dominios proteicos de tipo Mn (que forman una hélice de 5 a 6 residuos flanqueada por un residuo Tyr/Phe en un extremo y por un Ser/Thr por el otro extremo), lo que ha llevado a que PPP1R32 sea renombrada como la proteína SAXO 4, un miembro de la familia de estabilizadores de microtúbulos axonemales (Leung y col., 2023). En este contexto, futuros estudios serán necesarios para definir si la localización axonemal descrita para IIIIG9 en espermios de bovino es conservada en la estructura axonemal de los cilios ependimarios o de los protofilamentos que conforman el citoesqueleto de microtúbulos.

En esta tesis, también observamos el efecto de inhibición de IIIIG9 mediante una inyección única intraventricular de un adenovirus inhibidor (AdsiIIIIG9-GFP) y un adenovirus control (Adsiβgal-GFP). Nuestros hallazgos indican que la inhibición de IIIIG9 es capaz de disminuir la expresión de las tres isoformas de esta proteína detectadas en la pared ventricular

adulta. A su vez, esta inhibición genera eventos de denudación endimaria parcial, sin mostrar alteraciones en los astrocitos subependimales. Las células endimarias pierden su morfología cuboidal y pierden su polarización, con una distribución deslocalizada de cadherinas (Baeza y col., 2021). Estos efectos han sido previamente observados en experimentos en los cuales se han utilizado péptidos inhibidores de los dominios extracelulares de las cadherinas, que conduce a una apoptosis masiva, denudación endimaria y redistribución de cadherinas a nivel intracelular (Grondona y col., 1996; Jiménez y col., 2001; Oliver y col., 2013). Por esta razón, podemos concluir que IIIIG9 es relevante para mantener la supervivencia y normal fisiología del epitelio endimario, ya que estos eventos de denudación están intrínsecamente relacionados con patologías del SNC, como la hidrocefalia, espina bífida y heterotopias ventriculares (Baeza y col., 2021; Oliver y col., 2013; Subramanian y col., 2020).

## **1.2 Análisis del patrón de expresión de IIIIG9, PP1 $\alpha$ y Par-3 durante el desarrollo del cerebro.**

Las cadherinas son de crucial relevancia durante el desarrollo temprano de la pared ventricular, ya que permiten mantener la integridad del neuroepitelio y de las células endimarias que residen en la pared ventricular adulta. El efecto observado en la etapa adulta y la relevancia de las uniones adherentes en etapas tempranas de la pared ventricular, nos permitieron indagar en el efecto de inhibición de IIIIG9 en el estadio embrionario, y las potenciales repercusiones en la etapa postnatal.

Caracterizamos la expresión de IIIIG9, Par-3, PP1 alfa y cadherinas en estadios embrionarios y postnatales, comenzando con un análisis de hibridación *in situ* en el estadio embrionario E16, que nos mostró el ARNm de IIIIG9 en la glía radial localizada en la zona ventricular, reconocida por la expresión de los marcadores celulares clásicos vimentina y nestina. El ARNm de IIIIG9 se distribuye tanto a nivel citoplasmático, como en el proceso basal de la glía radial. Debido a lo cual, efectivamente IIIIG9 no solo se expresa en etapas maduras de las células endimarias.

Realizamos un análisis de qRT-PCR acoplado a microdissección láser, en diferentes estadios del desarrollo de la pared ventricular embrionaria y postnatal, que nos mostró la expresión de IIIIG9 en el estadio E13, con una disminución significativa del ARNm hacia el estadio E17. Finalmente, cuando se inicia la polarización y diferenciación de las células endimarias en el estadio PN1, se inicia un alza en el ARNm de IIIIG9, hasta ser significativo hacia el estadio PN15-PN20. En conclusión, el mensajero de IIIIG9 se encuentra en la etapa de compromiso del linaje endimario (E14-E16), y este se incrementa cuando comienza la etapa de maduración (PN1) y ciliogénesis (Spassky y col., 2005).

En el caso de PP1 alfa, observamos una tendencia similar respecto a los niveles de expresión, con una disminución significativa entre el estadio E13 respecto al E15, E17 y PN1. Mientras que en el estadio E13 y PN15, se observaron los niveles de expresión más altos. Por tanto, podemos decir que existe una cierta correlación entre los niveles de ARNm de IIIIG9 y PP1 alfa en la zona ventricular, a pesar que la expresión relativa de PP1 alfa es inferior a lo detectado para IIIIG9.

Finalmente, los niveles de expresión de Par-3 muestran una disminución significativa entre el E13 y el E15-E17. Dicha disminución del ARNm de Par-3 se vuelve significativa

hacia la etapa postnatal tardía (PN20). Respecto a estos resultados es importante mencionar que, de acuerdo a la bibliografía, los niveles de expresión de Par-3 disminuyen a medida que avanza la neurogénesis, ya que, durante la división asimétrica, las células que heredan una menor cantidad de Par-3 se transforman posteriormente en neuroblastos que migrarán hacia la corteza cerebral en formación, por tanto, concuerda con los niveles de expresión observados (Costa y col 2008; Bultje y col., 2009; Laumonnerie y Solecki, 2018).

Respecto a la expresión de estas proteínas, observamos que existe una única banda de 42 kDa en tejido embrionario detectada para IIIIG9, a diferencia de lo observado en el estadio adulto, donde se observan tres bandas (42, 51 y 53 kDa). Por otra parte, datos de nuestro laboratorio muestran la expresión de una banda de igual tamaño para IIIIG9 en extractos de células neuroepiteliales humanas obtenidas a partir de células pluripotentes inducidas (IPSCs). Por lo tanto, nosotros creemos que esta isoforma de 42 kDa detectada en estadios embrionarios (E13, E15, E17) y postnatal temprano (PN1), se deba a una forma exclusiva presente durante el desarrollo en células troncales como las glías radiales cuya función sea, entre otras, la mantención de las uniones adherentes favoreciendo el normal desarrollo de la corteza cerebral embrionaria y postnatal. Por otra parte, retomando nuestros hallazgos en la etapa adulta, creemos que las isoformas de 51 y 53 kDa detectadas en células endimarias diferenciadas se asocian a la función ciliar de IIIIG9 estabilizando la estructura axonemal de los cilios móviles (Leung y col., 2023) o participando de la desfosforilación de la dineína para facilitar el batido ciliar (Wirschel y col., 2011). Así, al igual que muchas otras proteínas ciliares, IIIIG9 también presentaría localizaciones y funciones extraciliares (Hua y Ferland., 2018, Oviedo y col., 2022).

Por su parte, la expresión proteica de PP1 alfa mostró una única banda de 37 kDa cuyo tamaño es igual a la observada en la etapa adulta. Respecto a Par-3, observamos una banda de 180 kDa y otra de 100 kDa. La primera de ellas corresponde a Par-3 de longitud completa y la segunda a una variante de empalme (Gao y col., 2002; Kohjima y col., 2002; Atashrazm y col., 2021). Ambas isoformas han sido previamente reportadas por bibliografía desde extractos de proteína obtenidos desde embriones completos de ratón (E9.5-E14.5), sin embargo, no existían antecedentes sobre la expresión de una isoforma específica de Par-3 en la pared ventricular embrionaria (Lin y col., 2000). Por tanto, nuestros resultados indican que a diferencia de la pared ependimaria adulta, las glías radiales ventriculares expresan una variante de empalme de 100 kDa, que carece del dominio de unión a aPKC (Gao y col., 2002; Thompson, 2021).

Respecto a la distribución de IIIIG9 utilizando análisis inmunohistoquímicos en el estadio E11, que corresponde a la etapa donde comienza la neurogénesis cortical, observamos que IIIIG9 y Par-3 se distribuye en un patrón punteado ascendente en la pared ventricular que indica una etapa de inducción temprana de ambas proteínas, mientras que las cadherinas se distribuyen desde la zona ventricular hasta la pre-placa cortical (Miyamoto y col., 2015). Respecto a las cadherinas, ambas proteínas muestran una escasa colocalización.

Hacia el estadio embrionario E13, la expresión de IIIIG9 se extiende a lo largo de toda la corteza, similar a lo observado para Par-3, pero con un aumento significativo en la colocalización con cadherinas. Finalmente, hacia el estadio E16 podemos observar que IIIIG9 se polariza en la pared ventricular, aumentando su colocalización con las cadherinas a nivel ventricular. Respecto a Par-3, observamos la misma polarización, sin embargo, Par-3 muestra una menor abundancia.



En los diferentes estadios embrionarios analizados, observamos la presencia de las cadherinas a nivel ventricular y de la corteza cerebral en formación, ya que se inducen tempranamente en la adhesión célula-célula en células progenitoras (NPC), glías radiales y también en neuronas a través del desarrollo de las uniones adherentes (Kadowaki y col., 2007; Miyamoto y col., 2015). Respecto a Par-3, nuestros antecedentes son respaldados por el grupo de Costa y col., 2008, que muestran un enriquecimiento de Par-3 mediante inmunohistoquímica en la superficie apical de la zona ventricular en el estadio E12, sin embargo, ellos indican que en etapas embrionarias posteriores la expresión se debilita progresivamente (E14-E16), evento que se correlaciona con la disminución de las divisiones celulares proliferativas (Haubensak y col., 2004). Por el contrario, nosotros observamos que la expresión de Par-3 se mantiene en la zona ventricular, ya que aún es necesario para mantener la polaridad de las glías radiales remanentes.

Para observar a nivel subcelular la localización de IIIIG9 en la zona ventricular, realizamos un análisis ultraestructural en cortes ultrafinos obtenidos de cerebros embrionarios (E13 y E16). En estas muestras, localizamos a IIIIG9 en las uniones adherentes, de la glía radial ventricular, a la forma de puntos electrodensos cercanos a las zonas de adhesión. Algunos de los hallazgos observados fuera de la zona ventricular, es la presencia de IIIIG9 en los neuroblastos migrantes a nivel nuclear y citoplasmático, lo que se correlaciona con nuestros hallazgos, utilizando los análisis inmunohistoquímicos mediante fluorescencia. La distribución de IIIIG9 mediante microscopía electrónica de transmisión en estadios embrionarios se correlaciona con los hallazgos obtenidos en el estadio adulto, con la diferencia que no observamos la presencia de IIIIG9 a nivel ciliar, ya que estos solo se observan en etapas postnatales o adultas (Spassky y col., 2005).

Considerando lo previamente descrito, analizamos la distribución de IIIIG9 y Par-3 respecto a las cadherinas utilizando *whole mount -en face* en un estadio PN1, que corresponde a la etapa en donde comienza la diferenciación y polarización de las células endimarias. En estas muestras observamos claramente que ambas proteínas se localizan por sobre el patrón reticulado de cadherinas. Por otro lado, IIIIG9 además muestra una distribución apical que puede dar cuenta del evento de anclaje de los cuerpos basales al comienzo de la multiciliogénesis, proceso llamado polaridad traslacional (Hirota y col., 2010). La polaridad traslacional es relevante para el correcto posicionamiento de los cuerpos basales que darán origen a las células multiciliadas del epéndimo (Mirzadeh y col., 2010). Además, en estas muestras es posible reconocer estructuras propias del nicho neurogénico que se componen de células tipo astrocitos, que se encuentran rodeados de células endimarias multiciliadas (Redmond y col., 2019). Los análisis ultraestructurales en el estadio PN5 y PN7, nos muestran que IIIIG9 mantiene su distribución en las uniones de tipo adherente de la zona ventricular. Durante estos estadios postnatales, aún es posible observar la glía radial que se mantiene hasta el estadio PN15 (Tramontin y col., 2003). En conclusión, la distribución de IIIIG9 en las uniones adherentes se mantiene desde los estadios embrionarios hasta los estadios postnatales en la pared ventricular.

### **1.3 Efecto de la inhibición de IIIIG9 en el estadio embrionario E16 (*in utero*).**

Posteriormente, analizamos los cerebros de los animales postnatales, que fueron previamente inyectados en la cavidad ventricular con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 (AdsiIIIIG9-GFP), o el adenovirus control (Adsiβgal-GFP). Las inyecciones se realizaron en el estadio E16, ya que corresponde a la etapa donde se encuentran los menores niveles de

expresión de IIIIG9, de esta forma, el objetivo era disminuir el incremento del ARNm que ocurre durante el nacimiento. Los análisis por microscopía confocal nos indicaron la presencia de nódulos periventriculares, que muestran las células transducidas con el adenovirus inhibidor de IIIIG9, dichas estructuras no se observaron en los cerebros controles. Por otro lado, en los cerebros control podemos observar algunas células GFP positivas a nivel de la corteza cerebral, que mantienen su polaridad celular. Las células que conforman los nódulos periventriculares exhiben pérdida de polaridad, al orientar sus procesos en diversas direcciones (Veeraval y col., 2020; Subramanian y col., 2020). Este efecto se ha observado previamente en bibliografía, por ejemplo, en mutaciones para filamina (*FLNA*) que corresponde a una fosfoproteína de unión a actina citoplasmática participando en cambios de la membrana plasmática y la migración celular, cuyas alteraciones en el gen conducen a heterotopias periventriculares (Stossel y col., 2001). Las heterotopias forman parte de los desórdenes en la migración neuronal que se relacionan con el desarrollo de discapacidad mental y epilepsia (Carabalona y col., 2012). Nosotros creemos que los efectos observados en los cerebros tratados con el adenovirus inhibidor AdsiIIIIG9-GFP, corresponden a un fenotipo de heterotopia periventricular. Estas anomalías del desarrollo generan alteraciones en la migración de los neuroblastos y otros progenitores como los astrocitos (Soumiya y col., 2009). En la pared ventricular, donde se encuentran los nódulos periventriculares, observamos que se altera el patrón de inmunotinción para cadherinas, acompañado por la presencia de células que expresan GFP cuyos somas y procesos se disponen en distintas direcciones (Figura 20D). Por otro lado, analizamos el linaje de las células transducidas por el adenovirus inhibidor de IIIIG9 que se mantienen en la pared ventricular, observando que las células GFP expresan marcadores astrogliales, marcadores de progenitores neuronales y de neuronas maduras.

Por otro lado, la alteración en la distribución de las cadherinas en la pared ventricular tratada con el AdsiIIIIG9-GFP es evidente, ya que no se observa un patrón reticulado homogéneo como si ocurre en la condición control. Esto se representa con claridad en el perfil de fluorescencia entre ambas condiciones, en donde la señal fluorescente de cadherinas en la condición de inhibición (AdsiIIIIG9-GFP) se encuentra pobremente definido. Luego, realizamos el análisis de la entropía de Shannon que nos confirma que el patrón de cadherinas observado en la pared ventricular tratada con el adenovirus posee un índice de entropía mayor respecto al control. Proponemos que la pérdida de la polaridad en la glía radial y la consecuente incapacidad de los progenitores intermedios y neuroblastos de migrar hacia capas superiores, mantiene a estas células retenidas sin un destino establecido, alterando la arquitectura ventricular.

Desde el punto de vista de nuestra hipótesis, la ausencia de IIIIG9 produciría un escaso estado de desfosforilación en Par-3, ya que IIIIG9 no podría conducir la actividad fosfatasa de PP1 alfa. En consecuencia, respecto a la literatura las moléculas libres de Par-3 se vuelven más difusas en la unión célula-célula y no se pueden establecer uniones estrechas maduras y estables (Yamashita y col., 2020). A pesar que este antecedente se relaciona con las uniones estrechas, existe evidencia de que Par-3 interactúa con E-cadherina (Mizuno y col., 2003; Traweger y col., 2008; Coopman y Djianne, 2016) y se sugiere que Par-3 igualmente se encuentre regulando la integridad de las uniones adherentes, ya que, durante el desarrollo, estas uniones son las primeras en formarse y posteriormente las uniones estrechas (Ooshio y col., 2007). Desde este punto de vista, el efecto de inhibición de IIIIG9 en la distribución podría estar dado por la incapacidad de formar uniones adherentes estables.

Luego observamos los efectos a nivel de la corteza marginal en la condición de inhibición y control. En estas muestras se presenta un cúmulo de células AdsiIIIIG9-GFP positivas que migraron desde la zona ventricular y poseen una morfología redondeada. Además, estas células fueron positivas para marcadores de neuronas inmaduras como Tbr2 y doblecortina, que corresponde a un marcador de progenitor intermedio y de migración neuronal, respectivamente (Englund y col., 2005; Ayanlaja y col., 2017). En este contexto, ha sido demostrado que la expresión de Tbr2 aumenta con la aparición de progenitores intermedios mitóticamente activos en la ZSV que se generan a partir de la glía radial; y que esta expresión disminuye drásticamente con el aumento en la neurogénesis cortical, donde las neuronas postmitóticas expresan Tbr1 (Englund y col., 2005). Estas características solo se observan en las células que fueron infectadas con el adenovirus AdsiIIIIG9-GFP y en donde la expresión de Tbr2 y doblecortina en las células de la corteza cerebral externa nos indican que se mantuvo el linaje de las progenitoras de la zona subventricular en una etapa tardía del desarrollo cortical. Los cúmulos celulares observados en la corteza cerebral externa infectados con el AdsiIIIIG9-GFP, son negativos para GFAP (marcador de astrocitos), sin embargo, se encuentran rodeados de células GFAP positivas sugiriendo la presencia de una astrogliosis reactiva. La astrogliosis reactiva se produce cuando se genera un daño en el tejido cerebral, acompañado de una muerte celular, donde los astrocitos se hipertrofian y aumentan de tamaño sus procesos que son fuertemente positivos a marcadores de filamentos intermedios como GFAP y vimentina (Sofroniew y col., 2010; Salazar y col., 2018).

Por otra parte, los cúmulos celulares observados en la zona marginal muestran ausencia de caspasa-3-clivada, que se expresa ampliamente en el SNC en desarrollo, debido a su participación en la plasticidad neuronal y otros procesos celulares (D'Amelio y col., 2012). Por

tanto, debido a la morfología que poseen las células presentes en la corteza cerebral externa que han perdido la función de IIIIG9, la ausencia de expresión de la caspasa-3-clivada y la astrogliosis circundante, creemos que estas células se encuentran en un proceso de muerte celular. Análisis futuros, nos ayudarán a definir si estos acúmulos celulares no fueron capaces de trascender en la expresión de nuevos marcadores que indiquen una etapa de maduración más avanzada, en zonas altas de la corteza cerebral, como podría ser Tbr1 (marcador de neuronas postmitóticas) (Englund y col., 2005). Por lo tanto, proponemos que la pérdida de función de IIIIG9 en cerebros E16 induce también un fenotipo de heterotopia de tipo cortical.

Debido a que, durante la corticogénesis, las neuronas de las capas superiores emergen alrededor del nacimiento (Kriegstein y Alvarez-Buylla., 2009), es probable que la inhibición de IIIIG9 en animales E16 afecte mayormente la génesis de las neuronas de la corteza externa que son las últimas en migrar y poblar la corteza cerebral. Análisis a futuro, realizando la inyección de adenovirus inhibidor de IIIIG9 en una etapa más temprana de la neurogénesis (E13-E14), nos permitirán dilucidar si la ausencia de IIIIG9 altera la formación de neuronas de las capas inferiores y superiores, llevando a un efecto de alteración más masiva en la corticogénesis cerebral.

El estadio de inyección adenoviral (E16), representa un estadio cercano al comienzo de la etapa gliogénica de la corteza cerebral (Kriegstein y Alvarez-Buylla., 2009), donde la glia radial embrionaria y postnatal temprana se delamina para generar astrocitos piales y protoplasmáticos, los cuales se dispersan por toda la pared neocortical mientras proliferan (Clavreul y col., 2019). Esta fase dinámica es seguida por una fase de maduración (PN7-PN21) donde los clones detienen tanto la expansión como la proliferación mientras los astrocitos individuales aumentan su volumen y la complejidad de sus procesos (Clavreul y

col., 2019). De esta forma, nosotros también analizamos la expresión de GFAP al día PN4 en los cerebros inhibidos, donde a nivel de la corteza marginal observamos una menor área inmunoreactiva para GFAP en  $\mu\text{m}^2$  en los cerebros transducidos con el adenovirus inhibidor de IIIIG9. Por esta razón, creemos que la infección con el adenovirus inhibidor de IIIIG9 en RGCs afectaría la génesis de astrocitos marginales. Nuestros resultados además nos indican que las células que son positivas para GFAP expresan GFP (proteína reportera de los adenovirus inhibidores). Esta observación se complementa con el hecho de que estos astrocitos expresan nestina, que corresponde a un filamento intermedio embrionario, que es considerado un marcador de células gliales en el SNC (Kriegstein y Alvarez-Buylla., 2009). Se ha demostrado que la expresión de nestina es regulada a la baja, después de que las células progenitoras se diferencian en neuronas o células gliales, sin embargo, se ha reportado que puede expresarse en astrocitos inmaduros, junto a vimentina y sinemina (Potokar y col., 2020).

Por tanto, considerando nuestros resultados es posible que la expresión de nestina en astrocitos GFAP positivos, en los cerebros inhibidos con el AdsiIIIIG9-GFP, nos indique que los astrocitos aún poseen características de células progenitoras. Esto no es observado en la condición control, ya que las células GFAP positivas de la corteza marginal, no expresan nestina. Además, considerando la disminución en el área inmunoreactiva para GFAP en la corteza marginal, es posible que la población astrocítica se encuentre reducida.

De esta manera, podemos concluir que el efecto de inhibición de IIIIG9 conduce a errores en la migración de progenitores neuronales y afecta la capacidad de los astrocitos de poblar las zonas marginales y la corteza cerebral interna (Clavreul y col., 2019). Una explicación a nuestros hallazgos es la relación de IIIIG9 con proteínas del citoesqueleto (Oviedo y col., 2022) y su reciente nombramiento como una proteína de la familia SAXO

(estabilizador de microtúbulos axonemales). IIIIG9 o SAXO 4, se define como un estabilizador de microtúbulos en axones, cilios y flagelos (Leung y col., 2023) debido a la presencia de múltiples dominios de unión a tubulina. Los motivos de interacción se denominan motivos Mn, a causa de su resistencia al nocodazol (Dacheux y col., 2012) y en el caso de SAXO 4 se une longitudinalmente a lo largo de un único protofilamento interno, en donde los motivos se encuentran separados por 40 residuos, con una repetición interna de 8 nm (Leung y col., 2023; Wang y col., 2021). Sin embargo, IIIIG9 además de la distribución puntiforme y polarizada hacia un lado del cilio móvil en células ependimarias (Cifuentes y col., 2018), muestra una distribución en las uniones adherentes presentes en la glía radial ventricular y en el epéndimo adulto (presente tesis). Considerando estos antecedentes, se ha reportado que las glías radiales presentan centros de nucleación de microtúbulos que son dependientes de proteínas estabilizadoras como por ejemplo Nezha o también llamada CAMSAP3 (Meng y col., 2008). Específicamente, los centros de nucleación de microtúbulos permiten mantención de la morfología de la glía radial, localizándose a nivel del soma, los pies apicales y también en el proceso basal de la glía radial para controlar su crecimiento (Coquand y col., 2020). Fundamentalmente, los microtúbulos se clasifican en dos categorías: centrosomales y no centrosomales. Los microtúbulos no centrosomales emanan de sitios diferentes al centrosoma, como el aparato de Golgi, la corteza apical y también desde las uniones adherentes (Vogelmann y Nelson., 2005; Meng y col., 2008; Toshiya y col., 2021). En los microtúbulos no centrosomales, los extremos negativos de los microtúbulos contactan la zona más apical de la unión adherente basada en cadherina y se ha reportado que el agotamiento de las proteínas estabilizadoras como Nezha conduce a la desorganización de la unión (Meng y col., 2008). Por el contrario, existen antecedentes de que los extremos positivos de los microtúbulos igualmente se contactan con las uniones adherentes de células tumorales mamarias y que la



despolarización microtubular conduce a una acumulación desorganizada de E-cadherina (Stehbens y col., 2006), por tanto, los microtúbulos son requeridos para el ensamblaje de las uniones adherentes.

Además, el proceso de migración de los neuroblastos es dependiente del tráfico endocítico que permite el reciclaje de N-cadherina en el proceso líder, y que su vez se desplaza sobre estructuras microtubulares que ascienden por el proceso basal de la glía radial (Agustín-Durán y col., 2021; Granger y col., 2014). En este contexto, que se ha reportado que la reducción de N-cadherina en la superficie del progenitor intermedio (presente en la ZSV) conduce a una progresión deficiente de la fase multipolar a bipolar necesaria para la migración radial hacia la placa cortical, ya que tanto la glía radial como el neuroblasto poseen N-cadherinas que interactúan y facilitan el proceso de migración (Tabata y col., 2003; Meyerink y col., 2020). Esto conlleva a una acumulación de neuronas en la zona intermedia, que no migraron más allá de las neuronas previamente establecidas (Kawauchi, 2015). En este caso, sugerimos que la inhibición de IIIIG9 promueve la pérdida de los centros de nucleación de microtúbulos en las uniones adherentes presentes en las glías radiales y eventualmente afectando la integridad del proceso basal hasta la superficie pial. En consecuencia, el proceso de migración de los progenitores neuronales y la colonización de los astrocitos hacia la corteza cerebral se ve perjudicada, conduciendo al desarrollo de heterotopia periventricular y cortical.

## **CAPITULO 2. Evaluar la interacción de IIIIG9 con PP1 $\alpha$ y Par-3 durante la polarización y diferenciación del epitelio endimario.**

### **2.1 Caracterización del modelo *in vitro* de células MDCK.**

En nuestro segundo capítulo, utilizamos un modelo *in vitro* de células MDCK, que ha sido ampliamente utilizado para analizar proteínas de adhesión celular y de polaridad (Traweger y col., 2008). Elegimos este modelo, ya que, a diferencia del epéndimo, nos permitió una mayor versatilidad para analizar distribución subcelular y ensayos de interacción entre las proteínas estudiadas. Nuestros análisis de *western blot* indicaron que este modelo *in vitro* de células MDCK expresa IIIIG9, Par-3, PP1 alfa y cadherinas.

Los análisis de distribución subcelular por microscopía de superresolución SIM, indican que IIIIG9 posee un patrón punteado en la membrana celular en células MDCK en confluencia, destacando su concentración en procesos como filopodios, lamelipodios y en los contactos célula-célula junto a las cadherinas. PP1 alfa muestra más bien una distribución ubicua en el citoplasma, sin embargo, su localización a nivel de los complejos de unión célula-célula puede ser un problema de los niveles de concentración relativa de esta proteína. Además, la localización ubicua de PP1 alfa era esperable, debido a que la distribución de las subunidades catalíticas de PP1 es una característica clave de estas fosfatasas para los eventos de desfosforilación de proteínas involucrados en diversos procesos a nivel subcelular (Cohen, 2002).

Por su parte, mediante microscopía de resolución SIM observamos que la distribución de Par-3 se asocia a la membrana plasmática en condiciones de confluencia celular, al igual

que lo reportado por Zhang y col., 2016. Sin embargo, también es posible observar una fracción de Par-3 a nivel citoplasmático, a quien se le han atribuido otras funciones junto a PP1 alfa, como promover la desfosforilación de Last1 y YAP de la vía Hippo-Yap, que conduce a un aumento en la proliferación celular en condiciones de baja densidad celular (Zhang y col., 2016).

Los antecedentes publicados por Traweger y col., indican que Par-3 coimmunoprecipita con la forma endógena con PP1 alfa desde extractos obtenidos de tejido embrionario de ratón E13, en células HEK293T y células MDCK II. Respecto a su distribución subcelular se transfectaron células MDCK II con construcciones que codifican Par-3 YFP (180 kDa) y PP1 alfa-RFP, indicando que ambas proteínas se distribuyen en los contactos celulares, con una amplia distribución de PP1 alfa en la membrana plasmática y en agregados citoplasmáticos, siendo concordante con nuestros resultados. Respecto a la subunidad catalítica PP1 beta y PP1 gamma no fueron observadas en la membrana plasmática ni tampoco interactuaban con Par-3 (Traweger y col., 2005). La interacción entre Par-3 y PP1 alfa se encuentra principalmente dado por la presencia del motivo degenerado RVXF [RK]-X<sub>0,1</sub>- [V/I]- [F/W] ubicado en el dominio C-terminal del dominio PDZ1 de Par-3 (desde el residuo 351-355, RVIWF), un motivo de interacción previamente reportado en proteínas reguladoras de PP1 (Cohen, 2002). La mutación de determinados residuos a alanina (**RVIWF** a **AVIWA**) reduce la interacción de Par-3 con PP1 alfa, pero no la elimina por completo. Por esta razón, se sugiere que el anclaje de PP1 alfa a Par-3 también puede ser mediado por proteínas regulatorias de PP1 alfa que, por ejemplo, puedan anclarse a otras regiones de Par-3 como sus dominios PDZ (Traweger y col., 2008). PP1 alfa es capaz de desfosforilar selectivamente los residuos de Par-3 de ratón (Ser-144 y Ser-824) que se localiza a nivel citoplasmático tras liberarse de la corteza lateral, luego

de la fosforilación de Par-1 (Traweger y col., 2008). De esta forma, PP1 alfa restablece la interacción entre Par-3 y aPKC funcional en el dominio apical de las células epiteliales para el establecimiento de las uniones estrechas. Sin embargo, existen antecedentes de que Par-3 también participa en el establecimiento de las uniones adherentes, como se ha reportado en *Drosophila*, en donde la disminución en la expresión de Bazuca (homólogo de Par-3), conduce a una mala localización de E-cadherina y alterando las uniones septadas (Pinheiro y Montell, 2004). Igualmente, en *Drosophila*, Par-3 (Bazuca o Baz), es capaz de reclutar grupos de cadherina-catenina hacia los dominios apicolaterales para ensamblar las uniones adherentes (McGill y col., 2009). Por otra parte, en células MDCK, la sobreexpresión del dominio CR1 de Par-3 (de unión a la membrana celular) perturba el patrón de tinción de E-cadherina, ZO-1 y F-actina (Mizuno y col., 2003). De esta forma, se ha concluido que Par-3 es relevante para la formación inicial de las uniones adherentes y, por tanto, en forma secundaria de las uniones estrechas (Ooshio y col 2007). No debemos olvidar que la actividad de Par-3 puede ser independiente de su interacción con aPKC y Par-6, en donde Baz y las uniones adherentes se localizan en la posición basal del complejo aPKC y Par-6. Además, existen una amplia variedad de variantes de empalme de Par-3 que pueden asociarse en forma diferencial con aPKC y formar parte exclusiva de las uniones adherentes, como la isoforma Pard3B (Gao y col., 2002). Se ha reportado que Par3B de vertebrados posee una mutación en los motivos FXR y KR, que impediría la interacción con aPKC y, por ende, favoreciendo la localización de Par-3B junto a E-cadherina. Mientras que Par-3 se asocia al dominio apical reclutando a CDC42-Par-6-aPKC, participando en la polarización celular y el tráfico de vesículas (Thompson, 2022).

En este contexto, se ha reportado que Par-3, al igual que las cadherinas, se transportan apicalmente a través de dineínas, la proteína motora de los microtúbulos (Ligon y col., 2001), ya que la dineína interactúa con  $\beta$ -catenina, uniendo los microtúbulos a las uniones adherentes en células Ptk2 (células epiteliales de riñón de *Potorous tridactylis*) (Ligon y col., 2001).

Debido a que las células MDCK es un buen modelo de estudio, nos quisimos acercar mucho más al proceso de morfogénesis epitelial cultivando las células en una matriz pre-gelificada de matrigel. Así generamos un modelo 3D *in vitro* de células MDCK, en los cuales se obtuvimos cistos (o quistes) polarizados y una condición mixta de cistos y monocapas 3D de células MDCK (Gao y col., 2007). Ambos modelos nos permitieron observar un mayor grado de polarización de IIIIG9, PP1 alfa y Par-3 respecto a las cadherinas que mostraron una distribución basolateral, debido a la presencia de un microambiente que recrea la presencia de una matriz extracelular. Por tanto, en este modelo celular, observamos una significativa colocalización IIIIG9, PP1 alfa y Par-3 con las cadherinas.

En conclusión, retomando los antecedentes relatados previamente en literatura y nuestros resultados, las proteínas de estudio se distribuyen junto a las uniones basadas en cadherinas (observado también en la pared ventricular en desarrollo en el Capítulo 1), por tanto, proponemos la distribución punteada de IIIIG9 a nivel citoplasmático y en las uniones adherentes observada en células MDCK, se asemeja en gran medida con la distribución axonemal previamente reportada (Leung y col., 2023), sin embargo, el objetivo se orientaría en mantener la estabilidad de los microtúbulos citoplasmáticos que se anclan en las uniones adherentes. Además, la polarización observada de IIIIG9 en estructuras como lamelipodios y filopodios, en los cuales participan además los filamentos de actina (Schober y col., 2007), nos resulta interesante ya que dichas estructuras protrusivas participan tempranamente en la

formación de uniones adherentes basadas en cadherina como se ha reportado en células endoteliales (Hoelzle y col., 2012). Finalmente, en nuestros análisis, no observamos a IIIIG9 en los bordes celulares libres de células MDCK.

## **2.2 Análisis de interacción de IIIIG9, Par-3 y PP1 $\alpha$ , en las uniones adherentes.**

El modelo 3D de células MDCK fue mucho más adecuado para polarizar las proteínas en las uniones adherentes, por tanto, para confirmar la interacción de IIIIG9, PP1 alfa y Par-3 con las uniones adherentes (cadherinas), realizamos un ensayo para evaluar las interacciones proteína-proteína. Utilizamos, el ensayo de ligadura por proximidad (*PLA*), que nos permite observar interacción de proteínas endógenas con alta sensibilidad y especificidad (Söderberg y col., 2006), en donde si las proteínas están lo suficientemente cerca (<40 nm) se genera una reacción en cadena de la polimerasa en un círculo rodante, que produce una señal fluorescente roja. En este modelo, observamos la interacción de IIIIG9 con E-cadherina en las uniones intercelulares de monocapas 3D de células MDCK, en toda la extensión de la unión adherente (Figura 35), mientras que en el cisto polarizado, la marca fluorescente de interacción se distribuye en los dominios basolaterales (Figura 34). Por otro lado, Par-3 igualmente interactúa con E-cadherina, distribuyéndose en un patrón regular en los sitios de interacción célula-célula (Figura 36). Debido a que ambos anticuerpos están sintetizados en la misma especie (conejo), no analizamos en forma directa la interacción entre IIIIG9 y Par-3, por lo que sería interesante en el futuro analizar si estas proteínas interactúan directamente. Además, confirmamos la interacción entre IIIIG9 y PP1 alfa a través de *PLA* en cistos 3D y monocapas 3D, observando la señal positiva en las uniones adherentes y en las porciones más

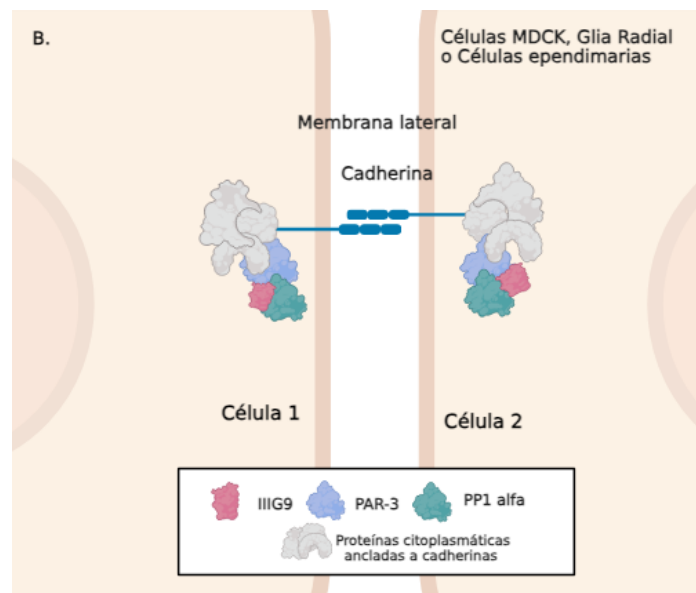
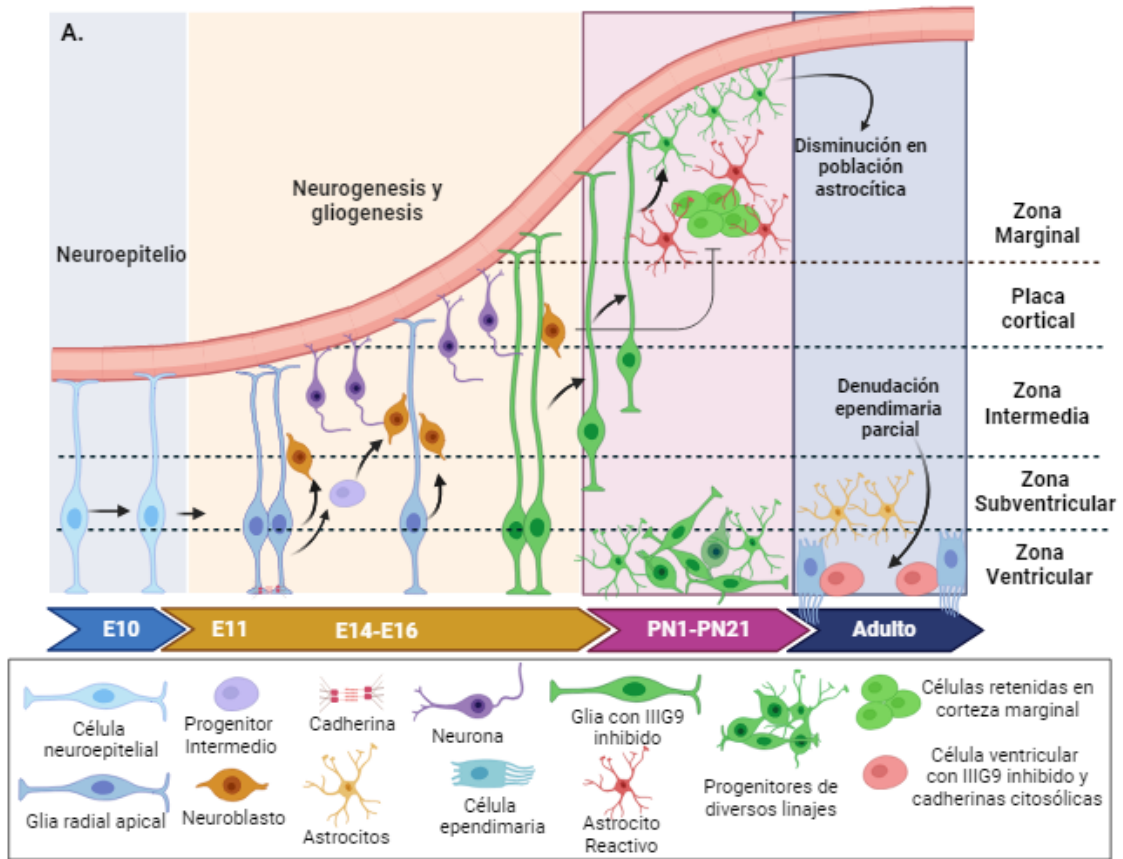
basolaterales de los cistos polarizados. Finalmente, recreamos el mismo ensayo en el epéndimo adulto y nuevamente observamos que ocurre interacción entre IIIIG9/E-cadherina, y Par-3/E-cadherina. Por lo tanto, es posible que la interacción de estas proteínas sea consistente con diversos epitelios que expresan IIIIG9. Mientras que la interacción entre IIIIG9/PP1 alfa fue confirmada por *PLA* y además por análisis de FRET, que les otorgan mayor sustento a nuestros hallazgos.

En conclusión, podemos confirmar parte de nuestra hipótesis presentada en esta tesis, en donde IIIIG9, Par-3 y PP1 alfa se distribuyen e interactúan en las uniones adherentes en un modelo *in vitro* 3D (Capítulo 2) y siendo reproducible *in situ* en la pared ventricular de rata durante el desarrollo de la pared ventricular, que incluye a glías radiales en etapas embrionarias y también en células endoteliales adultas (Capítulo 1). Sin embargo, no podemos confirmar que IIIIG9 permitiría la focalización de la actividad fosfatasa de PP1 alfa sobre la proteína de polaridad Par-3, promoviendo la estabilidad de las uniones adherentes, ya que para esto se requeriría de estudios bioquímicos y mutaciones sitio dirigidas en los dominios RVXF de IIIIG9 (de unión a PP1) (Hendrickx y col., 2009), en la cola C-terminal de IIIIG9 que potencialmente podría interactúa con dominios PDZ (Wolting y col., 2011) y finalmente, en los dominios Mn que permiten la interacción de IIIIG9 con microtúbulos axonemales y eventualmente a los localizados en el citoplasma y las uniones adherentes (Leung y col., 2023). A pesar de esto, los ensayos de inhibición *i.c.v* en etapas embrionarias (*in utero*) y adultas nos permiten obtener una visión amplia de los efectos fisiopatológicos conducidos por la inhibición de IIIIG9, que se encuentran directamente relacionados con fenotipos que presentan pérdida de uniones adherentes y de la polaridad de la glía radial, que estaría dado por el desensamble de los microtúbulos que mantienen su estructura polarizada (uniones

apicales y extensión del proceso basal hacia la superficie pial) (Carabalona y col., 2012), que conduce a una difusa distribución de cadherinas en la superficie de la pared ventricular inhibida (PN4).

El fenotipo de heterotopia cortical y periventricular observadas al inhibir IIIG9, corresponden a malformaciones del desarrollo cortical que se asocian a patologías del SNC como la epilepsia, discapacidad intelectual y autismo (entre otras) (Agustín- Durán y col., 2021), en donde su interacción con PP1 alfa y Par-3 serían claves para comprender su origen.





Creado en Biorender

**Figura 40. Modelo final del estudio.**

**A. Efectos celulares y fenotípicos generados por la pérdida de función de IIIIG9 durante el desarrollo embrionario y el estado adulto de la pared del ventrículo lateral.**

La pérdida de función de IIIIG9 en un estadio E16 conlleva a la aparición de heterotopia ventricular y cortical y a una reducción en la población de astrocitos marginales en cerebros postnatales (PN4); en cambio, en el cerebro adulto, la ausencia de IIIIG9 induce denudación endimaria parcial, donde algunas células remanentes presentan una morfología no polarizada con internalización de las cadherinas.

**B. Mecanismo molecular propuesto para la función de IIIIG9 en las uniones adherentes de células MDCK, células endimarias y la glia radial.**

El complejo IIIIG9-PP1 alfa permite el anclaje de Par-3 a las cadherinas a nivel de la membrana apico-lateral de células MDCK, células endimarias y la glia radial, contribuyendo a mantener la polaridad celular a través de las uniones adherentes.

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- La pared ventricular embrionaria, postnatal y adulta expresan IIIIG9, Par-3 y PP1 alfa en las uniones adherentes basadas en cadherinas.
- 2.- El efecto de inhibición de IIIIG9 en la etapa adulta conduce a denudación endimaria parcial, pérdida de polaridad en las células transducidas e internalización de cadherinas hacia el citoplasma.
- 3.- El efecto de inhibición de IIIIG9 en la etapa embrionaria (E16) conduce a heterotopias periventricular y cortical en el estadio postnatal temprano (PN4), y a una reducción en el contenido de astrocitos marginales. Esto debido a la pérdida de polaridad de la glia radial y la consecuente incapacidad de los progenitores neuronales y gliales de migrar hacia zonas altas de la corteza cerebral.
- 4.- IIIIG9, Par-3 y PP1 alfa interactúan con cadherinas *in vivo* e *in vitro*, confirmando parte de nuestra hipótesis.
- 5.- Nuestros hallazgos, indican que IIIIG9 (PPP1R32/SAXO4) es una proteína relevante en la mantención de la polaridad de la glia radial (célula troncal) y de las células endimarias. Así su función podría limitar la aparición de patologías del desarrollo cerebral (dislexia, epilepsia, autismo, entre otras) y del cerebro adulto (hidrocefalia).

## VII. REFERENCIAS

- Afonso C, Henrique D (2006) PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. J Cell Sci 119: 4293–4304.
- Atashrazm, F., & Ellis, S. (2021). The polarity protein PARD3 and cancer. Oncogene, 40(25), 4245–4262.
- Avasthi, P., Marshall, W. F. (2012). Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. Differentiation, 83, S30–S42.
- Ayanlaja, A. A., Xiong, Y., Gao, Y., Ji, G., Tang, C., Abdikani Abdullah, Z., & Gao, D. (2017). Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. Front Mol Neurosci., 10, 199.
- Baeza, V., Cifuentes, M., Martínez, F., Ramírez, E., Nualart, F., Ferrada, L., & Salazar, K. (2021). IIIIG9 inhibition in adult ependymal cells changes adherens junctions structure and induces cellular detachment. Sci. Rep., 11(1), 18537.
- Barford, D., Das, A. K., Egloff, M. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 27, 133–64.
- Benton, R. and St Johnston, D. (2003). Drosophila PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. Cell 115, 691-704.
- Bertocchi, C., Vaman Rao, M., & Zaidel-Bar, R. (2012). Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. J. Signal Transduct., 2012:125295.
- Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J. and Beullens, M. (2010) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. Trends Biochem. Sci. 35, 450–458.
- Bordelon, J. R., Smith, Y., Nairn, A. C., Colbran, R. J., Greengard, P., Muly, E.C. (2005). Differential localization of protein phosphatase-1alpha, beta and gamma 1 isoforms in primate prefrontal cortex. Cereb. Cortex., 15, 1928–37.
- Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Brautigan, D. L. (2013). Protein Ser/ Thr phosphatases - The ugly ducklings of cell signalling. FEBS J., 280, 324–45.
- Breunig, J. J., Haydar, T. F., & Rakic, P. (2011). Neural stem cells: historical perspective and future prospects. Neuron, 70(4), 614–625.

Bultje, R., Castaneda-Castellano, DR., Jan, LY., Jan, YN., Kriegstein, AR & Shi, SH (2009). Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via Notch signaling in the developing neocortex. Neuron 63(2), 189-202.

Campbell, K. Gotz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci, 25, 235–38.

Cappello, S., Böhringer, C. R., Bergami, M., Conzelmann, K. K., Ghanem, A., Tomassy, G. S., Arlotta, P., Mainardi, M., Allegra, M., Caleo, M., van Hengel, J., Brakebusch, C., & Götz, M. (2012). A radial glia-specific role of RhoA in double cortex formation. Neuron, 73(5), 911–924.

Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-Pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., Hubert, P., Oualha, M., Siffroi, JP., Khantane, S., Coupry, I., Goizet, C., Gelot, AB., Represa, A., Cardoso, C (2012). A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. Hum. Mol. Genet., 21(5), 1004–1017.

Carlén, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K. Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M., Naldini, L., Honjo, T., Kokola, Z., Shupliakov, O., Cassidy, R., Lindwall, O., Frisén, J (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. Nat. Neurosci, 12, 259-267.

Casamayor, A., & Ariño, J. (2020). Controlling Ser/Thr protein phosphatase PP1 activity and function through interaction with regulatory subunits. Adv. Protein Chem. Struct. Biol., 122, 231–288.

Ceulemans, H., Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. Physiol Rev., 84, 1–39.

Ceulemans, H., Bollen, M. (2006). A Tighter RVxF Motif Makes a Finer Sift. Chem. Biol., 13, 6–8.

Chen, E.Y.; Tan, C.M.; Kou, Y.; Duan, Q.; Wang, Z.; Meirelles, G.V.; Clark, N.R.; Ma'ayan, A (2013). Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. BMC Bioinform, 14, 128.

Chen, X., & Macara, I. G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. Nat. Cell Biol., 7(3), 262–269.

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

Cifuentes, M., Baeza, V., Arrabal, P. M., Visser, R., Grondona, J. M., Saldivia, N., Martínez, F., Nualart, F., & Salazar, K. (2018). Expression of a Novel Ciliary Protein, IIIG9, During the Differentiation and Maturation of Ependymal Cells. Mol. Neurobiol, 55(2), 1652–1664.

Clavreul, S., Abdeladim, L., Hernández-Garzón, E., Niculescu, D., Durand, J., Ieng, S. H., Barry, R., Bonvento, G., Beaupaire, E., Livet, J., & Loulier, K. (2019). Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels. *Nat. Commun*, 10(1), 4884.

Cohen PTW (2002). Protein phosphatase 1–targeted in many directions. *J. Cell.Sci.*, 115, 241–56.

Coopman, P., & Djiane, A. (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(18), 3535–3553.

Coquand, L., Victoria, G. S., Tata, A., Carpentieri, J. A., Brault, J. B., Guimiot, F., Fraissier, V., & Baffet, A. D. (2021). CAMSAPs organize an acentrosomal microtubule network from basal varicosities in radial glial cells. *J Cell Biol*, 220(8), e202003151.

CORTECON. Repository of Gene Expression in the Developing Cortex. NSCI, Neural Stem Cell Institute. Gene Expression: PPP1R32. Available online: [https://cortecon.neuralsci.org/index.php?cort\\_mode=genedisplay&geneid=220004](https://cortecon.neuralsci.org/index.php?cort_mode=genedisplay&geneid=220004)

Costa, MR., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., Götz, M (2008) Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Dev.*, 135 (1): 11–22.

Da Cruz e Silva, E., Fox, C., Ouimet, C. Gustafson, E., Watson, E., Greengard, E. (1995). Differential Expression of Protein Phosphatases 1 isoforms in Mammalian Brain. *J. Neurosci.*, 15, 3375–3389.

Dacheux D, Landrein N, Thonnus M, Gilbert G, Sahin A, Wodrich H, et al. (2012) A MAP6-Related Protein Is Present in Protozoa and Is Involved in Flagellum Motility. *PLoS One* 7(2): e31344.

D'Amelio, M., Sheng, M., & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci.*, 35(11), 700–709.

Danielson, P. E., Sautkulis, L. N., Foye, P. E., Hedlund, P. B., & Carson, M. J. (2002). A novel mRNA expressed along brain ventricles. *Brain Res Gene Expr Patterns.*, 1(2), 83–88.

De Agustin-Duran, D., Mateos-White, I., Fabra-Beser, J., & Gil-Sanz, C. (2021). Stick around: Cell-Cell Adhesion Molecules during Neocortical Development. *Cells*, 10(1).

Del Bigio M. R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 55–73.

Deng, S., Gan, L., Liu, C., Xu, T., Zhou, S., Guo, Y., Zhang, Z., Yang, G. Y., Tian, H., & Tang, Y. (2023). Roles of Ependymal Cells in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Aging Dis*, 14(2), 468–483.

Egloff, MP., Johnson, DF., Moorhead, G., Cohen, PT., Cohen, P., Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. EMBO J., 16, 1876–87.

Elam, C. A., Sale, W. S., & Wirschell, M. (2009). The regulation of dynein-driven microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella by axonemal kinases and phosphatases. Methods Cell Biol., 92, 133-151.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., & Hevner, R. F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. J. Neurosci., 25(1), 247–251.

Enrichr: Interactive and Collaborative HTML5 Gene List Enrichment Analysis Tool. Gene: PPP1R32. Available online: <https://maayanlab.cloud/Enrichr/#find!gene=PPP1R32> (accessed on 20 July 2023).

Esteves, S. L. C., Domingues, S. C., da Cruz e Silva, O. A. B., Fardilha, M., & da Cruz e Silva, E. F. (2012). Protein phosphatase 1 $\alpha$  interacting proteins in the human brain. OMICS., 16, 3–17.

Esteves, S. L., Korrodi-Gregório, L., Cotrim, C. Z., van Kleeff, P. J., Domingues, S. C., da Cruz e Silva, O. A., Fardilha, M., & da Cruz e Silva, E. F. (2013). Protein phosphatase 1 $\gamma$  isoforms linked interactions in the brain. J. Mol. Neurosci., 50(1), 179–197.

Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Taylor, J., Trotter, M., Pollard, S., Smith, A., & Brüstle, O. (2012). Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. PloS One, 7(1), e29597.

Felgueiras, J., Jerónimo, C & Fardilha, M (2020). Protein phosphatase 1 in tumorigenesis: is it worth a closer look?. Biochem Biophys Acta Rev Cancer. 1874, 188433.

Ferreira, M., Beullens, M., Bollen, M., & Van Eynde, A. (2019). Functions and therapeutic potential of protein phosphatase 1: Insights from mouse genetics. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 1866(1), 16–30.

Figueiredo, J., da Cruz e Silva, O. A. B., Fardilha, M. (2014). Protein phosphatase 1 and its complexes in carcinogenesis. Curr Cancer Drug Targets., 14, 2–29.

Franco, S.J.; Müller, U (2013). Shaping our minds: Stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. Neuron, 77, 19–34.

Gao, L., Macara, I. G., & Joberty, G. (2002). Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. Gene, 294(1-2), 99–107.

Gao, P., Postiglione, M. P., Krieger, T. G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., et al. (2014). Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. Cell, 159, 775–788.

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. J. Neurosci., 34(32), 10475–10487.

Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. Nature reviews. Mol Cell Biol, 6(10), 777–788.

Granger, E., MnNee, G., Allan, V., Woodman, P (2014) The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. Semin Cell Dev Biol, 31 (100) 20-29.

Greig, L., Woodworth, M., Galazo, M., Padmanabhan, H & Macklis, J (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nat Rev Neurosci, 14, 755–769.

Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2013). A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. Histochem. Cell Biol, 139(1), 205–220.

Guarnieri, F. C., de Chevigny, A., Falace, A., & Cardoso, C. (2018). Disorders of neurogenesis and cortical development. Dialogues Clin. Neurosci, 20(4), 255–266.

Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, JM., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, YG., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol, M., Sawamoto, K., Spassky, N (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. Nat Cell Biol, 12, 341–350.

Guo, Z., Neilson, L. J., Zhong, H., Murray, P. S., Zanivan, S., & Zaidel-Bar, R. (2014). E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics. Sci. Signal, 7(354): rs7.

Guo, Q., Xia, B., Moshiach, S., Xu, C., Jiang, Y., Chen, Y., Sun, Y., Lahti, J. M., & Zhang, X. A. (2008). The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. Eur. J. Cell Biol., 87(4), 251–266.

Hao, K., Chen, Y., Yan, X., & Zhu, X. (2021). Cilia locally synthesize proteins to sustain their ultrastructure and functions. Nat. Commun, 12(1), 6971.



Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. and Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,3196-3201.

Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Den Abt, T., Van Eynde, A., Nico-laescu, E., Lesage, B., Bollen, M. (2009). Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1. Chem. Biol, 16, 365-371.

Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L. and Bollen, M. (2013) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. FEBS J. 280, 584–595.

Hirota, Y., Meunier, A., Huang, S., Shimosawa, T., Yamada, O., Yasuyuki, K., Inoue, M., Ito, T., Kato, H., Sakaguchi, M., Sunabori, T., Nakaya, M., Nonaka, S., Ogura, H., Higuchi, H., Okano, H., Spassky, N., Sawamoto, K. (2010). Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle miosina II. Dev, 137, 3037–3046.

Hoelzle, M. K., & Svitkina, T. (2012). The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. Mol. Biol Cell, 23(2), 310–323.

Hua, K., & Ferland, R. J. (2018). Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. Cell Mol Life Sci. 75(9), 1521–1540.

Ivliev, A. E., 't Hoen, P. A., van Roon-Mom, W. M., Peters, D. J., & Sergeeva, M. G. (2012). Exploring the transcriptome of ciliated cells using in silico dissection of human tissues. PLoS One,7(4), e35618.

Jiménez, A. J., Domínguez-Pinos, M. D., Guerra, M. M., Fernández-Llebrez, P., & Pérez-Fígares, J. M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. Tissue barriers, 2, e28426.

Jossin, Y., Lee, M., Klezovitch, O., Kon, E., Cossard, A., Lien, W. H., Fernandez, T. E., Cooper, J. A., & Vasioukhin, V. (2017). Llg11 Connects Cell Polarity with Cell-Cell Adhesion in Embryonic Neural Stem Cells. Dev. Cell,41(5), 481–495.e5.

Jou, T. S., Stewart, D. B., Stappert, J., Nelson, W. J., & MARRS, J. A. (1995). Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,92(11), 5067–5071.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873), 583-589.

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

Kawauchi T. (2015). Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. Front. Cell. Neurosci., 9, 394.

Kim, S., Lehtinen, M. K., Sessa, A., Zappaterra, M. W., Cho, S. H., Gonzalez, D., Boggan, B., Austin, C. A., Wijnholds, J., Gambello, M. J., Malicki, J., LaMantia, A. S., Broccoli, V., & Walsh, C. A. (2010). The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. Neuron, 66(1), 69–84.

Kohjima M, Noda Y, Takeya R, Saito N, Takeuchi K, Sumimoto H (2002). PAR3beta, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. Biochem Biophys Res Commun. 299:641–6.

Kriegstein, A. R., & Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. Glia, 43(1), 37–43.

Kriegstein, A. R., Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu. Rev. Neurosci., 32, 149–184.

Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., ... & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. Nucleic Acids Res, 44(W1), W90-W97

Lacroix, S., Hamilton, L. K., Vaugeois, A., Beaudoin, S., Breault-Dugas, C., Pineau, I., Lévesque, S., Grégoire, C., Fernandes, K. (2014). Central canal ependymal cells proliferate extensively in Response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions. PLoS Med, 9, 1-11.

Laumonnerie, C., & Solecki, D. J. (2018). Regulation of Polarity Protein Levels in the Developing Central Nervous System. J. Mol. Biol, 430(19), 3472–3480.

Leung, M.R., Zeng, J., Wang, X., Roelofs, M.C., Huang, W., Zenezini Chiozzi, R., Hevler, J.F., Heck, A.J.R., Dutcher, S.K., Brown, A., Zhang, R., and Zeev-Ben-Mordehai, T. 2023. Structural specializations of the sperm tail. Cell, 186, 2880-2896.e2817.

Ligon, L. A., Karki, S., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. (2001). Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. Nat. Cell Biol, 3(10), 913–917.

Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., & Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. Nat. Cell Biol, 2(8), 540–547.

Liu, W. A., Chen, S., Li, Z., Lee, C. H., Mirzaa, G., Dobyms, W. B., Ross, M. E., Zhang, J., & Shi, S. H. (2018). PARD3 dysfunction in conjunction with dynamic HIPPO signaling drives cortical enlargement with massive heterotopia. Genes Dev., 32(11-12), 763–780.

Lv, T., Xu, J., Yuan, H., Wang, J., & Jiang, X. (2022). Dual Function of Par3 in Tumorigenesis. Front. Oncol., 12, 915957.

MacDonald, A., Lu, B., Caron, M., Caporicci-Dinucci, N., Hatrock, D., Petrecca, K., Bourque, G., & Stratton, J. A. (2021). Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. Front. Cell. Neurosci., 15, 703951.

MacMillan, L. B., Bass, M. A., Cheng, N., Howard, E. F., Tamura, M., Strack, S., Colbran, R. J. (1999). Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. J. Biol. Chem., 274, 35845–54.

Malatesta, P., Appolloni, I., & Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. Cell Tissue Res, 331(1), 165–178.

McGill, M., McKinley, RFA., Harris, T (2009). Independent cadherin-catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions. J Cell Biol, 185(5):787-796.

Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., & Takeichi, M. (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. Cell, 135(5), 948–959.

Merkle, F. T., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 17528–17532.

Meyerink, B (2020). Ariadne’s Thread in the Developing Cerebral Cortex: Mechanisms enabling the guiding role of the radial glia basal process during neuron migration. Cells, 10(1):3.

Mirzadeh Z., Han Y. G., Soriano-Navarro M., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. (2010). Cilia organize ependymal planar polarity. J. Neurosci. 30, 2600-2610.

Mitchell, B., Jacobs, R., Li, J., Chien, S., Kintner, C. (2007) A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. Nature., 447, 97– 101.

Miyamoto, Y., Sakane, F., & Hashimoto, K. (2015). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. Cell Adhes. Migr. 9(3), 183–192.

Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., Amano, Y. and Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. J. Biol. Chem. 278, 31240-31250.

Molofsky, A. V., Krencik, R., Ullian, E. M., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., & Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. Genes Dev, 26(9), 891–907.

Mukherji, M., Bell, R., Supekova, L., Wang, Y., Orth, A. P., Batalov, S., ... & Schultz, P. G. (2006). Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103(40), 14819-14824.

Naruse, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Tanaka, A & Hitashi, S (2017) Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. J Physiol Sci, 67, 63–70.

Nualart, F., Godoy, A., & Reinicke, K. (1999). Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. Brain Res, 824(1), 97–104.

Oliver, C., González, C. A., Alvial, G., Flores, C. A., Rodríguez, E. M., & Bátiz, L. F. (2013). Disruption of CDH2/N-cadherin-based adherens junctions leads to apoptosis of ependymal cells and denudation of brain ventricular walls. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 72(9), 846–860.

Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K., & Takai, Y. (2007). Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. J Cell Sci, 120(Pt 14), 2352–2365.

Ortiz, J. (2006). La diversidad funcional de proteína fosfatasa-1 y el papel de nuevas subunidades reguladoras y el papel de nuevas subunidades reguladoras. An. R. Acad. Nac. Farm., 72, 283–299.

Oviedo, M. J., Ramírez, E., Cifuentes, M., Farkas, C., Mella, A., Bertinat, R., ... & Salazar, K. (2022). Is IIIIG9 a New Protein with Exclusive Ciliary Function? Analysis of Its Potential Role in Cancer and Other Pathologies. Cells, 11(20), 3327.

Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., & Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. J. Cell Biol, 118(3), 681–691.

Peti, W., Naim, A & Page, R (2013). Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. FEBS J., 280, 596-611.

Pinheiro, E. M., & Montell, D. J. (2004). Requirement for Par-6 and Bazooka in Drosophila border cell migration. Dev., 131(21), 5243–5251.

Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. Cells, 9(7), 1604.

Redmond, S. A., Figueres-Oñate, M., Obernier, K., Nascimento, M. A., Parraguez, J. I., López-Mascaraque, L., Fuentealba, L. C., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. Cell Rep., 27(2), 429–441.e3.

Rodríguez, E. M., Guerra, M. M., Vío, K., González, C., Ortloff, A., Bátiz, L.F. Rodríguez, M., Muñoz, R., Ortega, E., Jaque, J., Guerra, F. Sival, D., den Dunnen, W., Jiménez, A., Domínguez-Pinos, M., Pérez- Fígares, J., McAllister, J., Johanson, C. (2012). A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. Biol Res, 45, 231–241.

Salazar, K., Martínez, F., Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M. J., López-Gambero, A. J., Bonansco, C., Bongarzone, E. R., & Nualart, F. (2018). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. Mol. Neurobiol., 55(7), 5439–5452.

Sarnat, HB (1992). Role of human fetal ependyma. Pediatr Neurol, 8, 163-78.

Schiweck, J., Eickholt, B. J., & Murk, K. (2018). Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease. Front. Cell. Neurosci, 12.

Schober, J. M., Komarova, Y. A., Chaga, O. Y., Akhmanova, A., & Borisy, G. G. (2007). Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. J. Cell Sci, 120(Pt 7), 1235–1244.

Shannon, C. E., "A mathematical theory of communication," in The Bell System Technical Journal (1948), 27(3), 379-423.

Shikanai, M., Nakajima, K., & Kawauchi, T. (2011). N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. Commun. Integr. Biol., 4(3), 326–330.

Silva-Álvarez, C., Carrasco, M., Balmaceda-Aguilera, C., Pastor, P., García, M., Reinicke, K., Aguayo, L., Molina, B., Cifuentes, M., Medina, R., Nualart, F (2005). Ependymal cell differentiation and GLUT-1 expression is a synchronous process in the ventricular wall. Neurochem Res, 30, 1227-1236.

Sloboda R. D. (2009). Posttranslational protein modifications in cilia and flagella. Methods Cell Biol., 94, 347–363.

Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat Methods, 3:995–1000.

Sofroniew M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci., 32(12), 638–647.

Soumiya, H., Fukumitsu, H., & Furukawa, S. (2009). Stem cell factor induces heterotopic accumulation of cells (heterotopia) in the mouse cerebral cortex. Biomed. Res., 30(2), 121–128.

Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J. Neurosci, 25(1), 10–18.

Stebbens, SJ., Paterson., Ad., Crampton MS Shewan AM Ferguson C Akhmanova, A., Parton, RG., Yap AS (2006). Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. J Cell Sci, 119 (Pt9): 1801-11.

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel ASchleicher M, Shapiro SS (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2:138–145.

Strack, S., Kini, S., Ebner, F. F., Wadzinski, B. E., & Colbran, R. J. (1999). Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. J. Comp. Neurol., 413, 373–384.

Subramanian, L., Calcagnotto, M. E., & Paredes, M. F. (2020). Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. Front. Cell. Neurosci, 13, 576.

Tabata, H., & Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J. Neurosci, 23(31), 9996–10001.

Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 30, 465–502.

Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, F & Dominguez, R (2004). Structural basis of protein phosphatase1 regulation. Nature. 429, 780-784.

Terry-Lorenzo, RT., Carmody, LC., Voltz, JW. Connor, JH., Smith, FD., Milgram, SL., Colbran, SL., Shenolikar, S. (2002). The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. J. Biol. Chem., 277, 27716–24.

Thompson B. J. (2022). Par-3 family proteins in cell polarity & adhesion. FEBS J, 289(3), 596–613.

Toshiya, Kimura., Hiroko, S., Kawasaki, M., Takeichi, M (2021). CAMSAP3 is required for mTORC1-dependent ependymal cell growth and lateral ventricle shaping in mouse brains. Dev, 148 (3): dev195073.

Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. Cereb. Cortex, 13(6), 580–587.

Traweger, A., Wiggin, G., Taylor, L., Tate, S. A., Metalnikov, P., & Pawson, T. (2008). Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105(30), 10402–10407.

Trinkle-Mulcahy, L., Sleeman, J.E., and Lamond, A.I. 2001. Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. J. Cell Sci, 114: 4219–4228.

Tucker, K., Caspary, T. (2013). Cilia and Nervous System Development and Function. (K.L. Tucker & T. Caspary, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands 1- 277.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyrto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., ... Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science, 347(6220), 1260419.

Van De Leemput, J., Boles, N. C., Kiehl, T. R., Corneo, B., Lederman, P., Menon, V., ... & Fasano, C. A. (2014). CORTECON: a temporal transcriptome analysis of in vitro human cerebral cortex development from human embryonic stem cells. Neuron, 83(1), 51-68.

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., ... & Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. Nucleic Acids Res, 50(D1), D439-D444.

Veeraval, L., O'Leary, C. J., & Cooper, H. M. (2020). Adherens Junctions: Guardians of Cortical Development. Front. Cell Dev. Biol., 8, 6.

Verbinnen, I., Ferreira, M., & Bollen, M. (2017). Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. Biochem. Soc. Trans., 45, 89–99.

Vogelmann R. Nelson W.J (2005) Fractionation of the epithelial apical junctional complex: reassessment of protein distributions in different substructures. Mol. Biol. Cell, 16: 701-716.

Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2003). Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. J Biol Chem, 278, 18817–18823.

Wang, X., Fu, Y., Beatty, W.L., Ma, M., Brown, A., Sibley, L.D., Zhang, R. Cryo-EM structure of cortical microtubules from human parasite *Toxoplasma gondii* identifies their microtubule inner proteins. Nat. Commun, 2021; **12**: 3065.

Wirschell, M., Yamamoto, R., Alford, L., Gokhale, A., Gaillard, A., & Sale, W. S. (2011). Regulation of ciliary motility: conserved protein kinases and phosphatases are targeted and anchored in the ciliary axoneme. Arch. Biochem. Biophys., 510(2), 93-100.

Wu, C., Jin, X., Tsueng, G., Afrasiabi, C., & Su, A. I. (2016). BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. Nucleic Acids Res., 44(D1), D313-D316.

Yamashita, K., Mizuno, K., Furukawa, K., Hirose, H., Sakurai, N., Masuda-Hirata, M., Amano, Y., Hirose, T., Suzuki, A., & Ohno, S. (2020). Phosphorylation and dephosphorylation of Ser852 and Ser889 control the clustering, localization and function of PAR3. J. Cell Sci., 133(22), jcs244830.

Zhang, P., Wang, S., Wang, S., Qiao, J., Zhang, L., Zhang, Z., & Chen, Z. (2016). Dual function of partitioning-defective 3 in the regulation of YAP phosphorylation and activation. Cell discov, 2, 16021.

Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. Cell Rep, 1(3), 100014.



