



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

Área de Biología Celular

**ESTUDIO DEL PAPEL DE P73 EN LA CILIOGÉNESIS Y EL  
ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD CELULAR PLANAR EN  
CÉLULAS EPENDIMARIAS**

Tesis Doctoral

Sandra Fuertes Álvarez

León, Septiembre 2017



Las investigaciones correspondientes a esta Memoria de Tesis Doctoral han sido dirigidas por la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Marín Vieira (Departamento de Biología Molecular, Universidad de León) y la Dra. Margarita Marqués Martínez (Departamento de Producción Animal, Universidad de León).

El trabajo se ha realizado en las instalaciones del Instituto de Biomedicina y del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León.

La financiación ha estado a cargo de los proyectos nacionales SAF2012-36143 y SAF2015-71381-R subvencionados por el Ministerio de Economía y Competitividad y LE310U14 subvencionado por la Junta de Castilla y León.

La autora de esta Tesis Doctoral ha sido beneficiaria de una beca PIRTU (Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria) de la Junta de Castilla y León, RD 2720/1998, ORDEN EDU/346/2013.



# Índice



# Tabla de contenidos

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas .....	viii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>1. LA FAMILIA GÉNICA DE p53 .....</b>	<b>4</b>
1.1 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA P53 .....	4
1.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA FAMILIA P53 .....	9
1.2.1 Papel de p73 en ciclo celular y apoptosis.....	11
1.2.2 Papel de p73 en fertilidad y reproducción .....	11
1.2.3 Papel de p73 en vasculogénesis y angiogénesis tumoral .....	14
1.2.4 Papel de p73 en cáncer .....	16
1.2.5 Papel de p73 en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, neurogénesis y neurodegeneración.....	17
<b>2. NICHOS NEUROGÉNICOS EN LA REGIÓN SUBVENTRICULAR (SVZ) .....</b>	<b>22</b>
2.1 NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA Y ZONAS GERMINATIVAS EN CEREBRO .....	22
2.2 DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE LA REGIÓN SUBVENTRICULAR .....	23
2.3 GENERACIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS .....	25
2.3.1 Descripción y función de las células endimarias.....	25
2.3.2 Generación de las células endimarias.....	26
2.3.2.1 Transformación de células de glia radial en células endimarias .....	26
2.3.2.2 Multiciliogénesis en células endimarias.....	28
A) Formación y anclaje de los cuerpos basales a la membrana apical .....	28
B) Formación de múltiples cilios móviles.....	31
C) Establecimiento de la polaridad en células endimarias .....	32
2.4 MECANISMOS MODULADORES DE LA RETERMINACIÓN DE LAS RGCs .....	33
2.5 PAPEL DE P73 EN EL DESARROLLO DE LA REGIÓN SVZ.....	35
<b>3. POLARIDAD CELULAR PLANAR .....</b>	<b>36</b>
3.1 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA POLARIDAD CELULAR PLANAR.....	37
3.1.1 Módulo global: Regulación mediante morfógenos.....	38

3.1.2 Módulo de propagación de la asimetría .....	39
3.1.2.1 Módulo Fat/Dachous/FourJointed .....	39
3.1.2.2 Módulo <i>core-PCP</i> .....	41
A) Frizzled .....	43
B) Celsr.....	44
C) Vangl.....	44
D) Prickle.....	45
E) Dishevelled.....	45
3.1.3 Módulo efectores.....	48
3.1.3.1 Módulo efector de la vía Wnt/PCP .....	48
3.1.3.2 Módulo efector de la vía Ft/Ds/Fj.....	49
3.1.3.3 Implicación del citoesqueleto celular en polaridad planar.....	49
A) Citoesqueleto de actina .....	50
B) Citoesqueleto de microtúbulos .....	50
3.2 POLARIDAD CELULAR PLANAR EN CÉLULAS EPENDIMARIAS .....	51
3.2.1 Polaridad translacional y su regulación .....	51
A) Reguladores de la tPCP: Miosina No Muscular II (NMII) .....	52
B) Reguladores de la tPCP: Kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) .....	55
3.2.2 Polaridad rotacional y su regulación.....	57
A) Reguladores de la rPCP: <i>core-PCP</i> .....	58
3.2.3 Citoesqueletos en células ependimarias .....	58
<b>OBJETIVOS</b> .....	62
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>1. CAPÍTULO I. p73 IS REQUIRED FOR EPENDYMAL CELL MATURATION AND NEUROGENIC SVZ CYTOARCHITECTURE</b> .....	68
1.1 ABSTRACT .....	69
1.2. INTRODUCTION .....	69
1.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	71
1.3.1 Lack of p73 impairs ciliogenesis .....	71
1.3.2. Lack of p73 impairs Planar Cell Polarity establishment .....	75
1.4 MATERIAL & METHODS.....	79



1.4.1 Mouse Husbandry, Genotyping and BrdU Treatment.....	79
1.4.2 Immunohistochemistry.....	80
1.4.3 Isolation and Immunostaining of SVZ Wholemounts .....	80
1.4.4 Scanning Electron Microscopy (SEM) .....	81
1.4.5 Image Data Quantification and Statistical Analyses .....	81

## **2. CAPÍTULO II. p73 IS ESSENTIAL FOR TRANSLATIONAL PLANAR CELL POLARITY AND NON-MUSCLE MYOSIN II ACTIVATION AND LOCALIZATION IN EPENDYMAL CELLS.....**

2.1 ABSTRACT.....	85
2.2 INTRODUCTION .....	85
2.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	87
2.3.1 p73 regulates NMII activation inducing the expression of MLCK, correlating p73 expression with NMII activation <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> .....	87
2.3.2 p73 regulates tPCP through the activation of NMII and is required for pMLC distribution and association with basal bodies .....	91
2.3.3. p73 is required for actin cytoskeleton assembly and correct BB docking in ECs..	94
2.3.4. Specific TAp73 knockout results in a milder ciliary phenotype than the total p73KO with altered tPCP, lower levels of p-MLC and impaired docking.....	98
2.4 MATERIAL & METHODS.....	100
2.4.1 Mouse Husbandry and Genotyping .....	100
2.4.2 Cell culture.....	100
2.4.3 RNA isolation and qRt-PCR analysis .....	101
2.4.4 Western Blot analysis .....	102
2.4.5 Luciferase assay .....	102
2.4.6 ChIP (Chromatine Immunoprecipitation).....	102
2.4.7 Sequence analysis.....	103
2.4.8 Immunochemistry.....	103
2.4.9 Isolation and immunostaining of the lateral wall of the ventricles.....	104
2.4.10 Image Data Quantification and Statistical Analyses .....	105

## **3. CAPÍTULO III. p73 IS REQUIRED FOR ASYMMETRIC LOCALIZATION OF PCP CORE PROTEIN VANGL2 THROUGH THE ESTABLISHMENT OF MICROTUBULES POLARIZED IN EPENDYMAL CELLS .....**

3.1 ABSTRACT.....	107
-------------------	-----

3.2 INTRODUCTION .....	107
3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	109
3.3.1 p73 is necessary for PCP establishment and the asymmetric localization of pcp core- proteins in ependymal cells.....	109
3.3.2 Lack of p73 results in defects in the cellular and tissular organization of the microtubule cytoskeleton.....	112
3.3.3 p73 requirement for Vangl2 membrane is a general process .....	114
3.3.4 Overexpression of TAp73 can modulate MT dynamics, increases EB3 expression and reorganize Vangl2 localization .....	116
3.4 MATERIAL & METHODS.....	118
3.4.1 Mouse Husbandry and genotyping.....	118
3.4.2 Cell culture.....	118
3.4.3 RNA isolation and qRt-PCR analysis .....	119
3.4.4 Isolation and immunostaining of wholemounts of the LW of the ventricles.....	119
3.4.5 Sequence analysis and and statistical analyses .....	121
<b>CONCLUSIONES</b> .....	122
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	130

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Evolución funcional de la familia de p53 .....	5
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la estructura génica y proteica de la familia p53.....	6
<b>Figura 3.</b> Dimerización y tetramerización de p73 en un sitio completo RE .....	8
<b>Figura 4.</b> Funciones celulares de la familia de p53 y sus genes diana .....	10
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de inducción apoptótica de p73.....	12
<b>Figura 6.</b> La ausencia de TAp73 disminuye la calidad de los blastocistos.....	13
<b>Figura 7.</b> La falta de p73 altera la formación de estructuras vasculares en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	16
<b>Figura 8.</b> p73 regula la auto-renovación y la diferenciación de las NSC, al menos en parte mediante la regulación de TRIM32 .....	20
<b>Figura 9.</b> Relación de linajes celulares en la neurogénesis.....	23
<b>Figura 10.</b> Transformación de las células RG durante el desarrollo embrionario y postnatal.....	25
<b>Figura 11.</b> Arquitectura del nicho neurogénico de la región SVZ.....	26
<b>Figura 12.</b> Esquema de la transición de las RGCs a las ECs.....	28
<b>Figura 13.</b> Proceso de formación, acoplamiento y orientación de los cuerpos basales .....	29
<b>Figura 14.</b> Comparación estructural entre centriolo y cuerpo basal .....	29
<b>Figura 15.</b> Modelo de formación de cuerpos basales en células multiciliadas .....	30
<b>Figura 16.</b> Dishevelled controla el docking de los cuerpos basales en la membrana apical .....	31
<b>Figura 17.</b> Estructura longitudinal y transversal de un cilio móvil.....	32
<b>Figura 18.</b> Detalle representativo de tPCP Y rPCP en células ependimarias .....	34
<b>Figura 19.</b> Mecanismos reguladores de la determinación de las RGCs a células ependimarias.....	35
<b>Figura 20.</b> La falta de p73 da lugar a la pérdida de la integridad de la pared lateral del ventrículo.....	36

<b>Figura 21.</b> La falta de p73 impide el correcto establecimiento de la citoarquitectura de la pared lateral y la organización de las células endimarias en <i>pinwheels</i> .....	37
<b>Figura 22.</b> Vías de señalización de Wnt .....	40
<b>Figura 23.</b> Esquema de la localización de los componentes de la vía Ft/Ds/Fj.....	41
<b>Figura 24.</b> Modelo de interacción entre Fat y Dachous .....	42
<b>Figura 25.</b> Modelo de cambio de polaridad en ausencia de la vía <i>core-PCP</i> .....	43
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática de la proteína Frizzled.....	44
<b>Figura 27.</b> Representación esquemática de la proteína Celsr .....	45
<b>Figura 28.</b> Representación esquemática de la proteína Vangl .....	45
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática de la proteína Prickle.....	46
<b>Figura 30.</b> Representación esquemática de la proteína Dishevelled.....	46
<b>Figura 31.</b> Esquema de la organización de las proteínas <i>core-PCP</i> .....	47
<b>Figura 32.</b> Vía <i>core-PCP</i> de señalización .....	48
<b>Figura 33.</b> Representación esquemática de la vía Wnt/PCP .....	49
<b>Figura 34.</b> Esquema representativo de la vía de señalización Fat/Warts.....	50
<b>Figura 35.</b> Adquisición de tPCP de las células endimarias .....	53
<b>Figura 36.</b> Estructura proteica de NMII .....	54
<b>Figura 37.</b> Distribución de NMII en las células endimarias .....	55
<b>Figura 38.</b> Representación esquemática de estructura génica y proteica de MLCK.....	56
<b>Figura 39.</b> Esquema de unión de MLCK-210 a filamentos de actina y microtúbulos.....	57
<b>Figura 40.</b> Las proteínas <i>core-PCP</i> durante el desarrollo de las células endimarias a partir de las RGCs .....	58
<b>Figura 41.</b> Red de citoesqueletos en células endimarias adultas .....	60
<b>Figure 42.</b> p73 deficiency affects ependymal cell cilia formation .....	72
<b>Figure 43.</b> Lack of p73 alters motile cilia generation and planar cell polarity establishment during the transformation of moniciliated RG into ependymal cells.....	73
<b>Figure 44.</b> p73 deficiency mice had less organized network of supra-ependymal axons .....	75
<b>Figure 45.</b> Lack of p73 impairs translational planar cell polarity in ependymal cells.....	77
<b>Figure 46.</b> p73 binds directly to human MLCK regulatory elements.....	88
<b>Figure 47.</b> p73 binds directly to mouse MLCK regulatory elements .....	89

<b>Figure 48.</b> In silico analysis of p73RE in Myh9 promoter .....	89
<b>Figure 49.</b> p73 expression correlates with MLCK mRNA expression .....	90
<b>Figure 50.</b> p73 expression correlates with NMII activation in vitro.....	90
<b>Figure 51.</b> p73 expression correlates with NMII activation in vitro.....	91
<b>Figure 52.</b> Representative scheme and quantification of P1 BB displacement from cell centre .....	92
<b>Figure 53.</b> Activated NMII decreases in RGCs in the absence of p73 .....	92
<b>Figure 54.</b> Activated NMII decrease in ECs in the absence of p73 and lose its localization .....	94
<b>Figure 55.</b> Lack of p73 results in a lost of apical actin network organization.....	95
<b>Figure 56.</b> Lack of p73 results in defective BB docking .....	96
<b>Figure 57.</b> BB docking defects in p73 deficient cells correlates with mislocalization of Dvl .....	96
<b>Figure 58.</b> Lack of p73 results in mislocalization of Rac-1.....	97
<b>Figure 59.</b> Lack of TAp73 affects NMII activation, actin network organization, docking, tPCP and ciliogenesis .....	98
<b>Figure 60.</b> Lack of p73 results in a lost of BB and cilia organization .....	110
<b>Figure 61.</b> P73 is necessary for asymmetric localization of PCP core proteins .....	111
<b>Figure 62.</b> Lack of p73 affects Sec24b localization, but not its expression .....	112
<b>Figure 63.</b> p73 deficiency results in a lost of MT cytoskeleton organization in vivo. ....	114
<b>Figure 64.</b> p73 deficiency results in lost of PCP-core proteins membrane localization in vitro.....	115
<b>Figure 65.</b> Lack of TAp73 results in lost of MT and Vangl2 organization in vitro. ....	117

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Defectos neuronales en ratones carentes de p73.....	22
<b>Table 2.</b> Primary Antibodies Used for Immunohistochemistry (chapter I) .....	81
<b>Table 3.</b> Culture media (chapter II).....	101
<b>Table 4.</b> qRT-PCR primers (chapter II).....	101
<b>Table 5.</b> Primary and secondary antibodies and phalloidin staining used for immunostaining (chapter II) .....	105
<b>Table 6.</b> Culture media (chapter III).....	119
<b>Table 7.</b> qRT-PCR primers (chapter III).....	119
<b>Table 8.</b> Primary and secondary antibodies used for immunostaining (chapter III).....	120

# **INTRODUCCIÓN**

---





En los animales vertebrados, desde el momento inicial del desarrollo hasta el estadio adulto, la polaridad planar que se establece en los tejidos controla, de manera fundamental, multitud de aspectos (Butler and Wallingford 2017). Esta polaridad, ejercida en un plano perpendicular a la conocida polaridad apico-basal, dirige la organización de estructuras celulares, como por ejemplo la localización de cilios y los procesos de migración (Goodrich and Strutt 2011).

La migración celular se da en diferentes momentos del desarrollo, como por ejemplo en el proceso de extensión convergente durante el cierre del tubo neural en el desarrollo embrionario (Nikolopoulou et al. 2017). Pero también está implicado en los procesos de progresión tumoral (Krakhmal et al. 2015). Por otro lado, el establecimiento de la polaridad es esencial en el funcionamiento de las células ciliadas. Los cilios llevan a cabo importantes funciones en la biología de vertebrados y anomalías en sus características funcionales dan lugar a patologías muy severas. La presencia de un cilio primario o de un grupo de cilios móviles en las células va a gobernar procesos durante el desarrollo de tejidos y sus características funcionales. La alteración en la polaridad de los mismos va a dar lugar a ciliopatías muy diversas, desde el fallo en el establecimiento de la simetría corporal, hasta fallos en funcionalidad del sistema respiratorio, reproductivo y nervioso. Por ello, el conocimiento de los mecanismos que regulan la polaridad se torna imprescindible.

La hidrocefalia se encuentra entre uno de los trastornos más severos ocasionados por la disfunción ciliar en el Sistema Nervioso Central. La hidrocefalia se caracteriza por la acumulación del líquido cefalorraquídeo en las cavidades del cerebro. Una de las causas de este trastorno es el funcionamiento anómalo de los cilios presentes en las células que tapizan los conductos cerebrales, las células ependimarias. Cada una de estas células presenta en su estado desarrollado un grupo de entre 30 y 70 cilios. El movimiento de los mismos permite el flujo constante del líquido cefalorraquídeo a su paso por el cerebro. La disfunción de estos cilios conlleva la pérdida de dicho movimiento y la acumulación del líquido en las cavidades cerebrales. El mantenimiento de la precisa organización que presentan los cilios de las células ependimarias, tanto intracelularmente como intercelularmente, es una característica esencial para que su función se desarrolle adecuadamente. Por tanto, el conocimiento de las vías de regulación implicadas en este proceso se considera de una tremenda importancia.

El gen *TP73*, perteneciente a la familia de factores de transcripción p53, es uno de los reguladores más importantes en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (Yang et al. 2000).

Entre otros aspectos, p73 está implicado en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y multipotencia de las células troncales neurales (Agostini et al. 2010, Fujitani et al. 2010, Gonzalez-Cano et al. 2010, Talos et al. 2010). Sin embargo, su función en el control del establecimiento de los sistemas que regulan la polaridad en general y del desarrollo funcional de las células ependimarias en particular es muy limitado actualmente. Durante el periodo de desarrollo de esta tesis doctoral hemos analizado el efecto de la falta de p73 en la ciliogénesis y en el establecimiento de las vías que regulan la polaridad implicada en la organización de los cilios de estas células, no solo demostrando un importante y novedoso papel de p73 en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, si no también abriendo la puerta al estudio del papel que p73 presenta en el establecimiento de la polaridad celular en general, tan implicado en la migración celular, el desarrollo tumoral y en la irrigación del mismo.

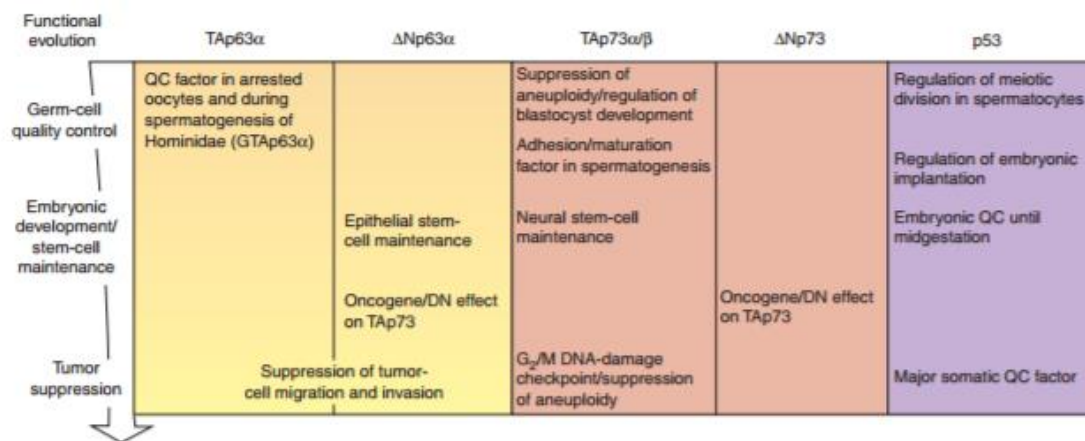
## 1. LA FAMILIA GÉNICA DE p53

### 1.1 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA P53

La familia de p53, constituida por los factores de transcripción p53, p63 y p73, está implicada en la regulación de múltiples funciones celulares como la proliferación celular, senescencia y apoptosis (Pflaum, Schlosser and Muller 2014). Por tanto, la alteración en estos genes, o en las proteínas que codifican, puede tener importantes consecuencias tanto durante el desarrollo embrionario, como en el desarrollo de diversas patologías como cáncer o las enfermedades neurodegenerativas.

Los genes que codifican las proteínas p53, p63 y p73 derivan de un gen ancestral común (Belyi et al. 2010) que se ha identificado en casi todos los animales invertebrados. Aunque el mayor énfasis de estudio se realizó inicialmente en la estructura y función de p53 debido a su relevancia en cáncer, p63 y p73 son evolutivamente más antiguos de p53 (Dotsch et al. 2010). Además, se han descrito homólogos de la familia de p53, proteínas *p53-like*, que se encuentran en multitud de organismos muy diferentes entre ellos, como moluscos, anémonas, almejas, *C. elegans*, *Drosophila* o ranas (Nedelcu and Tan 2007). Estas proteínas *p53-like* son más similares a p63/p73 que a p53 (Belyi et al. 2010, Rutkowski, Hofmann and Gartner 2010). Por lo tanto, se ha determinado que p63/p73 sería evolutivamente más antigua, y que p53 ha evolucionado a partir de ella (Nedelcu and Tan 2007).

Además, estudios recientes han demostrado la implicación de p73 y p63 en el mantenimiento de la línea germinal (Tomasini et al. 2008, Hu et al. 2007, Suh et al. 2006, Gonfloni et al. 2009), sugiriendo que el ancestro original de esta familia en mamíferos sería un factor relacionado con el correcto mantenimiento de esta línea (Figura 1). De hecho, las proteínas *p53-like* han sido identificadas en organismos de ciclo de vida corto donde no existe la amenaza de desarrollar cáncer, y que por tanto no necesitan un supresor tumoral como tal (Brodsky et al. 2000, Ollmann et al. 2000, Derry, Putzke and Rothman 2001, Nedelcu and Tan 2007, Joerger, Wilcken and Andreeva 2014). Todo ello sugiere que las funciones iniciales de estas proteínas era la protección de la integridad genómica de las células germinales, para asegurar una reproducción sin fallos. Un ejemplo de esta función es el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, donde la proteína Cep-1 (proteína *p53-like*) se expresa en las células germinales, en las que funciona como inductor de apoptosis durante la división meiótica en caso de daño en el DNA (Greiss et al. 2008a, Greiss et al. 2008b).



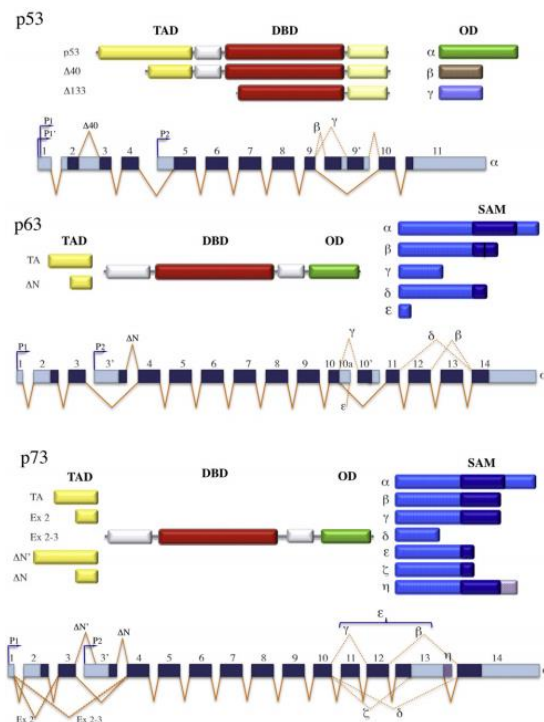
**Figura 1. Evolución funcional de la familia de p53.** Todos los miembros de la familia de p53 han adquirido distintos papeles regulatorios durante su evolución, desde el control de la calidad de la línea germinal y el desarrollo embrionario, hasta el mantenimiento de las células troncales y la supresión tumoral (Chillemi et al. 2017).

Sin embargo, la mayoría de los animales vertebrados poseen tres genes independientes (Belyi et al. 2010): p53 está implicado en la supresión tumoral y la estabilidad del DNA, p63 está relacionada con la regulación del desarrollo de epitelios y p73 es un importante regulador del desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, p63 y p73 pueden actuar, junto con p53 o de manera independiente a él, en procesos de supresión tumoral (Belyi et al. 2010, Blandino and Dobbstein 2004).

Cada uno de los miembros de esta familia presenta varias isoformas debido a la existencia de diferentes promotores y a procesamientos alternativos durante la maduración del RNA, tanto en la región N-terminal, como en la C-terminal. En concreto, el gen *TP73* presenta dos

promotores, P1 y P2, que van a dar lugar a la expresión de isoformas TAp73 y DNp73, respectivamente. El promotor P1 está localizado en posición 5' respecto al exón 1 y da lugar a los transcritos que codifican las proteínas que contienen el dominio de transactivación TA (isoformas TAp73). El promotor P2, localizado en el intrón 3, da lugar a las proteínas truncadas en el extremo N-terminal (isoformas DNp73), que no poseen el dominio de transactivación (Jacobs, Walsh and Miller 2004, Yang and McKeon 2000).

En total, teóricamente el gen p73, con las posibles combinaciones para ambos extremos, puede dar lugar al menos a 35 transcritos, que codifican para 29 proteínas diferentes, de las cuales hasta el momento sólo se han identificado 14 (Candi et al. 2014) (Figura 2). En general se han descrito ocho isoformas diferentes denominadas para TAp73:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  y  $\phi$  ( $\phi$  o  $\eta'$ ) (De Laurenzi et al. 1998, De Laurenzi et al. 1999, Zaika et al. 1999, Ishimoto et al. 2002) y cuatro variantes de la región N-terminal;  $\Delta$ Np73, generada a partir del promotor P2;  $\Delta$ Np73', variante generada a partir de un sitio de iniciación de traducción alternativo; y las isoformas  $\Delta$ Ex2, carentes del exón 2 y  $\Delta$ Ex2/3, carentes de los exones 2 y 3 (Stiewe and Putzer 2002, Stiewe et al. 2004, Dominguez et al. 2006, Fillippovich et al. 2001, Ishimoto et al. 2002, Zaika et al. 1999).



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura génica y proteica de la familia p53.** Figura representativa de los dominios estructurales de los miembros de la familia de p53. Muestra la localización de los diferentes promotores, los sitios de maduración alternativa y las posibles isoformas que se producen (Allocati, Di Ilio and De Laurenzi 2012).

El gen *TP73* da lugar a una proteína modular que consta de tres dominios estructurales principales (Figura 2). El dominio N-terminal de transactivación (TAD), presente en las isoformas

TA. Esta es la región menos conservada entre especies y la que presenta menor homología entre los miembros de la familia, con un 30% entre p73 y p53. El segundo es el dominio de unión a DNA (DBD), el más conservado entre especies y entre los componentes de la familia, con un 63% entre p73 y p53. Finalmente, el dominio de oligomerización (OD), presenta una homología del 38% entre p73 y p53 (Moll and Slade 2004, Dotsch et al. 2010). Todos los miembros de esta familia poseen una señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES), muy conservados en todos ellos que permiten el transporte núcleo-citoplasma (Harms and Chen 2006, Liang and Clarke 1999a, Liang and Clarke 1999b, Inoue et al. 2002).

Una característica importante de esta familia de factores de transcripción es la necesidad de formación de tetrámeros. Esto es posible mediante una dimerización proteica inicial entorno al DNA a través del dominio de unión al DNA (DBD) y una posterior unión de dos dímeros mediante sus dominios de oligomerización (OD), formando un tetrámero (Figura 3).

El dominio **TAD** es necesario para la activación o repression transcripcional de los genes diana, mediante su interacción con la maquinaria transcripcional RNA polimerasa II y reguladores de la transcripción (Collavin, Lunardi and Del Sal 2010). Este dominio en p73 consta de dos subdominios denominados TAD1 y TAD2 (Yoon et al. 2015). Las isoformas DN contienen una secuencia de 13 aminoácidos, rica en prolina, que actúa como sitio de activación TAD2 (Liu et al. 2004).

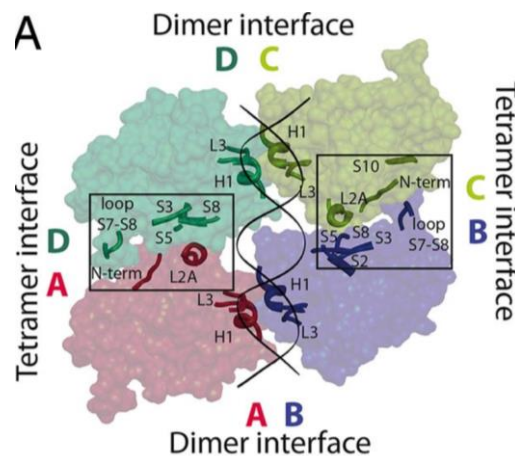
El dominio **DBD** es el encargado del reconocimiento de los sitios de unión al DNA, permitiendo la regulación de la transcripción de los genes diana de manera específica (Brandt et al. 2009). Este dominio en p73 está compuesto por "hojas"  $\beta$  antiparalelas y bucles proteicos donde se encuentran los aminoácidos clave tanto para la dimerización proteica como para la unión a DNA (Ethayathulla et al. 2012, Yoon et al. 2015, Canning, von Delft and Bullock 2012, Cho et al. 1994). Estos residuos clave se encuentran muy conservados entre los miembros de la familia p53, ya que las mutaciones de cambio de sentido que afectan a estos aminoácidos impiden la unión al DNA. Así, el DBD de cada uno de los monómeros, va a reconocer 5 bp del total de 20 bp que presenta la secuencia de unión a DNA para p73. Además, la dimerización inicial de dos moléculas iguales ocurre entorno al DNA a través de este dominio. En p73 la hélice H2 y los lazos que le preceden son los que presentan la mayoría de los residuos de unión a DNA (Arg-293, Ala-296, Cys-297, and Arg-300) (Ethayathulla, Nguyen and Viadiu 2013).

Las secuencias reguladoras a las cuales se unen los miembros de la familia pueden encontrarse en zonas promotoras o intrónicas. Todos ellos son capaces de unirse a secuencias consenso, denominadas "elementos de respuesta a p53" (p53RE), que contienen dos copias de la

secuencia palindrómica decamérica 5'-RRRCWWGYYY-3' separados por un espacio de hasta 13 pb (R es purina, W es Adenina o Timina e Y es pirimidina) (el-Deiry et al. 1992, Flores et al. 2002).

Sin embargo, a pesar de ser capaces de unirse a estos elementos de respuesta, p73 y p63, muestran patrones de expresión génica diferentes (Candi et al. 2014). En concreto, p73 reconoce los p73RE 5'-GAACATGTTCTGAACATGTTTC-3' y 5'-GAACCGGTTCTGAACCGGTTTC-3' (Ethayathulla et al. 2012, Ethayathulla et al. 2013). Se ha propuesto que la especificidad de secuencia se debe, al menos en parte, al número de pares de bases que separen los dos palíndromos del RE, de manera que la actividad transcripcional de p73 disminuye drásticamente cuando la distancia es superior a 2 pb, mientras que p53 tolera distancias mayores (Ethayathulla et al. 2012).

El dominio **OD** (Joerger et al. 2009) es el dominio a través del cual dos dímeros proteicos van a interactuar para formar un tetrámero. La formación de tetrámeros es necesaria para muchas funciones conocidas de esta familia. p73 forma homotetrámeros para la transcripción de sus genes diana (Ethayathulla et al. 2012, Ethayathulla et al. 2013).



**Figura 3. Dimerización y tetramerización de p73 en un sitio completo RE.** Modelo de la interacción proteica para la formación de un tetrámero de p73, que muestra las dos zonas de dimerización (AB y DC) y las dos zonas de tetramerización (AD y CB) (Ethayathulla et al., 2013).

Además, las proteínas p63 y p73 son capaces de interactuar entre sí a través de su dominio OD para formar hetero-tetrámeros (Davison et al. 1999, Coutandin et al. 2009). A pesar de la interacción de DNp73 con p53 para actuar como dominante negativo, p53 no es capaz de oligomerizar a través de este dominio con sus homólogos. Sin embargo, se ha descrito que las formas mutantes de p53 que presentan mutaciones de cambio de sentido en su dominio DBD (Freed-Pastor and Prives 2012), son capaces de unirse a p73 e inactivarlos mediante interacción con dicho dominio (Marin et al. 2000, Gaiddon et al. 2001, Bensaad et al. 2003).

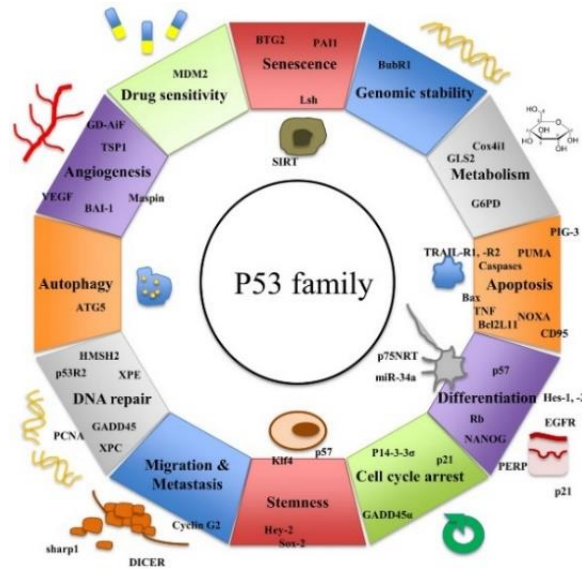
p73 y p63 albergan otros dominios en su extremo C-terminal, como el dominio **SAM**, implicado en interacciones proteína-proteína (Chi, Ayed and Arrowsmith 1999, Thanos and Bowie 1999) y posee además un dominio de inhibición de transcripción **TID** que disminuye la capacidad de activación transcripcional (Ozaki et al. 1999).

Esta complejidad estructural, y la capacidad de las distintas isoformas de los miembros de esta familia de interactuar entre ellas y modificar sus respectivas capacidades transcripcionales, hace que el estudio de las funciones biológicas de esta familia se muy compleja.

## 1.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA FAMILIA P53

El gen TP53, descrito en 1979 (Lane and Crawford 1979, Linzer and Levine 1979), fue inicialmente considerado un oncogen, hasta que en 1989 se descubrió que la forma *wild-type* de la proteína p53 actuaba realmente como un supresor tumoral (Baker et al. 1989, Finlay, Hinds and Levine 1989). En respuesta a daño genotóxico, p53 regula procesos tan importantes como la reparación del DNA, la parada del ciclo celular, la inducción de senescencia o la apoptosis, entre otros (Biegging, Mello and Attardi 2014, Spike and Wahl 2011, Riley et al. 2008, Vousden and Ryan 2009, Jiang et al. 2015). Por todo ello, se conoce como "el guardian del genoma" (Lane 1992). TP53 es el gen más frecuentemente mutado en tumores humanos, estimándose que más de un 50% de los tumores muestran una pérdida de función de p53 (Olivier, Hollstein and Hainaut 2010).

La familia de p53 se completa con la identificación de p73 (Kaghad et al. 1997, Jost, Marin and Kaelin 1997) y, posteriormente p63 (Osada et al. 1998, Yang and McKeon 2000). Tanto p63 como p73 pueden activar la transcripción de genes diana de p53 implicados en parada de ciclo celular y apoptosis, pero también son capaces de activar vías de señalización distintas a éstas independientemente de p53. En general, la familia de p53 está implicada en la regulación de múltiples procesos biológicos (Figura 4), siendo determinante el balance de cada uno de los miembros y de sus isoformas.



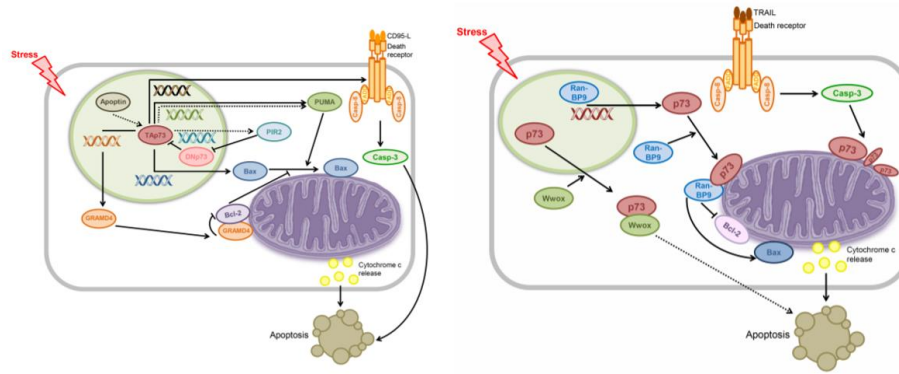
**Figura 4. Funciones celulares de la familia de p53 y sus genes diana.** Esquema de diferentes funciones celulares en las cuales está implicada la familia p53 (Pflaum et al. 2014).

Las isoformas completas TAp73 (TAp73 $\alpha$  y TAp73 $\beta$ ) transactivan los genes diana de p53, mientras que las formas truncadas DNp73 actúan como dominantes negativos de p53 y TAp73, inhibiendo su función y promoviendo la supervivencia celular (Zaika et al. 2002, Murray-Zmijewski, Lane and Bourdon 2006). Dicha inhibición puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: DNp73 puede secuestrar estas proteínas mediante la formación de heterotetrámeros transcripcionalmente inactivos (Zaika et al. 2002, Nakagawa et al. 2002, Zoric, Horvat and Slade 2013) o bien puede formar homotetrámeros que compitan por los sitios de unión a DNA con p53 o TAp73 (Kartasheva et al. 2002). La expresión de DNp73 es inducida tanto por p53 como por TAp73 mediante su unión directa a P2, generando un bucle de retroalimentación negativa (Kartasheva et al. 2002, Grob et al. 2001, Vossio et al. 2002, Zaika et al. 2002). Sin embargo, también se ha descrito que DNp73 puede estimular la actividad transcripcional de p53/TAp73 dependiendo del gen diana y del contexto celular concreto, sugiriendo que dichas isoformas no sólo actúan como inhibidores de su función (Goldschneider et al. 2005, Marques-Garcia et al. 2009). Por otro lado, las isoformas DNp73 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) puede transactivar genes dianas específicos (Kartasheva et al. 2003, Liu et al. 2004, Tanaka et al. 2006), ejerciendo funciones propias. Así, la regulación de la expresión de unos miembros sobre otros, la cooperación para la expresión de genes dianas y la existencia de funciones tanto comunes como específicas, muestra el alto nivel de interconexión funcional que existe dentro de esta familia y la relevancia del contexto celular en la función de los miembros de la misma.



### **1.2.1 Función de p73 en ciclo celular y apoptosis**

Uno de los papeles más estudiados de p73 es su implicación en la regulación del ciclo celular y apoptosis, función que comparte con p53 (Jost et al. 1997). Durante la regulación del ciclo celular, y mientras no se detecten señales de estrés, tanto los niveles de p53 como de p73 se encuentran regulados por E3 ubiquitin ligasas: MDM2 en el caso de p53 (Hernandez-Monge et al. 2016, Huang et al. 2011) y la ligasa ITCH en el caso p73 (Rossi et al. 2005). Además, p73 también puede ser degradado en el proteasoma de manera independiente a ubiquitinación (Asher et al. 2005) o degradado por calpainas (Munarriz et al. 2005). En respuesta a estrés genotóxico, TAp73 se va a acumular rápidamente tras sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo fosforilación mediate c-Abl y acetilación mediate p300 (Costanzo et al. 2002, Mantovani et al. 2004), y además, se va a producir una disminución de la proteína ITCH (Rossi et al. 2005). En respuesta a estrés genotóxico también se induce la expresión de PIR2, una E3 ubiquitin ligasa que en presencia de altos niveles de TAp73 va a degradar preferencialmente DNp73 (Sayan et al. 2010) lo que aumentará el ratio TA/DN favoreciendo la función de TAp73. Así TAp73 se unirá al DNA tras para transcribir genes diana, entre los que se encuentran genes diana comunes con p53, como p21, la ciclina B2 o las proteínas CDC25B y CDC25C (Scian et al. 2008), pero también específicos como el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, p57/Kip2 (Balint et al. 2002) o la ciclina B1 (Innocente and Lee 2005). El daño del DNA puede llegar a estimular la entrada en apoptosis. TAp73 puede inducir la muerte celular mediante la inducción de estrés en el retículo endoplasmático (Terrinoni et al., 2004) y mediante la expresión de genes proapoptóticos como PUMA y Bax (Melino, De Laurenzi and Vousden 2002). La expresión de PUMA se induce directamente por p73 en respuesta a daño en el DNA, lo que da lugar a la translocación de Bax a la mitocondria, desencadenando la liberación del citocromo c. Durante los procesos de apoptosis, p73 induce también la expresión de la proteína GRAMD4, que ayuda a la translocación mitocondrial y oligomerización de Bax (John et al. 2011). Además de estas proteínas, p53 y p73 incluyen entre sus dianas transcripcionales microRNAs de supresión tumoral como let-7, miR-34, miR-15/16a, miR-145, miR-29, miR-26, miR-30, and miR-146a que están implicadas en facilitar la parada del ciclo celular y la entrada en apoptosis (Boominathan 2010). Se ha descrito que p73 también puede activar la apoptosis de manera exonuclear, localizándose en el citoplasma y en el entorno mitocondrial durante la apoptosis e interactuando con proteínas como la proteína de supresión tumoral Wwox (Aqeilan et al. 2004) o la proteína de andamiaje RanBP9 (Figura 5) (Liu et al. 2013).



**Figura 5. Mecanismos de inducción apoptótica de p73.** Esquema de los mecanismos de inducción de apoptosis dependientes (a) e independientes (b) de transcripción de genes diana de p73 (Yoon et al. 2015).

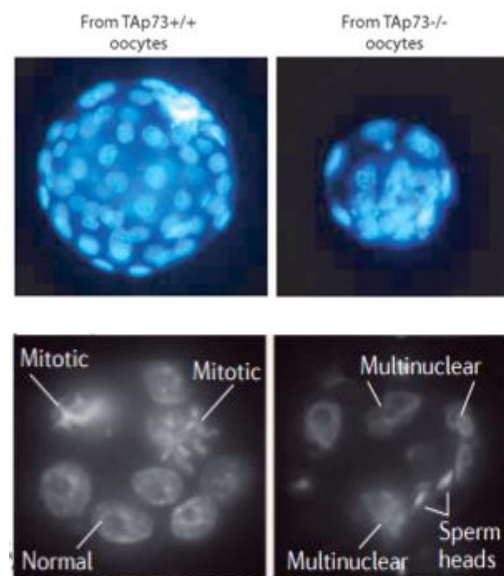
### 1.2.2 Función de p73 en fertilidad y reproducción

La familia de p53 también ha sido relacionada en el mantenimiento de las líneas germinales. En animales invertebrados, el ancestro común de esta familia se encuentra de manera predominante en la línea germinal, donde protege al DNA de daño y señales de estrés (Belyi et al. 2010), evitando errores en dicha línea germinal que puedan pasar a los embriones. El estudio de los ratones carentes de las proteínas de esta familia indica que p73 está implicado en garantizar que el blastocisto temprano tenga una entrada en división mitótica normal (Tomasini et al. 2008), mientras que p53 regula la implantación del cigoto mediante la regulación de LIF (factor inhibidor de leucemia, *leukaemia inhibitory factor*) (Hu et al. 2007) y p63 está implicado en controlar la calidad y la supervivencia de los oocitos (Suh et al. 2006, Gonfloni et al. 2009).

En el caso de la fertilidad en hembras, se ha descrito que p53 ejerce un importante papel. Los ratones hembras carentes de p53, a pesar de presentar una ovulación y fertilización adecuada, la implantación de los huevos fertilizados en el útero no se realiza correctamente (Hu et al. 2007, Hu et al. 2008). Esto es debido a que p53 regula la transcripción del gen *Lif*, factor que secretan las células glandulares del útero y que es necesario para la implantación del cigoto en el útero cuatro días después de tras la fertilización en el caso del ratón. En ausencia de p53, los niveles de LIF son muy reducidos, dando como resultado una implantación defectuosa.

En el caso de p73, los ratones *Trp73<sup>-/-</sup>*, tanto hembras como machos, muestran defectos en vías hormonales y sensoriales que contribuyen a que el ratón tenga un fenotipo de conducta que imposibilita el apareamiento (Yang et al. 2000). Los ratones hembra carentes de TAp73 específicamente (TAp73KO) presentan un ciclo menstrual normal, pero aún así son estériles (Tomasini et al. 2008). Esto se debe a la baja calidad de los oocitos TAp73KO, que presentan multitud de anomalías en sus husos así como aneuploidias. Esto es debido a la interacción de

TAp73 con proteínas que forman el completo proteico para la formación de los husos, el SAC (Spindle Assembly Checkpoint) (Baker et al., 2004; Leland et al., 2009; Shuda et al., 2009; Zhang and Lees, 2001). De este modo, la mayoría de los embriones obtenidos de oocitos TAp73KO detuvieron su crecimiento durante la etapa de escisión, dando lugar a embriones con blastómeros multinucleados y blastocistos de baja calidad con un número anómalo de células (Figura 6) (Tomasini et al. 2008). Todo ello indica que p73 tiene un papel importante en la fertilidad en hembras, en concreto durante el desarrollo de oocitos, ya que la ausencia de la isoforma TAp73 da lugar a anomalías en el desarrollo embrionario preimplantacional. Además de ello se ha observado un descenso significativo del número de folículos primordiales y primarios en ratones hembra TAp73KO por lo que el agotamiento reproductivo ocurre antes. Estas hembras también presentan un ratio de ovulación mucho menor, con menor número de oocitos que en los ratones hembra WT (Tomasini et al. 2008).



**Figura 6. La ausencia de TAp73 disminuye la calidad de los blastocistos.** Cigotos fertilizados *in vitro* provenientes de oocitos TAp73KO muestran células multinucleadas y defectos morfológicos que el cigoto control no presenta (Levine et al. 2011).

Un detalle importante es el impacto negativo que representa el aumento en la edad de la hembra sobre la fertilidad (Spandorfer et al. 2004). En humanos, la expresión de la isoforma TAp73 disminuye de manera natural en los oocitos durante el envejecimiento (Guglielmino et al. 2011), lo que podría explicar la reducción en la tasa de fertilidad y el aumento en la proporción de bebés nacidos con anomalías cromosomales. Todo ello concuerda con lo observado en ratones hembra, donde los oocitos de hembras WT de edad avanzada muestran anomalías similares a los oocitos de los ratones TAp73KO hembra jóvenes (Tomasini et al. 2008).

En el caso de fertilidad en machos, p73 ejerce también un importante papel, ya que se ha descrito que la isoforma TAp73 está implicada en la maduración de los tubos seminíferos. Los ratones macho TAp73KO, pero no los DNp73KO, muestran túbulos seminíferos "vacíos" debido a la masiva pérdida prematura de células germinales inmaduras. Esto se debe a defectos en adhesiones célula-célula entre las células germinales en desarrollo y las células de Sertoli, las cuales también presentan cierta degeneración, todo ello alterando la integridad y la maduración del epitelio germinal (Holembowski et al. 2014).

Todo ello se debe a la transcripción, por parte de TAp73, de moléculas relacionadas con la adhesión y la migración celular, como las metaloproteinasas ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) y MMP13 (Inoue et al. 2014), Timp1 (inhibidor de metaloproteinasa 1), Serpina3n (inhibidor de serine-peptidasa) (Holembowski et al. 2014). Estas moléculas son conocidos reguladores de la adhesión celular y la migración de células germinales (Moreno, Urriola-Munoz and Lagos-Cabre 2011, Guyot et al. 2003, Le Magueresse-Battistoni 2007).

Todo ello demuestra que la familia de p53, p73 en concreto, presenta un papel muy importante en la regulación de las líneas germinales y la fertilidad en ambos sexos.

### **1.2.3 Función de p73 en vasculogénesis y angiogénesis tumoral**

La vasculogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la diferenciación y el establecimiento de precursores mesodérmicos, mientras que la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya formados. Durante el desarrollo de mamíferos, los progenitores mesodérmicos dan lugar a hemangioblastos, que son precursores multipotentes de células troncales hematopoiéticas (HSCs) y angioblastos. Durante la vasculogénesis, los procesos de hipoxia y las señales proangiogénicas van a inducir estos angioblastos a diferenciarse a células endoteliales CD31+ que van a ser las que formen la red vascular primitiva (Cao and Yao 2011).

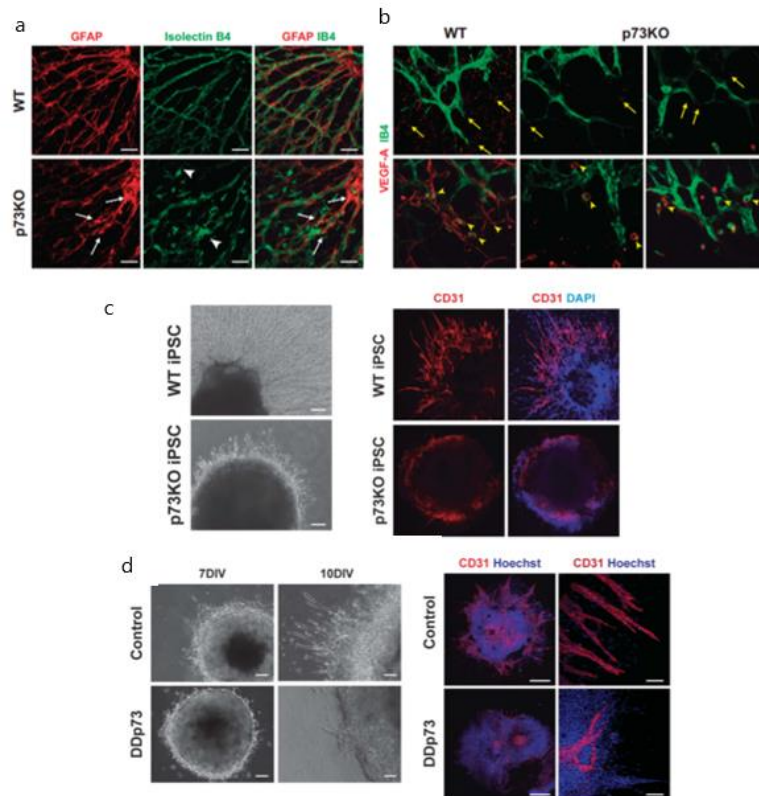
La regulación de los procesos de vasculogénesis y angiogénesis depende de un gran número de moléculas de señalización, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Ferrara, Gerber and LeCouter 2003) y el factor- $\beta$  de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) (Bertolino et al. 2005) entre otras. En concreto, TGF $\beta$  controla la diferenciación de células endoteliales, inhibiendo su migración y su proliferación.

El papel de p73 en la regulación de la formación de vasos sanguíneos ha sido un tema controvertido durante mucho tiempo. Los ratones carentes de p73 presentan, entre otros

defectos, hemorragias gastrointestinales y craneales (Yang et al. 2000), lo cual sugiere tanto defectos en la integridad vascular y como un posible papel de p73 en la regulación de los procesos de vasculogénesis/angiogénesis. Nuestro grupo de investigación, además, demostró que el gen GATA-1 (Marques-García et al. 2009) esencial en la diferenciación endotelial y hematopoiética (Adamo and García-Cardena 2012), es una diana transcripcional directa de TAp73.

Nuestro grupo, paralelamente a otros, ha analizado el papel de p73 en la angiogénesis. Fernández-Alonso *et al* determinó, mediante el uso de modelos *in vitro* en 3D de cuerpos embrioides (EBs), que en ausencia de p73 el tamaño de los EBs era menor y con menos proporción de células CD31+, demostrando la necesidad de p73 para una adecuada diferenciación endotelial (Fernández-Alonso et al. 2015). Los EBs son capaces de recapitular la morfogénesis vascular temprana (Li and Claesson-Welsh 2009, Kohler et al. 2013, Yoshida and Yamanaka 2010), ya que bajo condiciones adecuadas generan células endoteliales funcionales (Yurugi-Kobayashi et al. 2003, Narazaki et al. 2008). Además, en ausencia de p73, la formación del plexo vascular primitivo se encuentra alterado, y se observó una reducción de las vías de señalización de VEGF y TGF $\beta$  (Mallet et al. 2006, Fernández-Alonso et al. 2015). En este modelo ambas isoformas de p73, TAp73 y DNp73, se mantenían sobreexpresadas, siendo DNp73 la isoforma predominante (Fernández-Alonso et al. 2015, Marin and Marques 2016).

Para analizar el papel de p73 en los procesos angiogénicos *in vivo* se estudió la vascularización de la retina (Uemura et al. 2006, Poulaki 2011). Tras el nacimiento, en las retinas avascularizadas, las células endoteliales proliferan y migran, formando estructuras bidimensionales. Este crecimiento está dirigido por una red de astrocitos que, en respuesta a un ambiente hipóxico, secretan VEGF. De este modo los gradientes de VEGF polarizan el crecimiento de células endoteliales para la formación de vasos (Roca and Adams 2007). En ausencia de p73, la densidad y la estabilidad del desarrollo vascular de la retina de ratón se encuentra alterada debido a que se forman menor número de redes de células endoteliales, que presentan además mayor desorganización (Figura 7), sugiriendo una alteración de las vías de señalización de VEGF y de TGF $\beta$  (Fernández-Alonso et al. 2015, Marin and Marques 2016).



**Figura 7. La falta de p73 altera la formación de estructuras vasculares en modelos *in vivo* e *in vitro*.** (a) En las retinas de los ratones carentes de p73 se produce la formación de una vasculatura aberrante (IB4) sobre una red astrocítica desorganizada (GFAP), (b) además de una clara disminución de la producción de VEGF *in vivo*. (c) El estudio de los modelos en 3D *in vitro* revela que la ausencia de p73 altera la correcta formación de prolongaciones endoteliales. (d) en concreto en ausencia de la isoforma DNp73 en comparación con los controles (Fernandez-Alonso et al. 2015).

Sin embargo, el papel de las isoformas de p73 en la formación de nuevos vasos ha sido muy controvertido. Diferentes estudios han demostrado la función proangiogénica de DNp73 (Amelio et al. 2015, Stantic et al. 2015, Dulloo et al. 2015b, Dulloo, Hooi and Sabapathy 2015a, Fernandez-Alonso et al. 2015). Sin embargo, el papel de TAp73 ha sido mucho más discutido, con estudios que le asocian un papel proangiogénico (Amelio et al. 2015, Stantic et al. 2015) y otros un papel antiangiogénico (Dulloo et al. 2015a, Dulloo et al. 2015b, Fernandez-Alonso et al. 2015). La regulación dual que parece ejercer TAp73 en la formación de nuevos vasos parece estar relacionada con la regulación de HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), un factor asociado al desarrollo de los vasos sanguíneos en bajas condiciones de oxígeno. De este modo, TAp73 podría estar regular la angiogénesis en las dos direcciones dependiendo de ventanas temporales que establecerían un lazo de regulación bajo determinadas condiciones celulares, de localización y de tiempo (Sabapathy 2015).

El conocimiento de la implicación de p73 en la formación de vasos, ya sea mediante por procesos vasculogénicos o angiogénicos, es esencial desde el punto de vista de la progresión tumoral.

### 1.2.4 Función de p73 en cáncer

La función de p73 en el establecimiento y progresión tumoral ha sido intensamente estudiada en los últimos 20 años (Inoue and Fry 2014, Ferraiuolo et al. 2016, Engelmann et al. 2015, Melino 2003, Moll and Slade 2004). Debido a la importante implicación de p53 en este ámbito, también se ha estudiado el papel de p73 y p63 en la supresión tumoral, promoviendo la senescencia y la apoptosis. El gen TP53, pero no TP63 y TP73, se encuentra frecuentemente mutado en tumores humanos, con una tasa de incidencia superior al 50%, dando lugar a mayores tasas de proliferación celular, procesos invasivos, angiogénesis, inestabilidad genómica de células cancerosas y quimioresistencia. Todas estas funciones oncogénicas, además de estar promovidas por la mutación de p53, pueden también estar fomentadas por la interacción de p53 con DNp63 y DNp73, lo que determina su inactivación funcional.

La proteína p73, descubierta en 1997 (Kaghad et al. 1997, Schmale and Bamberger 1997) juega, junto con p53, un importante papel en los puntos de control en la regulación del ciclo celular (Melino et al. 2002). El gen *TP73* raramente se encuentra mutado en tumores humanos, pero su expresión sí se puede encontrar desregulada, siendo más frecuente la sobreexpresión de la proteína que la pérdida de expresión de la misma (Kaghad et al. 1997). La alteración en la expresión de p73 se ha estudiado en multitud de tumores como hepatocarcinoma (Bantel and Simon 2010), neuroblastoma (Casciano et al. 1999, Kovalev et al. 1998), cáncer de pulmón (Mai et al. 1998, Tokuchi et al. 1999), cáncer de próstata (Carastro et al. 2014), carcinoma colorrectal (Lee et al. 2010, Sunahara et al. 1998, Guan et al. 2003, Sun 2002), cáncer de mama (Zaika et al. 1999), cáncer de esófago (Cai et al. 2000), cáncer estomacal (Kang et al. 2000), leucemia linfocítica crónica (Novak et al. 2001), leucemia mielógena crónica y aguda (Tschan et al. 2000, Peters et al. 1999).

El estudio de la formación de tumores en el modelo murino *Trp73*<sup>-/-</sup> se imposibilita debido a que mueren a edades muy tempranas sin desarrollar tumores (Yang et al., 2000). Sin embargo, estudios llevados a cabo en ratones heterocigotos *Trp73*<sup>+/-</sup> revelaron la formación de tumores espontáneos (Flores et al. 2005). Los tumores derivados de dichos ratones *Trp73*<sup>+/-</sup> mostraban pérdida de heterocigosidad (LOH, loss of heterozigosity) en los alelos p73wt, característica típica de la inactivación de la supresión tumoral en cáncer (Rufini et al. 2011). Estos datos concuerdan con lo observado en tumores gastrointestinales en humanos, donde la pérdida de heterocigosidad llega a alcanzar tasas de hasta el 40% de los casos (Zaika and El-Rifai 2006).

Las diferentes isoformas de p73 van a jugar importantes y muy diferentes papeles en la evolución tumoral. Mientras que TAp73 actúa, junto con p53, en la promoción de la actividad proapoptótica, las isoformas carentes del dominio de transactivación ( $\Delta$ Np73,  $\Delta$ N'p73,  $\Delta$ ex2p73,

and  $\Delta ex2/3p73$ ) ejercen una función de supervivencia tumoral inhibiendo dicha actividad propoptótica tanto de p53 como de TAp73 (Casciano et al. 2002). El análisis fenotípico de los ratones carentes de la isoforma TAp73 reveló una alta tasa de formación espontánea de tumores (Tomasini et al. 2008) indicando la función de TAp73 como supresor tumoral.

Los ratones carentes de la isoforma DNp73 no presentan formación espontánea de tumores. Sin embargo, se ha demostrado su potencial oncogénico en determinados contextos celulares (Bailey, Cragg and Townsend 2011), ya que las isoformas de p73 truncadas en el extremo Nterminal se encuentran sobreexpresadas en una amplia gama de tumores humanos (Rufini et al. 2011, Soldevilla et al. 2011, Soldevilla et al. 2014, Zaika et al. 2002, Stiewe and Putzer 2002, Casciano et al. 2002, Douc-Rasy et al. 2002). En concreto la isoforma  $ex2/3p73$  parece ser específica de procesos tumorales ya que no se ha encontrado su expresión en tejidos sanos (Fillippovich et al. 2001, Concin et al. 2004). De este modo la expresión de las isoformas carentes del extremo N-terminal durante un proceso tumoral es considerado un marcador de pronóstico adverso.

### **1.2.5 Función de p73 en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, neurogénesis y neurodegeneración**

La familia de p53 tiene una función esencial durante el desarrollo embrionario. p63 regula del desarrollo epitelial (Mills et al. 1999, Yang et al. 1999) mientras que p73 ejerce un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, con una implicación clave en el mantenimiento de la autorrenovación y la diferenciación de precursores neuronales.

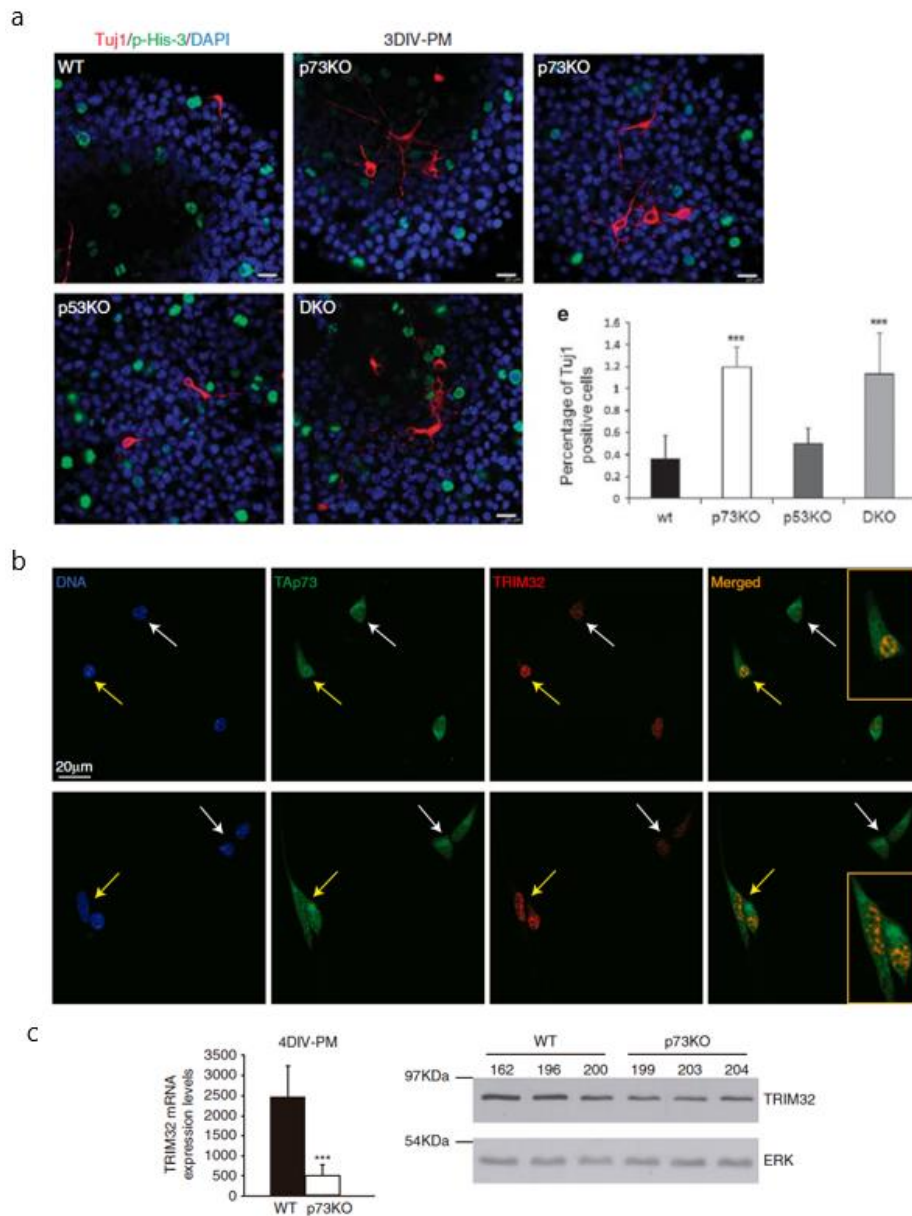
El análisis fenotípico de los ratones carentes de p53 (p53KO), no muestra anomalías severas durante el desarrollo (Donehower et al. 1992). La mayoría de los ratones p53KO consiguen alcanzar el estado adulto, por lo que inicialmente se sugirió que p53 era dispensable para el desarrollo embrionario y postnatal (Donehower et al. 1992). Sin embargo, se demostró que la falta de p53 generaba, especialmente en hembras, exencefalia, que es un crecimiento excesivo de parte del tejido neural en el mesencéfalo debido a defectos en el cierre del tubo neural (Armstrong et al. 1995, Sah et al. 1995). Estos datos demuestran que la falta de p53 da lugar a alteraciones durante el desarrollo neural, siendo esta regulación, en gran medida, dependiente del contexto celular debido a la alta proporción de casos observados en hembras.

En los últimos años varios grupos, incluido el nuestro, han demostrado que p73 desempeña un papel fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso central (CNS) (Killick et al. 2011). Los ratones p73KO presentan severas deficiencias neurológicas entre las que se encuentran la



disgénesis del hipocampo, hidrocefalia, anomalías en las vías sensoriales de detección de feromonas (Yang et al. 2000), hipoplasia cortical (Yang et al. 2000, Meyer et al. 2004), pérdida postnatal de neuronas simpáticas (Pozniak et al. 2002) y ausencia de células Cajal-Retzius (Abraham, Perez-Garcia and Meyer 2004, Meyer et al. 2004).

El gen *Trp73* juega un papel fundamental en la biología de las NSC (células troncales neurales), ya que es necesario para el mantenimiento de la neurogénesis (Agostini et al. 2010, Agostini et al. 2011, Fujitani et al. 2010, Gonzalez-Cano et al. 2010, Talos et al. 2010). Nuestro grupo de investigación demostró, paralelamente con otros laboratorios, que p73 es un regulador básico del mantenimiento de la autorrenovación de las NSC *in vitro* (Gonzalez-Cano et al. 2010, Agostini et al. 2010). Además, está implicado en la correcta diferenciación de las mismas, ya que la ausencia de p73 da lugar a su diferenciación prematura *in vitro* (Gonzalez-Cano et al. 2010), todo ello de manera antagónica e independiente a p53, el cual es un regulador negativo de la autorrenovación y proliferación de las NSC (Figura 8 a) (Gonzalez-Cano et al. 2010, Meletis et al. 2006). En concreto, la isoforma TAp73 juega un papel determinante, no sólo en dicho proceso de autorrenovación, sino también en la diferenciación neuronal. Por un lado, se ha descrito que TAp73 regula el mantenimiento de las NSC en el tiempo, al menos en parte, mediante la regulación de la expresión de la proteína bHLH Hey2, que se expresa en precursores neuronales (Sakamoto et al. 2003), regulando la prevención de la diferenciación prematura (Fujitani et al. 2010) que nuestro grupo de investigación había observado (Gonzalez-Cano et al. 2010). Por otro lado, TAp73 está implicado en la regulación del desarrollo neuronal mediante la regulación de la expresión de miR-34a (Agostini et al. 2011), molécula implicada en la expresión de proteínas que participan en la diferenciación neuronal (Agostini et al. 2011). En este aspecto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que TAp73 regula la diferenciación neuronal a través de TRIM32 (Figura 8 b y c) (Gonzalez-Cano et al. 2013).



**Figura 8. p73 regula la autorrenovación y la diferenciación de las NSC, al menos en parte mediante la regulación de TRIM32.** Representación de algunos de los relevantes aportes de nuestro grupo de investigación en los últimos años al campo de la regulación de la neurobiología por parte de p73. (a) Imágenes y cuantificación de la diferenciación prematura en ausencia de p73 *in vitro* (Gonzalez-Cano et al. 2010). (b) Relación de la expresión de TRIM32 en presencia de TAp73 *in vitro*. (c) Niveles de mRNA y proteicos de TRIM32 en presencia y ausencia de p73 (Gonzalez-Cano et al. 2013).

TAp73 activa directamente la expresión de esta proteína en NPC (progenitores neurales) (Gonzalez-Cano et al. 2013), la cual, a través de Argonauta-1, va a regular la activación de micro-RNAs inductores de la diferenciación como Let-7a (Schwamborn, Berezikov and Knoblich 2009). TRIM32, a su vez, va a cerrar un lazo de regulación negativa con TAp73 al unirse a ella para promover su ubiquitinación y degradación (Gonzalez-Cano et al. 2013). Además, se ha descrito que la isoforma DNp73, debido a su función como dominante negativo de p53 y TAp73, tiene

funciones antiapoptóticas y de supervivencia neuronal (Pozniak et al. 2002, Pozniak et al. 2000). Esta isoforma también está implicada en la regulación de la diferenciación de NPC a través de TRIM32, ya que reprime de manera muy eficaz la inducción de la expresión que TAp73 lleva a cabo sobre el promotor de TRIM32.

Se han descrito dos variantes fenotípicas en los ratones p73KO en cuanto al desarrollo cerebral: el fenotipo severo presenta una alta tasa de apoptosis celular en cortex y una muerte muy prematura a pesar de intensos cuidados postnatales, y un fenotipo intermedio capaz de alcanzar el estado adulto (Medina-Bolivar et al. 2014). A pesar de esta diferencia ambas variantes muestran los tres signos típicos de la deficiencia de p73: hipoplasia cortical, disgénesis hipocampal y ventriculomegalia (Yang et al. 2000).

El estudio de los ratones carentes específicamente de una de las dos isoformas de p73 (TAp73KO o DNp73KO) reveló, en ambos casos, un fenotipo menos agresivo que el ratón p73KO en cuanto fenotipo cerebral (Tabla1). Los ratones carentes de la isoforma TAp73 (Tomasini et al. 2008) presentan malformaciones en el hipocampo y disminución de la neurogénesis, todo ello subrayando la función fundamental de TAp73 en el desarrollo del hipocampo y en el mantenimiento de la neurogénesis. Sin embargo, estos ratones no presentan hidrocefalia ni diferencias en el grosor del cortex lo que parecía estar sugiriendo, por eliminación, que falta de la isoforma DNp73 y no de TAp73 es la causa de estos defectos. La generación de los ratones carentes de DNp73 (Tissir et al., 2009; Ravni et al., 2010; Wilhelm et al., 2010) mostró que estos ratones son viables, pero presentan altas tasas de apoptosis neuronal, y una reducción de la densidad neuronal en la corteza motora (Tissir et al. 2009, Ravni, Tissir and Goffinet 2010, Wilhelm et al. 2010), confirmando la actividad neuroprotectora de DNp73 propuesta anteriormente (Pozniak et al. 2002, Pozniak et al. 2000, Walsh et al. 2004). Los ratones DNp73<sup>-/-</sup> generados por Tissir y cols sufren reducción del plexo coroideo (Tissir et al. 2009), mientras que Wilhelm y cols describen un ligero ensanchamiento de los ventrículos (Wilhelm et al. 2010). Sin embargo, los ratones DNp73KO tampoco presentan hidrocefalia.

**Tabla 1. Defectos neuronales en ratones carentes de p73.** Tabla comparativa de los defectos neuronales hallados en ratones carentes de p73, TAp73 y DNp73 (Killick et al. 2011).

**Table 1** Neuronal defects in p73 transgenic mice

	p73 <sup>-/-</sup> (Yang et al. [15], Pozniak et al. [17])		TAp73 <sup>-/-</sup> (Tomasini et al. [22])		DNp73 <sup>-/-</sup> (Wilhelm et al. [19])	
<b>Anatomical defect</b>						
Cortex	Hypoplasia		None		Age-dependence hypocellularity and cortex thinning	
Hippocampus	Dysgenesis		Absence lower blade of dentate gyrus		None	
Ventricular	Third ventricle enlarged and hydrocephalus		None		Enlarged ventricle	
Others	Loss of Cajal-Retzius neurons and Reelin defective. Abnormalities of the pheromone sensory pathway					
<b>Behavioural test</b>						
	(Talos et al. [16], Wetzel et al. [19])		(Personal communication)		(Personal communication)	
	Young	Aged	Young	Aged	Young	Aged
Burrowing	NT	NT	Reduced	Reduced	NT	Normal
Clasping	Positive	Reduced <sup>a</sup>	Positive	Positive	NT	Positive
Open field	Reduced	Reduced <sup>a</sup>	Reduced	Reduced	NT	Reduced
Barnes Maze	Reduced	Reduced <sup>a</sup>	NT	NT	NT	NT
Hind grip	Loose	Reduced <sup>a</sup>	NT	NT	NT	NT
Light-dark box	Positive	NT	NT	NT	NT	NT

Young mice: 2–4 months old. Aged mice: 15–17 months old

NT not tested

<sup>a</sup>The behavioural experiments were performed in p73<sup>+/-</sup> mice

La función de DNp73 en los ventrículos no se apoya en la expresión de las isoformas *in vivo*, ya que DNp73 se expresa en plexo coroideo, pero no se ha detectado su expresión en células endoteliales (Tissir et al. 2009), mientras que TAp73 es abundante en células endoteliales maduras (Medina-Bolivar et al. 2014). Esto podría sugerir que las isoformas TAp73 y DNp73 podrían tener funciones superpuestas y por ello, algunos de los fenotipos requieren la ausencia de ambas isoformas (Killick et al. 2011), como puede ser el caso de la hidrocefalia. Esto parece estar apoyado por la mayor severidad de los fenotipos observados en el modelo p73KO donde la suma de la pérdida de ambas isoformas parece tener un efecto sinérgico.

También se ha estudiado el papel de p73 en neurodegeneración. Se ha descrito que p73 está implicado en procesos neurodegenerativos, en concreto en Alzheimer. En el proceso de esta enfermedad, se producen depósitos extracelulares de péptido  $\beta$ -amiloide en forma de placas. Además de ello se producen acúmulos intracelulares en forma de redes neurofibrilares (NFTs) formados por la proteína tau fosforilada (Braak and Braak 1995, de Strooper 2010, Braak et al. 2006). Esta proteína normalmente está asociada a microtúbulos, pero al estar fosforilada no es capaz de unirse a ellos y se forman dichos agregados.

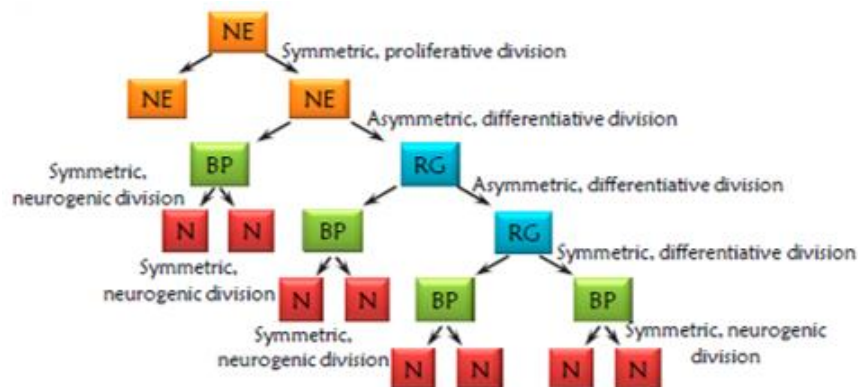
Se ha descrito que p73 podría estar implicado en neurodegeneración al estar implicado en la acumulación de péptido  $\beta$ -amiloide y la creación de redes neurofibrilares de fosfo-tau (Wetzel et al. 2008, Hooper et al. 2006). Sin embargo, otros estudios no han sido capaces de reproducir estos resultados (Vardarajan et al. 2013), necesitando de nuevos estudios para desvelar la función de p73 en neurodegeneración.

En resumen, p73 está implicado en multitud de procesos en diferentes tipos celulares, en concreto, p73 ejerce un papel esencial en la regulación del desarrollo del sistema nervioso central. Como se ha descrito, ha sido muy estudiado su papel en la regulación del mantenimiento de la autorrenovación de NSC y en su diferenciación, sin embargo, se conoce muy poco sobre la implicación que p73 tiene sobre el desarrollo de otros componentes del CNS. En este aspecto esta tesis doctoral se ha centrado en analizar el efecto de la falta de p73 en el desarrollo y función de las células endimarias, las cuales se van a describir a continuación.

## 2. NICHO NEUROGÉNICO EN LA REGIÓN SUBVENTRICULAR (SVZ)

### 2.1 NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA Y ZONAS GERMINATIVAS EN CEREBRO

El sistema nervioso central comienza su desarrollo alrededor del día embrionario E7.5 con la formación de la placa neural a partir del neuroectodermo. Durante el proceso de neurulación, este epitelio pseudoestratificado se engrosará, doblará y fusionará para formar el tubo neural (Sulik et al. 1994). El lumen de este tubo está tapizado por una única capa de células denominadas neuroepiteliales (NE), que constituyen las primeras células progenitoras del CNS siendo consideradas células troncales con capacidad de auto-renovación y multipotencia (Huttner and Kosodo 2005). En los primeros estadios las NE aumentan su población mediante divisiones simétricas (divisiones de auto-renovación). Posteriormente algunas de estas células comienzan a dividirse asimétricamente (divisiones de diferenciación) dando lugar por un lado a células de la glia radial (RGCs), y por otro a progenitores basales más diferenciados generadores de neuronas (Gotz and Huttner 2005, Huttner and Kosodo 2005) (Figura 9). Hoy en día, se acepta que las RGCs y constituyen las células troncales neurales que generaran neuronas y células gliales, tanto durante el desarrollo como en estadios postnatales (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).



**Figura 9. Relación de linajes celulares en la neurogénesis.** Relación entre células neuroepiteliales (NE), células de la glia radial (RG) y progenitores basales (BP) en la generación de neuronas (N) (Gotz and Huttner 2005).

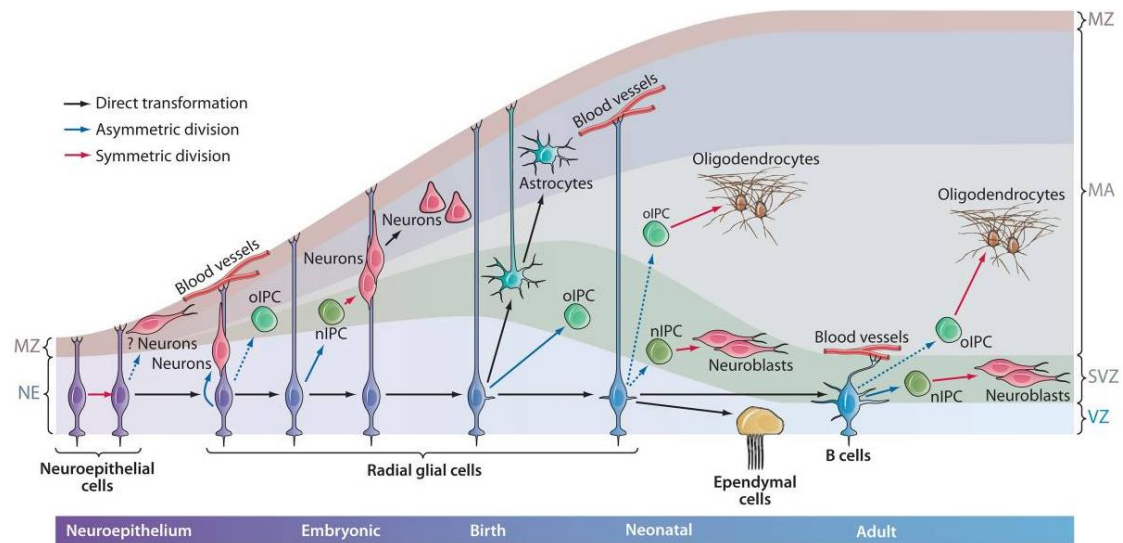
La neurogénesis cortical comienza entre los días E9 y E10, y es en ese momento cuando el neuroepitelio se transforma en un tejido pluriestratificado, denominado zona ventricular. En este estadio se generan las células de la glia radial que se extenderán desde la cara apical ventricular a través de la capa neuronal hasta la lámina basal (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Durante el desarrollo cortical, las RGCs generarán neuronas que, mediante divisiones simétricas o a través de progenitores, incrementarán el grosor de la corteza cerebral.

Durante los últimos estadios del desarrollo embrionario la localización de la población de células gliales se va a restringir a determinadas regiones, denominadas nichos neurogénicos. Estos centros germinales, son microambientes especializados encargados de regular la capacidad de auto-renovación y proliferación de estas células y mantener así la capacidad neurogénica en los adultos. En concreto en el cerebro adulto de vertebrados se han descrito al menos dos regiones neurogénicas (Alvarez-Buylla and Lim 2004, Ernst and Frisen 2015): la zona subventricular de la pared lateral de los ventrículos (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ).

## 2.2 DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE LA REGIÓN SUBVENTRICULAR

La región SVZ está situada en la pared lateral del ventrículo, por debajo del epéndima y alberga uno de los nichos neurogénicos activos (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002, Tropepe et al. 1997) más estudiados hasta el momento. Este nicho neurogénico mantiene una citoarquitectura altamente organizada que es absolutamente necesaria para el mantenimiento de las características de auto-renovación y multipotencia de las células troncales neurales.

El desarrollo de la región subventricular en roedores tiene lugar durante las primeras semanas postnatales. En el momento del nacimiento, la región periventricular es similar al neuroepitelio embrionario. En ella se distinguen dos zonas definidas: la zona ventricular, que está constituida por los somas de las RGCs, y la zona subventricular, que está formada por las prolongaciones basales de éstas, que alcanzan la superficie pial del cerebro, y por progenitores, tanto neurales (nIPC) como oligodendrocíticos (oiIPC) (Tramontin et al. 2003, Hartfuss et al. 2001, Merkle et al. 2004). Durante la primera semana postnatal (P0-P7), una población de RGCs comenzarán a transformarse para dar lugar a células endimarias inmaduras (Spassky et al. 2005), mientras que otra población de RGCs dará lugar a células con carácter astrocítico, células B1, que serán las futuras células troncales neurales del cerebro adulto (Merkle et al. 2004). En los días siguientes, el número de células que constituye esta región disminuirá, y a los quince días comenzará a estar estructurada de manera semejante a la región SVZ adulta (Figura 10).

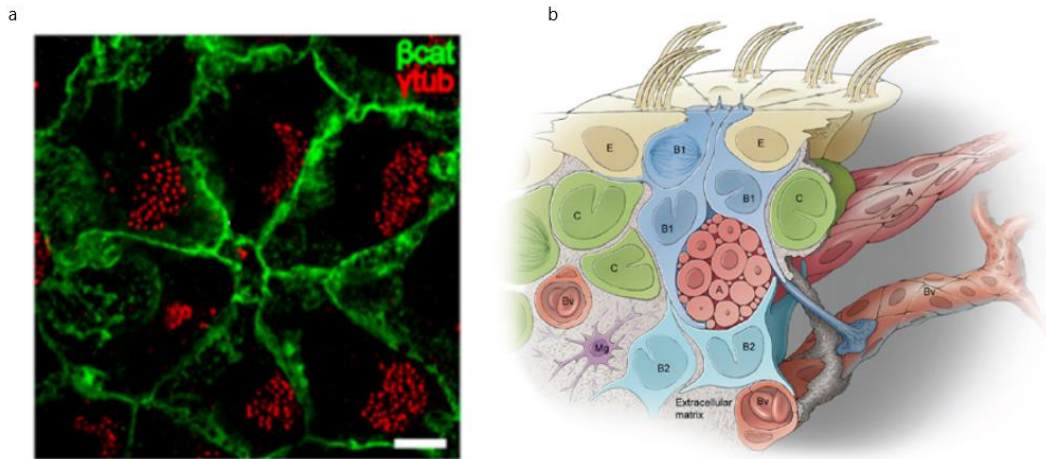


**Figura 10. Transformación de las células RG durante el desarrollo embrionario y postnatal.** Esquema de los diferentes tipos celulares que componen el nicho neurogénico ventricular durante el desarrollo embrionario y postnatal: MZ: zona marginal, NE: neuroepitelio, oIPC: progenitores oligodendrocíticos, nIPC: neurogénico progenitor neuronales, SVZ: zona subventricular, VZ: zona ventricular (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Finalmente, a partir del día postnatal 15 (P15) y en el ratón adulto, las RGCs habrán desaparecido de la zona ventricular, estando el ventrículo tapizado por células ependimarias multiciliadas que, junto a las células neurogénicas B1, generarán la citoarquitectura característica del nicho germinativo de esta región (Tramontin et al. 2003). Este microambiente, altamente organizado es esencial desde el punto de vista funcional, tanto para el mantenimiento de la auto-renovación y multipotencia de las NSCs como para mantener la homeostasis del nicho germinal (Chmielnicki et al. 2004, Lim et al. 2000, Andreu-Agullo et al. 2009, Ramirez-Castillejo et al. 2006).

La citoarquitectura de este nicho se caracteriza por la formación de unas estructuras características, denominadas *pinwheels* o rueda de carro (Figura 13a), que son las unidades regenerativas y que se van a extender a lo largo de toda la pared lateral (Lim et al. 2000, Mirzadeh et al. 2008). En contacto con el ventrículo se encuentran las células ependimarias (E o ECs), multiciliadas y de gran superficie apical. Estas células se colocan en torno a las células B1, las cuales poseen una pequeña superficie apical y un cilio primario en contacto con el ventrículo, tienen su soma localizado en la zona subventricular y presentan una larga prolongación que se extiende hacia el estriado. Las células B generarán una población de progenitores intermedios (células C) que darán lugar a neuroblastos (células A) (Figura 11 b). Los neuroblastos generados migrarán hasta alcanzar los bulbos olfatorios donde se diferencian a interneuronas globulares y periglomerulares (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002, Doetsch, Garcia-Verdugo and Alvarez-Buylla 1999, Lois and Alvarez-Buylla 1994).





**Figura 11. Arquitectura del nicho neurogénico de la región SVZ.** (a) Estructura ventricular de la unidad regenerativa típica o pinwheel (Mirzadeh et al. 2008). (b) Esquema representativo de los componentes del nicho neurogénico de la región SVZ. Células endimarias (E), progenitores intermedios (C), neuroblastos (A), vasos sanguíneos (Bv), microglia (Mg) y matriz extracelular (Ihrie and Alvarez-Buylla 2011).

## 2.3 GENERACIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS

### 2.3.1 Descripción y función de las células endimarias

Las células endimarias (ECs) son células multiciliadas que tapizan los ventrículos y proyectan sus cilios hacia el lumen ventricular en el cerebro adulto de mamíferos (Mirzadeh et al. 2008, Del Bigio 1995). La naturaleza de las células endimarias fue controvertida en los primeros momentos de su descubrimiento, ya que se sugirió que podían ser NSCs adultas responsables de una lenta neurogénesis en la zona subventricular (Johansson et al. 1999). Sin embargo, esta idea se abandonó debido a que carecen de capacidad de auto-renovación en cultivo (Doetsch et al. 1999, Chiasson et al. 1999, Laywell et al. 2000).

Las células endimarias se identifican por la expresión de marcadores como CD24, s100β (*S100 calcium-binding protein β*) o Vimentina (Mirzadeh et al. 2008, Pastrana, Cheng and Doetsch 2009, Raponi et al. 2007). Además, se caracterizan por la presencia de múltiples cilios móviles agrupados en la membrana apical, y polarizados respecto al plano del tejido (Polaridad Celular Planar) siguiendo la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo (CSF).

Las células endimarias de la pared lateral del ventrículo son necesarias para el mantenimiento del microambiente neurogénico, ya que son capaces de promover la neurogénesis mediante la secreción de Noggin (Chmielnicki et al. 2004, Lim et al. 2000) y de mantener la auto-renovación de las células B mediante la producción de PEDF (*Pigment epithelium-derived factor*) (Andreu-Agullo et al. 2009, Ramirez-Castillejo et al. 2006). Además, son las encargadas de propulsar el líquido cefalorraquídeo a lo largo de los ventrículos gracias al



movimiento coordinados de sus cilios ayudando a la dispersión de mensajeros neurales y morfógenos en general (Worthington and Cathcart 1963, Ibanez-Tallon et al. 2004b). Este movimiento ciliar establece gradiente quimio-repelentes, dirigiendo así la migración de los neuroblastos al bulbo olfatorios a través del RMS (Sawamoto et al. 2006). Además de todo ello, las células endimarias ejercen funciones de barrera entre el CSF y el cerebro (Jimenez et al. 2014). En la zona apical, las células endimarias presentan uniones gap, o uniones de hendidura, que permiten el paso intertracelular de moléculas, como proteínas y marcadores (Johanson, Stopa and McMillan 2011). Sin embargo, a pesar de esta permeabilidad, las células endimarias representan una importante barrera que regula la difusión de moléculas entre el CSF y el cerebro (Del Bigio 1995).

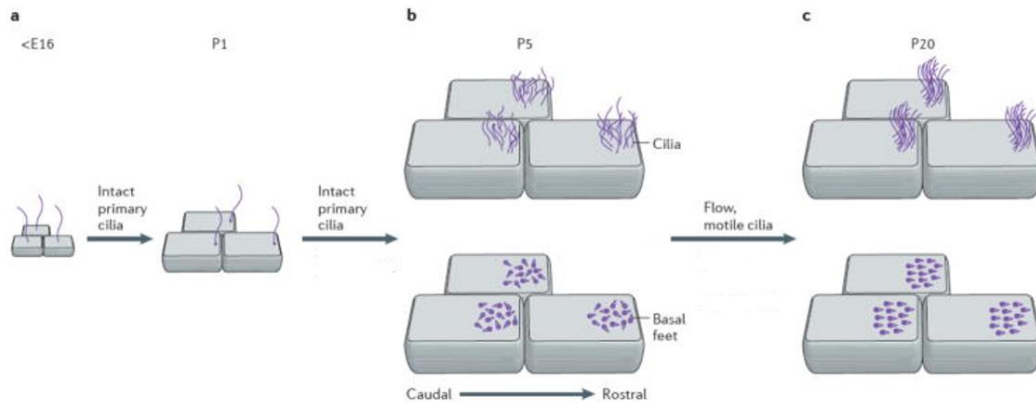
Las funciones de las ECs se pueden ver alteradas por anomalías durante su desarrollo que afecten a la maduración, a las uniones que establecen entre ellas o a la formación y organización de sus cilios. De este modo puede verse afectado el mantenimiento del centro germinal, y por tanto la neurogénesis cerebral y la corticogénesis (Rodriguez et al. 2012). Además de ello, puede verse afectado el flujo de líquido ceforraquídeo dando lugar a hidrocefalia, que consiste en una acumulación del líquido en los ventrículos cerebrales, generando un aumento en la cavidad ventricular. Esta patología es habitual en los casos en que el epéndima que limita los ventrículos se encuentra alterado. Por ejemplo, en los casos en que el desarrollo de los cilios móviles se ve alterado, ya sea a nivel estructural (Banizs et al. 2005, Ibanez-Tallon et al. 2004a, Davy and Robinson 2003) o a nivel de organización (Tissir et al. 2010). Otras patologías, como la lisencefalia y la paquirigia (Sarnat et al. 1993), son menos habituales, pero son también debidas al incorrecto desarrollo de las ECs. Por todo ello, es fundamental el estudio de las rutas que regulan la formación y la maduración de estas células.

### **2.3.2 Generación de las células endimarias**

#### 2.3.2.1 Transformación de células de glia radial en células endimarias

Las células endimarias son células postmitóticas que se generan a partir de las RGCs durante el desarrollo perinatal (Spassky et al. 2005). Aunque el proceso comienza entre los días embrionarios E14 y E16, la maduración de las mismas y la formación de los cilios tiene lugar en la primera semana postnatal (P1-P7). El inicio del proceso de transformación de las RGCs en ECs (E16-P1) se caracteriza por un aumento en la superficie apical y la migración del cilio primario hacia la cara rostral de la célula (Figura 12 a) (Spassky et al. 2005, Guirao et al. 2010). Es a partir de este momento (P1-P5) cuando comienza la diferenciación de estas células a ECs, continuándose la expansión de la superficie apical y comenzando la producción de múltiples

cuerpos basales, que se van a anclar a la superficie apical y de a partir de los cuales se van a desarrollar los cilios (Figura 12 b). Estos cuerpos basales van a adquirir una localización (Figura 12 b) y una organización determinada (Figura 12 c) en la superficie apical.



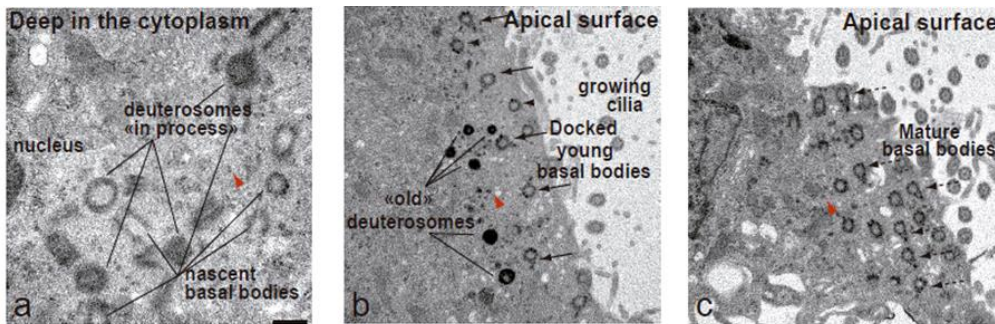
**Figura 12. Esquema de la transición de las RGC a las ECs.** (a) Las RGCs, que entre los días E16 y P1 van a sufrir un pequeño aumento de la superficie apical, presentan un cilio primario que migra hacia la zona rostral de la superficie. (b) Posteriormente, entre los días P1 y P5, estas RGCs comienzan su transformación a ECs, que se caracteriza por un gran aumento en la superficie apical y la formación de un grupo de cuerpos basales, de los que emergen cilios móviles, localizado en la zona anterior de la superficie apical. (c) Entre los días P5 y P20 estos cilios van a adquirir la organización necesaria que determinará su movimiento coordinado (Bayly and Axelrod 2011).

En esta etapa (P1-P5) se pueden identificar tres estadios intermedios diferentes del desarrollo (Figura 13):

- Se pueden observar células con múltiples deuteromasas en el citoplasma celular (Guirao et al. 2010, Spassky et al. 2005), en proceso de formación de cuerpos basales (Gonzalez-Cano et al. 2016). Los deuteromasas son estructuras electrodensas que sirven como lugares de nucleación de cuerpos basales de células multiciliadas en desarrollo y están constituidos por diversas proteínas encargadas del proceso como Cep152, Plk4, SAS6 y CCDC78, entre otras (Klos Dehring et al. 2013) (Figura 13 a).
- Se observan también células con algunos deuteromasas y cuerpos basales recién formados en su trayectoria hacia la superficie apical, o incluso ya acoplados a la superficie apical (Guirao et al. 2010, Gonzalez-Cano et al. 2016) (Figura 13 b).
- Por último, se observan células con cuerpos basales maduros, donde ya no se observa la presencia de deuteromasas (Gonzalez-Cano et al. 2016, Guirao et al. 2010) (Figura 13 c).

En torno al día postnatal P4, las ECs aún inmaduras y con cilios muy cortos, ya están muy distribuidas por las paredes laterales del ventrículo. A partir de la segunda semana postnatal los grupos de cilios se compactan formando clusters, desplazándose hacia la región rostral donde estaba localizado inicialmente el cilio primario en la RGC, y cada uno de los cilios que lo compone

se orientan en la misma dirección (Figura 12 b y c). Esta orientación se extiende a nivel tisular siguiendo la dirección del flujo del CSF.



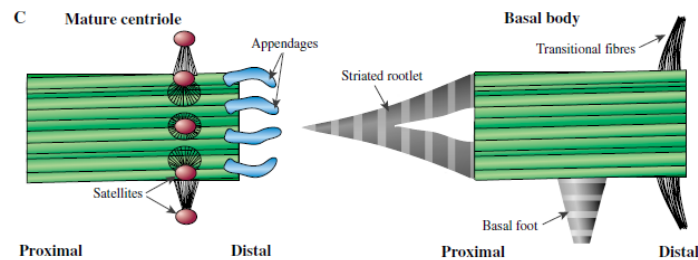
**Figura 13. Proceso de formación, acoplamiento y orientación de los cuerpos basales.** Los cuerpos basales se forman en el interior celular (a) para posteriormente migrar hacia la membrana apical (b) y acoplarse a ella con una orientación determinada (c) (Guirao et al. 2010).

### 2.3.2.2 Multiciliogénesis en células endimarias

#### A) Formación y anclaje de los cuerpos basales a la membrana apical

Como se ha explicado, las células endimarias derivan de precursores monociliados con un único centrosoma, las RGCs. Por ello es necesario que se produzca una amplificación que genere múltiples centriolos que puedan nuclear los futuros cilios de la célula endimaria madura multiciliada (Spassky and Meunier 2017).

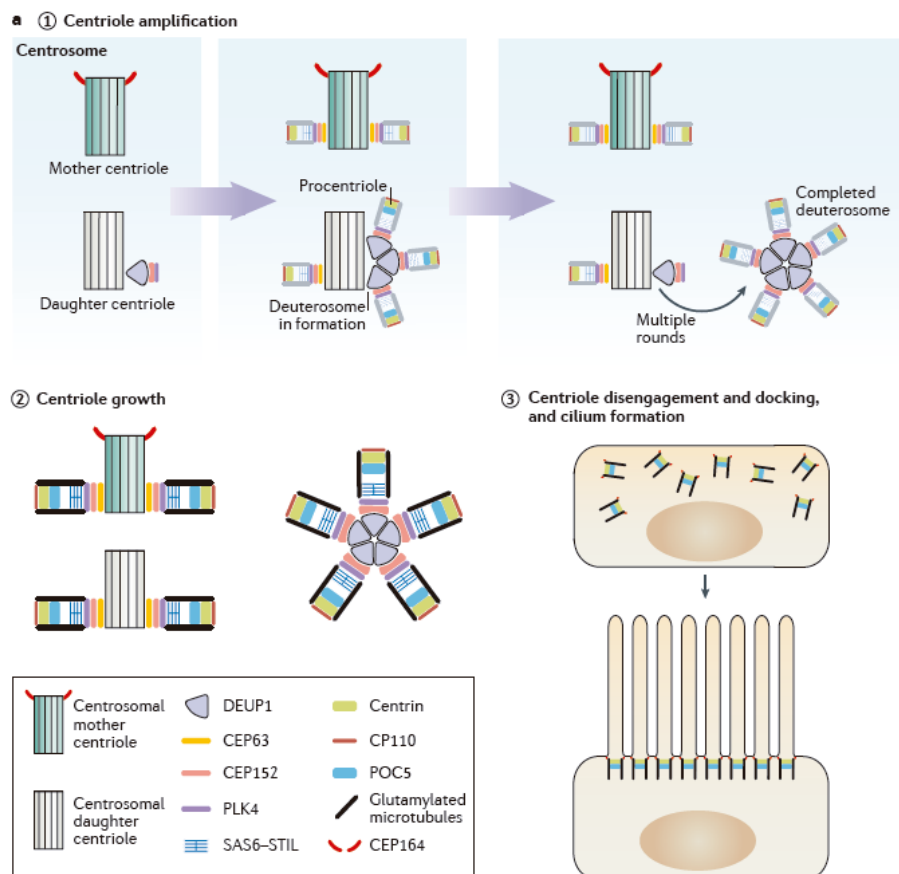
El proceso de producción de cuerpos basales, transporte y anclaje de los mismos a la membrana apical de la célula es un proceso altamente regulado que consta de multitud de pasos (Sorokin 1962, Sorokin 1968). Típicamente ha descrito que los cuerpos basales se desarrollan a partir del centrosoma de la célula, en concreto del centriolo "madre", que es el más antiguo de los dos centriolos del centrosoma. Este centriolo "madre" presenta apéndices distales y subdistales. Los primeros van a ser importantes durante el reclutamiento de los cuerpos basales a la membrana (Tanos et al. 2013) mientras que los segundos intervienen en el anclaje con los microtúbulos (Piel et al. 2000) (Figura 14).



**Figura 14. Comparación estructural entre centriolo y cuerpo basal.** Vista longitudinal esquemática de un centriolo maduro con los apéndices y un cuerpo basal con las estructuras accesorias (Dawe, Farr and Gull 2007).

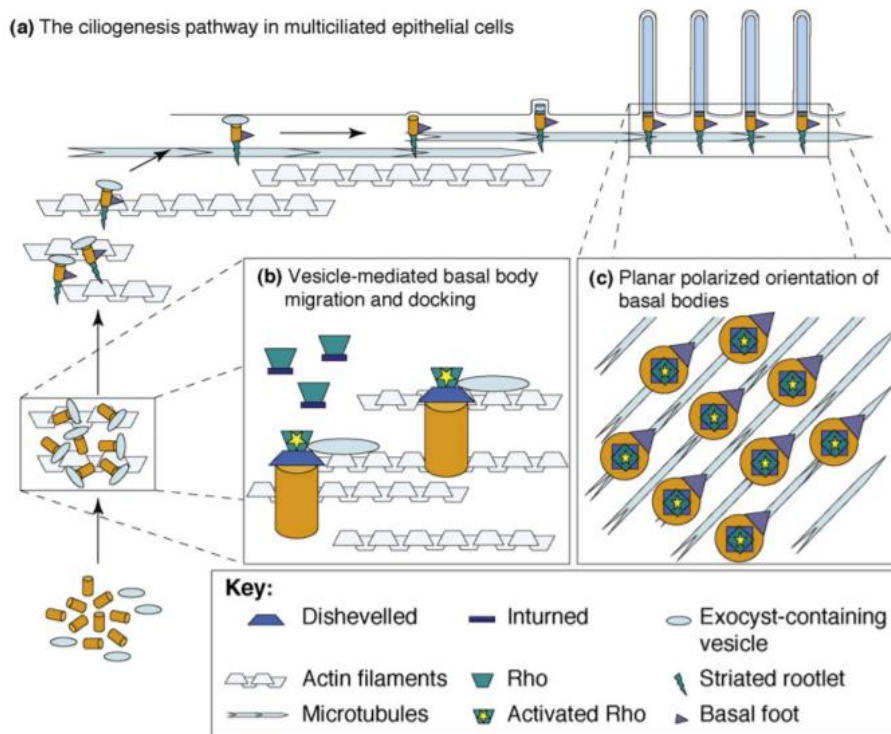
Sin embargo, en células multiciliadas, se han descrito dos vías de producción de cuerpos basales, la vía centriolar y la vía acentriolar o del deuterosoma (Al Jord et al. 2014, Dawe et al. 2007). En la vía centriolar los procentriolos se producen a partir de los centriolos existentes. En la vía acentriolar los procentriolos se forman a partir de los deuterosomas anteriormente descritos (Spassky et al. 2005). Ambas vías pueden darse simultáneamente en la célula (Beisson and Wright 2003, Al Jord et al. 2014, Spassky and Meunier 2017) (Figura 15).

En el caso del cerebro, en una primera fase, los deuterosomas se nuclean por la unión de la proteína DEUP1 (*Deuterosome protein 1*) al centriolo hijo en respuesta a una señal desconocida. En esta fase de amplificación de centriolos, y durante la formación de los deuterosomas, los procentriolos se mantienen latentes en un estadio temprano de su biogénesis (Figura 15, paso 1). Una vez terminada la formación del deuterosoma, en respuesta a una señal desconocida, los centriolos crecen y maduran simultáneamente (Figura 15, paso 2). Finalmente, los centriolos maduros migran a la superficie, donde se convierten en cuerpos basales, para la nucleación de los cilios (Figura 15, paso 3).



**Figura 15. Modelo de formación de cuerpos basales en células multiciliadas.** (A) Proceso de formación de cuerpos basales: Amplificación de procentriolos (paso 1). Crecimiento de procentriolos (paso 2). Proceso de separación de los cuerpos basales del centrosoma y acoplamiento a la membrana (paso 3) (Spassky and Meunier 2017).

Los cuerpos basales, una vez formados en el citoplasma, van a formar un complejo uniéndose con una vesícula citoplasmática proveniente del Golgi (vesículas del apéndice distal, DAV). Posteriormente, migran hacia la superficie apical a través de la red de filamentos de actina, para anclarse a la superficie mediante la fusión entre la membrana y la vesícula gracias al complejo proteico de acoplamiento a membrana de la vesícula (Vladar and Axelrod 2008) (Figura 16 a). Por ello, en este proceso, el citoesqueleto de actina juega un papel muy importante al estar implicado tanto en el tráfico vesicular (Sorokin 1968), como en el acoplamiento posterior a la membrana apical (Dawe et al. 2007, Boisvieux-Ulrich, Laine and Sandoz 1990). Se ha descrito que la proteína citoplasmática de señalización Dishevelled (Dvl) es necesaria en el transporte (Park et al. 2008) y el anclaje (Park, Haigo and Wallingford 2006) de los cuerpos basales a la membrana apical. También la activación de la proteína-G Rho esta implicado en el transporte y acoplamiento de los cuerpos basales, ya que es necesario para el ensamblaje de la red de actina de la zona apical (Pan et al. 2007). La proteína Rac, GTPasa perteneciente a la familia Rho, también parece estar implicada en este proceso (Epting et al. 2015). De este modo, Dvl y Rho/Rac podrían estar interactuando para llevar a cabo el proceso de acoplamiento (Park et al. 2008). (Figura 16 b).



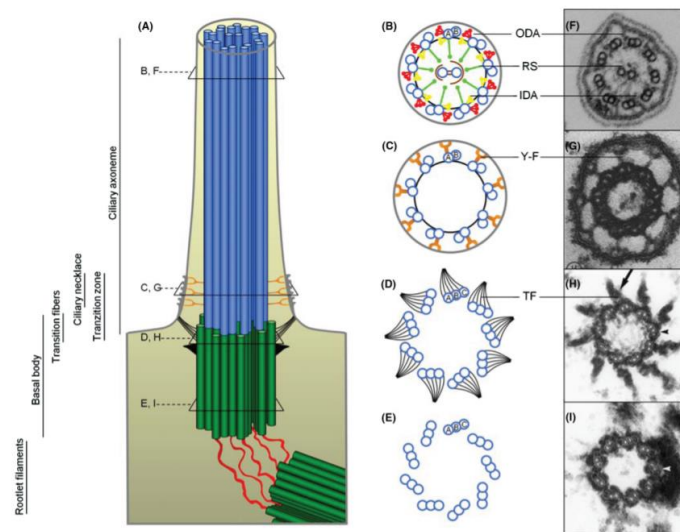
**Figura 16. Dishevelled (Dvl) controla el docking de los cuerpos basales en la membrana apical.** (a) En el interior celular se da lugar a la formación de múltiples cuerpos basales, que se asocian con vesículas para llevar a cabo la migración apical a través del citoesqueleto de actina. Posteriormente, el cuerpo basal se ancla a la superficie gracias a la fusión de la vesícula y la membrana. Los pies basales se asocian a los cuerpos basales antes del anclaje con la membrana. El axonema ciliar, que está encapsulado por la membrana, comienza su elongación desde el cuerpo basal tras el acoplamiento de éste con la membrana. La organización de los cuerpos basales en una misma dirección de movimiento ocurre gracias a la interacción de los pies basales con el citoesqueleto de microtúbulos. (b) La molécula Inturned une la Rho GTPasa al cuerpo basal, y es cuando Dvl activa Rho, que se cree que dirige el ensamblaje de los filamentos de actina. (c) Dvl y Rho activada son necesarias para la orientación de los cuerpos basales (Vladar and Axelrod 2008).

La asociación del citoesqueleto de actina con los cuerpos basales en la zona apical de la célula es esencial, ya que la alteración del mismo impide la correcta localización de los cuerpos basales y la ciliogénesis (Boisvieux-Ulrich et al. 1990, Werner et al. 2011). Además, el citoesqueleto de actina es muy importante en las adhesiones focales que se encuentran en la superficie apical entre las células epiteliales multiciliadas (Park et al. 2006, Pan et al. 2007, Werner et al. 2011).

Una vez los cuerpos basales están anclados a la membrana, el axonema ciliar crece a partir de ellos. Posteriormente, los cuerpos basales se alinean en la dirección del movimiento ciliar, polarizados en el plano del tejido. Se ha propuesto que dicha polarización se lleva a cabo mediante la interacción de los cuerpos basales con una red polarizada de microtúbulos (Figura 16 c).

### B) Formación de múltiples cilios móviles

Como hemos indicado, la nucleación del axonema se da tras el proceso de anclaje de los cuerpos basales a la membrana apical y paralelamente con la adquisición de la polaridad planar. Durante este proceso van a ir desapareciendo las estructuras 9+0, característica inequívoca de cilio primario de las RGCs, y todas las que se observan son las estructuras 9+2 características de los cilios móviles (Spassky et al. 2005) (Figura 17).



**Figura 17. Estructura longitudinal y transversal de un cilio móvil.** Vista esquemática longitudinal de cilio móvil (a) y vistas transversales esquemáticas (b-e) y de microscopía de transmisión (f-i) a nivel de cuerpo basal, zona de transición y axonema ciliar. ODA: Outer Dynein Arms, brazos de dineína externos; RS: Radial Spikes, radios laterales; IDA: Inner Dynein Arms, brazos de dineína internos; TF: Transition Fibers, fibras de transición (Pedersen et al. 2012).

En los estadios tempranos de la ciliogénesis el axonema incipiente del cilio sobresale con una extensión de membrana que le recubre. El cilio comenzará a crecer a partir del extremo positivo de los microtúbulos, mientras las vesículas del Golgi suplirán la necesidad del incremento de membrana durante el crecimiento del axonema, fusionándose con la membrana plasmática (Keeling, Tsiokas and Maskey 2016). Esta protuberancia que se va elongando desde su extremo,

da lugar a una zona de transición estructural entre los nueve tripletes de microtubulos del cuerpo basal y los nueve dobletes que forman el axonema ciliar (Figura 17) (Gilula and Satir 1972).

El crecimiento ciliar depende del sistema de transporte intraflagelar (IFT), sistema especializado en el transporte de proteínas hacia dentro y hacia afuera del cilio. Este sistema consta de dos complejos multiproteicos, IFT-A y IFT-B, que se encargan respectivamente del transporte retrógrado y de reciclaje de componenetes ciliares, y del transporte anterógrado para el transporte de precursores ciliares (Pedersen and Rosenbaum 2008, Piperno et al. 1998). El complejo anterógrado es dirigido hacia el extremo del cilio por kinesinas. Una vez que el complejo anterógrado llega al extremo positivo del cilio, se inactiva y se descarga, mientras que el complejo retrógrado se activa y transporta a este complejo de nuevo a la zona del cuerpo basal mediante la interacción con dineínas, junto con moléculas que haya que exportar del cilio (Keeling et al. 2016).

Este mecanismo de ciliogénesis da lugar al bolsillo ciliar o *ciliary pocket*, una hendidura de la membrana plasmática en la que yace parte del cilio maduro y que funciona como una plataforma de interacción funcional con el citoesqueleto de actina y con la maquinaria que regula el tráfico vesicular (Molla-Herman et al. 2010).

La longitud del cilio varía de un tipo celular a otro y la regulación de este proceso parece ser compleja, multifactorial y dependiente del contexto celular. Cuando el crecimiento del cilio se ha completado, el cilio permanece dinámicamente activo ya que nuevas moléculas de tubulina son incorporadas de manera continua al extremo del cilio, sin elongarse más gracias a un proceso de recambio continuo (Ishikawa and Marshall 2011, Garcia-Gonzalo and Reiter 2012).

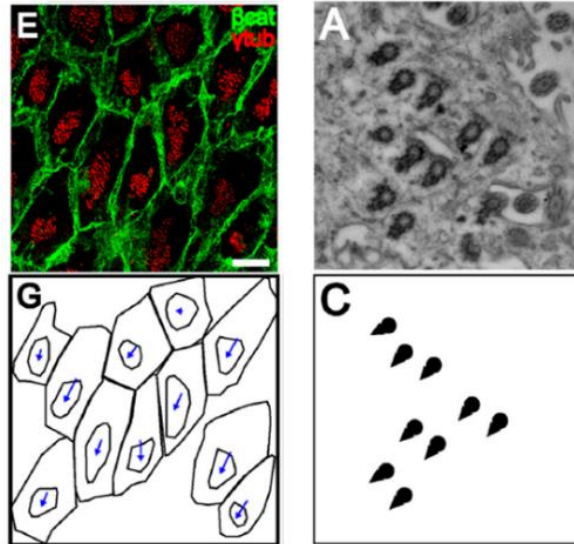
### **C) Establecimiento de la polaridad en células endimarias**

Las células endimarias presentan dos tipos de polaridad: la polaridad traslacional (PCPt) y la polaridad rotacional (PCPr) (Figura 18). La primera de ellas se corresponde con la localización de los cilios en la superficie apical de la célula y la segunda define la dirección de movimiento de los mismos (Hirota et al. 2010, Mirzadeh et al. 2010). El establecimiento de la polaridad comienza de manera paralela al anclaje de los cuerpos basales a la membrana apical y continúa durante la formación de los cilios. Además de establecerse a nivel celular, es necesario que la polaridad se establezca al nivel tisular, lo cual permitirá que el movimiento de los cilios sea coordinado (Werner et al. 2011).

La polaridad planar de las células endimarias es esencial para el movimiento del líquido cefalorraquídeo que circula por los ventrículos y las malformaciones de la función ciliar están muy



relacionadas con severas anomalías, como la hidrocefalia. Por ello es muy importante conocer las vías que regulan tanto la maduración de las células endimarias en general como la formación y orientación de los cilios en particular.



**Figura 18. Detalle representativo de tPCP y rPCP en células endimarias.** (A) Localización anterior del grupo de cuerpos basales en la membrana apical de las células endimarias. (B) Alineamiento de la orientación de los cuerpos basales de células endimarias (Mirzadeh et al. 2010).

#### 2.4 MECANISMOS REGULADORES DE LA DETERMINACIÓN DE LAS RGCs

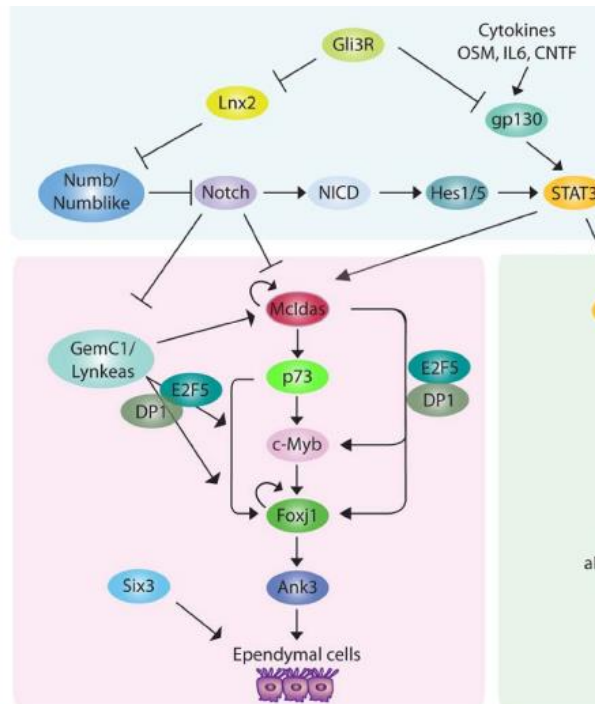
Multitud de mecanismos regulan la maduración de las células endimarias (Kyrousi et al. 2016). Como se ha descrito, las células endimarias se forman a partir de las RGCs (Merkle et al. 2004). Este proceso comienza en torno a los días E14-E16 cuando estas células se comprometen a generar ECs (Spassky et al. 2005) y sufren su última división celular. Sin embargo, van a mantener características de glia radial hasta los primeros días del periodo postnatal, cuando empieza el programa de diferenciación a ECs, que finalizará en torno al día P20.

En la diferenciación a ECs, la multiplicación de los cuerpos basales y la multiciliogénesis está regulado por el factor de transcripción Foxj1 (Jacquet et al. 2009). En los últimos estadios del estado embrionario, Foxj1 se expresa en RGCs BLBP+ (proteína cerebral de unión a lípidos, *Brain lipid-binding protein*), pero progresivamente Foxj1 va a comenzar a expresarse en células con marcaje de ECs como S100β, mientras que deja de expresarse en NSCs (Jacquet et al. 2009), sugiriendo que FoxJ1 se expresa en la subpoblación de RGCs que se encuentran comprometidas con el linaje endimario antes de su diferenciación.

Las ECs y las NSCs en la pared lateral establecen uniones adherentes y estrechas, que se derivan de la especialización de las uniones que existían entre las RGCs que las han generado, y



que son básicas para mantener la citoarquitectura del nicho neurogénico (Paez-Gonzalez et al. 2011). La especialización de estas uniones está regulada por Ank3 (Ankyrin-3), proteína perteneciente a la familia de las Ankirinas, que actúa de adaptador en la organización de dominios de membrana en diferentes tipos celulares (Bennett and Healy 2008). La expresión de Ank3 se restringe a la población de RGCs que se van a diferenciar a ECs, mediante su regulación directa por Foxj1 (Paez-Gonzalez et al. 2011) (Figura 19).



**Figura 19. Mecanismos reguladores de la determinación de las RGCs a ECs.** El compromiso de la RGCs a diferenciarse a ECs ocurre a través de la expresión de GemC1/Lynkeas y McIdas, lo cual desencadena una cascada molecular en la que están implicados p73, c-Myb, Foxj1, Ank3 y Six3 que activan la diferenciación endotelial (Kyrousi et al. 2016).

También se ha descrito a Six3 (*Homeobox protein Six3*) como regulador de la transición de RGCs a ECs, posteriormente de la regulación de Foxj1 (Figura 19). En ausencia de Six3, se generan ECs erróneas ya que, a pesar de expresar S100β y presentar múltiples BBs, mantienen la expresión de marcadores de glia radial como BLBP y GLAST (transportador de glutamato y aspartato) (Lavado and Oliver 2011).

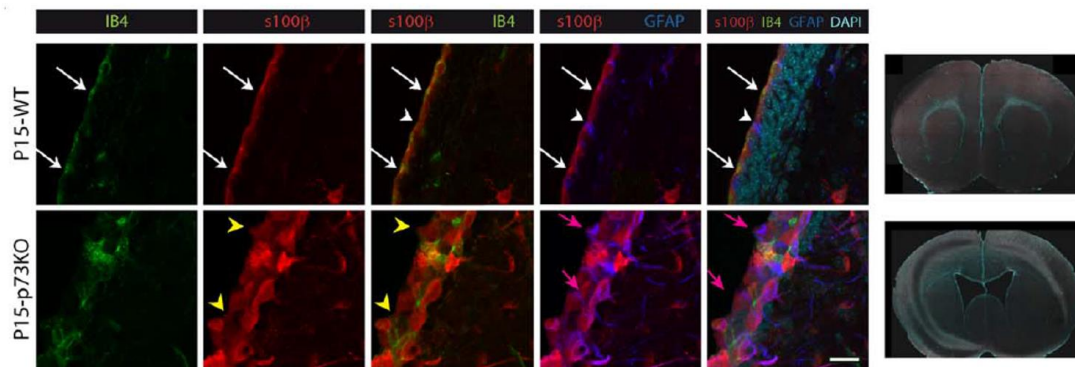
El papel de las moléculas McIdas y GemC1/Lynkeas en el compromiso de las RGCs a ECs ha sido recientemente estudiado. Estas proteínas están implicadas en la regulación del ciclo celular (Balestrini et al. 2010, Caillat et al. 2015, Pefani et al. 2011) y se ha descubierto que participan en el proceso de compromiso de las RGCs, pero no en la diferenciación a ECs (Kyrousi et al. 2016, Kyrousi et al. 2015). Además, proteínas están negativamente reguladas por la vía Notch. De este modo las RGCs mantienen el estado indiferenciado mientras la señal de Notch está activa, pero

cuando ésta se inhibe, la señalización es inhibida y McIdas y GemC1/Lynkeas promueven el proceso de compromiso de las RGCs para diferenciarse a ECs (Kyrrousi et al. 2015) (Figura 19).

La correcta ejecución de todos estos mecanismos de regulación es esencial para el desarrollo de las características morfofuncionales de estas células.

## 2.5 PAPEL DE P73 EN EL DESARROLLO DE LA REGIÓN SVZ

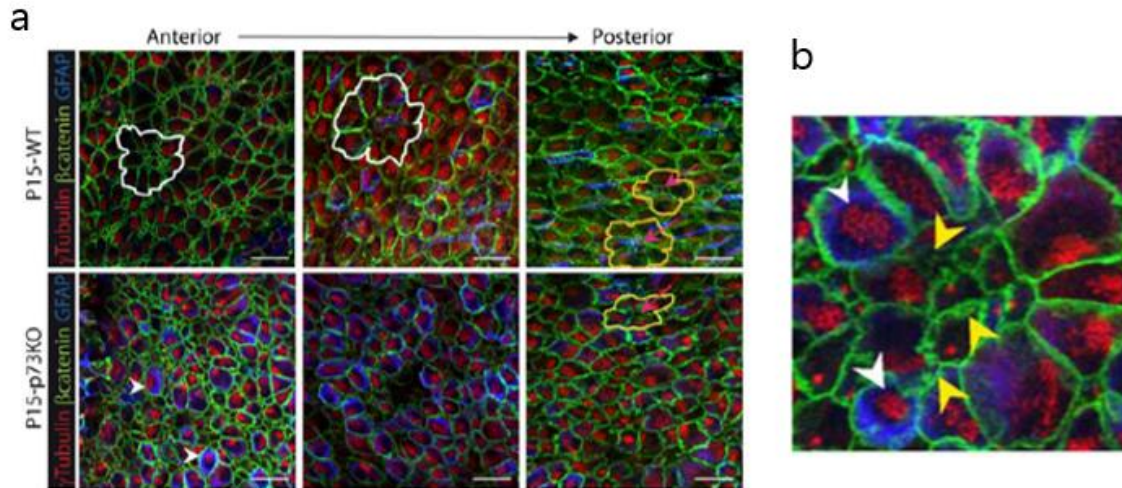
Como se ha descrito anteriormente, p73 ejerce un papel importante en el desarrollo del CNS. Nuestro grupo ha demostrado que la función de p73, no es solo necesario para el mantenimiento *in vitro* de las NSCs, si no también para su mantenimiento en el nicho germinal (Gonzalez-Cano et al. 2016, Gonzalez-Cano et al. 2010). La ausencia de p73 tiene profundas consecuencias en la generación de la región SVZ durante su desarrollo perinatal. La falta de p73 altera la transformación de las RGCs en ECs y NSCs. En ausencia de p73 se generan células inmaduras que presentan un patrón de expresión de marcadores erróneo. Las ECs carentes de p73 son incapaces de establecer las interacciones célula-célula necesarias para formar un epéndimo funcional. Por ello, este epéndimo presenta una apariencia pseudo-estratificada y una disposición celular discontinua, perdiéndose así la integridad de la barrera endotelial (Figura 20) (Gonzalez-Cano et al. 2016).



**Figura 20. La falta de p73 da lugar a la pérdida de la integridad de la pared del ventrículo.** La pared lateral en los ratones WT es un epitelio monoestratificado de células endoteliales S100β+/IB4+ (flechas blancas) con algunas células B GFAP+/S100β+ (cabezas de flechas blancas). La falta de p73 da lugar a un epitelio pseudoestratificado y una pared discontinua (cabezas de flecha amarillas) con células S100β+/GFAP+ (flechas rosas) con una prolongación similar a la que presentan las RGCs (Gonzalez-Cano et al. 2016).

Además, p73 es esencial para la formación de los *pinwheels* en la pared lateral del ventrículo. En ausencia de p73 la citoarquitectura de la pared lateral se encuentra alterada, apenas se forman *penwheels* (Figura 21) y las células endoteliales presentan en su membrana múltiples ondulaciones (Figura 21), lo que sugiere que las uniones celulares podrían estar afectadas.

Por otro lado, las células monociliadas en la región SVZ que se detectaron en estos ratones, presentan marcadores y morfología aberrante, indicando que no son *bona fide* NSCs. En conjunto, la falta de p73 parece ser necesaria para la correcta determinación del RGCs *cell fate* y para su diferenciación. Por ende, p73 es esencial en el establecimiento de la citoarquitectura celular de la región SVZ. Sin embargo, desconocemos tanto la isoforma (o isoformas) de p73 que regula la maduración de las células endimarias, como los mecanismos moleculares subyacentes.



**Figura 21. La falta de p73 impide el correcto establecimiento de la citoarquitectura de la pared lateral y la organización de las ECs en *pinwheels*.** (a) Los ratones WT presentan pre-pinwheels (línea blanca) y pinwheels (línea amarilla), mientras que los ratones p73KO apenas se forman estas estructuras (b) y se pueden observar multitud de ondulaciones en las membranas. Las cabezas de flecha blancas muestran las ECs con expresión de GFAP, las cabezas de flecha amarillas las ondulaciones en las membranas y las flechas rosas el centro de los *pinwheels* (Gonzalez-Cano et al. 2016)

### 3. POLARIDAD CELULAR PLANAR

La polarización celular se refiere a la distribución organizada de componentes celulares en dos polos opuestos de la célula. Generalmente, pero no siempre, la polaridad celular se establece en epitelios. En las células que constituyen estos tejidos se definen dos tipos de polaridad: ápico-basal, referida a la distribución asimétrica de componentes celulares entre dos superficies de una capa de tejido; y polaridad planar, referida a la organización en el plano del epitelio y perpendicular a la polaridad apico-basal (Butler and Wallingford 2017).

La Polaridad Celular Planar (PCP) describe la polarización coordinada de células, o de sus componentes, en el plano del tejido (Goodrich and Strutt 2011). Fueron muchos los autores de mediados del siglo pasado los que hicieron mención a este tipo de polaridad en tejidos de diferentes insectos como Wigglesworth en *Rhodnius* (1940) (WIGGLESWORTH 1940), Lawrence, en *Oncopeltus* (1966) (LAWRENCE 1966) o Gubb y Garcia-Bellido en *Drosophila* (1982) (Gubb and Garcia-Bellido 1982). Finalmente se acuñó el término "polaridad planar" en *Dysdercus*

*intermedius*, los chincles del algodón (Nubler-Jung and Grau 1987), para describir la organización espacial de estructuras en las cutículas de insectos. Sin embargo, ha sido en *Drosophila melanogaster*, debido a la homogeneidad y simplicidad de sus alas, donde los mecanismos de polaridad planar se han descrito más extensamente (Maung and Jenny 2011, Strutt 2009, Strutt and Strutt 2009, Strutt and Strutt 2005), convirtiéndose en el modelo por excelencia de análisis genéticos en el estudio de la PCP.

Posteriormente, los estudios sobre PCP se hicieron extensivos a tejidos de vertebrados, incluidos mamíferos, evidenciando claramente la conservación evolutiva de este sistema en el reino animal (Goodrich and Strutt 2011, Wang and Nathans 2007). Este hecho da una idea de la importancia de la función fisiológica de estos procesos en el desarrollo y homeostasis de los animales multicelulares.

La polaridad planar en vertebrados ha sido estudiada tanto durante el desarrollo embrionario como en estadio adulto. La Polaridad Celular Planar es fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso central (Tissir and Goffinet 2013), en el desarrollo de las extremidades (Gao and Yang 2013) y en el correcto funcionamiento de diversos órganos del sistema respiratorio, el sistema reproductor y el sistema nervioso central (Spassky and Meunier 2017).

### 3.1 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA POLARIDAD CELULAR PLANAR

Estudios multidisciplinarios han llevado a proponer un modelo de regulación de la PCP de tres pasos, cada uno regulado por un módulo de señalización (Tree, Ma and Axelrod 2002):

- Módulo global o de señalización direccional: establece la dirección de la polarización respecto al eje del tejido.
- Módulo de propagación de la asimetría, módulo Fat/Dachsous/FourJointed (Ft/Ds/Fj) y módulo de la Polaridad Celular Planar (PCP) o *core-PCP*: interpreta las señales globales para generar la localización asimétrica de complejos moleculares de señalización que propagarán la asimetría en el eje del plano.
- Módulo efector: que traducirá las asimetrías moleculares en cambios morfológicos manifiestos, estableciendo la polarización intracelular.

Esta visión lineal de señalización (Matis and Axelrod 2013) no siempre ha sido demostrada, dándose escenarios en los que el módulo Ft/Ds/Fj y el módulo *core-PCP* actúen

independientemente en paralelo (Casal, Lawrence and Struhl 2006) o siendo el segundo dirigido por el primero (Matakatsu and Blair 2004).

### 3.1.1 Módulo global: Regulación mediante morfógenos

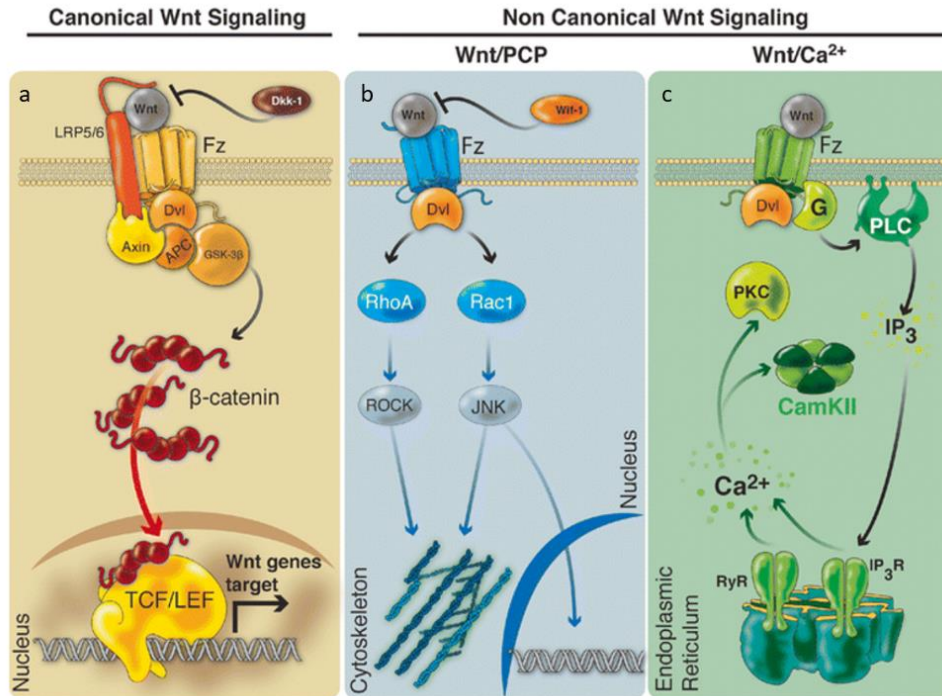
La coordinación local de la PCP requiere un sistema de información previa que determine la correcta orientación respecto al eje del tejido. Se ha determinado que esta información viene dada por gradientes de difusión de morfógenos, los cuales proporcionarán la señalización direccional necesaria para inducir la localización asimétrica de los componentes del siguiente módulo.

Los morfógenos pertenecen a una serie de familias protéicas: Wnt, Hedgehog (Hh), TGF $\beta$ , EGF y FGF. Estas moléculas son producidas y secretadas localmente estableciendo gradientes de difusión, siendo así capaces de cambiar el comportamiento de las células vecinas a una cierta distancia (Briscoe and Small 2015). La señal activada por estos morfógenos viene determinada por la concentración del mismo (Rogers and Schier 2011, Dessaud et al. 2007, van Boxtel et al. 2015), por la distancia entre la fuente de dicha señal y las células diana (Meinhardt 1978, Crick 1970) y por la velocidad de difusión del morfógeno, y todo ello determinará la dinámica, el tipo y la duración de la señal activada (Rogers and Schier 2011, Sagner and Briscoe 2017).

La familia de proteínas Wnt, moléculas de señalización ampliamente implicadas en desarrollo (Grigoryan et al. 2008, Xiao et al. 2017), participa en multitud de procesos que regulan la polaridad, motilidad, proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo (van Amerongen and Nusse 2009, Gao et al. 2011, Kilian et al. 2003, Marlow et al. 2002, Qian et al. 2007).

Las proteínas Wnt actúan como ligandos de diferentes receptores celulares entre los que se encuentran la familia de receptores Frizzled, las proteínas LRP 5 y 6 (receptores de lipoproteínas de baja densidad), Ror2 (receptor de transmembrana tirosin-quinasa) y Ryk (receptor tirosin-quinasa). Una vez que Wnt se une a su receptor, la señal es transducida al interior celular. Esto es posible gracias a la proteína Dishevelled (Dvl), que interacciona con Frizzled (Fz) directamente (Wallingford and Habas 2005). A nivel de Dvl, la señal Wnt puede activar tres rutas de señalización diferentes, que se clasifican en vía wnt canónica, dependiente de  $\beta$ -catenina (Figura 22, a), y vía wnt no canónica, independiente de  $\beta$ -catenina, la cual se subdivide en vía de la Polaridad Celular Planar (Figura 22, b) y la vía Wnt/Ca<sup>+</sup> (Figura 22, c) (Komiyama and Habas 2008). De ellas, vamos a analizar en detalle la implicada en la regulación de la Polaridad Celular Planar (a partir de ahora Wnt/PCP) (Figura 22, b) en el 3.1.3 (Módulo de efectores). En humano y ratón han sido

identificados 19 miembros de la familia de proteínas Wnt, las cuales también pueden ser clasificados en ligandos Wnt de la vía canónica (Wnt1 o Wnt3a) y de la vía no canónica (Wnt5a, Wnt11 o Wnt4).



**Figura 22. Vías de señalización Wnt.** La señalización Wnt puede dar lugar a la activación de tres vías en el interior celular: (a) La vía canónica de Wnt, también llamada vía de Wnt/β-catenina. La interacción de Wnt-Fz requiere la unión al co-receptor LRP5/6 para el posterior reclutamiento de Dvl. Tras una serie de fosforilaciones, β-catenina se disocia de su complejo de destrucción y se transloca al núcleo donde interacciona con factores de transcripción para inducir la expresión de genes diana. (b) La vía no canónica Wnt-PCP. Wnt-Fz recluta Dvl y activa GTPasas como Rho y Rac, que a su vez activarán JNK (*Jun-N-terminal kinase*) que puede traslocarse al núcleo para activar la expresión de genes diana o modificar la estabilidad del citoesqueleto. (c) La vía no canónica Wnt/Ca<sup>2+</sup>. La señalización de Dvl tras la unión a Wnt-Fz, estimula proteínas G triméricas y la fosfolipasa c (PLC), que aumenta la producción de IP<sub>3</sub> (*inositol-3-phosphate*) desencadenando el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, activando proteínas dependientes del mismo, como PKC (*protein kinase C*) o CaMKII (*calcium-calmodulin protein kinase II*) (Lambert, Cisternas and Inestrosa 2016).

### 3.1.2 Módulo de propagación de la asimetría

#### 3.1.2.1 Módulo Fat/Dachsous/ Four-jointed (Ft/Ds/Fj)

Este sistema engloba las protocaderinas Ft, Ds y la kinasa de trans-membrana localizada en el aparato de Golgi, Fj (Matis and Axelrod 2013, Thomas and Strutt 2012). La implicación de la vía Ft/Ds/Fj en la polaridad planar se comenzó a estudiar tras la observación de la formación de un patrón en forma de remolino en las alas de *Drosophila* tras la mutación de alguno de los genes implicados, indicando una pérdida de la orientación global, pero no de la local. En los sistemas hasta ahora estudiados en *Drosophila* (Clark et al. 1995, Brodsky and Steller 1996, Ma et al. 2003), tanto Fat como Ds están expresadas en localizaciones apuestas en las células. De este modo van

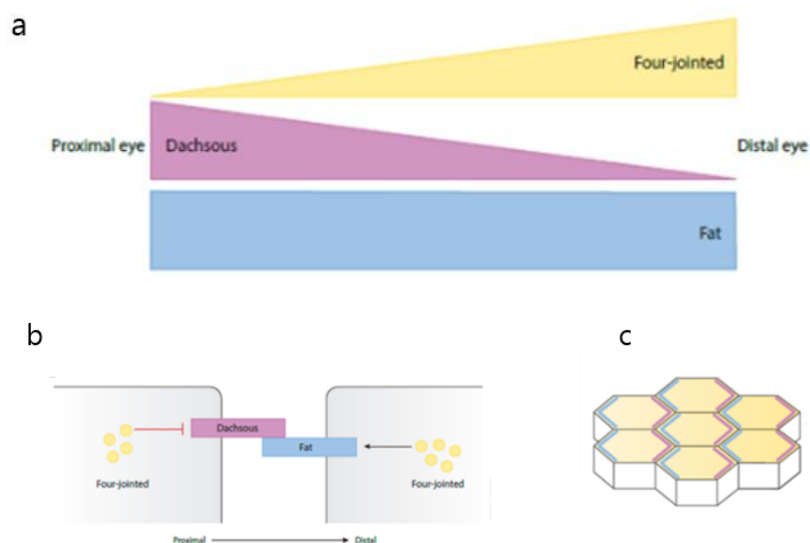


a formar interacciones heterofílicas intercelulares, propagando la polaridad a lo largo del tejido (Matakatsu and Blair 2004, Ambegaonkar et al. 2012, Brittle, Thomas and Strutt 2012).

La subfamilia de caderinas atípicas Fat está muy conservada desde moscas hasta mamíferos (Dunne et al. 1995, Ponassi et al. 1999, Mitsui et al. 2002, Rock, Schrauth and Gessler 2005). La proteína Fat presenta en su estructura 34 repeticiones caderina, 5 repeticiones *EGF-like* y dos motivos laminina A-G (Tanoue and Takeichi 2005, Mahoney et al. 1991). Mientras que en *Drosophila* existen dos isoformas de esta proteína, Fat y Fat-like (Mahoney et al. 1991, Castillejo-Lopez, Arias and Baumgartner 2004), en vertebrados se han identificado cuatro: Fat1, Fat2, Fat3 y Fat4 (Tanoue and Takeichi 2005). De entre todas ellas, se cree que Fat4 es el ortólogo de Fat en *Drosophila* debido a su similitud de secuencia (Katoh 2012).

Dachsous también pertenece a la familia de las caderinas atípicas conteniendo 27 repeticiones caderina en su dominio extracelular (Clark et al. 1995). Finalmente, Four-Jointed, cuyo ortólogo en vertebrados es FJX1, es una glicoproteína de transmembrana tipo II localizada en el aparato de Golgy que regula la función de Fat y Dachsous mediante fosforilaciones en sus regiones caderina.

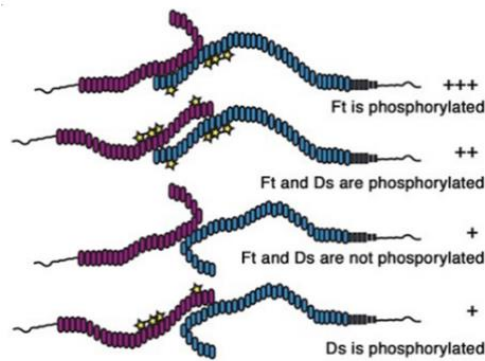
La vía Ft/Ds/Fj juega un papel muy importante en el establecimiento de la Polaridad Planar (Hale and Strutt 2015, Adler, Charlton and Liu 1998, Rawls, Guinto and Wolff 2002). En *Drosophila*, Ds y Fj son expresados en gradientes opuestos, de manera que Fj establece un gradiente en dirección distal-apical, mientras que Ds lo hace en dirección opuesta (Figura 23, a). Sin embargo, Fat mantiene la misma expresión a lo largo del tejido (Ambegaonkar et al. 2012, Brittle et al. 2012, Thomas and Strutt 2012, Goodrich and Strutt 2011).



**Figura 23. Esquema de la localización de los componentes de la vía Ft/Ds/Fj.** Figura representativa de la localización asimétrica de Fat y Dachsous y la dinámica de distribución a lo largo del tejido de los componentes de la vía. (a) Ds y Fj

son expresados en patrones complementarios. (b) Los dominios extracelulares de Ft y Ds se unen heterofílicamente a ambos lados de la membrana, estando Ft localizado en la zona proximal y Ds en la distal. Fj fosforila a Ft y Ds con diferentes resultados. Si fosforila Ft se mejora la unión, si fosforila Ds la unión se inhibe. (c) Localizaciones asimétricas de Ft y Ds en la célula (Hale and Strutt 2015).

Ft y Ds, a través de sus dominios extracelulares, van a interactuar heterofílicamente entre células vecinas (Figura 23, b y c) (Hale and Strutt 2015). La interacción entre estas proteínas está modulada mediante fosforilaciones en sus dominios extracelulares llevadas a cabo por la kinasa Fj (Ishikawa et al. 2008, Matakatsu and Blair 2004, Brittle et al. 2010, Simon et al. 2010). Fj fosforila residuos sememejantes en ambas proteínas, pero produce efectos opuestos. La fosforilación en Ft es capaz de estimular la unión de ésta con Ds, mientras que fosforilación en Ds la inhibe (Figura 24) (Brittle et al. 2010, Simon et al. 2010). Debido al gradiente de expresión de estas proteínas, una célula tendrá, en la membrana de su región distal Ft muy activo para interactuar con el Ds de su célula vecina, estableciéndose así asimetrías subcelulares (Figura 23, c).



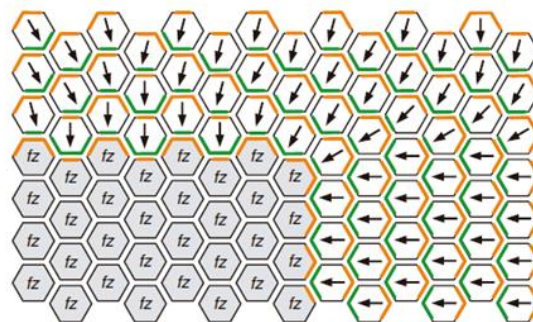
**Figura 24. Modelo de interacción entre Ft y Ds.** Esquema representativo de los cambios conformacionales que sufren Ft y Ds debido a la fosforilación de Fj. Estos cambios proporcionan una explicación a las diferencias en la afinidad de la unión entre ambas proteínas (Hale et al. 2015).

### 3.1.2.2 Módulo *core-PCP*

Este módulo funciona estableciendo bucles de retroalimentación positiva que van a generar asimetrías intracelulares en respuesta a una señal global de polarización. Esta constituido por las denominadas proteínas *core-PCP*, que van a formar complejos proteicos a ambos lados de la célula. En el complejo proximal se encuentran Celsr (receptor de caderina EGF LAG tipo G de siete pasos transmembrana) / Vang (proteína Van Gogh) / Pk (Prickle); y en el complejo distal Celsr / Fz (Frizzled) / Dsh (Dishevelled) / Dgo (Diego). La señalización de estos complejos moleculares activará, asimétricamente, módulos efectores intracelulares que serán los encargados de manifestar morfológicamente la polarización planar a lo largo del tejido (Chen et al. 2008, Strutt and Strutt 2008, Wu and Mlodzik 2008).



La vía *core-PCP* está muy conservada a lo largo del reino animal debido a su papel esencial en el desarrollo y el funcionamiento de tejidos y órganos tanto en células epiteliales como no epiteliales (Hale and Strutt 2015). El estudio del papel de las proteínas *core* en el establecimiento de la polaridad comenzó en las alas de *Drosophila*. En un modelo en forma de mosaico, la mutación de alguna de las proteínas *core* en un grupo de células daban lugar a cambios en la dirección de crecimiento de tricomas en las células vecinas (Figura 25) (Klein and Mlodzik 2005, Gubb and Garcia-Bellido 1982, Vinson and Adler 1987, Wong and Adler 1993), indicando la función no autónoma de estas proteínas y su relevancia en el establecimiento de polaridad coordinada.



**Figura 25. Modelo de cambio de polaridad en ausencia de la vía *core-PCP*.** Esquema representativo del cambio que ejerce la ausencia de la proteína *core* Fz sobre la polaridad de sus células vecinas. Células carentes de Fz (gris) sólo son capaces de formar complejos que contienen Vang (naranja), interaccionando con Fz (verde) en las células no mutadas vecinas. Esta polaridad anómala en complejos de unión se propaga por las células vecinas (Goodrich and Strutt 2011).

El módulo *core-PCP* está implicado en multitud de procesos de desarrollo durante el estadio embrionario (Roszko, Sawada and Solnica-Krezel 2009, Wallingford 2012), por ejemplo, durante el proceso de extensión convergente (Wallingford and Harland 2002), el desarrollo de extremidades corporales (Gao and Yang 2013), la división asimétrica en el desarrollo cerebral (Lake and Sokol 2009), la ramificación de los bronquios y del riñón (Yates et al. 2010) y la organización de estructuras epiteliales (Devenport and Fuchs 2008). Por tanto, fallos en la función de las proteínas *core* puede dar lugar a patologías asociadas al desarrollo anómalo del tubo neural y de las vías respiratorias, renales y auditivas entre otros.

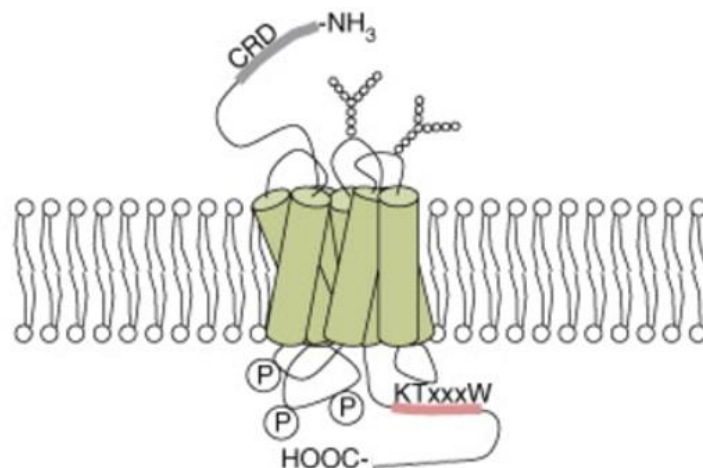
↳ Se ha descrito que en las MCC (células multiciliadas) que tapizan la tráquea se requiere la señalización del *core-PCP* para la producción de múltiples cilios. Durante el proceso de multiciliogénesis, las MCCs sufren cambios en el citoesqueleto necesarios para orientar los cilios en una dirección común tanto intracelular como intercelularmente. Durante la producción de cilios en las MCCs, éstos son orientados hacia el lado proximal de la célula mediante el citoesqueleto de microtúbulos de un modo dependiente de las proteínas *core*. La mutación de alguna de las proteínas del *core-PCP* conlleva fallos tanto en la organización de los cilios, como

en la elongación de su axonema. Esto demuestran que, al menos en las MCCs traqueales, el proceso de multiciliogénesis es dependiente de la polarización del módulo *PCP-core* (Vladar et al. 2016).

El *core-PCP* está formado por un conjunto de proteínas: Frizzled (Fz), Vangl (proteína Van Gogh-like; denominada Strabismus, Stbm o Vang en *Drosophila*), Celsr (receptor de caderina EGF LAG tipo G de siete pasos transmembrana; denominada Flamingo o starry night en *Drosophila*), Prickle (Pk), Dishevelled (Dvl; denominada Dsh en *Drosophila*) y Diego (Dgo) (Simons and Mlodzik 2008, McNeill 2010).

### A) Frizzled: Receptores de clase C asociados a proteína

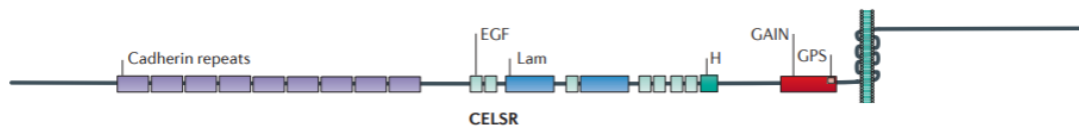
La función del gen *frizzled* (*fz*) fue identificado por primera vez en *Drosophila* en 1982 (Gubb and Garcia-Bellido, 1982), con la observación de la pérdida de la orientación de tricomas del ala de la mosca en los individuos mutantes. La proteína Frizzled es una proteína de siete pasos transmembrana (Figura 26) que se localiza en las uniones distales de las células. Extracelularmente, esta proteína actúa de receptor de ligandos de la familia Wnt, siendo capaz de establecerse la unión de diferentes isoformas de Fz con varias isoformas de Wnt, probablemente debido a la alta conservación de esta zona de unión en las diferentes isoformas (Janda et al. 2012, Kikuchi, Yamamoto and Kishida 2007). Intracelularmente, recluta a las proteínas Dishevelled y Diego a la membrana. Esta proteína en *Drosophila* presenta una sola isoforma, mientras que en vertebrados se han descrito diez isoformas.



**Figura 26. Representación esquemática de la proteína Frizzled.** Figura representativa de los dominios estructurales de la proteína Frizzled, donde se representan los siete pasos transmembrana y los posibles sitios de glicosilación y fosforilación. El dominio N-terminal CDR (dominio rico en residuos de cisteína) (gris) es la zona de unión de ligandos extracelulares y el dominio C-terminal KTxxxW (naranja) es la zona de interacción proteica intracelular, la cual está muy conservada entre las diferentes isoformas de Fz ya que es necesario para la unión con Dishevelled (Schulte and Bryja 2007).

### B) Celsr: receptor de caderina EGF LAG tipo G de siete pasos transmembrana

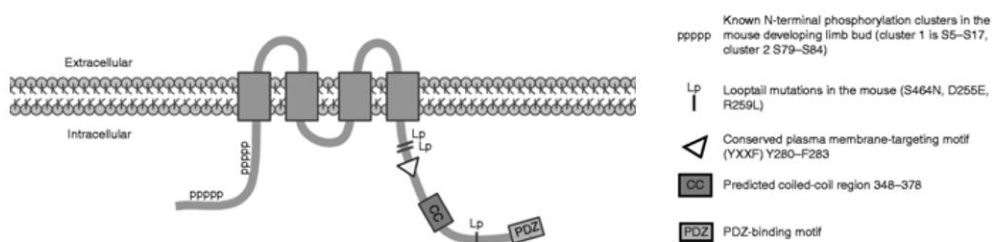
El gen *flamingo (fmi)*, también conocido como *starry night (stan)*, fue identificado por primera vez en *Drosophila* asociado al mantenimiento de la polaridad. Codifica para una proteína de siete pasos transmembrana con un dominio extracelular grande de nueve dominios cadherina (Figura 27), y se localiza tanto en el lado distal como en el proximal de la célula, donde puede formar homodímeros con otras proteínas Celsr de las células vecinas (Usui et al. 1999). Además, esta cadherina atípica interacciona con los complejos Dhs/Fz y Vang/Pk, estabilizándolos y propagando la señal de PCP (Simons and Mlodzik 2008, Chen et al. 2008). Esta proteína en *Drosophila* presenta una sola isoforma, mientras que en vertebrados se han descrito tres isoformas.



**Figura 27. Representación esquemática de la proteína Celsr.** Figura representativa de los dominios estructurales de la proteína Celsr. El dominio extracelular contiene repeticiones cadherina, un dominio EGF (factor de crecimiento epidérmico), un dominio Lam (laminina), motivos receptores de hormonas (H), y un dominio GAIN (*GPCR-autoproteolysis-inducing*) que contiene un sitio proteolítico GPCR (*G-protein-coupled receptors*) también llamado GPS (*GPCR proteolytic site*) (Tissir and Goffinet 2013).

### C) Vangl: Proteína Van Gogh-like

El gen *strabismus (stabm)* también llamado *van gogh (Vang)* en *Drosophila*, cuyo ortólogo es *vang-like (Vangl)* en vertebrados, se describió originalmente en 1949, debido a que tras la mutación del mismo se producían defectos en el desarrollo del tubo neural (Strong and Hollander 1949). Codifica para una proteína de cuatro pasos transmembrana (Figura 28), que presenta un dominio citosólico capaz de unirse a Prickle, reclutándolo en el entorno de la membrana. Además, Vang es capaz de interactuar con Celrs en la membrana. Esta proteína presenta una sola isoforma en *Drosophila* y dos en vertebrados.



**Figura 28. Representación esquemática de la proteína Vangl.** Figura representativa de los dominios estructurales de la proteína Vangl2. El dominio N-terminal contiene dos regiones ricas en residuos serina, cuya fosforilación en respuesta a la señal de Wnt5a regula su localización asimétrica (Gao et al. 2011). El dominio C-terminal presenta dos motivos de interacción proteica (Hatakeyama et al. 2014).

#### D) Prickle

El gen *prickle* (*pk*) codifica para una proteína con tres dominios LIM, un dominio PET (Figura 29) y un lugar para unión de grupos prenilo en el extremo C-terminal. Vangl es capaz de unirse a Pk y reclutarlo al entorno de la membrana, pero posee grupos farnesilo con los que puede asociarse a la membrana sin necesidad de la presencia de Vangl. La competición que existe entre Pk y Dgo por la unión de Dvl va a dar lugar a la asociación de este último con Fz, y su localización en el lado proximal de la célula (Jenny et al. 2005), Tree et al., 2002). Esto da lugar a que el complejo que se forma entre Pk y Vangl se localice en el distal (Bastock, Strutt and Strutt 2003), Jenny et al., 2003; Strutt et al., 2011). Esta proteína posee secuencias de traslocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción, denominado REST/NRSF, necesario en la represión de genes neuronales en tejidos no neuronales (Chong et al. 1995, Schoenherr and Anderson 1995). En *Drosophila* esta proteína presenta una isoforma, mientras que en vertebrados presenta cuatro.



**Figura 29. Representación esquemática de la proteína Prickle.** Figura representativa de los dominios estructurales de la proteína Prickle, que presenta un dominio PET (*PET: Prickle, Espinas, Testin*) seguido de varios dominios LIM (L) (*LIM: Linl-1, Isl-1, Mec-3*) (Tissir and goffinet, 2013).

#### E) Dishevelled

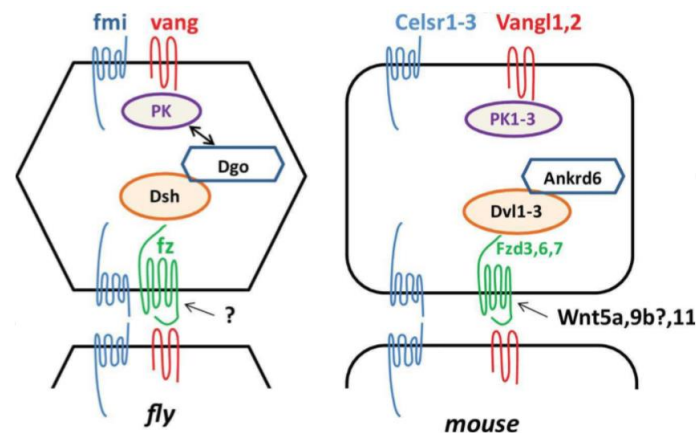
Dishevelled (Dsh en *Drosophila*, Dvl en vertebrados) (Figura 30) es una molécula de señalización muy estudiada por su implicación en las vías canónica y no canónica de Wnt/Fz. El gen *dsh* se identificó por primera vez en 1959 (Fahmy and Fahmy 1959) debido a que su ausencia daba lugar a defectos en la organización de las cerdas presentes en el cuerpo y las alas de *Drosophila*. En vertebrados esta molécula se conoce como Dvl y presenta tres isoformas (Mlodzik 2016).



**Figura 30. Representación esquemática de la proteína Dishevelled.** Figura representativa de los dominios estructurales de la proteína Dishevelled, que presenta en la región N-terminal un dominio DIX (*Dsh and Axin domain*) y un dominio PDZ (PSD95, DGL1 and ZO1 domain), seguido por un motivo DEP (*Dsh, Egl-10 and Pleckstrin motif*), motivo esencial para su unión a Fz en membrana (Pan et al., 2004) y por tanto para llevar a cabo su función en polaridad, y una secuencia Dsh final (Tissir and goffinet, 2013).

Las proteínas *core* se localizan de manera asimétrica en la célula, de tal modo que Frizzled se ubica en las uniones distales de la célula con sus compañeros citosólicos Dishevelled y Diego,

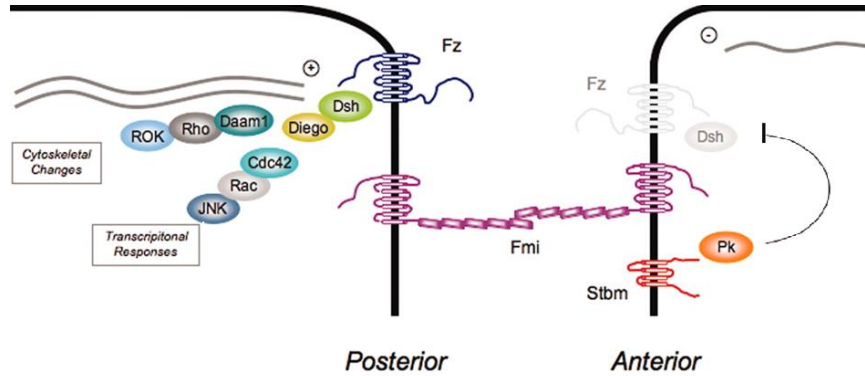
mientras que Vangl se localiza en las uniones proximales con su compañero citosólico Prickle (Figura 31) (Tree et al. 2002, Bastock et al. 2003). La proteína Celsr se localiza a ambos lados de la célula, distal y proximal, donde va a formar homodímeros entre células vecinas (Usui et al. 1999, Shimada et al. 2001, Strutt 2009). La localización asimétrica de estas proteínas se da como resultado de la formación de complejos Frizzled-Celsr y Vangl-Celsr en lados opuestos de la célula (Figura 31). La pérdida de actividad de cualquiera de estas proteínas da lugar a la pérdida de la localización asimétrica del resto y de la polaridad celular planar (Simons & Mlodzik, 2008).



**Figura 31. Esquema de la organización de las proteínas PCP.** Las proteínas PCP se organizan de manera análoga en las células de *Drosophila* y en las de ratón (Wansleeben and Meijlink 2011).

En el ala de *Drosophila*, las proteínas del *core-PCP* se transportan distalmente hacia las membranas a través de una red de microtúbulos (Shimada et al., 2006 (Shimada et al. 2006); Strutt and Strutt, 2008). La proteína de transmembrana Fmi se cree que sufre un proceso de flujo endocítico, hasta que su estabilidad en membrana aumenta mediante la unión a las proteínas Fz y Vang, formando los complejos Fmi-Vang y Fmi-Fz entre las células vecinas (Strutt et al., 2011). Estos complejos se van a localizar asimétricamente en la membrana a ambos lados de la célula, sugiriendo este punto como el inicio de la asimetría de las *core-PCP* en la célula, que se va a amplificar por interacciones de positivas y negativas entre las proteínas del *core-PCP* (Tree et al., 2002; Cho et al., 2015; Strutt and Strutt, 2007). Además, los complejos Fmi-Vang y Fmi-Fz son capaces de interactuar extracelulares entre ellos (Wu and Mlodzik, 2008; Chen et al., 2008; Strutt and Strutt, 2008; Wu and Mlodzik, 2008). En estas interacciones, Fmi forma homodímeros entre las células vecinas, sin embargo, esta unión va a funcionar de manera asimétrica en dichas células vecinas al reclutar distintas proteínas a ambos lados (Chen et al., 2008; Strutt and Strutt, 2008; (Struhl, Casal and Lawrence 2012). Por otro lado, la proteína Pk es capaz de unirse e inhibir la localización de Dsh, pero Dgo va a competir con Pk por la unión de Dsh, lo cual va a promover la asociación de Dsh con Fz (Jenny et al., 2005; Tree et al., 2002). Además, Pk interactúa con Vang

en el lado opuesto de la célula (Bastock et al., 2003; Jenny et al., 2003; Strutt et al., 2011) y está implicado en la internalización de Vang y Vang-Fmi que no están asociados de manera estable (Cho et al., 2015).



**Figura 32. Vía core-PCP de señalización.** La caderina atípica Fmi forma homodímeros y se localiza tanto en la zona anterior como en la posterior de las membranas celulares. Sin embargo, Fz/Dsh se acumula en la membrana posterior, donde interacciona con Dgo. Vang interacciona con Pk y se localiza en la membrana anterior de la célula. La inhibición de Pk sobre Dsh ayuda a mantener la distribución asimétrica de los complejos Fmi/Fz/Dsh/Dgo y Fmi/Vang/Pk. Esto puede desencadenar la cascada de efectores Daam1/Rho/ROK que va a dar lugar a modificaciones en el citoesqueleto y/o a la activación de genes diana a través de la vía Cdc42/Rac/JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). La localización asimétrica de Fz también es debida al transporte asimétrico de Fz a través de los microtúbulos (Shimada et al., 2006) (Modificado de (Benzing, Simons and Walz 2007)).

Otro mecanismo implicado en la localización asimétrica de estas proteínas es el transporte dirigido de las vesículas que las contienen, como las que portan Frizzled o Dishevelled (Werner et al 2011; Shimada et al., 2006; (Harumoto et al. 2010, Matis et al. 2014, Olofsson et al. 2014, Sharp and Axelrod 2016). Dicho transporte está mediado, al menos en parte, por una red de microtúbulos no centrosomales alineados entre los ejes proximal y distal con el extremo positivo (+) orientado hacia el lado distal (Figura 32). Dicha orientación de los microtúbulos se correlaciona con la asimetría de las proteínas de la vía PCP en células epiteliales de tráquea (Vladar 2012). Además, los microtúbulos son también necesarios para la distribución asimétrica de Prickle en la gastrulación de los embriones de zebrafish (Sepich et al. 2011).

También se ha descrito la modulación de los niveles de proteína como factor implicado en el mantenimiento de esta asimetría, restringiendo la cantidad de una proteína implicada en PCP que antagoniza con otra. En moscas, se ha descrito la regulación de Dishevelled por medio de Cullin-3-BTB E3 ubiquitin ligasa, que limita sus niveles en las uniones celulares (Strutt et al. 2013) y en ratones la proteína Smurf E3 ubiquitin ligasa ubiquitina Prickle y promueve su degradación (Narimatsu et al. 2009).

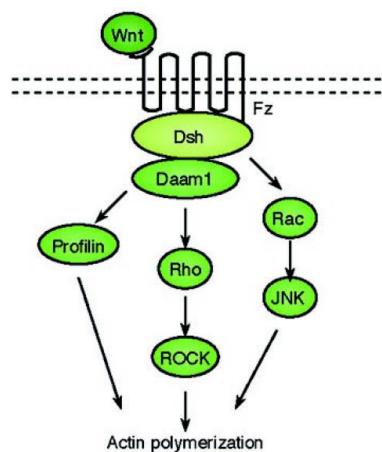
### 3.1.3 Módulo efectores

Este módulo será activado por los anteriores y traducirá las asimetrías moleculares en cambios morfológicos manifiestos, estableciendo la polarización intracelular. Entre los módulos efectores descritos están las familias Rho GTPases y Myosin II o las JNK kinasas entre otros, los cuales actuarán sobre el citoesqueleto de actina y la red de microtúbulos, polarizándolos.

#### 3.1.3.1 Módulo efector de la vía Wnt/PCP

En la vía no canónica Wnt/PCP, la señal de Wnt se transduce a través de Frizzled independientemente de LRP5/6, dirigiendo la activación de Dishevelled. De este modo se van a activar dos vías paralelas intracelulares que activan las GTPasas Rho y Rac (Wallingford and Habas, 2005).

Para la activación de la vía de señalización de Rho, Wnt induce la formación del complejo Dsh-Daam1 (activador de morfogénesis asociado a Dsh) (Figura 33), consiguiendo la activación de Daam1, que a su vez va a activar la vía de Rho GTPasa (Habas, Kato and He 2001, Tanegashima, Zhao and Dawid 2008). La activación de Rho dirige la activación de ROCK (Rho-associated kinase) (Marlow et al. 2002) lo que da lugar a modificaciones en el citoesqueleto de actina para su reordenamiento. La activación de la vía Rac es independiente de Daam1, y Rac activado va a dar lugar a una activación de la actividad de JNK (Habas, Dawid and He 2003). Tanto la vía Rho como la vía Rac están implicadas en regulación transcripcional que dará lugar a la remodelación del citoesqueleto (Keller et al. 2003)



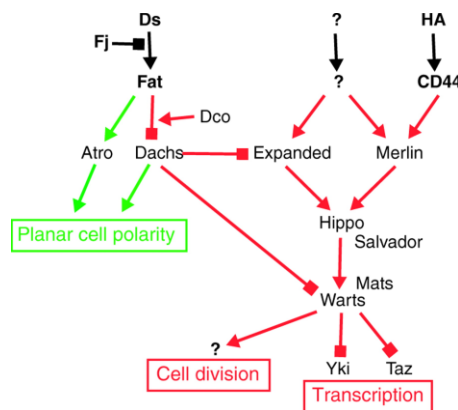
**Figura 33. Representación esquemática de la vía Wnt/PCP.** La señal de Wnt es transducida a través de Fz de manera independiente al co-recetor LRP5/6, para activar Dishevelled. Dsh a través de Daam1, media la activación de Rho que a su vez activa ROCK (quinasa de Rho). Daam1 también está implicada en la polimerización de actina a través de la Profilina (proteína de unión a actina). Dsh también media la activación de Rac, que activa JNK. Esta señalización de Rock, JNK y Profilina van a dar lugar a cambios en el citoesqueleto (Komiya and Habas 2008).



### 3.1.3.2 Módulo efector de la vía Ft/Ds/Fj

Las vías Ft/Ds/Fj y la vía Warts (también conocida como Hippo) forman una red interconectada de señalización (Figura 34) que juega un papel muy importante en el control del crecimiento de órganos, sin afectar a la formación de patrones. La vía Ft/Ds/Fj va a influir en el establecimiento de la polaridad tisular a través de la regulación de Dachs, una miosina atípica (Mao et al., 2006) implicada en la elongación de las alas de *Drosophila* en el eje del plano (Baena-Lopez, Baonza and Garcia-Bellido 2005).

Los componentes de la vía Warts (Wts) incluyen a Hpo (Hippo), Sav (Salvador) y a Mats (*Mob-as-tumor suppressor*). Hpo y Wts son Serin/Treonin quinasas y su actividad está regulada por la asociación con Sav y Mats. Se ha descrito en mamíferos que Hpo puede autofosforilarse (Glantschnig et al., 2002; Lee and Yonehara, 2002), y una vez que Hpo está activado, fosforila a Wts, Sav y Mats (Wei et al., 2007; Wu et al., 2003). La fosforilación de Wts por Hpo está facilitada por Sav, que une tanto a Hpo como a Wts, actuando de proteína de andamiaje (Wu et al., 2003). Además, la activación de Wts requiere a Mats (Lai et al., 2005), y la fosforilación de Mats por Hpo promueve la unión de Mats y Wts (Wei et al., 2007). La activación de Wts también está asociada a actividad de autofosforilación (Wei et al., 2007). Una vez que Wts está activado, fosforila cofactores de transcripción como Yorkie (Yki) para la regulación transcripcional de genes implicados en la regulación del crecimiento (Figura 34) (Huang et al., 2005).



**Figura 34: Esquema representativo de la vía de señalización Fat/Warts.** La vía Fat está indicada en verde, la vía Warts está indicada en rojo. Ds (Dachous), Ft (Fat), HA (hialuronato), Atró (Atropina), Dco (*Discs overgrown*), Fj (*four jointed*); Mats (*Mob-as-tumor suppressor*); Taz (*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*); Yki (Yorkie) (Reddy and Irvine, 2008).

### 3.1.3.3 Implicación del citoesqueleto celular en polaridad planar

Desde el comienzo del estudio de la polaridad planar ha ido tomando fuerza la relación que tiene el establecimiento de ésta con la polarización del citoesqueleto celular. El citoesqueleto celular es una red de filamentos que se extiende por el citoplasma y está constituido por tres tipos de



filamentos proteicos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, cada uno con distintas propiedades mecánicas y funciones biológicas. Los estudios llevados a cabo relacionaban el desarrollo de tejidos con la coordinación de los diferentes componentes del citoesqueleto celular (Wong and Adler 1993) así como la formación de haces de F-actina en el desarrollo de tricomas en las alas de *Drosophila*. Desde entonces muchas investigaciones se han centrado en el estudio de la reorganización del citoesqueleto implicada en la generación de la polaridad (Fanto and McNeill, 2004; Vladar et al., 2009).

### **A) Citoesqueleto de actina**

La actina es la proteína citoesquelética más abundante en la mayoría de las células. Es una proteína globular que polimeriza para formar fibras delgadas y flexibles, denominadas filamentos de actina. Estos filamentos se disponen próximos a la cara interna de la membrana plasmática formando el córtex celular. La formación del filamento comienza con la nucleación, cuando cada monómero de actina (actina G) interacciona con otros dos monómeros (cabeza-cola) formando trímeros que, a su vez, polimerizarán formando la actina filamentosa o actina F. Los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, por lo que los filamentos presentan una polaridad con extremos positivo (+) y extremo negativo (-) que va a ser fundamental en el movimiento celular. El proceso de despolimerización de un extremo y la polimerización del opuesto se denomina intercambio y es un proceso cíclico que permite el movimiento de los filamentos de actina.

Los filamentos de actina pueden asociarse como haces de actina, disponiéndose los filamentos en paralelo y uniéndose entre sí por proteínas más o menos flexibles, que son la  $\alpha$ -actinina y la fimbrina, respectivamente. Por otro lado, pueden asociarse en redes, disponiéndose los filamentos de forma ortogonal y uniéndose entre sí por proteínas diméricas flexibles en forma de V denominadas filaminas. Los filamentos de actina se asocian, además de entre ellos, a diferentes estructuras celulares como, la membrana plasmática, la matriz extracelular o a los cuerpos basales de los cilios.

### **B) Citoesqueleto de microtúbulos.**

Los microtúbulos son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro formadas por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un espacio hueco. Cada uno de estos filamentos a su vez están formados por el ensamblaje de dímeros de las proteínas globulares  $\alpha$ -y  $\beta$ -tubulina. Estas estructuras poseen polaridad, de modo que al extremo positivo se unen dímeros con GTP- $\beta$ -tubulina, creciendo el filamento en esa dirección. Mientras, el extremo

negativo está anclado al material pericentriolar que rodea a los centriolos celulares. Los microtúbulos comienzan a ensamblarse desde este material pericentriolar que constituye el centro organizador de microtúbulos (MTOC) junto con la  $\gamma$ -tubulina.

La polimerización/despolimerización de microtúbulos viene determinada por un comportamiento denominado inestabilidad dinámica. Este proceso se basa en la velocidad de adición de tubulina frente a la velocidad de hidrólisis de GTP, que conllevará el desensamblaje. Este proceso está regulado por proteínas asociadas a microtúbulos, que se pueden clasificar en dos grupos: aquellas que se unen al extremo positivo de los microtúbulos (*plus-end tracking proteins*, o +TIPs) o las *end-binding proteins* (EBs) y las que se unen a la red de microtúbulos regulando su estabilización (Kaverina and Straube 2011). Además, intervienen factores estabilizadores de microtúbulos como la proteína supresora tumoral APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Etienne-Manneville 2013).

Los microtúbulos participan en el ensamblaje del citoesqueleto de actina. En el extremo de los microtúbulos se une a factores implicados en la estabilización de microtúbulos, como APC, que activarán a proteínas de la familia de las Rho GTPasas, Rac y Cdc42, promoviendo la polimerización de filamentos de actina en filopodios y lamelipodios (Kaverina y Straube, 2011).

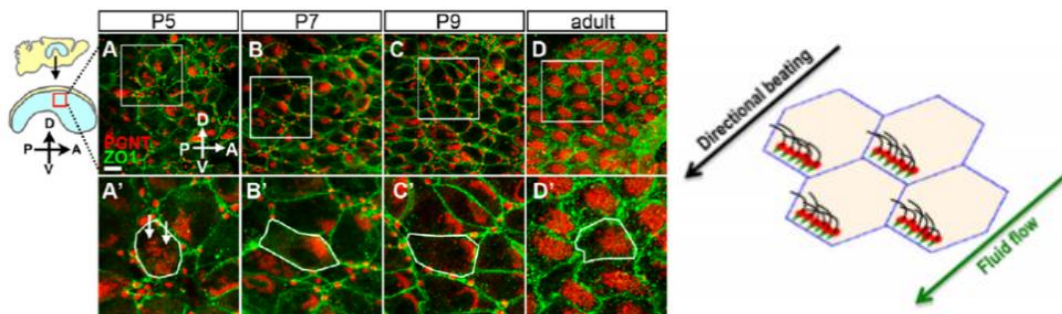
### 3.2 POLARIDAD CELULAR PLANAR EN CÉLULAS EPENDIMARIAS

Como se comentó anteriormente, las células endimarias presentan dos tipos de polaridad planar, la polaridad traslacional (tPCP) y la polaridad rotacional (rPCP). La primera de ellas se corresponde con la localización de los *clusters* de cuerpos basales en la zona anterior de la superficie apical de las células endimarias (Mirzadeh et al., 2010). La segunda define la orientación que adquieren progresivamente los cuerpos basales para adoptar una orientación común, esencial para la coordinación de la dirección del movimiento ciliar (Guirao et al., 2010). Ambas polaridades se establecen simultáneamente durante el desarrollo de las células endimarias en la primera semana tras el nacimiento (Hirota et al., 2010) pero se regulan de manera diferencial (Mirzadeh et al., 2010, Hirota et al., 2010).

#### 3.2.1 Polaridad traslacional y su regulación

Las células endimarias son las únicas células multiciliadas en las que se ha descrito la polaridad traslacional. La tPCP se caracteriza por la localización de los *clusters* de cuerpos basales en la zona anterior de la superficie apical de las células endimarias, tanto intracelularmente como de manera coordinada a nivel tisular entre células vecinas (Mirzadeh et al., 2010).

Como se explicó anteriormente, esta polaridad se adquiere durante las primeras semanas postnatales. La orientación de la tPCP en las células endimarias se establece en el cuerpo basal del cilio primario de las RGCs, lo cual predice la posición futura del grupo de cuerpos basales (Mirzadeh et al., 2010). Durante su transformación en células endimarias, los cuerpos basales van a sufrir una serie de cambios de localización. Inicialmente se encuentran distribuidos por toda la superficie apical. Posteriormente (P7), se irán desplazando gradualmente hacia la zona rostral de la superficie apical, alcanzando su máxima compactación a P9 (Hirota et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2016). A partir de P21 y en adultos no se mantiene esa fuerte compactación, pero los grupos de cuerpos basales de células vecinas se mantienen distribuidos asimétricamente hacia la zona anterior de la superficie apical de la célula (Figura 35) (Mirzadeh et al., 2010).



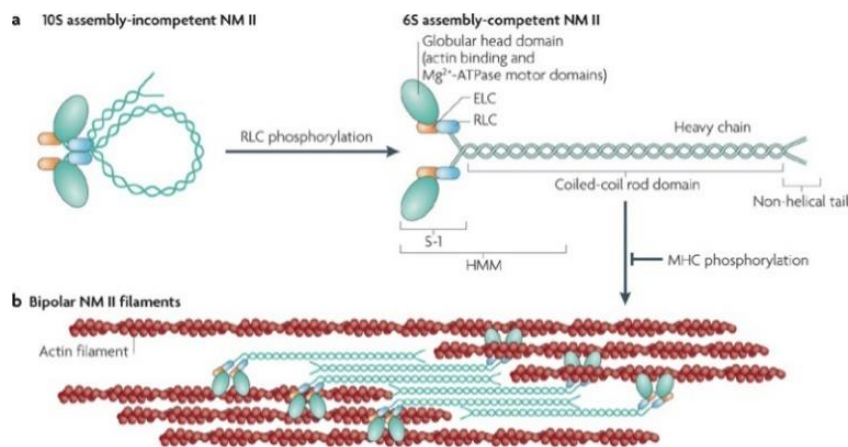
**Figura 35. Adquisición de tPCP de las células endimarias.** (A) Proceso de adquisición de tPCP de los cuerpos basales durante el desarrollo de las células endimarias. (B) Esquema de la localización anterior de los cuerpos basales en la superficie apical de las células endimarias en dirección al movimiento del flujo de líquido cefalorraquídeo (Hirota et al., 2010).

La importancia de la polaridad traslacional radica en la tensión que son capaces de soportar los cilios durante su movimiento. Esta tensión va a depender de la densidad del líquido cefalorraquídeo, que es menos espeso que otros fluidos movidos por células multiciliadas que no muestran polaridad traslacional (células multiciliadas de tráquea y de ovario), pero que presenta una velocidad de movimiento notablemente mayor. Por ello es importante conocer los mecanismos que regulan la tPCP.

#### **A) Reguladores de la tPCP: Miosina No Muscular II (NMII)**

La miosina no muscular II (NMII) es una de las principales proteínas motoras del citoesqueleto de actina. Tiene un papel fundamental en procesos celulares que requieren movimiento y reorganización celular. Por ello esta proteína está implicada de manera importante en procesos celulares como migración celular (Even-Ram et al. 2007, Vicente-Manzanares et al. 2007), adhesión celular (Conti et al. 2004, Shewan et al. 2005, Giannone et al. 2007) y división celular (Bao et al. 2007, Ma, Bao and Adelstein 2007).

NMII (Figura 36) presenta una estructura hexamérica que consiste en un par de cadenas pesadas (nonmuscle myosin heavy chains, NMHCs, 200 kDa), un par de cadenas ligeras esenciales (ELCs, 20 kDa) y un par de cadenas ligeras reguladoras (RLCs, 17 kDa). Las cadenas pesadas homodimerizan a través de una zona de estructura enrollada (coiled-coil), y cada una de ellas se une a las cadenas ligeras (Nagy et al. 2013). La miosina resultante contiene dos dominios motores globulares en el extremo N-terminal que albergan actividades ATPasa y de unión a actina (Conti and Adelstein 2008).

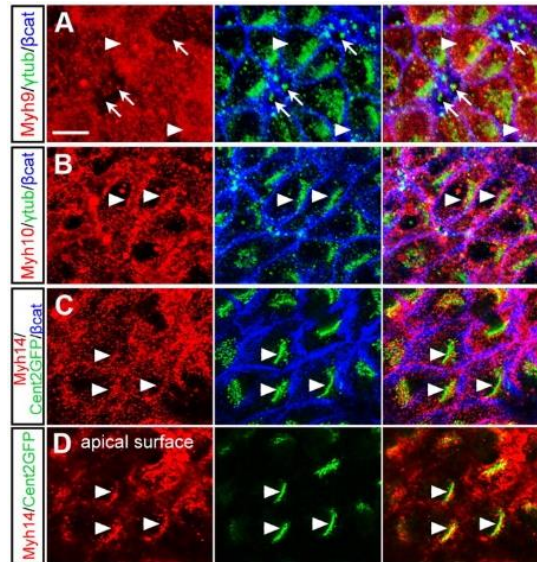


**Figura 36. Estructura proteica de NMII.** Esquema representativo de la estructura de NMII y su conformación en estado inactivo, su conformación en estado activo mediante la fosforilación de las cadenas ligeras, y el proceso de agregación entre diferentes moléculas de miosina mediante la fosforilación en las cadenas pesadas (Vicente-Manzanares et al., 2010).

NMII presenta tres isoformas, NMIIA, NMIIIB y NMIIIC, dependiendo de las cadenas pesadas que contengan, Myh9, Myh 10 o Myh 14 respectivamente (Heissler and Manstein 2013, Vicente-Manzanares et al. 2007). Estas cadenas pesadas comparten una identidad aminoacídica de entre el 60 y el 80%, pero muestran diferencias en la actividad motora (Kim et al., 2005). En general, las tres isoformas se expresan de manera ubicua en tejidos de vertebrados. En concreto en las paredes laterales de los ventrículos de ratón, las tres isoformas son expresadas por las células endoteliales, pero tienen diferentes patrones de localización: NMIIa está presente por todo el citoplasma celular, mientras que NMIIb y NMIIc se localizan principalmente en el entorno de los cuerpos basales (Figura 37) (Hirota et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado que la NMII está implicada de manera fundamental en la regulación de la polaridad planar durante el desarrollo tanto de invertebrados (Bertet, Sulak and Lecuit 2004, Saxena et al. 2014), como de vertebrados (Yamamoto et al. 2009), Hirota 2010). Incluso en procesos tan importantes como la extensión convergente (en vertebrados) regulando la intercalación de las células (Rozbicki et al. 2015). Se ha descrito que los ratones carentes de NMII mueren durante los días E14.5 y P0, y presentan anomalías en el desarrollo del cerebro,

como por ejemplo una severa hidrocefalia y la alteración de la pared lateral de los ventrículos (Tullio et al. 2001); Xuefei Ma, 2007). Estos datos indican que NMII podría estar implicada en la maduración de las células endimarias que limitan los ventrículos.



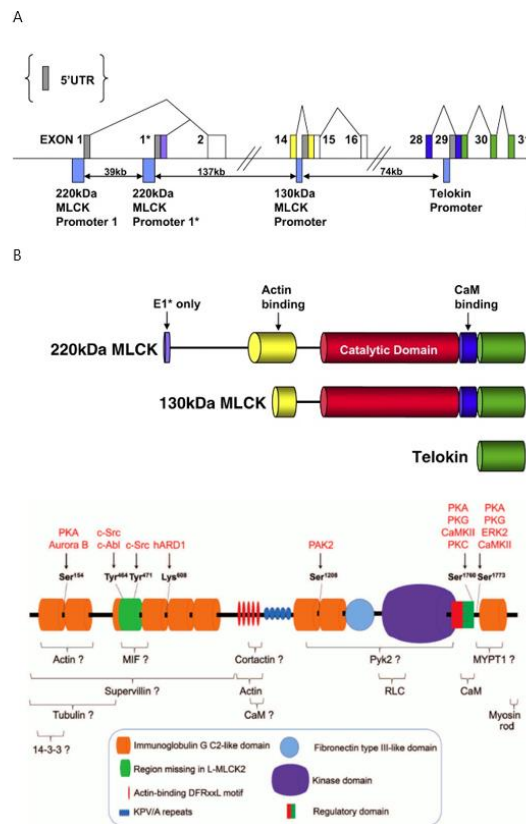
**Figura 37. Distribución de NMII en las células endimarias.** Localización de las diferentes isoformas de NMII, NMIIA, NMIIIB y NMIIIC en las células endimarias (Hirota et al., 2010).

La activación de NMII se lleva a cabo mediante la fosforilación de residuos conservados evolutivamente presentes en las cadenas ligeras reguladoras (*myosin light chain*, MLC), concretamente en la Ser19, lo que estimula su actividad motora (Vicente-Manzanares et al. 2009). Esta reacción es catalizada principalmente por las quinasas MLCK (myosin light chain kinase) y Rho kinase, ROCK, (Rho-associated protein kinase) (Vicente manzanares 2009, (Kamm and Stull 2001). La activación de NMII se puede analizar mediante el estudio de la forma fosforilada de MLC, pMLC. En células endimarias se ha descrito que la NMII activa se localiza en la proximidad de los cuerpos basales (Hirota et al., 2010). Además, estudios farmacológicos han demostrado que la activación de NMII es fundamental en la distribución apical de los cuerpos basales de estas células (Hirota et al., 2010). En particular, la fosforilación por MLCK, pero no por ROCK, es la encargada de regular el establecimiento de la polaridad traslacional en estas células (Hirota et al., 2010). De este modo, MLCK se puede considerar como un factor determinante en el establecimiento de la tPCP (Hirota et al., 2010).

## B) Reguladores de la tPCP: Kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK)

La kinasa MLCK fue aislada por primera vez en músculo liso (Dabrowska et al. 1978) y está muy implicada en el mantenimiento de la barrera endotelial (Shen et al. 2010). Esta función implica la regulación de la actomiosina a través de la fosforilación de NMII, regulando así las uniones adherens (Yu et al. 2010). Se ha descrito que esta función se lleva a cabo, al menos en parte, mediante la regulación de la concentración E-caderina en los contactos célula-célula (Shewan et al. 2005). También se ha propuesto su implicación en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Beard et al. 2014).

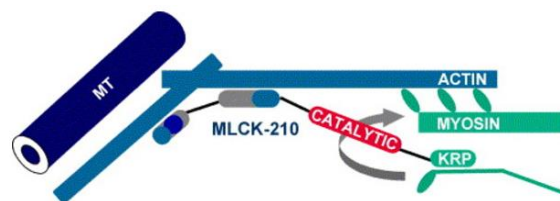
En vertebrados, MLCK está codificadas por al menos tres genes, *mylk1*, *mylk2* y *mylk3*, que van a dar lugar a un pequeño grupo de isoformas (Khapchaev and Shirinsky 2016, Herring et al. 2006). De ellos, *mylk2* y *mylk3* codifican para proteínas que sólo se expresan en músculo, esquelético y cardiaco respectivamente. El gen *mylk1* presenta cuatro promotores diferentes, generando cada uno una isoforma (Figura 38). Dos de ellas son isoformas de aproximadamente 210-220kDa denominadas MLCK-210 (que solo se diferencian en la secuencia que corresponde con el exón 1, dando una diferencia de 9 aminoácidos entre ambas) y otra es de 130kDa y denominada MLCK-130.



**Figura 38. Representación esquemática de la estructura génica y proteica de MLCK.** (A) Figura representativa del gen mlck. Muestra los diferentes exones e intrones además de los diferentes promotores descritos. (B) Figuras representativas de los dominios estructurales de la proteína MLCK (Khapchaev & Shirinsky, 2016; Herring et al., 2006).

Estas isoformas se expresan de forma ubicua en diferentes tejidos (Herring, Dixon and Gallagher 2000, Herring et al. 2006). Las isoformas MLCK-210 y MLCK-130 son idénticas en la parte C-terminal, mientras que MLCK-210 posee un extremo N-terminal de entre 922 y 935 aminoácidos que MLCK-130 no posee (Khapchaev and Shirinsky 2016). Ambas isoformas presentan los mismos sitios catalíticos, que contienen seis módulos *immunoglobulina-like*, dominios en tándem de unión a actina y dominios de regulación, por lo que poseen la misma afinidad y especificidad por las cadenas reguladoras RLCs de la NMII.

Estudios *in vitro* demuestran que MLCK-210 posee la capacidad de unión a filamentos de actina y al citoesqueleto de microtúbulos (Kudryashov et al. 1999). La diferencia estructural entre MLCK-210 y MLCK-108 reside, como hemos comentado, en la presencia de una región N-terminal en MLCK-210 denominado *tail domain*. A través de esta región, MLCK-210 es capaz de unirse a filamentos de actina (Figura 39) (Kudryashov et al., 1999). Esto es debido a la presencia de dominios *immunoglobulina-like*, que se localizan en la región más C-terminal de la región *tail*, y son idénticos a los motivos de unión a actina de MLCK-130 (Smith et al., 1999), por lo que ambas isoformas son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina. Además, MLCK-210, pero no MLCK-130, presenta en la región *tail* sitios de interacción con microtúbulos (Figura 39), siendo capaz de agregar dímeros de tubulina (Kudryashov et al. 2004). De este modo, MLCK-210 muestra una mayor capacidad organizadora de la motilidad celular y de la arquitectura del citoesqueleto que la isoforma MLCK-130, al ser capaz de llevar a cabo la interacción simultánea con el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos (Kudryashov et al., 2004).



**Figura 39. Esquema de la unión de MLCK-210 a filamentos de actina y microtúbulos.** El dominio KRP se une a la NMII, la región *tail* de la zona N-terminal interactúa con el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos. De este modo, MLCK-210 puede participar en la reorganización de las redes de citoesqueletos y organizar la motilidad dependiente de la actinmiosina II (Kudryashov et al., 2004).

MLCK es capaz de unirse a la miosina mediante su dominio c-terminal KRP (Kudryashov et al., 2002; Silver et al., 1997), y mediante el sitio catalítico fosforila a NMII en el residuo Ser19 de su RLC como hemos comentado. De este modo, NMII pierde su estado de plegamiento (Figura 36, a) y el dominio motor de la NMII se desbloquea, liberándose el sitio catalítico de ATP. De este modo, puede llevar a cabo la hidrólisis de ATP, obteniendo energía para realizar interacciones

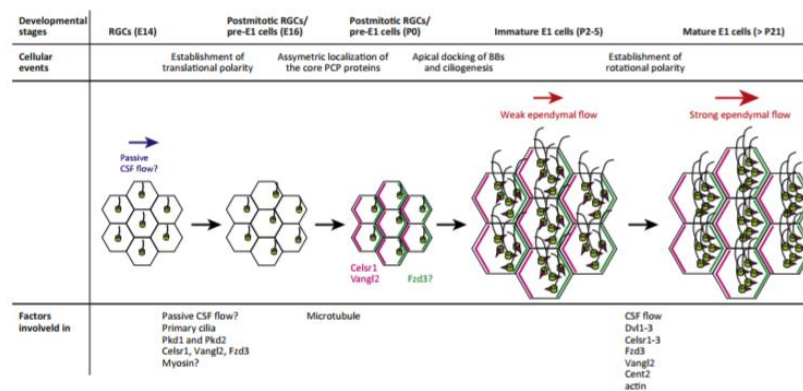


ciclinas con la F-actina y permitir una interacción productiva (Kudryashov et al., 2004; Brenner and Eisenberg, 1987; Adelstein, 1983).

### 3.2.2 Polaridad rotacional y su regulación

La polaridad rotacional (rPCP) es una característica fundamental de las células multiciliadas en general. Durante la diferenciación de las células endimarias, entre los días P1-P4, los cuerpos basales se anclan a la membrana apical sin una distribución determinada y orientados aleatoriamente (Figura 40) (Guirao et al. 2010, Ohata and Alvarez-Buylla 2016)(Guirao et al., 2010; Ohata and Alvarez-Buylla, 2016). Posteriormente, los cuerpos basales van a ir rotando progresivamente para adoptar una orientación común intracelularmente, alineándose en la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo (Guirao et al., 2010). Este proceso se denomina polaridad rotacional (rPCP) (Guirao et al., 2010; Mirzadeh et al., 2010). La orientación común de los cuerpos basales de las células endimarias es esencial para la coordinación de la dirección del movimiento ciliar, los cuales impulsan el líquido cefalorraquídeo en su paso por los ventrículos cerebrales.

Un indicador de la polaridad rotacional son los pies basales de los cuerpos basales, una estructura electrodensa asociada lateralmente a los BB que indica la dirección del movimiento del cilio (Marshall and Kintner 2008).



**Figura 40. Proteínas core-PCP durante el desarrollo de las ECs a partir de las RGCs.** En torno al día E14, el cilio primario de las RGCs se localiza cerca del centro de la superficie apical. En torno al día E16, comienza a desplazarse asimétricamente en dirección del CSF. Este flujo (flechas azules) en los ventrículos del embrión podría estar dirigiendo la localización asimétrica del cilio primario. La eliminación de Celsr1, Vangl2 o Fzd3 alteran también la polaridad translacional de las RGCs. Las proteínas core Celsr1 y Vangl2 comienzan a localizarse asimétricamente en la zona apical de las RGCs en el día P0, y Fzd3 en el día P5. En este proceso los microtúbulos juegan un papel importante en la localización asimétrica de Vangl2 y Celsr1 en las RGCs en P2. Los cuerpos basales generados durante el desarrollo de las ECs se anclan en la superficie apical de las ECs inmaduras y los cilios comienzan a generarse entre los días P2-P5. Durante estos días, la polaridad rotacional, indicada por la posición de los pies basales (triángulos rosas), es aleatoria. Los cuerpos basales comienzan a estar alineados con la dirección del flujo de CSF durante la maduración de las ECs. Este modelo sugiere que tanto el flujo de CSF como las proteínas core Dvl1-3, Celsr1-3, Fzd3 and Vangl2 están envueltan en la regulación del establecimiento de la polaridad rotacional (Ohata and Buylla, 2016).



### A) Reguladores de la rPCP: core-PCP

En células endimarias, la vía *core-PCP* está implicada en la orientación de los cuerpos basales en sentido de la dirección del movimiento del líquido cefalorraquídeo.

En las ECs las proteínas *core* Celsr1, Vangl2 y Fzd3 se acumulan de manera asimétrica en la zona apical de las células endimarias, muy próximas a las uniones celulares (Figura 40) (Boutin et al., 2014; Ohata et al., 2015; Guirao et al., 2010; Tissir et al., 2010; Shi et al., 2016). La eliminación de Vangl2 o Fzd3 afecta al establecimiento tanto de la polaridad rotacional como de la polaridad translacional de las células endimarias (Boutin et al., 2014; Ohata et al., 2014; Guirao et al., 2010). Además, Celsr1-3 regula diferentes aspectos de la Polaridad Celular Planar en las ECs: Celsr2 y Celsr3 regulan la polaridad rotacional y la translacional, mientras que Celsr1 parece que está envuelto en la coordinación intercelular de la PCP, la polaridad tisular (Boutin et al. 2014).

De las proteínas del *core-PCP*, Dvl se ha destacado por su importante implicación en el acoplamiento de los cuerpos basales en la membrana apical de la célula (Park et al., 2009; Vladar et al. 2008; Ohata et al., 2014). Dvl 1 y Dvl2 se acumulan en el entorno de los cuerpos basales de las células endimarias (Hirota et al., 2010, Ohata et al., 2015; Guirao et al., 2010) como ya se había visto en células multiciliadas de larvas de *Xenopus* (Park et al., 2008). Esto hace suponer el importante papel de Dishevelled durante el establecimiento de la polaridad rotacional. Además, Dvl parece estar implicado no solo en el establecimiento de la polaridad, si no también en su mantenimiento (Ohata et al. 2014).

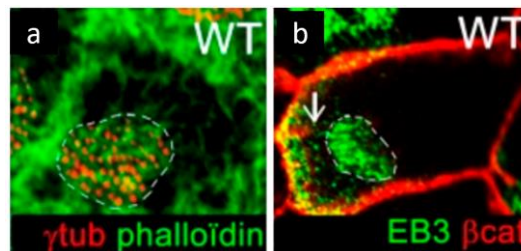
Curiosamente, en las RGCs la localización asimétrica de Vangl2 ocurre en torno a P0, tras el establecimiento de la polaridad translacional (E16 aproximadamente) (Boutin et al., 2014). El cilio primario podría estar proporcionando instrucciones para la posterior acumulación asimétrica de las proteínas del *core-PCP* (Ohata et al., 2015).

### 3.2.3 Citoesqueletos en células endimarias

En células endimarias se ha descrito que los cuerpos basales están interconectados mediante la red de filamentos de actina, jugando un papel importante en la sincronización del movimiento ciliar (Werner et al., 2011). Además de la asociación con los filamentos de actina, diferentes estudios describen la interacción existente entre los cuerpos basales, en concreto los pies basales, y los microtúbulos (Gordon 1982, Chailley, Nicolas and Laine 1989). La despolimerización de la red de microtúbulos conlleva la pérdida de la dirección del flujo debido

a una alteración en la coordinación en la orientación (Werner et al., 2011). Durante la maduración de las células endimarias los citoesqueletos de actina y microtúbulos se desarrollan simultáneamente. Ambos citoesqueletos se encuentran en el entorno de los cuerpos basales (Figura 41) ya que se ha descrito la presencia de una red de microtúbulos polarizados (Figura 41, b), juxtapuesto con la red de actina (Figura 41, a), entre el grupo de cuerpos basales (Boutin et al., 2010; Werner et al., 2011) y una segunda red entre el grupo de cuerpos basales y el córtex celular (Figura 39 b) (Boutin et al., 2010).

De este modo los citoesqueletos de actina y de microtúbulos muestran una complicada interacción totalmente necesaria para el mantenimiento de la polaridad planar, donde se ha propuesto que los microtúbulos unen los cuerpos basales a los pies basales de sus compañeros, promoviendo la polaridad rotacional, mientras que la actina une los cuerpos basales mediante las estructuras denominadas *striated rootlets*. Así el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos parece tener un papel importante tanto en polaridad celular (redes de actina y microtúbulos entre los cuerpos basales) como en polaridad tisular (redes de actina y microtúbulos entre el grupo de cuerpos basales y el córtex celular).



**Figura 41. Red de citoesqueletos en células endimarias adultas.** (a) En células endimarias adultas (P21) se puede observar una red de actina rodeando cada uno de los cuerpos basales (línea punteada). (b) Además, estas células también presentan un set de MT polarizados entorno a los cuerpos basales y un segundo set entre el grupo de cuerpos basales (línea punteada) y el córtex celular (flecha blanca) (Boutin et al., 2010).

Un factor importante en el establecimiento de la PCP es el transporte vesicular dirigido, mecanismo en el que son esenciales los microtúbulos. Los microtúbulos, mediante proteínas motoras asociadas, como las quinesinas y dineínas, transportan las proteínas *core-PCP* de manera dirigida, y no siempre radial, facilitando su asimetría (Werner and Mitchell 2012). Los microtúbulos juegan un papel importante en reparto de las proteínas de la polaridad en el epitelio del ala de la mosca y en la tráquea de vertebrados (Vladar et al., 2012. Shimada et al., 2006). La acumulación asimétrica de Frizzled en las células del ala de *Drosophila* se lleva a cabo por un transporte diferencial a lo largo de los microtúbulos (Shimada et al., 2006; Harumoto et al., 2010). Además, la desestabilización de los microtúbulos, mediante tratamiento con nocodazol, también afecta a la localización de las proteínas del *core-PCP*, Celsr1 y Vangl2, indicando que la alteración de los

microtúbulos es esencial para llevar a cabo el tráfico vesicular dirigido que transporta las proteínas encargadas de establecer la polaridad.

Se ha descrito que la vía de polarización Ft/Ds/Fj también regula la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos. Esta vía proporciona una señal para orientar las proteínas de la vía PCP (el transporte distal del complejo Frizzled-Dishevelled-Celsr) a través de la polarización de microtúbulos ya que el anclaje del extremo positivo de los microtúbulos a las uniones celulares de la zona apical es dependiente de la polarización inicial de Fat/Dachsous/FourJointed (Harumoto et al. 2010, Marcinkevicius and Zallen 2013). Esto está en concordancia con datos que correlacionan la orientación de los microtúbulos con la asimetría de las proteínas de la PCP en células epiteliales de tráquea (Vladar 2012).

## **OBJETIVOS**

---

El estudio de los mecanismos que regulan la función ciliar es necesario desde el punto de vista de la cantidad de ciliopatías que existen. Una característica esencial para que el movimiento ciliar se efectúe correctamente es el correcto establecimiento de la polaridad planar, tanto en las células individuales como en el tejido completo. Ampliar el conocimiento actual acerca de la regulación de la polaridad planar es primordial ya que estas vías de regulación no solamente controlan la polaridad planar de tejidos desarrollados. Estas vías son también responsables de los cambios de polaridad en las células durante la movilidad celular y la invasividad, procesos que se dan tanto en desarrollo embrionario y postnatal, como en el desarrollo tumoral.

El factor de transcripción p73 es muy conocido por pertenecer a la familia p53, reguladores por excelencia del ciclo celular en condiciones de estrés celular. El papel de la familia p53 en general, y p73 en particular, en el desarrollo tumoral ha sido intensamente estudiado. Además, p73 es uno de los principales reguladores del desarrollo del sistema nervioso central. Sin embargo, a pesar de la importancia del papel de p73 en ambos aspectos, nunca se ha descrito su función en la regulación de las vías encargadas de establecer la polaridad.

La hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral fue determinar el papel que juega el factor de transcripción p73 en el establecimiento de la polaridad celular planar de las células endimarias. De este modo el objetivo principal de esta tesis doctoral fue el estudio del papel de p73 en el establecimiento de la polaridad traslacional y el análisis de la falta de p73 en el establecimiento de la polaridad rotacional.

Los objetivos específicos fueron:

1. Efecto de la falta de p73 en la maduración de las células endimarias y la citoarquitectura de la pared lateral del ventrículo.
2. Papel de p73 en la regulación de la polaridad traslacional de células endimarias a través de la activación de NMII mediante la regulación de la expresión de la kinasa MLCK.
3. Efecto de la falta de p73 en el establecimiento de la localización asimétrica de las proteínas core-PCP que regulan la polaridad rotacional de las células endimarias a través de la alteración del citoesqueleto de microtúbulos.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---





## **CAPÍTULO I**

---

**CAPÍTULO 1. p73 IS REQUIRED FOR EPENDYMAL CELL MATURATION AND NEUROGENIC SVZ CYTOARCHITECTURE**



## 1.1. ABSTRACT

The adult subventricular zone (SVZ) is a highly organized microenvironment established during the first postnatal days when radial glia cells begin to transform into type B-cells and ependymal cells, all of which will form regenerative units, pinwheels, along the lateral wall of the lateral ventricle. Here, we identify p73, a p53 homologue, as a critical factor controlling both cell-type specification and structural organization of the developing mouse SVZ. p73 deficiency halts the transition of the radial glia into ependymal cells, leading to the emergence of immature cells with abnormal identities in the ventricle and resulting in loss of the ventricular integrity. p73-deficient ependymal cells have noticeably impaired ciliogenesis and they fail to organize into pinwheels, disrupting SVZ niche structure and function. Therefore, p73 is essential for appropriate ependymal cell maturation and the establishment of the neurogenic niche architecture. Accordingly, lack of p73 results in impaired neurogenesis. We describe that p73 is required for translational planar cell polarity establishment, since p73 deficiency results in profound defects in cilia organization in individual cells and in intercellular patch orientation. Thus, our data reveal a completely new function of p73 in the neurogenic architecture of the SVZ of rodent brain and in the establishment of ependymal planar cell polarity.

## 1.2. INTRODUCTION

Maintenance of neural stem cell (NSC) capacity to self-renew is dependent upon intrinsic regulatory networks and extrinsic cues within the NSC niches (Miller and Gauthier-Ficher, 2009). The members of the p53 family of tumor suppressor genes, TP53, TP63 and TP73, are important players in NSC biology (Killick et al., 2011). In particular, TP73 is deeply involved in NSC maintenance and organization of the subventricular zone (SVZ) germinal center (Agostini et al., 2010; Fijitani et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2010; Talos et al., 2010) and regulates the balance between symmetric and asymmetric cell divisions of NSC (Gonzalez-Cano et al., 2013). The hydrocephalus phenotype of *Trp73*<sup>-/-</sup> mice (p73KO from now on) (Yang et al., 2000) suggested a possible p73 role in ependymal ciliary function that might be linked to its regulation of the neurogenic environment. However, this has never been addressed.

The architecture of the SVZ is established during the first postnatal days when a select group of radial glia cells (RGCs) begins to transform into NSC (Merkle et al., 2004) while other subpopulation gives rise to ependymal cells (ECs). ECs will form pinwheel structures with B-cells (NSC) intercalated among them. B-cells have a small apical surface with a single primary cilium contacting the ventricle and large basal process contacting blood vessels, and exhibit

ultrastructural characteristics and markers of astro-glial cells, including GFAP and GLAST expression (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011). The apical processes of the B-cells form the core of the pinwheel, which itself is formed by multi and bi-ciliated ECs (Mirzadeh et al., 2008). This highly organized microenvironment is necessary for maintaining NSC self-renewal and differentiation capacity as well as the neurogenic niche homeostasis (Lim et al., 2000; Chmielnicki et al., 2004; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Andreu-Agullo et al., 2009).

Multiciliated ECs have a prominent role in the maintenance of the neurogenic niche, since they induce neurogenesis and suppress gliogenesis by secreting the bone morphogenic protein (BMP) inhibitor, Noggin (Lim et al., 2000; Chmielnicki et al., 2004). ECs are defined as large-apical surface multiciliated cells that express S100b and Vimentin (Spassky et al., 2005; Raponi et al., 2007; Mirzadeh et al., 2008; Pastrana et al., 2009). ECs are generated from RG in a multistep process orchestrated by the primary cilium and its basal body apparatus (Spassky et al., 2005). RG planar cell polarity (PCP) is first established during perinatal development when the primary cilium migrates toward the rostral end. Later on, from P5 until P20, cilia clusters in maturing ECs become densely packed, with basal bodies aligned and positioned as a patch on the downstream side of the EC apical surface with respect to the direction of cerebrospinal fluid (CSF) flow (Bayly and Axelrod, 2011). Thus, EC cilia display two types of PCP: rotational PCP (rPCP) which refers to the parallel alignment of the basal bodies within each multi-ciliated cell and translational PCP (tPCP), defined by the basal body cluster anterior position on the cell apical surface (Mirzadeh et al., 2010). Both forms of polarity correlate with the onset of coordinated cilia beating in a uniform direction (Hirota et al., 2010).

Defects in cilia are associated with a range of human diseases, such as primary ciliary dyskinesia or hydrocephaly (Badano et al., 2006; Kishimoto and Sawamoto, 2012). In the brain, EC cilia are required for CSF circulation and neurogenesis (Boutin et al., 2014). Disruption in PCP establishment results in dysfunctions of ependymal cilia and their directional beating. Thus, the identification of the main players in EC maturation and PCP establishment results in dysfunction of ependymal cilia and their directional beating. Thus, the identification of the main players in EC maturation and PCP establishment might have important therapeutic implications.

It has been described that p73 deficiency alters RG cells transition into ECs. Our laboratory reported for the first time that lack of p73 resulted in a halted maturation of the EC layer (Gonzalez-Cano et al., 2016). WT mice exhibit an organized and continuous mono-stratified epithelium of mature ECs, while p73KO mice present a pseudo-stratified and discontinuous ependyma, indicating that lack of p73 compromises ependymal barrier integrity. Moreover, ECs

present an altered pattern of marker expression in the absence of p73. p73KO ECs expressed RGC markers as GFAP and GLAST. This aberrant expression indicates that p73 might be required for RGCs cell fate determination. Our laboratory also described for the first time that p73 is essential for the EC assembly into pinwheels as p73 deficiency alters the organization of the EC layer cytoarchitecture. p73KO ventricles lacked the organized pinwheel architecture observed in WT. It is noteworthy that, in the absence of p73, ECs had an aberrant membrane morphology with waves and pleats, suggesting that the intercellular junctions at the apical surface of these cells might be affected (Gonzalez-Cano et al., 2016).

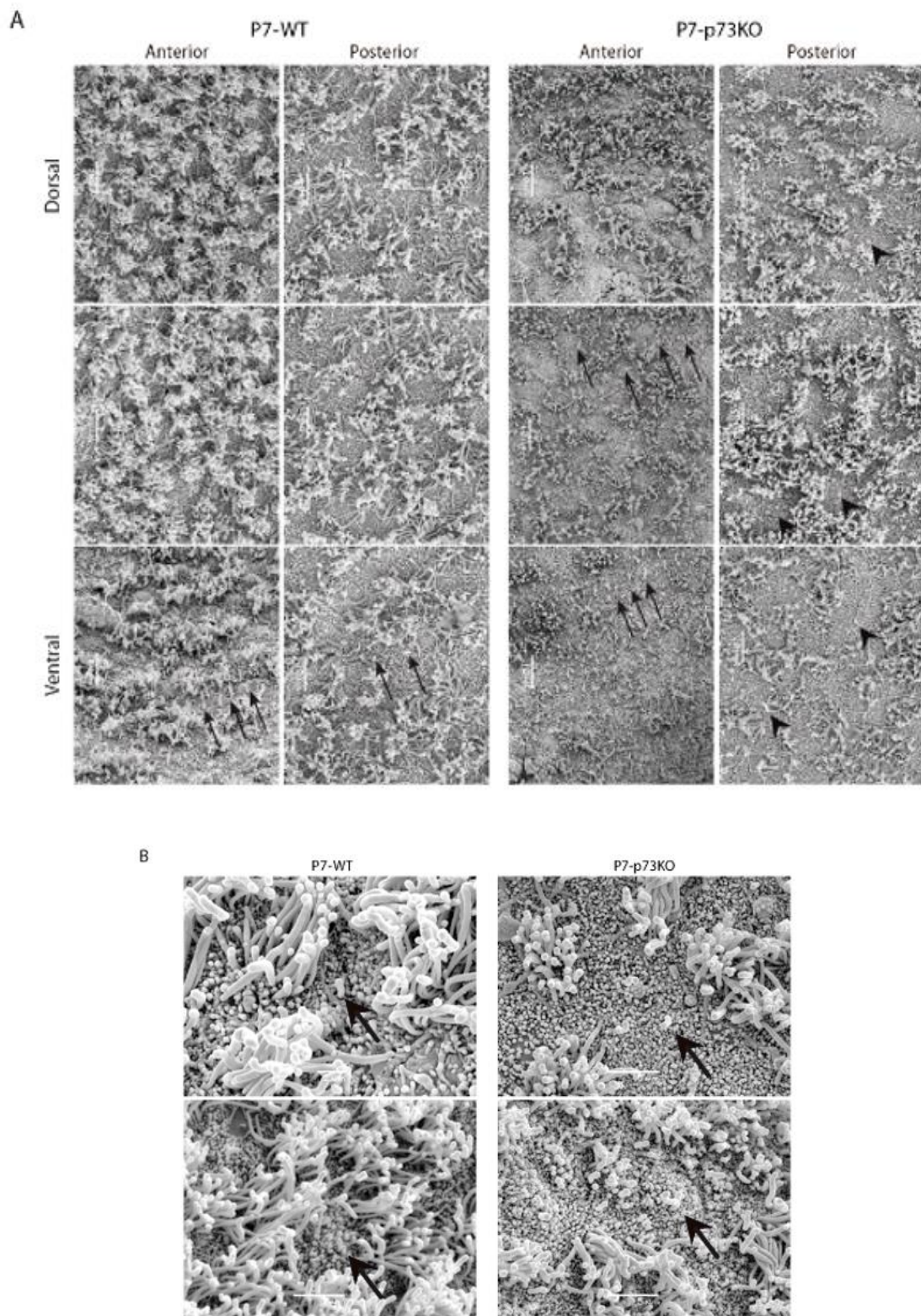
Altogether, these data indicate that p73 loss results in an aberrant maturation of the ECs. Here we describe that p73 deficiency impairs ependymal cell ciliogenesis and PCP establishment (Gonzalez-Cano et al., 2016).

### 1.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### **1.3.1. Lack of p73 impairs ciliogenesis**

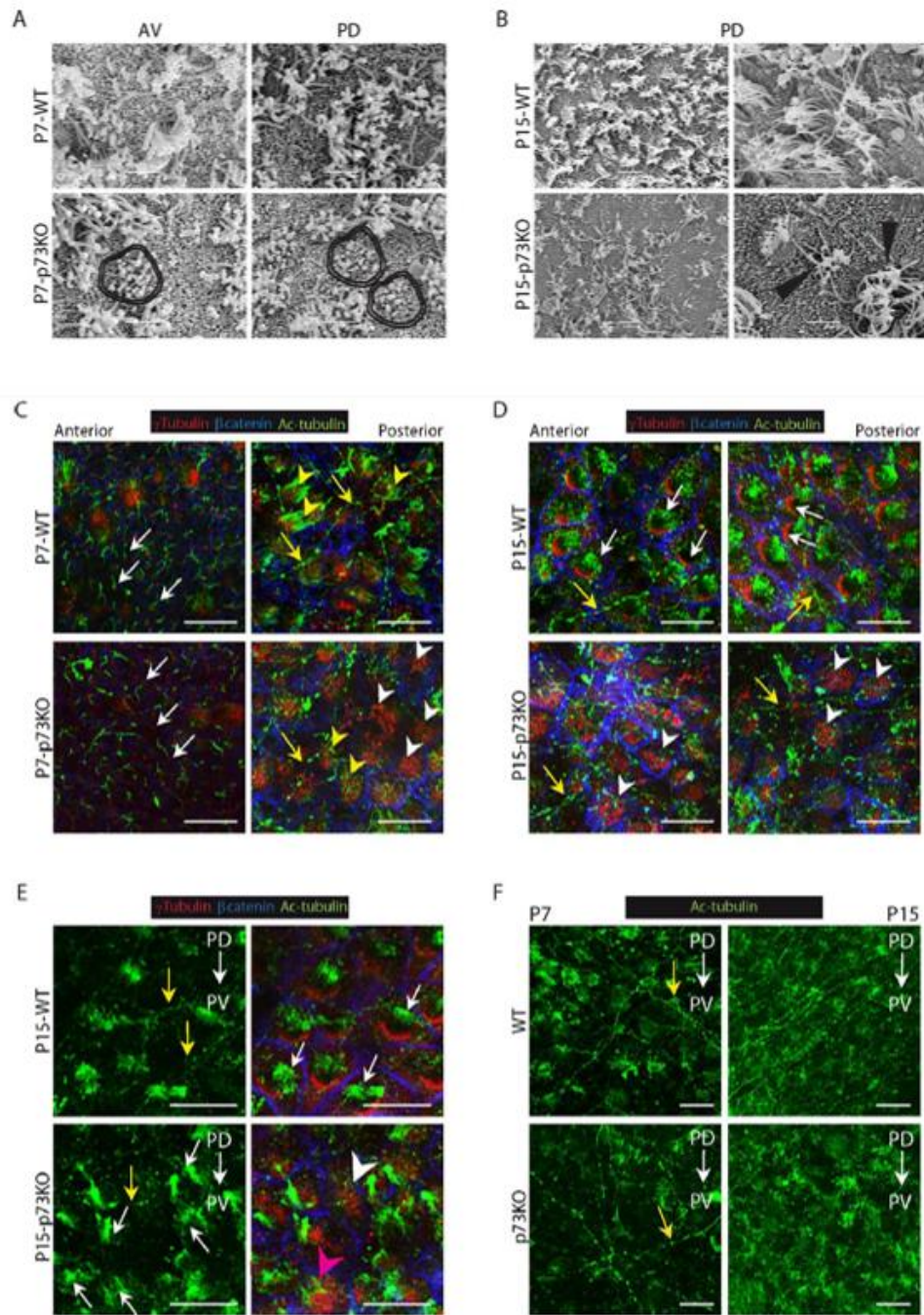
To address whether lack of p73 affected the genesis and organization of ependymal cilia, we performed a comparative study of P7 and P15 WT and p73KO mice using SEM. It has been described that cilia tufts appear around P5 and reach their mature density by P10 (Tissir et al., 2010). Accordingly, P7-WT AV regions displayed some monociliated cells (Figure 42 a, black arrows, and b) and abundant multiciliated cells (Figure 42 a and b) covering most of the ventricular surface. At the same stage, p73KO showed an immature phenotype with many monociliated cells (Figure 42 a and b, black arrows) and less cilia tufts (Figure 42 a and b). Moreover, it is noteworthy the presence of cells with cilia of different sizes distributed through the whole apical surface (Figure 43 a, double line).

As reported (Spassky et al., 2005), we observed that by P15 mature ECs dominate the VZ displaying compacted cilia clusters on the apical surface which have begun to be coordinately oriented (Figure 43 b). In contrast, cilia tufts in p73KO cells displayed an abnormal organization and, in some cases, the individual cilia within a given cell did not point to the same direction and some cilia seem to be angled or even truncated (Figure 43 b, black triangles). This data suggests that in the p73KO mice the cilia fail to form normally.



**Figure 42. p73 deficiency affects ependymal cells cilia formation.** (a, b) SEM analysis of WT and p73KO lateral ventricle wall whole mounts at P7. WT mice showed monociliated cells (black arrows), and abundant numerous multiciliated cells while p73KO mice had less multiciliated cells. Scale bar: 10 and 5  $\mu$ m.



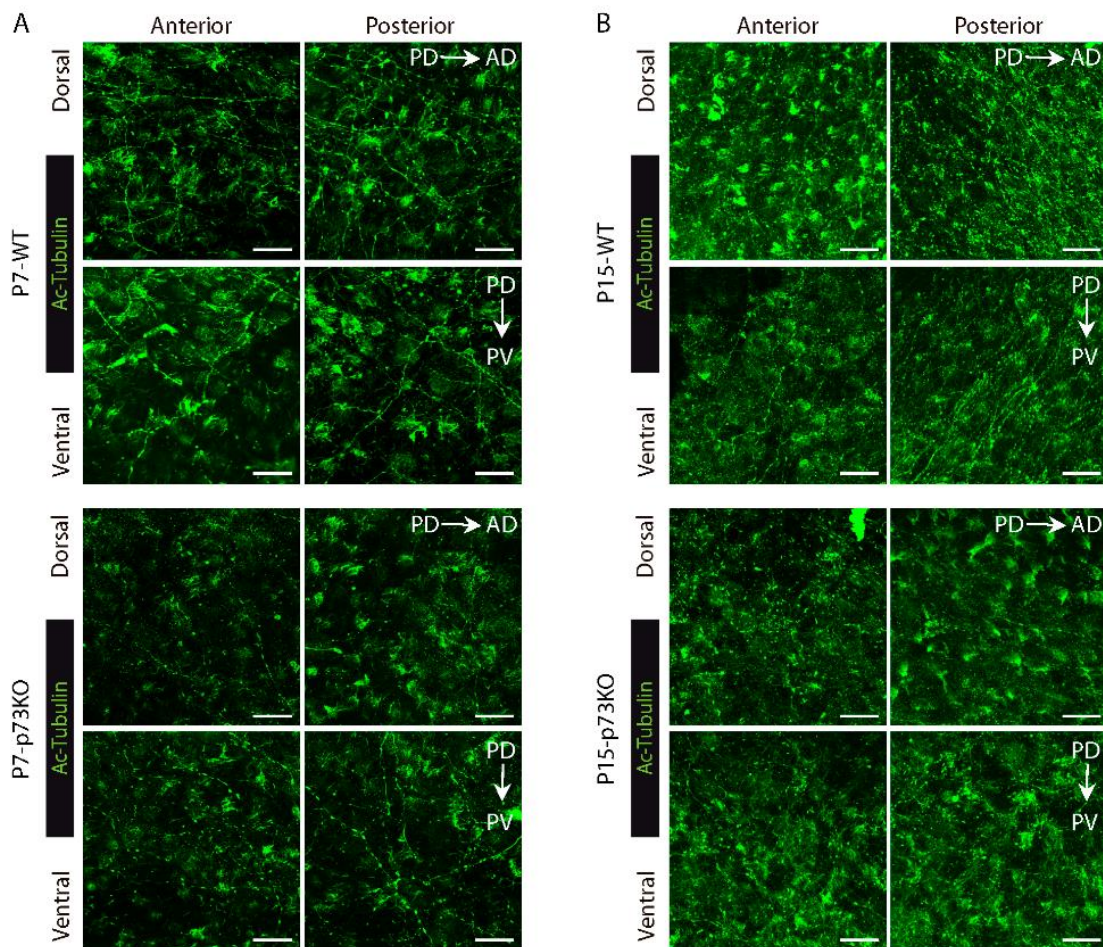


**Figure 43. Lack of p73 alters motile cilia generation and planar cell polarity establishment during the transformation of monociliated RG into ependymal cells.** SEM analysis of WT and p73KO lateral ventricle wall wholemounts at P7 (a) and P15 (b). (a) P7-p73KO mice displayed aberrant groups of cilia of different length (double lines). Scale bar: 5  $\mu$ m (b) P15 WT PD region showed organized multiciliated cells while in p73KO the cells had angled and truncated cilia (black triangles). Scale bar: 5 and 10  $\mu$ m. (c–f) Confocal Z-stacks images of WMs immunostained for c-tubulin (red), b-catenin (blue) and Actubulin (green) from P7 (c, f) and P15 (d–f) mice. (c) At P7, RGCs had a primary cilium associated to a single basal body (white arrows) and immature ECs had long cilia emanating from basal bodies patches (yellow arrowheads). Most p73KO ECs had multiple basal bodies but lacked motile cilia (white arrowheads) and only few displayed cilia, but disorganized and of different lengths (yellow arrowheads). (d,e) Mature WT-EC showed characteristic oriented basal bodies patches associated to cilia tufts (white arrows). ECs in p73KO had non oriented BB clusters either associated to disorganized cilia (pink arrowhead) or without cilia (white arrowheads). (f) Comparison of the supraependymal axons (c-f, yellow arrows) network between WT and p73KO mice. AV: anterior-ventral; PD: posterior-dorsal. PD-AD: anterior-posterior axis. PD-PV: dorso-ventral axis. Scale bar: 20  $\mu$ m

We found intriguing that while the SEM analysis revealed less cilia covered area in p73KO lateral ventricle wall (Figure 43 b). Previous data of our laboratory demonstrated that there were no differences in the number of total multiciliated cells in the p73KO, as accounted by the presence of BB clusters (Gonzalez-Cano et al., 2016). Thus, we hypothesized that p73-deficient VZ ependymal cells had BB clusters, but lacked cilia due to a defect in the ciliogenesis process. To address this, we analysed wholemounts of P7 and P15 SVZ stained for acetylated tubulin (Ac-tubulin) which marks ependymal long motile cilia and RGCs short primary cilia. At P7 anterior regions, WT mice displayed RGCs with a primary cilium associated to a single basal body (Figure 43 c, white arrows), while at posterior regions, ECs have long cilia tufts emanating from BBs patches (yellow arrowheads). The majority, although not all, p73-deficient RGCs had a primary cilium associated to a basal body (Figure 43 c, white arrows). However, many ECs had BB clusters that lacked cilia (white arrowheads). Few p73KO ECs had BB patches with associated cilia, but in these cases, the EC displayed disorganized cilia of different lengths (Figure 43 c, white arrowheads, double lines).

P15 WT ECs displayed densely packed BB clusters, all associated to cilia tufts (Figure 43 d and e, white arrows). The cilia dysfunction was patent in p73KO at this stage where many of the large surface cells had disorganized BB clusters that were not associated with cilia (Figure 43 d and e, white arrowheads). Ac-tubulin antibodies also stained some long and slender processes with varicosities (Figure 43 c-f, yellow arrows), corresponding with supra-ependymal axons (Tong et al., 2014). Supra-ependymal axons run parallel to the anterior-posterior axis (PD→AD) of the lateral ventricle on the dorsal V-SVZ and along the dorso-ventral axis (PD→PV) of the WT mice. Surprisingly, the lateral ventricular wall of the P7-p73KO mice had a less dense network of supraependymal axons which lack direction (Figure 43 f, yellow arrows and Figure 44 a). This was also evident at P15 stage where a fine and organized network of supra-ependymal axons running on a dorso-ventral direction was observed in the WT mice (Figure 43 f and Figure 44 b), whereas p73-deficient mice showed a less dense and disorganized network, presumably contributing to their neurogenic deficiency.





**Figure 44. p73 deficient mice had a less organized network of supra-ependymal axons.** Confocal micrographs of whole-mounts immunostained for  $\gamma$ -tubulin (red),  $\beta$ -catenin (blue) and Actubulin (green) from P7 (A) and P15 (B) WT and p73KO mice. Actubulin stain supraependymal axons. AV: anteriorventral; PD: posterior-dorsal. PD to AD: anterior-posterior axis. PD to PV: dorso-ventral axis. Scale bar: 20  $\mu$ m.

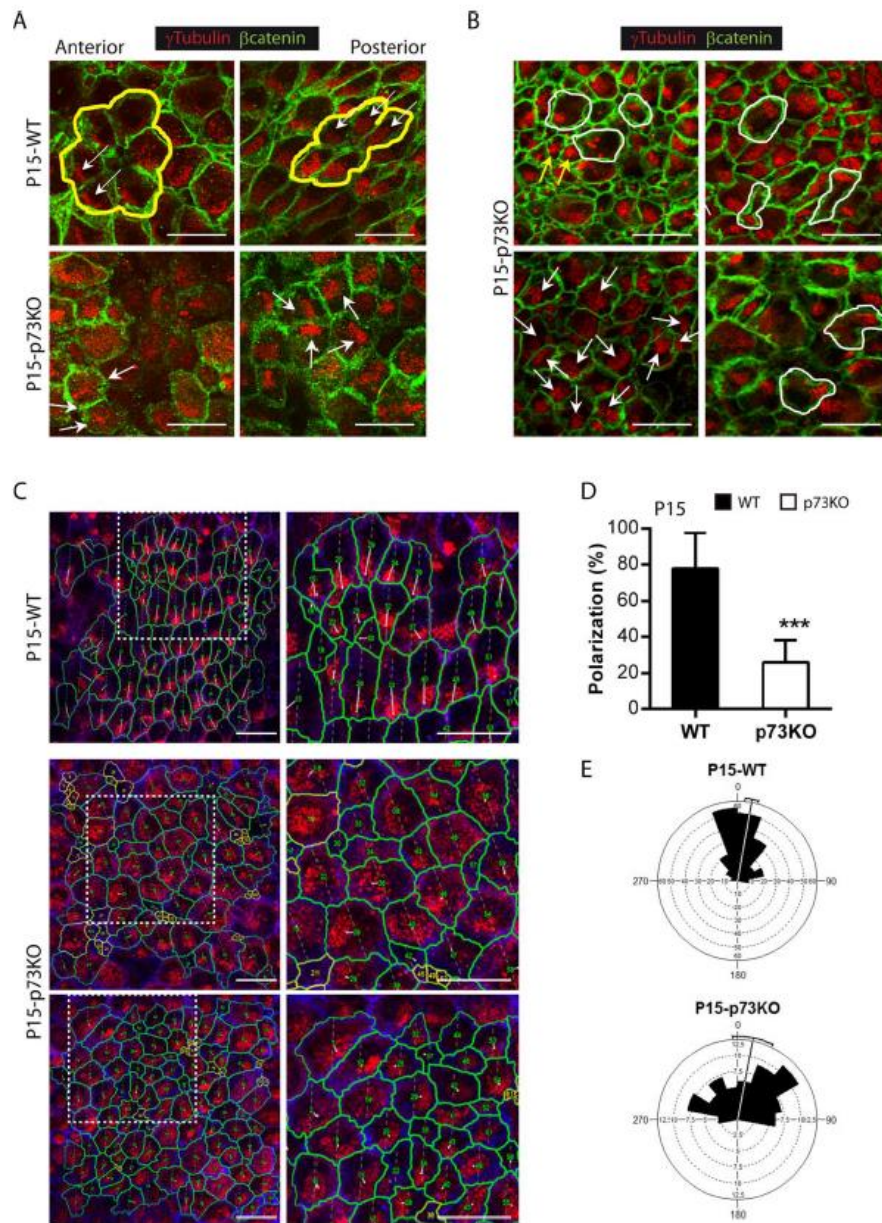
### 1.3.2. Lack of p73 impairs Planar Cell Polarity establishment

Our results confirmed that p73 deficiency results in defective ciliogenesis during the transition from monociliated RGCs into multiciliated ECs. A correlation between defective ciliogenesis and alterations in ependymal planar polarization has been previously reported (Mirzadeh et al., 2010). In agreement with previous data of our laboratory (Gonzalez-Cano et al., 2016) most multiciliated P15 WT ECs were polarized at tissue level (tPCP established). They had their BB patches compacted and clustered on the “downstream” side of the apical cell surface, with respect to the direction of CSF flow, and cilia tufts following the same orientation (Figure 43 d and e, white arrows). However, in p73-deficient cells most BB clusters were not polarized (Figure 43 d, white arrowheads], independently of the presence of cilia tufts (Figure 43 e, white arrows, pink arrowhead) or its absence (white arrowheads), suggesting that p73 effect on tPCP was upstream of ciliogenesis.

Moreover, WT ECs that conform a pinwheel structure had their BB clusters polarized with a similar orientation (Figure 45 a, yellow lines and white arrows). That was not the case in p73KO ECs, which had their BBs either distributed throughout the apical surface, or oriented following different directions (Figure 45 a and b, white arrows). Moreover, they display different arrays of cilia cluster distribution: some cells had very tightly compacted basal bodies (Figure 45 b, yellow arrows), others formed more than one cluster located on one side of the apical surface, or even in two opposing poles (white lines). Altogether, suggesting that p73 is essential to organize BB in individual cells and also for intercellular BB patch orientation. To further address p73 requirement for the establishment of tPCP we quantify the degree of cluster polarization relative to the apical surface. For this purpose we use a program generated by Wimasis® to calculate the polarization ratio (Figure 45 c and d). We measured the relative distance between the geometric center of the apical surface and the BB cluster centroid (Boutin et al., 2014). We observed significant differences between WT ECs, with a mean polarization ratio of  $77.72 \pm 19.77$ , and p73KO cells with a ratio of  $25.99 \pm 12.13$  (Figure 45 d), indicating that p73 is essential to organize translational polarity at single cell level. Furthermore, we asked whether p73 deficiency affected the coordination of BB patches displacement at tissue level by drawing a vector from the cell centre to the cluster centroid (Boutin et al., 2014). Vectors of neighbor WT ECs had similar direction, but in p73KO ECs they were more divergent (Figure 45 c, white lines). Calculation of the angle of displacement (Figure 45 e) indicated that the angular desviation of individual vectors from the mean was  $\pm 35.76^\circ$  (Watson's U2 test  $p < 0.005$ ). Altogether, our data strongly support the hypothesis that p73 is essential to translational PCP.

The appropriate functioning of ependymal cells is fundamental to create and maintain the neurogenic milieu of the germinal niche in the SVZ of rodent brain (Lledo et al., 2008). In this regard, since p73 is expressed in the ependymal cells (Hernandez-Acosta et al., 2011; Medina-Bolivar et al., 2014), we hypothesized that p73 had a possible role in EC biology. In agreement with our hypothesis, ependymal cell denudation in p73 deficient mice has recently been described (Medina-Bolivar et al 2014), although the nature of the ECs defects have not been described. Previous results from our group (Gonzalez-Cano, Tesis Doctoral, 2013) indicated that p73 ablation did not result in less S100 $\beta$ + cells, but rather in ECs immaturity with the consequent cellular disorganization in the VZ and loss of brain ventricular integrity. One of the hallmarks of the p73 deficient brain is the presence of immature ECs that express GFAP and had the basal bodies clustered in deuterosomes. These immature ECs fail to organize into neurogenic pinwheels, disrupting p73KO-SVZ cytoarchitecture and thus, niche structure and function (Kokovay et al.,

2012). These features are maintained in the adult p73KO VZ, suggesting that the EC maturation was halted and confirming that p73 deficiency results in a deregulation of the transition process from RGC to ependymal and B-cells, leading to the emergence of aberrant cells with abnormal intermediate identities within the lateral wall of the ventricle.



**Figure 45. Lack of p73 impairs translational planar cell polarity in ependymal cells.** Confocal Z-stacks images of lateral ventricle wall wholemounts from the indicated age and phenotype immunostained for b-catenin (green, a, b or blue, c) and ctubulin (red). (a) P15-WT ECs, but not the p73KO, were organized in pinwheel structures (yellow lines) and displayed translational PCP with cilia patches clustered on the “downstream” side of the apical cell surfaces, and oriented with respect to the direction of CSF flow (white arrows). (b) p73KO multiciliated ECs had the basal bodies distributed throughout the apical surface (white arrows) and showed different cilia clusters distribution: e.g. BB patches compacted very tightly (yellow arrows) or multiple clusters (white lines). (c) Trace of the cell contour (green) and magnifications of the white line inserts (right panels). Lines from the cell center to the BB centroid show BB cluster’s angle displacement. Scale bar: 20  $\mu$ m. (d) Quantification of BB polarization (the relative distance between the geometric center of the apical surface and the BB cluster centroid) (e) Angular distribution of vectors of BB displacement around the mean. In WT, the majority of vectors were closely distributed showing the coordination of BB displacement among neighbor cells. In the absence of p73, this coordination is lost, leading to a broader distribution.

p73 deficient ependymal cells had an aberrant membrane morphology with pleats and invaginations that could be the cause of their failure in establishing appropriate cell to cell adhesions. This p73KO phenotype was also detected in the absence of p53 (DKO mice), suggesting that p73-deficient effect is not due to an enhanced cell death resultant from p53 compensatory activation in the absence of the anti-apoptotic DNp73. Indeed, the ependymal layer in the absence of p73, including in DKO, is pseudostratified and discontinuous indicating p73 requirement for brain ventricular integrity. In this regard, studies have demonstrated that ependymal cell–cell adhesion regulates NSC activation under physiological and regenerative conditions (Porlan et al., 2014). Thus, lack of cellular contacts in the p73KO SVZ could lead to activation and subsequent depletion of the normally quiescent NSCs.

In P15 p73KO mice we detect monociliated cells (accounted by BB staining) that cannot be identified as bona fide B1-cells (neural stem cells). These cells resemble the monociliated-small apical surface radial glial cells observed in WT brains at early immature stages (P7) that did not yet display GFAP expression. It is possible that in the absence of p73, only few RGC are capable to progress into functional neural stem cells (GFAP expressing B1-cells), leading to a diminished neural stem cell population in the SVZ. This lack of an appropriate pool of neural stem cells could be the underlying mechanism of the impaired neurogenic capacity in p73KO mice brain. This suggests that p73 is not only essential for neural stem cell maintenance (Agostini et al., 2010; Fujitani et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2010; Talos et al., 2010), but also for the de novo generation of neural stem cells during the postnatal generation of the neurogenic niche in mice SVZ. In agreement with impaired neurogenic function, p73KO lateral wall had a less dense network of supra-ependymal axons, known to directly interact with NSCs to regulate neurogenesis (Tong et al., 2014). These axons normally encircle the base of ependymal cilia tufts; therefore, their reduction could be secondary to abnormal cilia generation and growth. It has been proposed that glutamate provided by these axons may supplement metabolic pathways in multiciliated ECs in order to fuel the energy demand of the ciliary beating (Robinson et al., 1996). Consistent with p73 requirement for the maintenance of the neurogenic niche function, our analysis revealed that p73KO mice had significantly less proliferating neuroblasts and B cells than WT mice. This effect is not due to p53-induced cell death since DKO mice also showed a significant reduction in these cellular populations in the SVZ. These results support an impairment of neurogenesis and probably a decrease in the number of new neurons that migrate to the OB. Thus, p73 deficiency has a profound effect on SVZ maintenance and neurogenesis.

The most striking alteration of the p73KO brain is the profound defects in ECs planar cell polarity. Our data strongly suggest that p73 is necessary for the primary cilia organization in RGCs,

which orchestrates the planar polarized architecture of both radial glia and their progeny ependymal cells (Mirzadeh et al., 2010), and also for the establishment of ependymal tPCP. Moreover, in the absence of p73 many ECs had basal body clusters but lacked cilia, or the number of total cilia tufts was lower, indicating that p73 deficiency alters or delays ciliogenesis.

We demonstrate that p73 function is necessary to organize the basal bodies within individual cells and, even though it is not required for basal body cluster displacement from the center, it is essential for intercellular patch orientation, since the p73KO cells did not have a common direction of displacement. Lack of basal body cluster orientation in p73KO ECs was independent of the presence of cilia tufts, suggesting that p73 effect on PCP is upstream of ciliogenesis. This is in agreement with reported observations that support the notion that PCP signaling influences cilium, while definitive evidence for regulation of PCP signaling by cilium is still missing (Gray et al., 2011). Many PCP core regulator genes like Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type 1-3 (Celsr 1-3), Frizzled Class Receptor 3 (Fz3), Van Gogh like1-2 (Vangl1-2) and Disheveled1-3 (Dvl1-3) or Non-Muscle Myosin II (NMII) have also been implicated in cilia development and function (Ibañez-Tallon, et al. 2004; Lechtreck et al., 2008; Guirao et al., 2010; Hirota et al., 2010; Ohata et al., 2014). However, the mechanism of p73 regulation of PCP remains elusive.

Our results show that lack of p73 results in profound defects in the timing of ependymal cell maturation, and in the establishment of planar cell polarity, altogether affecting the correct assembly of the neurogenic cytoarchitecture of the SVZ germinal center. These alterations could be the subjacent mechanisms that lead to the hydrocephalus and defective neurogenic capacity of the p73 deficient mice, highlighting the important role of p73 in brain development and brain homeostasis.

## 1.4 MATERIAL AND METHODS

### **1.4.1 Mouse Husbandry, Genotyping and BrdU Treatment**

Housing and animal experiments were conducted in agreement with European and Spanish regulations on the protection of animals used for scientific purposes (Council Directive 2010/63/UE and RD 53/2013, respectively) with the appropriate institutional committee approval. Mice heterozygous for Trp73 on a mixed background C57BL/6 x 129/svJae (Yang et al., 2000) were backcrossed to C57BL/6, at least five times, to enrich for C57BL/6 background. Heterozygous animals were crossed to obtain the p73KO mice. C57BL/6 p53 knockout mice (p53KO) were previously described (Donehower et al., 1992). To generate the double p73;p53 knock-out mice



(DKO), heterozygous Trp73+/- animals were crossed with p53KO mice, obtaining the double heterozygous mice, Trp73+/-; Tp53+/- . Then, double heterozygous were inter-crossed to originate the DKO animals. Genotyping of adult animals was performed by PCR analysis as described before (Yang et al., 2000; Flores et al., 2005). The thymidine analogue BrdU (Sigma, St. Louis, MO) was administered intraperitoneal (90 mg/kg) in pulse injections every 2h, during 8h. Male and female mice were used in the experiments.

#### **1.4.2 Immunohistochemistry**

Animals were fully anesthetized using an analgesic/anesthetic mixture of medetomidine hydrochloride (Domtor®, Orion Corporation, Espoo, Finlandia) and ketamine (Imalgene® 500, Merial, Duluth, GA). Medetomidine (1 mg/kg)/ketamine (75 mg/kg) euthanasic mixture was prepared in phosphate buffer saline (PBS) and injected intraperitoneally. Animals were euthanized in agreement with European and Spanish regulations by transcardial perfusion with 0.1M PBS supplemented with 1% heparin until the drained blood became clear, and then with ~20–40 mL of fresh 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M PBS, depending of the age of the animal.

After perfusion, brains were dissected and post-fixed overnight (o/n) in fresh 4% PFA in PBS solution at 4°C. For cryopreservation, samples were incubated for 24 h in 30% sucrose/PBS solution. Samples were then frozen in dry ice and stored at -80°C. A 30-mm-thick coronal sections were prepared using a Microm HM450 sliding microtome (Thermo Scientific, Waltham, MA) and stored in PBS supplemented with 0.05% sodium azide at 4°C. BrdU and Ki67 staining required antigen retrieval for which sections were incubated in 2N HCl for 15 min at 37°C. Then, sections were washed and stained according to the published protocol (Gonzalez-Cano et al., 2010). Sections were incubated with the indicated antibodies (Table 1). Confocal microscopy images were obtained with Nikon Eclipse TE2000 confocal microscope (Nikon, Chiyoda-Tokyo, Japan) and Olympus FluoView FV10i Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus, Shinjuku-Tokyo, Japan). Figures show single level representative pictures.

#### **1.4.3 Isolation and Immunostaining of SVZ Wholemounts**

Wholemounts of the lateral wall of the ventricles were dissected from 7, 15 and 160 postnatal mice. Animals were anesthetized and euthanized in agreement with European and Spanish regulations and the brain was dissected and placed in cold 0.1M PBS. Dissection of the WMs was made under the stereomicroscope as described (Mirzadeh et al., 2010). WMs were transferred ventricle side up to a 24-well plate with 4%PFA/0.1% Triton-X100 (Tx100), fixed o/n at 4°C and stored in 0.1M PBS at 4°C.

WMs were incubated for 2h at room temperature in blocking buffer (0.1M PBS/10% NDS/0.5% Tx100). Then, sections were incubated for 48h at 4°C with the appropriate primary antibodies (Table 2) diluted in blocking buffer. Immunofluorescent detections were carried out with Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA) or DyLight (Pierce, Waltham, MA) and Cy2, Cy3, and Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) conjugated secondary antibodies. DAPI (1 mg mL<sup>-1</sup>) was used for nuclear counterstaining. Samples were analysed in an Olympus FluoView FV10i confocal laser scanning microscope (Olympus, Shinjuku-Tokyo, Japan). Images were acquired and processed using FV10-ASW 2.1 viewer software.

**Table 2.** Primary Antibodies Used for Immunohistochemistry

Antibody	Host	Dilution	Manufacturer, Catalog Number
BrdU	Mouse	1:200	Dako, M0744
BrdU	Mouse	1:500	BD Biosciences, 347583
β-Catenin	Rabbit	1:100	Cell signaling, 9587
β-Catenin	Mouse	1:100	BD Biosciences, 610153
Dcx	Goat	1:150	Santa Cruz Biotech, SC8066
GFAP	Chicken	1:500	Chemicon, Ab5541
GLAST	Rabbit	1:100	Tocris, 2064
IB4	Mouse	1:20	Sigma, L2140
Ki67	Rabbit	1:100	Abcam, ab15580
s100β	Rabbit	1:100	Dako, Z0311
Ac-Tubulin	Mouse	1:1000	Sigma, T6793
γ-Tubulin	Goat	1:200	Santa Cruz Biotech, SC7396
Vimentin	Guinea Pig	1:500	Fitzgerald, 20R-VP004

#### 1.4.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Lateral wall isolated from P7 and P15 mice were fixed with 0.1M PBS/2% glutaraldehyde, pH 7.2–7.4 at 48°C. Then, samples were dehydrated through a series of aqueous ethanol solutions (30, 70, 90, 96, and 100% ethanol) and finally dried with liquid CO<sub>2</sub> (critical point at 8°C). To obtain SEM images, samples were covered with a cycle of evaporation of gold atoms induced by argon in vacuum conditions (0.05–0.07 mbar). SEM images were obtained using a JEOL Scanning Electron Microscope (JEOL, Akishima-Tokyo, Japan). Images of the whole mounts were acquired every 0.5 mm and maximum projection of three to five consecutive Z levels are shown.

#### 1.4.5 Image Data Quantification and Statistical Analyses

For all the analyses, at least three independent mice from each genotype were considered. Analysis of SVZ coronal sections was performed considering anterior, medial and posterior sections. For each section, Z-stacks (20 μm) from at least six dorso-ventral regions along the wall of the ventricle were acquired. To determine the numbers of positive cells, images were counted approximately every 7 μm ensuring that different cells were considered. The percentage of positive or double positive cells was calculated relative to the total number of nuclei (DAPI

staining) at each Z level. When comparing the number of B cells versus GFAP positive cells, the number of GFAP and positive cells was first determined independently. Then, the percentage of GFAP/Ki67 cells out of the GFAP positive was calculated. Quantification of GLAST cells refers to the number of positive cells touching the ventricle relative to the analyzed lateral wall length (linear measurement= 130  $\mu$ m).

Wholemount image analysis was performed counting four non overlapping fields (130  $\mu$ m x 130  $\mu$ m) of every specified region and genotype. Images of the WM were acquired every 0.5 mm and maximum projections of three to five consecutive Z levels are shown. In some cases, due to the cell heterogeneity depending on the region and the genotype, data are presented relative to the total surface analysed.

A customized software developed by Wimasis (Wimasis GmbH, Munich, Germany) was used to determine cell areas, percentage of cell polarization and angle displacement. Ten independent representative images per genotype were analyzed. For cell polarization analysis, the contours of ependymal cells and BB patches were defined and the relative distance between the geometric center of the apical cell surface and the BB cluster centroid was determined and divided by the cell radio. Angle displacement was determined relative to a reference angle for each microscopy field by drawing a vector from the cell center to the cluster centroid (Boutin et al., 2014).

Comparison of the cellular populations that constitute the SVZ was carried out using a Kruskal–Wallis test together with Dunn’s multiple comparisons test. For all the other analyses, Mann–Whitney non-parametric tests were performed. Angle displacements were compared by circular statistical analysis. Data were graphically represented using Oriana software (Kovach Computing Services, Anglesey, Wales) and Watson’s  $U^2$  test was performed. Differences were considered significant when  $P < 0.05$  (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) and all data are reported as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD).



## **CAPÍTULO II**

---

**p73 IS ESSENTIAL FOR TRANSLATIONAL PLANAR CELL POLARITY AND NON-MUSCLE MYOSIN II ACTIVATION AND LOCALIZATION IN EPENDYMAL CELLS**



## 2.1 ABSTRACT

Cell shape, tissue structure and the coordinated behavior across epithelial sheets are established by the action of the planar cell polarity signaling pathway. In ependymal cells (ECs), translational cell polarity (tPCP) is fundamental for coordinated cilia beating and correct cerebrospinal fluid circulation. Planar cell polarity defects affect neurogenesis and brain homeostasis and result in hydrocephalus. Here we unveil p73 as a novel regulator of tPCP in ECs through the modulation of the activation of the actin-based motor protein, NMII, being p73 function essential for apical actin network assembly. Trp73 deficiency results in defective basal body (BB) docking and altered localization of the BB-docking regulators Dishevelled2 and Rac1. MLCK, the principal activator of NMII in ECs, is a direct transcriptional target of TAp73 and lack of p73 results in decreased NMII activation and altered sub-cellular localization. In agreement, lack of TAp73 results in altered tPCP and diminished and delocalized active-NMII. This new p73 function as regulator of ciliogenesis and translational PCP establishment, reveals p73 as an architect of epithelial tissues.

## 2.2 INTRODUCTION

The specific orientation of cells within the plane of the tissue, named Planar Cell Polarity (PCP), is an essential feature of animal tissues (Butler & Wallingford 2017). PCP is fundamental for the generation of the appropriate shape and function of tissues and organs during embryonic development and maintaining homeostasis in the adult tissues. It is well established that in multiciliated epithelial cells (MCC), such as the ependymal cells (ECs), individual and coordinated cilia orientation is fundamental for correct functioning (Butler & Wallingford 2017). In the brain, PCP disruption results in dysfunctions of ependymal cilia and hydrocephalus (Boutin et al., 2014; Ohata & Alvarez-Buylla, 2016). Thus, PCP signaling seems to be required for polarized beating of motile cilia in a variety of tissues, including ECs (Wallingford and Mitchell, 2011). However, in airway epithelia, PCP depends on MCC differentiation and ciliogenesis (Vladar et al., 2016). Perhaps the intersection of PCP and ciliogenesis resides in the existence of common regulators of these processes. In this regard, the p73 gene has been described as a key player in the organization of ciliated epithelia, in trachea and ependymal cells (Gonzalez-Cano et al. 2016, Marshall et al. 2016, Nemajerova et al. 2016) but also for PCP establishment in the latter (Gonzalez-Cano et al., 2016).

p73 transcription factor belongs to one of the most important gene families in vertebrate biology, the p53 family. The members of this p53 family, p53, p63 and p73, are important players

in neural stem cell (NSC) maintenance and neurogenesis (Meletis, et al., 2006; Agostini et al., 2010; Fujitani et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2010; Talos et al., 2010) and brain neurogenic niche cytoarchitecture (Gonzalez-Cano et al., 2016). The *TP73* gene can generate multiple isoforms, TA and DNp73 variants, with different and, some time, antagonist functions (Engelmann et al., 2015). The fundamental role of p73 in brain development and homeostasis is highlighted by central nervous system (CNS) defects of the *Trp73*<sup>-/-</sup> mice (p73KO from now on), which lack all p73 isoforms. These animals, show cranial hemorrhages, hippocampus dysgenesis and hydrocephalus (Yang et al., 2000) but also alterations in the ependymal layer and germinal niche cytoarchitecture (Gonzalez-Cano et al., 2016). While it is known that TAp73 acts as a central transcriptional integrator of multiciliogenesis, directly controlling key ciliary regulators (Marshall et al., 2016; Nemajerova et al., 2016), the mechanism underlining p73 control of PCP, or the isoform responsible for this regulation, has not been addressed.

In rodents, ECs layer the wall of the lateral ventricle (LV) and, together with NSCs, form the architecture of the sub-ventricular zone (SVZ) germinal centers (Mirzadeh et al., 2008). EC function is essential for neurogenesis (Lim et al. 2000, Boutin et al. 2014) and cerebrospinal fluid (CSF) circulation, and defects on ECs PCP can result in hydrocephalus, highlighting the important of these cells in brain development and homeostasis (Ohata & Alvarez-Buylla, 2016). ECs are generated from Radial Glia cells (RGCs) during late fetal development and after birth in a multistep process initially orchestrated by the primary cilium and its basal body (BB) apparatus (Spassky et al., 2005). ECs display two types of PCP: a unidirectional orientation of their motile cilia (rotational polarity, rPCP) and an asymmetric localization of the cilia cluster at the apical surface (translational polarity, tPCP). This polarization is also observed not only at single-cell level but also at tissue scale (Mirzadeh et al., 2010). tPCP is first established at individual level during perinatal development when RGCs increase their apical surface and develop clusters of newly generated centrioles, future BBs, that will migrate to the cell surface in a process called apical docking (Guirao et al., 2010; Jacquet et al., 2009). After birth, the individual BBs of multiciliated immature ECs will acquire rotational polarity at individual and tissue level and translational PCP at tissue level (Guirao et al., 2010). In this regard, lack of p73 abolishes ECs translational polarity (Gonzalez-Cano et al., 2016), suggesting its role as tPCP regulator.

Translational and rotational PCP are regulated by distinct molecular mechanisms (Hirota et al., 2010; Boutin et al., 2014), that are not fully elucidated. In this regard, non-muscle myosin II (NMII) was demonstrated to be a key player of this process, its function is required for the establishment of BB translational, but not rotational, polarity (Hirota et al., 2010). The translational polarity of the cilia BBs described in ECs is also observed in kinocilia, in hair cells of the vertebrate

inner ear, in node cilia and in lens fiber cells (Wallinford 2010), but not in multiciliated cells in the mouse trachea or in embryonic frog skin, where cilia are distributed throughout the whole cell surface (Ohata & Alvarez-Buylla, 2016).

NMII is an actin-binding protein central in the control of cell adhesion and tissue architecture that consist of two heavy chains (non-muscle myosin heavy chains, NMHCs), a pair of regulatory light chains (RLCs), and a pair of essential light chains (ELCs) (Vicente-Manzanares et al., 2009). NMII have been detected in the cytoplasm of ECs and at the proximity of the BBs. Whereas, NMII activity is regulated by the phosphorylation of its light and heavy chains by the kinases Rho-associated protein kinase (ROCK) and myosin light chain kinase (MLCK), only MLCK-dependent activation is essential for the establishment of this polarity in ependymal cells (Hirota et al., 2010). Moreover, NMII ablated mice present hydrocephalus (Ma et al., 2007).

The causal relationship between ciliogenesis and PCP signaling is not fully unraveled, thus it is unknown whether p73 regulates two independent pathways (ciliogenesis and PCP), or, if the defects observed obey to alteration of a unique and interconnected process. Here, we unveil p73 as a novel regulator of ECs through the modulation of NMII activation, being p73 function essential for apical actin network assembly. MLCK is a direct TAp73 transcriptional target thus lack of p73 results in decrease NMII activation and altered sub-cellular localization. In consequence, p73 deficiency affects apical actin networks resulting in defective BB docking and altered localization of the BB-docking regulators Dishevelled (Dvl2) and Rac1. Ependymal cell of TAp73KO mice displayed altered translational polarity and low levels of activated-NMII, revealing this isoform essential for translational polarity. However, TAp73-deficient ECs have altered BB docking and less cilia density, indicating that, while this isoform is dispensable for axoneme formation in ECs, is required for tPCP establishment and the correct ciliogenesis process.

## 2.3 RESULTS AND DISCUSSION

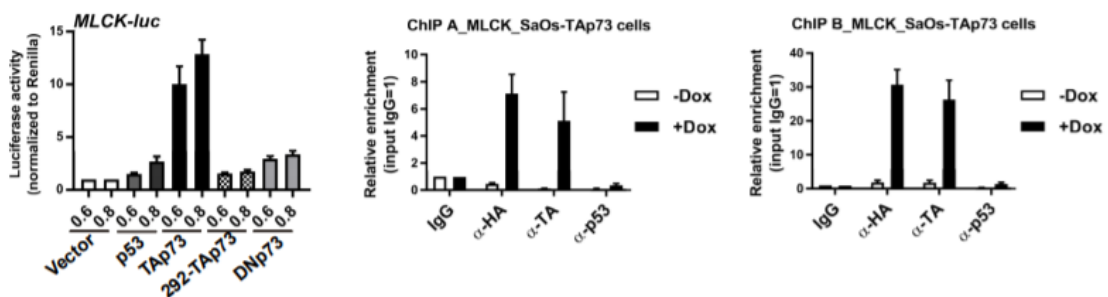
### **2.3.1 p73 regulates NMII activation inducing the expression of MLCK, correlating p73 expression with NMII activation *in vivo* and *in vitro***

To elucidate the possible mechanisms by which p73 regulates the establishment of ependymal tPCP (Gonzalez-Cano et al., 2016), we search published genome-wide expression analysis (Marques-Garcia et al., 2009) of p73 overexpressing cells to identify possible targets. Our quest revealed a significant upregulation of the NMII regulatory kinase, MLCK. Activation of NMII by MLCK was reported to be essential for ependymal translational (Hirota et al., 2010). Thus, we hypothesize that p73 could regulate tPCP at least in part, by controlling NMII activity. In

accordance with this hypothesis, a p53 response element (p53RE) has been previously reported within the human MLCK promoter (Ye and Ma 2008). Additionally, ChIP-seq analysis in human SAOS-2 cells (Nemajerova et al., 2016; published in advance) revealed a TAp73 peak which could correspond to a putative enhancer element (region 70681-70861 pb from NCBI Reference Sequence: NG\_029111.1, matching to intronic sequence upstream the exon that contains the ATG).

To address p73 transcriptional regulation of MLCK gene we performed luciferase assay with the p53RE identified (Figure 46, left panel). Transcriptional assays in p53 deficient HCT116p cells with the human pGL3-hMLCK(1Kb)-luc (Graham et al. 2006), demonstrated that TAp73 can significantly activate p53RE (Figure 46, left panel). In the same assay, the transcriptional-inactive mutant TAp73-292 had no effect while p53 and DNp73 had only weak activity (Figure 46, left panel).

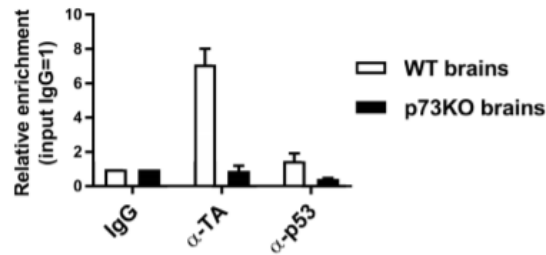
Next, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was carried out in p53-deficient, TAp73-inducible cell line, Tet-ON-SAOS2-HA-TAp73 (Gift from Karen Vousden, Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate, Glasgow, UK). Crosslinked cellular extracts were IP using either an anti-TAp73 or anti-HA specific antibodies, or, as negative controls, anti-p53 and isotopic (IgG) immunoglobulins. Following pulldowns, the interacting DNA was quantitated by qPCR, using primers specific for the p53RE in the hMLCK promoter region and the p73RE-enhancer. Then they were compared to IgG-pulldown as background. ChIP assays revealed a significant interaction of TAp73 with both sites (Figure 2, right panels). Altogether demonstrating that MLCK is a direct TAp73 transcriptional target and supporting the idea that p73 could regulate NMII activation.



**Figure 46. p73 binds directly to human MLCK regulatory elements.** Luciferase assay in HCTp cells (left panel) and ChIP analysis in inducible TAp73-Saos cells (right panel). TAp73 isoform binds directly the hMLCK promoter or to regulatory elements and regulates its transcription.

Even though previously published ChIP-seq analysis of murine tracheal epithelium cell culture (MTEC) (Marshall et al., 2016), did not detected p73 binding on the mouse MLCK promoter (Marshall et al., 2016), sequence analysis with the JASPAR Core Vertebrata Database identified a

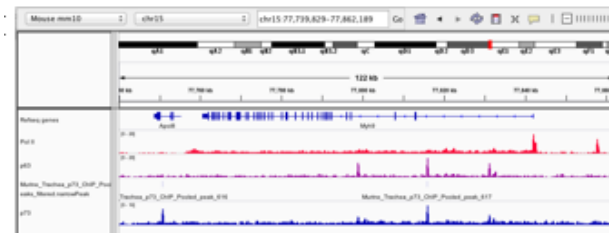
strong p73RE in the region ~1800 bp from the ATG in Exon 1\* (Herring et al., 2006; region between positions 34702917-34702967; from Genomic sequence compilation on the UCSC genome browser). Thus, to address direct p73 *in vivo* interaction, ChIP assay was performed in WT and p73KO mice brains. A significant interaction of endogenous of TAp73, but not p53, was observed in WT but not in 73KO brain tissue (Figure 47), demonstrating the specificity of the interaction in a physiological context.



**Figure 47. p73 binds directly to mouse *MLCK* regulatory elements.** ChIP analysis in WT and p73KO brains. TAp73 isoform binds directly to the mouse *MLCK* promoter.

It is noteworthy that previous MTEC-ChIP-seq analysis (Marshall et al., 2016) revealed a p73 binding at -2709 bp upstream of the *Myh9* TSS. Moreover, a robust increase (590→775 TPM [transcripts per million]) was detected in WT MTECs after ectopic TAp73 expression (Figure 48 a and b). Altogether suggesting that p73 could be regulating, not only the activation, but also NMII levels.

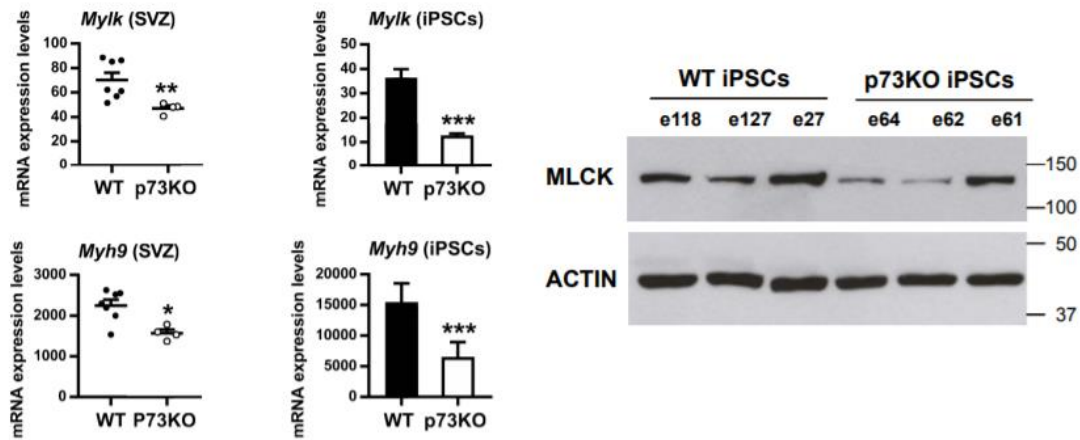
chr	start	end	peak_score	distance_to_TSS	mgi_gene_symbol
chr15	77815822	77816058	132	-2709	<i>Myh9</i>



**Figure 48. In silico analysis of p73RE in *Myh9* promoter.**

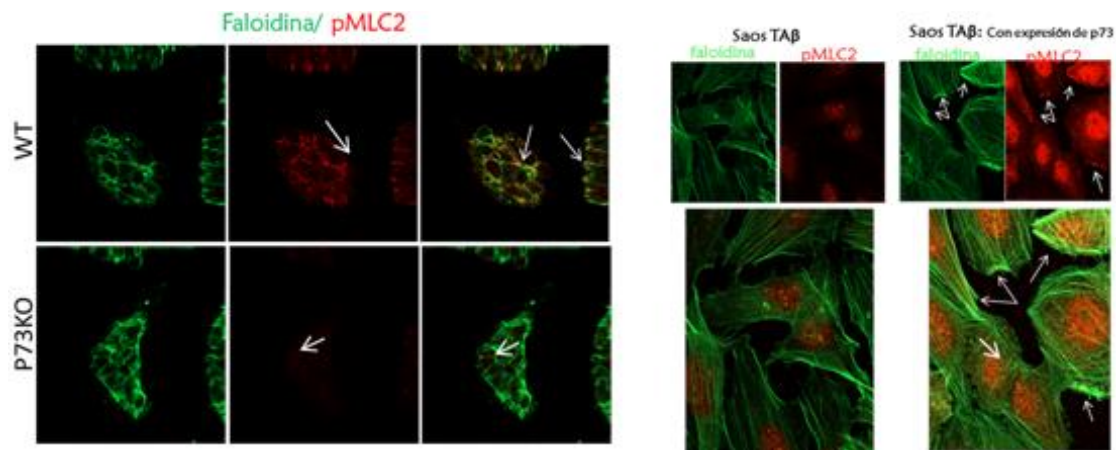
To further sought this, we analyzed *Mlck* and *Myh9* expression levels in tissue from the lateral wall of the lateral ventricle of P15 WT and p73KO mice brains and in WT or p73-deficient induced pluripotent stem cells (iPSC) (Martin-Lopez et al., submitted). Quantitative RT-PCR analysis indicated that lack of p73 correlated with significantly lower levels of *Mlck* and *Myh9* in both systems (Figure 49). Western blot analysis in iPSCs confirmed this correlation. However, one

of the p73-deficient clones analyzed expressed MLCK at levels similar to WT, indicating the existence of p73-independent regulation of MLCK expression (Figure 49, western blot).



**Figure 49. p73 expresión correlates with MLCK mRNA expression.** Quantitative analysis of p73 expression in mice samples: lateral ventricle walls samples and in iPSCs culture. p73 expression correlates with MLCK mRNA levels *in vivo* and mRNA and protein levels *in vitro*.

To determine if p73 expresión correlates with changes in NMII activation we used a specific antibody against the phosphorylated form of myosin light chain (pMLC). We analyzed pMLC in WT and p73KO-iPSCs. Z-stacks and lateral views of confocal microscopy images showed that WT iPSCs expressed higher levels of pMLC, which was detected at the cellular junctions, colocalizing with F-actin (Figure 50). However, in p73-deficient cells, low levels of pMLC were detected and is mostly limited to the cytoplasm, losing F-actin co-localization (Figure 50 e, arrows). Moreover, TAp73 induction in SAOS2-HA-TAp73 cells resulted in enhanced pMLC levels that colocalized with cortical actin bundles (figure 50 e, right panel, arrows) as previously described (Totsukawa et al., 2000). This result demonstrated TAp73 regulation of NMII activity and highlighted its connection with the actin-cytoskeleton.

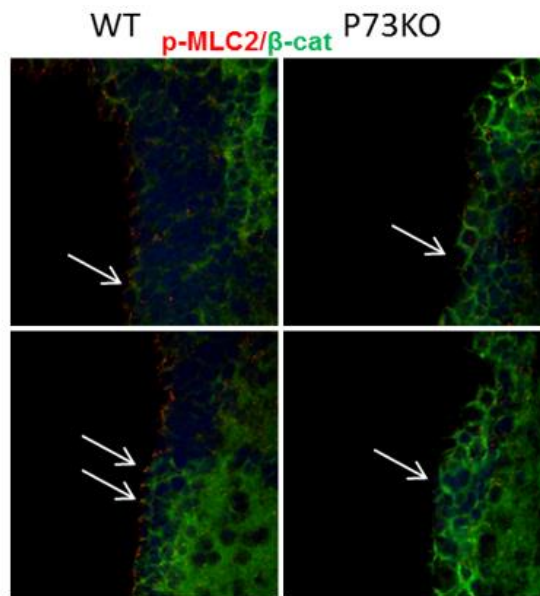


**Figure 50. p73 expresión correlates with NMII activation *in vitro*.** (a) p73KO iPSCs colonies show less pMLC than WT colonies, where pMLC colocalize with actin cytoskeleton (a, arrows; pMLC, red; phalloidin, green). (b) TAp73 induction in



Saos cells resulted in enhanced NMII activation that colocalized with cortical actin bundles (b, arrows; pMLC, red; phalloidin, green). Scale bar: xxx

To investigate the functional correlation between physiological endogenous p73 expression and MLCK activity, we analyzed pMLC in ECs along the lateral wall of the ventricle in coronal section of P15 WT and p73KO mice brains. pMLC junctional localization at the plasma membrane was observed on the apical surface of the WT-ECs facing the ventricle (Figure 51, arrows). However, p73KO ECs had less pMLC (arrows) supporting the idea that p73 function is required for appropriate NMII activity *in vivo*.

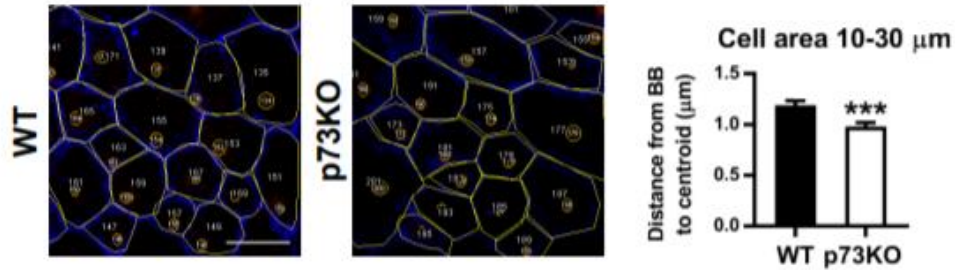


**Figure 51. p73 expression correlates with NMII activation *in vivo*.** Coronal sections of WT and p73KO brains where pMLC dots observed in WT were lost in p73KO mice (arrows; pMLC, red;  $\beta$ catenin, green; DAPI, blue).

### 2.3.2 p73 regulates tPCP through the activation of NMII and is required for pMLC distribution and association with basal bodies

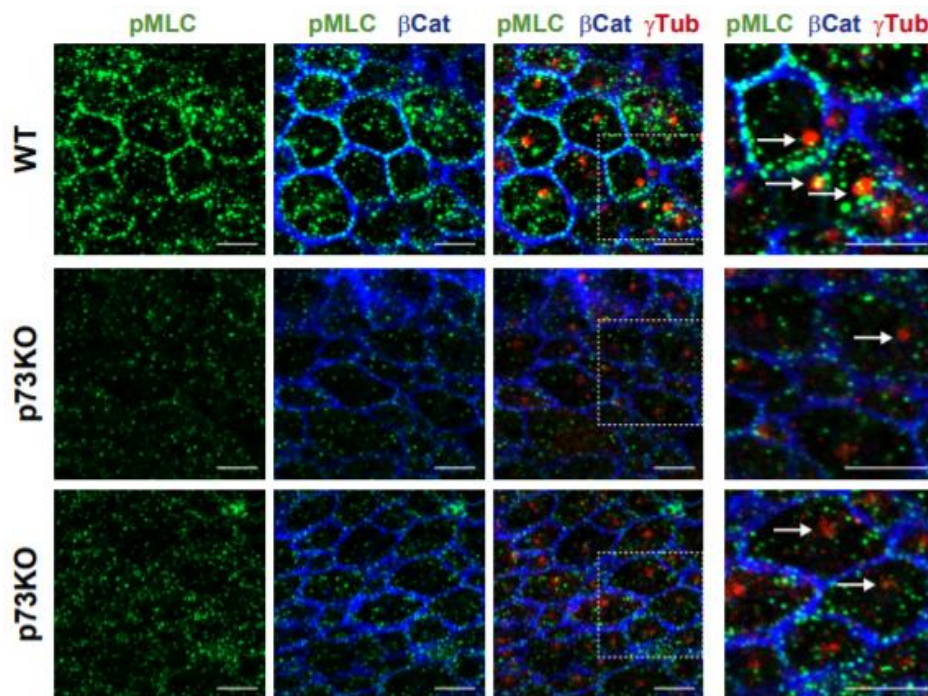
Since NMII is an essential regulator of ependymal tPCP (Hirota et al., 2010), we sought to analyze the effect of p73-deficiency on tPCP and in NMII activation and localization within these cells. We visualized ECs in whole-mount (WM) dissections (Gonzalez-Cano et al., 2016), from WT and p73KO mice, using anti pMLC to detect activated NMII, anti- $\beta$ catenin to delimit the cellular contour and anti- $\gamma$ tubulin to visualize the BBs of ECs. At perinatal day P1 the primary cilium of many RGCs has become asymmetrically displaced, indicating that establishment of tPCP has begun (Boutin et al., 2014; Mirzadeh et al., 2010). We quantify the displacement of the primary cilia by measuring a vector from the cell center to the BB (Figure 52 a, white arrows). We also analyzed 10-30  $\mu\text{m}^2$  RGCs (Boutin et al., 2014) and found that while some p73KO-RGCs had their

BB off-centered by P1, there was a significant difference with the displacement observed in WT cells (Figure 52 b). Thus, in the absence of p73, tPCP establishment, at single-cell level, is either delayed or defective.



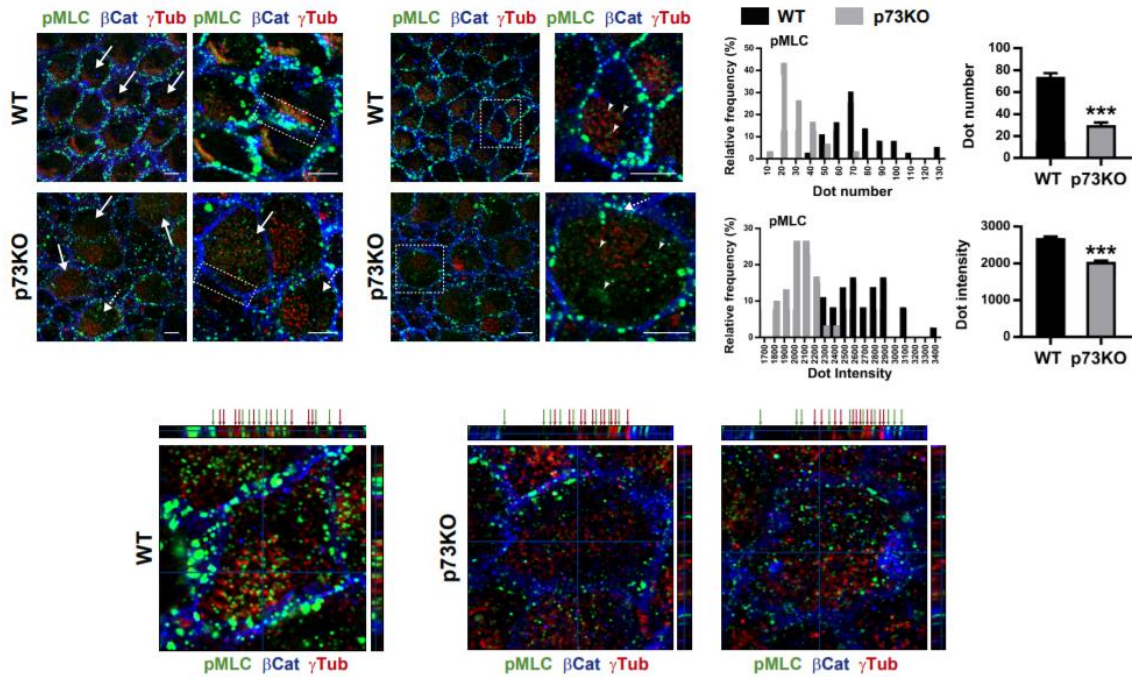
**Figure 52. Representative scheme and quantification of P1 BB displacement from cell centre.** Quantification of the BB displacement from the cell centre in P1 RGCs were carry out using ImageJ software.

In WT cells, at this stage, pMLC is located at the plasma membrane in distinct puncta and is less abundant in the cytoplasm (Figure 53). We observed a strong co-localization between pMLC signal and the unique BB (Figure 53, magnification of confocal images, white arrows), suggesting that activation of NMII at the proximity of the BB and at the plasma membrane might be associated with tPCP establishment. Supporting this idea, p73KO cells, with less cilia displacement at this stage (Figure 53), have lower levels of pMLC, both at the plasma membrane and within the BB proximity.



**Figure 53. Lack of p73 result in less NMII activation in P1 RGCs.** Confocal images (left panel) and magnification (right panel) of WT and p73KO P1 LV, where pMLC signal in membrane and BB colocalization (arrows) observed in WT is lost in the absence of p73 (arrows)

As reported, P15 WT-ECs had their BBs organized in tight clusters which are displaced towards the anterior region of the apical surface in a coordinated way among neighbor cells (Figure 54 a, arrows), indicating that individual tPCP, as well as tissue polarization, has been established at this stage. In these animals, pMLC displayed a planar polarized distribution in two cellular compartments of the ECs: 1) it localizes in puncta at the cellular membrane, close to the BB cluster (Figure 54 a, dotted square), and 2) it is tightly associated to the BBs within the cilia patch (Figure 54 a, arrows). A close observation of the BBs lattice in orthogonal sections of confocal Z-stacks images revealed that in WT-BB patches pMLC signal (Figure 54 c, green arrows) was adjacent to  $\gamma$ tubulin (red arrows). This result confirmed the observation that NMII was highly expressed in the immediacy of ECs BBs (Hirota et al., 2010), and advocating the idea that it plays a fundamental role in the polarization of these cells. As previously reported (Gonzalez-cano et al 2016), In agreement with p73 requirement for the establishment of tPCP (Gonzalez-Cano et al., 2016), most p73KO ECs lack tPCP and their BBs are scattered throughout the apical surface (Figure 54 a, solid arrows), only few cells had clustered and displaced BB patches (dotted arrow). In most p73KO cells pMLC is absent from the plasma membrane cluster (Figure 54 a, dotted square) and found all through the cytoplasm (Figure 54 a, white arrows). Indeed, quantification of the number of pMLC puncta at the plasma membrane, or the puncta average intensity, revealed a significant decrease of membrane activated NMII in p73KO (Figure 54 d). However, in the few p73KO cells with displaced BB cluster, pMLC localizes asymmetrically in puncta at the cellular membrane (Figure 54 a and b, dotted arrow), suggesting the pMLC asymmetric localization at the intercellular junctions might play an important role in translational polarity maintenance. In this regard, it has been reported that MLCK influences cortical localization of NMII, which seems to function as a cortical organizer to concentrate E-cadherin to zonula adherents (Smutny et al., 2010). Thus p73, through NMII regulation, might be a modulator of the functional interaction between cell adhesion and actin cytoskeleton, functioning as an epithelial organizer and helping to establish tPCP.

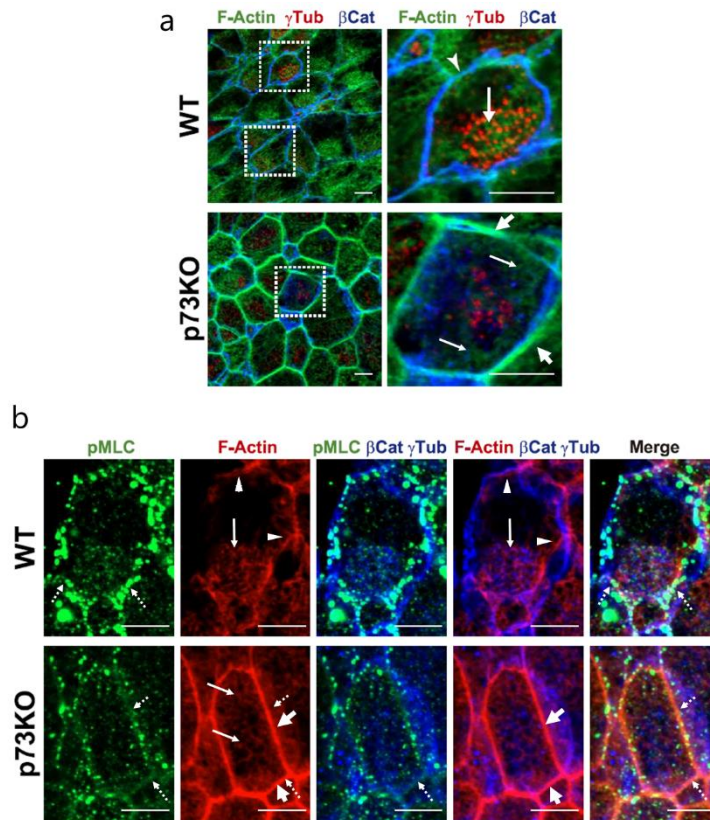


**Figure 54. Lack of p73 result in less NMII activation in P15 ECs.** (a) Lack of p73 results in less accumulation of pMLC in puncta membrane and (b) less colocalization with BB

### 2.3.3 p73 is required for actin cytoskeleton assembly and correct BB docking in ECs

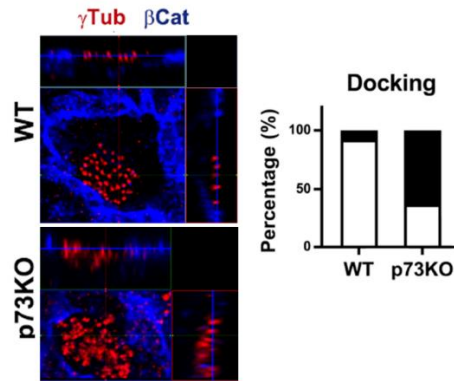
To seek the effect of p73 deficiency on NMII activity and the actin cytoskeleton, we examined F-actin distribution in P15 WT and p73KO WMs. In accordance with previous description (Boutin et al., 2014), WT ependymal cells displayed a polarized and organized apical actin meshwork between the BBs (Figure 55 a and b, arrows) and some loose cortical phalloidin staining (Figure 55 a and b, arrowheads). These actin networks, which provide regular BB spacing and are essential for global coordination of cilia polarity (Werner et al., 2011), appear to asymmetrically anchor pMLC puncta in the plasma membrane (Figure 55 b, dotted arrows), suggesting that the activated NMII could be playing a role in the organization and polarization of actin meshwork, and concomitantly, the BBs clusters. In contrast, p73KO cells exhibited a lax cytoplasmic actin staining (Figure 55 a and b, arrows) which is not connecting with pMLC membrane puncta (Figure 55 b, dotted arrows). In p73KO cells, F-actin is strongly associated with cell junctions at the plasma membrane (Figure 55 a and b, thick arrows), a feature of RGCs (Boutin et al., 2014), this may be a reflection of their aberrant maturation (Gonzalez-Cano et al., 2016) or a reflection of their altered actin dynamics.





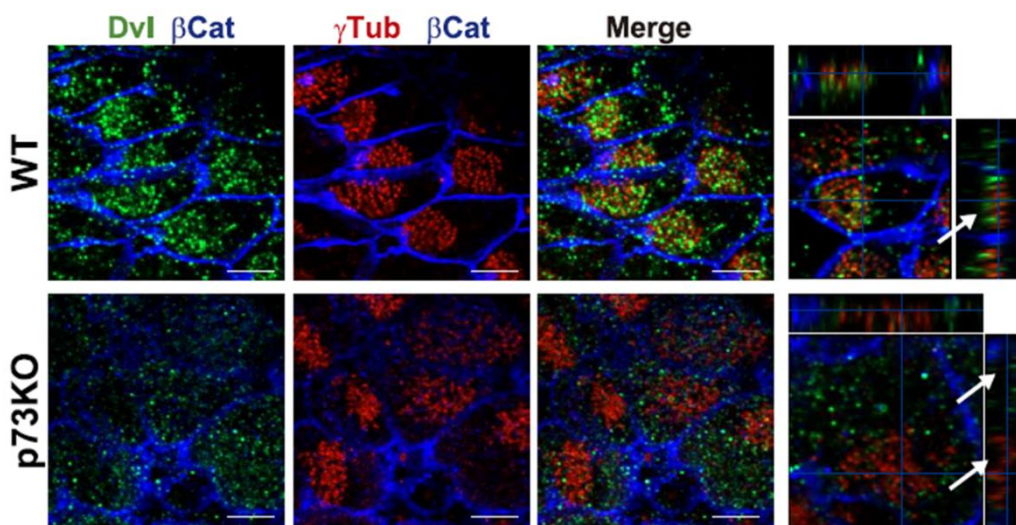
**Figure 55. Lack of p73 results in a lost of apical actin network organization.** Confocal images of WT ECs show a polarized apical actin network between BBs (a and b, arrows) and some cortical staining (a and b, arrowheads). In the absence of p73, ECs show some cytoplasmic lax actin meshwork (a and b, arrows) which is not connecting with pMLC membrane puncta (b, dotted arrows). F-actin is strongly associated with cell junctions (a and b, thick arrows). Scale bar: 10  $\mu$ m (a), 5  $\mu$ m (b).

Our experiments show that lack of p73 results in blunted NMII activation leading to failure of apical actin meshwork assembly. Polarized actin networks are essential to transport apically the newly formed BBs to the plasma membrane, where docking occurs (Vladar & Axelrod 2008). Moreover, docking defects have been reported in p73 deficient multiciliated cells of the trachea (Nemajerova et al., 2016). Thus, we sought to analyze the effect of p73 deficiency on ependymal BB docking. In WT-ECs, BBs were clearly identified by discrete  $\gamma$ tubulin signal which were regularly and aligned with the plasma membrane (Figure 56). This apical localization was lost in p73KO cells, where numerous BBs were scattered and deeply located within the cytoplasm (Figure 56).



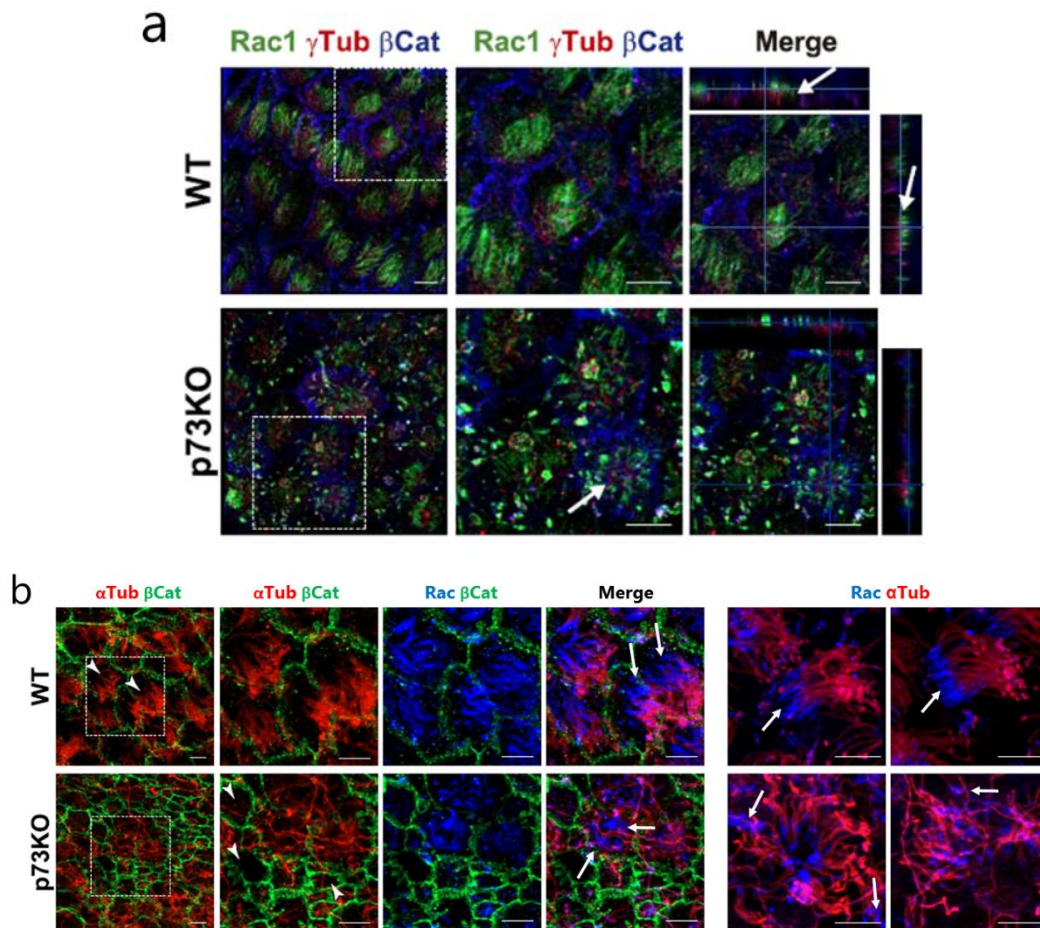
**Figure 56. Lack of p73 results defective BB docking.** Confocal images (a cell/field) with orthogonal projection show that the organization of BB in the apical membrane in WT ECs is lost in the absence of p73. Quantification of cell with BBs totally docked at apical cell membrane.

We next analyzed Dishevelled2 (Dvl 2) and Rac1 localization as a readout of the extent of BB docking defects due to their suggested role in BB planar polarization and requirement for actin assembly and basal body docking in ECs (Park et al., 2008). As reported previously (Ohata et al., 2014, Hirota et al., 2010), Dvl2 had a planar polarized distribution (Figure 57), localized to the rootlet of motile cilia (right panel, arrows). On the other hand, Rac1, which is activated by Dvl and controls basal body docking (Epting et al., 2015), was localized at the top of the BBs (Figure 58 a, arrows) following a coordinated polarized pattern across the tissue plane in WT ECs. In consonance with its function at sites of actin reorganization (Albertinazzi et al., 1999), Rac1 was detected at the base of the axoneme (Figure 58 b, arrows) in a region probably corresponding to the ciliary pocket, a proposed interface with the actin cytoskeleton and a platform for vesicle trafficking (Molla-Herman et al., 2010).



**Figure 57. BB docking defects in p73 deficient cell correlates with mislocalization of Dvl.** Confocal images and orthogonal projections show that in WT ECs Dvl is located at the bottom of BBs (arrow), but this localization is lost in the absence of p73.

In the absence of p73, Dvl2 had lost its polarized distribution and did not colocalize with BBs (Figure 57, right panel, arrows). Moreover, in the context of p73 deficiency, Rac1 expression was disorganized and not all the BB appear to be associated to Rac1 (Figure 58 a, arrows). As previously published (Gonzalez-Cano et al., 2016), cilia dysfunction was patent in p73KO LW, where many ECs had no cilia (figure 58 b, arrowheads), and the observed cilia displayed an abnormal organization when compared with WT ventricles (figure 58 b, arrowheads) which were layered with mature ECs displaying compact and coordinately oriented cilia clusters on their apical surfaces. Moreover, in p73KO cells Rac1 localization within the cilia was not restricted to the ciliary pocket being scattered throughout the axoneme (Figure 58 b, arrows). Altogether demonstrating p73 requirement for apical actin networks assembly, BB docking and the correct polarized localization of the BB regulators.

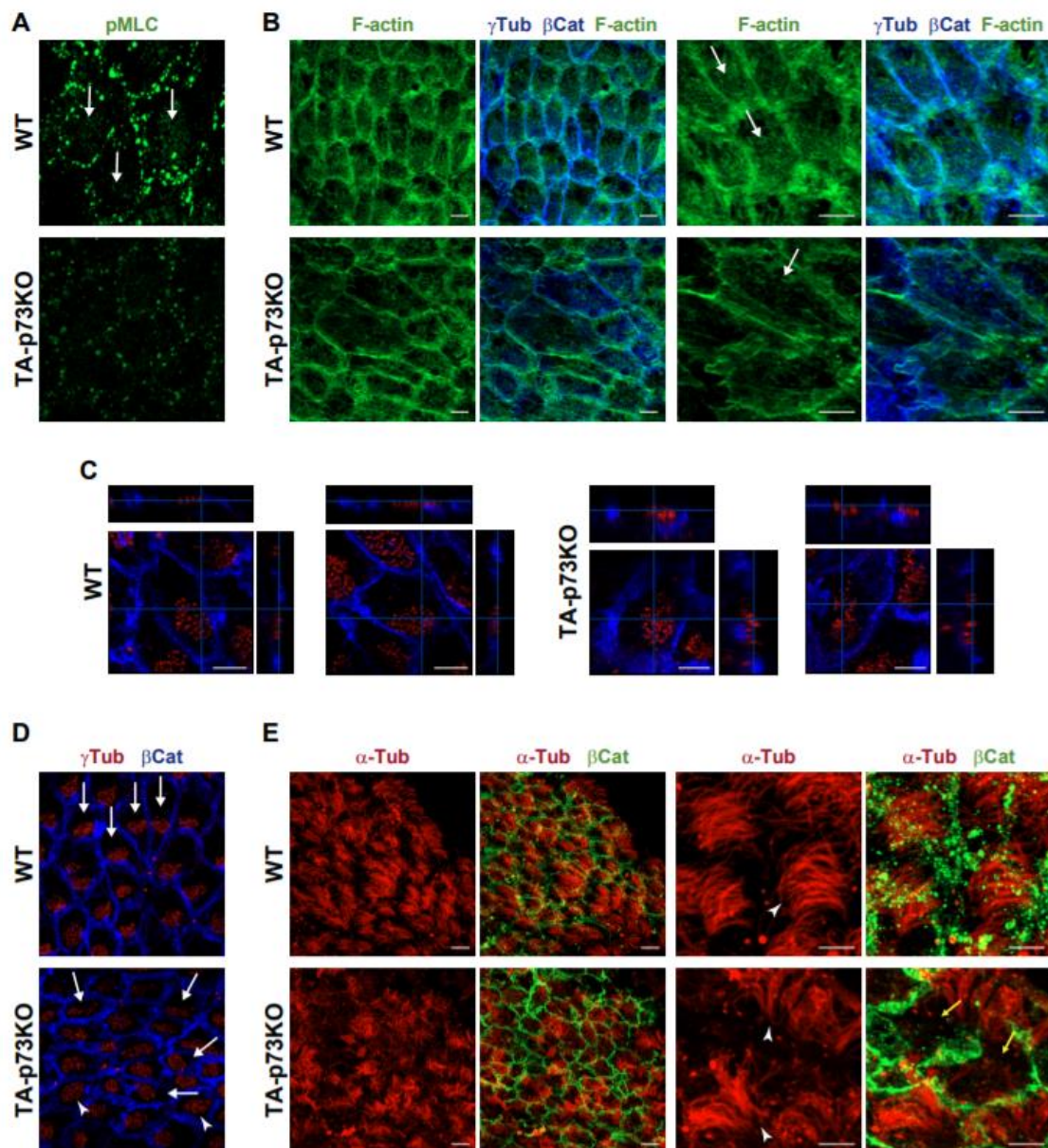


**Figure 58. Lack of p73 results in mislocalization of Rac-1.** Confocal images and orthogonal projections show Rac localization between BB and ciliary axoneme in WT ECs (a and b, arrows). While WT ECs present a patch of cilia (b, arrowheads,) cilia dysfunction is patent in p73KO ECs since many of them have no cilia (b, arrowheads). In the absence of p73, rac localization is not only within cilia axoneme (b, arrows). Scale bar: 10  $\mu$ m (a and b, left panels), 5  $\mu$ m (a and b, right panels, magnifications).



### 2.3.4 Specific TAp73 knockout results in a milder ciliary phenotype than the total p73KO with altered tPCP, lower levels of p-MLC and impaired docking

To determine if TAp73 was the isoform required for the modulation of NMII activity and tPCP establishment in vivo, we performed confocal microscopy analysis of P21 TAp73KO (Tomasini et al., 2008) WMs preparations. As expected, TAp73 deficient ECs showed lower levels of activated NMII that have lost its asymmetrical localization, compared to control (Figure 59 a, arrows). Congruently, they had lax actin staining, and lost the polarized actin-networks observed in the WT ECs (Figure 59 b, arrows).



**Figure 59. Lack of TAp73 affects NMII activation, actin network organization, docking, tPCP and ciliogenesis.** Confocal images of WT and TAp73KO ECs show that TAp73KO ECs present less activation of NMII in cytoplasm and in membrane puncta (a, arrows). Moreover, apical actin cytoskeleton is altered (b, arrows) and therefore basal bodies docking (c) and tPCP (d) is defective. In addition, ciliogenesis of TAp73KO ECs is affected (e). Scale bar: 5  $\mu$ m



These defects in apical actin networks are reflected in defective BB-docking in the absence of TAp73 (Figure 59 c) and lack of translational polarity (Figure 59 d-e). WT ECs at this stage displayed all its BB clusters compacted and coordinately polarized (Figure 59 d, arrows), all accompanied by organized cilia tufts (Figure 59 e, arrowhead). However, TAp73KO cells have their BBs either scattered throughout the apical surface (Figure 59 d, arrowheads), or in non-polarized clusters (Figure 59 d, arrow), with disorganized cilia tufts (Figure 59 e arrowheads). In many occasion TAp73-deficient cells lacked ciliary axoneme (Figure 59 e, yellow arrows), altogether indicating that lack of TAp73 is sufficient to produce ciliary defects and alterations in translational PCP, both at individual cell and tissue level. Nevertheless, the phenotype observed was less aggressive than the one observed in the total p73KO mice, indicating that either DNp73 can also play a role in these processes or the existence of compensatory signaling pathways in the absence of TAp73.

In the brain, disruption in PCP establishment results in dysfunctions of ependymal cilia and hydrocephalus (Boutin et al., 2014; Ohata & Alvarez-Buylla, 2016), implicating that PCP signaling could be upstream of cilia formation. However, it has been also documented that when ciliogenesis is disrupted in RGCs, clustering polarization of ependymal cilia is impaired, indicating that primary cilia is necessary for tPCP (Mirzadeh et al., 2010). Thus, whether p73 regulates independently both processes, or if those p73-regulated pathways are interconnected, remains to be resolved.

Activation of NMII by MLCK is essential for ependymal tPCP (Hirota et al., 2010), here we demonstrate that p73 isoform, TAp73, is a master regulator of tPCP since MLCK is one of its direct transcriptional targets. Moreover, we detect this tPCP-misregulation in the absence of p73 in both monociliated RGC and multiciliated ECs. As published (Totsukawa et al., 2000), we observe activated NMII and cortical actin bundles colocalization. NMII is a cortical organizer since it regulates E-cadherin concentration at zonula adherents (Smutny et al., 2010). Therefore, p73 could act as a modulator of the relation between cell adhesions and actin cytoskeleton, functioning as an epithelial organizer. Moreover, actin network is an essential for basal bodies polarity (Werner et al., 2011) and docking (Vladar and Axelrod, 2008), thus lack of p73 alters the correct BB docking in apical membrane, at least in part, through the regulation of actin network and NMII activation. Accordingly, both BB-docking regulators Dvl2 (Park et al., 2008, Ohata et al., 2014; Hirota et al., 2010) and Rac1 (Epting et al., 2015) present an altered localization in the absence of p73 compared with WT.

We also reveal that Tap73 isoform is the key regulator of the modulation of NMII activity by MLCK and tPCP establishment *in vivo*, since we observe an altered tPCP in the absence of TAp73. Moreover, lack of TAp73 also affects actin cytoskeleton and localization of Rac1 and Dvl2 docking-regulators, giving rise to a defective BB-docking. Although the lack of cilia is not so aggressive than in p73KO animals, TAp73KO animals also present a milder phenotype: cells with plenty of cilia, cells with less cilia or even cells with no cilia at all; indicating that ciliogenesis is also affected in the absence of TAp73. Interestingly, TAp73KO cells that have cilia, present an altered rPCP, indicating that the establishment of PCP and ciliogenesis are independent processes in ECs.

The article unveils p73 as a novel regulator of tPCP in ependymal cells through NMII activation and the consequent apical actin assembly, linking p73 function to actin-cytoskeleton remodeling, ciliogenesis and PCP establishment. However, since translational and rotational PCP are regulated by distinct molecular mechanisms (Hirota et al., 2010; Boutin et al., 2014), it will be important to investigate whether p73 also modulates PCP-core signaling pathways that control rotational polarity.

## 2.4 MATERIAL & METHODS

### 2.4.1 Mouse Husbandry and Genotyping

Animal experiments were conducted in agreement with European (Council Directive 2010/63/UE) and Spanish (RD 53/2013) regulations on the protection of animals used for scientific purposes with the appropriate institutional committee approval. Mice heterozygous for Trp73 on a mixed background C57BL/6 x 129/svJae (Yang et al., 2000) were backcrossed to C57BL/6, at least five times, to enrich for C57BL/6 background. Heterozygous animals were crossed to obtain the p73KO mice. Genotyping of adult animals was performed by PCR analysis as described before (Yang et al., 2000; Flores et al., 2005). Male and female mice were used in the experiments.

### 2.4.2 Cell culture

Mouse WT and p73KO iPSCs (Martin-Lopez et al, 2017) were cultured over *feeder cells*. *Feeder cells* were obtained from WT MEFs and were mitotically inactivated with mitomycin C (Sigma-Aldrich, M4287) 10µg/mL in MEF medium (table 2), during 2h at 37°C. *Feeder cells* were seeded at  $2 \cdot 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in iPSCs medium (table 4) 12h before iPSCs culture. iPSCs were cultured changing medium every day and they were subcultured every two days ( $5 \cdot 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) in 6-well plates, seeding iPSCs over *feeder cells* again. For immunofluorescence staining, iPSCs ( $5 \cdot 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) were seeded in 24-well plates with coverslips on the bottom of the well. Fixation with 3.7% PFA was carried out at RT during 15 min 24h after seeding.

TAp73-inducible Saos-2 cells, kindly provided by Dr. Karen Vousden (Cancer Research UK Beatson Institute, Glasgow), were cultured in Saos-2 medium (Table 4). Cells were seeded ( $3 \cdot 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in 24-well plates with coverslips on the bottom of the well. These cells were treated 24h after seeding, with 2.5 ug/ml of doxycycline (Melino et al., 2003) during 48h. Fixation with 3.7% PFA was carried out at RT during 15 min after treatment.

**Table 3.** Culture media

Cell line	Composition & final concentration	Catalog number
<b>HCT116p cells</b>	RPMI	Sigma-Aldrich, R1640
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503
	100 U/mL penicillin-0.1 mg/mL streptomycin	Sigma-Aldrich, F4333
<b>Saos cells</b>	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503
	100 U/mL penicillin-0.1 mg/mL streptomycin	Sigma-Aldrich, F4333
<b>iPSCs</b>	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503
	1mM non-essential aminoacids	Gibco, 11140
	1mM sodium piruvate	Gibco, 11360
	0.1 mM $\beta$ -mercaptoethanol	Gibco, 31350
<b>MEFs</b>	1000U/mL ESGRO/LIF	Chemicon, ESG1107
	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503

### 2.4.3 RNA isolation and real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with TRI reagent (Ambion, Austin, TX, USA) and cDNA was prepared using High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. MLCK and Myh9 expression was detected by qRT-PCR in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Basel, Switzerland). Primer sequences are described in Table 3 and qRTPCR conditions were described before (Tomassini R. et al, 2008). The expression levels of mRNA were expressed as  $2\Delta Ct$  and normalized to 18S.

**Table 4.** qRT-PCR primers

Gene	Specie	Sequence	Reference
<b>18S</b>	mouse	Fw 5'-AGTTCCAGCACATTTTGCAG-3'	Grespi & Melino, 2012
	mouse	Rv 5'-TCATCCTCCGTGAGTTCTCCA-3'	Grespi & Melino, 2012
<b>MLCK</b>	mouse	Fw 5'-TGGGGGACGTGAAACTGTTTG-3'	Primer Bank Database
	mouse	Rv 5'-GGGGCAGAATGAAAGCTGG-3'	Primer Bank Database
<b>Myh9</b>	mouse	Fw 5'-GGCCCTGCTAGATGAGGAGT-3'	Primer Bank Database
	mouse	Rv 5'-CTTGGCTTCTGGAAGCTGG-3'	Primer Bank Database

#### **2.4.4 Western Blot analysis**

Immunoblot was performed as previously described (Fernandez-Garcia et al., 2007) with the following primary antibodies: rabbit anti-MLCK [EP1458Y] 1:5000 (AbCam, ab76092) and rabbit anti-actin (20-33) 1:10000 (Sigma-Aldrich, A5060), followed by the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Pierce, Waltham). The enhanced chemiluminescence was detected with Super Signal West-Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, MA, USA).

#### **2.4.5 Luciferase assay**

HCT116p cells ( $6 \cdot 10^5$ ) were seeded in 24-well plate in HCT medium (table 4). They were transfected with 0.125  $\mu$ g of the reporter luciferase pGL3-hMLCK(1Kb)-luc described in Vallen-Graham W. et al, 2006 / gift from Dr. Jerrold Turner (University of Chicago) plus 0.0625  $\mu$ g pRLNull and 0.3, 0.6 and 0.8  $\mu$ g of either pcDNA3-HA-TAp73, pcDNA3-HA-292TAp73, pcDNA3-HA- $\Delta$ Np73 and pcDNA3-HA-p53 expression vectors. Transfection was carried out using X-tremeGENETM HP DNA Transfection Reagent (Sigma Aldrich) following the manufacturer's protocol. Cellular extracts were prepared 24 h after transfection and luciferase activity was assayed using the Dual-Luciferase Reporter System (Promega). Measurements were taken in a Berthold's luminometer and were normalized by the values of the Renilla luciferase of the same sample.

#### **2.4.6 ChIP (Chromatine Immunoprecipitation)**

ChIP analysis was carried out as previously described (Martín-López et al., 2017; Vaque et al., 2008). Briefly WT and p73KO brains [Fig. 1(C)], or cell pellets (20 millions) of TAp73-inducible Saos-2 cells [Fig. 1(B)] were used for ChIP. Samples were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The reaction was stopped by addition of 0.125 mM glycine for 10 min at room temperature and cells were washed with PBS and lysed in 0.7% SDS lysis buffer. Cross-linked chromatin was fragmented by sonication to an average size of 400 bp using a Bioruptor® sonicator (Diagenode, Liege, Belgium). Chromatin was immunoprecipitated with the following antibodies: anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) and anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA). Antibodies and cell lysates were incubated overnight at 4°C prior to the addition of protein G-coupled magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen) for 4 h at 4°C. Negative controls were prepared by incubating parallel samples with non-immune rabbit IgG and anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) antibodies.

The protein-DNA cross-links were reversed in elution buffer (1% SDS and 50 mM Tris-HCl), followed by RNase treatment overnight at 65°C. The eluted material was incubated with proteinase K for 3 h at 45°C, and the DNA was purified using the QIAquick PCR purification kit

(Qiagen, Hilden, Germany). Real time qPCR was performed using SYBR Green PCR kit (Bio-Rad, CA, USA) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The signals were normalized to the input (non-immune rabbit IgG immunoprecipitation). Primers encompassing the p53-RE in the human MLCK promoter were as follows:

5'- CATGTCACCGAAGCCAGATC and 5'- GACAGACGCAGAACCATGAC (amplicon, 192bp) [Fig.1(B), upper pannel]

5'- GAGTTGTGGTTTGCCGTGTT and 5'- AGCACTTTGGGAGGCCAAG (amplicon, 83bp) [Fig.1(B), lower pannel]

5'- TTGAGTGTCCAGTGGTGCTC and 5'- ACACTTGGGAGCAACCAAAA (amplicon, 169bp) [Fig.1(C)]

#### **2.4.7 Sequence analysis**

*In silico* prediction of putative p73-response elements within the mouse *Mlck* gene was performed using the open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles JASPAR (Mathelier et al., 2015). Matrix models MA0861.1 and MA0525.1 were applied for the mouse *Mlck* gene and for the analysis of the ChIP-Seq peak detected in the human *MLCK* gene, respectively. Only the sites with a score over 9.0 were selected for further *in vitro* analysis.

#### **2.4.8 Immunohistochemistry**

Animals were fully anesthetized using an analgesic/anesthetic mixture of medetomidine hydrochloride (Domtor®, Orion Corporation, Espoo, Finlandia) and ketamine (Imalgene® 500, Merial, Duluth, GA). Medetomidine (1 mg kg<sup>-1</sup>)/ketamine (75 mg kg<sup>-1</sup>). Euthanasic mixture was prepared in PBS and injected intraperitoneally. Perfusion was carried out with 0.1M PBS supplemented with 1% heparin until the drained blood became clear, and then with ~20–40 mL of fresh 4% PFA in 0.1M PBS.

After perfusion, brains were dissected and were post-fixed overnight (o/n) in fresh 4% PFA in PBS solution at 4°C. For cryopreservation, samples were incubated for 24 h in 30% sucrose/PBS solution. Samples were then frozen in dry ice and stored at –80°C.

Several 30-µm-thick coronal sections were prepared using a Microm HM450 sliding microtome (Thermo Scientific, Waltham, MA) and stored in PBS supplemented with 0.05% sodium azide at 4°C. Then, sections were washed and were stained according to the published protocol (Gonzalez-Cano et al., 2010). Sections were incubated with the indicated antibodies (Table 5). Confocal microscopy images were obtained with Nikon Eclipse TE2000 confocal microscope (Nikon, Chiyoda-Tokyo, Japan). Figures show single level representative pictures.

#### **2.4.9 Isolation and immunostaining of wholemounts of the lateral wall of the ventricles**

Wholemounts (WMs) of the lateral wall of the ventricles were dissected from 1, 15 and 30 postnatal day mice. Animals were euthanized in agreement with European and Spanish regulations and the brain was dissected and placed in cold 0.1M PBS. Dissection of the WMs was made under the stereomicroscope as described (Mirzadeh et al., 2010). WMs were transferred ventricle side up to a 48-well plate and fixed with 4% PFA o/n at 4°C or with freeze methanol 15 min at -20°C.

4% PFA fixation: WMs were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer (0.1M PBS/10% NDS/0.5% Tx100). Then, they were incubated for 24 h at 4°C with the appropriate primary antibodies (Table 3) diluted in blocking buffer. WMs were washed three times during 20 min with 0.1M PBS/0.1% Tx100 and incubated 24 h at 4°C with secondary antibodies (Table 5) diluted in blocking buffer.

Metanol fixation: WMs were incubated for 30min at room temperature in blocking buffer (0.1M PBS/10% NDS/0.1% Tx100). Then, sections were incubated for 1h30min at room temperature with the appropriate primary antibodies (Table 3) diluted in blocking buffer. WMs were washed three times during 5 min with 0.1M PBS/0.1% Tx100 and incubated 1 h at room temperature with secondary antibodies (Table 5) diluted in blocking buffer.

Immunofluorescent detections were carried out with Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA) and Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) conjugated secondary antibodies. DAPI (1µg/mL) was used for nuclear counterstaining. FluoromountG Electron Microscopy Sciences (EMS 17984-25) was used as mounting media. Samples were analysed in a Zeiss LSM800 Confocal Laser Scanning Microscope. Images were acquired and processed using ZEN blue software.

**Table 5.** Primary and secondary antibodies and phalloidin stainig used for immunostaining

Antibody	Host	Dilution	Manufacturer	Catalog Number
pMLC T18/S19	rabbit	1/200	Cell signaling	3674
$\gamma$ Tubulina (C20)	goat	1/200	Santa Cruz	sc-7396
Dvl2	rabbit	1/201	Santa Cruz	sc-13974
Rac1	mouse	1/200	Merk	05-389
$\alpha$ Tubulin	mouse	1/200	AbCam	ab7291
$\beta$ Catenin	mouse	1/200	BD transduction lab.	61053
$\beta$ Catenin	rabbit	1/200	Cell signaling	9587
Antibody	Host and Reactivity	Dilution	Manufacturer	Catalog Number
Alexa Fluor 488	donkey anti mouse	1/1000	Molecular Probes	A21202
Alexa Fluor 488	donkey anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A21206
Alexa Fluor 594	goat anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A11012
Alexa Fluor 568	donkey anti goat	1/1000	Molecular Probes	A11057
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated	donkey anti goat	1/1000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
Alexa Fluor 647	goat anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A21244
Alexa Fluor 647	donkey anti goat	1/1000	Molecular Probes	A21447
	Phalloidin staining	Dilution	Manufacturer	Catalog Number
	phalloidin-488	1/100 in 2 <sup>ary</sup> Ab solution	Molecular Probes	A12379
	phalloidin-TRITC	1/100 in 2 <sup>ary</sup> Ab solution	Sigma Aldrich	P1951

#### 2.4.10 Image Data Quantification and Statistical Analyses

For all analyses, at least five independent mice from each genotype were considered. Wholemount image analysis in Figure 2(A) was performed with ImageJ software counting four non overlapping fields (50  $\mu$ m  $\times$  50  $\mu$ m) of each animal. Images of P1 WMs were acquired every 0.3  $\mu$ m and maximum projections of four consecutive Z levels are shown. Wholemount image analysis in Figure 2(D) was performed with ZEN blue software in six non overlapping fields (1cel/field) of each animal counting the number and measuring the intensity of pMLC dots in membrane region. Images of the WM were acquired as a single level with AiryScan ZEN blue software.

Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). For the docking experiments, a contingency analysis was carried out; for all the other comparisons, Mann–Whitney non-parametric tests were applied. All data are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## **CAPÍTULO III**

---

**p73 IS REQUIRED FOR ASYMMETRIC LOCALIZATION OF PCP CORE PROTEIN VANGL2 THROUGH THE ESTABLISHMENT OF MICROTUBULES POLARIZED NETWORKS IN EPENDYMAL CELLS**



### 3.1 ABSTRACT

The correct orientation of cilia movement is depending on the correct localization of core-PCP proteins in membranes. In ependymal cells, this coordination is fundamental for the CSF flow. Ablation of core-PCP components lead to hydrocephalus. Here we unveil p73 as a regulator of core-PCP components localization. In the absence of p73, the core PCP proteins lose its membrane localization. It has been described that PCP core proteins establishment is downstream of ciliogenesis in trachea cells. Here we demonstrate that PCP core proteins membrane localization is independent of multiciliogenesis. Moreover, it has been reported the involvement of microtubule cytoskeleton in the asymmetric localization of core proteins. We observe that microtubule structure and polarization is affected in the absence of p73 both *in vitro* and *in vivo*. All these data reveal not only a new role of p73 in the establishment of ependyma polarity but also in the regulation of organization and dynamics of microtubule cytoskeleton.

### 3.2 INTRODUCTION

Multiciliate epithelial cells perform important functions in vertebrates and ciliary defects like abnormal cilia assembly, motility, or defective polarity, are associated with a range of human diseases, such as to infertility, situs inversus, primary ciliary dyskinesia or hydrocephaly (Badano et al., 2006; Kishimoto and Sawamoto, 2012).

In the brain, multiciliated Ependymal cells (ECs), which layer the lateral ventricle wall, are required for CSF circulation and neurogenesis (Boutin et al., 2014) and promote self-renewal of neural stem cells (Lim et al., 2000; Chmielnicki et al., 2004; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Andreu-Agullo et al., 2009). To fulfill their function, ECs most establish Planar cell polarity (PCP), which orients the cilia of a given cell in the plane of the epithelium, enabling their concerted beating, but also coordinates this polarization across the whole tissue. Thus, EC ciliary function is dependent upon the establishment of PCP. The primary cilia polarized position on the apical surface of the ependymal cell precursors, the radial glia cells, orchestrates the planar polarized architecture of both the radial glia and their EC progeny (Mirzadeh et al., 2010a). EC cilia display two types of PCP: the rotational polarity (rPCP) which refers to the common orientation the basal bodies within each multi-ciliated cell, and the translational polarity (tPCP) which is defined by the basal body cluster anterior position on the cell apical surface, (Mirzadeh et al., 2010a). The rotational polarity is coordinated between adjacent cells with cilia that point to a common direction (Boutin et al., 2014). ECs are generated from RG in a multistep process orchestrated by

the primary cilium and its basal body apparatus (Spassky et al., 2005). Disruption of RG primary cilium orientation, as well as defects in PCP establishment, results in dysfunctions in ependymal cilia and their directional beating. Moreover, EC motile cilia function is profoundly affected during stroke, highlighting the relevance of ciliary function in brain physiology and thus, its therapeutic implications.

Translational and rotational PCP are regulated by common as well as distinct molecular mechanisms (Hirota et al., 2010; Boutin et al., 2014). In rodents, many mammalian genes like the core-PCP regulator proteins, Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type 1-3 (Celsr 1-3), Frizzled Class Receptor 3 (Fzd3), Van Gogh like1-2 (Vangl1-2), Disheveled1-3 (Dvl1-3) or, the actin-binding protein, Non-Muscle Myosin II (NMII), have been implicated in cilia development and function. Their mutations lead to cilia defects and impaired CSF flow circulation (Ibanez-Tallon et al., 2004; Lehtreck et al., 2008; Guirao et al., 2010; Hirota et al., 2010; Ohata et al., 2014). A recent report demonstrated that ependymal multiciliated cells with inactivation of PCP-core regulators, Celsr2, Celsr3, Fzd3, or Vangl2, had perturbed organization of their cilia patches at the single-cell level, while inactivation of Celsr1, Fzd3, and Vangl2 perturb the tissue wide PCP (Boutin et al., 2014), implicating PCP signaling upstream of cilia formation. On the other hand, it has also been documented that when ciliogenesis is disrupted in radial glial cells the polarized clustering of ependymal cilia is impaired, indicating that cilia may regulate PCP. Thus, the causal relationship between the cilium and PCP signaling is controversial and the regulatory mechanism has not been fully unraveled.

In this regard, our group and other have demonstrated that the p53 homologue, p73 acts as a central transcriptional integrator of multiciliogenesis, directly controlling key ciliary regulators (Marshal et al., 2016; Nemajerova et al., 2016), required for ependymal ciliogenesis (Gonzalez-Cano et al., 2016). Moreover, p73 is necessary for the establishment of PCP in these cells (Gonzalez-Cano et al., 2016), but the mechanism of this regulations remains unknown. Recent data from our group has unveiled p73 as a novel regulator of tPCP through the modulation of NMII activation, being p73 function essential for apical actin network assembly and basal body docking (Fuertes-Alvarez unpublished results). However, the possible p73 function core-PCP signaling has never been addressed.

The establishment of PCP involves several processes which include sensing the global orientation cues, establishing molecular asymmetries following these cues, cell-cell communication and propagation of PCP asymmetry and executing the respective polarized cell shape or function (Butler and Wallingford, 2017). Multiple studies in *Drosophila melanogaster*

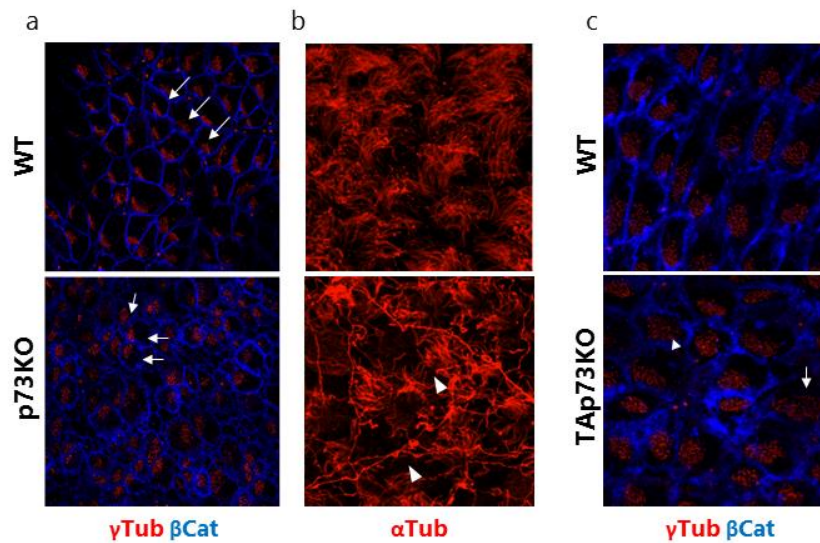
have identified two main planar cell polarity regulatory pathways: the Fat/Dachous pathway and the core-PCP pathway which will act upstream of PCP effectors.

In this study, we performed a comprehensive analysis of PCP, using the polarity of cilia and the asymmetric localization of multiple PCP components in ependymal cells to analyze the role of p73 in the PCP pathway and in the orientation of multiciliated cells.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

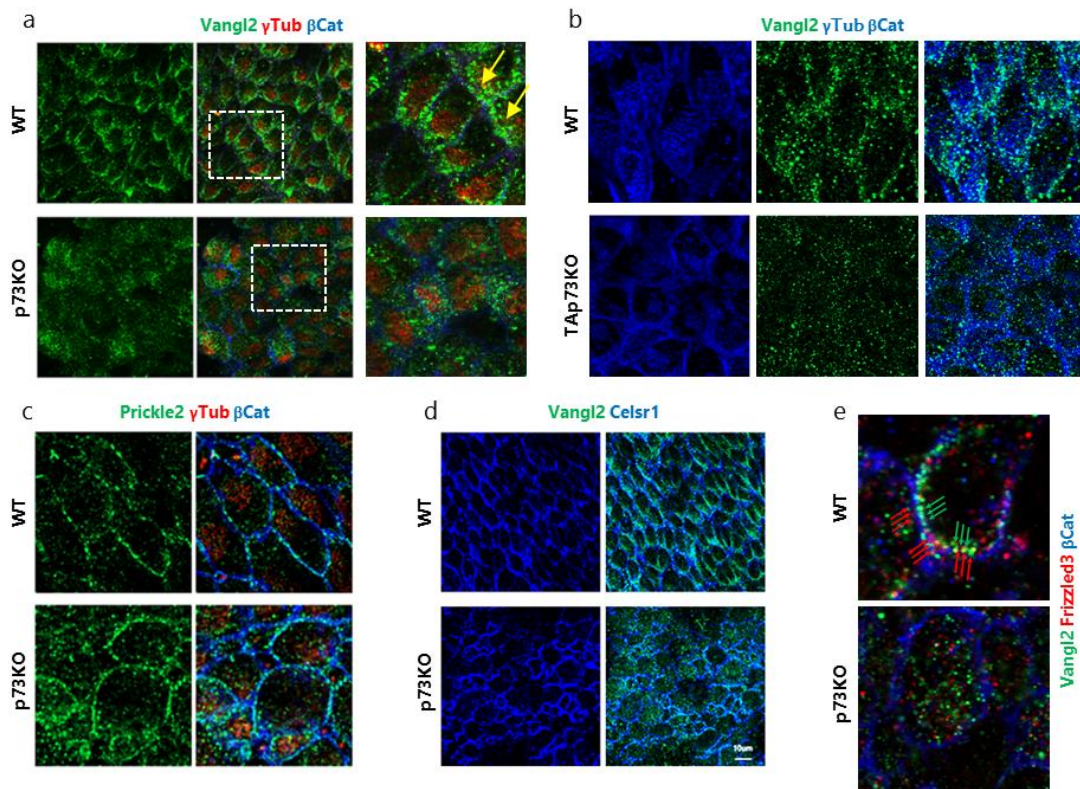
#### **3.3.1 p73 is necessary for PCP establishment and the asymmetric localization of pcp core-proteins in ependymal cells**

PCP is established during perinatal development (Bayly and Axelrod, 2011). We studied ependymal cells in whole-mount (WM) dissections (Gonzalez-Cano et al., 2016), from WT and p73KO mice, using anti- $\beta$ -catenin to delimit the cellular contour and anti- $\gamma$ -tubulin or to visualize the basal bodies (BBs) and cilia axoneme, respectively. After the first postnatal weeks (P15), basal bodies (BB) of ependymal cells become densely packed, coordinately aligned and positioned as a patch, on the downstream side of the EC apical surface (Figure 60 a, arrows). By this time EC apical surface is covered with coordinately oriented cilia tufts (Figure 60 b). In agreement with our previous data (Gonzalez-Cano et al., 2016), lack of p73 results in cell with BB clusters, that while some are off-centered, do not have a common direction of displacement, revealing a loss of tissue-wide polarity in the absence of p73 (Figure 60 a, arrows). This lack of coordination is reflected in the disorganized appearance of the cilia in these cells (Figure 60 b), indicating that p73 is necessary to organize multicilia in individual cells and for intercellular patch orientation tissue-wide. It is noteworthy that some ECs lacked cilia (Figure 60 b, arrowheads), confirming ciliogenesis defects in the absence of p73 (Gonzalez-Cano et al., 2016). Analysis of the TAp73 specific KO mice, revealed that this isoform is required, at least impart, for PCP establishment since TAp73KO cells displayed their BBs either scattered throughout the apical surface (Figure 60 c, arrowhead), or in non-polarized clusters (Figure 60 c, arrow). The specific deletion of the TAp73 isoforms, generates a less dramatic phenotype than the observed in the full p73KO mice, therefore we cannot rule out the possibility that DNp73-deficiency is responsible of some of the observed defects. Nevertheless, it is also possible that, in the absence of TAp73, the other members of the family carry out redundant functions.



**Figure 60. Lack of p73 results in BB and cilia organization.** Confocal images of WT ECs show organized BB patches localized at the anterior region of the apical surface (a, arrows) and organized clusters of cilia (b). p73KO ECs present BB patches without a common direction of displacement (a, arrows) and some of them lack cilia (b). Lack of TAp73 isoform give rise to ECs with their BBs either scattered throughout the apical surface (c, arrowhead), or in non-polarized clusters (c, arrow).

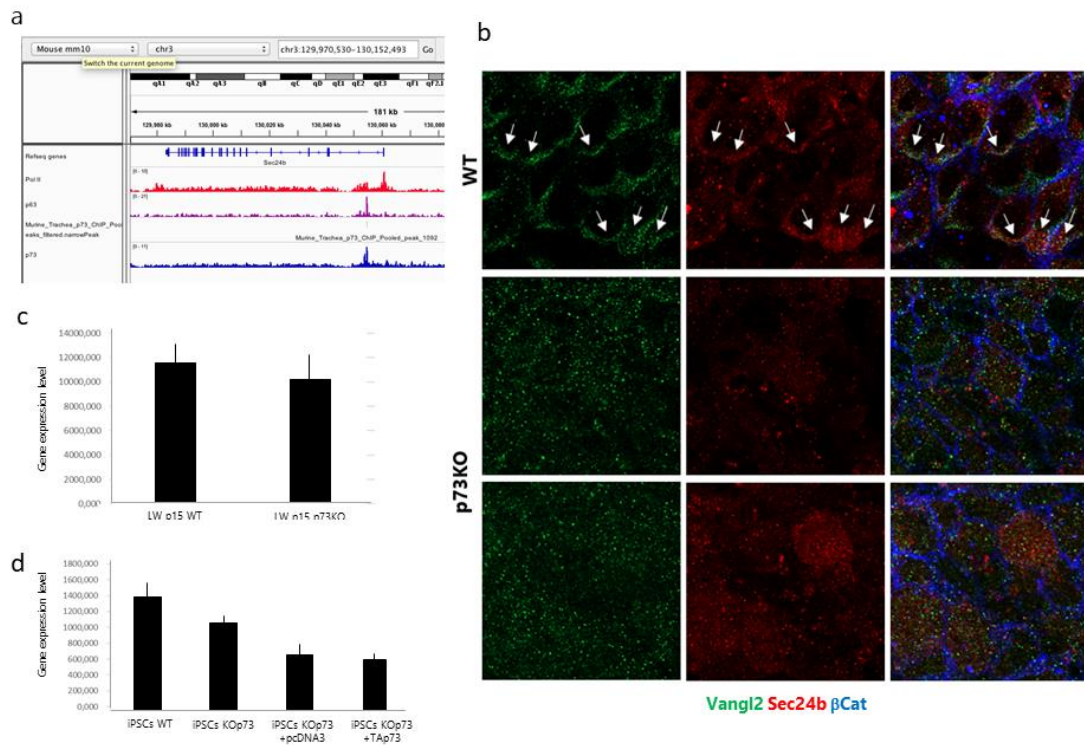
PCP is established through the localization of mutually exclusive subsets of core-PCP proteins to opposite sides of the cell cortex (Butler and Wallingford, 2017). Mammalian core-PCP genes *Celsr1*, *Fzd3*, and *Vangl2*, are known to establish coordinate tissue polarity across the ependyma (Boutin et al., 2014). On one side, *Celsr1*, *Vangl2* and its cytosolic effector *Pk2*, will form a complex, while in the opposite side *Celsr1* and *Fzd3* will form another one. As expected, *Vangl2* displayed an asymmetric distribution in the apical surface of P15 ependymal cells, which is coordinated across the tissue (Figure 61 a, arrows). Surprisingly, this zigzag pattern, characteristic of the mature ependyma, was completely lost in p73-defective cells, as well as in TAp73KO, with *Vangl2* in both cases mainly localized in the cytoplasm (Figure 61 b and c, respectively), indicating defective tissular coordination of polarity in the absence of p73. Reciprocally, the distribution of the *Vangl2* molecular partner, *Pk2* and *Celsr1* was also disturbed in p73KO cells (Figure 61, c and d, respectively). Moreover, the intercellular interaction detected between *Vangl2* and *Fzd3* in adjacent WT cells (Figure 61 e, green and red arrows, respectively) were completely lost in p73-deficient cells. Altogether demonstrating that p73, and TAp73 in particular, is necessary for asymmetric localization of PCP-core proteins in ependymal cells.



**Figure 61. p73 is necessary for asymmetric localization of PCP core proteins.** Confocal images show that lack of p73 results in a lost of the correct organization of the PCP core protein Vangl2 (a), Prickle (c) Celsr (d) and Frizzled (e). The Vangl2 zigzag pattern observed in WT ECs (a, arrows) is lost in both p73KO and TAp73KO (a and b).

We asked how the lack of p73 could affect PCP-core proteins asymmetric membrane localization. One possibility was a defect in vesicle trafficking, since the loss-of function phenotypes of the Vangl2LP mutants resulted from trafficking defects in which the Vangl2 protein failed to package into COPII vesicles and exit the ER to reach the plasma membrane (Torban et al., 2017). In this regard, Sec24b, a component of the COPII coat protein complex, selectively sorts Vangl2 to regulate PCP (Merte et al 2010), and Sec24b deficiency specifically affects Vangl2 transport (Wansleben et al., 2010). Previously published ChIP-seq analysis of murine tracheal epithelium cell cultures (MTEC) (Marshall et al., 2016) exposed a p73 binding on the mouse Sec24b promoter (Figure 62 a). Thus, we sought to investigate whether lack of p73 affected Sec24b expression levels. In WT ependymal cells, Sec24b displayed a polarized expression pattern in plasma membrane and cell cortex, that coincides with Vangl2 expression (Figure 62 b). In p73 deficient cells, Sec24b have lost this polarized pattern and, like Vangl2, appears to be cytoplasmic and not capable of reaching the plasma membrane, suggesting defects in directed vesicle traffic. However, we did not detected differences in Sec24b expression levels either by confocal microscopy (Figure 62 b) nor by qRT-PCR analysis of the LW tissue (Figure 62 c) or from induced

pluripotent stem cells (iPSC) from WT and p73KO phenotypes (Figure 62 d), indicating that Sec24b expression levels are not modulated by p73, at least in these cellular contexts. This lack of p73 regulation of Sec24b expression is in agreement with previously published expression analysis in WT and p73KO MTECs cultures where after ectopic p73 expression, only a modest increase of Sec24b expression was detected in WT MTECs (65 -> 76 TPM [transcripts per million]) and none was detected in p73KO. Therefore, lack of p73 results in defects in directed vesicular traffic but these are not caused by a Sec24b deficiency.



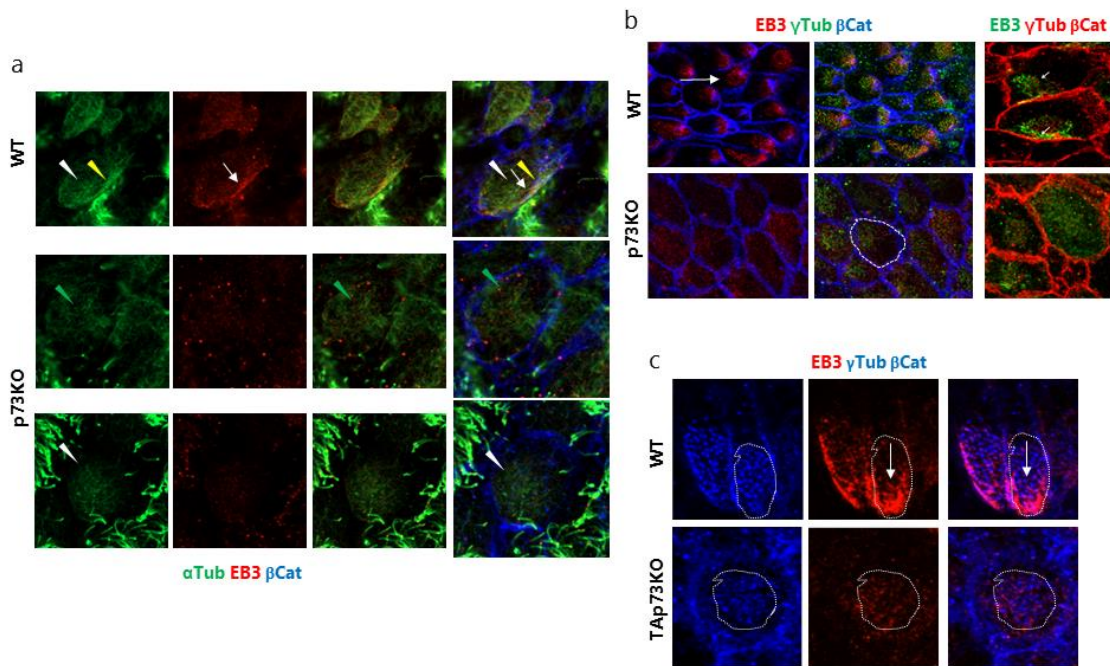
**Figure 62. Lack of p73 affects Sec24b localization, but no its expression.** (a) ChIP-seq analysis shows a p73 binding site in the p73 promoter in MTEC. (b) Confocal images show that p73 deficient ECs present an aberrant localization of Sec23b compared with WT ECs. Scale bar: xxxxx. (c) qRT-PCR of WT and p73KO LW samples. (d) qRT-PCR of WT and p73KO iPSCs cultures.

### 3.3.2 Lack of p73 results in defects in the cellular and tissular organization of the microtubule cytoskeleton

It has been proposed that microtubule (MT) dependent polarized transport of PCP-protein-containing vesicles plays a pivotal role in setting up a small anisotropic bias of Fz3 or Vangl2 activity across the anterior/posterior cell boundary, which will be subsequently amplified by a positive feedback loop (Axelrod et al., 2009). Work in *Drosophila* has shown that microtubules are involved in the asymmetric accumulation of Frizzled (Shimada et al., 2006). In mammalian airway epithelium, Vladar and colleagues provided evidence that microtubules are involved in the establishment of the initial asymmetry of core-PCP proteins, as well as interpreting these PCP



signals to polarize cellular organization downstream of PCP effectors (Vladar et al., 2012; Werner and Mitchell, 2012). Moreover, disassembling of MT by Nocodazole treatment of brain ventricles, impaired the trafficking and distribution of PCP-core proteins, phenocopying the observed p73KO phenotype (Boutin et al., 2014). It has been reported that ependymal cell cytoskeleton has a cellular component, comprised of an actin and MT networks within the BB patch, and a tissular, MT anchoring point, component (Boutin et al., 2014). We have previously demonstrated that p73 requirement for apical actin network assembly and its relevance in translational PCP and BB docking (Fuertes-Alvarez et al., 2017, *manuscript in preparation*). Therefore, we hypothesize that p73 might also play an essential role in the establishment of MT polarization. To address this, we examine the MT networks in mature (P15 or P21) ependymal cells. In agreement with published data (Boutin et al., 2014),  $\alpha$ -Tubulin immunostaining of WT cells revealed a fine and organized meshwork of MT in the apical cell surface where the BB cluster is localized and a second, and more intense set of MT, at the cell cortex (Figure 63 a, white and yellow arrowheads, respectively). Specific antibodies anti-EB3, the plus-end MT protein, confirmed the existence of this second MT meshwork and indicated that it grew asymmetrically from the center of the cell towards the anterior region of the apical cell cortex contacting, at that point, the plasma membrane in what it has been defined as a MT anchoring point (Figure 63 b and c, arrows). It is noteworthy that in WT cells this MT structure is coordinately polarized at individual cells as well as at tissue level. Lack of p73, even TAp73 deficiency, profoundly affect MT meshwork (Figure 63),  $\alpha$ -Tubulin staining of p73-deficient cells revealed a loose and non-polarized MT-structure (Figure 63 a, green arrowheads), with apparently shorter MTs. Only few cells in the p73KO WMs had polarized MT-meshwork (Figure 63 a, white arrowheads) but almost no p73 deficient cell had marked a MT anchoring points (figure 63 b and c). p73 deficient cells had a diffuse EB3 staining mainly localized within the BB cluster (Figure 63 b and c, dashed lines). Altogether this data supports our hypothesis and demonstrates that p73 function is essential for the cellular and tissular polarized organizations of the MT cytoskeleton. Thus, lack of p73 impairs the establishment of polarized microtubule networks, which lay the track for a directed trafficking of PCP proteins in differentiating ependymal cells, resulting in inability of PCP-core proteins to reach the plasma membrane at the MT anchoring points and assemble PCP-asymmetric complexes.



**Figure 63. p73 deficiency results in a lost of MT cytoskeleton organization *in vivo*.** Confocal images of WT ECs show an organized (a, white arrowheads) and polarized (a, yellow arrowheads and b, arrow) MT cytoskeleton colocalized with BB cluster (b, arrow) that is lost in p73KO cells. p73 deficient cells present diffuse EB3 staining in the cytoplasm (b and c, dashed lines).

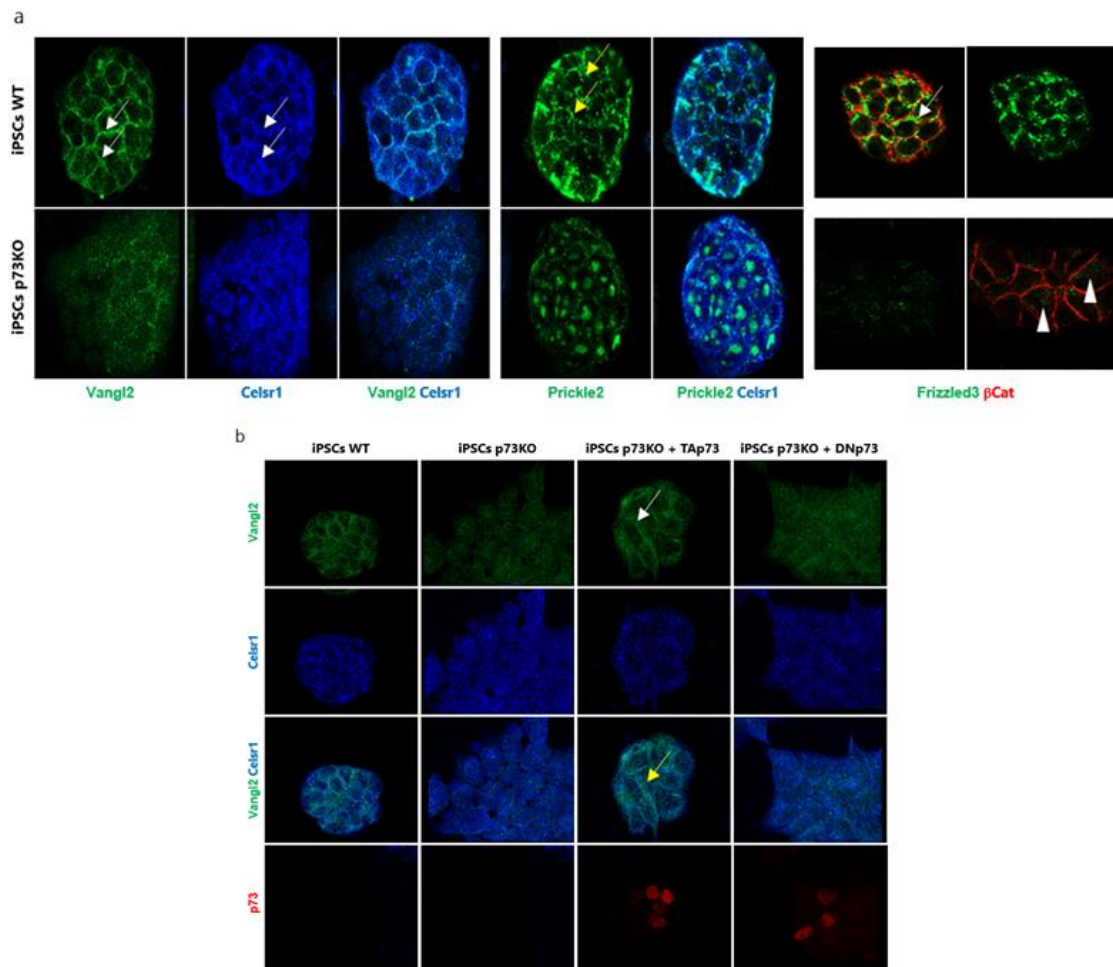
### 3.3.3 p73 requirement for Vangl2 membrane localization is a general process

In airway epithelial, planar cell polarity signaling depends on multiciliated cell differentiation (Vladar et al., 2016). Molecular signs of PCP like Vangl1/2 crescents emerges prior to multiciliated cell differentiation. These asymmetric complexes are further strengthened selectively as motile cilia appear, depending this PCP on the MCC transcriptional program. In this regard, TAp73 acts as a central transcriptional integrator of multiciliogenesis (Marshal et al., 2016; Nemajerova et al., 2016; Gonzalez-Cano et al., 2016; Fuertes-Alvarez et al., manuscript in preparation). Therefore, it was possible that the PCP defects observed in p73KO and TAp73KO mice, were a downstream effect of ciliogenesis impairment.

To rule out this possibility and to address if p73 requirement for Vangl2 membrane localization is a general process, we analyze Vangl2, Celsr-1, Fz3 and Pk2 in iPSC generated from WT and P73KO mouse embryonic fibroblast (Martin-Lopez et al., in revision CDDi 2017). Induced pluripotent stem cells, like embryonic stem cells, establish epithelial-like cell-cell contacts displaying apico-basal polarity (Krtolica et al., 2007). In WT-iPSC PCP-core proteins Vangl2, Celsr1 and Fz3 are expressed in the plasma membrane, with more intense staining at the lateral junctions (Figure 64 a, white arrows). It is precisely at these points were Vangl2 and Celsr1 colocalized and



where Pk2 is at the vicinity of Celsr1 (Figure 64 a, yellow arrows). Consistent with p73 requirement for vangl2 membrane localization, in p73 deficient iPSCs, Vangl2 and Celsr1 loose most of their co-localization at the plasma membrane (Figure 64 a). Concordantly, membrane localization of Pk2 was attenuated and aberrant aggregates at the cytoplasm were detected. It is noteworthy that Fz3 expression was significantly diminished in p73KO cells and it was also detected in the cytoplasm (Figure 64 a, arrowheads). To further demonstrate p73 requirement and determine the responsible p73 isoform of this regulation, we ectopically expressed either TAp73 or DNp73 in p73KO cells. As depicted (Figure 64 b), TAp73 but not DNp73, restored Vangl2 membrane localization and colocalization with Celsr1 (white and yellow arrows, respectively). This data demonstrated that p73, and TAp73, was required for the appropriated Vangl2 membrane localization independently of its function as multiciliogenesis regulator.

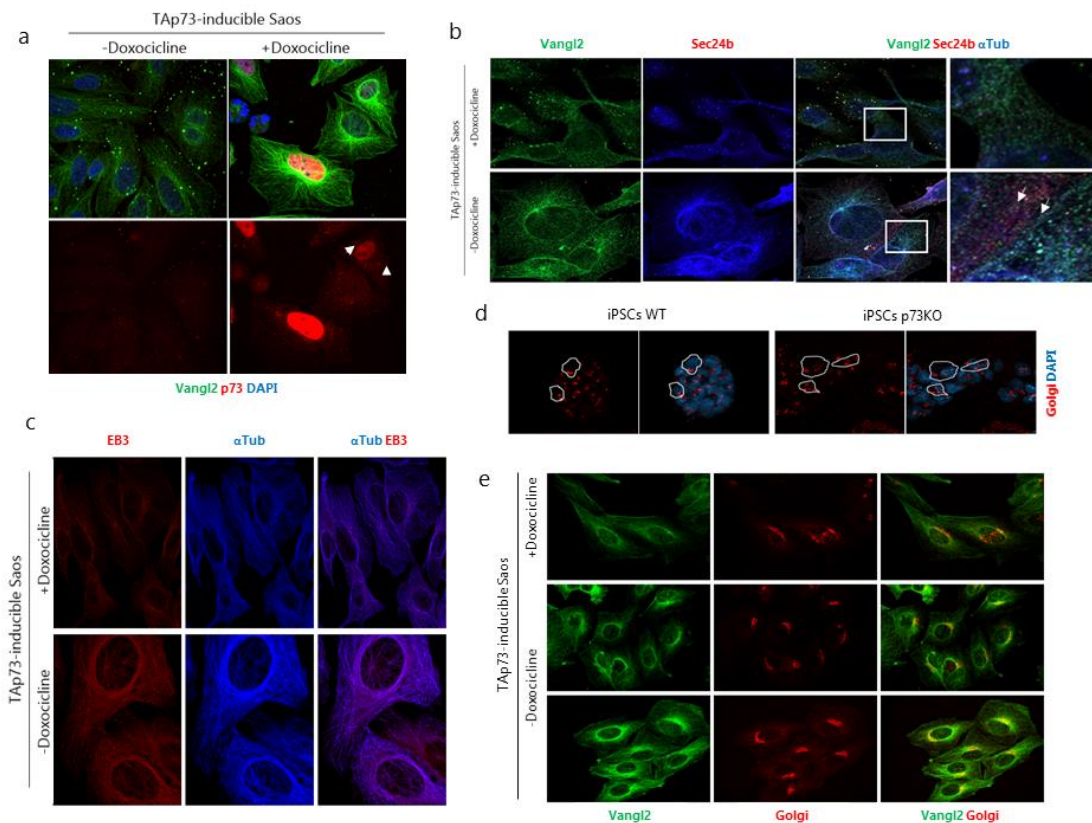


**Figure 64. p73 deficiency results in lost of PCP-core proteins membrane localization *in vitro*.** (a) WT and p73KO iPSCs culture shows that in the absence of p73 PCP core proteins do not reach the membrane. Vangl2 and Pk2 colocalized with Celsr1 (left panel white arrows and middle panel dashed arrow, respectively). In the absence of p73, Fz loose its membrane localization (white arrow) (b) Transfection of TAp73 isoform, but no DNp73 isoform in p73KO iPSCs retrieval the WT phenotype, where Vangl2 colocalize with Celsr (yellow arrow).

### **3.3.4 Overexpression of TAp73 can modulate MT dynamics, increases EB3 expression and reorganize Vangl2 localization**

We next sought to investigate whether TAp73 could modulate microtubule dynamics. We use the p53-deficient, TAp73-inducible cell line, Tet-ON-SAOS2-HA-TAp73, which express low levels but detectable levels of endogenous p73 in the absence of doxocycline treatment (Figure 65 a). Upon TAp73 induction, we observed a dramatic upregulation and re-localization of Vangl2 (Figure 65 a and b). In TAp73 overexpressing cells Vangl2, appears to be aligned with the MTs radiating from the centrosome and reaching the cellular cortex (Figure 65 a, arrowheads). To further address this, we co-stained Vangl2, Sec24b and  $\alpha$ -Tubulin and confirmed that upon TAp73 expression, Vangl2 staining was detected as discrete puncta, co-localizing with Sec24b, that were aligned along the MTs (Figure 65 b, arrows). We observed a dramatic change in MT reorganization upon TAp73 expression, that coincide with Vangl2, thus we asked whether TAp73 could be enhancing MT stability. In agreement with this idea, we have observed that p73-deficient ependymal cells had diminished levels of EB3 (Figure 63), suggesting a role in EB3 expression. EB3 is necessary for the regulation of microtubule dynamics and microtubule capture/anchorage at the cell cortex (Straube et al., 2007). Thus, we analyze the effect of TAp73 on EB3 expression and localization. Non-treated SAOS2-HA-TAp73 cells has low levels of EB3, however TAp73 induction resulted in a strong increase in EB3 extrusion and a dramatic change in MT reorganization (Figure 65 c). Moreover, lack of p73 in iPSC results in Cis-Golgi fragmentation (Figure 65 d), reflecting a MT dysfunction since the Golgi apparatus Integrity requires the microtubule network. Conversely, TAp73 expression induces Golgi reaggregation concomitantly with MT and Vangl2 reorganization, altogether supporting the idea that TAp73 enables Planar Cell Polarity through regulation of microtubules dynamics.

In the brain ECs, disruption of PCP core proteins establishment results in hydrocephalus (Tissir et al., 2010), altering CSF flow and impairing basal body translational and rotational polarity (Boutin et al., 2014) through the regulation of cytoskeleton dynamics. Our group have reported that p73 isoform TAp73, regulates tPCP establishment (Gonzalez-Cano et al., 2016; Fuertes-Alvarez et al., 2017, *manuscript in preparation*), and we observed altered ECs with cilia going in different directions (Gonzalez-Cano et al., 2016; Fuertes-Alvarez et al., 2017, *manuscript in preparation*). Thus, we decided to analyse if p73 deficiency resulted in PCP alteration through the regulation of PCP-core proteins localization.



**Figure 65. Lack of TAp73 results in lost of MT and Vangl2 organization *in vitro*.** TAp73-Saos inducible cells show organized Vangl2 structures (a) that colocalized with MT (a, arrowheads, and b, arrows) after induction. Saos cells express EB3 after induction (c). These data correlate with Golgi fragmentation both in the absence of p73 (d) and without induction of TAp73 (e) in contrast with control samples.

Asymmetric localization of PCP-core proteins in EC membranes is essential for planar polarity establishment. This pathway regulates the coordinated orientation of BB in order to move cilia in the same direction. We observe that in the absence of p73, Vangl2, Frizzled3, Prickled2 and Celsr1 core proteins lose their correct localization in cell membranes. Specifically, TAp73 deficiency results in a mislocalization of Vangl2. These data demonstrate that p73 play an important role in the regulation of PCP-core proteins localization. Surprisingly, p73 deficiency do not affect the expression of the specific vangl2 cargo protein Sec24b, but this protein lose its colocalization with Vangl2 in the membrane neighbourhood in this context.

It has been reported that MT network is essentially implicated in the localization of these proteins (Boutin et al., 2014). So we decided to analyze if p73 regulates MT dynamics. Here we show that p73 deficiency alters both MT organization and polarization dynamics in ECs, losing the colocalization with cell cortex and BB patches. This is observed also in the absence of TAp73 isoform. These data indicate that p73, TAp73 specifically, could regulate the PCP-core proteins localization through the regulation of MT dynamics in ECs.

It has been published that ciliogenesis is upstream of PCP, so we decided to analyze the PCP core proteins localization in an in vitro model to unveil if the role of p73 in PCP core localization depends of its role in ciliogenesis (marsharll y majeranova). Here we demonstrated that p73 regulates PCP core protein asymmetric localization independently of ciliogenesis

In this article we demonstrate the important role of p73 in the regulation of PCP core proteins in ECs through the regulation of MT network organization and polarization dynamics. All this data in addition with our previous report (Fuertes-Alvarez et al., 2017, *manuscript in preparation*) set the first steps to unravel the important role of p73 in the regulation of cellular cytoeskeletons.

### 3.5 MATERIAL AND METHODS

#### 3.4.1 Mouse Husbandry and Genotyping

Animal experiments were conducted in agreement with European (Council Directive 2010/63/UE) and Spanish (RD 53/2013) regulations on the protection of animals used for scientific purposes with the appropriate institutional committee approval. Mice heterozygous for Trp73 on a mixed background C57BL/6 x 129/svJae (Yang et al., 2000) were backcrossed to C57BL/6, at least five times, to enrich for C57BL/6 background. Heterozygous animals were crossed to obtain the p73KO mice. Genotyping of adult animals was performed by PCR analysis as described before (Yang et al., 2000; Flores et al., 2005). Male and female mice were used in the experiments.

#### 3.4.2 Cell culture

Mouse WT and p73KO iPSCs (Martin-Lopez et al, 2017) were cultured over *feeder cells*. *Feeder cells* were obtain from WT MEFs and were mitotically inactivated with mitomycin C (Sigma-Aldrich, M4287) 10µg/mL in MEF medium (table 2), during 2h at 37°C. *Feeder cells* were seeded at  $2 \cdot 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in iPSCs medium (table 4) 12h before iPSCs culture. iPSCs were cultured changing medium every day and they were subcultured every two days ( $5 \cdot 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) in 6-well plates, seeding iPSCs over *feeder cells* again. For immunofluorescence staining, iPSCs ( $5 \cdot 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) were seeded in 24-well plates with coverslips on the bottom of the well. Fixation with 3.7% PFA was carried out at RT during 15 min 24h after seeding.

TAp73-inducible Saos-2 cells, kindly provided by Dr. Karen Vousden (Cancer Research UK Beatson Institute, Glasgow), were cultured in Saos-2 medium (Table 4). Cells were seeded ( $3 \cdot 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in 24-well plates with coverslips on the bottom of the well. These cells were treated 24h

after seeding, with 2.5 ug/ml of doxycycline (Melino et al., 2003) during 48h. Fixation with 3.7% PFA was carried out at RT during 15 min after treatment.

**Table 6.** Culture media

Cell line	Composition & final concentration	Catalog number
Saos cells	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503
	100 U/mL penicillin-0.1 mg/mL streptomycin	Sigma-Aldrich, F4333
iPSCs	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503
	1mM non-essential aminoacids	Gibco,11140
	1mM sodium piruvate	Gibco,11360
	0.1 mM $\beta$ -mercaptoethanol	Gibco,31350
	1000U/mL ESGRO/LIF	Chemicon, ESG1107
MEFs	DMEM	Sigma-Aldrich, D5671
	15% FBS	Sigma-Aldrich, F7524
	2mM L-Glutamine	Gibco, 2503

### 3.4.3 RNA isolation and real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with TRI reagent (Ambion, Austin, TX, USA) and cDNA was prepared using High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. MLCK and Myh9 expression was detected by qRT-PCR in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Basel, Switzerland). Primer sequences are described in Table 6 and qRTPCR conditions were described before (Tomassini R. et al, 2008). The expression levels of mRNA were expressed as  $2\Delta Ct$  and normalized to 18S.

**Table 7.** qRT-PCR primers

Gene	Specie	Sequence	Reference
18S	mouse	Fw 5'-AGTTCAGCACATTTTGCAG-3'	Grespi & Melino, 2012
	mouse	Rv 5'-TCATCCTCCGTGAGTTCTCCA-3'	Grespi & Melino, 2012
Sec24b	mouse	Fw 5'-GGTCCAGCACAGAGTCCAATG-3'	Primer Bank Database
	mouse	Rv 5'-GGAGTCCCCGAATTTTGTGTT-3'	Primer Bank Database

### 3.4.4 Isolation and immunostaining of wholemounts of the lateral wall of the ventricles

Wholemounts (WMs) of the lateral wall of the ventricles were dissected from 1, 15 and 30 postnatal day mice. Animals were euthanized in agreement with European and Spanish regulations and the brain was dissected and placed in cold 0.1M PBS. Dissection of the WMs was made under the stereomicroscope as described (Mirzadeh et al., 2010). WMs were transferred

ventricle side up to a 48-well plate and fixed with 4% PFA 5', 15', 30' or o/n at 4°C or with freeze methanol 15 min at -20°C, depending on the antibody requirement.

4% PFA fixation: WMs were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer (0.1M PBS/10% NDS/0.5% Tx100). Then, they were incubated for 24 h at 4°C with the appropriate primary antibodies (Table 3) diluted in blocking buffer. WMs were washed three times during 20 min with 0.1M PBS/0.1% Tx100 and incubated 24 h at 4°C with secondary antibodies (Table 3) diluted in blocking buffer.

Metanol fixation: WMs were incubated for 30min at room temperature in blocking buffer (0.1M PBS/10% NDS/0.1% Tx100). Then, sections were incubated for 1h30min at room temperature with the appropriate primary antibodies (Table 3) diluted in blocking buffer. WMs were washed three times during 5 min with 0.1M PBS/0.1% Tx100 and incubated 1 h at room temperature with secondary antibodies (Table 8) diluted in blocking buffer.

**Table 8.** Primary and secondary antibodies and phalloidin stainig used for immunostaining

Primary Antibody	Host	Dilution	Manufacturer	Catalog Number
αTubulin	mouse	1/200	AbCam	ab7291
γTubulina (C20)	goat	1/200	Santa Cruz	sc-7396
βCatenin	mouse	1/200	BD transduction lab.	61053
βCatenin	rabbit	1/200	Cell signaling	9587
Frizzled3	rabbit	1/200	Sigma-Aldrich	SAB4503170
Frizzled3	goat	1/200	R&D Systems	AF1001
Sec24b	goat	1/200	Santa Cruz Biotechnology	sc160787
Vangl2 (H-55)	rabbit	1/200	Santa Cruz Biotechnology	sc67136
Prickle2	rabbit	1/200	OriGene	TA320126
EB3	rat	1/200	AbCam	ab53360
p73 Ab-4	mouse	1/201	NeoM	M-764-P
Secondary Antibody	Host and Reactivity	Dilution	Manufacturer	Catalog Number
Alexa Fluor 488	donkey anti mouse	1/1000	Molecular Probes	A21202
Alexa Fluor 488	donkey anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A21206
Alexa Fluor 594	goat anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A11012
Alexa Fluor 568	donkey anti goat	1/1000	Molecular Probes	A11057
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated	donkey anti goat	1/1000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
Alexa Fluor 594	donkey anti rat	1/1001	Jackson ImmunoResearch	712-585-150
Alexa Fluor 647	goat anti rabbit	1/1000	Molecular Probes	A21244
Alexa Fluor 647	donkey anti goat	1/1000	Molecular Probes	A21447
Alexa Fluor 648	goat anti guinea pig	1/1000	Molecular Probes	A21450

Immunofluorescent detections were carried out with Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA) and Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) conjugated secondary antibodies. DAPI (1µg/mL) was used for nuclear counterstaining. FluoromountG Electron Microscopy Sciences (EMS 17984-25) was used as mounting media. Samples were analysed in a Zeiss LSM800 Confocal Laser Scanning Microscope. Images were acquired and processed using ZEN blue software.

### **3.4.5 Statistical analyses**

Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). For the docking experiments, a contingency analysis was carried out; for all the other comparisons, Mann–Whitney non-parametric tests were applied. All data are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).





## **CONCLUSIONES**

---



## **CAPÍTULO I. EFECTO DE LA FALTA DE p73 EN LA MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS Y LA CITOARQUITECTURA DE LA PARED LATERAL DEL VENTRÍCULO.**

PRIMERA. El gen *Trp73* es necesario para llevar a cabo correctamente el proceso de multiciliogénesis en las células endimarias de la pared lateral del ventrículo.

SEGUNDA. La falta de p73 impide la correcta organización de los cilios asociados a los cuerpos basales en las células endimarias durante su maduración.

TERCERA. *Trp73* es necesario para el establecimiento de la polaridad translacional de los cuerpos basales de las células endimarias.

## **CAPÍTULO II. PAPEL DE P73 EN LA REGULACIÓN DE LA POLARIDAD TRANSLACIONAL DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DENMII MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LA EXPRSIÓN DE LA KINASA MLCK.**

CUARTA. El gen *Trp73* regula directamente la expresión de la kinasa MLCK, regulando así los niveles de activación del regulador de la polaridad translacional NMII.

QUINTA. La falta de p73 da lugar a una disminución de los niveles de NMII activada tanto *in vitro* como *in vivo*.

SEXTA. En ausencia de p73, la señal de NMII activada en el entorno de los cuerpos basales tanto en células de la glia radial como en células endimarias es menor, afectando a la polaridad translacional en estas células.

SEPTIMA. En ausencia de p73 la localización de NMII activada en las membranas celulares de las células endimarias disminuye significativamente, afectando los puntos de anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana.

OCTAVA. El gen *Trp73* es necesario para correcta organización apical del citoesqueleto de actina en las células endimarias, impidiendo el correcto anclaje de los cuerpos basales a la membrana apical.

NOVENA. En ausencia de p73 los reguladores del anclaje apical de los cuerpos basales Dishevelled y Rac pierden su localización próxima a los cuerpos basales (por debajo y por encima de los cuerpos basales respectivamente) afectando aún más al anclaje de los cuerpos basales a la membrana.

DECIMA. La ausencia de la isoforma de p73, TAp73, afecta la polaridad translacional y el anclaje de los cuerpos basales en la membrana apical, así como la formación de la red apical de actina en las células endimarias.

**CAPÍTULO III. EFECTO DE LA FALTA DE P73 EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA LOCALIZACIÓN ASIMÉTRICA DE LAS PROTEÍNAS *CORE-PCP* QUE REGULAN LA POLARIDAD ROTACIONAL DE LAS CÉLULAS EPENDIMARIAS A TRAVÉS DE LA ALTERACIÓN DEL CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS.**

DECIMOPRIMERA. *Trp73* es necesario para la correcta localización de las proteínas del módulo *core-PCP* en las membranas de las células endimarias, afectando de este modo la polaridad rotacional de los cuerpos basales.

DECIMOSEGUNDA. La falta de p73 afecta la organización y polarización del citoesqueleto apical de microtúbulos en las células endimarias, especialmente relacionado con el establecimiento de la polaridad en células multiciliadas.

DECIMOTERCERA. La falta de p73 altera la localización en membrana de las proteínas del módulo *core-PCP* de manera independiente al proceso de ciliogénesis, indicando el papel independiente de p73 en el proceso de multiciliogénesis y en el establecimiento de la polaridad.

DECIMOCUARTA. La isoforma TAp73, pero no DNp73, es capaz de recuperar la localización en membrana de las proteínas del módulo *core-PCP in vitro*. Además, la inducción de la expresión de esta isoforma regula la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos *in vitro*, regulando la polarización de los mismos, la localización de Vangl2 y la reorganización del aparato de Golgi. Todo ello indica que es la isoforma TAp73, pero no DNp73, la encargada de la regulación de la polaridad y organización de los microtúbulos y del establecimiento de la polaridad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abraham, H., C. G. Perez-Garcia & G. Meyer (2004) p73 and Reelin in Cajal-Retzius cells of the developing human hippocampal formation. *Cereb Cortex*, 14, 484-95.
- Adamo, L. & G. Garcia-Cardena (2012) The vascular origin of hematopoietic cells. *Dev Biol*, 362, 1-10.
- Adler, P. N., J. Charlton & J. Liu (1998) Mutations in the cadherin superfamily member gene *dachsous* cause a tissue polarity phenotype by altering frizzled signaling. *Development*, 125, 959-68.
- Agostini, M., P. Tucci, H. Chen, R. A. Knight, D. Bano, P. Nicotera, F. McKeon & G. Melino (2010) p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 403, 13-7.
- Agostini, M., P. Tucci, R. Killick, E. Candi, B. S. Sayan, P. Rivetti di Val Cervo, P. Nicotera, F. McKeon, R. A. Knight, T. W. Mak & G. Melino (2011) Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 21093-8.
- Al Jord, A., A. I. Lemaitre, N. Delgehyr, M. Faucourt, N. Spassky & A. Meunier (2014) Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*, 516, 104-7.
- Allocati, N., C. Di Ilio & V. De Laurenzi (2012) p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Exp Cell Res*, 318, 1285-90.
- Alvarez-Buylla, A. & J. M. Garcia-Verdugo (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 22, 629-34.
- Alvarez-Buylla, A. & D. A. Lim (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41, 683-6.
- Ambegaonkar, A. A., G. Pan, M. Mani, Y. Feng & K. D. Irvine (2012) Propagation of *Dachsous*-Fat planar cell polarity. *Curr Biol*, 22, 1302-8.
- Amelio, I., S. Inoue, E. K. Markert, A. J. Levine, R. A. Knight, T. W. Mak & G. Melino (2015) TAp73 opposes tumor angiogenesis by promoting hypoxia-inducible factor 1alpha degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 226-31.
- Andreu-Agullo, C., J. M. Morante-Redolat, A. C. Delgado & I. Farinas (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci*, 12, 1514-23.
- Aqeilan, R. I., Y. Pekarsky, J. J. Herrero, A. Palamarchuk, J. Letofsky, T. Druck, F. Trapasso, S. Y. Han, G. Melino, K. Huebner & C. M. Croce (2004) Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4401-6.
- Armstrong, J. F., M. H. Kaufman, D. J. Harrison & A. R. Clarke (1995) High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol*, 5, 931-6.
- Asher, G., P. Tsvetkov, C. Kahana & Y. Shaul (2005) A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev*, 19, 316-21.
- Baena-Lopez, L. A., A. Baonza & A. Garcia-Bellido (2005) The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr Biol*, 15, 1640-4.
- Bailey, S. G., M. S. Cragg & P. A. Townsend (2011) Family friction as DeltaNp73 antagonises p73 and p53. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 482-6.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, P. vanTuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, R. White & B. Vogelstein (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217-21.
- Balestrini, A., C. Cosentino, A. Errico, E. Garner & V. Costanzo (2010) GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nat Cell Biol*, 12, 484-91.

- Balint, E., A. C. Phillips, S. Kozlov, C. L. Stewart & K. H. Vousden (2002) Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3529-34.
- Banizs, B., M. M. Pike, C. L. Millican, W. B. Ferguson, P. Komlosi, J. Sheetz, P. D. Bell, E. M. Schwiebert & B. K. Yoder (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*, 132, 5329-39.
- Bantel, H. & H. U. Simon (2010) DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle*, 9, 2710-1.
- Bao, J., X. Ma, C. Liu & R. S. Adelstein (2007) Replacement of nonmuscle myosin II-B with II-A rescues brain but not cardiac defects in mice. *J Biol Chem*, 282, 22102-11.
- Bastock, R., H. Strutt & D. Strutt (2003) Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. *Development*, 130, 3007-14.
- Bayly, R. & J. D. Axelrod (2011) Pointing in the right direction: new developments in the field of planar cell polarity. *Nat Rev Genet*, 12, 385-91.
- Beard, R. S., Jr., R. J. Haines, K. Y. Wu, J. J. Reynolds, S. M. Davis, J. E. Elliott, N. L. Malinin, V. Chatterjee, B. J. Cha, M. H. Wu & S. Y. Yuan (2014) Non-muscle Mlck is required for beta-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1beta-mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *J Cell Sci*, 127, 1840-53.
- Beisson, J. & M. Wright (2003) Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 96-104.
- Belyi, V. A., P. Ak, E. Markert, H. Wang, W. Hu, A. Puzio-Kuter & A. J. Levine (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001198.
- Bennett, V. & J. Healy (2008) Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol Med*, 14, 28-36.
- Bensaad, K., M. Le Bras, K. Unsal, S. Strano, G. Blandino, O. Tominaga, D. Rouillard & T. Soussi (2003) Change of conformation of the DNA-binding domain of p53 is the only key element for binding of and interference with p73. *J Biol Chem*, 278, 10546-55.
- Benzing, T., M. Simons & G. Walz (2007) Wnt signaling in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 18, 1389-98.
- Bertet, C., L. Sulak & T. Lecuit (2004) Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature*, 429, 667-71.
- Bertolino, P., M. Deckers, F. Lebrin & P. ten Dijke (2005) Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*, 128, 585s-590s.
- Biegging, K. T., S. S. Mello & L. D. Attardi (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14, 359-70.
- Blandino, G. & M. Dobbstein (2004) p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*, 3, 886-94.
- Boisvieux-Ulrich, E., M. C. Laine & D. Sandoz (1990) Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell Tissue Res*, 259, 443-54.
- Boominathan, L. (2010) The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 613-39.
- Boutin, C., P. Labedan, J. Dimidschstein, F. Richard, H. Cremer, P. Andre, Y. Yang, M. Montcouquiol, A. M. Goffinet & F. Tissir (2014) A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E3129-38.
- Braak, H., I. Alafuzoff, T. Arzberger, H. Kretschmar & K. Del Tredici (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, 112, 389-404.
- Braak, H. & E. Braak (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*, 16, 271-8; discussion 278-84.
- Brandt, T., M. Petrovich, A. C. Joerger & D. B. Veprintsev (2009) Conservation of DNA-binding specificity and oligomerisation properties within the p53 family. *BMC Genomics*, 10, 628.



- Briscoe, J. & S. Small (2015) Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, 142, 3996-4009.
- Brittle, A., C. Thomas & D. Strutt (2012) Planar polarity specification through asymmetric subcellular localization of Fat and Dachshous. *Curr Biol*, 22, 907-14.
- Brittle, A. L., A. Repiso, J. Casal, P. A. Lawrence & D. Strutt (2010) Four-jointed modulates growth and planar polarity by reducing the affinity of dachshous for fat. *Curr Biol*, 20, 803-10.
- Brodsky, M. H., W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin & J. M. Abrams (2000) Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*, 101, 103-13.
- Brodsky, M. H. & H. Steller (1996) Positional information along the dorsal-ventral axis of the Drosophila eye: graded expression of the four-jointed gene. *Dev Biol*, 173, 428-46.
- Butler, M. T. & J. B. Wallingford (2017) Planar cell polarity in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 375-388.
- Cai, Y. C., G. Y. Yang, Y. Nie, L. D. Wang, X. Zhao, Y. L. Song, D. N. Seril, J. Liao, E. P. Xing & C. S. Yang (2000) Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis*, 21, 683-9.
- Caillat, C., A. Fish, D. E. Pefani, S. Taraviras, Z. Lygerou & A. Perrakis (2015) The structure of the GemC1 coiled coil and its interaction with the Geminin family of coiled-coil proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 71, 2278-86.
- Candi, E., M. Agostini, G. Melino & F. Bernassola (2014) How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat*, 35, 702-14.
- Canning, P., F. von Delft & A. N. Bullock (2012) Structural basis for ASPP2 recognition by the tumor suppressor p73. *J Mol Biol*, 423, 515-27.
- Cao, N. & Z. X. Yao (2011) The hemangioblast: from concept to authentication. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 580-8.
- Carastro, L. M., H. Y. Lin, H. Y. Park, D. Kim, S. Radlein, K. K. Hampton, A. Hakam, B. Zachariah, J. Pow-Sang & J. Y. Park (2014) Role of p73 Dinucleotide Polymorphism in Prostate Cancer and p73 Protein Isoform Balance. *Prostate Cancer*, 2014, 129582.
- Casal, J., P. A. Lawrence & G. Struhl (2006) Two separate molecular systems, Dachshous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. *Development*, 133, 4561-72.
- Casciano, I., K. Mazzocco, L. Boni, G. Pagnan, B. Banelli, G. Allemanni, M. Ponzoni, G. P. Tonini & M. Romani (2002) Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ*, 9, 246-51.
- Casciano, I., M. Ponzoni, C. Lo Cunsolo, G. P. Tonini & M. Romani (1999) Different p73 splicing variants are expressed in distinct tumour areas of a multifocal neuroblastoma. *Cell Death Differ*, 6, 391-3.
- Castillejo-Lopez, C., W. M. Arias & S. Baumgartner (2004) The fat-like gene of Drosophila is the true orthologue of vertebrate fat cadherins and is involved in the formation of tubular organs. *J Biol Chem*, 279, 24034-43.
- Chailley, B., G. Nicolas & M. C. Laine (1989) Organization of actin microfilaments in the apical border of oviduct ciliated cells. *Biol Cell*, 67, 81-90.
- Chen, W. S., D. Antic, M. Matis, C. Y. Logan, M. Povelones, G. A. Anderson, R. Nusse & J. D. Axelrod (2008) Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*, 133, 1093-105.
- Chi, S. W., A. Ayed & C. H. Arrowsmith (1999) Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *Embo j*, 18, 4438-45.
- Chiasson, B. J., V. Tropepe, C. M. Morshead & D. van der Kooy (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*, 19, 4462-71.

- Chillemi, G., S. Kehrlöesser, F. Bernassola, A. Desideri, V. Dotsch, A. J. Levine & G. Melino (2017) Structural Evolution and Dynamics of the p53 Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Chmielnicki, E., A. Benraiss, A. N. Economides & S. A. Goldman (2004) Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci*, 24, 2133-42.
- Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey & N. P. Pavletich (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265, 346-55.
- Chong, J. A., J. Tapia-Ramirez, S. Kim, J. J. Toledo-Aral, Y. Zheng, M. C. Boutros, Y. M. Altshuler, M. A. Frohman, S. D. Kraner & G. Mandel (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80, 949-57.
- Clark, H. F., D. Brentrup, K. Schneitz, A. Bieber, C. Goodman & M. Noll (1995) Dachsous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 9, 1530-42.
- Collavin, L., A. Lunardi & G. Del Sal (2010) p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ*, 17, 901-11.
- Concin, N., K. Becker, N. Slade, S. Erster, E. Mueller-Holzner, H. Ulmer, G. Daxenbichler, A. Zeimet, R. Zeillinger, C. Marth & U. M. Moll (2004) Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res*, 64, 2449-60.
- Conti, M. A. & R. S. Adelstein (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci*, 121, 11-8.
- Conti, M. A., S. Even-Ram, C. Liu, K. M. Yamada & R. S. Adelstein (2004) Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*, 279, 41263-6.
- Costanzo, A., P. Merlo, N. Pediconi, M. Fulco, V. Sartorelli, P. A. Cole, G. Fontemaggi, M. Fanciulli, L. Schiltz, G. Blandino, C. Balsano & M. Levrero (2002) DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*, 9, 175-86.
- Coutandin, D., F. Lohr, F. H. Niesen, T. Ikeya, T. A. Weber, B. Schafer, E. M. Zielonka, A. N. Bullock, A. Yang, P. Guntert, S. Knapp, F. McKeon, H. D. Ou & V. Dotsch (2009) Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ*, 16, 1582-9.
- Crick, F. (1970) Diffusion in embryogenesis. *Nature*, 225, 420-2.
- Dabrowska, R., J. M. Sherry, D. K. Aromatorio & D. J. Hartshorne (1978) Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochemistry*, 17, 253-8.
- Davison, T. S., C. Vagner, M. Kaghad, A. Ayed, D. Caput & C. H. Arrowsmith (1999) p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J Biol Chem*, 274, 18709-14.
- Davy, B. E. & M. L. Robinson (2003) Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet*, 12, 1163-70.
- Dawe, H. R., H. Farr & K. Gull (2007) Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci*, 120, 7-15.
- De Laurenzi, V., A. Costanzo, D. Barcaroli, A. Terrinoni, M. Falco, M. Annicchiarico-Petruzzelli, M. Levrero & G. Melino (1998) Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med*, 188, 1763-8.
- De Laurenzi, V. D., M. V. Catani, A. Terrinoni, M. Corazzari, G. Melino, A. Costanzo, M. Levrero & R. A. Knight (1999) Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells

- and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ*, 6, 389-90.
- de Strooper, B. (2010) Cancer and neurodegeneration meet. *EMBO Mol Med*, 2, 245-6.
- Del Bigio, M. R. (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14, 1-13.
- Derry, W. B., A. P. Putzke & J. H. Rothman (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*, 294, 591-5.
- Dessaud, E., L. L. Yang, K. Hill, B. Cox, F. Ulloa, A. Ribeiro, A. Mynett, B. G. Novitsch & J. Briscoe (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, 450, 717-20.
- Devenport, D. & E. Fuchs (2008) Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat Cell Biol*, 10, 1257-68.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11619-24.
- Dominguez, G., J. M. Garcia, C. Pena, J. Silva, V. Garcia, L. Martinez, C. Maximiano, M. E. Gomez, J. A. Rivera, C. Garcia-Andrade & F. Bonilla (2006) DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol*, 24, 805-15.
- Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel & A. Bradley (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-21.
- Dotsch, V., F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi & G. Melino (2010) p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a004887.
- Douc-Rasy, S., M. Barrois, M. Echeynne, M. Kaghad, E. Blanc, G. Raguenez, D. Goldschneider, M. J. Terrier-Lacombe, O. Hartmann, U. Moll, D. Caput & J. Benard (2002) DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol*, 160, 631-9.
- Dulloo, I., P. B. Hooi & K. Sabapathy (2015a) Hypoxia-induced DNp73 stabilization regulates Vegf-A expression and tumor angiogenesis similar to TAp73. *Cell Cycle*, 14, 3533-9.
- Dulloo, I., B. H. Phang, R. Othman, S. Y. Tan, A. Vijayaraghavan, L. K. Goh, M. Martin-Lopez, M. M. Marques, C. W. Li, Y. Wang de, M. C. Marin, W. Xian, F. McKeon & K. Sabapathy (2015b) Hypoxia-inducible TAp73 supports tumorigenesis by regulating the angiogenic transcriptome. *Nat Cell Biol*, 17, 511-23.
- Dunne, J., A. M. Hanby, R. Poulson, T. A. Jones, D. Sheer, W. G. Chin, S. M. Da, Q. Zhao, P. C. Beverley & M. J. Owen (1995) Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the *Drosophila* fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics*, 30, 207-23.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler & B. Vogelstein (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1, 45-9.
- Engelmann, D., C. Meier, V. Alla & B. M. Putzer (2015) A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene*, 34, 4287-99.
- Epting, D., K. Slanchev, C. Boehlke, S. Hoff, N. T. Loges, T. Yasunaga, L. Indorf, S. Nestel, S. S. Lienkamp, H. Omran, E. W. Kuehn, O. Ronneberger, G. Walz & A. Kramer-Zucker (2015) The Rac1 regulator ELMO controls basal body migration and docking in multiciliated cells through interaction with Ezrin. *Development*, 142, 1553.
- Ernst, A. & J. Frisen (2015) Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS Biol*, 13, e1002045.
- Ethayathulla, A. S., H. T. Nguyen & H. Viadiu (2013) Crystal structures of the DNA-binding domain tetramer of the p53 tumor suppressor family member p73 bound to different full-site response elements. *J Biol Chem*, 288, 4744-54.

- Ethayathulla, A. S., P. W. Tse, P. Monti, S. Nguyen, A. Inga, G. Fronza & H. Viadiu (2012) Structure of p73 DNA-binding domain tetramer modulates p73 transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 6066-71.
- Etienne-Manneville, S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29, 471-99.
- Even-Ram, S., A. D. Doyle, M. A. Conti, K. Matsumoto, R. S. Adelstein & K. M. Yamada (2007) Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*, 9, 299-309.
- Fahmy, O. G. & M. J. Fahmy (1959) Complementation among the subgenic mutants in the r-locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 184, 1927-9.
- Fernandez-Alonso, R., M. Martin-Lopez, L. Gonzalez-Cano, S. Garcia, F. Castrillo, I. Diez-Prieto, A. Fernandez-Corona, M. E. Lorenzo-Marcos, X. Li, L. Claesson-Welsh, M. M. Marques & M. C. Marin (2015) p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGFbeta signaling. *Cell Death Differ*, 22, 1287-99.
- Ferraiuolo, M., S. Di Agostino, G. Blandino & S. Strano (2016) Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol*, 6, 77.
- Ferrara, N., H. P. Gerber & J. LeCouter (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.
- Fillippovich, I., N. Sorokina, M. Gatei, Y. Haupt, K. Hobson, E. Moallem, K. Spring, M. Mould, M. A. McGuckin, M. F. Lavin & K. K. Khanna (2001) Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*, 20, 514-22.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds & A. J. Levine (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57, 1083-93.
- Flores, E. R., S. Sengupta, J. B. Miller, J. J. Newman, R. Bronson, D. Crowley, A. Yang, F. McKeon & T. Jacks (2005) Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, 7, 363-73.
- Flores, E. R., K. Y. Tsai, D. Crowley, S. Sengupta, A. Yang, F. McKeon & T. Jacks (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 416, 560-4.
- Freed-Pastor, W. A. & C. Prives (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 26, 1268-86.
- Fujitani, M., G. I. Cancino, C. B. Dugani, I. C. Weaver, A. Gauthier-Fisher, A. Paquin, T. W. Mak, M. J. Wojtowicz, F. D. Miller & D. R. Kaplan (2010) TAp73 acts via the bHLH Hey2 to promote long-term maintenance of neural precursors. *Curr Biol*, 20, 2058-65.
- Gaiddon, C., M. Lokshin, J. Ahn, T. Zhang & C. Prives (2001) A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*, 21, 1874-87.
- Gao, B. & Y. Yang (2013) Planar cell polarity in vertebrate limb morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 23, 438-44.
- Gao, X., N. Arenas-Ramirez, S. J. Scales & R. N. Hannoush (2011) Membrane targeting of palmitoylated Wnt and Hedgehog revealed by chemical probes. *FEBS Lett*, 585, 2501-6.
- Garcia-Gonzalo, F. R. & J. F. Reiter (2012) Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol*, 197, 697-709.
- Giannone, G., B. J. Dubin-Thaler, O. Rossier, Y. Cai, O. Chaga, G. Jiang, W. Beaver, H. G. Dobereiner, Y. Freund, G. Borisy & M. P. Sheetz (2007) Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*, 128, 561-75.
- Gilula, N. B. & P. Satir (1972) The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol*, 53, 494-509.
- Goldschneider, D., K. Million, A. Meiller, H. Haddada, A. Puisieux, J. Benard, E. May & S. Douc-Rasy (2005) The neurogene BTG2/TIS21/PC3 is transactivated by DeltaNp73alpha via p53 specifically in neuroblastoma cells. *J Cell Sci*, 118, 1245-53.

- Gonfloni, S., L. Di Tella, S. Caldarola, S. M. Cannata, F. G. Klinger, C. Di Bartolomeo, M. Mattei, E. Candi, M. De Felici, G. Melino & G. Cesareni (2009) Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med*, 15, 1179-85.
- Gonzalez-Cano, L., S. Fuertes-Alvarez, N. Robledinos-Anton, A. Bizy, A. Villena-Cortes, I. Farinas, M. M. Marques & M. C. Marin (2016) p73 is required for ependymal cell maturation and neurogenic SVZ cytoarchitecture. *Dev Neurobiol*, 76, 730-47.
- Gonzalez-Cano, L., M. Herreros-Villanueva, R. Fernandez-Alonso, A. Ayuso-Sacido, G. Meyer, J. M. Garcia-Verdugo, A. Silva, M. M. Marques & M. C. Marin (2010) p73 deficiency results in impaired self renewal and premature neuronal differentiation of mouse neural progenitors independently of p53. *Cell Death & Disease*, 1, e109.
- Gonzalez-Cano, L., A. L. Hillje, S. Fuertes-Alvarez, M. M. Marques, A. Blanch, R. W. Ian, M. S. Irwin, J. C. Schwamborn & M. C. Marín (2013) Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. *Cell Death & Disease*, 4, e704.
- Goodrich, L. V. & D. Strutt (2011) Principles of planar polarity in animal development. *Development*, 138, 1877-92.
- Gordon, R. E. (1982) Three-dimensional organization of microtubules and microfilaments of the basal body apparatus of ciliated respiratory epithelium. *Cell Motil*, 2, 385-91.
- Gotz, M. & W. B. Huttner (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- Graham, W. V., F. Wang, D. R. Clayburgh, J. X. Cheng, B. Yoon, Y. Wang, A. Lin & J. R. Turner (2006) Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. *J Biol Chem*, 281, 26205-15.
- Greiss, S., J. Hall, S. Ahmed & A. Gartner (2008a) C. elegans SIR-2.1 translocation is linked to a proapoptotic pathway parallel to cep-1/p53 during DNA damage-induced apoptosis. *Genes Dev*, 22, 2831-42.
- Greiss, S., B. Schumacher, K. Grandien, J. Rothblatt & A. Gartner (2008b) Transcriptional profiling in C. elegans suggests DNA damage dependent apoptosis as an ancient function of the p53 family. *BMC Genomics*, 9, 334.
- Grigoryan, T., P. Wend, A. Klaus & W. Birchmeier (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev*, 22, 2308-41.
- Grob, T. J., U. Novak, C. Maise, D. Barcaroli, A. U. Luthi, F. Pirnia, B. Hugli, H. U. Graber, V. De Laurenzi, M. F. Fey, G. Melino & A. Tobler (2001) Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, 8, 1213-23.
- Guan, M., H. X. Peng, B. Yu & Y. Lu (2003) p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 33, 215-20.
- Gubb, D. & A. Garcia-Bellido (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol*, 68, 37-57.
- Guglielmino, M. R., M. Santonocito, M. Vento, M. Ragusa, D. Barbagallo, P. Borzi, I. Casciano, B. Banelli, O. Barbieri, S. Astigiano, P. Scollo, M. Romani, M. Purrello & C. Di Pietro (2011) TAp73 is downregulated in oocytes from women of advanced reproductive age. *Cell Cycle*, 10, 3253-6.
- Guirao, B., A. Meunier, S. Mortaud, A. Aguilar, J. M. Corsi, L. Strehl, Y. Hirota, A. Desoeuvre, C. Boutin, Y. G. Han, Z. Mirzadeh, H. Cremer, M. Montcouquiol, K. Sawamoto & N. Spassky (2010) Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol*, 12, 341-50.
- Guyot, R., S. Magre, P. Leduque & B. Le Magueresse-Battistoni (2003) Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development. *Dev Dyn*, 227, 357-66.

- Habas, R., I. B. Dawid & X. He (2003) Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev*, 17, 295-309.
- Habas, R., Y. Kato & X. He (2001) Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*, 107, 843-54.
- Hale, R., A. L. Brittle, K. H. Fisher, N. A. Monk & D. Strutt (2015) Cellular interpretation of the long-range gradient of Four-jointed activity in the Drosophila wing. *Elife*, 4.
- Hale, R. & D. Strutt (2015) Conservation of Planar Polarity Pathway Function Across the Animal Kingdom. *Annu Rev Genet*, 49, 529-51.
- Harms, K. L. & X. Chen (2006) The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ*, 13, 890-7.
- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins & M. Gotz (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol*, 229, 15-30.
- Harumoto, T., M. Ito, Y. Shimada, T. J. Kobayashi, H. R. Ueda, B. Lu & T. Uemura (2010) Atypical cadherins Dachous and Fat control dynamics of noncentrosomal microtubules in planar cell polarity. *Dev Cell*, 19, 389-401.
- Hatakeyama, J., J. H. Wald, I. Printsev, H. Y. Ho & K. L. Carraway, 3rd (2014) Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr Relat Cancer*, 21, R345-56.
- Heissler, S. M. & D. J. Manstein (2013) Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cell Mol Life Sci*, 70, 1-21.
- Hernandez-Monge, J., A. B. Rousset-Roman, I. Medina-Medina & V. Olivares-Illana (2016) Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB. *Genes Cancer*, 7, 278-287.
- Herring, B. P., S. Dixon & P. J. Gallagher (2000) Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1656-64.
- Herring, B. P., O. El-Mounayri, P. J. Gallagher, F. Yin & J. Zhou (2006) Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C817-27.
- Hirota, Y., A. Meunier, S. Huang, T. Shimozawa, O. Yamada, Y. S. Kida, M. Inoue, T. Ito, H. Kato, M. Sakaguchi, T. Sunabori, M. A. Nakaya, S. Nonaka, T. Ogura, H. Higuchi, H. Okano, N. Spassky & K. Sawamoto (2010) Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development*, 137, 3037-46.
- Holembowski, L., D. Kramer, D. Riedel, R. Sordella, A. Nemajerova, M. Dobbstein & U. M. Moll (2014) TAp73 is essential for germ cell adhesion and maturation in testis. *J Cell Biol*, 204, 1173-90.
- Hooper, C., R. Killick, M. Tavassoli, G. Melino & S. Lovestone (2006) TAp73alpha induces tau phosphorylation in HEK293a cells via a transcription-dependent mechanism. *Neurosci Lett*, 401, 30-4.
- Hu, W., Z. Feng, G. S. Atwal & A. J. Levine (2008) p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*, 7, 848-52.
- Hu, W., Z. Feng, A. K. Teresky & A. J. Levine (2007) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, 450, 721-4.
- Huang, L., Z. Yan, X. Liao, Y. Li, J. Yang, Z. G. Wang, Y. Zuo, H. Kawai, M. Shadfan, S. Ganapathy & Z. M. Yuan (2011) The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 12001-6.
- Huttner, W. B. & Y. Kosodo (2005) Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 648-57.
- Ibanez-Tallon, I., A. Pagenstecher, M. Fliegau, H. Olbrich, A. Kispert, U. P. Ketelsen, A. North, N. Heintz & H. Omran (2004a) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits

- ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet*, 13, 2133-41.
- Ibanez-Tallon, I., H. Wen, J. M. Miwa, J. Xing, A. B. Tekinay, F. Ono, P. Brehm & N. Heintz (2004b) Tethering naturally occurring peptide toxins for cell-autonomous modulation of ion channels and receptors in vivo. *Neuron*, 43, 305-11.
- Ihrle, R. A. & A. Alvarez-Buylla (2011) Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, 70, 674-86.
- Innocente, S. A. & J. M. Lee (2005) p73 is a p53-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 329, 713-8.
- Inoue, K. & E. A. Fry (2014) Alterations of p63 and p73 in human cancers. *Subcell Biochem*, 85, 17-40.
- Inoue, S., R. Tomasini, A. Rufini, A. J. Elia, M. Agostini, I. Amelio, D. Cescon, D. Dinsdale, L. Zhou, I. S. Harris, S. Lac, J. Silvester, W. Y. Li, M. Sasaki, J. Haight, A. Brustle, A. Wakeham, C. McKelvie, A. Jurisicova, G. Melino & T. W. Mak (2014) TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 1843-8.
- Inoue, T., J. Stuart, R. Leno & C. G. Maki (2002) Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73. *J Biol Chem*, 277, 15053-60.
- Ishikawa, H. & W. F. Marshall (2011) Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 222-34.
- Ishikawa, H. O., H. Takeuchi, R. S. Haltiwanger & K. D. Irvine (2008) Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science*, 321, 401-4.
- Ishimoto, O., C. Kawahara, K. Enjo, M. Obinata, T. Nukiwa & S. Ikawa (2002) Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res*, 62, 636-41.
- Jacobs, W. B., G. S. Walsh & F. D. Miller (2004) Neuronal survival and p73/p63/p53: a family affair. *Neuroscientist*, 10, 443-55.
- Jacquet, B. V., R. Salinas-Mondragon, H. Liang, B. Therit, J. D. Buie, M. Dykstra, K. Campbell, L. E. Ostrowski, S. L. Brody & H. T. Ghashghaei (2009) FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*, 136, 4021-31.
- Janda, C. Y., D. Waghay, A. M. Levin, C. Thomas & K. C. Garcia (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science*, 337, 59-64.
- Jenny, A., J. Reynolds-Kenneally, G. Das, M. Burnett & M. Mlodzik (2005) Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol*, 7, 691-7.
- Jiang, H., Z. Xu, P. Zhong, Y. Ren, G. Liang, H. A. Schilling, Z. Hu, Y. Zhang, X. Wang, S. Chen, Z. Yan & J. Feng (2015) Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat Commun*, 6, 10100.
- Jimenez, A. J., M. D. Dominguez-Pinos, M. M. Guerra, P. Fernandez-Llebrez & J. M. Perez-Figares (2014) Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, 2, e28426.
- Joerger, A. C., S. Rajagopalan, E. Natan, D. B. Veprintsev, C. V. Robinson & A. R. Fersht (2009) Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17705-10.
- Joerger, A. C., R. Wilcken & A. Andreeva (2014) Tracing the evolution of the p53 tetramerization domain. *Structure*, 22, 1301-10.
- Johanson, C. E., E. G. Stopa & P. N. McMillan (2011) The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol*, 686, 101-31.
- Johansson, C. B., S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl & J. Frisen (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34.

- John, K., V. Alla, C. Meier & B. M. Putzer (2011) GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell Death Differ*, 18, 874-86.
- Jost, C. A., M. C. Marin & W. G. Kaelin, Jr. (1997) p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389, 191-4.
- Kaghad, M., H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J. C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J. M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon & D. Caput (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90, 809-19.
- Kamm, K. E. & J. T. Stull (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*, 276, 4527-30.
- Kang, M. J., B. J. Park, D. S. Byun, J. I. Park, H. J. Kim, J. H. Park & S. G. Chi (2000) Loss of imprinting and elevated expression of wild-type p73 in human gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 6, 1767-71.
- Kartasheva, N. N., A. Contente, C. Lenz-Stoppler, J. Roth & M. Dobbelstein (2002) p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene*, 21, 4715-27.
- Kartasheva, N. N., C. Lenz-Bauer, O. Hartmann, H. Schafer, M. Eilers & M. Dobbelstein (2003) DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion. *Oncogene*, 22, 8246-54.
- Katoh, M. (2012) Function and cancer genomics of FAT family genes (review). *Int J Oncol*, 41, 1913-8.
- Kaverina, I. & A. Straube (2011) Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 968-74.
- Keeling, J., L. Tsiokas & D. Maskey (2016) Cellular Mechanisms of Ciliary Length Control. *Cells*, 5.
- Keller, M., R. Tharmann, M. A. Dichtl, A. R. Bausch & E. Sackmann (2003) Slow filament dynamics and viscoelasticity in entangled and active actin networks. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 361, 699-711; discussion 711-2.
- Khapchaev, A. Y. & V. P. Shirinsky (2016) Myosin Light Chain Kinase MYLK1: Anatomy, Interactions, Functions, and Regulation. *Biochemistry (Mosc)*, 81, 1676-1697.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto & S. Kishida (2007) Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal*, 19, 659-71.
- Kilian, B., H. Mansukoski, F. C. Barbosa, F. Ulrich, M. Tada & C. P. Heisenberg (2003) The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev*, 120, 467-76.
- Killick, R., M. Niklison-Chirou, R. Tomasini, D. Bano, A. Rufini, F. Grespi, T. Velletri, P. Tucci, B. S. Sayan, F. Conforti, E. Gallagher, P. Nicotera, T. W. Mak, G. Melino, R. A. Knight & M. Agostini (2011) p73: a multifunctional protein in neurobiology. *Mol Neurobiol*, 43, 139-46.
- Klein, T. J. & M. Mlodzik (2005) Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 155-76.
- Klos Dehring, D. A., E. K. Vladar, M. E. Werner, J. W. Mitchell, P. Hwang & B. J. Mitchell (2013) Deuterosome-mediated centriole biogenesis. *Dev Cell*, 27, 103-12.
- Kohler, E. E., K. K. Wary, F. Li, I. Chatterjee, N. Urao, P. T. Toth, M. Ushio-Fukai, J. Rehman, C. Park & A. B. Malik (2013) Flk1+ and VE-cadherin+ endothelial cells derived from iPSCs recapitulates vascular development during differentiation and display similar angiogenic potential as ESC-derived cells. *PLoS One*, 8, e85549.
- Komiya, Y. & R. Habas (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4, 68-75.
- Kovalev, S., N. Marchenko, S. Swendeman, M. LaQuaglia & U. M. Moll (1998) Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ*, 9, 897-903.



- Krakhmal, N. V., M. V. Zavyalova, E. V. Denisov, S. V. Vtorushin & V. M. Perelmuter (2015) Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*, 7, 17-28.
- Kriegstein, A. & A. Alvarez-Buylla (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- Kudryashov, D. S., M. V. Chibalina, K. G. Birukov, T. J. Lukas, J. R. Sellers, L. J. Van Eldik, D. M. Watterson & V. P. Shirinsky (1999) Unique sequence of a high molecular weight myosin light chain kinase is involved in interaction with actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 463, 67-71.
- Kudryashov, D. S., O. V. Stepanova, E. L. Vilitkevich, T. A. Nikonenko, E. S. Nadezhdina, N. A. Shanina, T. J. Lukas, L. J. Van Eldik, D. M. Watterson & V. P. Shirinsky (2004) Myosin light chain kinase (210 kDa) is a potential cytoskeleton integrator through its unique N-terminal domain. *Exp Cell Res*, 298, 407-17.
- Kyrousi, C., M. Arbi, G. A. Pilz, D. E. Pefani, M. E. Lalioti, J. Ninkovic, M. Gotz, Z. Lygerou & S. Taraviras (2015) Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development*, 142, 3661-74.
- Kyrousi, C., M. E. Lalioti, E. Skavatsou, Z. Lygerou & S. Taraviras (2016) Mcidas and GemC1/Lynkeas specify embryonic radial glial cells. *Neurogenesis (Austin)*, 3, e1172747.
- Lake, B. B. & S. Y. Sokol (2009) Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *J Cell Biol*, 185, 59-66.
- Lambert, C., P. Cisternas & N. C. Inestrosa (2016) Role of Wnt Signaling in Central Nervous System Injury. *Mol Neurobiol*, 53, 2297-311.
- Lane, D. P. (1992) Worrying about p53. *Curr Biol*, 2, 581-3.
- Lane, D. P. & L. V. Crawford (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261-3.
- Lavado, A. & G. Oliver (2011) Six3 is required for ependymal cell maturation. *Development*, 138, 5291-300.
- LAWRENCE, P. A. (1966) Gradients in the Insect Segment: The Orientation of Hairs in the Milkweed Bug *Oncopeltus Fasciatus*. *Journal of Experimental Biology*, 44, 607-620.
- Laywell, E. D., P. Rakic, V. G. Kukekov, E. C. Holland & D. A. Steindler (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13883-8.
- Le Magueresse-Battistoni, B. (2007) Serine proteases and serine protease inhibitors in testicular physiology: the plasminogen activation system. *Reproduction*, 134, 721-9.
- Lee, K. E., Y. S. Hong, B. G. Kim, N. Y. Kim, K. M. Lee, J. Y. Kwak & M. S. Roh (2010) p73 G4C14 to A4T14 polymorphism is associated with colorectal cancer risk and survival. *World J Gastroenterol*, 16, 4448-54.
- Levine, A. J., R. Tomasini, F. D. McKeon, T. W. Mak & G. Melino (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 259-65.
- Li, X. & L. Claesson-Welsh (2009) Embryonic stem cell models in vascular biology. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 53-6.
- Liang, S. H. & M. F. Clarke (1999a) A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem*, 274, 32699-703.
- (1999b) The nuclear import of p53 is determined by the presence of a basic domain and its relative position to the nuclear localization signal. *Oncogene*, 18, 2163-6.
- Lim, D. A., A. D. Tramontin, J. M. Trevejo, D. G. Herrera, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28, 713-26.
- Linzer, D. I. & A. J. Levine (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17, 43-52.
- Liu, G., S. Nozell, H. Xiao & X. Chen (2004) DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol*, 24, 487-501.

- Liu, T., S. E. Roh, J. A. Woo, H. Ryu & D. E. Kang (2013) Cooperative role of RanBP9 and P73 in mitochondria-mediated apoptosis. *Cell Death Dis*, 4, e476.
- Lois, C. & A. Alvarez-Buylla (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264, 1145-8.
- Ma, D., C. H. Yang, H. McNeill, M. A. Simon & J. D. Axelrod (2003) Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature*, 421, 543-7.
- Ma, X., J. Bao & R. S. Adelstein (2007) Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell*, 18, 2305-12.
- Mahoney, P. A., U. Weber, P. Onofrechuk, H. Biessmann, P. J. Bryant & C. S. Goodman (1991) The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell*, 67, 853-68.
- Mai, M., A. Yokomizo, C. Qian, P. Yang, D. J. Tindall, D. I. Smith & W. Liu (1998) Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res*, 58, 2347-9.
- Mallet, C., D. Vittet, J. J. Feige & S. Bailly (2006) TGFbeta1 induces vasculogenesis and inhibits angiogenic sprouting in an embryonic stem cell differentiation model: respective contribution of ALK1 and ALK5. *Stem Cells*, 24, 2420-7.
- Mantovani, F., S. Piazza, M. Gostissa, S. Strano, P. Zacchi, R. Mantovani, G. Blandino & G. Del Sal (2004) Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell*, 14, 625-36.
- Marcinkevicius, E. & J. A. Zallen (2013) Regulation of cytoskeletal organization and junctional remodeling by the atypical cadherin Fat. *Development*, 140, 433-43.
- Marin, M. C., C. A. Jost, L. A. Brooks, M. S. Irwin, J. O'Nions, J. A. Tidy, N. James, J. M. McGregor, C. A. Harwood, I. G. Yulug, K. H. Vousden, M. J. Allday, B. Gusterson, S. Ikawa, P. W. Hinds, T. Crook & W. G. Kaelin, Jr. (2000) A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*, 25, 47-54.
- Marin, M. C. & M. M. Marques (2016) Novel role of p73 as a regulator of developmental angiogenesis: Implication for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*, 3, e1019973.
- Marlow, F., J. Topczewski, D. Sepich & L. Solnica-Krezel (2002) Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol*, 12, 876-84.
- Marques-Garcia, F., N. Ferrandiz, R. Fernandez-Alonso, L. Gonzalez-Cano, M. Herreros-Villanueva, M. Rosa-Garrido, B. Fernandez-Garcia, J. P. Vaque, M. M. Marques, M. E. Alonso, J. C. Segovia, J. Leon & M. C. Marin (2009) p73 plays a role in erythroid differentiation through GATA1 induction. *J Biol Chem*, 284, 21139-56.
- Marshall, C. B., D. J. Mays, J. S. Beeler, J. M. Rosenbluth, K. L. Boyd, G. L. S. Guasch, T. M. Shaver, L. J. Tang, Q. Liu, Y. Shyr, B. J. Venters, M. A. Magnuson & J. A. Pietenpol (2016) p73 is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports*, 14, 2289-2300.
- Marshall, W. F. & C. Kintner (2008) Cilia orientation and the fluid mechanics of development. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 48-52.
- Matakatsu, H. & S. S. Blair (2004) Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the Drosophila wing. *Development*, 131, 3785-94.
- Matis, M. & J. D. Axelrod (2013) Regulation of PCP by the Fat signaling pathway. *Genes Dev*, 27, 2207-20.
- Matis, M., D. A. Russler-Germain, Q. Hu, C. J. Tomlin & J. D. Axelrod (2014) Microtubules provide directional information for core PCP function. *Elife*, 3, e02893.
- Maung, S. M. & A. Jenny (2011) Planar cell polarity in Drosophila. *Organogenesis*, 7, 165-79.
- McNeill, H. (2010) Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003376.

- Medina-Bolivar, C., E. Gonzalez-Arnay, F. Talos, M. Gonzalez-Gomez, U. M. Moll & G. Meyer (2014) Cortical hypoplasia and ventriculomegaly of p73-deficient mice: Developmental and adult analysis. *J Comp Neurol*, 522, 2663-79.
- Meinhardt, H. (1978) Space-dependent cell determination under the control of morphogen gradient. *J Theor Biol*, 74, 307-21.
- Meletis, K., V. Wirta, S. M. Hede, M. Nister, J. Lundeberg & J. Frisen (2006) p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development*, 133, 363-9.
- Melino, G. (2003) p73, the "assistant" guardian of the genome? *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 9-15.
- Melino, G., V. De Laurenzi & K. H. Vousden (2002) p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2, 605-15.
- Merkle, F. T., A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17528-32.
- Meyer, G., A. Cabrera Socorro, C. G. Perez Garcia, L. Martinez Millan, N. Walker & D. Caput (2004) Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci*, 24, 9878-87.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop & A. Bradley (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398, 708-13.
- Mirzadeh, Z., Y. G. Han, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2010) Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci*, 30, 2600-10.
- Mirzadeh, Z., F. T. Merkle, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3, 265-78.
- Mitsui, K., D. Nakajima, O. Ohara & M. Nakayama (2002) Mammalian fat3: a large protein that contains multiple cadherin and EGF-like motifs. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 1260-6.
- Mlodzik, M. (2016) The Dishevelled Protein Family: Still Rather a Mystery After Over 20 Years of Molecular Studies. *Curr Top Dev Biol*, 117, 75-91.
- Moll, U. M. & N. Slade (2004) p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*, 2, 371-86.
- Molla-Herman, A., R. Ghossoub, T. Blisnick, A. Meunier, C. Serres, F. Silbermann, C. Emmerson, K. Romeo, P. Bourdoncle, A. Schmitt, S. Saunier, N. Spassky, P. Bastin & A. Benmerah (2010) The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci*, 123, 1785-95.
- Moreno, R. D., P. Urriola-Munoz & R. Lagos-Cabre (2011) The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis. *Spermatogenesis*, 1, 195-208.
- Munarriz, E., D. Bano, A. E. Sayan, M. Rossi, G. Melino & P. Nicotera (2005) Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 954-60.
- Murray-Zmijewski, F., D. P. Lane & J. C. Bourdon (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, 13, 962-72.
- Nagy, A., Y. Takagi, N. Billington, S. A. Sun, D. K. Hong, E. Homsher, A. Wang & J. R. Sellers (2013) Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level. *J Biol Chem*, 288, 709-22.
- Nakagawa, T., M. Takahashi, T. Ozaki, K. Watanabe Ki, S. Todo, H. Mizuguchi, T. Hayakawa & A. Nakagawara (2002) Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol*, 22, 2575-85.

- Narazaki, G., H. Uosaki, M. Teranishi, K. Okita, B. Kim, S. Matsuoka, S. Yamanaka & J. K. Yamashita (2008) Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118, 498-506.
- Narimatsu, M., R. Bose, M. Pye, L. Zhang, B. Miller, P. Ching, R. Sakuma, V. Luga, L. Roncari, L. Attisano & J. L. Wrana (2009) Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell*, 137, 295-307.
- Nedelcu, A. M. & C. Tan (2007) Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. *Dev Genes Evol*, 217, 801-6.
- Nemajerova, A., D. Kramer, S. S. Siller, C. Herr, O. Shomroni, T. Pena, C. Gallinas Suazo, K. Glaser, M. Wildung, H. Steffen, A. Sriraman, F. Oberle, M. Wienken, M. Hennion, R. Vidal, B. Royen, M. Alevra, D. Schild, R. Bals, J. Dönitz, D. Riedel, S. Bonn, K.-I. Takemaru, U. M. Moll & M. Lizé (2016) TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes & Development*, 30, 1300-1312.
- Nikolopoulou, E., G. L. Galea, A. Rolo, N. D. Greene & A. J. Copp (2017) Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, 144, 552-566.
- Novak, U., T. J. Grob, G. Baskaynak, U. R. Peters, S. Aebi, D. Zwahlen, M. P. Tschan, K. A. Kreuzer, E. O. Leibundgut, J. F. Cajot, A. Tobler & M. F. Fey (2001) Overexpression of the p73 gene is a novel finding in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*, 12, 981-6.
- Nubler-Jung, K. & V. Grau (1987) Pattern control in insect segments: superimposed features of the pattern may be subject to different control mechanisms. *Roux Arch Dev Biol*, 196, 290-294.
- Ohata, S. & A. Alvarez-Buylla (2016) Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends Neurosci*, 39, 543-51.
- Ohata, S., J. Nakatani, V. Herranz-Perez, J. Cheng, H. Belinson, T. Inubushi, W. D. Snider, J. M. Garcia-Verdugo, A. Wynshaw-Boris & A. Alvarez-Buylla (2014) Loss of Dishevelleds disrupts planar polarity in ependymal motile cilia and results in hydrocephalus. *Neuron*, 83, 558-71.
- Olivier, M., M. Hollstein & P. Hainaut (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001008.
- Ollmann, M., L. M. Young, C. J. Di Como, F. Karim, M. Belvin, S. Robertson, K. Whittaker, M. Demsky, W. W. Fisher, A. Buchman, G. Duyk, L. Friedman, C. Prives & C. Kopczynski (2000) Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*, 101, 91-101.
- Olofsson, J., K. A. Sharp, M. Matis, B. Cho & J. D. Axelrod (2014) Prickle/spiny-legs isoforms control the polarity of the apical microtubule network in planar cell polarity. *Development*, 141, 2866-74.
- Osada, M., M. Ohba, C. Kawahara, C. Ishioka, R. Kanamaru, I. Katoh, Y. Ikawa, Y. Nimura, A. Nakagawara, M. Obinata & S. Ikawa (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, 4, 839-43.
- Ozaki, T., M. Naka, N. Takada, M. Tada, S. Sakiyama & A. Nakagawara (1999) Deletion of the COOH-terminal region of p73alpha enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res*, 59, 5902-7.
- Paez-Gonzalez, P., K. Abdi, D. Luciano, Y. Liu, M. Soriano-Navarro, E. Rawlins, V. Bennett, J. M. Garcia-Verdugo & C. T. Kuo (2011) Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron*, 71, 61-75.
- Pan, J., Y. You, T. Huang & S. L. Brody (2007) RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J Cell Sci*, 120, 1868-76.
- Park, T. J., S. L. Haigo & J. B. Wallingford (2006) Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat Genet*, 38, 303-11.

- Park, T. J., B. J. Mitchell, P. B. Abitua, C. Kintner & J. B. Wallingford (2008) Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet*, 40, 871-9.
- Pastrana, E., L. C. Cheng & F. Doetsch (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6387-92.
- Pedersen, L. B. & J. L. Rosenbaum (2008) Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr Top Dev Biol*, 85, 23-61.
- Pedersen, L. B., J. M. Schroder, P. Satir & S. T. Christensen (2012) The ciliary cytoskeleton. *Compr Physiol*, 2, 779-803.
- Pefani, D. E., M. Dimaki, M. Spella, N. Karantzelis, E. Mitsiki, C. Kyrousi, I. E. Symeonidou, A. Perrakis, S. Taraviras & Z. Lygerou (2011) Idas, a novel phylogenetically conserved geminin-related protein, binds to geminin and is required for cell cycle progression. *J Biol Chem*, 286, 23234-46.
- Peters, U. R., M. P. Tschan, K. A. Kreuzer, G. Baskaynak, U. Lass, A. Tobler, M. F. Fey & C. A. Schmidt (1999) Distinct expression patterns of the p53-homologue p73 in malignant and normal hematopoiesis assessed by a novel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay and protein analysis. *Cancer Res*, 59, 4233-6.
- Pflaum, J., S. Schlosser & M. Muller (2014) p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*, 4, 285.
- Piel, M., P. Meyer, A. Khodjakov, C. L. Rieder & M. Bornens (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol*, 149, 317-30.
- Piperno, G., E. Siuda, S. Henderson, M. Segil, H. Vaananen & M. Sassaroli (1998) Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol*, 143, 1591-601.
- Ponassi, M., T. S. Jacques, L. Ciani & C. French Constant (1999) Expression of the rat homologue of the Drosophila fat tumour suppressor gene. *Mech Dev*, 80, 207-12.
- Poulaki, V. (2011) Angiogenesis assays. *Methods Mol Biol*, 731, 345-58.
- Pozniak, C. D., F. Barnabe-Heider, V. V. Rymar, A. F. Lee, A. F. Sadikot & F. D. Miller (2002) p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J Neurosci*, 22, 9800-9.
- Pozniak, C. D., S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D. R. Kaplan & F. D. Miller (2000) An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*, 289, 304-6.
- Qian, D., C. Jones, A. Rzadzinska, S. Mark, X. Zhang, K. P. Steel, X. Dai & P. Chen (2007) Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol*, 306, 121-33.
- Ramirez-Castillejo, C., F. Sanchez-Sanchez, C. Andreu-Agullo, S. R. Ferron, J. D. Aroca-Aguilar, P. Sanchez, H. Mira, J. Escribano & I. Farinas (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, 9, 331-9.
- Raponi, E., F. Agenes, C. Delphin, N. Assard, J. Baudier, C. Legraverend & J. C. Deloulme (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55, 165-77.
- Ravni, A., F. Tissir & A. M. Goffinet (2010) DeltaNp73 transcription factors modulate cell survival and tumor development. *Cell Cycle*, 9, 1523-7.
- Rawls, A. S., J. B. Guinto & T. Wolff (2002) The cadherins fat and dachsous regulate dorsal/ventral signaling in the Drosophila eye. *Curr Biol*, 12, 1021-6.
- Riley, T., E. Sontag, P. Chen & A. Levine (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 402-12.
- Roca, C. & R. H. Adams (2007) Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*, 21, 2511-24.

- Rock, R., S. Schrauth & M. Gessler (2005) Expression of mouse *dchs1*, *fjx1*, and *fat-j* suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in *Drosophila*. *Dev Dyn*, 234, 747-55.
- Rodriguez, E. M., M. M. Guerra, K. Vio, C. Gonzalez, A. Ortloff, L. F. Batiz, S. Rodriguez, M. C. Jara, R. I. Munoz, E. Ortega, J. Jaque, F. Guerra, D. A. Sival, W. F. den Dunnen, A. J. Jimenez, M. D. Dominguez-Pinos, J. M. Perez-Figares, J. P. McAllister & C. Johanson (2012) A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res*, 45, 231-42.
- Rogers, K. W. & A. F. Schier (2011) Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 377-407.
- Rossi, M., V. De Laurenzi, E. Munarriz, D. R. Green, Y. C. Liu, K. H. Vousden, G. Cesareni & G. Melino (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo j*, 24, 836-48.
- Roszko, I., A. Sawada & L. Solnica-Krezel (2009) Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 986-97.
- Rozbicki, E., M. Chuai, A. I. Karjalainen, F. Song, H. M. Sang, R. Martin, H. J. Knolker, M. P. MacDonald & C. J. Weijer (2015) Myosin-II-mediated cell shape changes and cell intercalation contribute to primitive streak formation. *Nat Cell Biol*, 17, 397-408.
- Rufini, A., M. Agostini, F. Grespi, R. Tomasini, B. S. Sayan, M. V. Niklison-Chirou, F. Conforti, T. Velletri, A. Mastino, T. W. Mak, G. Melino & R. A. Knight (2011) p73 in Cancer. *Genes Cancer*, 2, 491-502.
- Rutkowski, R., K. Hofmann & A. Gartner (2010) Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001131.
- Sabapathy, K. (2015) p73: a Positive or Negative Regulator of Angiogenesis, or Both? *Mol Cell Biol*, 36, 848-54.
- Sagner, A. & J. Briscoe (2017) Morphogen interpretation: concentration, time, competence, and signaling dynamics. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 6.
- Sah, V. P., L. D. Attardi, G. J. Mulligan, B. O. Williams, R. T. Bronson & T. Jacks (1995) A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet*, 10, 175-80.
- Sakamoto, M., H. Hirata, T. Ohtsuka, Y. Bessho & R. Kageyama (2003) The basic helix-loop-helix genes *Hes1/Hey1* and *Hes2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *J Biol Chem*, 278, 44808-15.
- Sarnat, H. B., H. Z. Darwish, P. G. Barth, C. L. Trevenen, A. Pinto, S. Kotagal, K. Shishikura, M. Osawa & R. Korobkin (1993) Ependymal abnormalities in lissencephaly/pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52, 525-41.
- Sawamoto, K., H. Wichterle, O. Gonzalez-Perez, J. A. Cholfin, M. Yamada, N. Spassky, N. S. Murcia, J. M. Garcia-Verdugo, O. Marin, J. L. Rubenstein, M. Tessier-Lavigne, H. Okano & A. Alvarez-Buylla (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311, 629-32.
- Saxena, A., B. Denholm, S. Bunt, M. Bischoff, K. VijayRaghavan & H. Skaer (2014) Epidermal growth factor signalling controls myosin II planar polarity to orchestrate convergent extension movements during *Drosophila* tubulogenesis. *PLoS Biol*, 12, e1002013.
- Sayan, B. S., A. L. Yang, F. Conforti, P. Tucci, M. C. Piro, G. J. Browne, M. Agostini, S. Bernardini, R. A. Knight, T. W. Mak & G. Melino (2010) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12877-82.
- Schmale, H. & C. Bamberger (1997) A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene*, 15, 1363-7.
- Schoenherr, C. J. & D. J. Anderson (1995) Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 566-71.

- Schulte, G. & V. Bryja (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 518-25.
- Schwamborn, J. C., E. Berezikov & J. A. Knoblich (2009) The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, 136, 913-25.
- Scian, M. J., E. H. Carchman, L. Mohanraj, K. E. Stagliano, M. A. Anderson, D. Deb, B. M. Crane, T. Kiyono, B. Windle, S. P. Deb & S. Deb (2008) Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene*, 27, 2583-93.
- Sepich, D. S., M. Usmani, S. Pawlicki & L. Solnica-Krezel (2011) Wnt/PCP signaling controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements. *Development*, 138, 543-52.
- Sharp, K. A. & J. D. Axelrod (2016) Prickle isoforms control the direction of tissue polarity by microtubule independent and dependent mechanisms. *Biol Open*, 5, 229-36.
- Shen, Q., R. R. Rigor, C. D. Pivetti, M. H. Wu & S. Y. Yuan (2010) Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res*, 87, 272-80.
- Shewan, A. M., M. Maddugoda, A. Kraemer, S. J. Stehbens, S. Verma, E. M. Kovacs & A. S. Yap (2005) Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*, 16, 4531-42.
- Shimada, Y., T. Usui, S. Yanagawa, M. Takeichi & T. Uemura (2001) Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Curr Biol*, 11, 859-63.
- Shimada, Y., S. Yonemura, H. Ohkura, D. Strutt & T. Uemura (2006) Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in Drosophila wing epithelium. *Dev Cell*, 10, 209-22.
- Simon, M. A., A. Xu, H. O. Ishikawa & K. D. Irvine (2010) Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Curr Biol*, 20, 811-7.
- Simons, M. & M. Mlodzik (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet*, 42, 517-40.
- Soldevilla, B., R. Diaz, J. Silva, Y. Campos-Martin, C. Munoz, V. Garcia, J. M. Garcia, C. Pena, M. Herrera, M. Rodriguez, I. Gomez, N. Mohamed, M. M. Marques, F. Bonilla & G. Dominguez (2011) Prognostic impact of DeltaTAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients. *Clin Cancer Res*, 17, 6029-39.
- Soldevilla, B., M. Rodriguez, C. San Millan, V. Garcia, R. Fernandez-Perianez, B. Gil-Calderon, P. Martin, A. Garcia-Grande, J. Silva, F. Bonilla & G. Dominguez (2014) Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet*, 23, 467-78.
- Sorokin, S. (1962) Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 15, 363-77.
- Sorokin, S. P. (1968) Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conf*, 11, 213-6.
- Spandorfer, S. D., O. K. Davis, L. I. Barmat, P. H. Chung & Z. Rosenwaks (2004) Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil Steril*, 81, 1265-9.
- Spassky, N., F. T. Merkle, N. Flames, A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*, 25, 10-8.
- Spassky, N. & A. Meunier (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 423-436.
- Spike, B. T. & G. M. Wahl (2011) p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer*, 2, 404-19.
- Stantic, M., H. A. Sakil, H. Zirath, T. Fang, G. Sanz, A. Fernandez-Woodbridge, A. Marin, E. Susanto, T. W. Mak, M. Arsenian Henriksson & M. T. Wilhelm (2015) TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1alpha activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 220-5.

- Stiewe, T. & B. M. Putzer (2002) Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*, 9, 237-45.
- Stiewe, T., S. Tuve, M. Peter, A. Tannapfel, A. H. Elmaagacli & B. M. Putzer (2004) Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, 10, 626-33.
- Strong, L. C. & W. F. Hollander (1949) HEREDITARY LOOP-TAIL IN THE HOUSE MOUSE Accompanied by Imperforate Vagina and with Lethal Craniorachischisis When Homozygous. *Journal of Heredity*, 40, 329-334.
- Struhl, G., J. Casal & P. A. Lawrence (2012) Dissecting the molecular bridges that mediate the function of Frizzled in planar cell polarity. *Development*, 139, 3665-74.
- Strutt, D. (2009) Gradients and the specification of planar polarity in the insect cuticle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a000489.
- Strutt, H., E. Searle, V. Thomas-MacArthur, R. Brookfield & D. Strutt (2013) A Cul-3-BTB ubiquitylation pathway regulates junctional levels and asymmetry of core planar polarity proteins. *Development*, 140, 1693-702.
- Strutt, H. & D. Strutt (2005) Long-range coordination of planar polarity in *Drosophila*. *Bioessays*, 27, 1218-27.
- (2008) Differential stability of flamingo protein complexes underlies the establishment of planar polarity. *Curr Biol*, 18, 1555-64.
- (2009) Asymmetric localisation of planar polarity proteins: Mechanisms and consequences. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 957-63.
- Suh, E. K., A. Yang, A. Kettenbach, C. Bamberger, A. H. Michaelis, Z. Zhu, J. A. Elvin, R. T. Bronson, C. P. Crum & F. McKeon (2006) p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature*, 444, 624-8.
- Sulik, K., D. B. Dehart, T. Iangaki, J. L. Carson, T. Vrablic, K. Gesteland & G. C. Schoenwolf (1994) Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn*, 201, 260-78.
- Sun, X. F. (2002) p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 8, 165-70.
- Sunahara, M., S. Ichimiya, Y. Nimura, N. Takada, S. Sakiyama, Y. Sato, S. Todo, W. Adachi, J. Amano & A. Nakagawara (1998) Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol*, 13, 319-23.
- Talos, F., A. Abraham, A. V. Vaseva, L. Holembowski, S. E. Tsirka, A. Scheel, D. Bode, M. Döbelstein, W. Bruck & U. M. Moll (2010) p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell Death Differ*, 17, 1816-29.
- Tanaka, Y., K. Ota, M. Kameoka, A. Itaya & K. Yoshihara (2006) Up-regulation of NFκB-responsive gene expression by ΔNp73α in p53 null cells. *Exp Cell Res*, 312, 1254-64.
- Tanegashima, K., H. Zhao & I. B. Dawid (2008) WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *Embo j*, 27, 606-17.
- Tanos, B. E., H. J. Yang, R. Soni, W. J. Wang, F. P. Macaluso, J. M. Asara & M. F. Tso (2013) Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev*, 27, 163-8.
- Tanoue, T. & M. Takeichi (2005) New insights into Fat cadherins. *J Cell Sci*, 118, 2347-53.
- Thanos, C. D. & J. U. Bowie (1999) p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci*, 8, 1708-10.
- Thomas, C. & D. Strutt (2012) The roles of the cadherins Fat and Dachshous in planar polarity specification in *Drosophila*. *Dev Dyn*, 241, 27-39.
- Tissir, F. & A. M. Goffinet (2013) Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat Rev Neurosci*, 14, 525-35.
- Tissir, F., Y. Qu, M. Montcouquiol, L. Zhou, K. Komatsu, D. Shi, T. Fujimori, J. Labeau, D. Tyteca, P. Courtoy, Y. Poumay, T. Uemura & A. M. Goffinet (2010) Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci*, 13, 700-7.



- Tissir, F., A. Ravni, Y. Achouri, D. Riethmacher, G. Meyer & A. M. Goffinet (2009) DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16871-6.
- Tokuchi, Y., T. Hashimoto, Y. Kobayashi, M. Hayashi, K. Nishida, S. Hayashi, K. Imai, K. Nakachi, Y. Ishikawa, K. Nakagawa, Y. Kawakami & E. Tsuchiya (1999) The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *Br J Cancer*, 80, 1623-9.
- Tomasini, R., K. Tsuchihara, M. Wilhelm, M. Fujitani, A. Rufini, C. C. Cheung, F. Khan, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M. S. Tsao, J. L. Iovanna, J. Squire, I. Jurisica, D. Kaplan, G. Melino, A. Jurisicova & T. W. Mak (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*, 22, 2677-91.
- Tramontin, A. D., J. M. Garcia-Verdugo, D. A. Lim & A. Alvarez-Buylla (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*, 13, 580-7.
- Tree, D. R., D. Ma & J. D. Axelrod (2002) A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin Cell Dev Biol*, 13, 217-24.
- Tropepe, V., C. G. Craig, C. M. Morshead & D. van der Kooy (1997) Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci*, 17, 7850-9.
- Tschan, M. P., T. J. Grob, U. R. Peters, V. D. Laurenzi, B. Huegeli, K. A. Kreuzer, C. A. Schmidt, G. Melino, M. F. Fey, A. Tobler & J. F. Cajot (2000) Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 62-5.
- Tullio, A. N., P. C. Bridgman, N. J. Tresser, C. C. Chan, M. A. Conti, R. S. Adelstein & Y. Hara (2001) Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol*, 433, 62-74.
- Uemura, A., S. Kusuhara, H. Katsuta & S. Nishikawa (2006) Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Exp Cell Res*, 312, 676-83.
- Usui, T., Y. Shima, Y. Shimada, S. Hirano, R. W. Burgess, T. L. Schwarz, M. Takeichi & T. Uemura (1999) Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell*, 98, 585-95.
- van Amerongen, R. & R. Nusse (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136, 3205-14.
- van Boxtel, A. L., J. E. Chesebro, C. Heliot, M. C. Ramel, R. K. Stone & C. S. Hill (2015) A Temporal Window for Signal Activation Dictates the Dimensions of a Nodal Signaling Domain. *Dev Cell*, 35, 175-85.
- Vardarajan, B., D. Vergote, F. Tissir, M. Logue, J. Yang, N. Daude, K. Ando, E. Rogava, J. Lee, R. Cheng, J. P. Brion, M. Ghani, B. Shi, C. T. Baldwin, S. Kar, R. Mayeux, P. Fraser, A. M. Goffinet, P. S. George-Hyslop, L. A. Farrer & D. Westaway (2013) Role of p73 in Alzheimer disease: lack of association in mouse models or in human cohorts. *Mol Neurodegener*, 8, 10.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R. S. Adelstein & A. R. Horwitz (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 778-90.
- Vicente-Manzanares, M., J. Zareno, L. Whitmore, C. K. Choi & A. F. Horwitz (2007) Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol*, 176, 573-80.
- Vinson, C. R. & P. N. Adler (1987) Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature*, 329, 549-51.
- Vladar, E. K. & J. D. Axelrod (2008) Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends Cell Biol*, 18, 517-20.
- Vladar, E. K., J. V. Nayak, C. E. Milla & J. D. Axelrod (2016) Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. *JCI Insight*, 1.

- Vossio, S., E. Palescandolo, N. Pediconi, F. Moretti, C. Balsano, M. Levrero & A. Costanzo (2002) DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene*, 21, 3796-803.
- Vousden, K. H. & K. M. Ryan (2009) p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, 9, 691-700.
- Wallingford, J. B. (2012) Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 627-53.
- Wallingford, J. B. & R. Habas (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, 132, 4421-36.
- Wallingford, J. B. & R. M. Harland (2002) Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development*, 129, 5815-25.
- Walsh, G. S., N. Orike, D. R. Kaplan & F. D. Miller (2004) The invulnerability of adult neurons: a critical role for p73. *J Neurosci*, 24, 9638-47.
- Wang, Y. & J. Nathans (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*, 134, 647-58.
- Wansleben, C. & F. Meijlink (2011) The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev Dyn*, 240, 616-26.
- Werner, M. E., P. Hwang, F. Huisman, P. Taborek, C. C. Yu & B. J. Mitchell (2011) Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *J Cell Biol*, 195, 19-26.
- Werner, M. E. & B. J. Mitchell (2012) Planar cell polarity: microtubules make the connection with cilia. *Curr Biol*, 22, R1001-4.
- Wetzel, M. K., S. Naska, C. L. Laliberte, V. V. Rymar, M. Fujitani, J. A. Biernaskie, C. J. Cole, J. P. Lerch, S. Spring, S. H. Wang, P. W. Frankland, R. M. Henkelman, S. A. Josselyn, A. F. Sadikot, F. D. Miller & D. R. Kaplan (2008) p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease. *Neuron*, 59, 708-21.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1940) The Determination of Characters at Metamorphosis in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*, 17, 201-223.
- Wilhelm, M. T., A. Rufini, M. K. Wetzel, K. Tsuchihara, S. Inoue, R. Tomasini, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M. Arsenian-Henriksson, G. Melino, D. R. Kaplan, F. D. Miller & T. W. Mak (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*, 24, 549-60.
- Wong, L. L. & P. N. Adler (1993) Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol*, 123, 209-21.
- Worthington, W. C., Jr. & R. S. Cathcart, 3rd (1963) Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. *Science*, 139, 221-2.
- Wu, J. & M. Mlodzik (2008) The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev Cell*, 15, 462-9.
- Xiao, Q., Z. Chen, X. Jin, R. Mao & Z. Chen (2017) The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomed Pharmacother*, 93, 359-369.
- Yamamoto, N., T. Okano, X. Ma, R. S. Adelstein & M. W. Kelley (2009) Myosin II regulates extension, growth and patterning in the mammalian cochlear duct. *Development*, 136, 1977-86.
- Yang, A. & F. McKeon (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 199-207.
- Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R. T. Bronson, C. Tabin, A. Sharpe, D. Caput, C. Crum & F. McKeon (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398, 714-8.
- Yang, A., N. Walker, R. Bronson, M. Kaghad, M. Oosterwegel, J. Bonnin, C. Vagner, H. Bonnet, P. Dikkes, A. Sharpe, F. McKeon & D. Caput (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404, 99-103.

- Yates, L. L., J. Papakrivopoulou, D. A. Long, P. Goggolidou, J. O. Connolly, A. S. Woolf & C. H. Dean (2010) The planar cell polarity gene Vangl2 is required for mammalian kidney-branching morphogenesis and glomerular maturation. *Hum Mol Genet*, 19, 4663-76.
- Ye, D. & T. Y. Ma (2008) Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor-alpha-induced regulation of myosin light chain kinase gene activity. *J Cell Mol Med*, 12, 1331-46.
- Yoon, M. K., J. H. Ha, M. S. Lee & S. W. Chi (2015) Structure and apoptotic function of p73. *BMB Rep*, 48, 81-90.
- Yoshida, Y. & S. Yamanaka (2010) Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation*, 122, 80-7.
- Yu, D., A. M. Marchiando, C. R. Weber, D. R. Raleigh, Y. Wang, L. Shen & J. R. Turner (2010) MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8237-41.
- Yurugi-Kobayashi, T., H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S. Nishikawa & K. Nakao (2003) Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood*, 101, 2675-8.
- Zaika, A. I. & W. El-Rifai (2006) The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. *Cell Death Differ*, 13, 935-40.
- Zaika, A. I., S. Kovalev, N. D. Marchenko & U. M. Moll (1999) Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res*, 59, 3257-63.
- Zaika, A. I., N. Slade, S. H. Erster, C. Sansome, T. W. Joseph, M. Pearl, E. Chalas & U. M. Moll (2002) DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*, 196, 765-80.
- Zoric, A., A. Horvat & N. Slade (2013) Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis*, 34, 522-9.