

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Implicación de la generación y reparación de roturas del DNA en el
desarrollo de la retina del ratón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noemí Lourdes Álvarez Lindo

Directores
Teresa Suárez González
Flora de Pablo Dávila

Madrid, 2016

IMPLICACIÓN DE LA GENERACIÓN Y REPARACIÓN DE ROTURAS DEL DNA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN.

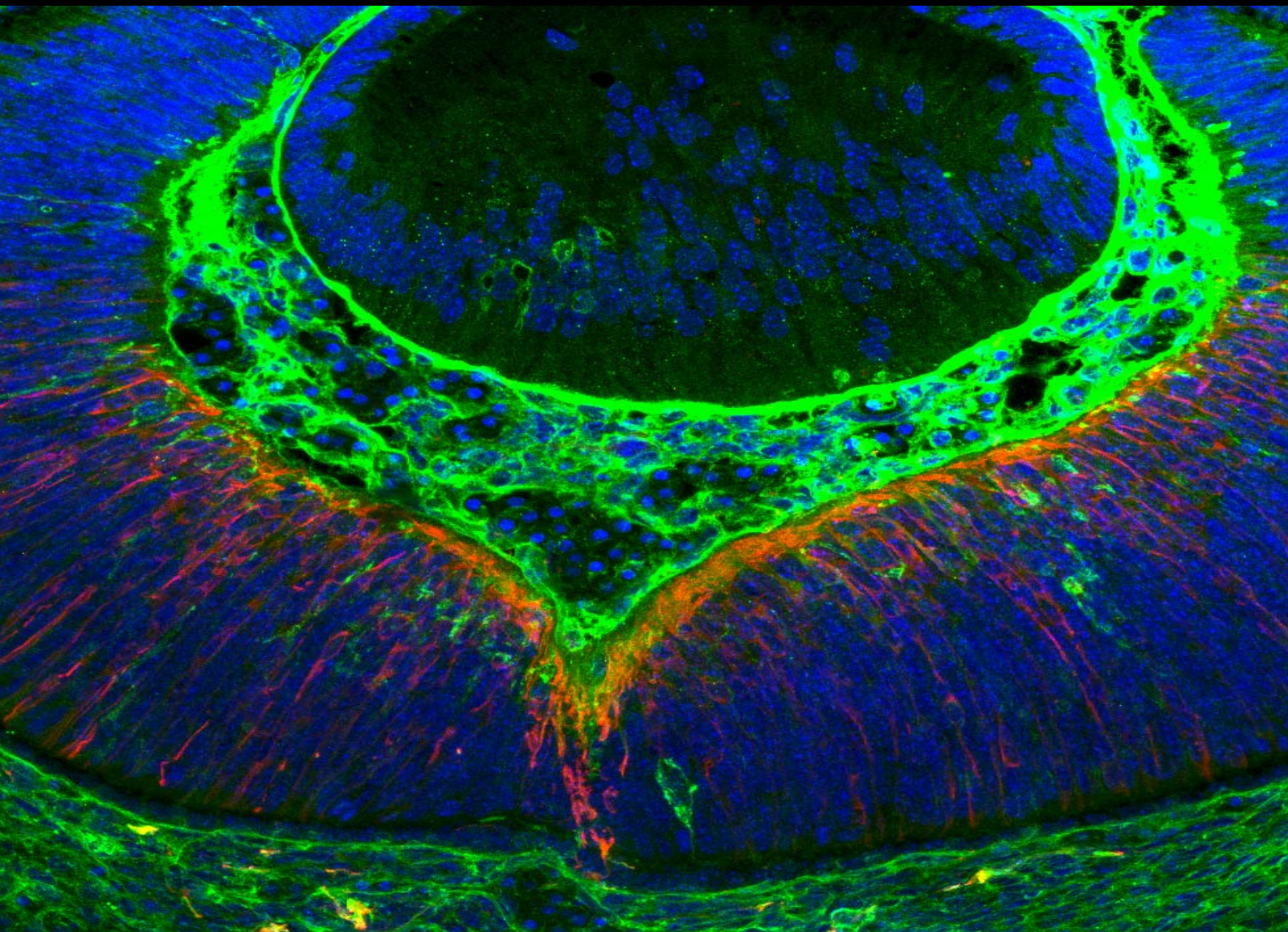
NOEMÍ L. ÁLVAREZ LINDO

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS.

DIRECCIÓN: TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ
Y FLORA DE PABLO DÁVILA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

IMPLICACIÓN DE LA GENERACIÓN Y REPARACIÓN
DE ROTURAS DEL DNA EN EL DESARROLLO
DE LA RETINA DE RATON.

Vº Bº de la tutora de la Tesis,

MARIA J. NAVARRO

Vº Bº de las directoras de la Tesis,

TERESA SUÁREZ

FLORA DE PABLO



Memoria presentada por Noemí L. Álvarez Lindo
para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular

A mis padres, y a mi abuela.

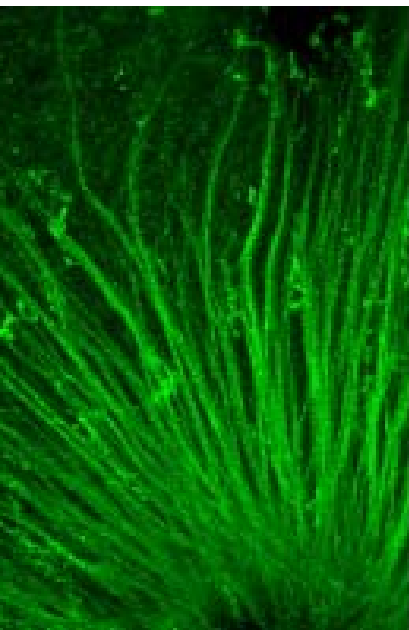
“Son los problemas sin resolver, no los resueltos, los que mantienen activa la mente”.

Erwin Guido Kolbenheyer.

...la curiosidad no mató al gato, le permitió vivir muchas vidas.

C.

AGRADECIMIENTOS.



AGRADECIMIENTOS.

Una Tesis Doctoral es un logro gracias al apoyo de muchas personas y, mirando hacia atrás, solo quiero dejar aquí constancia de las que más han contribuido a que sea hoy posible su defensa, y agradeceré públicamente. El proyecto fue impulsado por el Dr. Enrique J. de la Rosa, que inició los estudios de "roturas del DNA" cuando este tema no se consideraba importante en el desarrollo; gracias por la oportunidad de participar en una aventura investigadora apasionante, por ayudarme a iniciarla, por todos los consejos y por compartir conmigo tu amplísimo conocimiento. Haber podido concluir el estudio en pocos años se lo debo al tesón y a las oportunidades brindadas por las Dras. Flora de Pablo y Teresa Suárez, cuyo estímulo, guía, planificación, apoyo, sentido crítico y eficaz supervisión han sido fundamentales. Gracias, Flora, por confiar en mí e impedirme desertar.

Gracias a todos los que han colaborado en este proyecto, a los consejos de las Dras. Catalina Hernández y Patricia Boya, y a la formación, las técnicas, y los ratones de los Dres. Pedro de la Villa, Luis Blanco, Antonio Bernad, Concepción Lillo y José Alberto García, tan necesarios para este estudio.

Muchos miembros actuales y pasados del laboratorio 3D han sido también esenciales para desarrollar con éxito este trabajo. Comenzando por la Dra. Jimena Baleriola, primera en plantear la necesidad de estudiar estos mutantes, gran investigadora y mejor persona, a la que tengo que agradecer el apoyo, abrazos y sus ideas, siempre brillantes. A Ana Arroba, mi primera mentora en el CIB, y a Chus ("mami") les debo el haberme animado a hacer la tesis. Gracias a ambas por enseñarme, por ser como sois, por vuestra energía y entusiasmo por la ciencia, por vuestro sentido práctico, por los cafés, por los trucos, por las risas y por compartir los momentos difíciles, por haber estado presentes como nadie a lo largo de todo el camino, por ser amigas de verdad. Os echo en falta a las dos a diario, sois insustituibles. A Patri V, que podría haber sido mi tercera directora, millones de gracias por ayudarme a organizar la tesis, por tus sonrisas y tus canturreos de media tarde, tu tesón, tu altruismo y tus consejos, por tus correcciones, por ayudarme a pensar, y a reír, porque nadie puede sentirse solo si te tiene cerca. A Jose, por un tiempo mi tercera y cuarta manos, gracias por la confianza, por la ayuda en las inmunos, las colonias, la informática, las crisis, las llamadas al desayuno... te voy a echar de menos. A la pollito/lechal (Bea) y a mis compis del 105 (Ane, Marisa = ^.^ =, y mi joven ex-padawan, María), gracias por vuestro optimismo y alegría contagiosas, por esas risas que se escuchan por todo el pasillo y por todos los ratos vividos, es un gustazo trabajar cerca vuestra. A Ana Robles, gracias por tu confianza y consejos, por tener siempre un punto de vista fresco y razonado, por tener los pies en la tierra, por el apoyo a todos los niveles; te mereces toda la suerte del mundo. A Alberto y Josechu, gracias por todo lo que he aprendido de vosotros a nivel científico y humano, que es mucho. Y por pedirme los cafés, claro. Gracias, Tany, por tu optimismo, por los millones de cajas de puntas, los descuentos en camisetas frikis, por preocuparte como una madre, y porque siempre se puede contar contigo. A los miembros de ProRetina y a todos los miembros y ex-miembros de nuestro grupo (destacando a los ya mencionados y a Noe Blanco (infiltrada), Marchena, Esther, Carol, Violeta, M^a Lirón, Ruth, Alonso, Andrés, Patri, Diana, Kikote, Paula, y las Pin y Pon), junto a los pollos del 147 (Lorena, Sergio, Ana, Esther, Raquel, Elena, Lucía, Nata, Marian) y a los Vidales, gracias por el buen rollito, los protocolos, los congresos, las fiestas de primavera (¡la que ganamos!), y por todas las discusiones de ciencia, política, y personajes varios; conocerlos es lo más enriquecedor que me llevo de este trabajo.

Tengo mucho que agradecer a todos los miembros de los servicios del centro, por su labor imprescindible. Debo destacar al personal de Cromatografía de gases (Ali, y Jose) y de proteómica (Vivi, Paco, María, Tamar y Tamara), por ser los primeros en acogerme, por su nivel científico, por los protocolos, por toda la ayuda. Gracias a los grupos de confocal (Mayte, Oscar, Raúl, Bego, Lorena, Noemí y Gema) y del animalario (Manolo, María, Andrés, Estheres, Dani, Carlos, Marta, Silvias, Charo) por el compañerismo, la alegría, el asesoramiento y la gestión de colonias. Y al personal de limpieza (Gloria, Gise, Carmen, Antonia, Tere, Cris,..) por limpiar a pesar de los recortes, por amenizar las pausas, y por la degustación de tartas. Al personal de conserjería (Fernando, Carmen, Luci) y de seguridad (Antonio, Jose M^a, Florencio), gracias por vuestro trabajo, por preocuparos tanto de los que

AGRADECIMIENTOS

nos quedamos tarde... ¡y por evitar que me quede encerrada en el CIB y sin coche a altas horas de la madrugada!

Gracias también a mis amigos de siempre: Marta (por los planes), Edu, Jaba, Catu, Nati, Mike, Rafa, Eva, Liza, Sandra, Samu, por vuestra paciencia y por estar ahí siempre, para todo lo bueno y lo malo.

A toda mi familia (incluyendo a mis gordis), a mis suegros, a mi cuñada favorita, y, por encima de todo, a mis padres, a mi hermana y a mi abuela: Os lo debo todo. Gracias por quererme, aguantarme, darme ánimos, por hacerme llegar hasta aquí. Gran parte de lo que soy, y de esta tesis, es obra vuestra.

Y a Iván, mi pilar base, mil gracias por hacerme feliz, por estar a mi lado todos estos años, por hacerme ver las cosas en perspectiva, por buscar soluciones, por estar siempre pendiente, por luchar por mí, por todo el apoyo y amor incondicional, y por todo el futuro que nos espera.



ÍNDICE

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.	21
<hr/>	
SYNOPSIS.	27
SINOPSIS.	29
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN.	33
<hr/>	
1 - VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO.	33
Mecanismos que podrían generar variabilidad en el DNA neural.	36
RECOMBINASAS: RAG-1 Y RAG-2.	36
HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA.	37
SITIOS FRÁGILES DEL GENOMA.	38
RETROTRANSPOSICIÓN: LINE-1.	38
2- REPARACIÓN DE ROTURAS EN EL DNA.	40
Ruta NHEJ clásica de reparación de roturas del DNA.	42
. DNAPKcs.	42
DNA POLIMERASAS IMPLICADAS EN NHEJ. DNA POLIMERASA μ .	44
3 - LA RETINA.	46
Desarrollo de la retina murina.	48
DIFERENCIACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES DE LA RETINA.	48
Diferenciación de las RGCs y emisión del nervio óptico.	50
MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL: IgCAMs.	51
Funciones de las células no neuronales en el desarrollo de la retina.	52
MICROGLÍA.	52
ASTROCITOS.	52
4 - MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y NEUROGÉNESIS.	53
Muerte celular programada en el desarrollo del SNC.	53
MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA	55
.	55
Muerte neural temprana y roturas del DNA.	57
<hr/>	
2. OBJETIVOS.	62
<hr/>	

3. MATERIALES Y MÉTODOS.	66
<hr/>	
1-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	66
Cepas y colonias de ratones utilizadas.	67
Genotipado de animales.	68
2-OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE TEJIDOS.	70
Recogida de tejidos para extracción de DNA y <i>Western blot</i> .	70
TEJIDOS EMBRIONARIOS.	70
TEJIDOS POSTNATALES.	71
Montaje de retinas en plano.	71
RETINA EMBRIONARIA.	71
RETINA ADULTA.	71
Crio-sección de tejidos.	72
OJO EMBRIONARIO.	72
OJO ADULTO.	72
3-TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO.	73
PCR cuantitativa a tiempo real.	73
4-CULTIVOS CELULARES.	74
Cultivos primarios de células disociadas de la retina.	74
5-DETECCIÓN DE LA MUERTE CELULAR	74
Técnica TUNEL.	74
6-TÉCNICAS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.	75
Inmunodetección de proteínas en células y tejidos.	75
INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉLULAS DISOCIADAS DE TEJIDOS.	75
INMUNOHISTOQUÍMICA EN RETINAS MONTADAS EN PLANO.	76
INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES DE TEJIDOS.	77
TINCIÓN CON LECTINA DE TOMATE.	78
Inmunodetección de proteínas en membrana.	78
WESTERN BLOT.	78
INMUNODETECCIÓN DE ISOFORMAS PROTÉICAS.	79
EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS.	80
7-PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.	81
Métodos de cuantificación manual.	81
CONTAJE DE CÉLULAS SOBRE IMAGEN.	81
MEDICIÓN DE LONGITUDES DE NEURITAS.	81
ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA.	81
Métodos de detección automática.	82
DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE BORDES DE SUPERFICIES.	82
CUANTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE ÁREAS COMPLEJAS.	83
CUANTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA.	83
8-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	85
9-SOLUCIONES Y EQUIPOS.	86

4. RESULTADOS.	90
<hr/>	
1 - LA VÍA NHEJ EN LA RETINA EN DESARROLLO: PAPEL EN LA VIABILIDAD CELULAR.	90
Actividad de la DNA Polimerasa μ en la retina embrionaria.	90
Roturas del DNA en ausencia de NHEJ: ratones <i>SCID</i> y <i>pol</i> μ ^{-/-} .	91
Muerte celular programada en mutantes de la vía NHEJ: ratones <i>SCID</i> y <i>pol</i> μ ^{-/-} .	93
2- ROTURAS DEL DNA Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN AUSENCIA DE RAG-2.	95
3 - NEUROGÉNESIS DE LA RETINA EN AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS DNA-PK, POL μ Y RAG-2.	97
Muerte neural en ausencia de NHEJ: evaluación en ratones <i>SCID</i> , <i>pol</i> μ ^{-/-} y <i>rag</i> 2 ^{-/-} .	97
Muerte celular en las células ganglionares en ausencia de la DNA polimerasa μ .	99
4 - NAVEGACIÓN AXONAL EN LA RETINA DE MUTANTES DEFICIENTES EN DNA-PK, POL μ Y RAG-2.	101
Trayectoria axonal <i>in vivo</i> en ausencia de RAG-2 Y NHEJ: evaluación en los mutantes <i>SCID</i> , <i>pol</i> μ ^{-/-} y <i>rag</i> 2 ^{-/-} .	101
Emisión de neuritas <i>in vitro</i> en ausencia de RAG-2 Y NHEJ: evaluación en los modelos <i>SCID</i> , <i>pol</i> μ ^{-/-} y <i>rag</i> 2 ^{-/-} .	102
Distribución de las RGCs en ausencia de la DNA polimerasa μ .	106
5 - DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE GUÍA AXONAL L1CAM y BRAVO EN AUSENCIA DE DNA-PK, POL μ Y RAG-2.	107
Distribución de las proteínas de guía axonal L1CAM Y BRAVO: evaluación en los ratones <i>SCID</i> , <i>pol</i> μ ^{-/-} y <i>rag</i> 2 ^{-/-} .	108
Asociación de las proteínas de guía axonal L1CAM Y BRAVO al frente de diferenciación en ausencia de la DNA polimerasa μ .	110
6 -ALTERACIONES EN LA RETINA ADULTA ASOCIADAS A DEFICIENCIAS EN LA DNA POLIMERASA μ .	112
Estructura de la retina y densidad de RGCs en la retina embrionaria y adulta en ausencia de la DNA polimerasa μ .	112
Distribución de astrocitos en la retina adulta en ausencia de la DNA polimerasa μ .	113
Disposición de los vasos sanguíneos en la retina adulta del ratón <i>pol</i> μ ^{-/-} .	116
7- MICROGLIA EN LA RETINA EN DESARROLLO EN AUSENCIA DE DNA-PK, POL μ Y RAG-2.	117
Evaluación de la microglía por tinción con lectina de tomate.	118
Evaluación de la microglía por marcaje con cd68.	122
8 - TRANSPOSICIÓN DEL ELEMENTO MÓVIL DEL GENOMA LINE-1 EN MUTANTES DEFICIENTES EN RAG-2 y NHEJ.	124
La transposición de LINE-1 se activa en células somáticas de la retina en etapas tardías de su desarrollo.	124
Modulación de la transposición de LINE-1 en la retina por proteínas de generación y reparación de roturas del DNA.	126

5.DISCUSIÓN. 131

1-DNA-PK Y DNA-POLIMERASA μ EN EL DESARROLLO DE LA RETINA MURINA.	131
Acumulación de roturas del DNA y apoptosis neuronal en la retina de ratones <i>polμ^{-/-}</i> y <i>SCID</i> .	131
Desarrollo distrófico de la retina en ausencia de DNA-PK y Pol μ .	133
Alteración de la axonogénesis de las células ganglionares de la retina en ausencia de DNA-PK y de la DNA polimerasa μ .	134
Repercusión de la falta de Pol μ en la retina del animal adulto	136
Roturas del DNA en la retina en desarrollo: consideraciones sobre su origen.	137
2- RAG-2 Y NHEJ EN LA NEUROGÉNESIS DE LA RETINA.	139
Actividad endonucleasa de RAG-1,2 en la retina y posible coordinación con la vía NHEJ.	139
Posibles mecanismos afectados por la falta de RAG-2, DNA-PK y Pol μ .	140
GENERACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA.	140
REGULACIÓN GÉNICA.	143
Maduración de la microglía durante el desarrollo de la retina murina en ausencia de RAG-2, DNA-PK, y Pol μ .	143
3-RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1 EN LA RETINA.	144
RESUMEN DE MECANISMOS.	145

6. CONCLUSIONES. 150

7. REFERENCIAS. 153

8-ANEXOS 175

1- MICROGLIA-MEDIATED IGF-I NEUROPROTECTION IN THE <i>rd10</i> MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA.	175
2- MICROGLIA-MÜLLER GLIA CROSSTALK IN THE <i>rd10</i> MOUSE MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA.	188



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

AID	del inglés, <i>Activation-Induced cytosine Deaminase</i> . Desaminasa activada por citosina.	DDSB	del inglés, <i>DNA Double Strand Breaks</i> . Roturas de DNA que afectan a las dos hebras.
Alu	enzima de restricción de <i>Arthrobacter luteus</i> (elemento retrotransponible).	DNA	del inglés, <i>Deoxy-riboNucleic Acid</i> . Ácido desoxirribonucleico.
APAF 1	del inglés, <i>Apoptosis activating factor 1</i> . Factor inductor de apoptosis, 1.	DNA-PK	del inglés, <i>DNA dependent-Protein Kinase</i> . Proteína quinasa dependiente de DNA.
ATM	del inglés, <i>Ataxia Telangiectasia Mutated gene</i> . Gen mutado en ataxia telangiectasia.	DNA-PKcs	del inglés, <i>DNA-PK catalytic subunit</i> . Subunidad catalítica de DNA-PK.
ATR	del inglés, <i>Ataxia-Telangiectasia and Rad-3 related gene</i> . Gen relacionado con la ataxia telangiectasia y Rad3.	dNTP	del inglés, <i>deoxyNucleotide Tri-Phosphate</i> . Desoxi-nucleótido trifosfato.
Bak	del inglés, Bcl-2 Homologous Antagonist Killer.	DTT	ditiotreitól.
Bax	del inglés, Bcl2 Associated X Protein. Proteína X asociada a Bcl2.	dUTP	del inglés, <i>deoxy-Uridine Triphosphate</i> . Desoxinucleótido trifosfato de uridina.
BDNF	del inglés, <i>Brain Derived Neurothrophic Factor</i> . Factor neurotrófico derivado del cerebro.	E	Estadio del desarrollo embrionario.
BER	del inglés, <i>Base Excisión Repair</i> . Reparación por excisión de bases.	G0	del inglés, <i>Gap 0</i> . Pausa del ciclo celular en células quiescentes.
Brn3	del inglés, <i>Brain 3</i> . Proteína de cerebro, 3, (también conocido como POUF).	G1	del inglés, <i>Gap 1</i> . Pausa del ciclo celular, 1.
BSA	del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> . Albúmina de suero bovino.	G2	del inglés, <i>Gap2</i> . Pausa del ciclo celular, 2.
BGT	BSA-Glicina-Tritón x-100	GFAP	del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> . Proteína fibrilar glial ácida.
CB	del inglés, <i>Coomasie Blue loading buffer</i> . Tampon de carga con azul de Coomasie.	HBSS	del inglés Hanks Balanced Salt Solution, solución salina equilibrada de Hanks.
CFS	del inglés <i>Common Fragile Sites</i> . Sitios frágiles comunes.	hiPSCs	del inglés, <i>Human Induced Pluripotent Cells</i> . Células madre pluripotentes humanas obtenidas por inducción.
CRALBP	del inglés, <i>Cellular RetinAldehyde-Binding Protein</i> . Proteína de unión a retinaldehído celular.	HR	del inglés, <i>Homologous Recombination</i> . Recombinación Homóloga.
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético.	Ig	Inmunoglobulina
EGTA	Etilén glicol Bis amino etilo.	IgCAM	del inglés, <i>Immuno-Globulin like Cell Adhesión Molecule</i> . Molécula de adhesión celular similar a inmunoglobulinas.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol clorhidrato.		

ABREVIATURAS

IGF	del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor</i> . Factor de crecimiento similar a la insulina.	NGF	del inglés, <i>Nerve Growth Factor</i> . Factor de crecimiento nervioso.
ILM	del inglés, <i>Inner Limiting Membrane</i> . Membrana limitante interna.	NHEJ	del inglés, <i>Non Homologous End Joining</i> . Reparación por union de extremos no homólogos.
INL	del inglés, <i>Inner Nuclear Layer</i> . Capa nuclear interna.	Nhej1	del inglés, <i>Non homologous end joining protein 1</i> . Proteína 1 de reparación por union de extremos no homólogos. También llamada XLF o Cernunnos.
IPL	del inglés, <i>Inner Plexiform Layer</i> . Capa plexiforme interna.	NRCAM	del inglés, <i>NgCAM Related Cell Adhesión Molecule</i> . Molécula de adhesión celular relacionada con NgCAM. También conocida como BRAVO.
kD	Kilo-Dalton	OLM	del inglés, <i>Outer Limitant Membrane</i> . Membrana limitante externa.
KU70/80	Proteínas auto antigénicas Ku p70 y p80.	ONL	del inglés, <i>Outer Nuclear Layer</i> . Capa nuclear externa.
L1CAM	del inglés, <i>L1 Cell Adhesión Molecule</i> . Molécula de adhesión celular L1. También conocida como NgCAM.	OPL	del inglés, <i>Outer Plexiform layer</i> . Capa plexiforme externa.
LIG	Ligasa.	OS	del inglés, <i>Photoreceptor outer segment</i> . Segmento externo de los fotorreceptores.
LINE	del inglés, <i>Long Interspersed Nuclear element</i> . Elemento largo nuclear inter-espaado (elemento transponible).	P	Día postnatal.
LTR	del inglés, <i>Long Terminal Repeats</i> . Repeticiones terminales largas.	p/v	peso/volumen.
M	Mitosis	pb	pares de bases.
Mac-1	del inglés, Macrophage antigen-1. Antígeno 1 de macrófagos. Receptor de complemento presente en la microglía y otros fagocitos mononucleados, compuesto por dos integrinas: CD11b y CD18.	PBS	del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> . Tampón fosfato salino.
Mb	Megabase.	PCNA	del inglés <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> . Antígeno nuclear de proliferación celular.
MCP	Muerte celular programada.	PCR	del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
MRE11	del inglés, <i>Meiotic Recombination Protein 11</i> . Proteína de recombinación meiótica 11.	PFA	paraformaldehído.
mRNA	RNA (del inglés, <i>RiboNucleic Acid</i>) Ácido ribonucleico mensajero.	PI3K	del inglés, <i>Phospho-Inositide-3 Kinase</i> . Fosfatidil-inositol-3-Quinasa.
NBS1	del inglés, <i>Nijmegen Breakage syndrome protein 1</i> . Proteína 1 del síndrome de roturas de Nijmegen (también llamada nibrina).	Pol	DNA Polimerasa.
NCAM	del inglés, <i>Neural Cell Adhesión Molecule</i> . Molécula de adhesión neural.	RAD50	del inglés <i>Radiation sensitivity abnormal protein 50</i> . Proteína 50 de sensibilidad anormal a la radiación.
NF-κB	del inglés, <i>Nuclear Factor Kappa B</i> . Factor nuclear Kappa B.	RAG	del inglés, <i>Recombination Activating Gene</i> . Gen activador de la recombinación.
NgCAM	del inglés, <i>Neuron-glia Cell Adhesión Molecule</i> . Molécula de adhesión celular de neuronas y glía.	RGCS	del inglés, <i>Retinal Ganglion Cells</i> . Células ganglionares de la retina.

RIPA	del inglés, <i>Radioimmunoprecipitation assay lysis buffer</i> . Tampón de lisis para ensayos de radioinmunoprecipitación.	TBS	del inglés, <i>Tris Buffered saline</i> , Tampón salino de Tris
rNTP	del inglés, <i>riboNucleotide TriPhosphate</i> . Ribonucleótido trifosfato.	TdT	del inglés, <i>Terminal deoxinucleotidil Transferase</i> . Transferasa terminal de desoxinucleótidos.
RPE	del inglés, <i>Retinal Pigmented Epithelium</i> . Epitelio pigmentario de la retina.	Tuj-1	anti- β -III tubulina, clon Tuj-1.
ROI	del inglés, <i>Region Of Interes</i> . Región de interés.	TUNEL	del inglés <i>TdT-mediated dUTP Nick End Labelling</i> . Marcado de extremos con dUTP mediado por TdT.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.	V(D)J	del inglés, <i>Variable-Diversity-Joining</i> . Regiones génicas dianas de recombinación somática Variable – Diversidad – Unión.
S	Síntesis.	v/v	volumen/volumen.
SCID	del inglés, <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> . Inmuno-deficiencia combinada severa.	VEGF	del inglés, <i>Vascular-Endothelial Growth Factor</i> . Factor de crecimiento vascular-endotelial.
SHM	del inglés, <i>Somatic Hyper Mutation</i> . Hipermutación somática.	WT	del inglés, <i>Wild Type</i> . Cepa silvestre.
SINE	del inglés, <i>Short Interspersed Nuclear Element</i> . Elemento corto nuclear inter-espaado.	XLF	del inglés, <i>XRCC4 Like Factor</i> . Factor similar a XRCC4. También llamado Cernunos y Nhej1.
SNC	Sistema Nervioso Central.	XRCC4	del inglés, <i>X-Ray Cross-Complementing defective repair protein 4</i> . Proteína 4 de defectos en la reparación por complementación cruzada en lesiones inducidas por rayos X.
SNP	Sistema Nervioso Periferico.		
SVA	Elemento transponible SINE/VNTR/Alu.		

A fluorescence microscopy image showing a biological structure, possibly a cross-section of a tissue or organ, with a prominent green signal. The signal is concentrated in a curved, layered structure, likely representing a specific cell type or protein expression. The background is dark, and the green signal is bright and well-defined. The word "SINOPSIS." is overlaid on the right side of the image.

SINOPSIS.

SYNOPSIS.

During neural development, orchestrated proliferation, differentiation and cell death processes are necessary to achieve the complex cytoarchitecture and connectivity of the nervous system. Concerning cell death, several phases of apoptosis occur during retinal development, including an early one that affects neuroblasts and recently born neurons, and whose function is not well understood.

The existence of somatic mosaicism in the nervous system, first postulated in 1963, has been recently demonstrated: actually, it is a frequent process that takes place during neurogenesis. However, the mechanisms that generate it are still unknown. Several genetically-modified mouse model systems defective in Non Homologous End Joining (NHEJ) DNA break repair pathway present a dramatic phenotype during neural development, characterized by massive apoptosis of immature neurons. These data suggest a possible function of DNA breaks generation and repair in the neurogenic process. LINE-1 retrotransposition has been suggested to act as a necessary source of DNA breaks during embryonic development that plays a crucial role in the generation of neural diversity. Hereby, we study the *in vivo* requirement of proteins involved in a DNA double-strand break generation and repair pathway, for proper neural development, and their relationship with LINE-1 retrotransposition.

METHODS.

We have analyzed retinal development in two murine models defective in DNA repair: the *SCID* (truncated DNA-PK) and the DNA polymerase μ deficient mice (*pol μ ^{-/-}*). We also evaluated one model defective for RAG-1,2 endonuclease (*rag2^{-/-}* mice), an enzyme complex known to produce directed DNA breaks in the immune system cells. Whole mount, dissociated retinas and retina slices were processed for TUNEL to detect apoptosis, for γ H2AX to detect DNA breaks presence, for L1CAM and *BRAVO* to evaluate axonal guidance cues distribution, and for β -III tubulin to evaluate axonal navigation and neural cell distribution. Microglial cell number and maturation were also evaluated through cd68 and tomato lectin histochemistry. Dissociated retina cells were cultured to determine the effect of the mutations on neuronal differentiation and axonogenesis. Adult whole mount retinas and retina slices from *pol μ ^{-/-}* mice were evaluated for

the number of nuclei layers in central retina, as well as for RGC presence (Brn3a), Müller glia (CRALBP), astrocyte distribution (GFAP) and vascularization (PECAM). LINE-1 relative content was evaluated by quantitative PCR.

RESULTS.

SCID and *pol μ*^{-/-} DNA repair deficient mice presented more unresolved DNA breaks than their control strains as well as increased apoptosis. The pattern of axonal growth, axonal navigation and guidance cues distribution was also affected, suggesting that correct DNA break repair is necessary for proper neural development. Retinas from *pol μ*^{-/-} mice also displayed an altered number of nuclear layers, as well as an increase in the number of ectopic neurons. However, adult *pol μ*^{-/-} retinas presented an attenuated phenotype, mainly affecting astrocyte cell number and retina vascularization.

Despite the fact that RAG-2 deficient mice presented less unprocessed DNA breaks than its control strain, it also displayed an increase in apoptosis and a neural phenotype that closely resembled that of *SCID* and *pol μ*^{-/-} DNA repair deficient mice. Both *rag2*^{-/-} and *SCID* mutants also presented alterations in microglia maturation.

In relation to LINE-1 retrotransposition, *SCID* and *pol μ*^{-/-} mutants presented a higher relative content than their control strains, whereas LINE-1 content was decreased in *rag2*^{-/-} mutant. However, these alterations were not specific for neural tissues: LINE-1 content increased in every tissue defective for DNA repair and decreased in every tissue where RAG-2 mRNA had been detected.

CONCLUSIONS.

Our results show that defective DNA breaks generation and repair interferes with survival and differentiation of embryonic retinal neurons, as well as with proper axonal guidance cues distribution. These results suggest that, in the nervous system, NHEJ repair pathway and RAG-1,2 endonuclease may act coordinately in a shared pathway important in mammalian development.

LINE-1 retrotransposition does not seem to be a major source of DNA breaks in early neural retina development. However, LINE-1 content might be modulated by proteins implicated in DNA breaks generation and repair such as DNA-PK, DNA polymerase μ and RAG-2.

SINOPSIS.

El desarrollo de la arquitectura y conectividad del sistema nervioso requiere de tres grandes mecanismos finamente coordinados: la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada. Durante el desarrollo del sistema nervioso en general, y de la retina en particular, se producen varias fases de muerte apoptótica, incluyendo una fase de muerte neural temprana que afecta a neuroblastos y a neuronas al inicio de su proceso de diferenciación, cuya función aún no está clara.

La existencia de mosaicismos somáticos en el sistema nervioso, postulada en 1963, ha sido demostrada recientemente, observándose que es un evento frecuente producido durante el proceso de neurogénesis. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que lo genera. Diversos modelos murinos deficientes en proteínas de reparación de roturas de doble hebra del DNA por la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) presentan un fenotipo severo en el desarrollo neural, con un incremento drástico de la muerte temprana de neuronas inmaduras, lo que sugiere que la generación y reparación de roturas del DNA podrían estar implicadas en el proceso de neurogénesis. Se ha propuesto que la retrotransposición de LINE-1 actúe como una fuente necesaria de roturas del DNA durante el desarrollo embrionario y que su actividad esté implicada de manera directa en la generación de diversidad neuronal. Por ello, en el presente estudio analizaremos el papel *in vivo* en el desarrollo neural de proteínas de generación y reparación de roturas de DNA de doble hebra, así como su relación con la transposición de LINE-1.

MÉTODOS.

Analizamos el desarrollo de la retina en dos modelos murinos con alteraciones en la reparación del DNA: el modelo *SCID* (con la DNA-PK truncada) y el modelo nulo para la DNA-polimerasa μ . También estudiamos un modelo carente de una de las subunidades de la endonucleasa RAG-1,2, (ratones *rag2^{-/-}*), complejo enzimático que produce roturas dirigidas en el DNA en células del sistema inmune. Procesamos retinas *in toto*, retinas disociadas y secciones de retinas de E13,5 para distintos marcajes inmunohistoquímicos, a saber: la técnica TUNEL para detectar apoptosis, inmunofluorescencia de γ H2AX para visualizar roturas del DNA, de L1CAM y *BRAVO* para evaluar proteínas de guía axonal, y de β -III tubulina para evaluar la navegación axonal y la

distribución de las neuronas. También estudiamos el número y maduración de células microgliales por tinción histoquímica con lectina de tomate y para cd68. Así mismo, se cultivaron células de retina disociadas para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la diferenciación neuronal y el proceso de axonogénesis. En retinas adultas del ratón *pol μ^{-/-}* se analizó, *in toto* y en secciones, la glía de Müller (células CRALBP positivas), la distribución de astrocitos (GFAP positivas) y la vascularización de la retina (con el marcador PECAM). El número relativo de copias de LINE-1 se determinó por PCR cuantitativa.

RESULTADOS.

Los mutantes de reparación *SCID* y *pol μ^{-/-}* presentaron más roturas de DNA sin reparar que sus estirpes silvestres, así como un incremento de células apoptóticas. También se observaron alteraciones en el patrón de crecimiento y navegación de los axones, y en la distribución de proteínas de guía axonal, lo que sugiere que el correcto desarrollo neuronal requiere de la reparación adecuada de las roturas del DNA. La falta de Pol μ también produjo alteraciones en el número de filas de núcleos de la retina y en el número de neuronas ectópicas. El fenotipo de este mutante se atenuó en el adulto, afectando principalmente a la vascularización de la retina y a la distribución de astrocitos.

Aunque el mutante *rag2^{-/-}* presentó menos focos de reparación del DNA que su control, en este mutante también se observó un incremento de apoptosis y un fenotipo neural muy próximo al de los mutantes *SCID* y *pol μ^{-/-}*. Además, en los mutantes *rag2^{-/-}* y *SCID* se encontraron alteraciones en la maduración microglial.

Respecto a la transposición de LINE-1, los mutantes *SCID* y *pol μ^{-/-}* presentaron un número relativo de copias mayor que su control, mientras que en el mutante *rag2^{-/-}* este número se redujo. Los cambios no fueron específicos de tejidos neurales: la ausencia de reparación de roturas produjo un incremento generalizado del número relativo de copias del transposón en todos los tejidos que estudiamos, y la falta de RAG-2 provocó un descenso significativo de las mismas en los tejidos en los que se ha demostrado expresión de esta proteína.

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados demuestran que los defectos en la generación y reparación de roturas del DNA interfieren con la supervivencia y axonogénesis de neuronas de la retina embrionaria, afectando a la distribución de proteínas de guía axonal, y sugieren que, en el sistema nervioso, la vía NHEJ de reparación del DNA y la endonucleasa RAG-1,2 podrían actuar de manera coordinada en una misma vía, importante en el desarrollo de mamíferos.

La transposición de LINE-1 no parece jugar un papel determinante en la generación de roturas del DNA en etapas tempranas del desarrollo de la retina, si bien el número de copias de LINE-1 parece modulable por las proteínas de generación y reparación de roturas DNA.



1-INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

1 - VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO.

La población neuronal del sistema nervioso es extraordinariamente compleja, tanto en el número de células que lo componen como en las funciones que desempeñan. Respecto a su número, se ha calculado que el cerebro humano cuenta con aproximadamente 86.100 millones de neuronas (frente a 71 millones del ratón) (Azevedo et al., 2009), con una diversidad tal de conexiones y funcionalidad que ha llevado a organizar dos consorcios internacionales para su estudio, uno europeo (www.thehumanbrainproject.eu) y otro norteamericano (<http://braininitiative.nih.gov/>). En gran parte, esta diversidad en los tipos celulares, unida a su complejo entramado de interconexiones, hacen el cerebro de cada individuo, único.

Aunque todas las neuronas comparten características que las hacen diferenciarse de las células de otros tejidos, su mapeo y clasificación están muy lejos de ser completados ya que, desde el punto de vista funcional y bioquímico, no hay dos neuronas iguales (Armananzas and Ascoli, 2015). A día de hoy, sólo se ha conseguido una clasificación exhaustiva de las neuronas en un compartimento del sistema nervioso central: la retina adulta (Siegert et al., 2012, Armananzas and Ascoli, 2015). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los que, a partir de células precursoras comunes, se genera tal diversidad.

Uno de los paradigmas más básicos de la genética humana es que, dado que el DNA de todas las células de un individuo se genera a partir de copias del DNA de una única célula original (el cigoto), la información contenida en el DNA de todas las células somáticas de un mismo organismo es esencialmente idéntica (Lewin, 2004). Sin embargo, se ha observado que algunas células del sistema inmune (linfocitos T y B, células T citotóxicas y células dendríticas) escapan a esta definición, y presentan sistemáticamente reorganizaciones del genoma

ausentes en otros tipos celulares. En 1967 se hipotetizó por primera vez que el origen de la diversidad de las proteínas de adhesión celular del sistema nervioso podría basarse en cambios a nivel genético en las neuronas (Deyer, 1967, Edelman and Gally, 1967). Desde entonces, diversos estudios *in vivo* han demostrado que las neuronas no son homogéneas desde el punto de vista genético, y presentan mayor número de variaciones en su DNA que las células somáticas de otros tejidos (Rehen et al., 2001, Rehen et al., 2005, McConnell et al., 2013, Poduri et al., 2013). Gracias a los avances en genómica de célula única, sabemos que las neuronas presentan mosaicismo somático, es decir, que su DNA puede variar de una neurona a otra dentro de un mismo individuo (Evrony et al., 2012, McConnell et al., 2013, Cai et al., 2015, Evrony et al., 2015). Estas alteraciones son bastante frecuentes; se estima que, de manera natural, las células neurales de individuos sanos acumulan variaciones en su contenido total de DNA de más de 1 Mb de extensión por neurona (Westra et al., 2010, McConnell et al., 2013, Cai et al., 2015). En concreto, el DNA neural es especialmente rico en alteraciones genéticas como aneuploidías, repeticiones en tándem de trinucleótidos, polimorfismos de un único nucleótido, inversiones, deleciones, y cambios en el contenido de retrotransposones (Rehen et al., 2005, Gonitel et al., 2008, Coufal et al., 2009, Guilmatre et al., 2009, Singer et al., 2010, Iourov et al., 2012). Esto implica que la heterogeneidad en las células del sistema nervioso va más allá de la diversidad transcriptómica y funcional, existiendo también en cambios en DNA, aunque aún no se ha descrito que éstos afecten a regiones definidas.

Diversos desórdenes neurológicos se asocian a mutaciones somáticas específicas de neuronas, incluyendo casos de epilepsia, autismo, esquizofrenia y Alzheimer (Abner and McKinnon, 2004, McKinnon and Caldecott, 2007, Barzilai et al., 2008), lo que hace pensar que los eventos mutagénicos son especialmente frecuentes en este tipo celular. De hecho, se ha observado que la aparición de cambios en el material genético se produce de manera específica en el proceso de diferenciación de las células madre hacia el linaje neural: *in vitro*, la diferenciación de hIPSCs (células madre pluripotentes humanas inducidas) en paralelo a neuronas y a fibroblastos demostró que aquellas células diferenciadas a neuronas, presentaban más alteraciones en su contenido de DNA que en las diferenciadas a fibroblastos (McConnell et al., 2013). Además, se observó que los cambios en el material genético (sobre todo, deleciones) se producían, mayoritariamente, en el paso de diferenciación de precursores neurales a neuronas (McConnell et al., 2013), lo que indica que el proceso de generación de diversidad somática es inherente al proceso de generación neuronal. En conjunto, estos datos sugieren que, durante el proceso de neurogénesis, se crea un ambiente permisivo para la aparición de mutaciones específicamente en células del sistema nervioso y plantean si la variación genética es la causa principal de la diversidad funcional de las neuronas y, de ser así, cómo pueden generarse estos cambios a nivel del DNA.

Diversos estudios han planteado que la variabilidad genética de las neuronas se genere, al igual que en el sistema inmune, por un mecanismo dirigido. (Fig.1.1) (Deyer, 1967, Edelman and Gally, 1967, Muotri and Gage, 2006, Coufal et al., 2009, Singer et al., 2010, Erwin et al., 2014).

En el sistema inmune, se generan millones de nuevas combinaciones alélicas a través de la inducción de roturas del DNA en zonas concretas del genoma. Gracias a éstas roturas, distintos segmentos génicos se recombinan al azar (Lewin, 2004). Las células precursoras de los linfocitos B y T, obtienen así cambios permanentes en su secuencia del DNA que se reflejan, respectivamente, en cambios en los tipos de inmunoglobulinas y de receptores de antígeno que son capaces de generar (Fig.1.1). Esta gran diversidad alélica es lo que les permite el reconocimiento de múltiples patógenos distintos (Lewin, 2004). Las recombinaciones improductivas y las afinidades incorrectas (en torno al 90% de las células generadas) son posteriormente eliminadas por procesos apoptóticos (Strasser, 2005).

La suposición de que el desarrollo del sistema nervioso y del sistema inmune puede estar sometido a procesos similares se basa en que son comparables en diversidad, ambos presentan cambios en el contenido total de DNA de más de 1Mb de media por célula y, al igual que el sistema inmune, el sistema nervioso es especialmente sensible a la falta de proteínas de reparación de roturas del DNA (Gao et al., 1998, Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, McConnell et al., 2013), lo que hace suponer que la generación de roturas de DNA podría jugar un papel en su desarrollo.

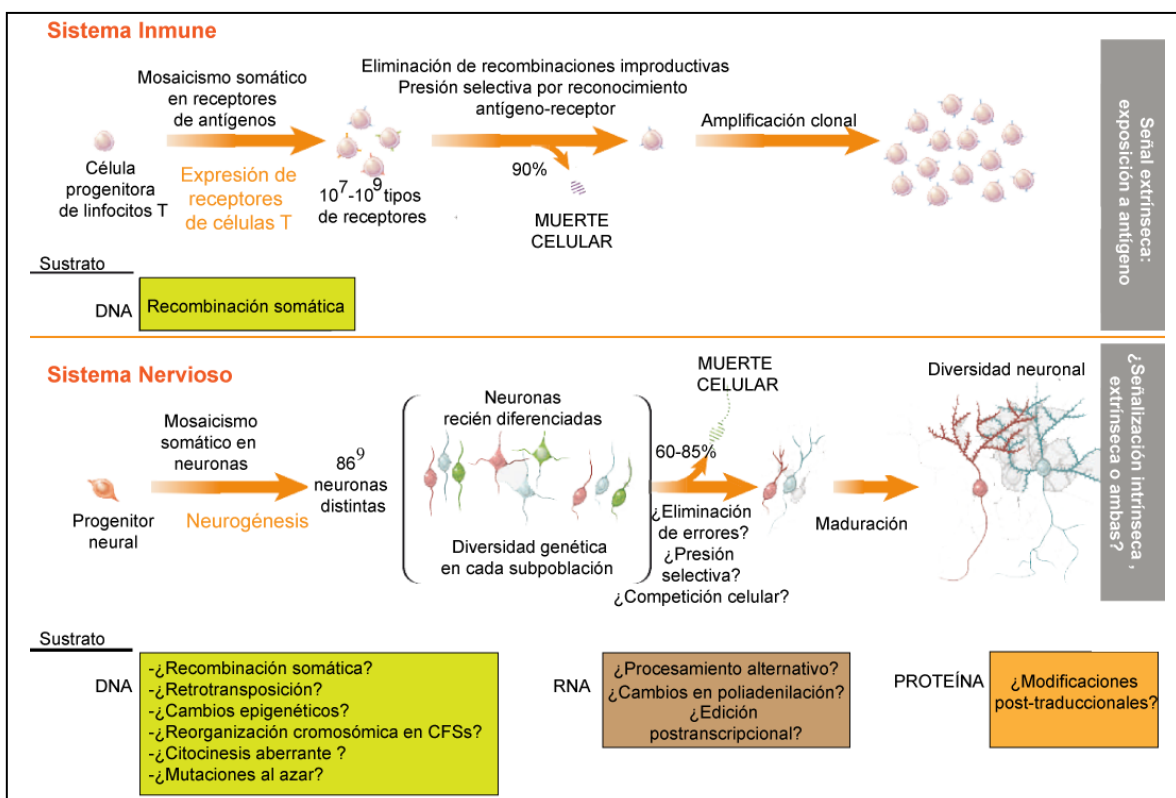


FIGURA 1.1 - GENERACIÓN DE VARIABILIDAD SOMÁTICA EN LOS SISTEMAS INMUNE Y NERVIOSO.

En el sistema inmune, la gran diversidad de los receptores de las células T (10^7-10^9 diferentes), así como de las inmunoglobulinas (10^{12} distintas), son generadas por el mecanismo de recombinación somática V(D)J. En el sistema nervioso, hay más neuronas distintas que la diversidad celular observada en los linfocitos T. A día de hoy no hay ningún mecanismo intrínseco que explique toda la variabilidad detectada en su diferenciación. Sin embargo, hay mecanismos que pueden ayudar a generar diversidad actuando sobre diferentes sustratos (DNA, RNA o proteínas). Su actuación, individual o conjunta, podría estar implicada en la diferenciación neuronal. CFS-Sitios comunes de fragilidad cromosómica.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo de Tesis doctoral estudiaremos la relación entre los mecanismos de generación y reparación de roturas en el DNA, la apoptosis neural temprana y el proceso de neurogénesis en la retina murina, el modelo experimental para el análisis del desarrollo del sistema nervioso central utilizado actualmente en nuestro laboratorio.

Mecanismos que podrían generar variabilidad en el DNA neural.

Las mutaciones en células somáticas se deben, en gran parte, a eventos espontáneos. Pueden generarse a consecuencia de la acción de agentes físicos, como la radiación ultravioleta y la radiación ionizante (Lieber, 2010), o químicos, como diversos agentes alquilantes, oxidantes y desaminantes (Madabhushi et al., 2014). Sin embargo, se conocen algunos mecanismos intrínsecos que pueden generar sistemáticamente mutaciones y reorganizaciones del DNA en regiones específicas del genoma. Comentaremos a continuación los mejor conocidos y su posible relación con la aparición de cambios en el material genético de las neuronas.

RECOMBINASAS: RAG-1 Y RAG-2.

El complejo de endonucleasas RAG-1,2 ha sido especialmente estudiado, dada su importancia en la generación de la diversidad celular del sistema inmune (Gao et al., 1998, Lieber, 2010, Helmink and Sleckman, 2012). El complejo enzimático RAG-1,2 es el encargado de iniciar el proceso de recombinación somática en los linfocitos T y B a través de la generación de roturas programadas en los genes de las inmunoglobulinas y en los receptores de las células T (Tsai et al., 2002, Lieber, 2010).

RAG-1 reconoce dos señales de recombinación en la secuencia del DNA de las células precursoras de los linfocitos, y RAG-2, detecta señales de control epigenético (hipermetilación de H3K4) (Schatz and Ji, 2011). El complejo secciona el DNA tras las secuencias señal, produciendo roturas en el DNA (Lewis et al., 1985, Qiu et al., 2001). Las secuencias intermedias entre dos roturas se delecionan y los extremos del DNA se procesan, y se fusionan entre sí por medio de la vía NHEJ de reparación del DNA (de sus siglas en inglés, *Non Homologous End Joining*). El resultado tras la reparación de la rotura, es la aparición de un nuevo exón. (Lieber, 2010, Grabarz et al., 2012, Helmink and Sleckman, 2012, Rass et al., 2012).

El complejo RAG-1,2 puede actuar no sólo como endonucleasa, sino también como generador de inversiones y como transposasa, en función del sustrato de que parta, insertando DNA

exógeno (con las secuencias de señalización adecuadas) en otras localizaciones del DNA (Agrawal et al., 1998, Hiom et al., 1998, Messier et al., 2003, Lewin, 2004, Fugmann, 2010) .

El análisis de tumores ha demostrado que RAG-1,2 también puede ejercer su función endonucleasa en otros genes aparte de los de inmunoglobulinas y receptores de células T. Esta actuación se produce si aparecen secuencias similares a su secuencia consenso, las denominadas secuencias de recombinación crípticas (en inglés, *cryptic RSSs*) (Lewis et al., 1997, Nishana and Raghavan, 2012). De momento no es predecible la localización de estas secuencias a priori, sin haber sido asociadas a eventos de recombinación.

RAG-1 y RAG-2 se expresan mayoritariamente en tejidos linfoides, pero además, RAG-1 ha sido encontrada en el sistema nervioso, tanto en estadios embrionarios como en el cerebro adulto (Chun and Schatz, 1999). Su función parece necesaria para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, ya que en ratones, su falta (pero no la de RAG-2) afecta a la correcta formación de la memoria (McGowan et al., 2011). En línea con lo anterior, en humanos, se ha encontrado algún individuo con mutaciones en RAG-1 y con encefalopatía (Dhingra et al., 2014).

Diversos estudios han demostrado la presencia del mRNA del complejo RAG-1,2 en el sistema nervioso. Chun demostró que RAG-1 se transcribe extensamente en el cerebro murino durante el desarrollo embrionario, y postnatalmente, en el hipocampo y cerebelo. Sin embargo, no detectó la isoforma de RAG-2 típica del sistema inmune (Chun et al., 1991). Otros autores sí han encontrado esta isoforma en cerebro y en otros tejidos no linfoides, en concreto en los testículos, en el corazón (Aoki et al., 1991, Laszkiewicz et al., 2012). En trabajos previos de nuestro grupo (Baleriola, 2008) también detectamos la presencia del mRNA de RAG-1 y de RAG-2 en la retina embrionaria de ratón. Hasta el momento, en tejidos no linfoides, sólo se ha demostrado la coexistencia de las proteínas RAG-1 y RAG-2, en neuronas del bulbo olfatorio de pez cebra (Jessen et al., 2001), pero la expresión del mRNA de RAG-1 y RAG-2 en cerebro y en retina hace teóricamente posible la actividad recombinasa del complejo RAG-1,2 en el sistema nervioso.

HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA.

La hipermutación somática (SHM, *Somatic Hyper Mutation*) es un proceso que permite refinar la especificidad de las células B frente a determinados antígenos, incrementando la variabilidad de los anticuerpos con un segundo ciclo de diversificación (Honjo et al., 2002, Seki et al., 2005, Martomo and Gearhart, 2006). Consiste en un proceso de mutación programada que afecta a los genes ya recombinados de las inmunoglobulinas (Igs) (Papavasiliou and Schatz, 2002), y

que resulta en la acumulación de hasta un millón de veces más de mutaciones puntuales en los genes de las cadenas ligeras y pesadas de las Igs que en el resto del genoma (Honjo et al., 2002). Las mutaciones típicas del proceso SMH se producen como resultado de la actividad tendente a fallos de diversas DNA polimerasas de baja fidelidad (Honjo et al., 2002, Seki et al., 2005, Martomo and Gearhart, 2006). Las más conocidas son Pol ι , Pol ϵ , Pol η , y Pol ζ , (Gearhart and Wood, 2001, Honjo et al., 2002), si bien diversos estudios relacionan también la actividad de la DNA polimerasa μ (implicada en la vía NHEJ) en la generación de SHM (Dominguez et al., 2000, Ruiz et al., 2001, Ruiz et al., 2004, Lucas et al., 2005).

SITIOS FRÁGILES DEL GENOMA.

Los sitios frágiles son regiones cromosómicas específicas en las que, durante la metafase mitótica, se presentan preferentemente roturas en el DNA (Durkin and Glover, 2007) y donde, tras concluir la mitosis, se acumulan numerosas reorganizaciones génicas (Durkin and Glover, 2007). Estas regiones son especialmente sensibles al estrés replicativo, y se rompen durante la replicación generando roturas que afectan a las dos hebras del DNA. Dentro de ellos, destacan los CFS, (de sus siglas en inglés *Common Fragile Sites*), que se encuentran presentes en la misma posición en todos los individuos de una población (Smith et al., 2006).

Los CFS están conservados en la evolución en distintas especies (Shiraishi et al., 2001), y se asocian a genes de gran tamaño (Palakodeti et al., 2010), en general relacionados con la supresión de tumores, la reparación de DNA y el desarrollo neural (Kholodnyuk et al., 2000, Smith et al., 2006). Su estabilidad está mediada por las proteínas de respuesta al daño al DNA. Entre las enzimas que los regulan, destacan ATR, ATM (Barlow et al., 2013) y algunas proteínas de la vía NHEJ de reparación del DNA, como DNA-PK y la DNA-ligasa IV (Durkin and Glover, 2007). En ausencia de ATM, se produce un incremento dramático en la inestabilidad cromosómica en el cerebro, apareciendo numerosas roturas del DNA en regiones concretas del DNA, en especial en el de las neuronas cerebelares, lo que hace suponer que hay sitios frágiles que se activan preferentemente en las células nerviosas (Iourov et al., 2009). Se ha propuesto que la ruptura de los CFSs juegue un papel fisiológico e intervenga en procesos de regulación génica, fundamentalmente asociado a situaciones de estrés celular (Smith et al., 2006).

RETROTRANSPOSICIÓN: LINE-1.

Otro mecanismo capaz de generar cambios genéticos tanto a gran escala como en localizaciones concretas en el DNA es el derivado de la inserción de transposones en nuevas localizaciones del genoma. Los transposones son secuencias de DNA capaces de escindirse del DNA nuclear y cambiar su localización dentro del genoma. También pueden producir copias de sí mismos e insertarlas en nuevas localizaciones.

La transposición de elementos móviles está íntimamente relacionada con la evolución del genoma humano, hasta el punto de que alrededor del 45% de nuestro genoma deriva de elementos transponibles; la mayoría, de retrotransposones del tipo no-LTR (no derivados de retrovirus) como LINE-1, Alu y SVA (16.9%, 10,6% y 0,2% del total del genoma, respectivamente) (Cordaux and Batzer, 2009, Singer et al., 2010). La movilidad de los retrotransposones es un proceso altamente mutagénico que sigue activo en nuestro genoma (Cordaux and Batzer, 2009). A corto plazo, su transposición puede causar inestabilidad genómica a nivel local, y cambios en el patrón epigenético y en la regulación génica de los loci próximos (Muotri and Gage, 2006, Coufal et al., 2009, Singer et al., 2010, Thomas et al., 2012, Erwin et al., 2014). También pueden producir reorganizaciones severas del material genético, como recombinaciones ectópicas, conversiones génicas, deleciones, traslocaciones, transversiones e inversiones, entre otras (Cordaux and Batzer, 2009).

Dentro de los retrotransposones, destaca especialmente LINE-1, ya que es el único retrotransposón activo en el genoma de mamíferos que expresa el set enzimático completo que se necesita para la transposición: codifica su propia endonucleasa y transcriptasa reversa, lo que le confiere una capacidad autónoma de salto y la posibilidad de catalizar la transposición de otros retrotransposones (Muotri and Gage, 2006, Cordaux and Batzer, 2009). LINE-1 es una secuencia móvil altamente repetida, con más de 500.000 copias esparcidas a lo largo del genoma humano, de las que sólo unas 100 se mantienen activas (Cordaux and Batzer, 2009). En su transposición, produce roturas en el DNA de manera selectiva en diversas localizaciones genómicas que contengan la secuencia AA/TTTT y, posteriormente, inserta copias de sí mismo o de otro trasposón como Alu en el punto de rotura (Thomas et al., 2012). De hecho, LINE 1 es capaz incluso de retrotransponer mRNAs de la célula huésped, lo que puede provocar la aparición de duplicaciones génicas y pseudogenes (Cordaux and Batzer, 2009).

Este transposón es un elemento generalmente quiescente en el genoma de la mayoría de las células somáticas; sin embargo, en los últimos años, se han acumulado numerosas evidencias de que su actividad transposasa se activa de forma específica en el hipocampo humano (Coufal et al., 2009, Evrony et al., 2012, Thomas et al., 2012). Estudios con LINE-1 transgénicos demostraron que su capacidad de salto se activa *ex vivo* en precursores neurales del hipocampo humano (Muotri et al., 2005) e *in vivo* en el hipocampo murino (Muotri et al., 2010). Esta capacidad de transposición también se detectó en el hipocampo y en el córtex prefrontal de pacientes humanos con síndrome de Rett, y con esquizofrenia (Muotri et al., 2010) (Bundo et al., 2014). En individuos sanos (humanos y murinos), estudios por PCR cuantitativa demostraron que el contenido de LINE-1 es mayor en diferentes regiones del cerebro y del cerebelo que en otros tejidos no neurales, como hígado o corazón (Coufal et al., 2009). La transposición de LINE-1 en el hipocampo también se ha evidenciado usando la técnica de enriquecimiento en transposones seguida de secuenciación de última generación.

Con este método se detectaron miles de eventos de retrotransposición somática en neuronas del hipocampo humano (Baillie et al., 2011). En resumen, no hay duda de que tanto en seres humanos como en ratones se producen inserciones somáticas de LINE-1 en tejidos neurales como el hipocampo que están ausentes en otros tejidos del individuo, como el hígado.

Se desconocen las consecuencias de esta elevada transposición en neuronas hipocampales, si es un evento parasitario o si cumplen alguna función (Upton et al., 2011), aunque se ha postulado que su movilización puede participar en la generación de diversidad genómica en el hipocampo (Singer et al., 2010, Thomas et al., 2012, Erwin et al., 2014). Sin embargo, estudios de secuenciación de genomas de más de 300 neuronas individuales concluyen que la frecuencia de retrotransposición de LINE-1 por neurona es muy baja (menor al 0,6%) (Evrony et al., 2012), muy inferior a la tasa de mutaciones observada en neuronas, lo que pone en duda que sea el único o el principal mecanismo de generación de diversidad genética en el sistema nervioso.

Por otra parte, los datos indican que la transposición de LINE-1 no se produce por igual durante toda la vida de un organismo: los eventos de transposición se han descrito fundamentalmente en el desarrollo embrionario, durante las primeras fases de la neurogénesis, afectando específicamente a precursores neurales (van den Hurk et al., 2007, Coufal et al., 2009, Kano et al., 2009).

2- REPARACIÓN DE ROTURAS EN EL DNA.

Todos los mecanismos conocidos por los que se generan reorganizaciones severas del genoma implican que en algún momento se produzcan roturas del DNA que afecten simultáneamente a las dos hebras (a partir de ahora, DDSB, de sus siglas en inglés *DNA Double Strand Breaks*). Estas roturas son la alteración más severa del material genético que puede sufrir una célula, ya que se pierde tanto la continuidad del cromosoma como la accesibilidad al DNA molde de la hebra complementaria. Son especialmente dañinas para la célula, ya que generan inestabilidad genómica que, si no se repara o lo hace de forma incorrecta, puede activar eventos citotóxicos (Grabarz et al., 2012, Deriano and Roth, 2013), como la apoptosis de la célula (Barzilai et al., 2008), o procesos de senescencia celular y envejecimiento (Hoeijmakers, 2009, Deriano and Roth, 2013).

Además, aunque la célula sobreviva, los fallos en la reparación de roturas también pueden derivar en eventos mutagénicos, como deleciones, traslocaciones, inversiones (Barzilai et al., 2008, Grabarz et al., 2012, Liu et al., 2014), y dar origen a la transformación en células cancerosas. A pesar de ello, son eventos muy frecuentes; se estima que se producen alrededor de 10 DDSBs por célula y día (Lieber, 2010).

Hay diversos procesos celulares que pueden producir DDSBs: reorganizaciones programadas del genoma, la actividad de nucleasas endógenas, errores en el metabolismo del DNA, la replicación sobre los sitios frágiles del genoma, fuerzas físicas y especies reactivas de oxígeno procedentes de la respiración celular. Aunque también pueden ser producidas por fuentes exógenas como ciertos virus, radiaciones ionizantes y fuentes químicas (Lieber, 2010, Chapman et al., 2012, Deriano and Roth, 2013).

En las células eucariotas, las DDSBs pueden repararse por dos vías alternativas: por recombinación homóloga (HR, de *Homologous Recombination*) y por unión de extremos no homólogos (NHEJ, de sus siglas en inglés *Non Homologous End Joining*) (Chapman et al., 2012). Curiosamente, ambos mecanismos se relacionan con dos procesos opuestos: mantener la integridad del genoma y generar diversidad génica. Así, ambos procesos son necesarios para mantener la viabilidad celular pero, además, en la línea germinal, la vía HR interviene en los intercambios de información genética que se producen durante el sobrecruzamiento meiótico (Symington and Gautier, 2011, Chapman et al., 2012), y en el sistema inmune, la vía NHEJ es la utilizada en la recombinación somática (Lieber, 2010, Grabarz et al., 2012).

Ambas vías responden a requerimientos celulares diferentes: La recombinación homóloga, que permite minimizar la pérdida de información genética, funciona exclusivamente en células proliferativas durante las fases S y G2 del ciclo celular (Hendrickson, 1997, Symington and Gautier, 2011, Chapman et al., 2012). Por el contrario, la actividad de la vía NHEJ, es ubicua, estando presente en todos los tipos celulares durante todo el ciclo celular (Chapman et al., 2012, Deriano and Roth, 2013). En la vía NHEJ, mucho menos fidedigna que la anterior, el sellado de los extremos del DNA de la rotura se realiza frecuentemente de manera imprecisa, sin asegurarse de si se mantiene o no la secuencia original. A pesar de ser un mecanismo con una alta tasa de error en la reparación, es la única vía de reparación de DDSBs activa en células en fase G1 y en células post mitóticas (G0) (Hendrickson, 1997, Chapman et al., 2012), lo que la convierte en el único mecanismo disponible en células diferenciadas, como las neuronas maduras (Lieber, 2010).

Ruta NHEJ clásica de reparación de roturas del DNA.

La vía NHEJ es posiblemente la ruta más versátil de reparación de daño al DNA. Acepta como sustrato fragmentos de DNA con cualquier tipo de extremos, incluyendo extremos incompatibles y aquellos con estructura secundaria en forma de horquilla; puede reparar la rotura en presencia o ausencia de microhomologías y no requiere de DNA molde para sustituir los nucleótidos perdidos (Lieber, 2010, Chapman et al., 2012).

Como la mayor parte de los procesos de reparación del DNA, la vía de NHEJ requiere nucleasas para eliminar extremos de DNA no compatibles, DNA polimerasas para sintetizar los nucleótidos perdidos y una DNA ligasa para restaurar la integridad de las cadenas de DNA (Lieber, 2010) (Fig. 1.2). El procesamiento de extremos corre a cargo de DNA-PKcs y Artemis. Ambas forman un complejo con actividad nucleasa capaz de eliminar los segmentos en forma de horquilla de los extremos del DNA (típicos de las roturas inducidas por RAG-1,2 (Nishana and Raghavan, 2012)), y de retirar los fragmentos de DNA dañado en los extremos de las hebras (Lieber, 2010). La reposición de los nucleótidos perdidos la realiza una de las DNA polimerasa de la familia X: TdT, Pol μ o Pol λ , en función de las características de la rotura (Lieber, 2010, Ramsden, 2011, Chapman et al., 2012, Deriano and Roth, 2013). El sellado de la rotura requiere la acción conjunta de la DNA ligasa IV, y los factores XRCC4, que estabiliza la ligasa, y Cernunnos/XLF, que favorece la unión de extremos incompatibles (Lieber, 2010).

. DNAPKcs.

La quinasa DNA-PK está formada por dos subunidades: la subunidad catalítica DNA-PKcs y el heterodímero KU70/80. La subunidad catalítica ha sido implicada en una amplia variedad de procesos relacionados con la respuesta al daño al DNA, incluyendo la respuesta a DNA exógeno por medio de la inducción de moléculas proinflamatorias (Kong et al., 2011, Unterholzner, 2013), y la intervención en las vías HR y NHEJ de reparación de DDSBs (Kong et al., 2011).

DNA-PKcs promueve la reparación del daño al DNA, al estimular la fosforilación de H2AX a γ H2AX, la función endonucleasa de Artemis y la actividad ligasa del complejo XRCC4: DNA ligasa IV (Lieber, 2010).

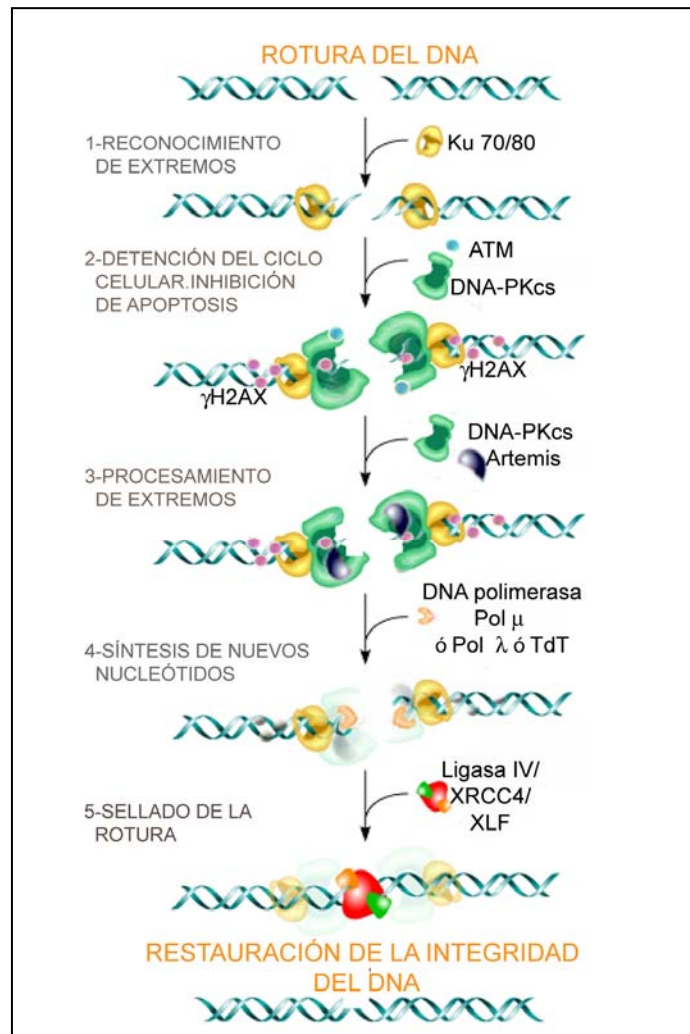


FIGURA 1.2 - VÍA NHEJ CLÁSICA DE REPARACIÓN DE ROTURAS DEL DNA.

1-Los extremos de la rotura se protegen por el dímero Ku70/80, que sirve de punto de anclaje a todas las proteínas de la vía. 2-Las primeras en anclarse son ATM y DNA-PK. Estas quinasas marcan el punto de rotura fosforilando la histona H2AX en el residuo Ser¹³⁹. La histona fosforilada se denomina γH2AX. DNA-PK y ATM interaccionan con proteínas de control del ciclo celular, evaluándose si la rotura es reparable o si la célula debe entrar en apoptosis. Si se continúa con la reparación, el ciclo celular se detiene hasta completarla. 3-La unión de DNA-Pk y Artemis permite procesar los extremos del DNA, eliminando las estructuras secundarias y los nucleótidos dañados. 4-Las DNA polimerasas TdT, Pol λ ó Pol μ sintetizan los nucleótidos perdidos. 5-El complejo LigasaIV/XRCC4/XLF sella la rotura. (Modificado de (Mladenov and Iliakis, 2011)

La actividad de DNA-PKcs es también necesaria para mantener la estabilidad cromosómica durante el proceso mitótico: la inactivación *in vitro* y *ex vivo* de DNA-PKcs conduce a alteraciones mitóticas, incluyendo desalineamientos entre cromosomas mitóticos, alteraciones en la morfología nuclear y cromosomas rezagados (Jette and Lees-Miller, 2015).

Por otro lado, DNA-PKcs también participa en la generación de variabilidad a través del proceso de recombinación somática; de hecho, su actividad en la reparación de las roturas generadas por las recombinasas RAG-1/2 es estrictamente necesaria para la correcta formación del sistema inmune. Este hecho se evidencia en modelos murinos hipomorfos para esta proteína, como el ratón SCID (del inglés *Severe Combined Immunodeficiency*), que

presenta una inmunodeficiencia severa debida a la incapacidad de llevar a cabo la reorganización de los genes de las inmunoglobulinas (Shinkai et al., 1992, Shultz et al., 1995, Blunt et al., 1996, Araki et al., 1997). DNA-PKcs, además, contribuye a la formación de las señales de unión (*signal joints*) típicas de la recombinación mediada por RAG-2, a la que también fosforila (Lin et al., 1999, Hah et al., 2007, Gapud and Sleckman, 2011).

La actividad de DNA-PKcs podría estar implicada en la formación del sistema nervioso ya que, en seres humanos, la ausencia de DNA-PK se asocia, además de con una inmunodeficiencia severa, con problemas de crecimiento, microcefalia y anomalías de la función neurológica (van der Burg et al., 2009, Woodbine et al., 2013, Woodbine et al., 2014). En el mismo sentido, hemos visto en nuestro laboratorio que la inactivación *in vivo* y *ex vivo* de DNA-PKcs también resulta en un incremento en la apoptosis de neuronas recién diferenciadas durante el desarrollo de la retina (Baleriola et al., 2010).

DNA POLIMERASAS IMPLICADAS EN NHEJ. DNA POLIMERASA μ .

Los genomas de mamíferos codifican 4 enzimas de la familia de polimerasas X, todas ellas implicadas en la reparación del genoma: la DNA polimerasa β (Pol β), implicada en el mecanismo de reparación BER (del inglés *Base Excisión Repair*) (Lieber, 2006, Weissman et al., 2007, Ramsden, 2011, Martin and Blanco, 2014), y las DNA polimerasas λ (Pol λ), μ (Pol μ), y TdT (de sus siglas en inglés Terminal deoxinucleotidil Transferase), implicadas en NHEJ (Moon et al., 2007, Motea and Berdis, 2010).

De ellas, sólo tres pueden reparar DDSBs: TdT, Pol μ y Pol λ (Nick McElhinny et al., 2005, Lieber, 2006, Moon et al., 2007). Pol μ es especialmente versátil, ya que es la única polimerasa conocida capaz de sintetizar la nueva cadena de DNA tanto en presencia como en ausencia de DNA molde (Ramsden, 2011) (Fig. 1.3).

Aunque las actividades de Pol λ , Pol μ y TdT son parcialmente solapantes, en realidad llevan a cabo funciones distintas, diferenciándose por su afinidad a sustrato y por los tejidos donde se expresan. La actividad de reparación fidedigna, dependiente de molde, es común a Pol λ y a Pol μ , pero sólo Pol μ es capaz de reparar lesiones en ausencia de microhomologías (de, al menos, 1-2 nucleótidos) entre los extremos del DNA a reparar (Nick McElhinny et al., 2005, Moon et al., 2007) (Fig. 1.3). En la actividad mutagénica, independiente de molde, TdT es más activa que Pol μ , pudiendo reparar con mayor eficiencia sustratos con roturas de mayor longitud (Gozalbo-Lopez et al., 2009). Sin embargo, TdT limita su expresión al sistema inmune (Nick McElhinny et al., 2005, Moon et al., 2007, Motea and Berdis, 2010), mientras que la expresión de Pol μ es más generalizada: es especialmente abundante en órganos linfopoyéticos (Dominguez et al., 2000, Lucas et al., 2013), pero también se encuentra

presente en otros órganos como hígado, riñón, pulmón, testículos, cerebro, y retina (Dominguez et al., 2000, Bertocci et al., 2003, Lucas et al., 2005, Baleriola, 2008).

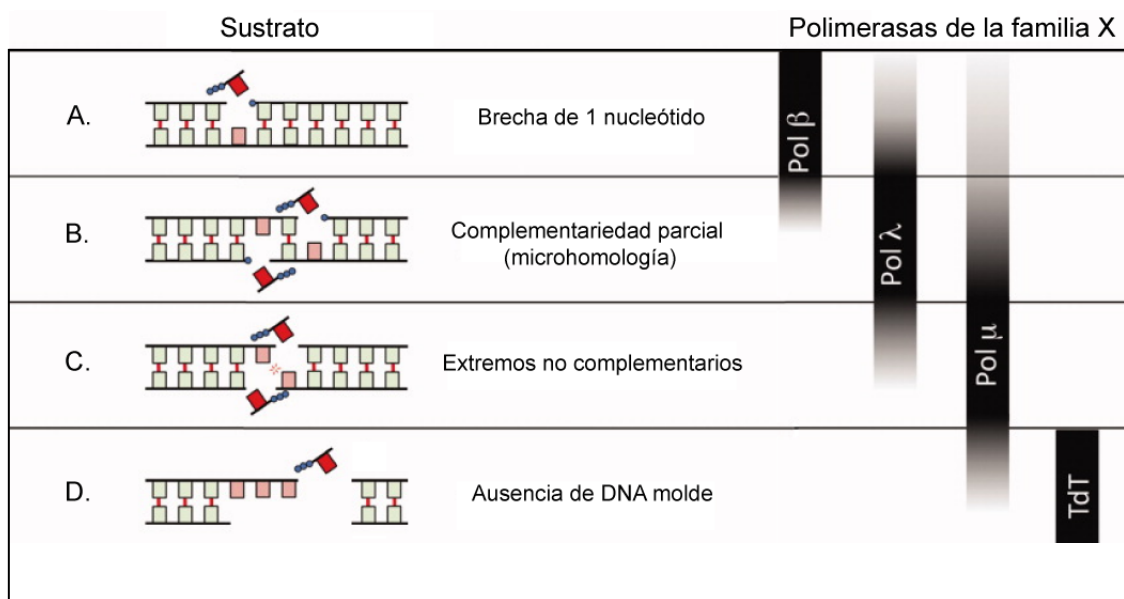


FIGURA 1.3 - REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PREFERENCIA POR SUSTRATO DE LAS DNA-POLIMERASAS DE LA FAMILIA X.

Se representa en rojo la DNA polimerasa con el residuo a incorporar. A- Pol β, Pol λ y Pol μ pueden rellenar pequeñas brechas que afecten a una única hebra de DNA de manera dependiente de molde. B- Pol λ y Pol μ pueden reparar roturas que afecten a ambas hebras del DNA si existe al menos una base de complementariedad entre los extremos de ambas cadenas. C- Pol μ puede reparar pequeñas DDSBs sin que existan nucleótidos complementarios en la hebra opuesta. D- TdT, utiliza sustratos de DNA con una protrusión en su extremo 3' y lleva a cabo la polimerización de manera independiente de molde. Aunque en menor medida, Pol μ también puede realizar síntesis independiente de molde utilizando el mismo sistema. Modificado a partir de (Ramsden, 2011)

La capacidad de Pol μ de incorporar nucleótidos puede desplazarse entre la reparación fidedigna a la secuencia original, dependiente de DNA molde, y una actividad mutagénica, independiente de molde (Martin et al., 2013). Se ha comprobado que ambas actividades (mutagénica vs fidedigna) son funcionales *in vivo*, tanto en el desarrollo embrionario (Gozalbo-Lopez et al., 2009) como en la edad adulta (Martin et al., 2013). Este tipo de actuación dual le permite a Pol μ recuperar roturas severas en el DNA en cualquier célula del organismo, manteniéndose fiel a la secuencia original cuando es necesario y, en determinados casos, convirtiéndose en un potencial agente mutagénico y/o en una fuente de diversidad genética.

Pol μ parece desempeñar un papel protagonista en la generación de diversidad somática del sistema inmune: en las células precursoras de los linfocitos, participa en el proceso de hipermutación somática (Dominguez et al., 2000, Ruiz et al., 2001, Ruiz et al., 2004, Lucas et al., 2005) y, así mismo, interviene junto a TdT en la recombinación somática iniciada por RAG-1,2 (Bertocci et al., 2003, Bertocci et al., 2006, Lieber, 2006, Gozalbo-Lopez et al., 2009, Motea and Berdis, 2010). Su participación cobra mayor importancia en función del momento del

desarrollo. En etapas tempranas del desarrollo embrionario (E10-E12), TdT no se encuentra presente, y Pol μ es la que lleva a cabo gran parte de la reparación de las lesiones asociadas a los primeros eventos de recombinación somática (Gozalbo-Lopez et al., 2009). En consecuencia, la ausencia de Pol μ provoca importantes defectos en el desarrollo hematopoyético (Bertocci et al., 2003).

Se sospecha que Pol μ también podría jugar un papel en el desarrollo del sistema nervioso. Estudios *in vivo* con ratones carentes de esta DNA polimerasa realizados en nuestro laboratorio, demostraron que su presencia en la retina se encuentra incrementada respecto a Pol λ durante la fase de neurogénesis (Baleriola, 2008); de hecho, estos ratones presentaron un fenotipo neural inesperado durante el envejecimiento (Lucas et al., 2013), al ser capaces de mantener sus habilidades cognitivas durante más tiempo que sus controles silvestres.

3 - LA RETINA.

La retina es una lámina fotosensible encargada de transformar la información lumínica en impulsos nerviosos. Es un tejido muy conservado evolutivamente en todos los vertebrados, tanto en su estructura general, como en los tipos de células que lo componen, y en sus moduladores principales (Masland, 2001, Finlay, 2008, Reese, 2011). Se localiza dentro de la esfera posterior del ojo y se conecta a través del nervio óptico con el córtex visual (Gray, 1960).

La retina, como parte del sistema nervioso central, es un sistema modelo clásico para el estudio de procesos celulares relacionados con el desarrollo neural (Cepko et al., 1996, Levin, 2001, Valenciano et al., 2006, Yucel and Gupta, 2008). Su estructura y desarrollo son conocidos (Masland, 2001, Marquardt and Gruss, 2002, Davis and Dyer, 2010) y es fácilmente accesible para su extracción, cultivo y tratamiento farmacológico (de la Rosa et al., 1998, Baleriola et al., 2010).

La retina interna o retina neural es una lámina de tejido estratificada compuesta por seis tipos principales de neuronas, cuyos núcleos están distribuidos en tres capas paralelas (Fig.1.4). De fuera a dentro, se distinguen: la capa nuclear externa (ONL), donde se sitúan los núcleos de los fotorreceptores (conos y bastones); la capa nuclear interna (INL) que contiene los núcleos de las interneuronas (células amacrinas, bipolares y horizontales); y la capa de células ganglionares (GCL), que contiene a las células del mismo nombre. Estas capas de núcleos

están separadas entre sí por dos capas de sinapsis: la capa plexiforme externa (OPL), donde contactan los fotorreceptores con las interneuronas; y capa plexiforme interna (IPL), donde las interneuronas contactan con las células ganglionares (Fig. 1.4). Los axones de las células ganglionares se asocian en haces que, compactados y fasciculados entre sí, dan origen al nervio óptico, conectando directamente la retina con los núcleos visuales primarios (núcleos supraquiasmáticos, el geniculado lateral, y el córtex visual) (Gray, 1960).

Aparte de neuronas, en la retina también se encuentran las células de Müller, (una población glial generada en la propia retina) y dos poblaciones celulares de origen extrarretiniano: los astrocitos (de origen neural) y la microglía (células del sistema inmune). La glía de Müller (o radial) se distribuye perpendicularmente a las capas de núcleos; la microglía está presente en las capas de sinapsis (OPL e IPL), y los astrocitos se localizan entre la GCL y los vasos sanguíneos que irrigan la cara interna de la retina (Gray, 1960).

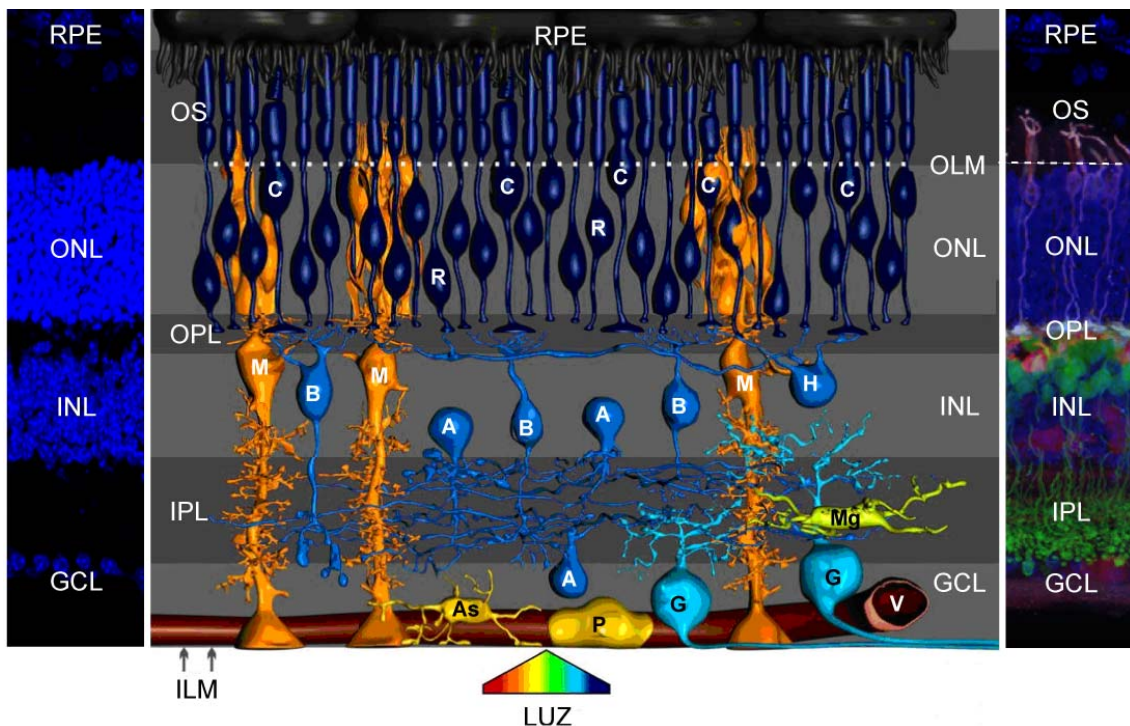


FIGURA 1.4- ESTRUCTURA DE LA RETINA MURINA Y TIPOS CELULARES QUE LA CONFORMAN.

Izquierda: Núcleos de las células de la retina teñidos con DAPI. Capa de epitelio pigmentario (RPE) y capas de neuronas: ONL, INL y GCL, separadas por zonas de sinapsis (OPL e IPL). **Centro:** En la ONL se encuentran los núcleos de los fotorreceptores (C-Conos, R-Bastones), cuyos segmentos externos se emiten hasta las células del RPE, que los engloban. En la INL están los núcleos de las interneuronas (A-Células Amacrinas, B-Células Bipolares, H-Células Horizontales). En la GCL se encuentran las células ganglionares (G) y células amacrinas desplazadas (A). La microglía (MG) se presenta en la OPL e IPL. La glía de Müller (M) se extiende radialmente, atravesando todas las capas de la retina. Sus pies forman las membranas limitantes externa (OLM) e interna (ILM). Entre la GCL y los vasos sanguíneos (V) se encuentran los astrocitos (As). Se muestran también los pericitos (P) rodeando los vasos. La flecha indica el sentido de entrada de la luz. Modificado a partir de un esquema original de @EFFIGOS **Derecha:** Superposición de una tinción de algunos tipos celulares de la retina sobre la estructura nuclear de la misma. Modificado a partir de una imagen de <http://webvision.med.utah.edu/Wong.htm>. RPE-Epitelio pigmentario. OS-Segmentos externos de los fotorreceptores, ONL-Capa nuclear externa. OPL-Capa plexiforme externa. INL-Capa nuclear interna. IPL-Capa plexiforme interna. GCL-Capa de células ganglionares.

Desarrollo de la retina murina.

En los vertebrados, la formación de la retina es un evento conservado evolutivamente, basado en procesos secuenciales de proliferación, diferenciación, regionalización y muerte celular programada (Chow and Lang, 2001, Eiraku et al., 2011, Sinn and Wittbrodt, 2013).

La formación de la retina proviene de la invaginación central de las vesículas ópticas a ambos lados del tubo neural, formando la copa óptica (Fig.1.5 A). En ratón, este proceso se produce entre E9,5 y E10,5. La invaginación es asimétrica, ya que queda una apertura en la zona ventral de la retina que se conoce como fisura óptica (Morcillo et al., 2006, Francisco-Morcillo et al., 2014). Posteriormente (entre E11 y E14), los márgenes de la fisura se fusionan entre sí, completando la copa óptica, pero dejando una apertura central, la cabeza del nervio óptico, por donde los axones de las células ganglionares proyectarán hacia sus destinos finales (Fig.1.5 A). (Chow and Lang, 2001, Richardson et al., 2014). EMAP eMouse Atlas Project (<http://www.emouseatlas.org>).

La copa óptica resultante es una estructura formada por dos capas de células. La capa más externa se diferenciará en las células del epitelio pigmentario, mientras que la capa interna (neuroepitelio) dará lugar a la retina neural (Chow and Lang, 2001, Reese, 2011).

DIFERENCIACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES DE LA RETINA.

Las células neuroepiteliales de la retina interna son poblaciones de células multipotentes que dan origen a todos los tipos neuronales de la retina, así como a la glía de Müller (Cepko et al., 1996, Cepko, 2014)

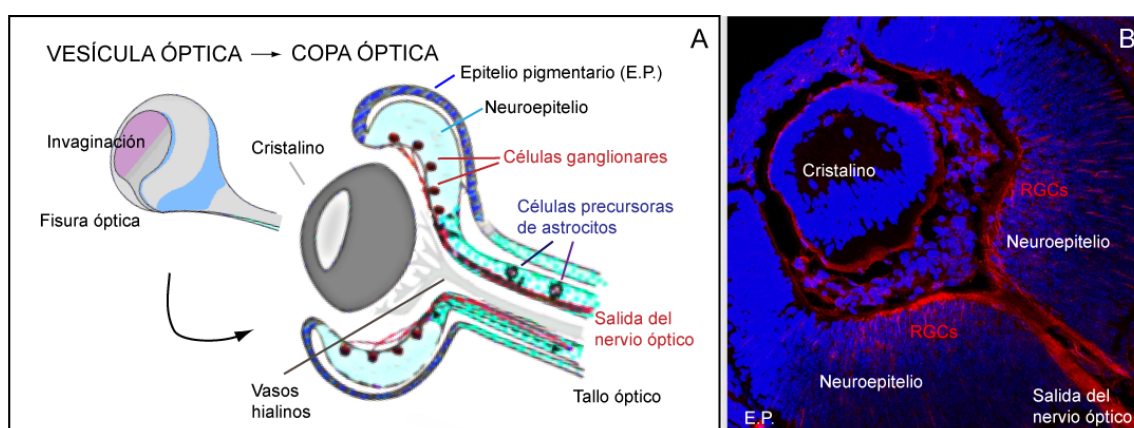


FIGURA 1.5-DESARROLLO DE LA COPA ÓPTICA.

A- La invaginación asimétrica de la vesícula óptica da origen a dos capas de células y una fisura óptica en posición ventral. La copa óptica es una estructura bilaminada; con epitelio pigmentario y neuroepitelio. Las células ganglionares, las primeras en diferenciarse, se sitúan en posición basal. Sus axones formarán el nervio óptico. Las células precursoras de los astrocitos se sitúan en el tallo óptico e invadirán la retina desplazándose sobre los axones de las ganglionares. B- Sección del ojo de ratón a E12,5, teñida con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares y Tuj-1 (rojo) para ver las células ganglionares y sus proyecciones axonales. E.P.- Epitelio pigmentario; RGC-Células ganglionares, Modificado a partir de (Tao and Zhang, 2014).

Durante las primeras etapas del desarrollo, se dividen simétricamente, incrementando la cantidad de progenitores neurales en la recién formada copa óptica. Durante esta etapa de proliferación, los núcleos de los progenitores neurales cambian su localización según la fase del ciclo celular en la que estén, concluyendo la mitosis en la superficie externa de la retina (también llamada ventricular o apical) (Fig.1.6 A). Tras esta fase expansiva, comienzan a dividirse asimétricamente, dando lugar a una célula proliferativa y a una célula hija que sale del ciclo celular. La célula hija pasa a una fase de quiescencia o G0 y comienza el proceso de diferenciación, migrando desde la cara externa hasta su posición definitiva. Para ello, extiende una prolongación hacia la cara interna (también llamada vitreal o basal) de la retina y, a continuación, migra el núcleo a través de esta prolongación a su posición final (McLoon and Barnes, 1989, Reese, 2011) (Fig. 1.6 A).

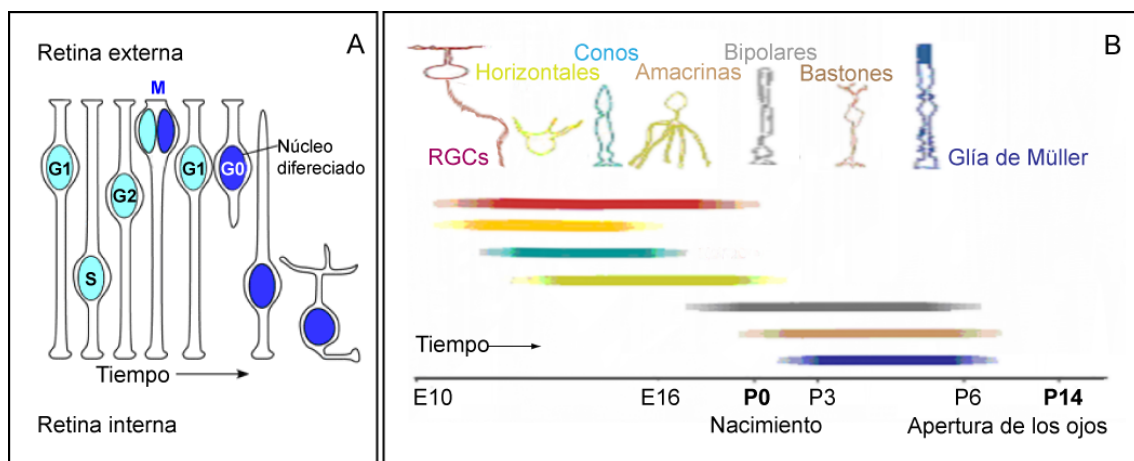


FIGURA 1.6 DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA RETINA.

A- Migración del núcleo celular entre las superficies apical y basal del neuroepitelio en función del estadio del ciclo celular. Se muestra en cian el núcleo de células proliferativas y en azul el núcleo de células postmitóticas. La flecha indica el transcurso del tiempo. M-Mitosis. Reproducido de (Starr, 2009) B- Orden de aparición de los distintos tipos celulares en el desarrollo de la retina de ratón. E-Día embrionario, P0-día de nacimiento, P-Día postnatal, P14-Día de apertura de los ojos. Horizontales-Células horizontales; RGCs-Células ganglionares, Amacrinas-Células amacrinas, Bipolares- Células bipolares. Modificado de (Zhang et al., 2011).

La diferenciación de las células de la retina se produce en un orden temporal específico, (Sidman, 1963, Young, 1985, Cepko et al., 1996, Marquardt and Gruss, 2002) que, en todas las especies de vertebrados estudiados, comienza por las células ganglionares (RGCs, del inglés *Retinal Ganglion Cells*) (Fig.1.6 B).

En torno a E13,5-E14 aparece un segundo grupo de células progenitoras neurales, procedentes de células neuroepiteliales de la cabeza nervio óptico, que darán lugar a los astrocitos de la retina (Fig 1.5 A) (Raff et al., 1984, Miller et al., 1989). Estas células acceden a la retina desplazándose sobre los axones de las células ganglionares (Watanabe and Raff, 1988), que secretan diversos factores que controlan tanto su proliferación como su migración al

interior de la retina (Fruttiger et al., 1996, Burne and Raff, 1997, Wallace and Raff, 1999, Dakubo et al., 2003).

Durante el desarrollo embrionario, la microglía penetra en el sistema nervioso en estadios muy tempranos (E9,5), previa o simultáneamente al proceso de neurogénesis (Bessis et al., 2007). La microglía se encuentra presente en la retina murina desde, al menos, E11,5, y proviene de la infiltración de precursores del sistema inmune desde el saco embrionario al sistema nervioso (Santos et al., 2008, Francisco-Morcillo et al., 2014). Inicialmente, cuando aún es inmadura, se presenta en su forma ameboide, y según madura, se ramifica, adquiriendo nuevas funcionalidades (Nayak et al., 2014). Su densidad decrece hasta prácticamente desaparecer en el neonato, aunque vuelve a incrementarse en estadios postnatales (Santos et al., 2008, Bejarano-Escobar et al., 2011, Francisco-Morcillo et al., 2014).

Diferenciación de las RGCs y emisión del nervio óptico.

Las primeras células ganglionares comienzan a diferenciarse cuando el cierre del tallo óptico está casi completo, en torno a E10 (Fig.1.6 B), en la región dorso-temporal de la retina, y su diferenciación suele ir acompañada de una fase de muerte celular programada, descrita en nuestro laboratorio (Valenciano et al., 2009, Chavarria et al., 2013). La diferenciación de este tipo celular y la correcta emisión de sus axones está regulada, entre otros mecanismos, por la expresión de diversos factores de transcripción, como Islet 1, Islet 2, y Bn3a, (Erskine and Herrera, 2007, Ohsawa and Kageyama, 2008, Pan et al., 2008, Badea et al., 2009, Cepko, 2014). Inmediatamente tras su generación, las RGCs comienzan a migrar hacia la cara interna de la retina. La prolongación radial que emiten durante este proceso, da origen a su axón, que comenzará a dirigirse hacia la salida del nervio óptico incluso antes de que termine la migración nuclear. (McLoon and Barnes, 1989, Reese, 2011)(Fig. 1.6 B). Durante el proceso de emisión, la célula reorganiza de manera autónoma diversas estructuras de su citoesqueleto, lo que permite polarizar el crecimiento del axón y extenderlo. Así mismo, la célula responderá a señales extrínsecas de guía axonal, que le permitirán dirigir los axones ordenada y específicamente hacia la cabeza del nervio óptico y más allá del ojo, hacia los núcleos visuales primarios (Oster et al., 2004, Reese, 2011).

Una vez que los axones de las células ganglionares han definido su polaridad y comienzan su navegación hacia la cabeza del nervio óptico, se adhieren a los axones de células ganglionares generadas anteriormente, formando haces o fascículos que se compactan unos con otros, hasta formar fibras nerviosas. Este proceso de fasciculación es una forma eficaz de que un número elevado de axones sigan de manera conjunta una vía coherente hacia sus dianas cerebrales, si bien depende en último término de la ruta trazada por los axones pioneros al contactar con sus dianas (Reese, 2011).

Las primeras células ganglionares en emitir el axón se sitúan en la región central de la retina, a corta distancia del nacimiento de la cabeza del nervio óptico. Las células ganglionares que se desarrollan más adelante están en regiones más periféricas de la retina, por lo que sus axones deben de recorrer distancias cada vez más largas para encontrar la cabeza del nervio óptico, e interactuar con los axones que ya han emitido las otras células ganglionares generadas con anterioridad (Reese, 2011).

MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL: IgCAMs.

Cómo estos primeros axones logran establecer la conexión con los núcleos visuales es un tema aún en debate, si bien durante las últimas dos décadas, se han encontrado multitud de factores implicados en el proceso de guía de los axones hasta sus dianas primarias (Oster et al., 2004, Reese, 2011). En la retina, destaca la acción combinada de diferentes proteínas de adhesión celular independientes de calcio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgCAMs) (Oster et al., 2004).

Las IgCAMs son moléculas que se expresan en la superficie de los axones e interactúan entre sí, mediando la adhesión de unos axones con otros (Reese, 2011). Tienen, en este sentido, una doble función: detectan el camino marcado por axones previos y actúan como moléculas de señalización para los axones que lleguen a continuación.

Dentro de esta familia, cobran especial importancia en el desarrollo de la retina las proteínas de la subfamilia de L1: L1CAM, NRCAM (*BRAVO*) y NCAM, entre otras (Maness and Schachner, 2007). Esta familia de proteínas se encuentra presente en toda la trayectoria del nervio óptico, y están implicadas en la proliferación celular, y en la determinación del crecimiento, dirección y mielinización de los axones. También intervienen en el proceso de guía de los axones de las RGCs hasta sus dianas celulares, estando presentes desde su origen en la retina, en la decusación a nivel del quiasma óptico y en su conexión con el geniculado lateral, donde dirigen la formación de sinapsis (Sakurai, 2012).

Las alteraciones en estas proteínas suelen producir errores en el proceso de guía de axones, desorientación de las dendritas y posicionamiento anormal de las neuronas, y se asocian con alteraciones neurales, entre las que destacan malformaciones oculares, problemas de reconocimiento espacial, de conducta exploratoria, y elevada agresividad (Maness and Schachner, 2007).

Funciones de las células no neuronales en el desarrollo de la retina.

MICROGLÍA.

La microglía, la población de células del sistema inmune en el SNC, juega un papel indispensable para el correcto desarrollo del sistema nervioso. Según el momento del desarrollo, se asocia a los procesos de muerte celular (Santos et al., 2008, Francisco-Morcillo et al., 2014), fagocitando las células apoptóticas sin activar la respuesta inflamatoria. (Nayak et al., 2014). Desempeña sin embargo un papel dual, pues también puede inducir la apoptosis de diversos tipos neurales (Frade and Barde, 1998, Wakselman et al., 2008, Marin-Teva et al., 2011).

La microglía secreta una serie de factores que han sido implicados en todas las fases de la neurogénesis (Bessis et al., 2007, Squarzone et al., 2014); entre otros, la secreción de IGF-I y neurotrofina-3 al entorno extracelular, contribuye a la supervivencia y proliferación celular y a la diferenciación neuronal (Nayak et al., 2014). Las células microgliales son además agentes activos del proceso de sinaptogénesis, regulando el establecimiento de las conexiones sinápticas en función de su actividad mediante el proceso de “poda sináptica” (Ji et al., 2013, Nayak et al., 2014). La microglía está también implicada en la formación del nervio óptico y su fasciculación (Rodríguez-Gallardo et al., 2005), así como en la formación de los vasos sanguíneos en la retina (Checchin et al., 2006).

ASTROCITOS.

Si bien inicialmente se pensaba que la función principal de los astrocitos era la de sostén y soporte trófico de las neuronas, a día de hoy se sabe que también participan activamente en el desarrollo y la función del sistema nervioso (Tao and Zhang, 2014), con un amplio rango de funciones que varían desde el establecimiento de la barrera hematorretiniana en la cara interna de la retina y el mantenimiento de la homeostasis iónica en el espacio intercelular, al mantenimiento del tono vascular, la plasticidad sináptica y la comunicación neuronal (Volterra and Meldolesi, 2005, Clarke and Barres, 2013, Bernardinelli et al., 2014). En etapas tempranas del desarrollo embrionario, los astrocitos participan en el proceso de angiogénesis de la retina (Gariano, 2003), por medio de la secreción de VEGF y formando la matriz extracelular que las células endoteliales usarán de guía durante su migración. (Pekny and Pekna, 2014).

4 - MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y NEUROGÉNESIS.

Para conseguir la sofisticada conectividad y arquitectura celular del sistema nervioso central hace falta que durante el desarrollo se produzca un proceso de muerte celular programada, finamente coordinado con los procesos de proliferación celular, salida del ciclo celular y diferenciación (Yeo and Gautier, 2004, Joseph and Hermanson, 2010).

La muerte celular programada (MCP) es el proceso mediante el cual la célula activa su propio suicidio, manteniendo intacta su membrana celular y evitando así dispersar restos tóxicos en el entorno. Es un proceso activo y genéticamente controlado, caracterizado por la fragmentación del DNA celular, picnosis, degradación de los componentes intracelulares, y fagocitosis por células vecinas o por macrófagos profesionales (Voyvodic et al., 1995, Thomaidou et al., 1997, Lewin, 2004, Yeo and Gautier, 2004, Buss et al., 2006).

La MCP se activa durante el desarrollo en la mayor parte del sistema nervioso central y periférico, y afecta a todos los tipos principales de células nerviosas, incluyendo motoneuronas, neuronas sensoriales, interneuronas, astrocitos y oligodendrocitos, así como a células gliales (Finlay and Slattery, 1983, Blaschke et al., 1996, Clarke et al., 1998, Cellerino et al., 2000, Kuan et al., 2000, Yuan and Yankner, 2000, Kaufmann and Hengartner, 2001, Taylor et al., 2003, Yeo and Gautier, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Buss et al., 2006, Lee and McKinnon, 2009, Southwell et al., 2012).

Muerte celular programada en el desarrollo del SNC.

La muerte celular programada juega un papel crítico en el establecimiento de las conexiones sinápticas: en la mayoría de especies de vertebrados, en torno a un 40% de las neuronas maduras son eliminadas por muerte celular programada durante el proceso de conexión con sus células diana en las etapas tardías del desarrollo embrionario, o incluso peri y postnatalmente (Miller, 1995, Valenciano et al., 2009). La **teoría neurotrófica** surgió como una explicación de esta apoptosis neuronal masiva. Establece que las neuronas, durante su desarrollo, compiten por cantidades limitantes de factores de supervivencia emitidos por otras neuronas aferentes, por células gliales, o por sus células diana (Gould and Oppenheim, 2001,

Oppenheim et al., 2001, Buss et al., 2006), de forma que aquellas que no los consiguen, degeneran, eliminándose por apoptosis. De esta manera, se optimiza la conectividad entre las neuronas y sus dianas (Dekkers et al., 2013).

Entre los factores difusibles que regulan la supervivencia o muerte de las neuronas durante su proceso de diferenciación, destacan el NGF (Levi-Montalcini, 1987, Frade and Barde, 1998, Nikolettou et al., 2010), el BDNF (Frade et al., 1997), y los factores IGF-I e Insulina/proinsulina (De Pablo et al., 1996, Diaz et al., 1999, Diaz et al., 2000, Camarero et al., 2003, Varela-Nieto et al., 2003, Yeo and Gautier, 2004, Rodriguez-de la Rosa et al., 2007).

Sin embargo, la muerte neurotrófica no es ni la única ni la primera fase de MCP que afecta a las poblaciones neuronales: una oleada apoptótica previa afecta específicamente a los precursores neurales y a las neuronas postmitóticas inmaduras durante el desarrollo embrionario (Blaschke et al., 1996, de la Rosa and de Pablo, 2000, Yeo and Gautier, 2004, Valenciano et al., 2009, Chavarria et al., 2013). Como hemos demostrado en nuestro laboratorio, la envergadura de este proceso de muerte neural temprana es igual o superior a la de muerte neurotrófica (Valenciano et al., 2009); y se corrobora con modelos matemáticos, que predicen que la correcta generación del sistema nervioso requiere de la muerte del 50% o más de los progenitores neurales (McConnell et al., 2009).

La importancia de este proceso de muerte neural temprana se manifiesta en los modelos mutantes carentes de alguna de las proteínas clave del proceso apoptótico. Se ha comprobado que la desregulación del proceso de muerte celular programada conduce a numerosas patologías (Yuan and Yankner, 2000, Kaufmann and Hengartner, 2001, Mayordomo et al., 2003), que resultan especialmente evidentes en etapas tempranas del desarrollo embrionario y afectan de manera específica al sistema nervioso. (Tabla 1). En ratones nulos para genes implicados en la apoptosis se observan defectos en los procesos de proliferación y diferenciación neural temprana (Yeo and Gautier, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Valenciano et al., 2009) y se refleja en numerosas malformaciones neurales, incluyendo hiperplasia cerebral, exencefalia, defectos en el tubo neural y en la retina que, en muchos casos, conducen a letalidad embrionaria o perinatal del ratón (de la Rosa and de Pablo, 2000, Boya and de la Rosa, 2005). Estos estudios demuestran que la muerte neural temprana es un proceso fisiológico estrictamente necesario para la formación del sistema nervioso y la supervivencia del individuo.

TABLA 1.1. IMPACTO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA ELIMINACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA EJECUCIÓN Y MODULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

Modificado a partir de (Boya and de la Rosa, 2005, Frappart and McKinnon, 2008).

Gen eliminado	Letalidad	Fenotipo neural	Fenotipo celular
Caspasa 3	1-3 semanas (Depende de la cepa; no se observa en c57BL/6J).	Hiperplasia cerebral. Exencefalia. Aumento de conjuntos de neuronas ectópicas.	Reducción de la apoptosis de precursores neurales y neuronas postmitóticas inmaduras. Incremento del número de células del córtex, estriado, hipocampo, cerebelo y retina.
Caspasa 9	Perinatal.	Hiperplasia cerebral. Extrusión de parte del cerebro.	Reducción de la apoptosis e incremento del número de células en la mayor parte del SNC.
Caspasa 2	Viable.	No se han detectado alteraciones severas.	Incremento de la apoptosis de motoneuronas faciales.
Caspasa 8	E12,5.	Defectos en el tubo neural.	Menor expresión de genes neurogénicos.
Bcl-X	E13,5.	Reducción del tamaño del cerebro.	Incremento de apoptosis en neuronas postmitóticas de la médula espinal, ganglios de la raíz dorsal y cerebro en desarrollo.
Bax y Bak	Perinatal.	Hiperplasia cerebral, sordera, defectos de comportamiento (fallos de succión).	Disminución de la apoptosis. Mayor número de células en regiones ricas en progenitores neurales y células madre: regiones periventriculares, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio, línea media dorsal y mesencéfalo.
Citocromo C	E15,5 / Perinatal.	Malformaciones cerebrales.	Reducción de la apoptosis. Expansión de la corteza y el mesencéfalo. Aparición de masas de células proliferativas ectópicas.
Apaf 1	E16,6 (depende de la cepa).	Malformaciones en prosencéfalo, espina bífida, anomalías en el oído interno y retina.	Disminución de la muerte celular programada de progenitores neurales y neuronas postmitóticas inmaduras.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA

Una de las regiones del sistema nervioso central donde mejor se han caracterizado las oleadas de muerte celular durante el desarrollo es la retina de vertebrados (Voyvodic et al., 1995, Mayordomo et al., 2003, Varela-Nieto et al., 2003, Valenciano et al., 2006, Valenciano et al., 2009, Chavarria et al., 2013).

La muerte celular programada es también determinante de la estructura y la conectividad del sistema óptico (Cellerino et al., 2000, de la Rosa and de Pablo, 2000, Buss et al., 2006) al ser necesaria durante la neurogénesis de los distintos tipos celulares de la retina (Valenciano et al., 2009, Reese, 2011, Francisco-Morcillo et al., 2014). La muerte celular programada en la retina se puede dividir en tres fases distintas (Fig. 1.7): la muerte morfogénica, que elimina principalmente células neuroepiteliales; la muerte neural temprana, que afecta a neuroblastos recién salidos del ciclo celular y neuronas inmaduras, y la muerte neurotrófica, comentada

anteriormente (de la Rosa and de Pablo, 2000, Baleriola, 2008, Valenciano et al., 2009, Baleriola et al., 2010, Francisco-Morcillo et al., 2014).

La muerte morfo genética se presenta durante el desarrollo temprano de la retina (E10-E15), en la región ventral de la misma, y se asocia al proceso de fusión de los bordes de la fisura óptica (Valenciano et al., 2009). **La muerte neural temprana** es una fase que se presenta fundamentalmente en la región dorso-central de la retina en desarrollo y coincide con el inicio de la neurogénesis (de la Rosa and de Pablo, 2000, Masland, 2001, Marquardt and Gruss, 2002). entre E12,5 y E17,5. Afecta a algunos precursores neuroepiteliales, aún proliferativos, y a neuroblastos recién salidos del ciclo celular, coincidiendo con el inicio del proceso de diferenciación de las células ganglionares (de la Rosa and de Pablo, 2000, Erskine and Herrera, 2007, Valenciano et al., 2009, Chavarria et al., 2013, Francisco-Morcillo et al., 2014) (Fig. 1.7). **La muerte neurotrófica** afecta a gran parte de las neuronas diferenciadas de la retina durante el contacto con sus dianas primarias (E18,5-P2) (Fig.1.7). (Buss et al., 2006, Valenciano et al., 2009).

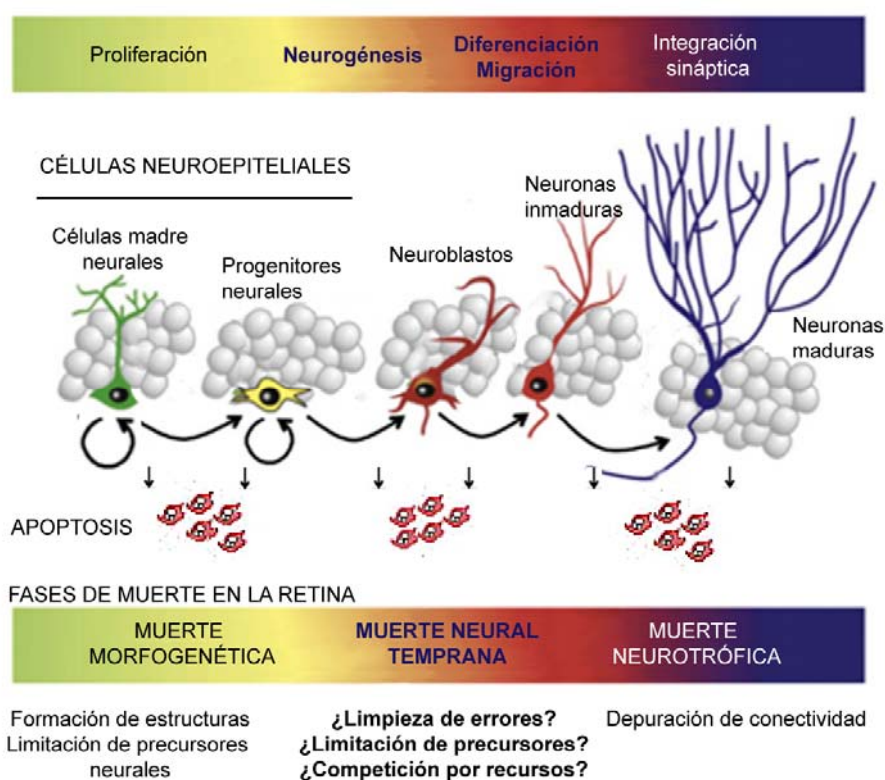


FIGURA 1.7 – MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO. FASES DE MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA RETINA.

Se especifican las funciones propuestas para cada fase de muerte celular. Modificado de (de la Rosa and de Pablo, 2000) y (Buss et al., 2006).

Muerte neural temprana y roturas del DNA.

La función de la fase de muerte celular que afecta a los neuroblastos recién salidos del ciclo celular y neuronas postmitóticas no está clara. Se ha intentado explicar su origen aplicando la teoría neurotrófica, postulando que se deba a la competición por diversos factores secretados por células diana (Buss et al., 2006). Si bien esta teoría tiene gran número de seguidores, no explica toda la apoptosis observada durante el desarrollo (Buss et al., 2006, Dekkers and Barde, 2013).

Parte de la apoptosis observada durante el desarrollo es independiente de factores externos, y depende fundamentalmente del momento de generación de la neurona (Galli-Resta and Ensini, 1996, Southwell et al., 2012). Este hecho se demostró a partir de dos grandes estudios: en experimentos con interneuronas corticales, Southwell observó que el 35-40% los neuroblastos recién diferenciados morían sistemáticamente dos semanas después de su generación por muerte celular programada, tanto *in vivo*, como *in vitro*. El momento de la muerte se mantenía incluso después de ser transplantadas a un embrión de diferente edad, donde, si dependiera de factores externos, las células implantadas deberían morir a la vez que las del organismo hospedador. Sin embargo, las células morían en función del momento en el que hubieran sido generadas, en porcentajes similares en los tres casos (*in vivo*, *in vitro* y tras el trasplante heterocrónico). Además, se comprobó que este proceso de muerte celular programada era independiente de neurotrofinas (Southwell et al., 2012). Estos resultados coinciden con un estudio previo realizado por Galli-Resta sobre el sistema óptico: las células ganglionares también parecen seguir un reloj celular que conduce a la muerte celular programada de gran parte de ellas 5 días después de su generación, independiente de la edad en la que se generen, observándose resultados similares con células procedentes de embriones de E13 a E21 (Galli-Resta and Ensini, 1996). En conjunto, ambos estudios demuestran que hay un grupo de neuronas en los que la muerte celular programada se produce como consecuencia de procesos intrínsecos de la propia célula, aunque se desconoce qué alteración interna activa la muerte celular.

La función más conocida de la muerte celular programada fuera del sistema nervioso consiste en actuar como mecanismo de defensa, eliminando las células dañadas o anormales que pudieran comprometer la supervivencia de sus vecinas o incluso del organismo completo (Buss et al., 2006). Se ha propuesto que la muerte celular podría actuar también como un mecanismo de eliminación de células defectuosas en el sistema nervioso (Cellerino et al., 2000, Buss et al., 2006), como aquellas con inestabilidad genómica (Clarke et al., 1998, Cellerino et al., 2000, de la Rosa and de Pablo, 2000, Oppenheim et al., 2001, Rehen et al., 2001, Yang et al., 2003).

TABLA 1.2 – IMPACTO EN EL SISTEMA NERVIOSO E IMMUNE DE LA ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REPARACIÓN DE DDSBS.

Se resume el fenotipo encontrado en diferentes mutantes murinos nulos y en mutantes espontaneos humanos de proteínas implicadas, principalmente, en la reparación de roturas que afectan a la doble cadena del DNA. Modificado a partir de (Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Woodbine et al., 2014). Cuando se ha utilizado alguna referencia externa a estas, se indica en el texto. E-Día de desarrollo embrionario; SNC-Sistema nervioso central; SNP-Sistema nervioso periférico; Ig-Inmunoglobulina.

GEN MUTADO (Y FUNCIÓN)	FENOTIPO NEURAL EN RATÓN	FENOTIPO EN HUMANOS	
		Sistema inmune y estabilidad del genoma	Sistema Nervioso
LIG IV (Sellado de roturas de DNA)	Letal en E14-E16 (según autor). Incremento de apoptosis en neuronas postmitóticas inmaduras. Acelularidad en SNC y SNP.	Inmunodeficiencia, (Células T y B residuales) Pancitopenia, Linfomas, leucemia.	(Solo se conocen mutantes hipomorfos). Microcefalia (no progresiva tras el nacimiento). Retraso del desarrollo.
XLF/Cernunnos (Sellado de roturas de DNA)	Viable. Elevada inestabilidad genómica espontánea, gran número de traslocaciones (Zha et al., 2007)	Inmunodeficiencia (Células T y B residuales). Neutropenia. Anemia macrocítica. Autoinmunidad.	Polimicrogria. En mutantes hipomorfos: Microcefalia. (no progresiva tras el nacimiento).Retraso del desarrollo. Traslocaciones cromosómicas.
XRCC4 (Sellado de roturas de DNA)	Letal en E14,5. Incremento de apoptosis en neuronas postmitóticas inmaduras. Acelularidad en SNC y SNP.	Inestabilidad genómica. Hipersensibilidad a la radiación. Predisposición a cáncer (Rosin et al., 2015).	Microcefalia. Retraso en el desarrollo. (Rosin et al., 2015).
Poi β (Restauración de nucleótidos perdidos)	Letalidad neonatal. Incremento de apoptosis en neuronas postmitóticas inmaduras. Apoptosis en SNC y SNP. Inestabilidad genómica.	Inestabilidad genómica (Sobol, 2012)	Actividad reducida en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Weissman et al., 2007).
DNA-PK (Nucleasa. Procesamiento de extremos.Interacción con ciclo celular)	Viable. Incremento de apoptosis en neuronas postmitóticas inmaduras de la retina (Baleriola et al., 2010). Si se combina con ausencia de Poi β, letal en E11,5, desarrollo embrionario ralentizado y apoptosis neuronal masiva.	Inmunodeficiencia. Ausencia de células T y B.(Fulop and Phillips, 1990, Shultz et al., 1995).	Microcefalia. Retraso del desarrollo. Degeneración neural progresiva. Reducción de los telómeros.(van der Burg et al., 2009, Woodbine et al., 2013)
Artemis (Nucleasa. Procesamiento de extremos)	Viable. Hipersensibilidad a radiación. Inestabilidad genómica, incluyendo fusiones teloméricas (Rooney et al., 2003).	Inmunodeficiencia progresiva, llegando a ausencia de células T y B. Infecciones recurrentes. Autoinmunidad. Leucemia. Carcinomas no linfoides.	No se conoce.
MRE11/NBS1-1/RAD50 (Sensores de daño a DNA)	Letales a E6. Gran inestabilidad genómica.(Zhu et al., 2001, Buis et al., 2008).	Predisposición a linfomas.	Síndrome de roturas de Nijmegen (NBS). Microcefalia. Ataxia.
ATM (Sensor de daño al DNA. Interacción con ciclo celular).	Viable. Retraso del desarrollo. Disfunción neurológica. Pérdida selectiva de una subpoblación de neuronas dopaminérgicas (Eilam et al., 1998). Hipersensibilidad a radiación (Barlow et al., 1996).	Disminución o ausencia de IgE, IgA e IgG2. Inestabilidad genómica. Predisposición a linfomas.	Ataxia, neurodegeneración progresiva. Pérdida de telómeros,
KU 70/80 (Reconocimiento de lesiones al DNA.).	Viable. Incremento de apoptosis en neuronas potsmitóticas inmaduras, especialmente en la retina (Gu et al., 2000, Karanjawala et al., 2003).	No hay descritos mutantes humanos en ninguna de las subunidades de Ku. Se sospecha que causa letalidad embrionaria por inestabilidad telomérica (Wang et al., 2009).	

A este respecto, diversos estudios sugieren una asociación entre la muerte neural temprana y las vías de reparación del DNA (Gao et al., 1998, Chun and Schatz, 1999, Gilmore et al., 2000, Lee and McKinnon, 2000, Orii et al., 2006, Katyal and McKinnon, 2007, Lee and McKinnon, 2007, El Waly et al., 2014). Esta interrelación se deduce de las observaciones de animales con deficiencias en genes de reparación de roturas de DNA de doble hebra: la mayoría presentan un incremento dramático de la MCP en tejidos neurales, lo que implica que las proteínas de reparación del DNA son necesarias para la viabilidad de las neuronas (Gao et al., 1998, Boya and de la Rosa, 2005, McKinnon and Caldecott, 2007, Barzilai et al., 2008).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, cobra especial importancia la reparación de roturas que afectan a progenitores neurales y a neuronas recién diferenciadas, (ver (Barzilai and McKinnon, 2013) y los artículos que menciona), como se evidencia por la temprana edad de letalidad de los ratones mutantes en las vías de reparación del DNA en especial por NHEJ. Además, en mutantes de esta vía (tanto murinos como humanos) es frecuente encontrar inestabilidad genómica, y afectación de neuronas postmitóticas inmaduras (Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Frappart and McKinnon, 2008, McKinnon, 2009) (Tabla 1.2). Estos mutantes también suelen compartir alteraciones de los tejidos linfoides; sin embargo, el resto de órganos y tejidos no se encuentran tan afectados. Todo parece indicar que el sistema nervioso, al igual que el inmune, es más propenso que otros a acumular roturas en el DNA durante su desarrollo (McKinnon, 2009, Barlow et al., 2013), y que defectos en su reparación podrían subyacer al proceso de muerte neural temprana (Gao et al., 1998, Chun and Schatz, 1999, Gilmore et al., 2000, Boya and de la Rosa, 2005, Baleriola, 2008, McKinnon, 2009, Baleriola et al., 2010, Jeppesen et al., 2011).

Una evidencia directa de la asociación de generación de roturas del DNA con la diferenciación neural procede de los experimentos de Gatz con mutantes hipomorfos de NHEJ (Gatz et al., 2011). Se demostró que la generación de roturas del DNA se produce en regiones proliferativas del SNC, pero no siempre detiene el ciclo celular ni da lugar a la apoptosis inmediata de la célula. La existencia de un mecanismo específico de la neurogénesis para tolerar las roturas de DNA sugiere que estas deben ser bastante frecuentes durante la generación de las neuronas y que la reparación de las mismas por NHEJ está implicada en su supervivencia.

En la retina de ratón, las roturas de DNA son especialmente frecuentes, como se aprecia por la aparición de gran número de focos de reparación (γ H2AX positivos) durante la fase de muerte neural temprana, E14,5 (Fig. 1.8). Sin embargo, durante la fase de muerte neurotrófica, P2, aunque el número de células afectadas por procesos apoptóticos es similar a la observada durante la fase anterior, hay una menor cantidad de células con focos de reparación (Fig.1.8) (Baleriola, 2008, Valenciano et al., 2009, Chavarria et al., 2013).

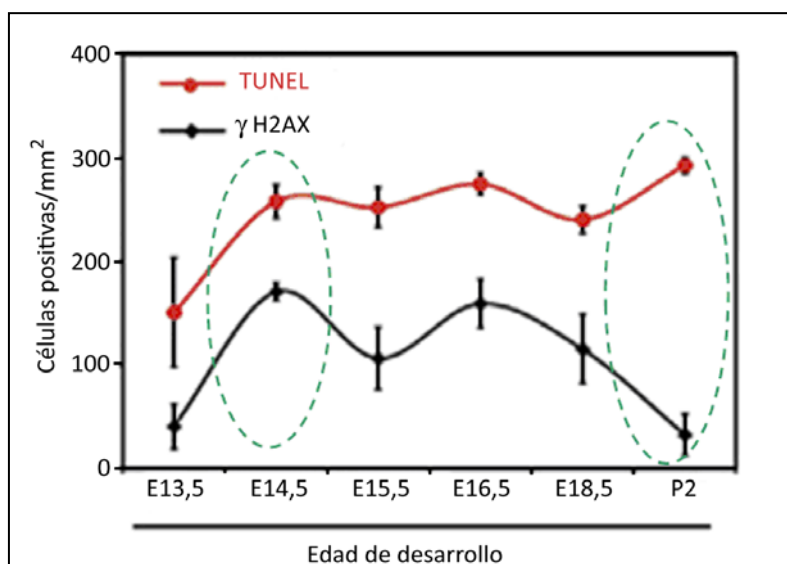


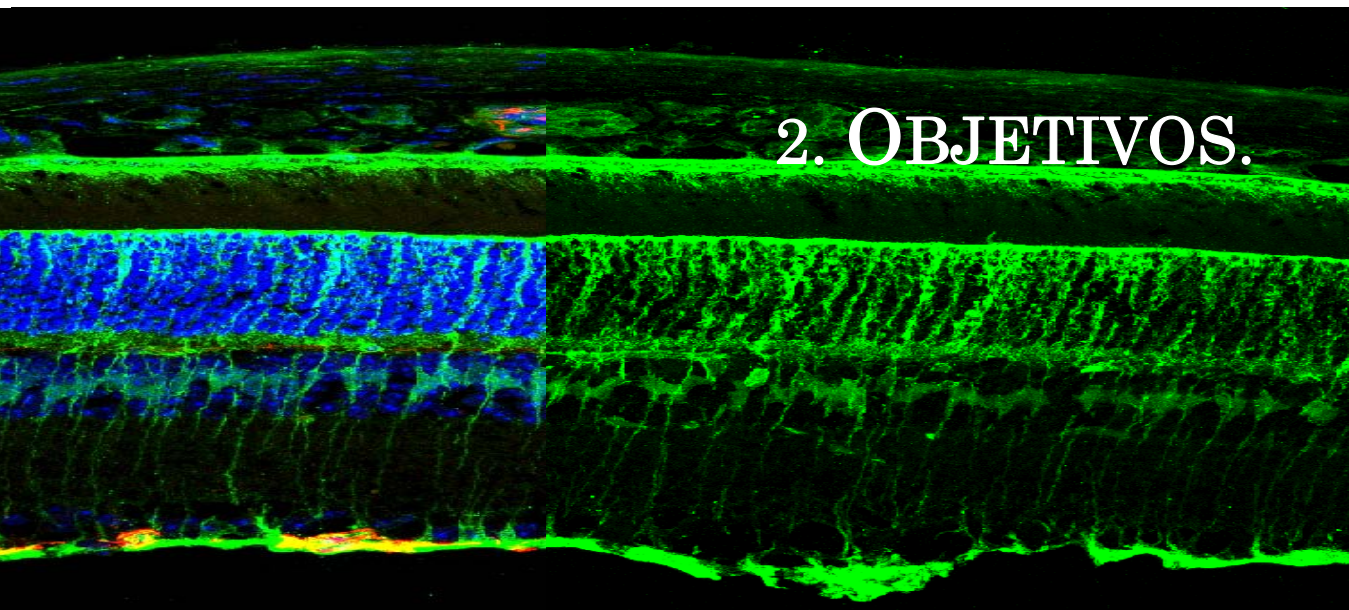
FIGURA 1.8 - RELACIÓN ENTRE MUERTE CELULAR Y ROTURAS DEL DNA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA MURINA.

Se representa en rojo la densidad de células apoptóticas (detectadas por la técnica TUNEL) y en negro, el número de focos de reparación de roturas de DNA (reconocidos por marcaje de γ H2AX) a lo largo del desarrollo embrionario de la retina de ratón. E-día embrionario. Modificado de (Baleriola et al., 2010)

Estos datos indican que, de manera fisiológica, se producen roturas en el DNA durante una fase concreta del desarrollo embrionario de la retina. Sin embargo, aún se desconoce el origen de estas roturas, es decir, si se producen de manera selectiva o no, si tienen alguna función en el desarrollo del sistema óptico y si podrían estar relacionadas con mecanismos eliminación de errores (Gilmore et al., 2000, Yeo and Gautier, 2004, Buss et al., 2006).

Resultados previos de nuestro grupo demostraron la presencia de proteínas de la vía de NHEJ en la retina (Baleriola, 2008, Baleriola et al., 2010) así como la importancia de la DNA-PKcs en la supervivencia de neuronas ganglionares recién diferenciadas (Baleriola et al., 2010), apoyando un posible papel de la vía de NHEJ en la neurogénesis temprana de la retina. Dada la gran flexibilidad de la vía NHEJ, su baja fidelidad y su participación en la generación de diversidad del sistema inmune, diversos autores se han centrado en analizar su importancia durante la neurogénesis y su relación con las fuentes de recombinación somática (Chun and Schatz, 1999, Rehen et al., 2001, Orii et al., 2006, Baleriola, 2008, Baleriola et al., 2010), proyecto en el que también se enmarca esta Tesis Doctoral.

2. OBJETIVOS.

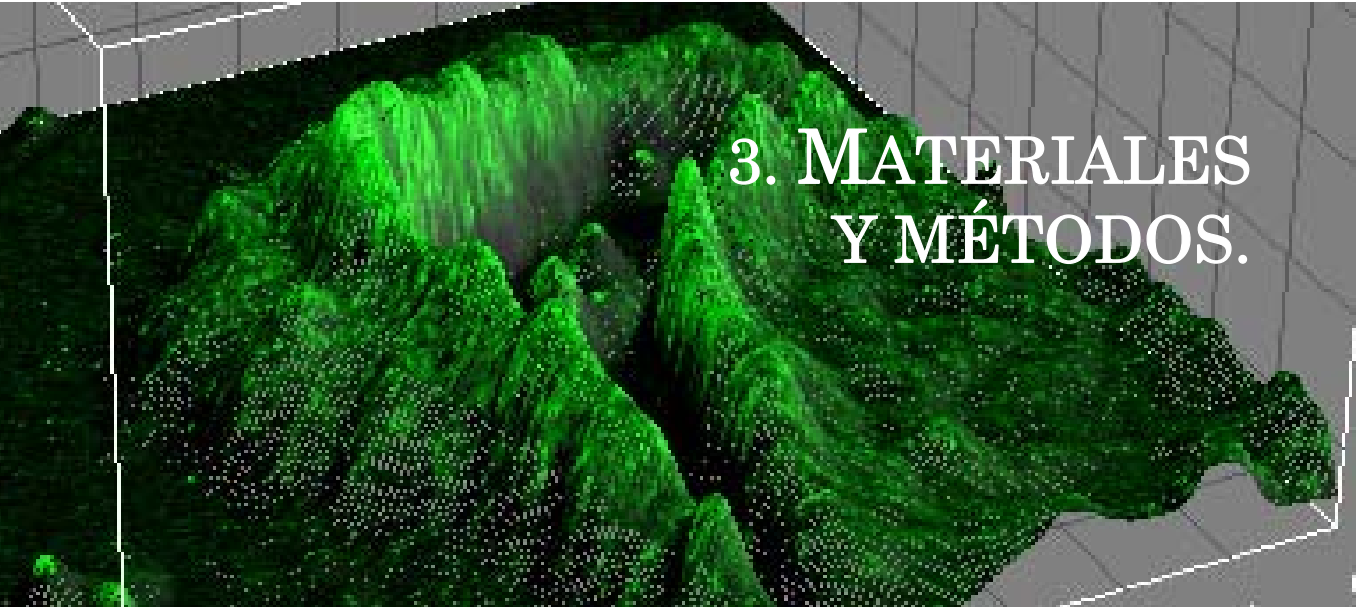


2. OBJETIVOS.

El objetivo global de este proyecto de Tesis Doctoral es avanzar en la comprensión de cómo intervienen los mecanismos de generación y reparación de roturas de doble hebra del DNA en el desarrollo del sistema nervioso, empleando la retina murina como modelo. Más concretamente, estudiamos cómo estos mecanismos afectan a los procesos de muerte celular temprana, a la neurogénesis y a la diferenciación de las neuronas en las etapas tempranas del desarrollo de la retina.

Para ello, este objetivo general se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la función *in vivo* e *in vitro* de la quinasa DNA-PKcs en el desarrollo temprano de la retina.
2. Caracterizar la función *in vivo* e *in vitro* de la DNA polimerasa μ en el desarrollo temprano de la retina de ratón, y valorar sus implicaciones en la retina adulta.
3. Estudiar *in vivo* e *in vitro* la función de la endonucleasa RAG-2 en el desarrollo temprano de la retina murina.
4. Caracterizar la presencia del retrotransposón LINE-1 en el DNA de las células de la retina murina en comparación con otros tejidos y su posible modulación por la vía NHEJ.



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

1-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Este trabajo se ha llevado a cabo en la retina embrionaria murina, fundamentalmente en embriones de 13,5 días de gestación (E13,5), aunque ocasionalmente se estudiaron también otras edades (E14,5, E18,5), neonatos (P2) y adultos (P90).

Para la estimación de la edad de los embriones (E), se consideró la mañana de la aparición del tapón vaginal como 0,5 días de desarrollo embrionario (E0,5). Una vez verificada la gestación por palpación, se comprobó el estadio real de desarrollo de los embriones bajo la lupa de aumento, conforme a los criterios establecidos por Theiler (1989) para el desarrollo embrionario murino. Para la estimación de edades postnatales (P), se tomó como tiempo cero el día del nacimiento (P0).

Todos los animales se utilizaron conforme a la normativa en vigor para el manejo animal de la Unión Europea, minimizando el número de animales necesarios por experimento. Los ratones se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a temperatura constante de 22 °C, con comida y bebida *ad libitum*, evaluándose mensualmente la ausencia de enfermedades en la sala de cría.

Cepas y colonias de ratones utilizadas.

En el presente trabajo se analizaron dos modelos mutantes de proteínas de NHEJ: el ratón *SCID*, mutante en *prkdc*, que codifica la kinasa DNA-PKcs; y el ratón *pol μ^{-/-}*, nulo para la DNA polimerasa μ . También se analizó un mutante nulo para una de las subunidades de la recombinasa RAG-1,2 del sistema inmune, el ratón *rag 2^{-/-}*. Cada una de las colonias mutantes se estudió en un fondo genético diferente. La tabla 3.1 especifica cada uno de estos modelos, su fondo genético, la mutación que portan y su procedencia. Todos los experimentos se realizaron en paralelo con animales silvestres del mismo fondo genético que el mutante analizado.

TABLA 3.1 – ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

CEPA	ORIGEN	PERFIL GÉNICO	FENOTIPO CONOCIDO
Balb/C (Balb/C JHA)	Harland, Reino unido.	Cepa silvestre de <i>SCID</i> (WT-1)	-
C57BL/6 (C57BI/6J)	Charles Rivers, España.	Cepa silvestre de <i>pol μ^{-/-}</i> (WT-2)	-
C57BI/10 (C57BI/10JCrI)	Charles Rivers, Francia.	Cepa silvestre de <i>rag 2^{-/-}</i> (WT-3)	-
SCID (Balb/C JHA ^{hsc-} <i>prkdc</i> SCID)	Harland, Reino unido	Una mutación puntual espontánea en el gen <i>prkdc</i> (transversión de T a A a nivel de la tirosina 4016) produce un codón de parada prematuro, lo que da lugar a una versión truncada y no funcional de la DNA-PKcs. (Araki et al., 1997) (Blunt et al., 1996)	Elevada radiosensibilidad e inmunodeficiencia severa: los homocigotos carecen de linfocitos T y B funcionales, presentan linfopenia e hiperglobulinemia (Shultz et al., 1995). Incremento en la apoptosis de neuronas recién diferenciadas durante el desarrollo de la retina (Baleriola et al., 2010).
<i>pol μ^{-/-}</i> (C57BI/6J Polm ^{tm1Abnd})	Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid. Cedidos por los doctores Luis Blanco y Antonio Bernad en fondo c57b6.SJL).	Contienen una delección del dominio PolX de la DNA polimerasa μ (Mu) que comprende la eliminación completa de los exones 7 a 9 y un truncamiento de los exones 6 y 10 del gen. (De Lucas, 2005, Eur. J. Immunol.)(Lucas et al., 2009).	Defectos en el desarrollo hematopoyético. Los homocigotos presentan inmunodepresión y, en menor medida, daños celulares en hígado, riñón, pulmón y fibroblastos embrionarios (Dominguez et al., 2000, Bertocci et al., 2003, Lucas et al., 2005). La retina embrionaria murina también se encuentra afectada (Baleriola, 2008). Durante el envejecimiento, mantienen la capacidad regenerativa del hígado y sus habilidades cognitivas durante más tiempo que sus controles silvestres (Lucas et al., 2013, Escudero et al., 2014)
<i>rag 2^{-/-}</i> (C57BI/10 SnJ ^{rag2^{-/-}})	Producidos por Taconic, (Hudson, NY), cedidos por el Dr. José Alberto García (CIB, Madrid)	Contienen una interrupción del gen activador de la recombinación 2 (<i>Rag2</i>), caracterizada por la delección de 286 de los 521 aminoácidos de la proteína y su sustitución por el gen <i>pmc1neo</i> . (Shinkai et al, Cell, 1992).	Los homocigotos presentan una incapacidad absoluta para iniciar la recombinación V(D)J y no son capaces de generar linfocitos T ni B maduros. (Shinkai et al., 1992) Su falta afecta al desarrollo de la retina murina (Baleriola, 2008).

Aunque las mutaciones estudiadas son comunes a las utilizadas en trabajos previos del laboratorio (Baleriola, 2008, Baleriola et al., 2010), en algunos casos las colonias empleadas fueron derivadas a otro fondo genético. En concreto:

- Se derivó la línea *pol* μ^{-} de fondo c57BL6.SJL (portador del haplotipo CD45.2, receptor de la proteína-tirosín fosfatasa, *ptprc*) a fondo C57BL/6J (con haplotipo CD45.1+) por transferencia de embriones en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Todos los experimentos en el presente trabajo están hechos en ésta nueva colonia, en la que se comprobó la ausencia de virus y persistencia del fenotipo apoptótico.
- La línea con la mutación *rag* 2^{-} fue generada en el fondo genético C57BL/10 SnJ. Como carecíamos de esta cepa silvestre, realizamos dos abordajes para igualar el fondo genético de los animales silvestres y mutantes:
 - en el primero, obtuvimos cruces de C57BL/10SnJ^{*rag2*^{-/-}} por C57BL/10CrI y estudiamos el fenotipo en la F2, comparando hermanos de camada silvestres y mutantes. La mayor parte de los datos del ratón *rag2*^{-/-} presentados en el presente trabajo se generaron por medio de este método.
 - El segundo, retrocruzamos animales C57BL/10SnJ^{*rag2*^{-/-}} con C57BL/6J, para llevar la mutación a un fondo conocido en el que sí dispusiéramos de la estirpe silvestre. Se comprobó el fenotipo de los ratones tras 5 y 10 generaciones de retrocruce.

Genotipado de animales.

Para genotipar los ratones del estudio, se realizaron PCRs convencionales a partir de DNA genómico extraído de un fragmento de la cola.

La extracción de DNA se realizó por el método descrito por Miller y Dikes en 1988 (Miller et al., 1988). Se digirieron las colas durante toda la noche a 55 °C en tampón de digestión (Tris Clorhídrico 40 mM pH 8,0, SDS 0,5% (p/v) (ambos de ICN biomedical, Santa ana, California, E.E.U.U.), EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) 20 mM y cloruro sódico 200 mM (ambos de Merk, Darmstad, Alemania)) con proteinasa K a 1,4 U/ml (Roche, Mannheim, Alemania). Se añadió cloruro sódico a una concentración final de 2 M, se dejó sedimentar el DNA en hielo y se centrifugaron las muestras a 12000 r.p.m., durante 10 minutos. Se precipitó el DNA a partir de 500 μ l del sobrenadante con dos volúmenes de etanol absoluto (Merk). Tras lavar el pellet resultante con etanol al 70% (v/v), se dejó secar y se resuspendió en agua destilada para su análisis, cuantificando su concentración con ayuda de un espectrofotómetro (todos los aparatos utilizados en este estudio pueden consultarse en la tabla 3.7).

Para la amplificación por PCR se partió de 200 a 500 ng de DNA por muestra utilizando el kit de Taq Polimerasa de Invitrogen (Paisley, Reino Unido), acorde a las instrucciones del fabricante. Los cebadores, temperaturas y número de ciclos se detallan en las tablas 3.2 y 3.3 a continuación. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) (Pronadisa, laboratorios Conda, Madrid, España) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (100 mM) (Fluka Biochemika, Buchs, Suiza)

TABLA 3.2 – CEBADORES Y AMPLICONES OBTENIDO EN LAS REACCIONES DE GENOTIPAJE.

CEPAS	CEBADORES (5'- 3')	AMPLICONES ESPERADOS
<i>rag2</i> ^{-/-} vs C57BL/10	Drag → ggagggatttcattggaggt UintronRag → atgaaaagatattctaagtattgcg	WT- 1585 pb HT- 1585+1800pb KO- 1800 pb
SCID vs BalbC	Multiplex (Ver Maruyama et al, 2002) F→ gagaaaaggcggatcatggactcaagaataaatgtaacg R→ cctaagagtcactttctcatttacacagtgaggagtc MF→ tggatccacaacataaaaatagcctaa WR→ tggcccctgctaacttttctcttagca	WT- 228pb + 100 pb HT- 228pb+179pb+100 pb KO-228pb+179pb
<i>polμ</i> ^{-/-} vs C57BL/6	Genotipaje por dos PCRs independientes: PCR1 -Gen de Pol μ (amplicón de 1120 pb) Mu 2486→ ggc ctg tca cag tgc aat aa Mu 3150 → ggc tca gct acc tgc aaa aa PCR2 -Casete de resistencia a neomicina (317pb) Neo S1 → gga gag gct att cgg cta tga c Neo AS2→ cgc att gcg cat cag cca tga tgg	WT - 1120 pb HT - 1120 pb+317 pb KO- 317 pb

TABLA 3.3 - PROGRAMAS DE PCR USADOS EN LAS REACCIONES DE GENOTIPAJE.

Gen a genotipar	Tiempo y temperatura					
	Nº Ciclos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final
<i>rag 2</i>	30	94 °C, 1 min	94 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 2 min	72 °C, 10 min
<i>prkdc</i> (DNA-PKcs)	38	94 °C, 2 min	94 °C, 30 s	60 °C, 30 s	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
<i>pol μ</i>	35	95 °C, 5 min	95 °C, 1 min	45 °C, 30 s	72 °C, 45 s	72 °C, 10 min

2-OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE TEJIDOS.

Para la recogida de embriones en los estadios de desarrollo E13,4, E14,5 y E18,5, se procedió a la eutanasia de la madre por dislocación cervical, se extrajeron los embriones por cesárea y se depositaron en PBS (Tampón fosfato salino 10 mM, Tabla 3.8) en hielo hasta su procesamiento. Los embriones se decapitaron y se aislaron, según el tipo de experimento, solo las retinas, o bien la cabeza completa, o bien el conjunto de la retina, el hígado, el cerebro y el corazón.

Se realizaron experimentos puntuales con tejidos de animales postnatales de animales de dos días (P2) y de tres meses de edad (en torno a P90). En estos casos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación y se recogieron, según el experimento, sólo sus retinas, o bien el ojo completo, o bien el conjunto de la retina, el hígado, el músculo, el hipocampo, el cerebro y el corazón.

La extracción y procesamiento de las retinas fue diferente en función del uso posterior como se especifica a continuación.

Recogida de tejidos para extracción de DNA y *Western blot*.

TEJIDOS EMBRIONARIOS.

Las retinas se disecaron en PBS frío con ayuda de unas pinzas, entrando al ojo desde la cornea, levantando el cristalino y separando la retina del epitelio pigmentario. El tejido resultante se congeló inmediatamente a -80 °C.

En el caso del cerebro, tras la decapitación, se abrió la cabeza desde la nuca, se retiró la piel y las placas craneales, con cuidado de no dañar el tejido subyacente y se recogió todo el contenido cerebral, procediendo inmediatamente a su congelación a -80 °C. En el caso de hígado y corazón, se separaron los órganos enteros del tejido circundante con ayuda de unas pinzas de disección y se congelaron inmediatamente a -80 °C.

TEJIDOS POSTNATALES.

Los ojos se enuclearon con ayuda de unas pinzas de disección curvas. Para extraer la retina, se realizó una incisión en el *ora serrata*, se levantó la cornea, se extrajo el cristalino y se eliminaron los restos de epitelio pigmentario adyacentes. La retina así extraída se lavó en PBS y se congeló inmediatamente a -80 °C.

El cerebro se extrajo posteriormente con ayuda de unas pinzas, congelándolo de inmediato. Para extraer el hipocampo, se mantuvo el cerebro en la cavidad craneal y se realizaron dos incisiones de un milímetro de profundidad, aproximadamente, una a lo largo del extremo de cada hemisferio cerebral y otra a lo largo del ventrículo lateral. Tras retirar el cortex cerebral, se recogió el hipocampo con ayuda de unas pinzas y se congeló a -80 °C hasta su uso. Se recogieron también el corazón entero y un fragmento del lóbulo medial del hígado. Tras extraer los tejidos, estos se lavaron en PBS y se congelaron inmediatamente a -80 °C.

Montaje de retinas en plano.

RETINA EMBRIONARIA.

Las retinas se disecaron como se describe en el apartado anterior y se extendieron en plano sobre una membrana de nitrocelulosa negra (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Alemania). Para fijarlas a la membrana, se respuntearon los bordes con ayuda de unas pinzas finas. Las retinas se fijaron por inmersión en paraformaldehído de calidad de microscopía electrónica al 4% (p/v) en tampón fosfato de Sorensen 0,1M pH 7,4 (tabla 3.8) (en adelante, PFA al 4%) (TAAB, Berks, Inglaterra), manteniéndose en dicha solución durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron las membranas con PBS y se conservaron hasta su uso en PBS con azida sódica 15 mM (Riedel de Haën, Kennezeichnung, Alemania).

RETINA ADULTA.

Tras extraer las retinas como se describe en el apartado anterior se lavaron con PBS y se fijaron 24 horas a 4°C por inmersión en PFA al 4%, se lavaron con PBS y se mantuvieron en flotación a lo largo de las tinciones y tratamientos posteriores. Finalizados los tratamientos, en la periferia de la retina se realizaron cuatro cortes radiales equidistantes con ayuda de unas tijeras de microdissección, se colocó cada retina sobre un portaobjetos y se retiraron los restos

líquidos circundantes con ayuda de una micropipeta. Con ayuda de un pincel, se extendió cada retina sobre el cristal, se rodeó con Fluoromont G (Southern Biotech, Birmingham, EE.UU.) y se cubrió con un cubreobjetos de cristal (Menzel gläser, Braunschweig, Alemania), con cuidado de que la retina extendida no se doblara ni enrollase. Se dejó secar la muestra varias horas a temperatura ambiente y se conservó a 4 °C.

Criosección de tejidos.

OJO EMBRIONARIO.

Las cabezas de los embriones recién decapitadas se fijaron por inmersión en PFA al 4%, manteniéndose en dicha solución durante 24 horas a 4 °C. Se lavaron las cabezas con PBS y se crioprotegieron por inmersión 24+24 horas en gradientes de sacarosa del 15% al 30% (p/v) (Tabla 3.8) (Sigma, St. Louis, MO., EE.UU.) con azida sódica al 0,1% (p/v). Las cabezas se incluyeron en *Tissue Teck O.C.T. Compound* (Sakura Finetek, Tokio, Japón) y, tras congelarlas, se cortaron a -25 °C, en secciones de 10 micras de espesor. Las secciones se recogieron sobre portaobjetos con carga positiva Superfrost plus (Menzel Gläser), se dejaron secar a temperatura ambiente y se congelaron a -20 °C hasta su utilización.

OJO ADULTO.

Tras enuclear los ojos con ayuda de unas pinzas curvas, se realizó una incisión en la córnea y se fijaron en PFA al 4% de 2 a 24 horas a 4 °C. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron los ojos con PBS y se retiró el cristalino. Las muestras se crioprotegieron por inmersión 24+24 horas en gradientes de sacarosa del 15% al 30% (p/v) con azida sódica al 0,1% (p/v). A continuación, los ojos se incluyeron en *Tissue Teck O.C.T. Compound* a temperatura ambiente y se mantuvieron un mínimo de dos horas en agitación, se congelaron en hielo seco y se cortaron a -25 °C, en secciones de 10 micras de espesor. Las secciones se recogieron y conservaron como se describe en el apartado anterior.

3-TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO.

PCR cuantitativa a tiempo real.

Utilizamos este método para estimar los cambios en el número de copias del retrotransposón LINE-1 en diferentes tejidos de un mismo individuo (hígado, corazón, cerebro, hipocampo, retina). Para ello, comparamos en cada tejido la cantidad de copias de un gen normalizador altamente repetido en el genoma pero no móvil, como es el del RNA ribosómico 18S, frente al número de copias del retrotransposón LINE-1 (concretamente, de su marco abierto de lectura 2), altamente repetitivo y capaz de escindirse e insertarse en diferentes posiciones del genoma. Los cebadores utilizados para cada gen se especifican en la tabla 3.4 (Todos de Sigma).

La PCR cuantitativa permite cuantificar la cantidad de producto de PCR producido durante cada ciclo de amplificación a través de la incorporación de una sonda fluorescente. Se realizaron 40 ciclos de amplificación por reacción, con la sonda SYBRGREEN, de Roche.

El material de partida para este tipo de amplificación fueron 0,1 ng de DNA genómico extraído de distintos tejidos por el método de Miller y Dikes, tal como se describe en el apartado de genotipado. Una vez extrapolada la amplificación de cada gen a su recta patrón, se relativizó el número de copias de LINE-1 en cada tejido al de 18S por el método ΔC_t con gen de referencia (Schmittgen and Livak, 2008). Dentro de cada individuo se compararon diferentes tejidos (hígado, corazón, retina, hipocampo, cerebro). Para facilitar la interpretación de los datos, todos los valores obtenidos se normalizaron al número relativo de copias de LINE-1 en el hígado silvestre adulto.

TABLA 3.4 – CEBADORES Y AMPLICÓN OBTENIDO EN LAS REACCIONES DE PCR A TIEMPO REAL.

CEBADOR	AMPLICÓN	SECUENCIA
18S 1	118 pb	F→CAGCGTGTGCCTACCC
18S 2		R→CAAGCTTATGGCCCG
LINE-1 1	168 pb	F→TAAAGAACTCAAGAAGGTGG
LINE-1 2		R→AGGGTTGTTTTGATTTGC
LINE-1 3	351 pb	F→TATTCAAAGAATTAACCAAACGAGGAG
LINE-1 4		R→CCTGGGCTTTTTTGGTTGG

4-CULTIVOS CELULARES.

Cultivos primarios de células disociadas de la retina.

Las retinas se extrajeron en HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco, Lifetechnologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.) frío y a continuación se eliminaron las uniones intercelulares por digestión con tripsina al 0,1 U/ml (Worthington Biochemical Corporation, Sigma) en HBSS durante 10 minutos a 37 °C. Transcurrido dicho tiempo, las retinas se disociaron mecánicamente y se centrifugaron 10 minutos a 200g (1200 r.p.m.). Se determinó el número y viabilidad de las células contando una alícuota diluida (1:1) en azul de tripano (Sigma) en una cámara Neubauer. Para favorecer el cultivo, se pretrataron las cámaras de cultivo Permanox® de 2 cm² (Nalgene Nunc Internacional, Thermo Scientific, Rochester, NY, EE.UU.) durante 1 hora con poliornitina 0,15 mM (Sigma) y, tras lavar con PBS, durante otra hora con laminina 1,176 nM (Invitrogen). Se sembraron en ellas 80.000 células/cm² en medio DMEM-F12 (Gibco) suplementado con piruvato sódico 1 mM (Sigma), bicarbonato sódico 22 mM (Sigma), glutamina 2 mM (Gibco), penicilina/estreptomicina al 0,5% (v/v) (Gibco) y suplemento N-2 acorde a la formulación propuesta por Bottenstein (Bottenstein, 1988) (putrescina 100 µM, apotransferrina 1,32 mM (Sigma), progesterona 20 mM en etanol (Sigma), selenito sódico 30 nM (Sigma) e insulina a 27 mU/ml (Sigma)). Una vez distribuidas las células, se añadió el factor de crecimiento FGF-2 100 U/ml (Preprotech, EE.UU.), y su estabilizador, heparina, a 3,65 mU/ml (Serva, Heidelberg, Alemania). Las placas se incubaron 18 o 24 horas, a 37 °C, con un 5% (v/v) de CO₂. Transcurrido ese tiempo, los cultivos se fijaron añadiendo un volumen de paraformaldehído al 8% (p/v) en tampón fosfato de Sörensen 0.1M pH 7.4 (en adelante, PFA al 8%) durante 20 minutos y se lavaron con PBS, conservándose a 4 °C hasta su uso.

5-DETECCIÓN DE LA MUERTE CELULAR

Técnica TUNEL.

El TUNEL (*TdT mediated dUTP Nick-End Labelling*) es una técnica fluorométrica de detección de muerte celular programada. Detecta la fragmentación nuclear característica de las células apoptóticas mediante la actividad de la enzima TdT, una DNA polimerasa independiente de molde que incorpora en los extremos 3'-OH del DNA fragmentado un nucleótido (dUTP)

marcado con fluoresceína. Empleamos esta técnica para detectar las células apoptóticas en células disociadas y retinas montadas en plano. Para ello, utilizamos el kit *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* (Promega, Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se lavaron con PBS y se montaron con Fluoromont-G.

Cuando se combinó la detección de la muerte celular con la técnica de inmunofluorescencia, se siguió el protocolo de inmunofluorescencia hasta la incubación con el anticuerpo primario, a continuación se procesaron las muestras para la técnica TUNEL (eliminando el tratamiento con proteinasa K), y se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia con normalidad.

6-TÉCNICAS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

Immunodetección de proteínas en células y tejidos.

INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉLULAS DISOCIADAS DE TEJIDOS.

Las retinas, recién extraídas, se disociaron con Accutasa a 200-300 U/ml (Sigma) en HBSS, manteniéndolas durante 20 minutos a 37 °C. Las células terminaron de disociarse mecánicamente con ayuda de una pipeta p100 y se fijaron añadiendo un volumen de PFA al 8%, manteniéndose en agitación durante, al menos, 1 hora a 4° C. Tras la fijación, las células se recuperaron por centrifugación a 1200 r.p.m. y se lavaron con BSA al 0,3% (p/v) (Sigma) en PBS, tras lo cual, o se utilizaron inmediatamente o bien se conservaron en PBS con azida sódica al 0,1% (p/v), a 4 °C, hasta su utilización.

Con ayuda de una citocentrífuga (Cytospin3, Shandon), se centrifugaron alícuotas de 50 µl de células disociadas sobre un portaobjetos previamente tratado con una solución de poli-L-Lisina a 0,05 mg/ml (Sigma). Para la detección del antígeno nuclear de PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*), se sumergieron los portaobjetos con las células en metanol absoluto (Merk-Millipore, Billerica, MA., EE.UU.) inmediatamente tras la centrifugación, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las células con PBS y se bloquearon y permeabilizaron con una solución de suero normal de cabra (Sigma) al 15% (v/v) y Tritón X-100 (Sigma) al 0,2% (v/v) en PBS. Se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4 °C (el listado de anticuerpos primarios y su concentración de uso se detalla en la tabla 3.5) durante, al menos, 16 horas, tras lo que se lavaron con PBS y se incubaron durante, al menos, 1 hora a

temperatura ambiente, en solución de bloqueo con anticuerpos secundarios de la especie correspondiente al anticuerpo primario, unidos a fluoróforos tipo Alexa (A488, A568, A647, de Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Scientific). Tras varios lavados con PBS, las muestras se contrastaron con DAPI 2,85 μ M (4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) para detectar sus núcleos, se montaron con Fluoromont-G y se visualizaron por microscopía convencional y/o confocal.

INMUNOHISTOQUÍMICA EN RETINAS MONTADAS EN PLANO.

Las muestras fueron obtenidas y conservadas como se explica en la sección de montaje de retinas en plano. En la inmunotinción se siguieron en todo momento las recomendaciones de la casa comercial respecto a cada anticuerpo (ver tabla 3.5).

TABLA 3.5- ANTICUERPOS PRIMARIOS.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	NATURALEZA	DILUCIÓN
<i>BRAVO</i> (NrCAM)	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Policlonal de conejo	1/250 IF, 1/500 WB
Brn3a	Chemicon, Pittsburg, MA., EE.UU.	Monoclonal de ratón	1/50 IF
Cd68	Ventana Medical Systems (Roche), Tucson, Arizona, EE.UU.	Monoclonal de ratón	Sin diluir IF
CRALBP [B2]	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Monoclonal de ratón	1/50 IF
F4/80	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Policlonal de conejo	1/100 IF
GAPDH	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Monoclonal de ratón	1/5000 WB
GFAP	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca	Policlonal de conejo	1/500 IF
γ H2AX (Ser 139)	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Monoclonal de ratón	1/500 IF
γ H2AX (Ser 139)	Merk-Millipore, EE.UU.	Policlonal de conejo	1/500 IF
Islet 1/2	Developmental studies Hibridoma Bank, Iowa, EE.UU.	Monoclonal de ratón	1/200 IF
L1CAM	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Monoclonal de ratón	1/250 IF, 1/500 WB
PCNA	Delta Biolabs, CA, EE.UU.	Monoclonal de conejo	1/200 IF
PECAM-1 (89C2, CD-31)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, EE.UU.	Monoclonal de ratón	1/500 IF
Pol μ humana	Antisuero cedido por M ^a José Pereira y Luis Blanco (CBM)	Policlonal de conejo	1/200 IF
TUJ-1, anti β -III tubulina	Covance, Paris, Francia	Policlonal de conejo	1/1000 IF
Tuj-1, anti β -III tubulina	Covance, Paris, Francia	Monoclonal de ratón	1/5000 IF

WB-Western blot; IF- Inmunofluorescencia.

Algunos anticuerpos requieren tratamientos específicos para mejorar la exposición de los epítomos, sobre todo aquellos que requieren la exposición de epítomos nucleares. Los más usados fueron los siguientes:

- **REFIJACIÓN ÁCIDA:**
Aplicado a anti- γ H2AX: fijamos las retinas 10 minutos con una mezcla de etanol:acético en una proporción 95:5 (ambos de Merk-Millipore).
- **EXPOSICIÓN ÁCIDA:**
Aplicado a Islet1/2, CRALBP, Br3a: se calentaron las retinas en el microondas a baja potencia durante 5 minutos con una solución de tampón citrato 0,1 M, pH 6, procurando que no hirviera en ningún momento.

En todos los casos, tras los tratamientos específicos correspondientes, se lavaron las retinas con PBS y se permeabilizaron a temperatura ambiente con Tritón X-100 al 1% (v/v) en PBS (para el anticuerpo PECAM se usó Tritón X-100 al 5% (v/v)) durante 2 horas, cambiando la solución cada 30 minutos. Las retinas se bloquearon con BGT durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios (ver tabla 3.5) en solución de bloqueo a 4 °C durante, al menos, 16 horas.

Se lavaron las retinas con PBS, y se incubaron con DAPI 2,85 μ M para contrastar los núcleos, y con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos a fluoróforo disueltos en el buffer de bloqueo durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos con Fluoromont-G.

Las tinciones se visualizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia o en un microscopio confocal, mostrando en este trabajo la proyección máxima del grosor total de la retina obtenida a través de secciones ópticas de 0,75 a 2 μ m de espesor, en función del tipo celular estudiado.

INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES DE TEJIDOS.

Las muestras fueron obtenidas y conservadas como se explica en la sección de criosección de tejidos. Previamente a su procesado, las secciones se descongelaron a temperatura ambiente, se refijaron 20 minutos en PFA al 4% y se lavaron con PBS.

En el caso de la tinción con el anticuerpo Brn3a, la refijación se realizó con metanol absoluto durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción con CRALBP fue necesario permeabilizar las retinas con 3 lavados de 20 minutos con Tritón X-100 al 0,5% (p/v) en PBS. Los protocolos de refijación y exposición ácida se llevaron a cabo en las mismas tinciones y con las mismas condiciones que se describen en el apartado anterior.

En todos los casos, las retinas se bloquearon y permeabilizaron a la par con una solución de suero normal de cabra al 15% (v/v) y Tritón X-100 al 0,2% (v/v) en PBS. Y se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, contraste nuclear y posterior montaje por el mismo sistema descrito en el apartado anterior.

TINCIÓN CON LECTINA DE TOMATE.

La lectina de tomate es un glucolípido característico de células microgliales y endoteliales. Se comercializa biotinilado, lo que permite su visualización por la reacción de la biotina con estreptavidina unida a un fluoróforo.

Este método se combinó con la inmunofluorescencia de retinas en plano. Para ello, tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la retina tres veces con TBS (Tabla 3.8) y se incubó durante 2 horas a 37 °C con Lectina de tomate (Sigma, 1:200) en TBS. Posteriormente, se lavó la retina con PBS y se procedió a la incubación simultánea con DAPI, con los anticuerpos secundarios correspondientes a los primarios usados y con estreptavidina conjugada con un fluoróforo de la serie Alexa (A488, A568, A647, de Molecular Probes) durante 1 hora en el buffer de bloqueo correspondiente a los anticuerpos primarios. Las retinas se lavaron con PBS, se montaron con Fluoromont-G y se visualizaron por microscopía de fluorescencia y/o confocal.

Inmunodetección de proteínas en membrana.

WESTERN BLOT.

Se homogeneizaron retinas embrionarias individuales con un homogenizador tipo *potter* en 20 µl de tampón de lisis o una retina adulta en 40 µl de tampón RIPA (Tabla 3.8). Se mantuvieron los extractos homogeneizados 1 hora en hielo para facilitar el lisado. Transcurrido ese tiempo, los extractos de retinas adultas se centrifugaron 15 minutos a 12000 r.p.m., recuperándose el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemania), midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro a 640 nm e interpolando la de la muestra sobre una recta patrón realizada con una solución estándar de albúmina (Pierce, ThermoScientific, Rockford, Illinois, E.E.U.U.). Se usaron alícuotas de 40 µg de proteína procedentes de retinas adultas para cada muestra, se añadió el tampón de carga CB (Tabla 3.8) al 0,01% (p/v) y se calentaron las muestras a 95 °C, 10 minutos para facilitar la desnaturalización.

En el caso de retinas embrionarias, dada la escasez de la muestra inicial, no se cuantificó la cantidad de proteína ni se clarificaron las proteínas por centrifugación. Las muestras se disolvieron directamente en un buffer de carga con DTT 2 mM (ditiotreitól, Sigma) (Tabla 3.8) y se hirvieron 5 minutos a 95 °C. En cada pocillo se cargó el contenido del lisado protéico total de una retina.

Se fraccionaron los extractos proteicos en geles SDS-PAGE al 6% (v/v) (Bio-Rad) y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa por el sistema de transferencia semiseca (Bio-Rad), 90 minutos a 18V.

Las membranas se lavaron con Tween 20 (Sigma) al 0,5% en TBS (TBS-T) y se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en BSA al 3% (p/v) en TBS-T durante, al menos, 16 horas a 4°C en agitación. Tras lavar con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las membranas se revelaron con ECL (Pierce) y se expusieron a películas Curix RP2 plus (Agfa Healthcare, Mortsell, Bélgica).

INMUNODETECCIÓN DE ISOFORMAS PROTÉICAS.

Algunas proteínas de membrana tales como L1CAM y *BRAVO* se encuentran habitualmente formando dímeros muy estables, unidos por numerosos puentes disulfuro. Para poder estudiar las diferentes isoformas que forman parte de estos dímeros, es necesario romper su estructura terciaria, lo que no se consigue con el sistema clásico de extracción de proteínas. En esos casos, se recurrió a unas condiciones de extracción más desnaturalizantes, basadas en los protocolos descritos en (Kayyem et al., 1992).

Se homogenizaron juntas 4 retinas embrionarias con un *potter* en 20 µl de tampón de lisis. Se mantuvieron los extractos homogenizados durante 1 hora en hielo para facilitar el lisado. Transcurrido ese tiempo, se añadió DTT a una concentración final de 100 mM y se hirvieron las muestras 5 minutos a 95 °C. Los extractos proteicos se fraccionaron en geles SDS-PAGE al 6% (v/v) y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa, por el sistema de transferencia húmeda (Bio-Rad), durante toda la noche a 15 V y 4 °C. La detección de proteínas en membrana se realizó tal como se describe en el apartado anterior.

EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS.

Para visualizar mejor las isoformas de algunas proteínas se recurrió a la extracción secuencial de las mismas, basándonos en el protocolo descrito en (Morales et al., 1996).

Se extrajeron los tejidos (cerebro o retina) en PBS frío, anotando el peso de cada tejido. En el caso de retinas embrionarias, se procesaron conjuntamente 10 retinas por muestra. Se partió en todos los casos de 0,5 mg de tejido por microlitro de tampón de lisis, compuesto por Hepes 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM (Merk-Millipore), DNasa I a 10 U/ml (Sigma,), RNAsa a 250 U/ml (Sigma,) e inhibidores de proteasas (Complete, Roche, 1 pastilla por cada 10 ml). Las muestras se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 minutos. Se centrifugaron las muestras 30 minutos a 22 °C y 13.000 r.p.m. (17.000 x g). El sobrenadante se denominó extracto 1. El *pellet* se trató con una solución de Hepes 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, cloruro sódico 1 M (Merk), Cloruro potásico 1 M (Merk), DNasa I a 10 U/ml, RNAsa a 250 U/ml e inhibidores de proteasas. Las muestras se dejaron lisar 1 hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 minutos. Se centrifugaron las muestras 30 minutos a 22 °C y 13.000 r.p.m. (17.000 x g). El sobrenadante se denominó extracto 2. El *pellet* se resuspendió en una solución de Hepes 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, cloruro sódico 0,3 M, NP-40 al 2,5% (v/v) (Igepal CA-630, Sigma), DNasa I a 10 U/ml, RNAsa a 250 U/ml e inhibidores de proteasas. Se mantuvieron los extractos homogeneizados 1 hora a 22 °C para facilitar el lisado, agitando cada 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron 30 minutos a 22 °C y 13.000 r.p.m. (17.000 x g). El sobrenadante se denominó extracto 3 y el *pellet*, extracto 4.

Se diluyeron todos los extractos tampón de carga (Tris clorhídrico 370 mM pH 8,8, EDTA 1 mM, SDS al 1,5% (p/v), azul de bromofenol al 0,005% (p/v) y glicerol (Merk) al 12,5% (p/v)), y se añadió DTT a una concentración final de 100 mM. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95 °C, se fraccionaron en geles SDS-PAGE al 6% (v/v) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por el sistema de transferencia húmeda durante toda la noche, a 15 V y 4 °C.

Las membranas se lavaron con Tween-20 al 0,1% (p/v) (Sigma) y BSA al 0,1% (p/v) en PBS (PBS-T). Posteriormente, se bloquearon con BSA al 3% (p/v) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en PBS-T, durante, al menos, 16 horas, a 4 °C en agitación. Tras lavar con PBS-T, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y se lavaron con PBS-T. Las membranas se revelaron con ECL y se expusieron películas Curix RP2 Plus.

7-PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

Para el procesado de imágenes se utilizó el software FIJI – image J diseñado por (Schindelin et al., 2012), con diferentes aplicaciones (*plugins*) según el tipo de procesado.

Métodos de cuantificación manual.

CONTAJE DE CÉLULAS SOBRE IMAGEN.

Se utilizó el *plugin cell counter* procediendo a identificar el tipo celular buscado en cada sección óptica obtenida por microscopía confocal, utilizando diferentes contadores para cada tipo celular. Durante el conteo, comprobó que los núcleos contabilizados no fueran marcados en más de una sección óptica y se moduló la intensidad y contraste de cada canal de fluorescencia para permitir una óptima identificación del tipo celular buscado.

MEDICIÓN DE LONGITUDES DE NEURITAS.

Se obtuvieron imágenes calibradas de células Tuj-1 positivas con la cámara Leica FC500 (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania) con el objetivo de 40 aumentos del microscopio de fluorescencia. Se identificaron neuronas que no contactaran con ninguna otra y se midió la longitud total del axón de cada célula. A la hora de representarlos, se agruparon las longitudes de los axones en intervalos de 20 micras.

ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA.

Para evaluar la ramificación microglial, se partió de imágenes a 40 aumentos tomadas por microscopía confocal calibradas en micras en cada sesión. Con el programa FIJI, se creó un ROI (región de interés, del inglés *Region Of Interest*) compuesto por círculos concéntricos de diámetros crecientes de 10 en 10 micras. En las imágenes, se evaluó dónde estaba el núcleo de 90 células microgliales y se superpuso el ROI sobre cada una de ellas. En cada célula, acorde a lo descrito en (Xing et al., 2011), se cuantificó para cada círculo el número de prolongaciones microgliales que lo cortaban.

Métodos de detección automática.

DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE BORDES DE SUPERFICIES.

Para la determinación del frente de diferenciación asociado a la tinción con diversos marcadores se utilizó un método automático de detección de bordes. Para ello, se partió de proyecciones máximas de las imágenes obtenidas por microscopía confocal (Fig. 3.1 - A). Utilizando el *plugin Surface Plot* de FIJI, se estableció un tamaño de cuadrícula medio (512). Con la opción *Mesh* se ajustó la iluminación y el umbral de detección de intensidad con una imagen representativa del experimento, de forma que el reconocimiento de bordes fuera óptimo para cada marcador (Fig. 3.1 - B). A continuación, se ajustó la altura de detección en el eje z. Por último, las imágenes se transformaron a isolíneas y se suavizaron (Fig. 3.1 - C).

Se movió la representación tridimensional de las isolíneas hasta obtener una visión superior de las mismas (Fig. 3.1 - D), se guardó la imagen y se cuantificó el área comprendida entre las áreas marcadas por el frente.

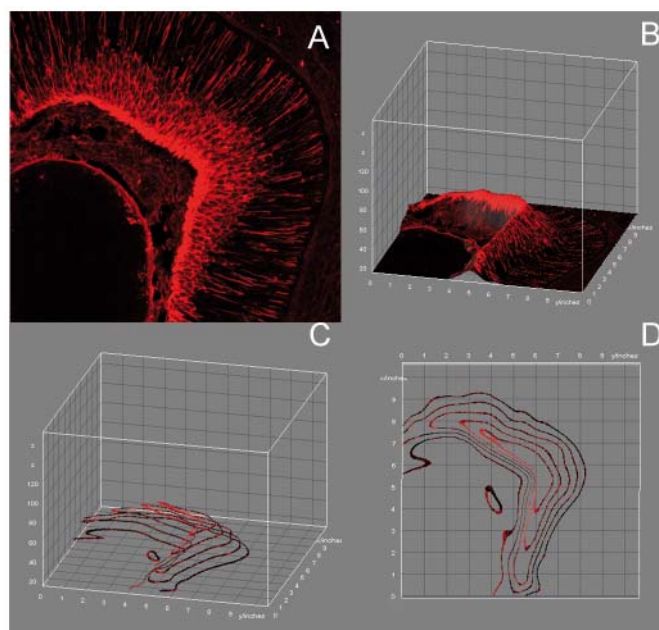


FIGURA 3.1- DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE BORDES DE SUPERFICIES.

A-Proyección máxima de la imagen de confocal. B- Misma imagen que en A vista con la opción *Mesh* del *plugin Surface Plot*. C- Misma imagen que en B vista como isolíneas del *plugin Surface Plot*. D- Isolíneas de la imagen C vistas desde el plano superior.

CUANTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE ÁREAS COMPLEJAS.

Este método se utilizó para medir el área cubierta por astrocitos y/o vasos sanguíneos respecto al área total cubierta por DAPI en imágenes obtenidas por microscopía confocal. Para ello, se partió de las proyecciones máximas de cada canal de fluorescencia. Con el programa FIJI, se calibraron las imágenes en cada sesión, y se convirtieron las proyecciones máximas de cada canal a imágenes en blanco y negro, de 16 bit. Con la imagen en blanco y negro, se utilizó una imagen representativa para establecer un umbral de detección de la tinción común a todas las imágenes. Se analizaron el área y el porcentaje de imagen cubierto por la misma: para ello, se establecieron los parámetros a medir, seleccionando la limitación de los resultados al umbral establecido anteriormente. Las instrucciones anteriores se grabaron en un macro que se utilizó para el procesamiento de cada una de las imágenes (Script 1.1).

SCRIPT 1.1 – CUANTIFICACIÓN DE SUPERFICIES CON EL PROGRAMA FIJI

```
run("Set Scale...", "distance=1920 known=388 pixel=1 unit=micras global");
run("16-bit");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(28, 85); ← ((13,85) para CRALBP, DAPI)
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Set Measurements...", "area limit redirect=None decimal=3");
run("Measure");
```

CUANTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA.

Este método se utilizó para comparar tinciones de un mismo marcador capturadas por microscopía de fluorescencia, manteniendo constantes el número de secciones a adquirir, la intensidad del láser y el tiempo de exposición. De manera similar a la anterior, se utilizaron proyecciones máximas de cada canal, esta vez en color, ajustando la imágenes al formato RGB y estableciendo de nuevo el umbral de detección con una imagen representativa del experimento. Se cuantificó la intensidad de cada imagen midiendo el valor medio de tonos de grises por canal limitados al umbral establecido anteriormente. Las instrucciones anteriores se grabaron en un macro que se utilizó para el procesamiento de cada una de las imágenes y que se detalla a continuación.

SCRIPT 1.2 – CUANTIFICACIÓN DE INTENSIDAD CON EL PROGRAMA FIJI

```

run ("Color Threshold...");
//Color Thresholder 1.45b
//Autogenerated macro, single images only!
Min=newArray(3);
Max=newArray(3);
Filter=newArray(3);
A=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=89;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i],max[i]);
  run ("Convert to Mask");
  if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("Set Measurements...", "area mean limit redirect=None decimal=3");
run("Measure");

```

8-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, E.E.U.U.). En cada grupo de datos, se analizó la normalidad simultáneamente con 3 pruebas diferentes: los tests de Kolmogorof-Smirnov, D'Agostino y Pearson ómnibus y Shapiro-Wilk. Los datos se consideraron ajustados a una distribución normal cuando ninguno de los tres test descartó que no lo fueran, es decir, cuando los p-valores de todos los tests fueron mayores a 0,05. Se comprobó la homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos aplicando un test de Fisher; las varianzas se consideraron iguales cuando el valor del estadístico fue mayor a 0,05. Cuando las muestras resultaron normales y homocedásticas, se utilizaron test paramétricos; si resultaron normales y no homocedásticas, se aplicaron tests paramétricos con las pertinentes correcciones, y en los casos en los que se descartó la normalidad de los datos, se aplicaron tests no paramétricos. En la tabla 3.6 se especifica el test aplicado en función del tipo de análisis y la normalidad de las muestras. Las diferencias significativas se señalaron en las gráficas en función del grado de significación con un asterisco ($p < 0,05$), con dos ($p < 0,01$) o con tres asteriscos ($p < 0,005$).

TABLA 3.6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE COMPARATIVA.

COMPARATIVA	Muestra NORMAL: TEST PARAMÉTRICO	Muestra No NORMAL: TESTS NO PARAMÉTRICOS
Grupos dos a dos	T-test (con corrección de Welch si no son homocedásticos)	U de Mann Withney
Tres grupos o más, de un mismo genotipo.	Anova de una vía + Post-test de Bonferroni	Test de Kruskal Wallis + Post-test de Dunns o, en el caso de referir todas las columnas a una control, Pos-test de Dunnet
Tres grupos o más, de un mismo genotipo. Varios valores procedentes de un mismo individuo.	Anova de valores repetidos + Post-test de Bonferroni	Test de Friedmann + Post-test de Dunns
Tres grupos o más, analizados en 2 genotipos.	Anova de dos vías + Post-test de Bonferroni	-

9-SOLUCIONES Y EQUIPOS.

Los equipos y soluciones utilizados en este trabajo se detallan respectivamente en las tablas 3.7 y 3.8, a continuación.

TABLA 3.7: RELACIÓN DE EQUIPOS UTILIZADOS Y SU CASA COMERCIAL.

INSTRUMENTACIÓN	CASA COMERCIAL
Baño termostatzado Precistern	Selecta, Barcelona, España.
Campana de cultivos BV-100	Burdinola, Bizcaya, España.
Centrífuga "Centrifuge 5405"	Eppendorf, NY, EE.UU.
Centrífuga Biofuge Fresco	Heraeus, Thermo Scientific.
Centrífuga Hettich Zentrifugen	Mikro 20, Boston, Massachusetts, EE.UU.
Citocentrífuga Shandon Cytospin 3	Thermo Scientific.
Criostato	Leica Microsystems.
Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific.
Estufa de cultivos Forma Scientific, CO ₂ , Water jacketed Incubator, Series II	Thermo Scientific.
Fuente de electroforesis Power Pack 1000	Bio-Rad.
Microscopio confocal Leica TCS-SP2-A0BS	Leica Microsystems.
Microscopio de fluorescencia Axioskop	Zeiss, Standort Göttingen-Vertrieb, Alemania.
Microscopio invertido DMIL	Leica Microsystems.
Revelador CURIX 60	Agfa Healthcare.
Sistema de electroforesis Miniprotean Tetracell	Bio-Rad.
Sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot	Bio-Rad.
Sistema de transferencia semi-seca TransBlotSD	Bio-Rad.
Termociclador a tiempo real ABI Prism 7700	Applied Biosystems, Lifetechnologies, Thermo Fisher Scientific.
Termociclador a tiempo real IQ5	Bio-Rad.
Termociclador T personal	Biometra, Göttingen, Alemania.

TABLA 3.8: COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES DE USO FRECUENTE.

SOLUCION	COMPOSICIÓN
BGT	BSA 0,3%, Glicina 100 mM, Tritón X-100 0,25% (p/v) en PBS.
Buffer de lisis	Tris clorhídrico 50 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), fluoruro sódico 1 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM.
CB	Tris clorhídrico 30 mM, pH 6,8, glicerol 12,5% (v/v), SDS 0,2% (p/v), azul de bromofenol 5% (v/v), β-mercaptoetanol 0,01% (p/v).
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	Cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 5,4 M, fosfato sódico dibásico 0,25 mM, fosfato potásico monobásico 0,44 mM, cloruro cálcico 1,3 mM, sulfato magnésico 1,0 M, bicarbonato sódico 4,2 mM
PBS	Cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 2,7 mM, fosfato sódico dibásico (Na ₂ HPO ₄) 10 mM, fosfato potásico monobásico 1,8 mM, pH 7,4.
RIPA	Tris clorhídrico 50 mM, pH 7,4, NP-40 1% (v/v), deoxicolato sódico 0,25% (p/v), cloruro sódico 150 mM, EGTA (Etilén glicol bis-amino etilo) 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 1 mM.
Sacarosa	Sacarosa al 15% o 30% (p/v) disuelta en tampón fosfato de Sörensen 0,01 M, pH 7,4
Salting Out	Tris clorhídrico 40 mM, EDTA 20 mM, SDS 0,5% (p/v), cloruro sódico 200 mM.
TAE 1X	Tris 40 mM, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA.
Tampón Citrato 0,1 M pH 6	Ácido cítrico 0,1 M y citrato sódico 0,1 M, mezclados hasta obtener pH6.
Tampón de carga con DTT (1X)	Tris clorhídrico 37,5 mM, pH8,8, EDTA 1 mM, glicerol 12,5 % (v/v), SDS 1,5% (p/v), DTT 1 mM, azul de bromofenol 0,005%.
Tampón de lisis de Nicholson	10 mM Hepes pH 7,5, cloruro sódico 140 mM, EDTA 4 mM, NP40 2,5% (v/v), tritón x100 2,5% (v/v), azida sódica 0,02% (p/v), inhibidores de proteasas (1 pastilla por cada 10 ml de tampón, Roche) e inhibidores de fosfatasas (ortovanadato sódico 1mM, fluoruro sódico 1 mM, y pirofosfato sódico 5 mM).
Tampón fosfato de Sörensen	Fosfato sódico dibásico 0,1 M, y fosfato sódico monobásico 0,1 M, mezclados hasta ajustar el pH a 7,4.
TBS	Tris clorhídrico 50 mM, pH 7,5, cloruro sódico 150 mM.
TBS-T	Tris Base 100 mM, cloruro sódico 1,5 M, Tween 0,5% (v/v), pH 7,4.

A microscopic image of muscle tissue, likely a skeletal muscle, showing a dense arrangement of parallel muscle fibers. The fibers are stained with a green fluorescent dye, which highlights the striated pattern of the muscle. The text '4.RESULTADOS' is overlaid on the right side of the image.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS.

1 - LA VÍA NHEJ EN LA RETINA EN DESARROLLO: PAPEL EN LA VIABILIDAD CELULAR.

Actividad de la DNA Polimerasa μ en la retina embrionaria.

En estudios anteriores se observó que en la retina de ratón, simultáneamente al proceso de muerte celular temprana y la diferenciación neuronal, se produce un incremento de las roturas que afectan a las dos hebras del DNA (*DDSBs*) (Baleriola et al., 2010). Durante todo el desarrollo prenatal de la retina murina se puede detectar el mRNA de las principales moléculas de reparación de roturas del DNA por NHEJ (Baleriola, 2008), lo que indica que esta vía podría encargarse de reparar dichas lesiones. En este trabajo hemos buscado focos nucleares discretos de la DNA polimerasa μ (Pol μ), característicos de que la reparación se encuentra activa (Ruiz et al., 2004) y analizado por inmunofluorescencia la distribución de Pol μ en las neuronas recién diferenciadas en células dissociadas de retina de ratón de estadio embrionario E13,5 (Fig. 1.A). Identificamos las neuronas recién generadas por inmunotinción con Tuj-1, que reconoce la β -III tubulina, específica del citoesqueleto neuronal. Pol μ presenta una distribución focal en las células donde la DNA polimerasa μ se encuentra activa (Fig. 4.1 A), ya que no se detectan focos en células del ratón *pol* $\mu^{-/-}$, deficiente en dicha proteína (Fig. 4.1. B). Dichos focos nucleares se presentan tanto en neuronas (positivas para Tuj-1, Fig. 4.1 C) como en otros tipos celulares (Fig. 4.1 D), sin que se pueda establecer una presencia mayoritaria en ninguna de las dos subpoblaciones (Fig. 4.1 E).

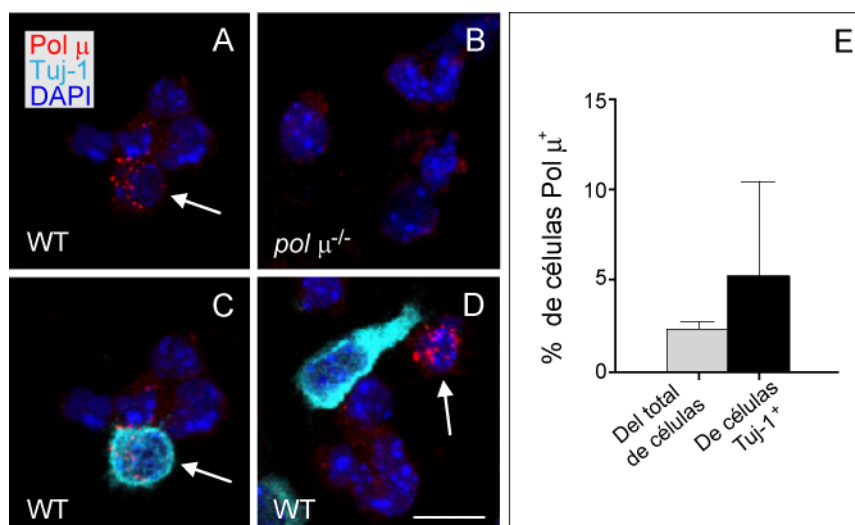


FIGURA 4.1 – EXPRESIÓN FOCAL DE POL μ EN LA RETINA EMBRIONARIA.

(A-D) Inmunofluorescencia de la DNA polimerasa μ (rojo) en células disociadas de retinas embrionarias de estadio E13,5 procedentes de ratones silvestres (A, C-D) y de mutantes nulos para Pol μ (B). Distribución focal de Pol μ (A, flecha blanca) en células neuronales (positivas para Tuj-1, cian) (C, flecha blanca; misma célula que en A) y en células no neuronales (D, flecha blanca). (E) Cuantificación de la distribución de la proteína en ambas subpoblaciones. Se analizaron células disociadas de 9 ratones silvestres y 11 ratones nulos a E13,5, cuantificando al menos 150 células disociadas de cada animal. Núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). WT-C57BL/6. Barra de escala, 10 μm. Las barras representan la media y el error estándar.

Roturas del DNA en ausencia de NHEJ: ratones *SCID* y *pol μ*^{-/-}.

Como hemos visto, la reparación del DNA por NHEJ está activa en la retina neural en desarrollo, y se detecta en diferentes tipos celulares. Analizamos su papel en la embriogénesis de la retina *in vivo*, caracterizando el fenotipo de los ratones mutantes *SCID* (con la DNA-PKcs truncada y no funcional) y *pol μ*^{-/-} (nulo para la DNA polimerasa μ).

Hemos evaluado si la ausencia de estas proteínas de reparación afectaba a la resolución de las roturas del DNA. Para ello, identificamos los focos de reparación del DNA detectando por inmunofluorescencia la fosforilación de la histona H2AX (γH2AX), uno de los primeros eventos en la formación del foco (Symington and Gautier, 2011). Las inmunotinciones para γH2AX en células disociadas de retinas de ratón de estadio de desarrollo E13,5 (Fig. 4.2 A), muestran las células con marcaje y el número focos de γH2AX por célula, indicativos de las regiones concretas del DNA donde se localiza una rotura (Fig. 4.2 A, recuadro). Tanto en el mutante *SCID* (Fig. 4.2 B) como en *pol μ*^{-/-} (Fig. 4.2 D) se observó un mayor número de células con focos nucleares de γH2AX respecto a sus respectivas cepas control^{*} (Fig 4.2 A y C).

* Nótese que las cepas control son distintas, ya que cada mutante se generó en un fondo genético diferente.

Al cuantificar el porcentaje total de células con roturas (Fig. 4.3 A-B) y el número de focos nucleares discretos de γ H2AX por célula (Fig. 4.3 C-D) demostramos que ambos parámetros se encontraban incrementados en los mutantes. Verificamos el resultado anterior estudiando el tejido sin disociar, analizando por inmunohistoquímica la densidad de células positivas para γ H2AX en retinas de E13,5, montadas en plano (Fig. 4.3 E-F). Por los tres métodos se observó que el número de lesiones del DNA era mayor en los mutantes en NHEJ.

Estos resultados sugieren la presencia de DNA-PKcs y Pol μ en embriones de E13,5, durante la embriogénesis temprana de la retina, e indican que su falta interfiere con la reparación de las roturas del DNA.

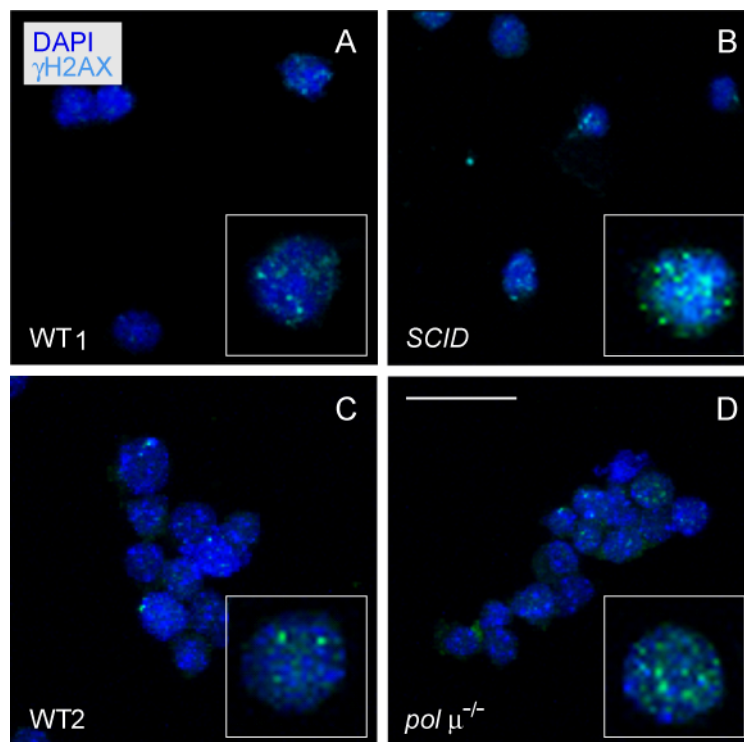


FIGURA 4.2 - DETECCIÓN DE ROTURAS DE DNA DE DOBLE HEBRA EN MUTANTES DE REPARACIÓN POR NHEJ.

Inmunohistoquímica de γ H2AX (cian) en retinas disociadas de los ratones mutantes SCID y $pol \mu^{-/-}$ (B, D) y sus respectivas cepas control (A,C). El recuadro muestra un detalle de la distribución focal de γ H2AX. Se analizaron células disociadas de 7 a 11 retinas de ratones a E13,5. Núcleos teñidos con DAPI (azul). WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6. Barra de escala: 50 μ m en las fotos panorámicas y 10 μ m en los recuadros.

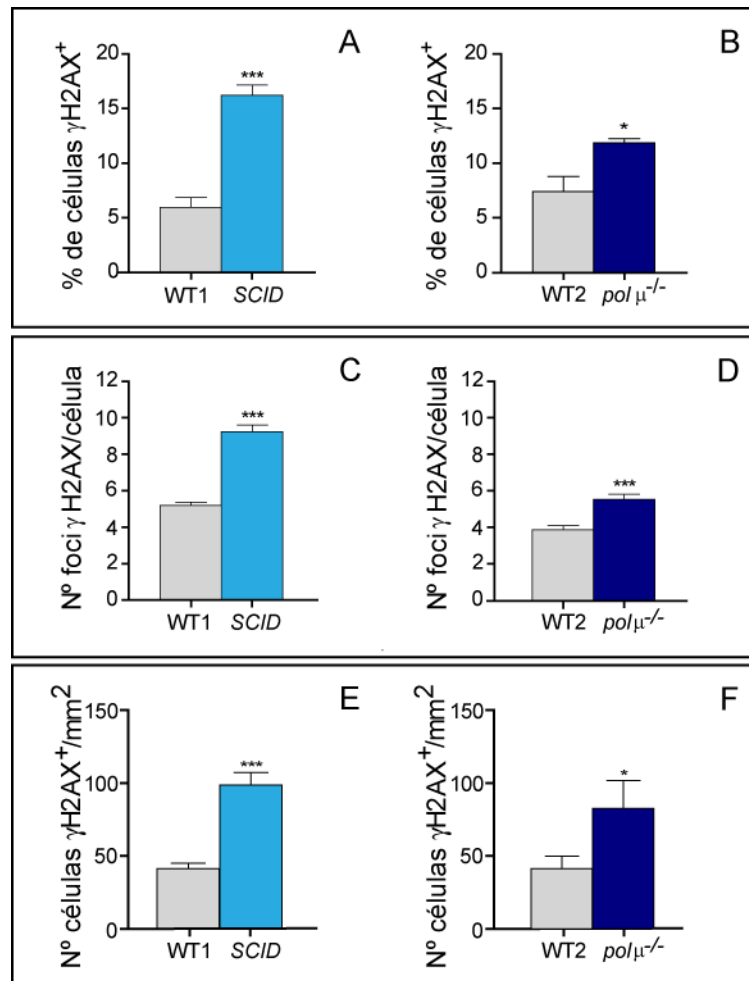


FIGURA 4.3 - CUANTIFICACIÓN DE ROTURAS DE DNA DE DOBLE HEBRA EN MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ.

(A-B) Porcentaje de células positivas para γ H2AX y (C-D) número de focos por célula en retinas disociadas de los ratones mutantes SCID (A,C) y $pol\ \mu^{-/-}$ (B,D) y sus respectivas cepas control. (E-F) Densidad de células positivas para γ H2AX en retinas disociadas de los ratones mutantes SCID (E) y $pol\ \mu^{-/-}$ (F). Se analizaron células disociadas de 7 a 11 ratones a E13,5, cuantificando al menos 100 células disociadas de cada animal, y de 6 a 10 retinas de E13,5 montadas en plano por cepa. Panel (E) en colaboración con Jose Luis Martínez Sanmartín. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6. Las barras representan la media y el error estándar. *p<0,05; ***p<0,001.

Muerte celular programada en mutantes de la vía NHEJ: ratones SCID y $pol\ \mu^{-/-}$.

Estudiamos si la falta de estas proteínas interfería con la viabilidad celular, cuantificando los niveles de muerte celular programada en los mutantes de DNA-PKcs y $pol\ \mu^{-/-}$, y comparándolos con sus respectivas estirpes silvestres. Detectamos los cuerpos apoptóticos por la técnica TUNEL, en retinas montadas en plano de E13,5, durante la fase de muerte

neural temprana (Fig. 4.4). Ambos mutantes (Fig. 4.4 B, D) presentaron una mayor densidad de cuerpos apoptóticos que sus controles (Fig. 4.4 A, C, E), lo que indican que estas proteínas de reparación de roturas de DNA por la vía NHEJ están implicadas en la supervivencia de parte de las células de la retina.

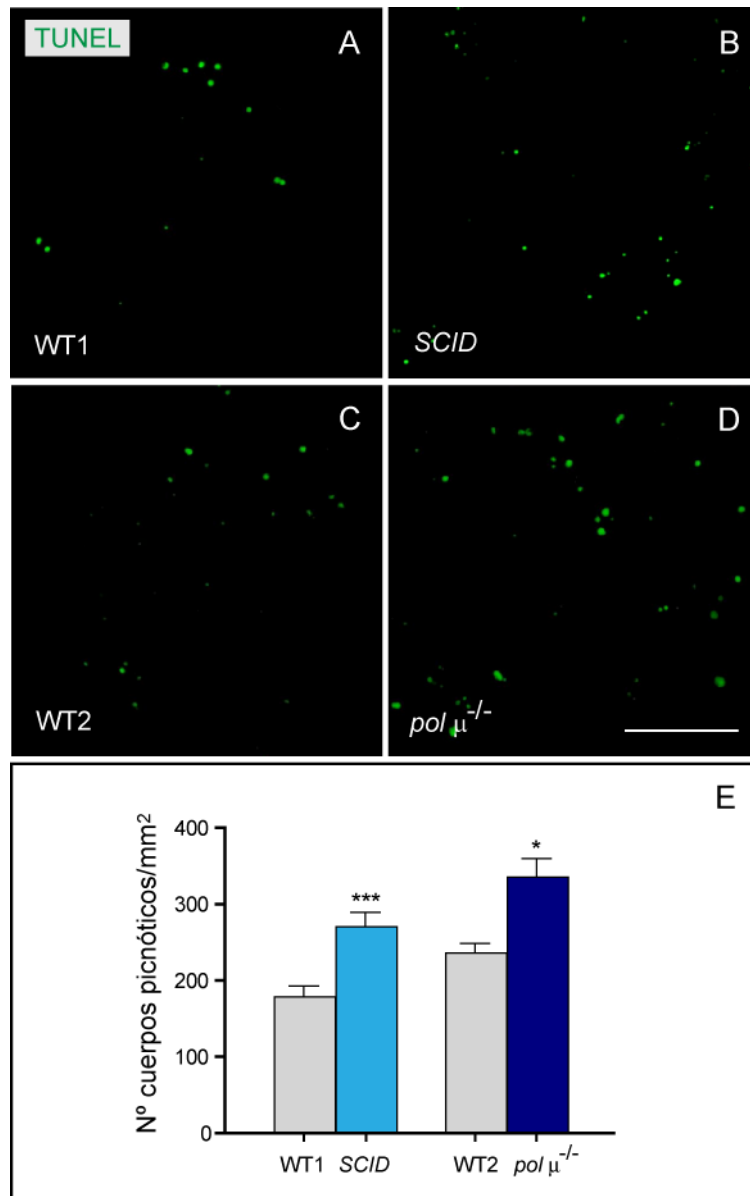


FIGURA 4.4 – INCREMENTO DE LA MUERTE CELULAR EN MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ.

(A-D) Detección de la muerte celular por la técnica TUNEL (verde) en retinas montadas en plano de los ratones mutantes *SCID* y $pol\ \mu^{-/-}$ (B, D) y sus respectivas cepas control (A, C). (E) Cuantificación de los cuerpos apoptóticos por unidad de superficie en los tres mutantes analizados. Se analizaron de 11 a 18 animales de E13,5 por cepa. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6. Barra de escala, 150 μ m. Las barras en (E) representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

2- ROTURAS DEL DNA Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN AUSENCIA DE RAG-2.

Como se comentó en la introducción, en el sistema inmune, una de las principales vías de activación de la vía de NHEJ consiste en la generación programada de roturas del DNA en genes concretos por medio del complejo endonucleasa RAG-1,2 (Helmink and Sleckman, 2012). Nos preguntamos si esta recombinasa podría estar generando roturas también en el sistema nervioso. Por ello, estudiamos *in vivo* el papel en la retina de uno de los componentes del complejo, utilizando un modelo mutante nulo, el ratón *rag 2^{-/-}*.

Al igual que se hizo con los mutantes de reparación del DNA, analizamos la densidad de células con focos de reparación del DNA por inmunohistoquímica, estudiando la distribución de γ H2AX en retinas montadas en plano de embriones de E13,5 (Fig. 4.5 A-B). Al comparar las retinas del mutante nulo *rag 2^{-/-}* con ratones silvestres de la misma camada, se observó que la ausencia de RAG-2 producía un descenso de las células con lesiones en el DNA (Fig. 4.5 E).

Además de presentar menos roturas en el DNA que su estirpe control, se sabía por un estudio previo del grupo que en el mutante *rag 2^{-/-}* se produce un incremento de la muerte por apoptosis durante el desarrollo de la retina (Baleriola, 2008). En este trabajo, verificamos dicho resultado en animales *rag 2^{-/-}* de dos fondos genéticos diferentes, analizando la muerte celular por la técnica TUNEL en retinas de E13,5 montadas en plano.

-**En el fondo C57BL/10Crl**, comparando la retina de ratones mutantes y silvestres de la misma de camada, observamos que la ausencia de RAG-2 se traducía en un mayor número de células muertas (Fig. 4.5 C-D). Su cuantificación demostró que la deficiencia de la endonucleasa RAG 2 se refleja en un 30,03% más de células con cuerpos apoptóticos (Fig. 4.5 F).

-**En el fondo C57BL/6N** (obtenido tras cinco generaciones de retrocruce), obtuvimos un 25,81% más de células muertas en la retina de los ratones mutantes (resultados no mostrados, $p=0,0425$).

Así pues, en los dos fondos genéticos, la carencia de RAG-2 genera un incremento de la muerte por apoptosis en la retina de embriones de E13,5.

En conjunto, estos datos implican que la ausencia de RAG-2 afecta a la viabilidad celular durante el desarrollo temprano de la retina neural e interfiere con la generación de parte de las roturas del DNA observadas durante su desarrollo.

Para estudiar más en profundidad si en la retina embrionaria, al igual que en el sistema inmune, RAG-2 y la reparación de *DDSBs* por la vía NHEJ forman parte de un mismo sistema, nos planteamos, a continuación, evaluar los mutantes *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}* en paralelo.

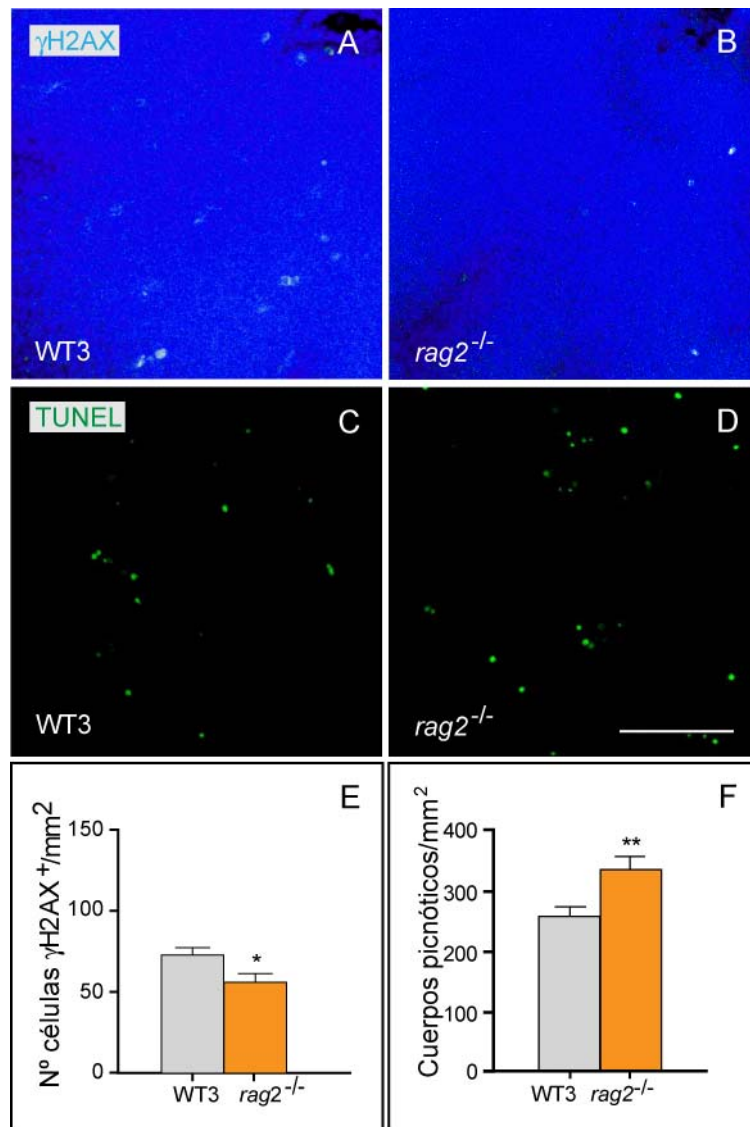


FIGURA 4.5 – CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE CÉLULAS CON ROTURAS EN EL DNA Y EN LA MUERTE CELULAR EN AUSENCIA DE LA ENDONUCLEASA RAG-2.

(A-B) Células γH2AX positivas por inmunofluorescencia en retinas montadas en plano del mutante *rag 2^{-/-}*, y su cepa control. (C-D) Detección de la muerte celular por la técnica TUNEL (verde), en retinas montadas en plano de ratones *rag 2^{-/-}* y su cepa control. (E) Densidad de células con focos de reparación del DNA positivos para γH2AX en retinas montadas en plano. (F) Cuantificación de los cuerpos apoptóticos por unidad de superficie en retinas montadas en plano. Para el estudio del número de roturas se utilizaron retinas de 6 a 10 ratones de E13,5 por cepa. Para la detección de la muerte celular se analizaron de 11 a 18 animales de E13,5 por cepa. WT3 - C57Bl/10. Barra de escala, 120 μm en A-B y 150 μm en C-D. Las barras en A y B representan la media y el error estándar. *p<0,05; **p<0,01.

3 - NEUROGÉNESIS DE LA RETINA EN AUSENCIA DE LAS PROTEÍNAS DNA-PK, POL μ Y RAG-2.

Los estudios anteriores realizados en nuestro grupo encontraron que la actividad de DNA-PKcs es necesaria para la viabilidad de las neuronas de la retina embrionaria (Baleriola et al., 2010). Esto nos llevó a preguntarnos cómo los procesos de generación y reparación de *DDSBs* afectan a la neurogénesis de las células ganglionares de la retina.

Muerte neural en ausencia de NHEJ: evaluación en ratones *SCID*, *pol μ ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}*.

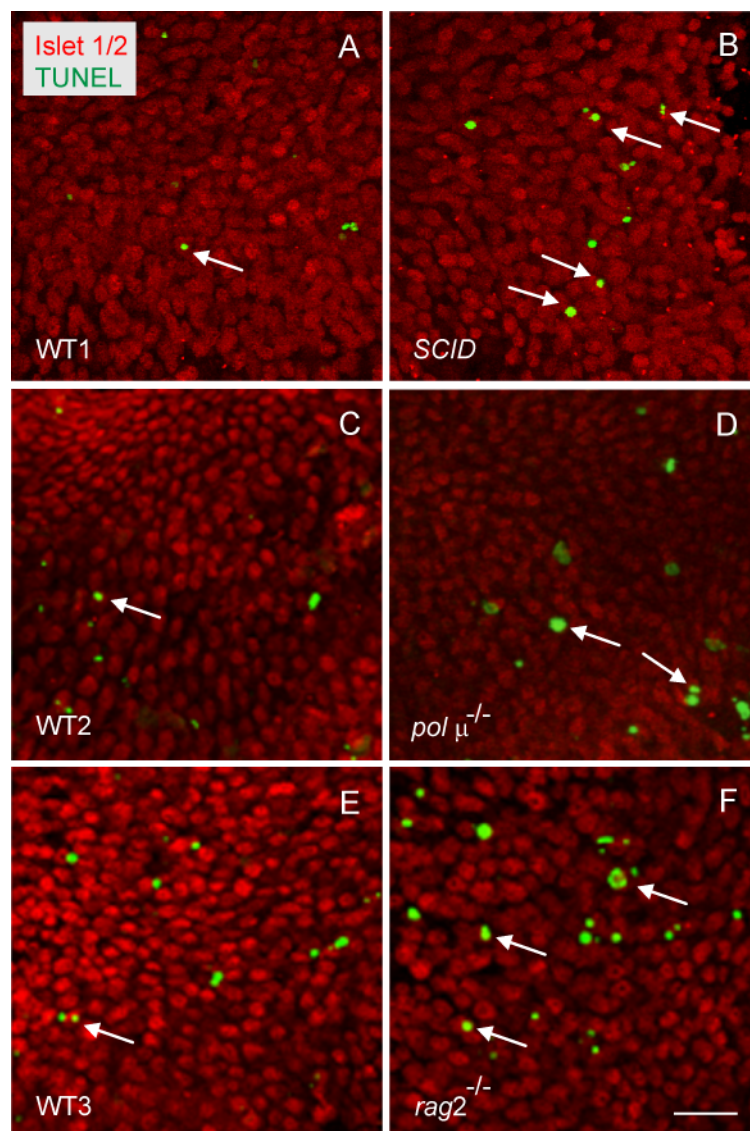


FIGURA 4.6 - DETECCIÓN DE MUERTE NEURONAL EN MUTANTES DEFICIENTES EN RAG-2 Y NHEJ.

(A-F) Inmunofluorescencia del factor de transcripción neuronal Islet 1/2 (rojo), y detección de células apoptóticas por la técnica TUNEL (verde), en retinas montadas en plano de ratones mutantes *SCID*, *pol μ ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}* (B, D, F) y sus respectivas cepas control (A, C, E). Las flechas blancas indican las células con dobles marcajes. Se analizaron de 4 a 10 animales de E13,5 por cepa. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57Bl/10. Barra de escala, 40 μ m.

Nuestro primer abordaje fue evaluar la muerte celular en las primeras neuronas en diferenciarse en la retina, comparando los fenotipos de *SCID*, *pol μ^{-/-}*, y *rag 2^{-/-}*, respecto a sus controles en las retinas de embriones de ratón de E13,5.

Estudiamos la distribución de las neuronas apoptóticas en retinas montadas en plano, combinando la técnica TUNEL y la inmunohistoquímica para Islet 1/2, factor de transcripción temprano (presente desde E11,5) que interviene en la diferenciación de las células ganglionares, amacrinas y horizontales (Elshatory et al., 2007). En los mutantes de reparación del DNA *SCID* (Fig. 4.6 B) y *pol μ^{-/-}* (Fig. 4.6 D), así como en el mutante *rag 2^{-/-}*, (Fig. 4.6 F), se apreció un mayor número de neuronas muertas que en sus estirpes control (Fig. 4.6 A, C y E). La cuantificación demostró que el incremento de muerte en esta población de neuronas era estadísticamente significativo en los tres mutantes (Fig. 4.7 A), aunque el número total de células Islet 1/2 positivas no varió (Fig. 4.7 B). Resulta interesante que, a pesar de que *rag 2^{-/-}* presente un fenotipo opuesto a *SCID* y *pol μ^{-/-}* en cuanto al número de focos de reparación del DNA presentes, el fenotipo de los tres mutantes tenga consecuencias en la supervivencia neuronal.

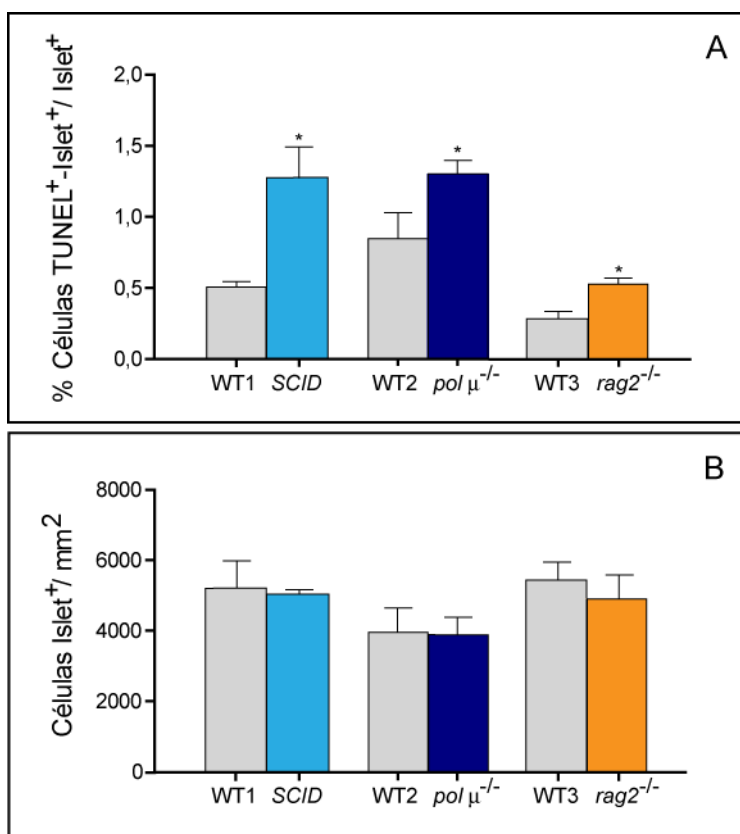


FIGURA 4.7 – INCREMENTO DE LA MUERTE NEURONAL EN MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ Y RAG-2.

(A) Número de células con doble marcaje Islet 1/2 y TUNEL respecto al total de células Islet 1/2 detectadas y (B) densidad de neuronas Islet 1/2 positivas en retinas montadas en plano de ratones mutantes *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}*, y sus respectivas cepas control. Se estudiaron 4 campos por retina, procedentes de 4 a 10 animales de E13,5 por cepa. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57Bl/10. Las barras representan la media y el error estándar. *p<0,05.

Muerte celular en las células ganglionares en ausencia de la DNA polimerasa μ .

En el mutante $pol \mu^{-/-}$, caracterizamos más en profundidad el incremento en la muerte neural que tiene lugar en E13,5. Buscamos si la población de células ganglionares estaba específicamente afectada, usando como marcador el factor de transcripción neuronal Brn3a, que comienza a expresarse en E12,5 e interviene en la diferenciación tardía de una subpoblación de células ganglionares (Badea et al., 2009).

Combinamos la inmunofluorescencia contra este factor con la técnica TUNEL para detectar la muerte celular tanto en retinas montadas en plano (Fig. 4.8 A-B), como sobre células disociadas de retina de E13,5. Obtuvimos resultados similares en ambos casos: la ausencia de la polimerasa μ , en retinas montadas en plano, se asoció a un incremento de la apoptosis de las células ganglionares (Fig. 4.8 C) que, en células disociadas, fue estadísticamente significativo (Fig. 4.8 D). La evaluación de estos experimentos junto con los que los realizamos con Islet 1/2 (Figs. 4.6 y 4.7), sugiere que la población neuronal de la retina de E13,5 y, en concreto, las células ganglionares, son sensibles a la falta de reparación y de generación de roturas en el DNA.

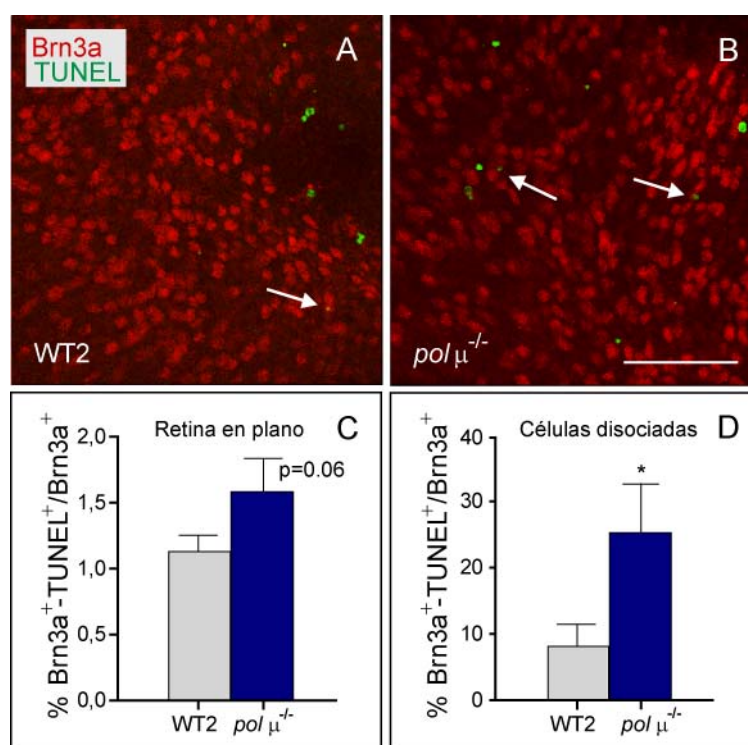


FIGURA 4.8 – INCREMENTO DE LA MUERTE CELULAR EN LAS CÉLULAS BRN3A POSITIVAS EN EL RATÓN $pol \mu^{-/-}$.

(A-B) Inmunofluorescencia del factor de transcripción neuronal Brn3a (rojo) y de células apoptóticas (TUNEL, verde; las doblemente marcadas se señalan con una flecha blanca) en retinas en plano de ratones $pol \mu^{-/-}$ y su cepa control. (C) Densidad de células TUNEL-Brn3a positivas en retinas de E13,5 montadas en plano. Se analizaron 4 campos por retina procedentes de 6 animales de E13,5 por cepa. (D) Porcentaje de células TUNEL-Brn3a positivas respecto al total de células Brn3a en células disociadas de retinas de E13,5. Se analizaron 6 animales silvestres y 8 mutantes a E13,5, examinando un mínimo de 200 células por retina. WT3-C57Bl/6. Barra de escala, 50 μ m. Las barras en (C,D), representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados nos hicieron plantear si los problemas de viabilidad serían específicos de neuronas o si afectarían también a otras subpoblaciones celulares de la retina en desarrollo. Para comprobarlo, decidimos evaluar la muerte celular por separado en las dos poblaciones principales de la retina de E13,5: precursores neurales (aún proliferativos) y neuronas recién diferenciadas.

Con el fin de definir ambas poblaciones, hicimos una aproximación semicuantitativa: realizamos una inmunofluorescencia en células disociadas de retina con anticuerpos para PCNA (antígeno expresado por células en proliferación) (Fig. 4.9 A-B y E) o contra el marcador neuronal Tuj-1, característico de la primera oleada de diferenciación neural (Sharma and Netland, 2007), presente en células de la retina desde E11 (Philips et al., 2005) y, a esta edad, principalmente asociado a células ganglionares tempranas (Watanabe et al., 1991) (Fig. 4.9 C-E). Evaluamos la muerte asociada a ambas subpoblaciones por medio de la técnica TUNEL (Fig. 4.9 B y D). También cuantificamos las neuronas Tuj-1 positivas recién salidas del ciclo celular, que aún conservaban la expresión del antígeno proliferativo (Fig. 4.9 H). En el mutante $pol\ \mu^{-/-}$ no se observaron alteraciones en el número ni en la viabilidad de las células en proliferación (Fig. 4.9 F). Por el contrario, sí se observó un incremento de la muerte neuronal, asociado a un descenso del número total de neuronas Tuj-1 positivas (Fig. 4.9 G). Estos datos sugieren que el déficit de Pol μ no altera por igual la viabilidad de todas las células de la retina, sino que afecta específicamente a neuronas recién diferenciadas, llegando a alterar el número total de la población de neuronas Tuj-1 positivas.

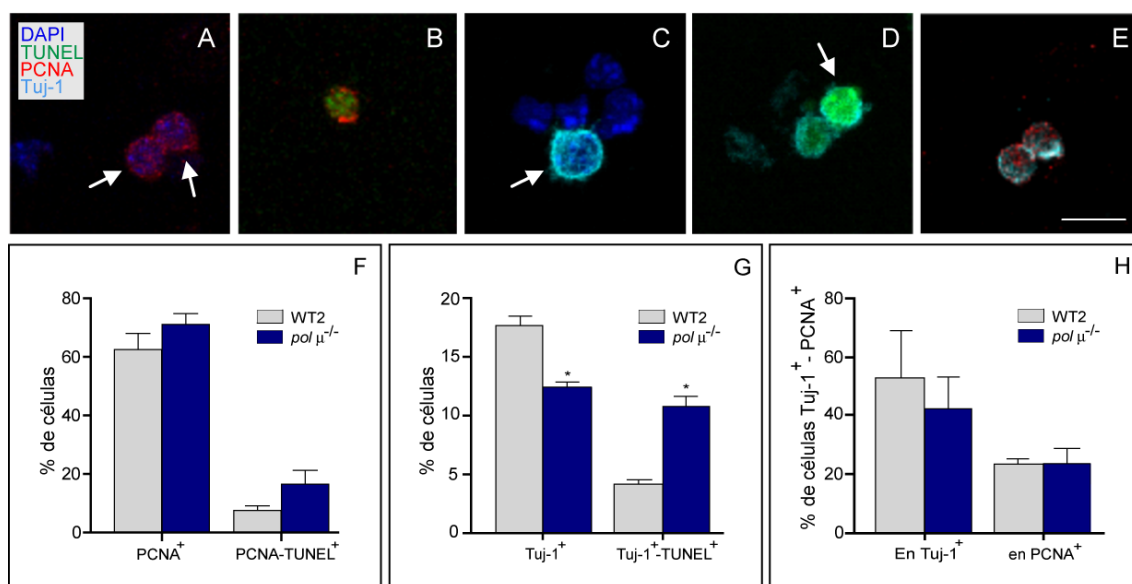


FIGURA 4.9 – INCREMENTO ESPECÍFICO DE LA APOPTOSIS EN LA POBLACIÓN DE NEURONAS JÓVENES DEL MUTANTE $pol\ \mu^{-/-}$.

(A-E) Inmunofluorescencia de células proliferativas (PCNA positivas, rojo, A, B, E), neuronas diferenciadas (Tuj-1 positivas, cian, C-E) y apoptosis (técnica TUNEL, verde, B, D) en animales $pol\ \mu^{-/-}$ y sus controles. (F, G) Porcentaje total de cada tipo celular y porcentaje de apoptosis en cada subpoblación (H) Porcentaje de neuronas recién diferenciadas que retienen marcadores de proliferación. Se analizaron células disociadas de retinas de 5 a 8 ratones de E13,5, estudiando un mínimo de 150 células de cada animal. WT2-C57Bl/6. Barra de escala, 10 μ m. Las barras en (F-H) representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$.

4 - NAVEGACIÓN AXONAL EN LA RETINA DE MUTANTES DEFICIENTES EN DNA-PK, POL μ Y RAG-2.

Ya que los mutantes de generación y reparación de *DDSBs* comparten el déficit de viabilidad de las células ganglionares, nos planteamos si la diferenciación de las RGCs estaría también afectada. Las células ganglionares son las únicas neuronas de proyección de la retina; presentan un axón típico, y comienzan a emitirlo según se diferencian.

Trayectoria axonal *in vivo* en ausencia de RAG-2 Y NHEJ: evaluación en los mutantes *SCID*, *pol μ ^{-/-}* y *rag2^{-/-}*.

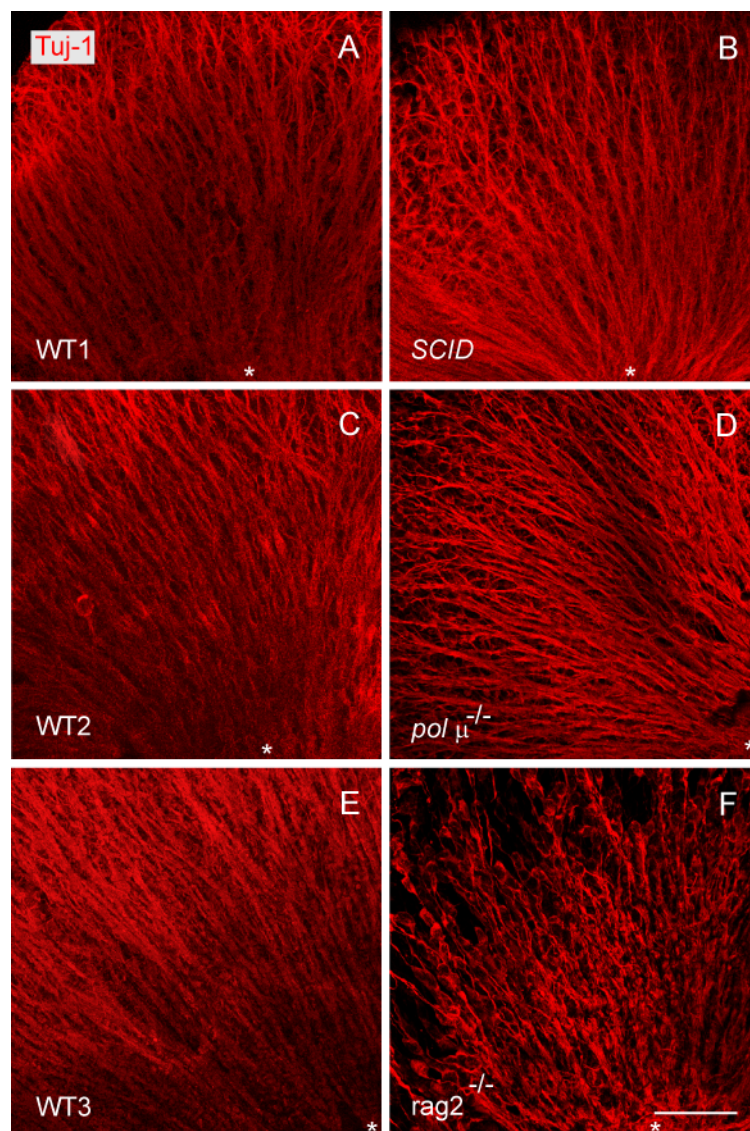


FIGURA 4.10 – ALTERACIONES EN LA FASCICULACIÓN AXONAL EN MUTANTES DEFICIENTES EN RAG-2 Y NHEJ.

(A-F) Inmunofluorescencia con Tuj-1 (rojo) en retinas montadas en plano de estadio E13,5 procedentes de los mutantes *SCID*, *pol μ ^{-/-}* y *rag2^{-/-}* (B, D, F) comparados con sus respectivas cepas silvestres (A, C y E). Se observa la navegación de los axones hacia la salida del nervio óptico (señalizado con un asterisco). Se analizaron de 5 a 8 animales de E13,5 por cepa. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57Bl/10. Barra de escala, 50 μ m.

Para visualizar *in vivo* la trayectoria de los axones de las células ganglionares, realizamos inmunotinciones con Tuj-1 en retinas montadas en plano de embriones E13,5, comparando las retinas de animales mutantes *SCID*, *pol* $\mu^{-/-}$ y *rag* $2^{-/-}$ (Fig.4.10). Observamos evidentes fallos en la fasciculación y la orientación de los axones, más frecuentes en los modelos mutantes (Fig. 4.10 B, D, F) que en sus respectivas cepas silvestres (Fig. 4.10 A, C, E). Tanto los mutantes en la reparación de roturas del DNA *SCID* (Fig. 4.10 B) y *pol* $\mu^{-/-}$ (Fig. 4.10 D) como RAG-2 (Fig. 4.10 F) presentaron alteraciones similares, lo que parece sugerir que la ausencia de estas proteínas comparten repercusiones comunes en el proceso de la axonogénesis de las células ganglionares.

Emisión de neuritas *in vitro* en ausencia de RAG-2 Y NHEJ: evaluación en los modelos *SCID*, *pol* $\mu^{-/-}$ y *rag* $2^{-/-}$.

Nos preguntamos si el fenotipo encontrado en los axones de las células ganglionares en estos tres mutantes dependería de otras señales o estímulos externos o si sería autónomo celular. Para analizarlo, se realizaron cultivos primarios de los progenitores neurales presentes en la retina de estadio E13,5 y se analizó la emisión de neuritas.

Los cultivos se realizaron sobre soportes comerciales en un medio definido, favoreciendo la diferenciación neuronal y la emisión de neuritas. La neuritogénesis se evaluó tras 18 y 24 horas de cultivo por medio de la tinción con el anticuerpo contra β -III tubulina (Tuj-1). Se estudiaron exclusivamente células aisladas, para minimizar en lo posible la influencia de las células circundantes en la emisión de las neuritas. Tras 18 horas de cultivo, en los tres mutantes se observó una menor longitud media de las neuritas que en sus controles (Fig. 4.11 A, C, E), aunque a las 24 horas esta diferencia se compensó en los mutantes de reparación *SCID* y *pol* $\mu^{-/-}$ (Fig. 4.11 B, D), e incluso se invirtió en el ratón *rag* $2^{-/-}$ (Fig. 4.11 F). La distribución de las longitudes de las neuritas en los tres mutantes fue similar a la observada en sus respectivas estirpes silvestres: Todos los mutantes fueron capaces de emitir neuritas de 120 μm o más, lo que parece indicar que la diferencia en la longitud media no se debe a un defecto severo en la capacidad de emisión de las neuritas, sino posiblemente a un retraso en su emisión.

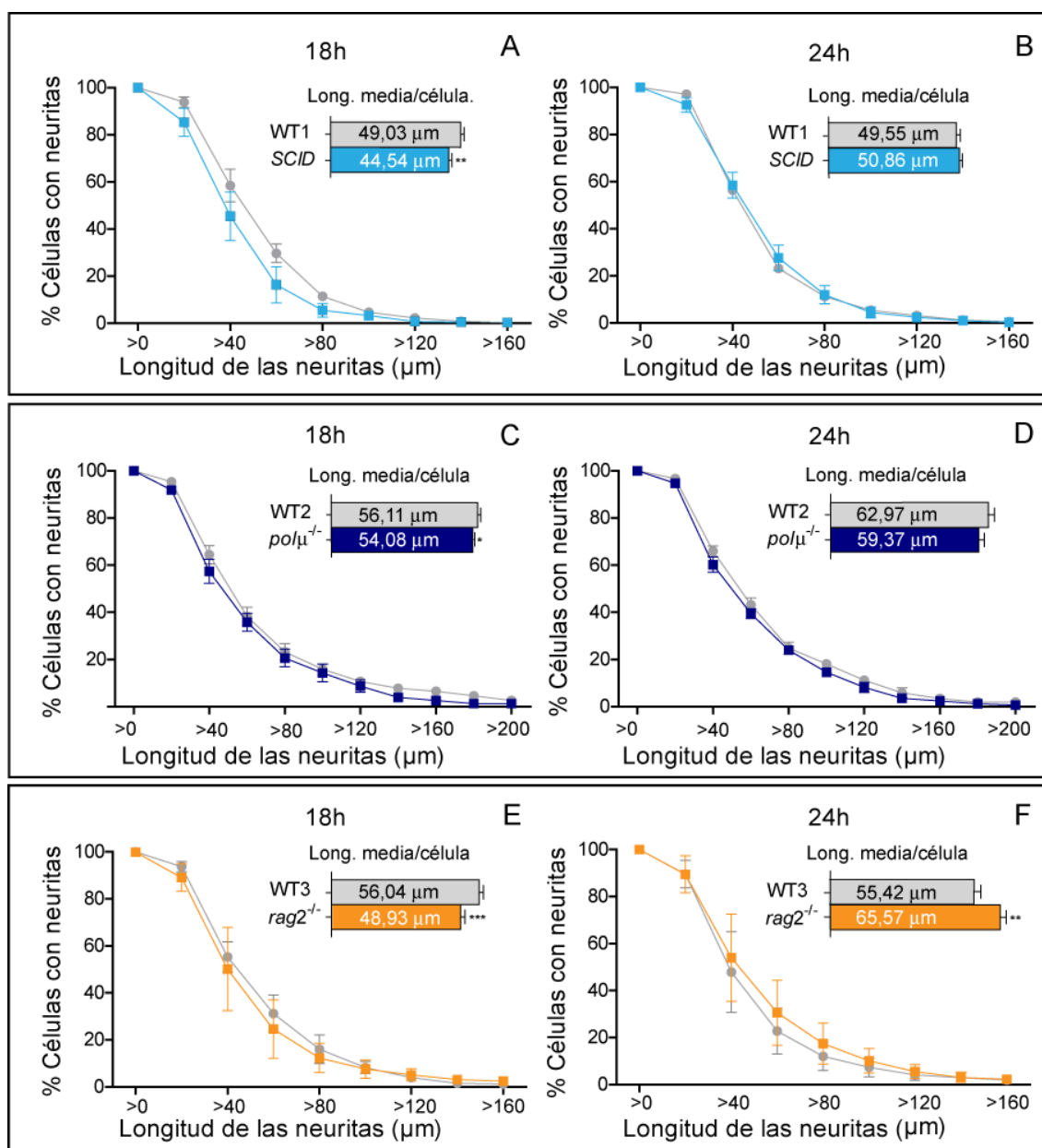


FIGURA 4.11 – DISTRIBUCIÓN DE LA LONGITUD DE LAS NEURITAS EN MUTANTES DE LA VÍA NHEJ Y RAG-2.

(A-F) Distribución de la longitud de las neuritas en intervalos de 20 μm y longitud media de las neuritas emitidas en cultivos primarios de retinas murinas de E13,5 tras 18 (A, C, E) y 24 horas (B, D, F) de incubación en los mutantes *SCID* (A-B), *pol μ ^{-/-}* (C-D) y *rag2^{-/-}* (E-F) y sus respectivas cepas silvestres. Las barras horizontales muestran la longitud media de las mismas. Se analizaron de 3 a 6 animales por cepa, examinando un mínimo de 400 células por cultivo. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57Bl/10. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Al estudiar la neuritogénesis en el cultivo, observamos que las células Tuj-1 positivas de los mutantes deficientes en NHEJ parecían tener alteraciones más severas en la direccionalidad de las neuritas que los silvestres. Mientras que los precursores neurales en cultivo, al diferenciarse, emiten habitualmente una única proyección que se extiende de manera rectilínea

(Fig. 4.12 A, 4.13 A, y 4.14 A), en los mutantes, observamos una mayor frecuencia de anomalías en su la emisión de las neuritas.

Caracterizamos estas alteraciones en los mutantes de reparación *SCID* (Fig. 4.12) y *pol μ⁻* (Fig. 4.13), en el mutante *rag2⁻* (Fig. 4.14), y en sus cepas control, clasificándolas en los siguientes tipos: autocontactos, giros bruscos, células con neuritas ramificadas o con más de una neurita y células sin neuritas. Observamos que el porcentaje de células que emitían neuritas frente a las que no lo hacían no estaba alterado en ninguno de los tres mutantes, (Fig. 4.12 F, 4.13 F y Fig. 4.14 F). Sin embargo, detectamos un incremento en el número de autocontactos de las neuritas con sus somas en los tres mutantes (Fig. 4.12 B y F, 4.13 B y F y Fig. 4.14 B y F). En los mutantes *pol μ⁻* y *rag 2⁻* también se observó un aumento significativo de neuritas que cambiaban bruscamente su rumbo (Fig. 4.13 C y F, y Fig. 4.14 C y F), y en el mutante *SCID* se apreció una tendencia en el mismo sentido (Fig. 4.12 C y F). Además, dos de los mutantes estudiados, *pol μ⁻* y *rag 2⁻*, presentaron alteraciones en la ramificación de sus neuritas (Fig. 4.12 D y F, y Fig. 4.14 D y F). Por último, aunque no cuantificado, se observó que las neuritas de los cultivos de *rag 2⁻* presentaban un cono de crecimiento de las neuritas mucho más “difuso” que el de su estirpe silvestre (Fig. 4.14 B).

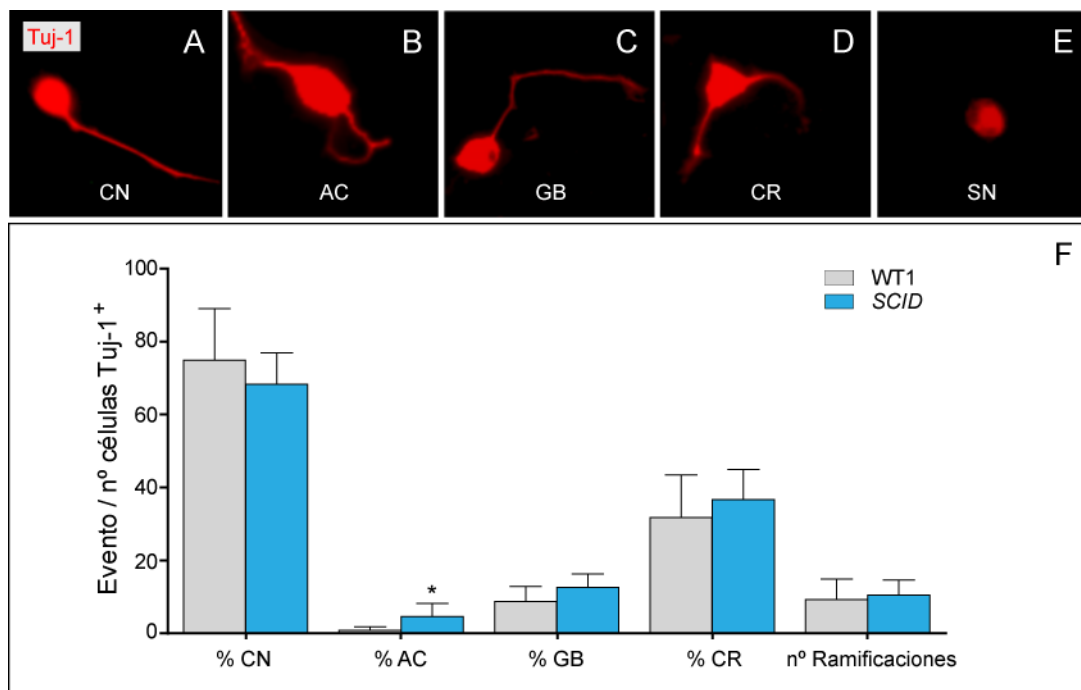


FIGURA 4.12- ALTERACIONES EN LA EMISIÓN DE NEURITAS EN EL MUTANTE *SCID*.

(A-E) Inmunofluorescencia con Tuj-1 (rojo) en células procedentes de cultivos primarios de retinas de E13,5 de ratones *SCID* y silvestres tras 24 horas de incubación. Se observan (A) células con neuritas y (B-D) alteraciones en su emisión: (B) autocontactos, (C) cambios de dirección, (D) ramificación de las neuritas y (E) células sin neurita. (F) Cuantificación del porcentaje de cada evento y del número de ramificaciones por célula respecto al total de neuronas Tuj-1 positivas. Se analizaron 6 animales por cepa, examinando un mínimo de 400 células por cultivo. WT1–Balb/C; CN–Células con neuritas; AC–Autocontactos; GB–Giros bruscos; CR–Células ramificadas; SN–Sin neurita. Las barras reosentran la media v el error estándar. *p<0.05.

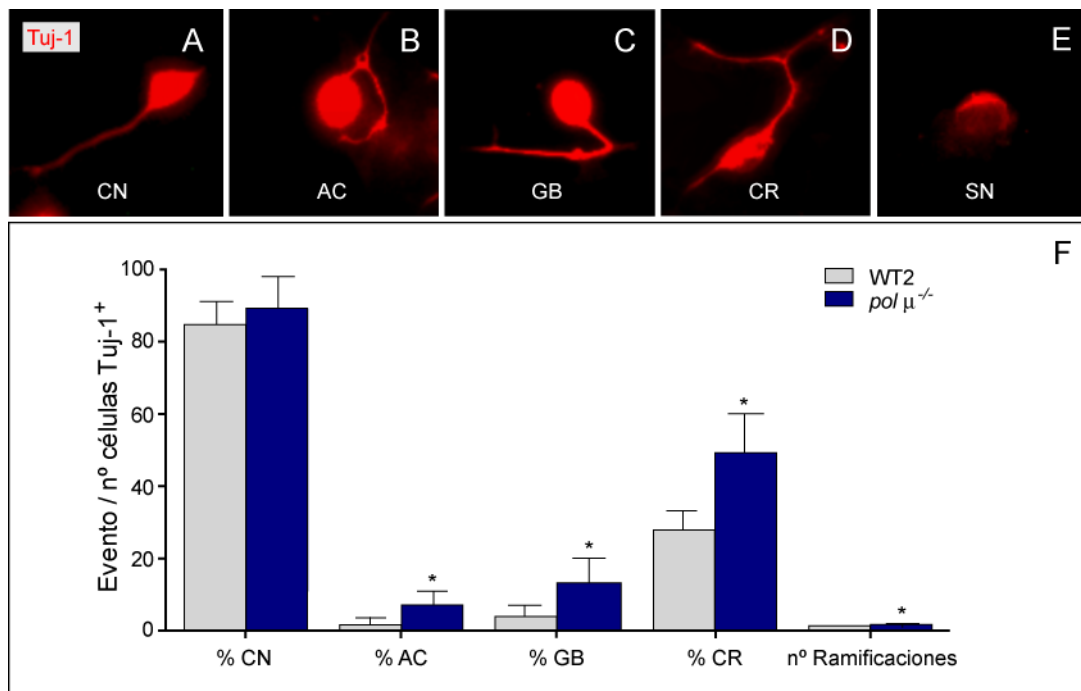


FIGURA 4.13- ALTERACIONES EN LA EMISIÓN DE NEURITAS EN EL MUTANTE *pol μ*^{-/-}.

(A-E) Inmunofluorescencia con Tuj-1 (rojo) en células procedentes de cultivos primarios de retinas de E13,5 de ratones *pol μ*^{-/-} y silvestres tras 24 horas de incubación. Se observan (A) células con neuritas y (B-D) alteraciones en su emisión: (B) autocontactos, (C) cambios de dirección, (D) ramificación de las neuritas y (E) células sin neurita. (F) Cuantificación del porcentaje de cada evento y del número de ramificaciones por célula respecto al total de neuronas Tuj-1 positivas. Se analizaron 6 animales por cepa, examinando un mínimo de 400 células por cultivo. WT2– C57Bl/6; CN–Células con neuritas; AC–Autocontactos; GB–Giros bruscos; CR–Células ramificadas; SN–Sin neurita. Las barras representan la media y el error estándar. *p<0,05.

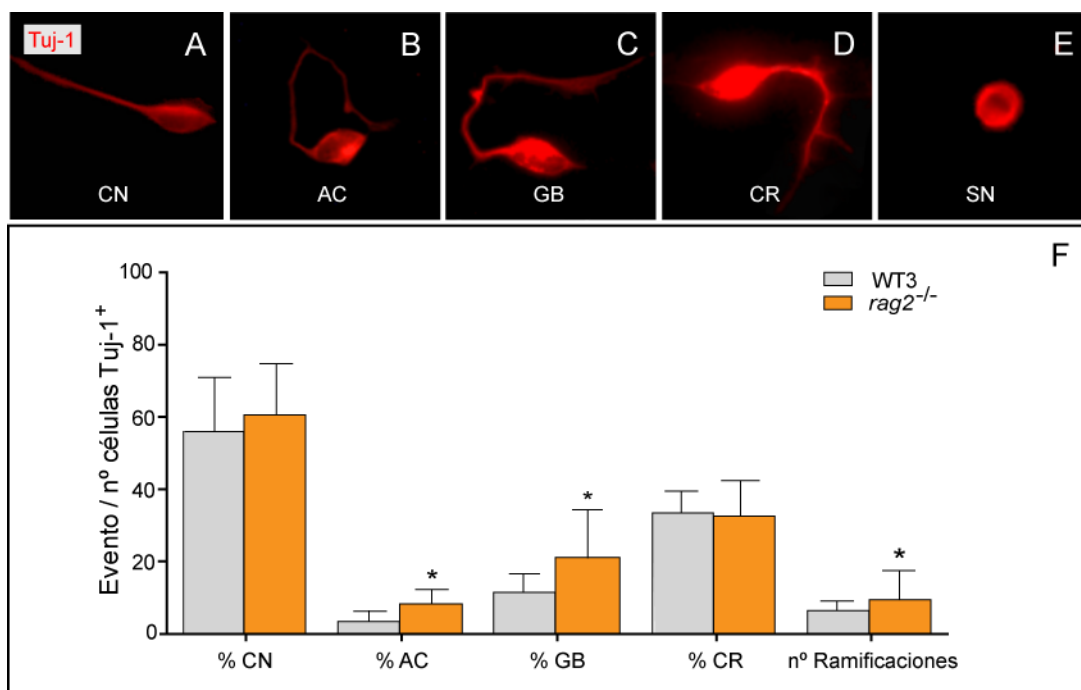


FIGURA 4.14- ALTERACIONES EN LA EMISIÓN DE NEURITAS EN EL MUTANTE *rag 2*^{-/-}.

(A-E) Inmunofluorescencia con Tuj-1 (rojo) en células procedentes de cultivos primarios de retinas de E13,5 de ratones *rag 2*^{-/-} y silvestres tras 24 horas de incubación. Se observan (A) células con neuritas y (B-D) alteraciones en su emisión: (B) autocontactos, (C) cambios de dirección, (D) ramificación de las neuritas y (E) células sin neurita. (F) Cuantificación del porcentaje de cada evento y del número de ramificaciones por célula respecto al total de neuronas Tuj-1 positivas. Se analizaron 6 animales por cepa, examinando un mínimo de 400 células por cultivo. WT3– C57Bl/10; CN–Células con neuritas; AC–Autocontactos; GB–Giros bruscos; CR–Células ramificadas; SN–Sin neurita. Las barras representan la media y el error estándar. *p<0,05.

Estos resultados concuerdan con las alteraciones en la emisión axonal observadas *in vivo* y corroboran que la ausencia de las proteínas de reparación de roturas al DNA Pol μ y DNA-PKcs interfiere con el guiado de los axones de las células ganglionares. La aparición de las alteraciones en célula aisladas apuntan a que el proceso podría ser autómo celular. La ausencia de RAG-2, tanto *in vivo* como *in vitro*, parece interferir en el mismo proceso.

Distribución de las RGCs en ausencia de la DNA polimerasa μ .

Como hemos demostrado, los mutantes en generación y reparación de *DDSBs* comparten un problema en la emisión axonal. Dado que las células ganglionares, durante su desarrollo, tras abandonar el ciclo celular, utilizan la emisión de su axón para ayudar a la migración de su núcleo hasta su capa definitiva, (Galli-Resta et al., 2008), nos preguntamos si estos mutantes podrían presentar alteraciones en la disposición final de las células ganglionares.

En este estudio, analizamos la localización de las células ganglionares recién diferenciadas en cortes transversales de retina de E13,5 del ratón deficiente para la DNA polimerasa μ , estudiando el área cubierta por el frente de diferenciación (los somas de las neuronas en torno a la lámina basal) y la cantidad de neuronas diferenciadas fuera de éste. Identificamos las neuronas diferenciadas por inmunotinción con Tuj-1 y determinamos el frente de diferenciación usando un método de detección automática. Este método nos permitió definir el borde del frente de diferenciación y cuantificar la superficie cubierta por el frente (Ver materiales y Métodos, apartado de detección automática de bordes de superficies). Cuantificamos también el ancho del neuroepitelio midiendo la distancia del frente de diferenciación al borde opuesto de la retina (Fig. 4.15 C). Consideramos ectópicas las células Tuj-1 positivas no incluidas dentro del frente de diferenciación (Fig. 4.15 B, flechas).

En los animales silvestres, los somas de las RGCs se distribuyen fundamentalmente en la cara interna de la retina, en la posición que conformará la GCL en el adulto, formando un frente definido asociado a su diferenciación (Fig. 4.15 A). En las retinas de E13,5, de manera ocasional, se observan distribuidas en el neuroepitelio indiferenciado algunas RGCs que aún no han alcanzado su posición final, pero que ya han comenzado su diferenciación y expresan marcadores neuronales como Tuj-1. En el mutante carente de la polimerasa μ , parece haber menos RGCs en la cara interna de la retina (Fig. 4.15 B), observándose una disminución del área del frente de diferenciación (4.15 C), y un engrosamiento del neuroepitelio indiferenciado (Fig. 4.15 C). El mutante, además, presentó más células ectópicas distribuidas por el neuroepitelio (Fig. 4.15 B, flechas y 4.15 E), sugiriendo que en los ratones *pol* $\mu^{-/-}$, el proceso de migración aún no ha concluido.

Estos datos implican que la falta de la polimerasa μ no solo interfiere con la emisión axonal, sino también con el posicionamiento de las células ganglionares en su capa.

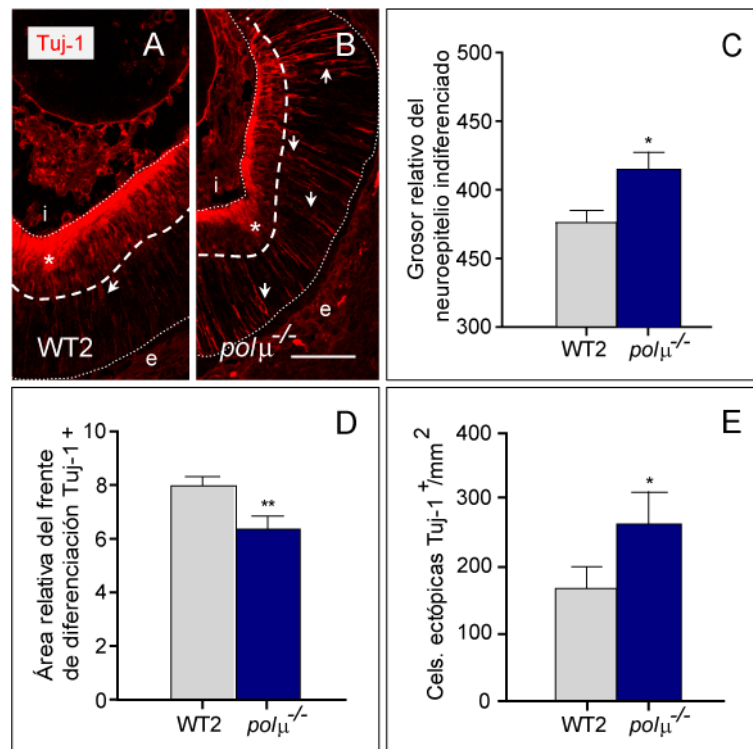


FIGURA 4.15 - DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES EN SECCIONES DE RETINA DEL MUTANTE *polμ*^{-/-}

(A, B) Inmuntinción con Tuj-1 (rojo) en secciones transversales de retinas de E13,5 del ratón *polμ*^{-/-} y su estirpe silvestre. Neuroepitelio delimitado por línea de puntos. i- Cara interna de la retina. e- Cara externa de la retina. El área de retina cubierta por el frente de diferenciación neural fue detectada automáticamente (línea discontinua). Las flechas señalan células localizadas fuera del frente de diferenciación. (C) Medida del grosor del epitelio indiferenciado (distancia del frente de diferenciación a la cara externa de la retina). (D) Cuantificación del área de retina cubierta por el frente de diferenciación neural (área del frente de diferenciación a la cara interna de la retina). (E) Cuantificación de células ectópicas en el neuroepitelio. El asterisco en A y B señala el nervio óptico. Barra de escala, 100 μ m. WT-C57BL/6. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5 - DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE GUÍA AXONAL L1CAM Y BRAVO EN AUSENCIA DE DNA-PK, POL μ Y RAG-2.

Las alteraciones observadas en la emisión de los axones de las RGCs sugerían problemas en la expresión o en el reconocimiento de señales de guía axonal durante la diferenciación neuronal. Las proteínas de guía se expresan en el axón de la propia célula ganglionar e interactúan con las expresadas en los axones de otras células ganglionares, y en otros tipos celulares próximos, como las células gliales. Por ello, estudiamos estas moléculas en nuestros modelos mutantes.

Distribución de las proteínas de guía axonal L1CAM Y BRAVO: evaluación en los ratones *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}*.

Decidimos analizar la implicación de la generación y reparación de *DDSBs* sobre el proceso de guía axonal, estudiando dos de las principales proteínas implicadas en la génesis de los axones y navegación axonal en la retina: L1CAM y *BRAVO* (Sakurai, 2012).

Evaluamos la distribución de la proteína L1CAM en los mutantes *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}* por inmunofluorescencia, analizando retinas montadas en plano de E13,5. Tanto en los animales deficientes en reparación de roturas (*SCID* (Fig. 4.16 D) y *pol μ^{-/-}* (Fig 4.16 E), como en el carente de RAG-2 (Fig. 4.16 F) se observaron alteraciones severas en la distribución en plano de L1CAM, similares a las observadas en la distribución en plano de los axones de las ganglionares (Fig.4.12).

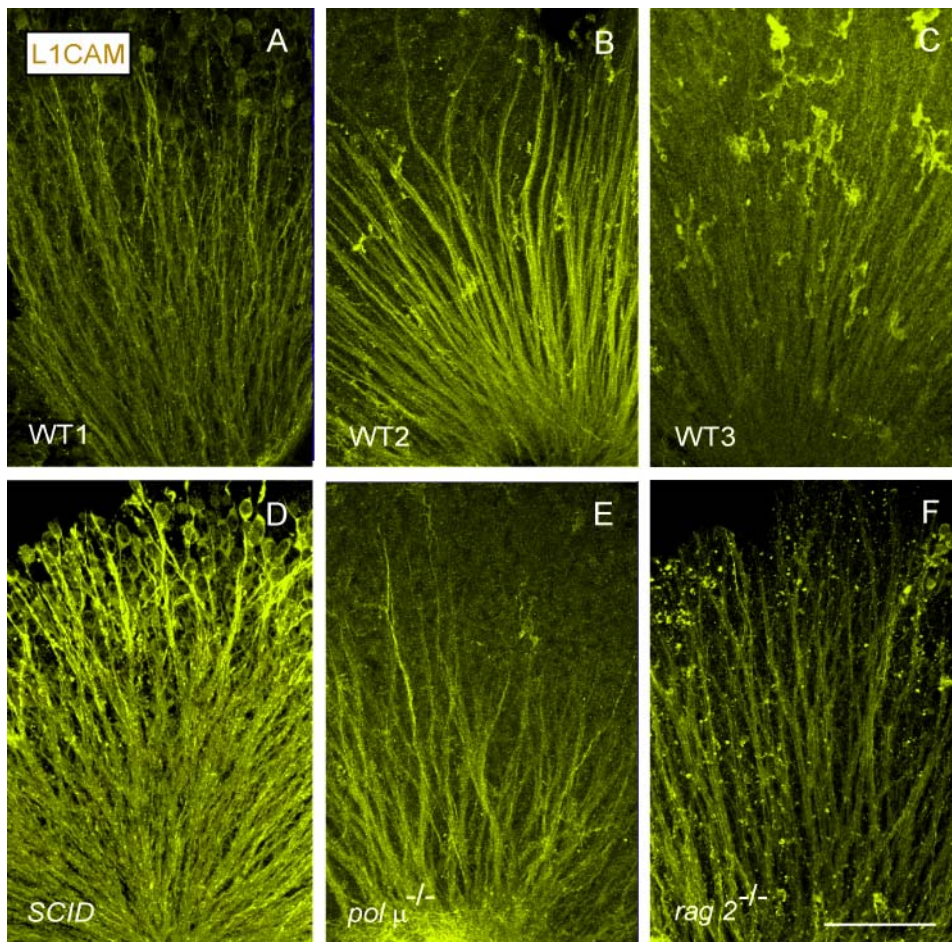


FIGURA. 4.16 – L1CAM EN RATONES MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ.

(A-F) Inmunofluorescencia de la proteína de guía axonal L1CAM en retinas montadas en plano de estadio E13,5 procedentes de los ratones mutantes *rag2^{-/-}*, *SCID* y *pol μ^{-/-}* (D, E, F) comparados con animales silvestres de sus respectivos fondos genéticos (A, B, C). Se analizaron un mínimo de 5 animales por cepa. WT1 - C57Bl/10 WT2 - Balb/c, WT3 - C57Bl/6. Barra de escala – 50 μm.

De manera similar, analizamos la expresión de *BRAVO* por inmunofluorescencia en los mutantes de reparación de *DDSBs* (Fig. 4.17). Tanto en el ratón *SCID* (Fig. 4.17 D) como en el modelo *pol μ^{-/-}*, (Fig. 4.17 E) las alteraciones en la distribución de L1CAM coincidieron con cambios en la distribución de *BRAVO*, especialmente evidentes en la zona central de la retina, próximas a la salida del nervio óptico (Fig. 4.17 D-E), donde se detectó una distribución mucho menos homogénea y más acicular que en los ratones silvestres (Fig. 4.17 A-B). El mutante *rag2^{-/-}* (Fig. 4-18 E) también presentó alteraciones en la distribución de *BRAVO* en la entrada al nervio óptico muy similares a las observadas en los mutantes de reparación (Fig. 4.17 D-E).

Estas observaciones indican que la falta de las proteínas de reparación del DNA DNA-PKcs y Pol μ , así como la de RAG-2, altera la distribución de las proteínas de guía axonal L1CAM y *BRAVO*, lo que podría repercutir en la conducción de los axones hacia los núcleos visuales primarios.

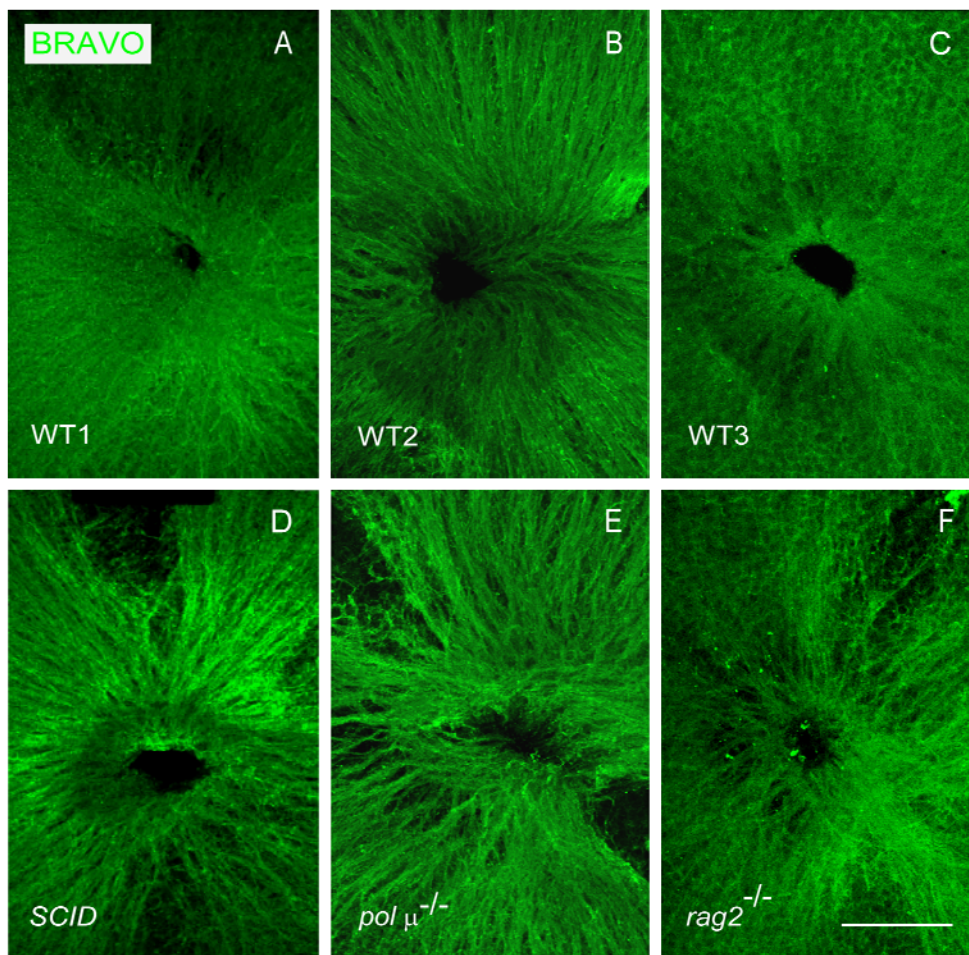


FIGURA 4.17 – *BRAVO* EN RATONES MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ.

(A-F) Inmunofluorescencia de la proteína de guía axonal *BRAVO* en retinas montadas en plano de estadio E13,5 procedentes de los ratones mutantes *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag2^{-/-}* (D, E, F) comparados con animales silvestres de sus respectivos fondos genéticos (A-C). Se analizaron de 6 a 8 animales por cepa. WT1 -Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57BL/10. Barra de escala – 50 μ m.

Asociación de las proteínas de guía axonal L1CAM Y BRAVO al frente de diferenciación en ausencia de la DNA polimerasa μ .

A continuación, determinamos si estos defectos en la distribución de proteínas de guía axonal se relacionaban con las alteraciones en la localización de las neuronas diferenciadas. Para ello, estudiamos la distribución de las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO en secciones transversales de retina, utilizando embriones $pol\mu^{-/-}$ de E13,5. Detectamos automáticamente el borde del frente de diferenciación y el área cubierta por éste utilizando el sistema de detección de bordes comentado anteriormente.

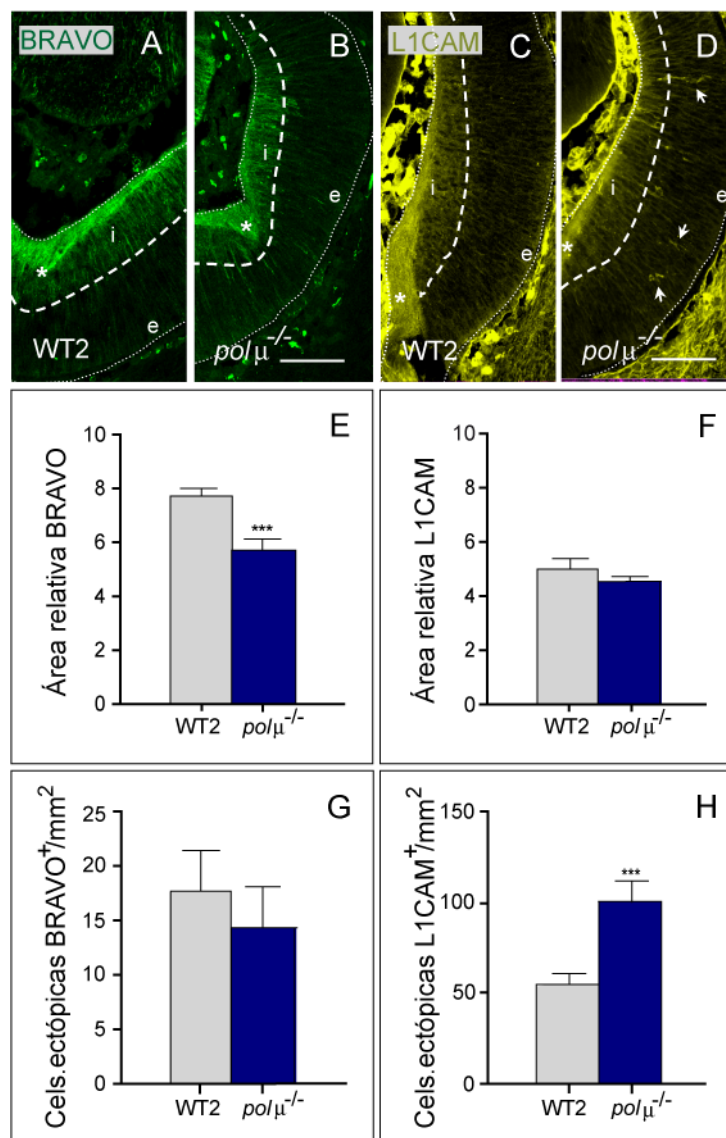


FIGURA 4.18 – DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS BRAVO Y L1CAM EN SECCIONES DE RETINA DEL MUTANTE PARA LA DNA-POLIMERASA μ .

(A,D) Inmuntinción de las proteínas de guía axonal BRAVO (A, B) y L1CAM (C-D) en secciones transversales de retinas de E13,5 de ratones $pol\mu^{-/-}$ (B,D) y su estirpe silvestre (A,C). Neuroepitelio delimitado por línea de puntos. i- Cara interna de la retina. e- Cara externa de la retina. El área de retina cubierta por el frente de diferenciación neural fue detectada automáticamente (línea discontinua). Las flechas señalan células localizadas fuera del frente de diferenciación. (E,G) Cuantificación del área de retina cubierta por el frente de diferenciación neural (área del frente de diferenciación a la cara interna de la retina). (F,H) Cuantificación de células ectópicas en el neuroepitelio indiferenciado. El asterisco en (A-D) representa el nervio óptico. Barra de escala – 100 μ m. WT2-C57BL/6. Las barras representan la media y el error estándar. ***p<0,001.

Se observó que el ratón *pol* $\mu^{-/-}$ presentaba un descenso del área cubierta por *BRAVO* en torno al frente de diferenciación (Fig. 4.18 A-B, línea discontinua, y E) y un incremento de células ectópicas L1CAM positivas en el neuroepitelio (Fig. 4.18 C-D, flechas, y H); los mismos tipos de alteraciones descritos en las células Tuj-1 positivas en el apartado 4.

Al observar que la ausencia de la polimerasa μ afectaba a la distribución de las dos proteínas de guía axonal, intentamos usar técnicas que nos permitieran obtener una cuantificación relativa de estos cambios. Para ello, analizamos por *Western Blot* la expresión de *BRAVO* (Fig. 4.19 A) y L1CAM (Fig. 4.19 B) en retinas de embriones *pol* $\mu^{-/-}$ de E13,5. Sin embargo, por esta técnica no detectamos cambios en la cantidad total de proteína entre el mutante y su control silvestre.

Estudiamos también por Western blot si había cambios en alguna de las distintas isoformas de L1CAM (Fig. 4.19 A) y *BRAVO* (Fig. 4.19 B), sin observar diferencias entre los ratones carentes de la DNA polimerasa μ y sus controles. La extracción secuencial de estas proteínas para evaluar cambios entre diferentes compartimentos celulares tampoco reveló cambios entre las mismas (no se muestra).

Dado que por ninguno de los métodos empleados se detectaron cambios significativos en la cantidad total de proteínas de guía axonal analizadas, es probable que los cambios en L1CAM y *BRAVO* asociados al mutante *pol* $\mu^{-/-}$ sean sólo de distribución. Estos análisis en conjunto parecen indicar que la falta de la polimerasa μ , afecta a la localización en las neuronas diferenciadas (Fig. 4.15), y a la distribución, pero no la cantidad, de L1CAM y *BRAVO* (Fig. 4.19).

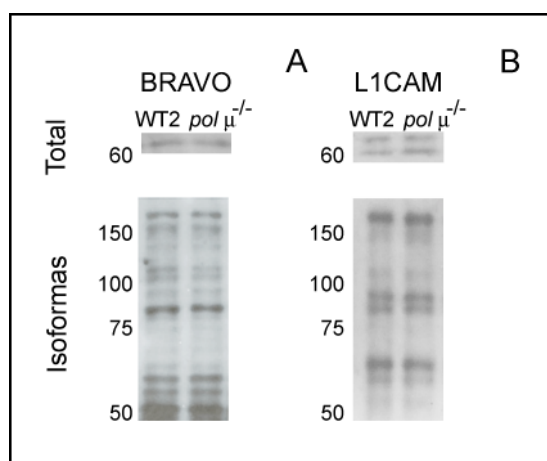


FIGURA 4.19- ESTUDIO POR *WESTERN BLOT* DE LAS PROTEÍNAS DE GUÍA AXONAL L1CAM Y BRAVO.

(A,B) Western Blot representativo de las proteínas de guía axonal *BRAVO* (A) y L1CAM (B) en retinas de E13,5 de ratones *pol* $\mu^{-/-}$. Se muestran extractos de proteína total y extractos con las isoformas disociadas. Se cargaron homogeneizados de 5 a 8 retinas por pocillo, repitiendo cada blot un mínimo de 3 veces. WT2-C57BL/6.

6 -ALTERACIONES EN LA RETINA ADULTA ASOCIADAS A DEFICIENCIAS EN LA DNA POLIMERASA μ .

Hemos visto que la neurogénesis y la axonogénesis de las células ganglionares durante el desarrollo temprano de la retina requiere la correcta actividad de DNA-PKcs y Pol μ en la reparación de roturas del DNA. Nos preguntamos si los defectos en estas proteínas tendrían alguna consecuencia posterior en la estructura de la retina o en el desarrollo de otros tipos celulares más tardíos. Para comenzar a evaluar este punto, abordamos el estudio de la retina adulta en el ratón *pol* $\mu^{-/-}$.

Estructura de la retina y densidad de RGCs en la retina embrionaria y adulta en ausencia de la DNA polimerasa μ .

Durante el desarrollo embrionario, habíamos observado un incremento en la muerte celular programada asociado a la falta de la DNA polimerasa μ . Evaluamos si ese incremento de la apoptosis se reflejaba en cambios de la estructura laminar de la retina comparando la retina embrionaria a E13,5 y la retina de ratones adultos de 3 meses de edad.

Cuantificamos el número de filas de núcleos presentes en la retina central a la altura del nervio óptico. En el ratón *pol* $\mu^{-/-}$ de E13,5 detectamos un pequeño pero consistente descenso del número total de filas de núcleos (Fig. 4.20 A) respecto a su cepa control. Por el contrario, en el modelo mutante adulto no se observaron cambios en el número total de filas de núcleos de la retina central, ($p= 0,1026$), ni tampoco evaluándolo por separado en las distintas capas nucleares de la retina (Fig. 4.20 B).

También estudiamos la evolución en el tiempo del número de células ganglionares a través de su marcador específico Brn3a, cuya expresión comienza en E12,5 y está presente en la edad adulta en el 74% de las células ganglionares (Nadal-Nicolas et al., 2012). Cuantificamos la densidad de células Brn3a positivas por inmunotinción de retinas montadas en plano de animales carentes de la DNA polimerasa μ embrionarios y adultos. En ratones de E13,5, detectamos una mayor densidad de esta población neuronal en el modelo nulo *pol* $\mu^{-/-}$ (Fig. 4.20 C), de explicación no clara. Sin embargo, al realizar este mismo experimento en ratones adultos (P90), no observamos cambios (Fig. 4.20 D), lo que podría indicar la existencia de un mecanismo de compensación.

En estudios anteriores del grupo, en el mutante *pol* $\mu^{-/-}$ a E18,5 se detectó una disminución en el número de axones que decusan ipsilateralmente a nivel del núcleo geniculado lateral. Sin embargo, en el animal adulto, el trazado retrógrado de la vía óptica con toxina colérica no reveló cambios en la decusación a nivel de ninguno de los núcleos visuales primarios (estudio

en colaboración con el Prof. Pedro de la Villa, no mostrado). En resumen, a pesar de haber detectado un claro fenotipo neural embrionario en el ratón mutante $pol\ \mu^{-/-}$, varios de estos cambios neuronales revierten al llegar a adulto.

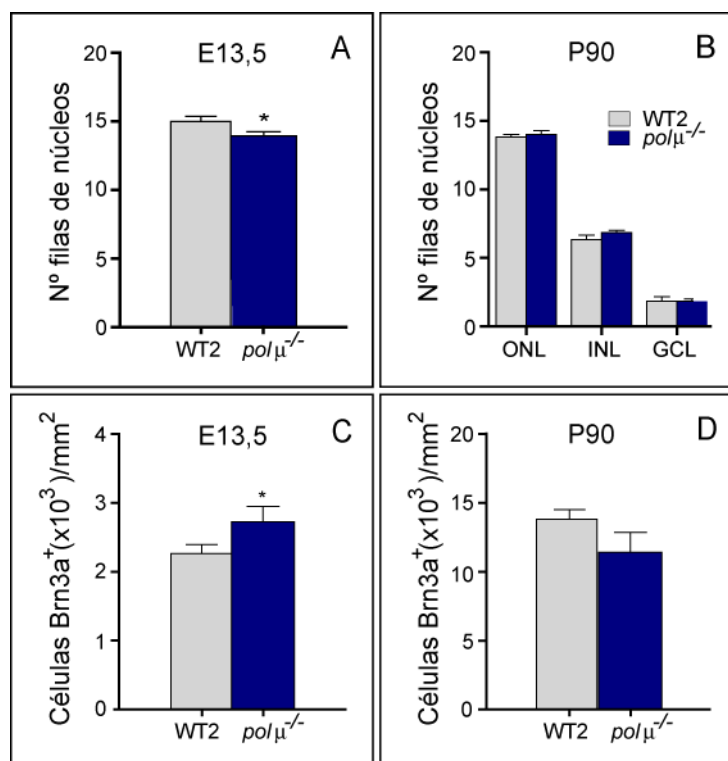


FIGURA 4.20 - DIFERENCIAS DE FENOTIPO EN LA RETINA DEL RATÓN $pol\ \mu^{-/-}$ EMBRIONARIO Y ADULTO.

(A,B) Cuantificación del número de capas de núcleos presentes en secciones longitudinales de la retina de ratones $pol\ \mu^{-/-}$ embrionarios (E13,5) y adultos (P90, capas analizadas individualmente). (C,D) Cuantificación de la densidad de neuronas Brn3a positivas en retinas montadas en plano de ratones $pol\ \mu^{-/-}$ embrionarios (E13,5) y adultos (P90). ONL-capa nuclear externa; INL-capa nuclear interna, GCL-capa de células ganglionares; WT-C57BL/6. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$;

Distribución de astrocitos en la retina adulta en ausencia de la DNA polimerasa μ .

Para evaluar más en detalle el alcance de la ausencia de las proteínas de reparación de *DDSBs* en la retina, se procedió a estudiar en el animal $pol\ \mu^{-/-}$ adulto (P90) las poblaciones celulares que se generan más tardíamente: los astrocitos y la glía de Müller.

Identificamos las células de la glía de Müller por su inmunoreactividad frente a CRALBP (*Cellular Retinaldehyde Binding Protein*) (Bunt-Milam and Saari, 1983). Estudiamos esta población de células gliales en secciones transversales de retina central de P90, cuantificando el número de células positivas para CRALBP (Fig. 4.21 A-B). También cuantificamos el área y la intensidad del marcaje en las mismas, por técnicas de procesamiento automático de imágenes

(ver material y métodos, detección automática de áreas complejas y cuantificación automática de intensidad de fluorescencia) (Fig. 4.21 C-D).

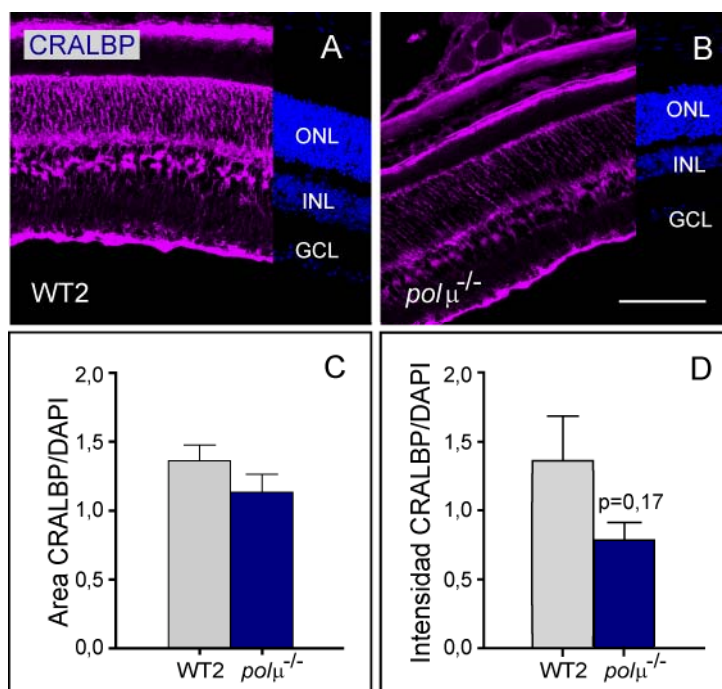


FIGURA 4.21 - GLÍA DE MÜLLER EN SECCIONES DE RETINA DEL RATÓN $pol\mu^{-/-}$ ADULTO.

(A-B) Inmunofluorescencia de la glía de Müller (células CRALBP positivas, morado) en secciones transversales de retina central del ratón $pol\mu^{-/-}$ a P90. A la derecha de cada sección se muestra su tinción con DAPI (azul). (C,D) Cuantificación del área cubierta por CRALBP (C) y la intensidad de fluorescencia de su marcaje (D). ONL-capa nuclear externa; INL -capa nuclear interna, GCL-capa de células ganglionares; WT-C57BL/6. Barra de escala- 75 μ m. Las barras representan la media y el error estándar.

En éste experimento los cambios en el mutante en el número total de células de la glía de Müller y en el área cubierta por las mismas no llegaron a ser significativos.

La población de astrocitos la estudiamos por inmunotinción de GFAP (*Glial Fibrillar Acidic Protein*)(Eng et al., 2000), analizando la densidad y morfología de los astrocitos en el mutante $pol\mu^{-/-}$ adulto tanto en regiones centrales y periféricas de retinas montadas en plano (Fig. 4.22 A-B, D-E) como en secciones de retina central (Fig. 4.27 I-J). En ellas, cuantificamos automáticamente el área cubierta por los astrocitos (Fig. 4.22 A, K). Asimismo, evaluamos el número de ramificaciones de cada astrocito contando el número de intersecciones de sus ramificaciones con un círculo de 10 μ m de diámetro centrado en el núcleo de la célula. (Fig. 4.22 G). Con este abordaje revelamos que el ratón carente de $Pol\mu$ presenta alteraciones morfológicas en la población astrogliar: En el estudio sobre secciones no se observan patrones de gliosis reactiva (Fig. 4.22 I-K), pero en el abordaje en plano, tanto en la región central de la retina como en la periferia de la misma, los astrocitos del mutante son atróficos, ya que aparecen más engrosados y, en la retina periférica, tienen las proyecciones más acortadas que en el control silvestre. Al cuantificar su número y ramificaciones, en la retina del ratón mutante

adulto se encontraron una menor densidad de astrocitos que en la retina silvestre (Fig. 4.22 A-B y F), y un mayor número de ramificaciones por célula (Fig. 4.22 G-H).

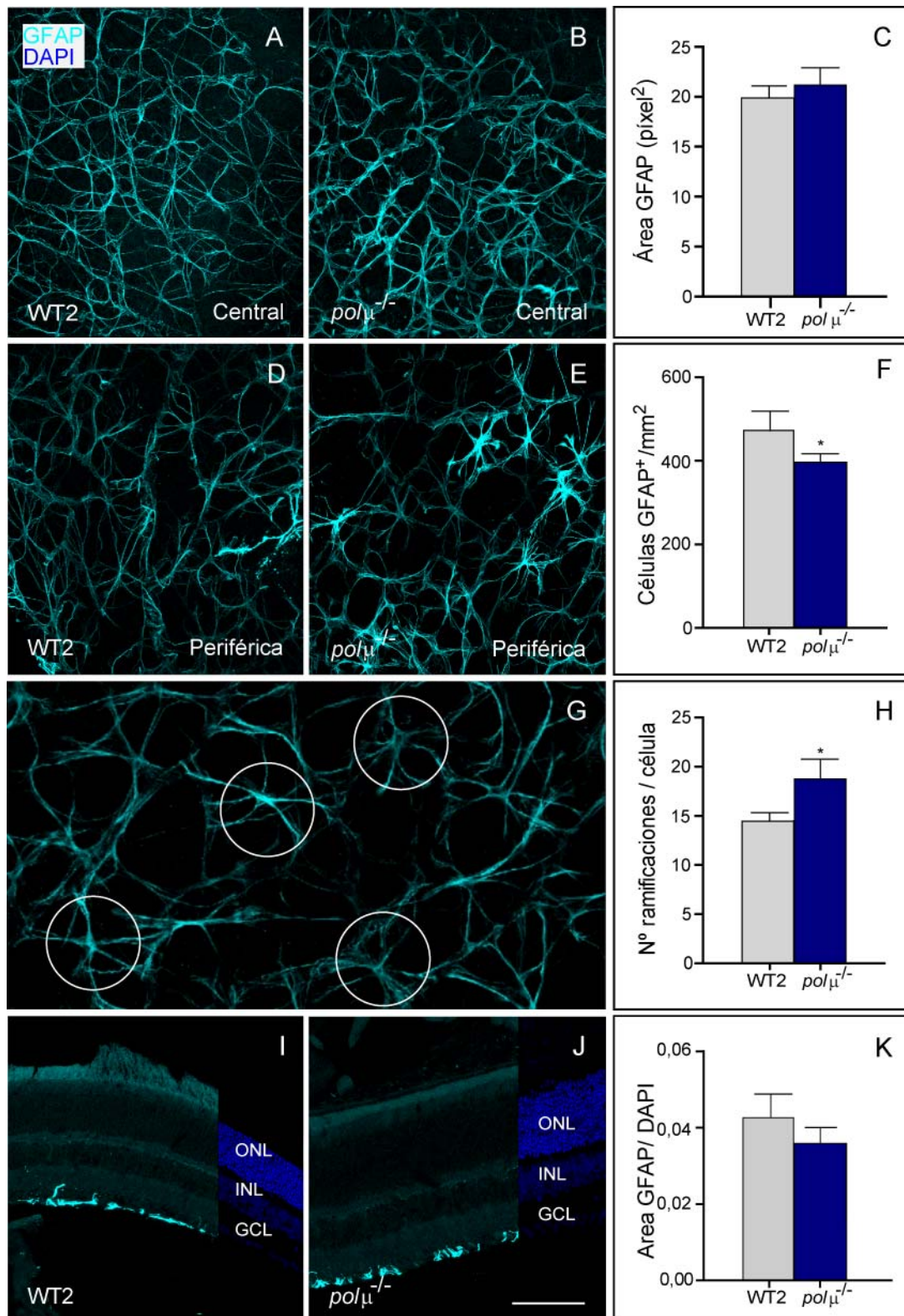


FIGURA 4.22 - ASTROCITOS EN EL RATÓN *polμ*^{-/-} ADULTO.

(A-B, D-E, G, I-J) Inmunofluorescencia de GFAP (cian) en retinas de P90 de ratones *polμ*^{-/-} y su estirpe silvestre montadas en plano (A-B, campos de retina central; D-E, campos de retina periférica) y en secciones de retina central (I,J, a la derecha de cada sección se muestra en azul su tinción con DAPI). (C,K) Cuantificación del área cubierta por astrocitos, (F) de la densidad de astrocitos y (G-H) del número de ramificaciones de cada uno. El número de ramificaciones se determinó contando las intersecciones de cada astrocito con un círculo de 10 μm de diámetro centrado en el núcleo del astrocito (G, círculo blanco) en 5 ratones por cepa. WT-C57Bl/6. ONL-Capa nuclear externa; INL-Capa nuclear interna; GCL-Capa de células ganglionares. Barra de escala - 75 μm. Las barras representan la media y el error estándar. *p<0,05.

Curiosamente, ambos fenómenos parecen compensarse mutuamente, ya que el área cubierta por los astrocitos (Fig. 4.22 C) es idéntica en el animal silvestre adulto (Fig. 4.22 A,D), que en el nulo (Fig. 4.22 B,E). Estos resultados indican que la ausencia de la DNA polimerasa μ afecta al número y la morfología de los astrocitos de la retina adulta.

Disposición de los vasos sanguíneos en la retina adulta del ratón $pol\mu^{-/-}$.

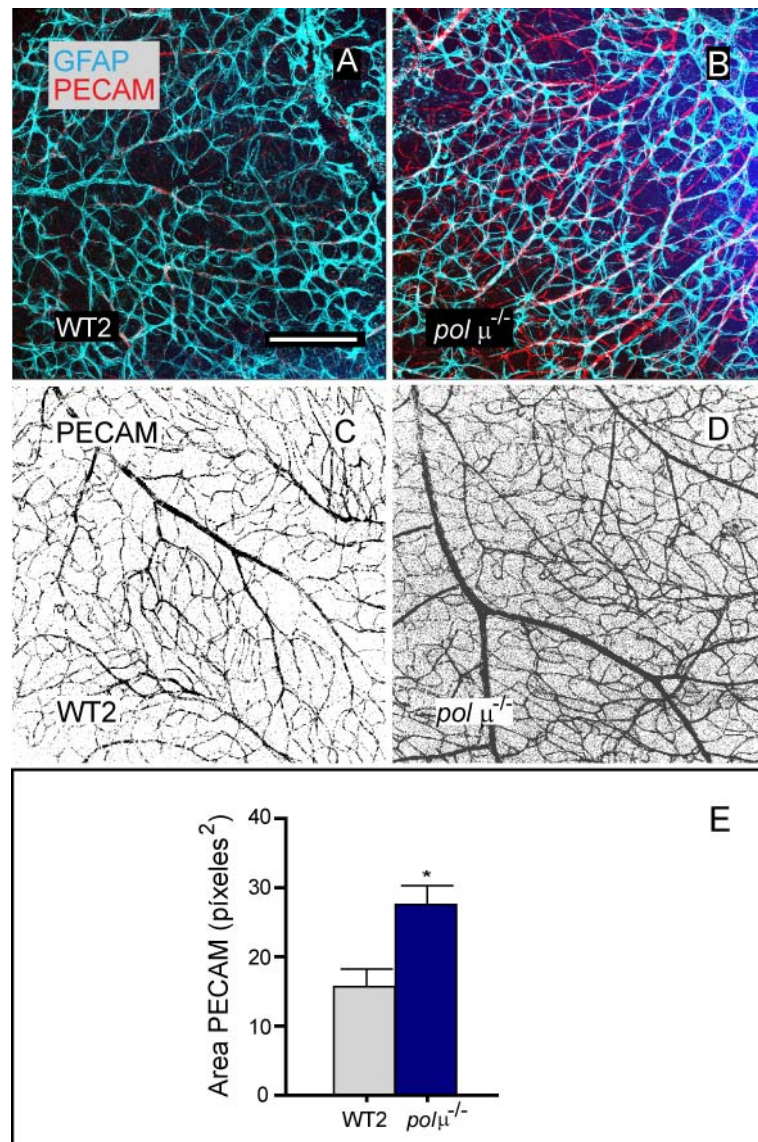


FIGURA 4.23 - HIPERVASCULARIZACIÓN EN LA RETINA DEL RATÓN $pol\mu^{-/-}$ ADULTO.

(A-D) Retinas de P90 de $pol\mu^{-/-}$ y su estirpe silvestre, montadas en plano y procesadas para inmunofluorescencia. (A-B, cian) Inmunofluorescencia de la población de astrocitos GFAP positiva. (A-B, rojo; C-D, negro) Inmunofluorescencia de la distribución de vasos sanguíneos PECAM positiva. (E) Cuantificación del área cubierta por los vasos. WT-C57Bl/6. Barra de escala - 75 μ m. *p<0,05.

La formación de los astrocitos y de la arteria de la retina discurre paralelamente en el tiempo y en el espacio. Además, desde el punto de vista molecular, ambos procesos se encuentran íntimamente relacionados (Gariano, 2003, Tao and Zhang, 2014). Por ello, nos planteamos si la afectación de los astrocitos podría ir acompañada de alteraciones en la angiogénesis de la retina. Para evaluarlo, revelamos los vasos sanguíneos de la retina por inmunofluorescencia contra PECAM (antígeno de células endoteliales) y comparamos su distribución en plano con la de los astrocitos (positivos para GFAP).

En retinas adultas, observamos que la distribución de los vasos sanguíneos en el animal silvestre es mayoritariamente coincidente con la distribución de los astrocitos. Por el contrario, en el mutante *pol* $\mu^{-/-}$ se observó una mayor abundancia de vasos sanguíneos, tanto secundarios como principales, que se extienden más allá del entramado definido por los astrocitos (Fig. 4.23 A-B).

Estudiamos la superficie cubierta por los vasos sanguíneos en las retinas utilizando técnicas de cuantificación automática de área análogas a las descritas en el apartado anterior. Con este método, observamos que, en efecto, en ausencia de Pol μ se produce una hipervascularización: el área cubierta por vasos sanguíneos en el animal mutante era mayor que en el animal silvestre (Fig. 4.23 C-E), lo que sugiere indirectamente que la falta de la DNA polimerasa μ podría repercutir en la angiogénesis de la retina.

7- MICROGLIA EN LA RETINA EN DESARROLLO EN AUSENCIA DE DNA-PK, POL μ Y RAG-2.

Según se describe en diversos estudios, los tres modelos mutantes estudiados comparten en la edad adulta una alteración severa del sistema inmune (Shinkai et al., 1992, Shultz et al., 1995, Bertocci et al., 2003). Nuestro grupo analizó preliminarmente el contenido de células del sistema inmune innato (microglía) en estos mutantes durante el desarrollo de la retina (Baleriola, 2008). En estos ensayos se vio que el mutante *pol* $\mu^{-/-}$ no presentaba cambios en la cantidad de células Mac-1 positivas (microglía ramificada), mientras que el mutante *rag* $2^{-/-}$ carecía completamente de esta población microglial (Baleriola, 2008).

Evaluación de la microglía por tinción con lectina de tomate.

Analizamos más en detalle la presencia y morfología microglial durante el desarrollo de la retina utilizando la lectina de tomate, que durante la embriogénesis está reconocida como un marcador general de microglía (Santos et al., 2008). Realizamos tinciones en retinas montadas en plano de ratones *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}* de E13,5, contrastando su fenotipo con el de sus controles silvestres (Fig. 4.24). En los tres mutantes, incluyendo a *rag 2^{-/-}*, detectamos una población de células microgliales positivas para lectina de tomate (Fig. 4.24 B,D,F). Estas células presentan una morfología alterada, más ameboide y menos ramificada en los mutantes *SCID* y *rag2^{-/-}* (Fig. 4.24 B,F), que en sus respectivas cepas silvestres (Fig. 4.24 A,E).

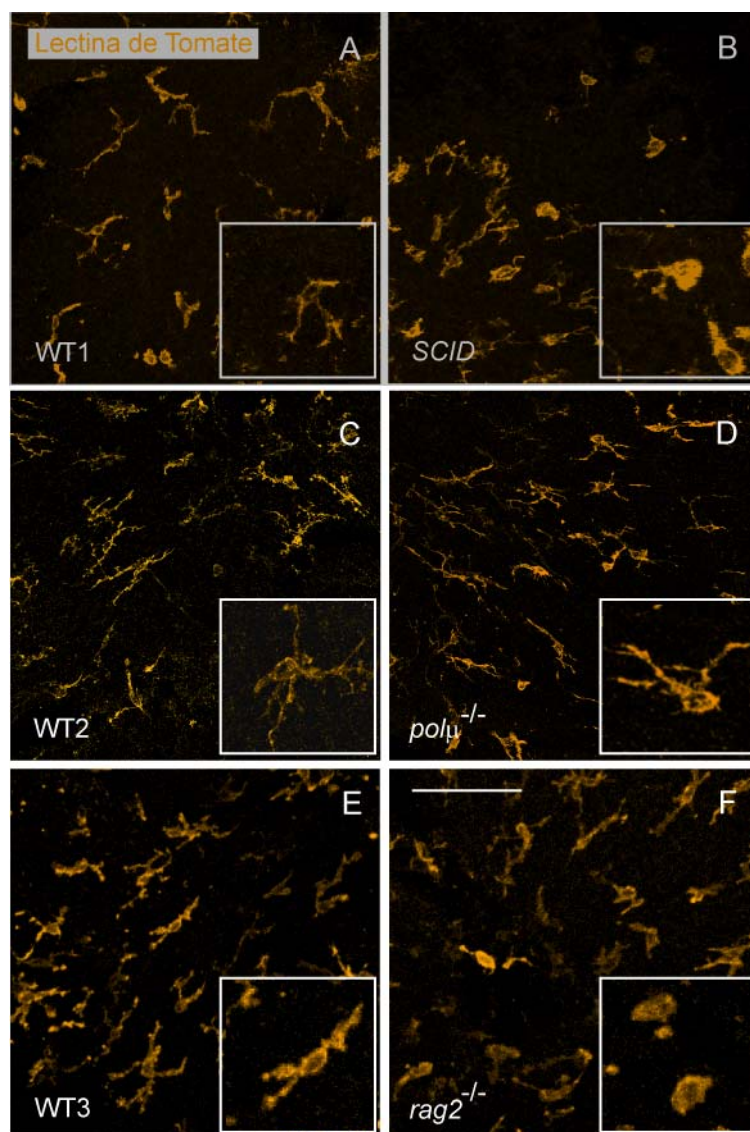


FIGURA 4.24 – DETECCIÓN DE MICROGLÍA EN MUTANTES DE LA VÍA NHEJ.

(A-F) Tinción con Lectina de tomate (TL) de retinas de E13,5 montadas en plano procedentes de ratones *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag2^{-/-}* (B, D, F) y sus controles respectivos (A,C y D). El recuadro muestra la vista magnificada. WT1 -Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57Bl/10. Barra de escala, 100 μm; 20 μm en las magnificaciones.

La cuantificación de las imágenes demostró que el incremento de células con morfología ameboide, típicas de estados indiferenciados de la microglía, era significativo en los dos mutantes a E13,5 (Fig. 4.25 A, E). Evaluamos si se trataba de un retraso en su maduración estudiando la distribución del mismo marcador en retinas de E14,5. Comprobamos que el fenotipo asociado a las células positivas a lectinas de tomate también se mantenía a esta edad, aunque atenuado (Fig. 4.25 B,F). Sin embargo, el mutante $pol\ \mu^{-/-}$ no presentó cambios significativos en esta población microglial a ninguna de las dos edades (Fig. A.24 y 4.25 C,D).

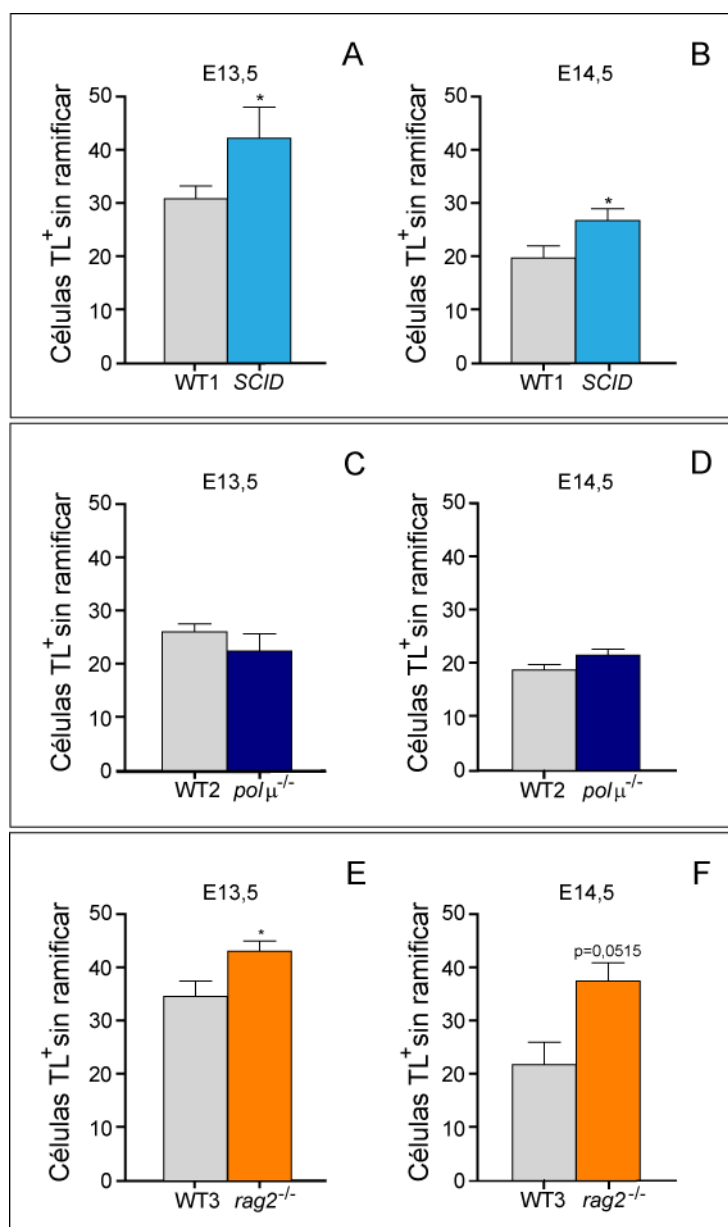


FIGURA 4.25- DETECCIÓN DE MICROGLÍA AMEBOIDE EN MUTANTES DE LA VÍA NHEJ.

(A-F) Cuantificación del número de células positivas para lectinas de tomate con morfología ameboide, sin ramificar, respecto al total de células microgliales positivas para lectinas de tomate presentes en la muestra. Se presentan contajes de los mutantes SCID, $pol\ \mu^{-/-}$ y $rag2^{-/-}$ y sus respectivas cepas control a E13,5 (A, C, E) y E14,5 (B, D, F). Se analizaron de 6 a 12 animales por edad y cepa. WT1 -Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57BL/10. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$.

Los cambios en la morfología de las células microgliales no correlacionaron con cambios en el número total de células microgliales a E13,5 en ninguno de los tres mutantes (Fig. 4.26 A), aunque en E14,5, el mutante SCID presentó un incremento del número de células positivas para lectinas de tomate (Fig. 4.26 B). La densidad de células microgliales en E14,5 en este mutante estaba, de hecho, más próxima a la de su estirpe silvestre en E13,5 .

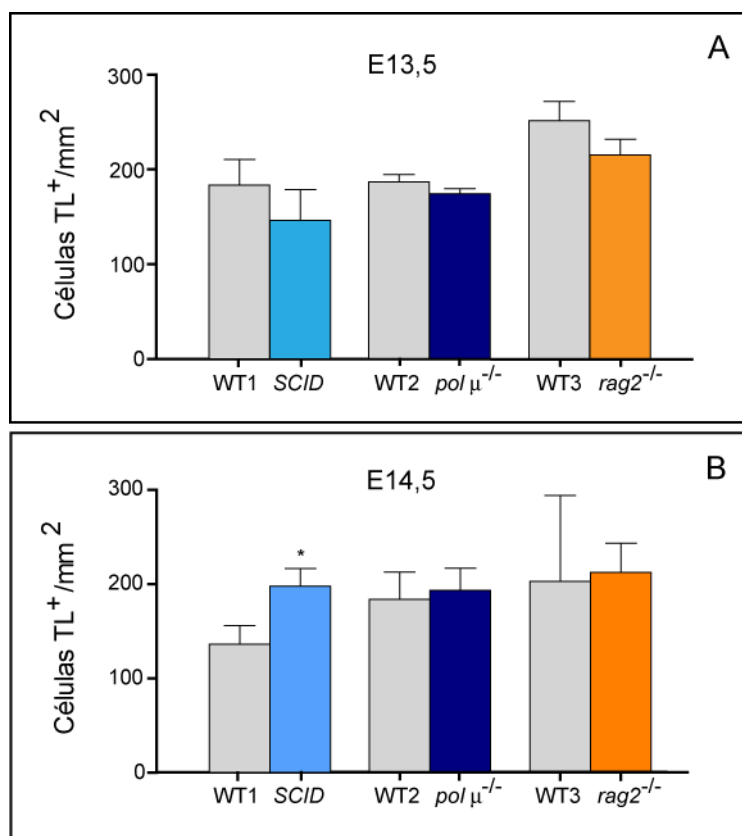


FIGURA 4.26- DENSIDAD DE LA MICROGLÍA AMEBOIDE EN MUTANTES DE LA VÍA NHEJ.

(A-B) Cuantificación de la densidad de células microgliales positivas para lectinas de tomate en los mutantes SCID, pol μ⁻ y rag2⁻ y sus respectivas cepas control a E13,5 (A) y E14,5 (B). Se analizaron de 6 a 12 animales por edad y cepa. WT1 - Balb/c, WT2 - C57Bl/6, WT3 - C57BL/10. Las barras representan la media y el error estándar. * p<0,05.

Intentamos averiguar si el mutante pol μ⁻ presentaba también alguna alteración, aunque menos severa, en la morfología microglial. Para ello, cuantificamos la arborización de las proyecciones microgliales estudiando su distribución a través de diversos círculos concéntricos centrados en el núcleo celular (Fig. 4.27 A) (Ver métodos de cuantificación manual de activación de la microglia). Con esta aproximación, el número de ramas microgliales resultó ser sistemáticamente menor en el mutante carente de la DNA polimerasa μ que en su control, sugiriendo que, en conjunto, la microglía estaba menos arborizada en el mutante, aunque los cambios no llegaron a ser significativos a nivel de ninguno de los anillos analizados.

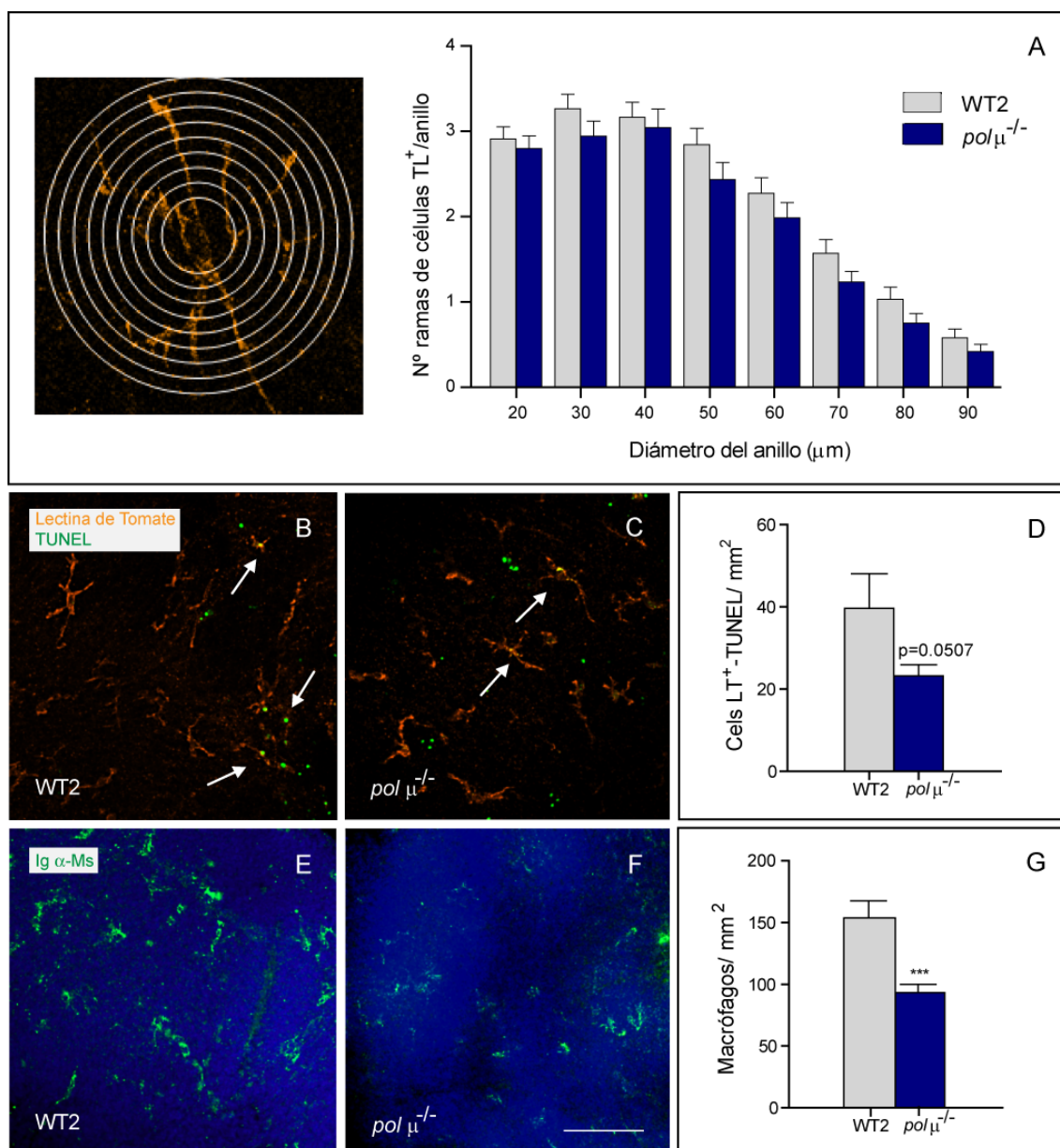


FIGURA 4.27 – MICROGLÍA DE LA RETINA EN AUSENCIA DE LA POLIMERASA μ .

(A) Cuantificación del número y longitud de ramas en células positivas para Lectina de tomate (detalle, naranja) en animales mutantes $pol \mu^{-/-}$ y su control silvestre. Se cuantificó por cada célula (90 células por animal) el número de ramas secantes a cada uno de 9 círculos concéntricos, con diámetros crecientes en intervalos de 10 μm y centrados en el núcleo de la célula. (B-C) Detección (flecha) y (D) cuantificación de la actividad fagocítica de la microglía en retinas montadas en plano procesadas por tinción con lectina de tomate (LT, naranja) y TUNEL (verde). (E-F) Detección y (G) cuantificación de las células presentadoras de antígenos en retinas montadas en plano procesadas por tinción contra inmunoglobulinas (verde). Los experimentos se realizaron en animales mutantes $pol \mu^{-/-}$ y su control de E13,5 silvestre. Se utilizaron de 5 a 8 animales por experimento y cepa. Escala: 80 μm en B-C y 100 μm en E-F. Las barras en (A,D,G) representan la media y el error estándar. *** $p < 0,001$.

Evaluamos también posibles cambios en la actividad microglial en el ratón $pol \mu^{-/-}$, estudiando la capacidad fagocítica de la microglía en este mutante, cuantificando el número de células muertas (TUNEL positivas) englobadas por microglía (identificada por lectina de tomate) (Fig.

4.27 B,C). No llegamos a obtener diferencias significativas, pero se observó una marcada tendencia a la baja en las células fagocíticas del mutante (Fig. 4.27D).

Por último, evaluamos las células presentadoras de antígeno presentes en el ratón *pol* $\mu^{-/-}$ en base a la presencia de receptores para inmunoglobulinas en su superficie. Realizamos una inmunotinción en retinas montadas en plano a E13,5 (Fig. 4.27 E-F) y descubrimos que el ratón mutante *pol* $\mu^{-/-}$ presentaba menos células presentadoras de antígeno que su control (Fig. 4.27 G), aunque el número de células con marcaje TUNEL englobadas por macrófagos no cambiaba (datos no mostrados, $p=0,3525$).

En general, la morfología de la microglía se ve alterada de manera similar en los ratones *SCID* y *rag2*^{-/-}. El fenotipo microglial se encuentra menos afectado en el mutante *pol* $\mu^{-/-}$ lo que podría indicar que, en la microglía, la falta de RAG-2 y DNA-PK interfiriera con un proceso independiente de Pol μ .

Evaluación de la microglía por marcaje con cd68.

Como se explicó en la introducción, la microglía ameboide predomina en estadios tempranos del desarrollo embrionario (E11,5), y va siendo sustituida a lo largo del mismo por la microglía ramificada, ya madura (Cuadros et al., 1992, Cuadros and Navascues, 1998, Santos et al., 2008, Marin-Teva et al., 2011). La afectación del número de células sin ramificar de los mutantes *SCID*, y *rag 2*^{-/-}, nos llevó a plantear si en los mutantes existiría algún problema en la maduración microglial. Para analizarlo, recurrimos a la inmunotinción con el marcador cd68, que durante el desarrollo de la retina se asocia a la maduración de este tipo celular (Santos et al., 2008) en retinas montadas en plano de ratones *SCID*, *pol* $\mu^{-/-}$ y *rag 2*^{-/-} de E13,5, y sus respectivas cepas silvestres. En los mutantes *SCID* (Fig. 4.28 B) y *rag 2*^{-/-} (Fig. 4.28 F) se observó una marcada disminución del número de células cd68 positivas (Fig. 4.28 G). En el mutante *pol* $\mu^{-/-}$, el número de esta población microglial no cambia (Fig. 4.28 G), pero sí se aprecia una menor ramificación de estas células (Fig. 4.28 F).

En línea con los resultados del apartado anterior, estos datos indican que, durante el desarrollo de la retina, la ausencia de la endonucleasa RAG-2 y de la proteína de NHEJ DNA-PKcs repercute en cambios en la maduración microglial, que deberían tenerse en cuenta de cara a evaluar el fenotipo neural encontrado. Por el contrario, la ausencia de la DNA polimerasa μ , tiene una escasa repercusión en este proceso.

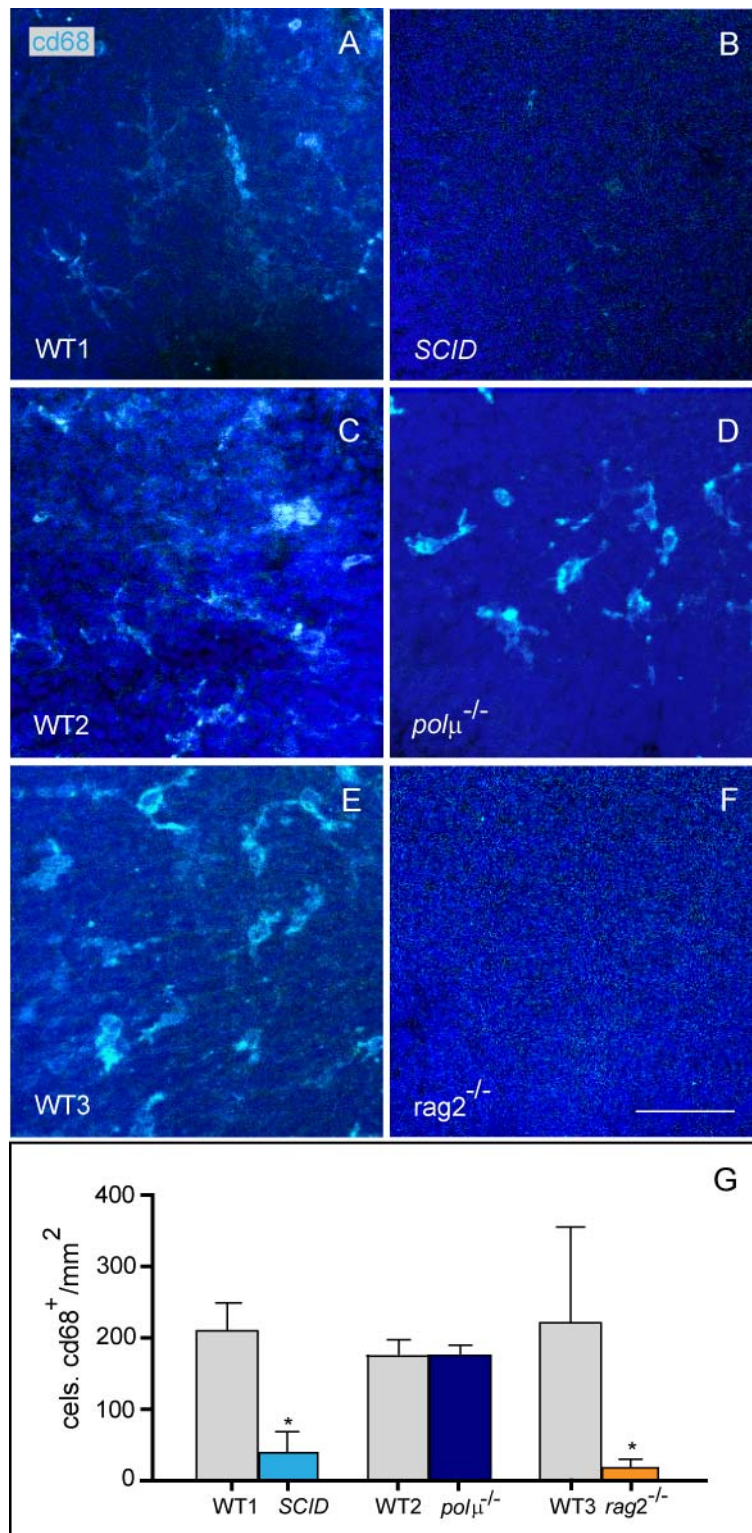


FIGURA 4.28 – MADURACIÓN MICROGLÍAL EN MUTANTES DEFICIENTES EN NHEJ.

(A-F) Inmunotinción para cd68 (cian) de retinas en E13,5 montadas en plano de los ratones mutantes *SCID*, $pol\mu^{-/-}$ y $rag2^{-/-}$ (B, D, F) y sus respectivos controles silvestres (A,C,E). Cuantificación de la densidad de células positivas para cd68 (G). Se analizaron 6 retinas por cepa. Barra de escala-75 μ m. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$.

8 - TRANSPOSICIÓN DEL ELEMENTO MÓVIL DEL GENOMA LINE-1 EN MUTANTES DEFICIENTES EN RAG-2 y NHEJ.

Hasta el momento hemos estudiado, en el desarrollo de la retina, el papel de dos posibles fuentes de mutación y diversidad somática: la actividad de genes implicados en la reparación de *DDSBs* por la vía NHEJ (DNA-PKcs y Pol μ) y la generación dirigida de roturas del DNA por la endonucleasa RAG-2. Evaluaremos a continuación uno de los mecanismos fisiológicos mejor conocido de generación de mosaicismo somático: la retrotransposición del elemento móvil LINE-1, evaluando su presencia en la retina embrionaria y adulta, y su relación con la ausencia de proteínas de generación y reparación de roturas del DNA.

La transposición de LINE-1 se activa en células somáticas de la retina en etapas tardías de su desarrollo.

En la mayor parte de los tejidos somáticos, el retrotransposón LINE-1 está quiescente. Sin embargo, su transposición se activa durante el desarrollo embrionario específicamente en los progenitores neurales de algunas áreas del sistema nervioso, (concretamente, en hipocampo, hipotálamo y cerebelo) (Coufal et al., 2009, Thomas et al., 2012), produciendo roturas en el DNA que serán utilizadas como dianas de salto. Este proceso provoca que el contenido relativo de LINE-1 se incremente en el DNA de las células de estas zonas respecto al resto de tejidos.

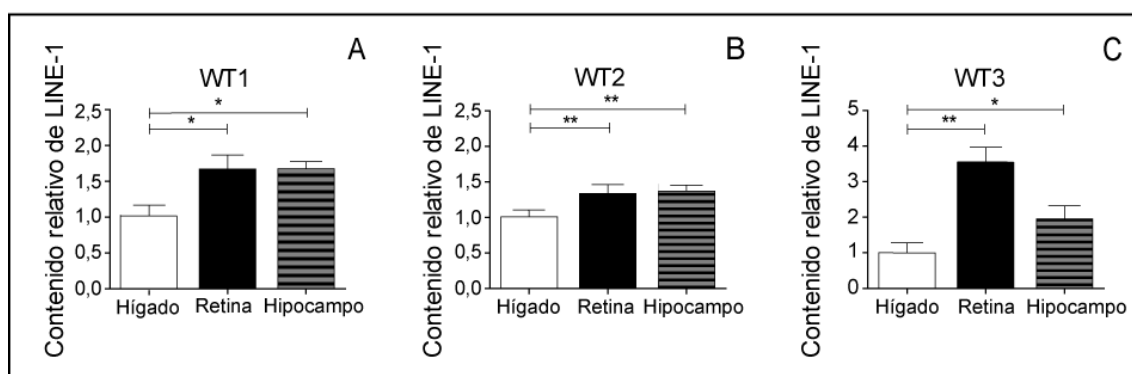


FIGURA 4.29 – CONTENIDO DE LINE-1 EN EL DNA DE CÉLULAS DE LA RETINA MURINA ADULTA.

Abundancia relativa del transposón LINE-1 en el hígado, la retina y el hipocampo de ratones adultos (P90) analizadas por qPCR, en tres cepas silvestres (A- WT1-Balb/c -, B- WT2 - C57Bl/6, C- WT3 - C57Bl/10). El contenido relativo de LINE-1 representa la ratio $2^{\Delta Ct}$ de LINE-1 referido al valor del hígado. * $p < 0,05$; ** $p > 0,01$.

Dado el incremento de roturas de DNA que se produce en la retina neural durante su desarrollo temprano, nos planteamos si el proceso de retrotransposición de LINE-1 se encontraría también activo en la retina. Para evaluar este supuesto, detectamos las copias de LINE-1 por

qPCRs en el DNA de células de retinas adultas de animales silvestres de tres cepas distintas: Balb/C (Fig. 4.29 A), C57BL/6 (Fig. 4.28 B) y C57BL/10 (Fig. 4.29 C), usando como normalizador interno el gen del mRNA 18 S (ver PCR cuantitativa a tiempo real en material y métodos). Comparamos el contenido relativo en LINE-1 de las retinas con el observado en el hígado, donde está descrito que no hay cambios en el contenido del transposón, y en hipocampo, donde se sabe que se incrementa (Muotri and Gage, 2006). Usando el valor del hígado adulto como control negativo, descubrimos que el contenido de LINE-1 en la retina de las tres cepas es especialmente alto, igualando el contenido relativo de LINE-1 en el hipocampo (Fig. 4.29 A,B) e incluso superándolo (Fig. 4.29 C). Estos datos sugieren que la transposición de LINE-1 podría activarse en algún momento durante el desarrollo de la retina.

Para evaluar en qué momento se produce la transposición, analizamos por qPCR el contenido en LINE-1 de retinas embrionarias de diferentes edades (Fig. 4.30 A). En concreto, evaluamos la abundancia de LINE-1 durante las etapas del desarrollo embrionario en las que hemos visto las alteraciones neuronales.

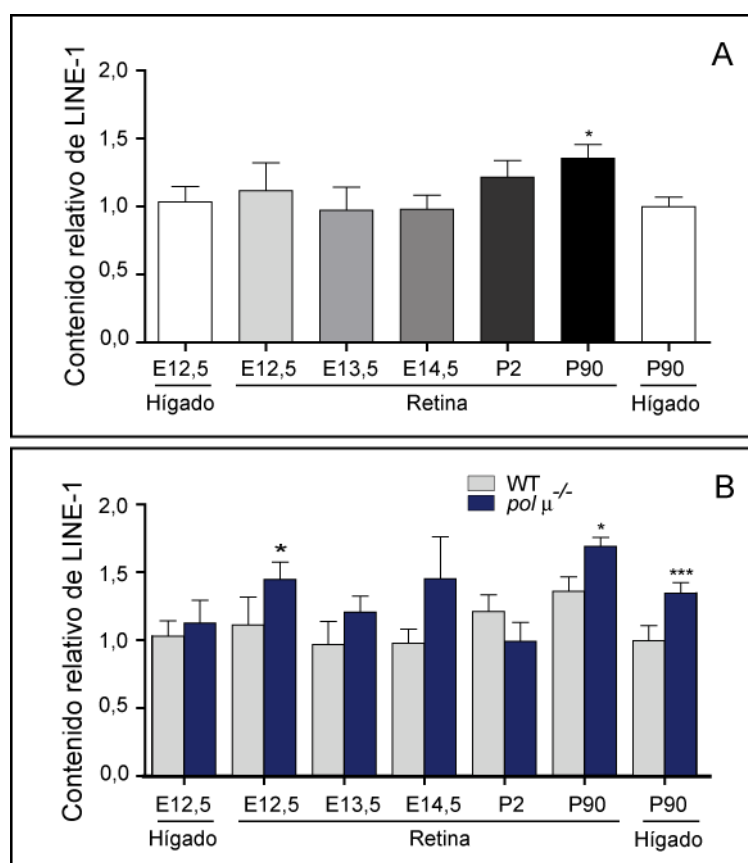


FIGURA 4.30- CONTENIDO DE LINE-1 EN LA RETINA EMBRIONARIA DE RATONES SILVESTRES Y MUTANTES *Pol μ*^{-/-}.

(A) Abundancia relativa de LINE-1 en la retina de c57BL/6 desde E12,5 a adulta (P90), determinada por qPCR. (B) Número relativo de copias del transposón LINE-1 (respecto al valor del hígado adulto) en el mutante *Pol μ*^{-/-} comparado con su estirpe silvestre durante diferentes estadios del desarrollo de la retina. El contenido relativo de LINE-1 representa la ratio 2^{ΔCt} de LINE-1 referido al valor del hígado adulto del modelo silvestre. WT3-C57BL/6. *p<0,05

En los animales silvestres no detectamos un incremento en la cantidad relativa de LINE-1 en la retina embrionaria, sino que su contenido es estable hasta P2 (Fig. 4.30 A). Esto indica que el aumento del número de copias del transposón LINE-1 debe ocurrir en algún momento entre P2 y P90. Acorde a estos datos, la retrotransposición de LINE-1 no estaría implicada en la generación de las roturas asociadas al desarrollo temprano de la retina.

Modulación de la transposición de LINE-1 en la retina por proteínas de generación y reparación de roturas del DNA.

La transposición de LINE-1 suele iniciarse con la inducción de una rotura en el DNA, generalmente mediada por la propia endonucleasa del transposón. A este respecto, algunos estudios sugieren que los procesos de transposición y de reparación de roturas de DNA están íntimamente relacionados (Barzilai and McKinnon, 2013). Esto nos llevó a plantear si la ausencia de proteínas implicadas en la reparación por NHEJ interfiere con la movilidad del transposón LINE-1. Para evaluarlo, cuantificamos LINE-1 en el mutante *pol μ^{-/-}*, estudiando retinas embrionarias y perinatales (Fig. 4.30 B). Hemos observado cambios significativos en el contenido relativo de LINE-1 en E12,5 y en la retina adulta, existiendo tendencia al alza respecto al ratón silvestre en todas las edades analizadas menos en P2. En el ratón *pol μ^{-/-}*, al llegar a la edad adulta, LINE 1 se incrementa tanto en la retina como en el hígado, lo que podría indicar que en este mutante no hay la especificidad de salto en tejidos neurales observada en los animales silvestres.

Dado que en el modelo silvestre los cambios en el contenido del transposón se evidencian sólo en la retina adulta, estudiamos a P90 el efecto de la falta de proteínas de generación y reparación de DDSBs, estudiando retinas de los animales *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}*.

En los tres mutantes analizados observamos que el contenido relativo en LINE-1 en tejido neural (retina, hipocampo) se iguala al de tejidos no neurales (corazón, hígado), lo que parece indicar que la ausencia de proteínas de reparación y generación de roturas en el DNA modulan la transposición de LINE-1. En los mutantes deficientes en reparación de roturas *SCID* y *pol μ^{-/-}* se observa un claro incremento en el contenido relativo en LINE-1 en todos los tejidos estudiados, sean o no de origen neural (Fig. 4.31 A y B, respectivamente). De estos resultados se concluye que la ausencia de las proteínas de reparación de roturas del DNA DNA-PKcs y polimerasa μ incrementa el número de copias del transposón LINE-1 a nivel de diversos órganos.

Por el contrario, en el mutante *rag 2^{-/-}*, (Fig. 4.31 C), que presenta un menor número de roturas en la retina embrionaria, el contenido en LINE-1 en el hipocampo, retina y corazón es menor

al observado en el ratón silvestre, por lo que la ausencia de RAG-2 juega difícilmente la transposición de LINE-1 en diferentes órganos.

En resumen, nuestros datos demuestran que LINE-1 no es el principal inductor de las DDSBs observadas durante el desarrollo de la retina. Asimismo, indican que en la retina adulta, la falta de DNA-PK, Pol μ y RAG-2 interfieren con su transposición.

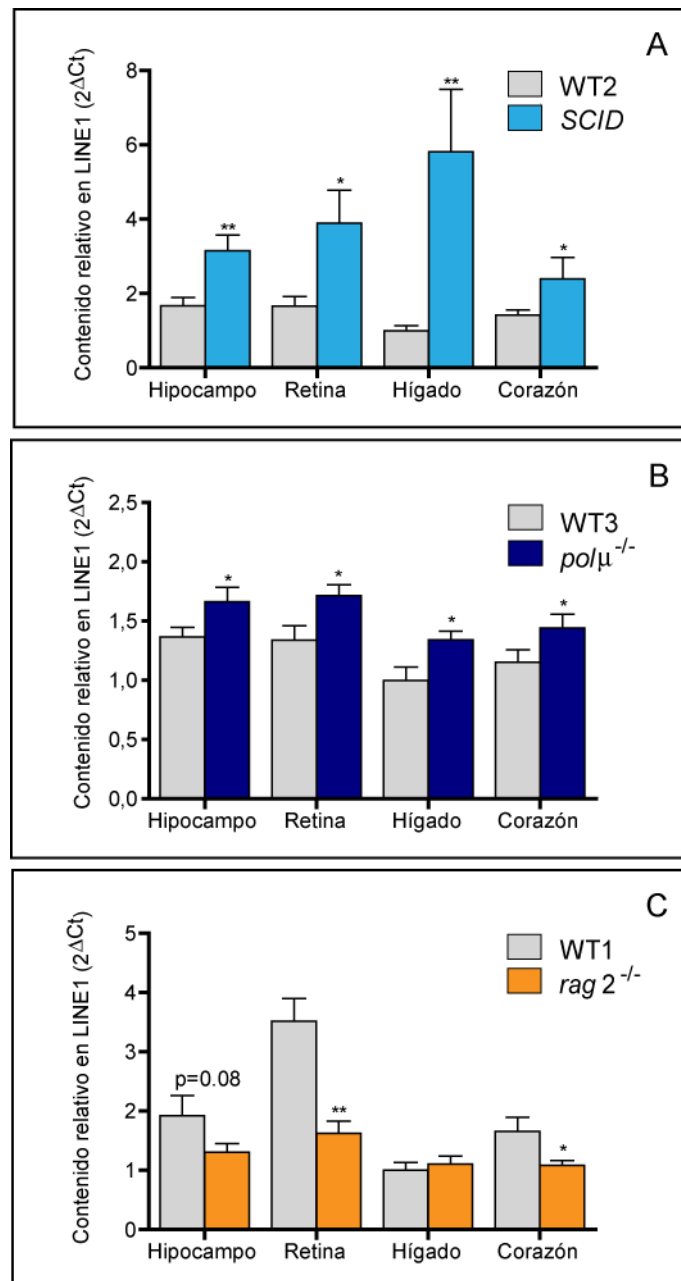


FIGURA 4.31- CONTENIDO DE LINE-1 EN DIVERSOS TEJIDOS EN MUTANTES DEFICIENTES EN RAG-2, DNA-PK, Y POL-M.

(A-C) Abundancia relativa de LINE-1 determinada por qPCR en distintos tejidos de ratones adultos (P90) de los mutantes *rag2*^{-/-} (A), *SCID* (B) y *pol μ*^{-/-} (C) y sus respectivas cepas silvestres. El contenido de LINE-1 representa la ratio 2^{-ΔCt} de LINE-1 referido al valor del hígado adulto del modelo silvestre. WT1 – Balb/C, WT2 – C57BL/6, WT3 - C57Bl/10. *p<0,05; **p<0,01



5. DISCUSIÓN

5.DISCUSIÓN.

1-DNA-PK Y DNA-POLIMERASA μ EN EL DESARROLLO DE LA RETINA MURINA.

Acumulación de roturas del DNA y apoptosis neuronal en la retina de ratones *pol* $\mu^{-/-}$ y *SCID*.

El abordaje de esta tesis doctoral emana de estudios del grupo sobre muerte celular programada en la retina en desarrollo. La neurogénesis es un proceso especialmente sensible a la falta de mecanismos de reparación de roturas que afecten simultáneamente a las dos hebras del DNA (Boya and de la Rosa, 2005, McKinnon, 2009, Barzilai and McKinnon, 2013). Nuestro grupo describió en la retina de vertebrados la fase de muerte neural temprana, que afecta especialmente a las células ganglionares durante la neurogénesis, aunque se desconoce qué estímulo desencadena la muerte de estas células (de la Rosa and de Pablo, 2000, Chavarria et al., 2013). También se observó que dicha fase es paralela a la aparición selectiva de focos de reparación del DNA y se puso de manifiesto la participación de las enzimas de reparación DNA-PK y Pol μ en la neurogénesis de la retina (Baleriola, 2008, Baleriola et al., 2010). En el presente trabajo, verificamos estos datos en fondos genéticos y edades diferentes, y avanzamos en la comprensión de las consecuencias de su ausencia en el desarrollo de la retina.

La reparación de las roturas de DNA observadas durante la el desarrollo temprano de la retina podría depender de la vía NHEJ, ya que, *in vitro*, su número es modulable por DNA-PK, (Baleriola et al., 2010), *in vivo*, por KU80 (Karanjawala et al., 2003, Bladen et al., 2005), y en la retina en desarrollo se encuentran los mRNAs de gran parte de las proteínas de la vía NHEJ, incluyendo DNA-PK, Pol μ y γ H2AX (Baleriola, 2008). Los resultados del presente estudio indican que está activa en la retina embrionaria, ya que la DNA polimerasa μ , que interviene en uno de los últimos pasos de NHEJ, no sólo está presente en la retina en desarrollo, sino que se

dispone en focos nucleares discretos (Fig. 4.1), lo que, acorde a lo descrito en (Ruiz et al., 2004 y Mahajan et al., 2002), es característico de su actividad.

Nuestros datos corroboran la aparición fisiológica de roturas de DNA durante el desarrollo de la retina, como se puede deducir del incremento de focos de reparación del DNA no resueltos observados *in vivo* en los modelos *SCID* (con la DNA-PK truncada) y *pol μ^{-/-}* (Figs 4.2 y 4.3). Estos datos también implican que al menos parte de las roturas del DNA observadas durante esta fase del desarrollo dependen de DNA-PK y Pol μ para su reparación.

La aparición de focos de reparación del DNA podría ser inherente al proceso de neurogénesis, como indica la detección sistemática de γH2AX en áreas del cerebro y la retina asociadas a la neurogénesis embrionaria (Gao et al., 2000, Baleriola, 2008, Barral et al., 2014). En el mismo sentido, cuando investigamos la distribución de Pol μ activa, observamos que la polimerasa tendía a localizarse con mayor frecuencia en neuronas que en otros tipos celulares, aunque esta tendencia no fue significativa (Fig. 4.1). La asociación de las roturas al proceso de neurogénesis se evidencia también en el estudio *in vivo* de nuestros mutantes. Acorde a nuestros datos, la falta de Pol μ y DNA-PK reduce la viabilidad celular (Fig 4.4), alterando específicamente la supervivencia neural de, al menos, tres subpoblaciones de neuronas en diferente momento de maduración (Figs 4.6 a 4.9) y disminuyendo incluso el número de capas de núcleos de la retina en desarrollo (Fig. 4.20), lo que evidencia la importancia del proceso de reparación en la generación de la neuroretina. Estos resultados son concordantes con los datos obtenidos tras la eliminación *in vivo* e *in vitro* de otras proteínas de la vía NHEJ, donde también se observan defectos en la viabilidad de las neuronas en diferentes regiones del SNC, especialmente evidentes en neuronas postmitóticas inmaduras, incluyendo las células ganglionares de la retina (Tabla 1.2) (Lee et al., 2000, Karanjawala et al., 2003, Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Baleriola et al., 2010, Woodbine et al., 2014).

En otros mutantes de la vía NHEJ, como los ratones nulos para la ligasa IV o para XRCC4, la falta de proteínas clave del proceso conduce a un fenotipo de letalidad embrionaria en torno a E14 (Ver tabla 1.2). Sin embargo, los ratones con alteraciones en DNA-PK y Pol μ son viables, posiblemente porque sus funciones puedan ser parcialmente reemplazadas por otras proteínas de la misma vía: en el caso de DNA-PKcs, por Artemis y ATM, y en el caso de la polimerasa μ, por la DNA-polimerasa λ (Lieber, 2010, Pryor et al., 2015). Este hecho nos permite examinar más en detalle las alteraciones a diferentes edades asociadas a la falta de proteínas de NHEJ, y proporcionar nuevas evidencias sobre el papel de las DDSBs en el desarrollo.

Cabe preguntarse por qué tanto en nuestro estudio como en otros sistemas, la muerte celular temprana afecta en mayor medida a las neuronas en maduración y no tanto a células proliferativas (Fig. 4.9) (Gatz et al., 2011, Turinetti and Giachino, 2015). Este hecho podría deberse a que las células proliferativas sean más resistentes frente a la muerte celular por disponer de una ruta alternativa de reparación del DDSBs inactiva en células diferenciadas: la recombinación homóloga (Abner and McKinnon, 2004, Orii et al., 2006, Symington and Gautier, 2011). En las neuronas, la falta de otras vías de reparación podría hacerlas hipersensibles a la

aparición *de novo* de cantidades relativamente bajas de *DDSBs* (Boya and de la Rosa, 2005, McKinnon and Caldecott, 2007). Esta teoría se vería apoyada por el hecho de que diversos mutantes de la vía NHEJ presentan hipersensibilidad a la radiación, en especial en células postmitóticas (ver tabla 1.2 de la introducción).

En conjunto, nuestros datos demuestran que la falta de proteínas de reparación DNA-PKs y Pol μ incide negativamente en la viabilidad neuronal e indican que las RGCs de la retina son especialmente sensibles a la falta de proteínas de reparación del DNA, poniendo de manifiesto la importancia de la reparación de DSBs en el proceso neurogénico.

Desarrollo distrófico de la retina en ausencia de DNA-PK y Pol μ .

Diversos datos de este trabajo sugieren que la ausencia de DNA-PK y Pol μ altera el proceso de neurogénesis y de maduración neuronal durante el desarrollo de la retina. Se ha observado que la ausencia de la polimerasa μ conlleva un incremento de células con *DDSBs* (Fig. 4.2), lo que, según se ha descrito en otros sistemas embrionarios carentes de polimerasa μ , afecta a la cinética de reparación del DNA, y aumenta el tiempo de generación celular (Chayot et al., 2010). En línea con el resultado anterior, en nuestro estudio hemos detectado la aparición de células ectópicas en el mutante *pol* $\mu^{-/-}$, lo que posiblemente refleja células en proceso de diferenciación que aún no han completado su migración a la cara interna de la retina (Fig. 4.15). En este sentido, se ha descrito que los fallos en la reparación de *DDSBs* afectan a la migración de las neuronas recién diferenciadas a zonas no proliferativas (Gatz et al., 2011, El Waly et al., 2014). Dado que la migración celular depende en gran parte del proceso de extensión de los axones, y que este se encuentra alterado, la aparición de células ectópicas podría reflejar una extensión del periodo de desarrollo de neurogénesis y maduración celular.

En este estudio también hemos observado una mayor muerte neural (Fig. 4.6-4.7) y descenso en el número de neuronas con axón (Tuj-1 positivas) (Fig. 4.9) que, en este estadio, corresponde principalmente a un descenso en las células ganglionares (Watanabe et al., 1991). En la retina del ratón nulo para Pol μ a E13,5 también encontramos alteraciones estructurales, afectándose el número de filas de núcleos en la retina central (Fig.4.20), lo que posiblemente refleje dicha pérdida de neuronas. El descenso en el número de células ganglionares podría tener repercusiones en la diferenciación de los progenitores neurales y en la correcta laminación de la retina, ya que ambos procesos están mediados por Shh, factor emitido por los axones de las RGCs (Wallace and Raff, 1999, Neumann and Nusslein-Volhard, 2000, Wang et al., 2002). El incremento de muerte neural en estos mutantes podría activar mecanismos alternativos para compensarla. Así, en el mutante *pol* $\mu^{-/-}$ existe un ligero incremento (no significativo) del número de células proliferativas (Fig. 4.9), lo que unido al aumento de células Br3a positivas encontradas en E13,5, posiblemente sea un primer indicio de compensación (Fig. 4.20). De manera similar, en cultivos neurales primarios de SCID a P0 se observó una mayor

tasa proliferativa del mutante, lo que podría interpretarse como un intento de compensación frente al incremento de apoptosis encontrado en el sistema nervioso (Chechlacz et al., 2001).

Un dato más a favor de la hipótesis de la compensación es que parte de los cambios observados en el embrión del ratón nulo para Pol μ desaparecen en el adulto, como los cambios en número de filas de núcleos y en el número de células Br3a positivas (Fig. 4.20). Es posible que, a pesar del incremento de muerte celular y del retraso inicial, suficientes neuronas acaben contactando con los núcleos visuales primarios con el progreso del desarrollo, como se ha observado en otros sistemas (Holt, 1984), compensando el fenotipo de estos animales en el estado adulto.

Si bien parte de los cambios embrionarios revierten en el adulto, el animal deficiente en la polimerasa μ retiene algunos defectos fenotípicos (Figs. 4.22 – 4.23). Estudios con animales adultos y envejecidos nulos para Pol μ , mostraron que estos ratones tardaban más tiempo que sus controles en adquirir características asociadas con el envejecimiento a nivel de varios tejidos, incluyendo el cerebro, lo que ha sido interpretado por sus autores como un posible retraso en el desarrollo (Lucas et al., 2013, Escudero et al., 2014). El retraso en desarrollo es un fenotipo frecuente en diversos mutantes de la vía NHEJ, como se observa en humanos con mutaciones hipomorfas en la Ligasa IV y en los mutantes murinos de XRCC4, XLF/Cernunnos, e incluso DNA-PK (ver tabla 1.2 de la introducción y las referencias que contiene). Diversos datos de este trabajo sugieren que la ausencia de DNA-PK y Pol μ podría producir un retraso del desarrollo especialmente evidente en la maduración neuronal. En relación con nuestros resultados, se ha demostrado que retrasos en la neurogénesis pueden afectar a la especificación de las RGCs, cambiando la expresión de factores de transcripción que regulan la proporción de fibras ipsilaterales que se generan (Bhansali et al., 2014). La proporción de fibras ipsilaterales también se altera en ausencia de la polimerasa μ (manuscrito en preparación y Baleriola, 2008), lo que podría ser un efecto más del retraso en la diferenciación.

En general, estos datos apuntan a que en los ratones *SCID* y *pol* $\mu^{-/-}$, el periodo de desarrollo de la retina se extiende para compensar la pérdida de neuronas recién nacidas. Otra posible interpretación es que el incremento de roturas del DNA en ausencia de DNA-PK y Pol μ conduce a un posible retraso del desarrollo neural, que más adelante puede ser parcialmente compensado.

Alteración de la axonogénesis de las células ganglionares de la retina en ausencia de DNA-PK y de la DNA polimerasa μ .

En nuestro estudio observamos que la ausencia de las proteínas de reparación DNA-PK y Pol μ altera el proceso de maduración de las células ganglionares a diferentes niveles. Además de reducir su viabilidad, también altera los procesos de axonogénesis, localización celular y navegación axonal intraretiniana (Fig. 4.10, 4.15 y 4.18).

En los ratones mutantes *SCID* y *pol* $\mu^{-/-}$, este comportamiento correlaciona *in vivo* con fallos en la distribución de las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO (Figs. 4.16 - 4.18). Además, el fenotipo es reproducible en cultivos primarios de retina de E13,5, donde observamos fallos frecuentes en la orientación de las neuritas (Figs. 4.12 - 4.14). Sin embargo, la capacidad de polarizar y emitir los axones no parece alterarse ya que las neuronas Tuj-1 positivas son capaces de emitir axones de la misma longitud que los animales silvestres (Fig 4.11).

Las alteraciones que afectan específicamente a la direccionalidad en la emisión axonal (Figs. 4.12-4.14) podrían estar asociadas a problemas en la señalización en el cono de crecimiento (Maness and Schachner, 2007, Sakurai, 2012). Los axones en crecimiento son estructuras con gran movilidad que modifican su dirección en función de las proteínas de guía axonal que sensan a su alrededor (Pollerberg et al., 2013). Alteraciones en las moléculas de guía axonal presentes en el cono de crecimiento, como L1CAM y BRAVO, afectan directamente a esta señalización (Erskine and Herrera, 2007). Dado que los defectos en estas proteínas se asocian a alteraciones en la fasciculación y direccionalidad de los axones en un patrón característico similar al presentado en los mutantes *SCID* y *pol* $\mu^{-/-}$ (Fig. 4.10) y ausente en alteraciones de otras proteínas de guía axonal (Oster et al., 2004), podría suponerse que las alteraciones observadas en estas IgCAMs podrían ser la causa de las alteraciones en la axonogénesis observadas en estos mutantes.

Resulta sorprendente que, a pesar de que menos del 5% de las células ganglionares estén afectadas por la muerte celular (Fig. 4.7), en estos mutantes se observen cambios en el fenotipo de navegación axonal a nivel de toda la retina. Cabe recordar que, las etapas finales del proceso apoptótico detectadas por la técnica TUNEL duran sólo unos pocos minutos. (Green, 2005), por lo que la cantidad total de neuronas afectadas por procesos apoptóticos en esta edad está probablemente subestimada por el método utilizado en este estudio (McConnell et al., 2009). Sin embargo, incluso aunque sólo hubiera un bajo porcentaje de células alteradas, si las alteraciones observadas en nuestros mutantes afectaran a los axones pioneros, podrían provocar defectos en la navegación de axones más tardíos. En este sentido, se ha observado que los fallos en la emisión de los primeros axones pueden producir alteraciones que afecten a todos los axones que se formen posteriormente, e incluso a la salida de los axones del ojo y a la conectividad de los mismos (Pittman et al., 2008, Raper and Mason, 2010 y referencias que contiene). Las primeras células en contactar con sus dianas establecen, en coordinación con sus células vecinas, marcas e hitos de guía axonal, que son seguidas por las siguientes neuronas durante una ventana espacio-temporal reducida (Oster et al., 2004, Raper and Mason, 2010), por lo que alteraciones en el crecimiento de los axones pioneros o en la exposición de proteínas de guía axonal pueden provocar defectos en las células de alrededor. Nuestros datos indican que defectos en la reparación del DNA pueden relacionarse con fallos intrínsecos en la direccionalidad de los axones y en la exposición tardía y/o mal posicionada de las proteínas de guía axonal (Figs. 4.11 - 4.18), lo que podría repercutir en la señalización de las neuronas afectadas a sus células vecinas y en su conectividad con sus dianas primarias. Los datos anteriores del grupo respaldan este resultado, ya que se observó que la ausencia de

Pol μ produce una disminución del porcentaje de neuronas que proyectan ipsilateralmente al núcleo geniculado lateral (manuscrito en preparación y Baleriola, 2008), y apoyan la implicación de Pol μ y DNA-PK en la maduración neuronal, en los procesos tempranos de navegación axonal.

Repercusión de la falta de Pol μ en la retina del animal adulto

El animal deficiente en la polimerasa μ adulto presenta algunos defectos en la retina que podrían derivar de alteraciones en el desarrollo embrionario de las RGCs, como los observados en la población astrocitaria (Figs. 4.22 y 4.23). Las células precursoras de astrocitos están presentes en la cabeza del tallo óptico en el intervalo de edad en el que se desarrolla este estudio (E13,5-E14), y dependen de los axones de las células ganglionares para proliferar y para migrar correctamente a la retina (Tao and Zhang, 2014). Se ha observado que alteraciones en los axones de las células ganglionares repercuten directamente en el número y la distribución de los astrocitos en la retina: así, la disminución del número o de la funcionalidad de los axones de las RGCs disminuye su proliferación, mientras que mutantes con axones de RGCs supernumerarios presentan un incremento del número de astrocitos presentes en la retina (Burne and Raff, 1997). Es posible que las alteraciones en el número de neuronas con axón (Tuj-1 positivas) (Fig. 4.9), en la emisión axonal (Figs. 4.10-4.14) y en la distribución de moléculas de su superficie observadas en nuestros mutantes (Figs. 4.16-4.19), pudieran repercutir secundariamente en el número y distribución de los astrocitos observadas en el mutante *pol μ ^{-/-}* (Fig. 4.22).

Alteraciones en el número y la morfología de los astrocitos, como los observados en ausencia de la polimerasa μ , se asocian frecuentemente a alteraciones en la vasculatura (Fig. 4.23) (Chan-Ling and Stone, 1992, Fruttiger et al., 1996). Este tipo de alteraciones también se han observado en otras enfermedades asociadas a defectos en la reparación del DNA, como en pacientes con mutaciones de ATM, que también presentan problemas en la vascularización ocular (telangectasia), además de crecimiento alterado de los astrocitos (Gosink et al., 1999, Frappart and McKinnon, 2006). Así pues, defectos en diversas proteínas de reparación de las roturas del DNA parecen inducir, quizá indirectamente, alteraciones en el número y distribución de astrocitos y vasos sanguíneos. Estas alteraciones reafirman la existencia de defectos previos en la emisión axonal de las RGCs en ausencia de DNA-PK y Pol μ durante el desarrollo temprano de la retina.

Roturas del DNA en la retina en desarrollo: consideraciones sobre su origen.

Resulta interesante que el proceso de diferenciación neuronal se asocie a la aparición de lesiones del DNA tan severas como las DDSBs. Además de ser especialmente frecuentes en zonas de diferenciación neural, en células del cortex cerebral se han descrito mecanismos permisivos con DDSBs que retrasan la posible respuesta apoptótica ante su aparición (Gatz et al., 2011), por lo que podría especularse que la generación de roturas de DNA y su reparación estuvieran acopladas con algún paso necesario en el proceso de la neurogénesis.

Estas roturas podrían proceder de la fragmentación del material nuclear inherente al proceso apoptótico de la muerte neural temprana. Sin embargo, en otras oleadas de muerte celular programada características de la formación de la retina, como la relacionada con el proceso de muerte neurotrófica, los focos de reparación son mucho menos frecuentes (Fig 1.8) (Baleriola, 2008, Baleriola et al., 2010), por lo que es posible que la reparación de roturas de DNA durante esta fase del desarrollo tenga una función específica.

De los resultados que hemos presentado en este estudio se deduce que la falta de DNA-PK y Pol μ interfiere en la viabilidad neural, afectando al proceso de neurogénesis y a la axonogénesis y navegación axonal de las RGCs. Si bien parte de fenotipo axonal de los animales *SCID* y *pol* $\mu^{-/-}$ pueden ser consecuencia de un retraso del desarrollo, nuestros datos indican que DNA-PK y Pol μ intervienen en un proceso autónomo celular, ya que los defectos en la emisión de los axones se mantienen en cultivo, donde la interacción con células vecinas se encuentra minimizada (Figs 4.11-4.14).

El incremento de muerte celular observado en ausencia de las proteínas de reparación DNA-PK y Pol μ probablemente se relaciona con el incremento de roturas de DNA observado en estos mutantes. Es sin embargo una cuestión abierta cuál puede ser el fenómeno que origine dichas roturas.

Las roturas de algunas regiones cromosómicas frágiles comunes (CFSs) podrían provocar DDSBs en diversos genes neurales que serían susceptibles de reparación por la vía NHEJ (Durkin and Glover, 2007, Palakodeti et al., 2010, Barlow et al., 2013). En concreto, tanto L1CAM como BRAVO, las proteínas de guía axonal en las que hemos detectado alteraciones de distribución en este estudio, están codificadas por genes neurales de gran tamaño, como los afectados por las CFSs y, de hecho, el sitio frágil asociado al cromosoma X, FRAXA, es adyacente al gen de L1CAM (Djabali et al., 1990, Venter et al., 2001, Smith et al., 2006). La asociación entre la ausencia de enzimas de reparación y la alteración de algunas proteínas de guía axonal podría sugerir que en los genes de estas proteínas se acumulen fisiológicamente lesiones en el DNA. En ausencia de ATM también se observan roturas recurrentes de los cromosomas en posiciones concretas, lo que apoya la existencia de este proceso. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito CFSs en regiones próximas al gen codificante de BRAVO. Por otra parte, aunque los CFCs podrían estar implicados en parte del fenotipo

observado en nuestros mutantes, no parecen subyacer todas las alteraciones observadas en nuestro sistema: la fractura de las CFSs se suele asociar al proceso de replicación celular, pero en este estudio observamos que la muerte celular afecta más a las células postmitóticas más que a las células proliferativas (Fig. 4. 9). Esto sugiere que las roturas del DNA que afectan a las neuronas tienen un origen distinto del estrés replicativo. O bien hay un tipo de CFCs no relacionados con la replicación, o bien parte de las roturas del DNA presentes en *SCID* y *pol μ^{-/-}* se originan por otro sistema.

Se ha propuesto que las roturas observadas durante la diferenciación neural se produzcan meramente como consecuencia del azar, como resultado de agentes externos y del metabolismo oxidativo propio de las neuronas (Barzilai et al., 2008, Barzilai and McKinnon, 2013). Sin embargo, estas hipótesis no tienen en cuenta por qué la falta de genes implicados en la reparación del DNA por la vía NHEJ comparten un fenotipo drástico centrado en los sistemas inmune y nervioso (Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005, Frappart and McKinnon, 2008, McKinnon, 2009), no tan evidente en otros tejidos que, al igual que las neuronas, también presentan un metabolismo fundamentalmente oxidativo, como el tejido muscular (Jackson, 2015). La ausencia de DNA-PKcs y de la DNA polimerasa μ también comparte una afectación preferente de los sistemas nervioso e inmune (Figs. 4.6-4.20, tabla 3.1 y referencias que contiene), lo que corrobora la alta sensibilidad de estos dos sistemas a la falta de proteínas de reparación de roturas del DNA (Gao et al., 1998, Abner and McKinnon, 2004, Boya and de la Rosa, 2005) e indica que durante el desarrollo el sistema nervioso e inmune podrían compartir un proceso específico común a ambos.

Como se comentó en la introducción, DNA-PKcs es una enzima que participa en numerosos procesos celulares, por lo que no es fácil inferir cual de ellos puede alterarse en su ausencia. Sin embargo, el papel más específico de la DNA-polimerasa μ puede proporcionar indicios de los procesos afectados por la falta de reparación. La alteración simultánea de los sistemas nervioso e inmune parece indicar que, en estos tejidos, esta polimerasa está realizando una función que Pol λ no es capaz de suplir. Una opción sería que en el sistema nervioso se produjera un incremento selectivo del tipo de roturas que la DNA polimerasa λ no es capaz de procesar, las *DDSBs* carentes de microhomologías (Nick McElhinny et al., 2005, Bertocci et al., 2006), lo que implicaría que algún mecanismo estaría facilitando la aparición de esta clase de roturas. Este tipo de extremos es característico (aunque no exclusivo) de actividad endonucleasa del complejo RAG-1,2 (Helmink and Sleckman, 2012, Nishana and Raghavan, 2012), por lo que nos planteamos si en el sistema nervioso podría observarse también alguna coordinación entre la posible generación de roturas por RAG-1,2 y la reparación de las mismas por NHEJ.

2- RAG-2 Y NHEJ EN LA NEUROGÉNESIS DE LA RETINA.

Actividad endonucleasa de RAG-1,2 en la retina y posible coordinación con la vía NHEJ.

RAG-1,2 es el complejo con actividad endonucleasa encargado de iniciar el proceso de recombinación somática en linfocitos T y B (Nishana and Raghavan, 2012). Hasta el momento, no está descrito que en el sistema nervioso pueda ejercer una función similar, ni que en ninguna región del sistema nervioso los dos miembros del complejo actúen de manera conjunta (Jessen et al., 2001, Eggan et al., 2004, Li et al., 2004). Sin embargo, diversos datos de este estudio parecen abrir dicha posibilidad. A este respecto, estudios previos de nuestro grupo, determinaron la existencia del mRNA de RAG-1 y de RAG-2 en la retina embrionaria, específicamente de las mismas isoformas presentes en los tejidos linfoides (Baleriola et al., 2008) lo que, teóricamente, hace posible la formación del complejo RAG-1,2. El mayor número de focos de reparación asociado a la presencia de RAG-2 (Fig.4.5) sugiere que, en la retina, esta proteína participa en la generación de al menos parte de las roturas observadas durante el desarrollo. Dado que no está descrito que la actividad endonucleasa de RAG-1,2 se produzca en ausencia de ninguna de las dos subunidades, nuestros datos apuntan a una posible actividad coordinada de RAG-1 y RAG-2 en la generación de roturas del DNA durante el desarrollo de la retina (Schlissel et al., 1993, Lin and Desiderio, 1994, Schatz and Ji, 2011).

Los mutantes nulos de RAG-1 o RAG-2 presentan fenotipos diferentes a nivel del SNC (McGowan et al., 2011), por lo que se ha propuesto que podrían tener funciones diferentes. En este sentido, en el sistema inmune se ha descrito que RAG-2, actuando en coordinación con ATM (proteína implicada en la reparación de DDSBs), puede proteger los genes diana del complejo RAG-1,2 de roturas no reguladas, como un mecanismo de protección de la integridad del genoma (Deriano et al., 2011, Chaumeil et al., 2013). Sin embargo, dicha función es difícilmente compatible con un descenso en el número de DDSBs encontrado en este estudio en la ausencia de RAG-2.

Acorde a nuestros datos, la falta de Rag2 solo afecta al 23% de las roturas de DNA presentes en E13,5 (Fig. 4.4), lo que indica la coexistencia en la retina de roturas del DNA de distintos orígenes. Aún así, la ausencia de esta proteína ocasiona un descenso en la viabilidad celular (Figs. 4.5 - 4.7), lo que implica que su función es necesaria para la homeostasis de la retina.

Nuestros datos demuestran que el fenotipo del mutante *rag2^{-/-}* es semejante en todos los aspectos al observado en mutantes de NHEJ, lo que es esperable si son parte de un mismo mecanismo necesario para la supervivencia y diferenciación neuronales. En ausencia de RAG-2 la viabilidad de las células ganglionares se ve reducida en niveles comparables a los observados en los mutantes SCID y *pol μ^{-/-}* (Fig. 4.6-4.7) y la diferenciación de las RGCs también está alterada, ya que presentan problemas al establecer la direccionalidad de las

neuritas tanto *in vivo* (Fig. 4.10) como en cultivo (Fig. 4.14). En los experimentos en cultivo, se observó que los tres mutantes compartían un retraso en la elongación de los axones (Fig. 4.11) y un incremento de células con autocontactos (Figs. 4.12-4.14). Las alteraciones del mutante *rag2^{-/-}* también afectan a la formación del nervio óptico, ya que se observa que sus axones decusan más tarde que los del modelo silvestre (Baleriola, 2008). Las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO también varían en el mutante *rag2^{-/-}* de manera similar a como lo hacen en los otros dos mutantes (Figs. 4.16-4.17), y, más aún, el análisis proteómico del animales nulos para RAG-2 demostró que diversas proteínas asociadas a la emisión axonal y migración neuronal estaban disminuidas (Baleriola, 2008). Asimismo, estas alteraciones coinciden con los cambios detectados en este estudio en el mutante nulo de Pol μ , como la disminución de células Tuj-1 (Fig. 4.9) y el aumento de células ectópicas en el neuroepitelio (Fig. 4.15). Nuestros datos apuntan a que la falta de DNA-PK, Pol μ y RAG-2 podría interferir en un proceso común, autónomo celular, relacionado con la viabilidad de las células ganglionares y la axonogénesis, y asociado a alteraciones en proteínas de guía axonal.

En el sistema inmune, RAG-2 es capaz de dirigir selectivamente la reparación de las roturas de DNA hacia la vía de reparación NHEJ (Gigi et al., 2014). La interacción de NHEJ con RAG-2 es mutua, habiéndose demostrado que DNA-PK regula a RAG-2 mediante su fosforilación (Hah et al., 2007) y que, en células T citotóxicas, la disminución de RAG-2 se asocia a una disminución de la reparación del DNA por NHEJ (Karo et al., 2014). Teniendo en cuenta que aproximadamente 1 de cada 4 roturas que observadas en E13,5 depende de Rag2, y dada la gran similitud de los fenotipos de los mutantes *SCID*, *pol μ ^{-/-}* y *rag2^{-/-}*, así como la exquisita coordinación de las dos vías en el sistema inmune, parece plausible que actúen también coordinadamente en el sistema nervioso. En conjunto, nuestros resultados apoyan la existencia durante el desarrollo de un proceso regulado de generación y reparación de roturas del DNA que podría ser necesario para la correcta la neurogénesis de la retina.

Posibles mecanismos afectados por la falta de RAG-2, DNA-PK y Pol μ .

GENERACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA.

En la retina, el proceso de diferenciación de precursores neurales a neuronas maduras se ve severamente afectado por una oleada de apoptosis (de la Rosa and de Pablo, 2000, Mayordomo et al., 2003, Valenciano et al., 2009), que, como hemos visto, aumenta en ausencia de DNA-PK, Pol μ y RAG-2. En los animales silvestres, sólo de un 15% a un 40% de las neuronas generadas sobreviven al proceso de diferenciación, (Finlay and Slattery, 1983, Ferrer et al., 1992), lo que parece implicar que la neurogénesis es un proceso altamente ineficiente, que hace que la mayoría de las células recién formadas no sean viables, o bien que, tras su generación, las células se someten a un proceso de selección. En este sentido, recientemente se ha relacionado la actividad de la endonucleasa RAG-1,2 con el aumento de la aptitud celular (*fitness*) de células T citotóxicas, donde se han descrito procesos de

recombinación somática residual (Karo et al., 2014). La ausencia de RAG-2 en estas células se asocia a una mayor mortalidad durante su generación, e incluso tiempo después del momento de generación de las roturas, las células T citotóxicas ya maduras, en respuesta a situaciones de estrés también presentan un incremento de la muerte celular y se desenvuelven peor que las del modelo silvestre (Karo et al., 2014). En nuestro sistema, la actividad de RAG-2 podría estar implicada en la mejora del *fitness* neural, entendiendo el *fitness* como una menor viabilidad celular y una funcionalidad disminuida de las neuronas. Nuestros resultados indican que en E13,5, la ausencia de RAG-2 también redundaría en una mayor mortalidad, a pesar de que el número de lesiones del DNA por célula es menor al observado en los animales silvestres. La ausencia de RAG-2 también altera la axonogénesis en células no afectadas por la muerte celular. Esto indica que la actividad de RAG-2 debe estar implicada en algún proceso beneficioso para la célula neural. Sin embargo, no todas las células se encuentran igualmente afectadas por la muerte celular, lo que podría indicar que RAG-2 no actúe en todas las neuronas y/o que el resultado de la actividad de RAG-2 varíe entre distintas neuronas. Dada la similitud de fenotipos entre los mutantes *SCID*, *pol μ^{-/-}* y *rag 2^{-/-}*, la actividad conjunta de RAG-1,2 y la vía NHEJ podría conferir a determinadas células ganglionares de alguna ventaja competitiva respecto a las células de su alrededor.

En la última década, diversos estudios han puesto de manifiesto que, de manera fisiológica, en las neuronas aparecen frecuentemente cambios en su secuencia del DNA que parecen ser inherentes al proceso de diferenciación neural (Rehen et al., 2005, Gonitel et al., 2008, Coufal et al., 2009, Westra et al., 2010, Iourov et al., 2012, McConnell et al., 2013). Los fenómenos de mosaicismo somático también se han detectado en la retina, a nivel de las células ganglionares y horizontales (Morillo et al., 2010, Shirazi Fard et al., 2013). Estos descubrimientos apoyan la teoría de que, en el SNC, la diversificación genética podría tener una función específica (Singer et al., 2010, Bushman and Chun, 2013).

Gran parte de los cambios genéticos observados en neuronas implican la formación previa de roturas del DNA. La aparición de roturas en el DNA puede promover fenómenos de muerte celular, mutación y reorganizaciones genómicas, por lo que diversos autores han especulado con la idea de que las roturas de DNA observadas durante el desarrollo neural se generen de manera controlada, con el fin de inducir procesos de reorganización cromosómica que generen diversidad somática. (Abner and McKinnon, 2004, Frappart et al., 2009). La aparente coordinación entre los sistemas de generación de roturas por el complejo RAG-1,2 y la reparación de las mismas por NHEJ observada en nuestro sistema indica por sí mismo que, en la retina de E13,5, la aparición de casi un cuarto de las roturas del DNA no es atribuible al azar, sino que puede deberse a un proceso programado.

En 1967 se propuso por primera vez la teoría de que en el sistema nervioso pudieran producirse procesos de recombinación somática durante la generación de las moléculas de superficie y de adhesión celular neurales (Deyer, 1967, Edelman and Gally, 1967). Apoyando esta teoría, se ha observado que la eliminación de ATM provoca que se acumulen roturas del

DNA en zonas no aleatorias del genoma, en genes relacionados con el desarrollo neural (Iourov et al., 2009). Dado que en ausencia de RAG-2, Pol μ y DNA-PK se alteran las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO, (Figs. 4.17 y 4.18), resulta sugerente pensar que en los cambios en estas proteínas podrían originarse en el DNA como consecuencia de procesos recombinatorios similares a los que tienen lugar en el sistema inmune. Si bien no se han encontrado dianas de inicio de recombinación de RAG-1,2 en genes distintos de los de las inmunoglobulinas (Chun et al., 1991, Nishana and Raghavan, 2012), a día de hoy se sabe que el complejo RAG-1,2 es capaz de ejercer su actividad recombinasa fuera de estas dianas, en las denominadas secuencias crípticas, sin que de momento sea posible predecirlas (Nishana and Raghavan, 2012). Alternativamente, la capacidad transposasa de RAG-1,2, dependiente también de secuencia, podría inducir cambios en el DNA neural (Agrawal et al., 1998). Sin embargo, de darse algún tipo de actividad mutagénica asociada a RAG-1,2, no parece probable que sea un proceso específico de genes de la familia de las inmunoglobulinas, ya que tanto en nuestros estudios como en los de otros mutantes de la vía, se encuentran alteradas moléculas de diferentes familias, incluyendo algunas relacionadas con las uniones intercelulares y con la remodelación del citoesqueleto axonal (Baleriola, 2008, Iourov et al., 2009). Sería factible que en el sistema nervioso, RAG-1,2 actuara sobre un rango amplio de sustratos génicos, siempre que portaran las señales de reconocimiento adecuadas. Si en el sistema nervioso su actividad endonucleasa se asocia a procesos de variabilidad neural, es un tema que merecerá especial atención en futuros estudios.

Apoyando el papel conjunto de RAG-2 y la vía NHEJ, la actividad de la DNA polimerasa μ sobre las DDSBs podría promover la acumulación de mutaciones en el DNA neural. Estudios *in vivo* e *in vitro* relacionan la actividad de Pol μ con los dos principales procesos de generación de variabilidad en el DNA en el sistema inmune: la hipermutación somática y la recombinación somática, siendo su papel especialmente importante durante el desarrollo embrionario (Dominguez et al., 2000, Ruiz et al., 2001, Bertocci et al., 2006, Gozalbo-Lopez et al., 2009). Aunque en el sistema inmune, esta tarea recae principalmente sobre otra DNA polimerasa, TdT, no está descrito que ésta se exprese en tejidos no linfoides, ni durante el desarrollo embrionario (Deibel et al., 1983, Nick McElhinny et al., 2005). Como hemos demostrado, Pol μ también se activa en el sistema nervioso central, participando en la neurogénesis y diferenciación de las RGCs y modulando directa o indirectamente el número y la distribución de otros tipos celulares de la retina de formación más tardía (Figs. 4.1, 4.6-4.15 y 4.22- 4.23). Además, resultados recientes demuestran su implicación en la funcionalidad del cerebro adulto (Lucas et al., 2013). En vista de estos datos, no es descartable que durante el desarrollo del sistema nervioso, Pol μ intervenga en colaboración con RAG-2 en procesos de generación de diversidad genética. Sin embargo, las alteraciones asociadas a hipermutación somática tienen un tamaño inferior a los límites de detección de la tecnología de secuenciación de célula única, por lo que serán necesarios más estudios en un futuro para clarificar el papel de la generación y correcta reparación de roturas en estas proteínas y sus repercusiones en la diferenciación neural.

REGULACIÓN GÉNICA.

Nuestros datos perfilan la actividad de RAG-1,2 como un agente a considerar en la generación dirigida de roturas en el sistema nervioso. Se ha observado que, en líneas celulares de precursores de linfocitos, las roturas reguladas por RAG-2, además de inducir proceso de recombinación genética, afectan a la expresión de un amplio número de genes, incluyendo algunos relacionados con el desarrollo neural como Notch-1 (Bredemeyer et al., 2008). Este resultado es coherente con un resultado previo de nuestro grupo, en el que se observó que la ausencia de RAG-2 alteraba el perfil proteómico de la retina murina (Baleriola, 2008). En nuestro estudio, las alteraciones en los procesos de diferenciación neuronal, distribución de proteínas de guía axonal, axonogénesis, y la migración de neuronas postmitóticas incitan a estudiar las potenciales interacciones entre la generación y reparación de DDSBs mediada por RAG-2, DNA-PK y Pol μ y la regulación transcripcional de genes relacionados con el desarrollo neural en la retina murina. Cada vez más evidencias apoyan que la generación controlada de lesiones del DNA en eucariotas puede actuar como un mecanismo fisiológico de regulación de diferentes procesos celulares, como el control de la expresión génica, el desarrollo celular y la determinación del destino celular (Ju et al., 2006, Bredemeyer et al., 2008, Larsen et al., 2010). En la mayoría de estos sistemas, la generación de DSBs se produce de manera transitoria y es reparada posteriormente por un complejo que incluye a ATM, KU y DNA-PK, implicando las proteínas de reparación de *DDSBs* en el proceso de regulación génica, en distintos contextos (Sartorius et al., 2000, Willis et al., 2002, Ko and Chin, 2003, Ju et al., 2006, Wong et al., 2009). En concreto, nuestros datos apuntan a la posible modulación de las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO por roturas del DNA. Así mismo, en conjunto con los resultados del análisis proteómico (Baleriola, 2008), insinúan que la actividad de RAG-1,2 y de la vía NHEJ debería valorarse como un posible nuevo mecanismo en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo de parte del sistema nervioso.

Maduración de la microglía durante el desarrollo de la retina murina en ausencia de RAG-2, DNA-PK, y Pol μ .

Entre las células neurales y la microglía existe una comunicación bidireccional, que puede afectar a la maduración y supervivencia de los dos tipos celulares (Cuadros and Navascues, 1998, Frade and Barde, 1998, Bessis et al., 2007, Santos et al., 2008, Bejarano-Escobar et al., 2011, Marin-Teva et al., 2011, Arno et al., 2014). Como se comentó anteriormente, los resultados de los experimentos en cultivo, en los que se minimiza el papel de la microglía, indican que los cambios en la axonogénesis asociados a la falta de DNA-PK, Pol μ y RAG-2

responden a un fenotipo autónomo celular (Figs. 4.11-4.14). Sin embargo, no es posible descartar que parte de los cambios en la microglia observados en los mutantes de este estudio se asocien a cambios en las células neurales.

En este sentido, la coordinación entre el fenotipo asociado a la falta de RAG-2 y los mutantes de NHEJ también se observa a nivel de la maduración microglial (Figs 4.24, 4.25 y 4.28): el modelo *SCID* y el ratón *rag2^{-/-}* comparten, en E13,5, la ausencia del marcador de maduración de la microglia CD68 (Fig. 4.28). Así mismo, ambos mutantes presentan una morfología ameboide típica de células microgliales indiferenciadas (Figs 4.24 y 4.25). Esta alteración morfológica parece mantenerse en el ratón *SCID* adulto (Lorke et al., 2008), lo que podría indicar problemas permanentes de maduración de la población microglial.

No está claro si esta alteración podría ser autónoma celular o si es consecuencia del fenotipo neural observado en estos mutantes. En el cortex neural, la migración y maduración de la microglía está determinada por precursores neurales (Arno et al., 2014). Por tanto, podría pensarse que defectos en la maduración neuronal como los observados en este estudio pudieran no solo alterar la distribución de la microglía, sino también limitar las señales de diferenciación microglial. Además, en la retina, la entrada de la microglía se produce siguiendo los primeros axones de las RGCs (Navascues et al., 2000, Cuadros and Navascues, 2001), por lo que alteraciones en el número y distribución de los axones podrían alterar su infiltración en la retina. Sin embargo, parece que su infiltración no se encuentra alterada (el número de células positivas para lectinas de tomate es constante en los 3 mutantes (Fig. 4.26), y que sólo está alterada su maduración en dos de los mutantes.

Podría pensarse que la falta de RAG-2 y DNA-PK en la microglía podría interferir con algún proceso de recombinación cromosómica V(d)J residual, de manera similar a lo observado en células dendríticas y células T citotóxicas (Corcoran et al., 2003, Borghesi et al., 2004, Fronkova et al., 2005, Harman et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento, no se han descritos procesos de recombinación ni en macrófagos ni en microglía (Borghesi et al., 2004). En nuestros estudios tampoco observamos la aparición de roturas de DNA asociada a células microgliales (no se muestra). Adicionalmente, el que en el mutante Pol μ , que comparte las alteraciones neurales con los otros dos mutantes, no se detectaran cambios en la maduración microglial (Figs. 4.24-4.28) indica que el proceso alterado podría ser una función independiente del fenotipo neural y de la reparación del DNA.

3-RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1 EN LA RETINA.

La transposición de LINE-1 es un evento frecuente durante la neurogénesis de diversas estructuras del sistema nervioso (Coufal et al., 2009, Kano et al., 2009), y se ha postulado que su transposición sea la fuente subyacente del mosaicismo somático detectado en las neuronas

(Muotri et al., 2005, van den Hurk et al., 2007, Thomas et al., 2012). Hasta el momento, ningún estudio ha abordado si dicha transposición se produce también en células de la retina. En el presente trabajo estudiamos el número de copias de LINE-1 en la retina y en otros tejidos neurales, comparándolo con su presencia en tejidos donde no se ha observado su transposición, como el hipocampo. Nuestros datos indican que, de manera fisiológica, el número de copias de LINE-1 se incrementa en la retina adulta (Fig. 4.29), pero no durante la embriogénesis (Fig.4.30), sugiriendo que en la retina se podrían producir eventos de transposición postnatalmente.

Se ha propuesto que las proteínas de NHEJ medien la transposición de LINE-1 (Sen et al., 2007, Coufal et al., 2011). En nuestras manos, esta hipótesis parece probable: en ausencia de proteínas de NHEJ el número de copias de LINE-1 aumenta, tanto en el embrión (Fig. 4.30) como en el adulto (Fig. 4.31), en tejidos neurales y no neurales (Figs. 4.30 y 4.31). Estos datos podrían implicar a DNA-PK y Pol μ en la modulación de la transposición de LINE-1, de manera similar a lo observado en el mutante nulo para ATM (Coufal et al., 2011), y al papel de DNA-PK en la transposición de otros elementos móviles (Yant and Kay, 2003).

La transposición de LINE-1 parece ser capaz de utilizar un mecanismo independiente de su endonucleasa para retrotransponerse (Sen et al., 2007), ya que su número de copias disminuye en el mutante *rag2*^{-/-} (Fig. 4.31), donde se ha observado una reducción del número de DDSBs (y donde la vía NHEJ de reparación de roturas está intacta). Experimentos previos en células de ovario de hamster apuntan en la misma dirección, ya que demuestran que LINE-1 podría utilizar roturas preexistentes como puntos de inserción (Morrish et al., 2002, Morrish et al., 2007). En este sentido, es especialmente relevante que, en nuestras manos, la transposición de LINE-1 se disminuya específicamente en los tejidos donde otros estudios han detectado el mRNA de RAG-2 (en cerebro, retina y en corazón) (Laszkiewicz et al., 2012), y no disminuya en otros donde RAG-2 está ausente, como hígado. Estos resultados apuntan a que LINE-1 podría actuar de manera oportunista aprovechando roturas preexistentes posiblemente generadas por el complejo RAG-1,2.

RESUMEN DE MECANISMOS.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que la ausencia de proteínas de reparación del DNA en la retina, en concreto de la vía NHEJ, interfiere con los proceso de neurogénesis y de maduración neural, incrementando la muerte celular programada. Así mismo, nuestros datos indican que al menos el una parte significativa de las DDSBs observadas durante el desarrollo de la retina no son atribuibles al azar sino a la presencia del complejo RAG-1,2. Su actividad parece coordinada con la vía NHEJ y podría ser necesaria para el *fitness* neural. La posible relación entre ambos mecanismos se especifica en la Fig. 5.1. Por último, descartamos que la generación de roturas en el desarrollo de la retina se deba mayoritariamente a la actividad del

elemento móvil LINE-1, si bien demostramos que la ausencia de la endonucleasa RAG-2 disminuye su transposición.

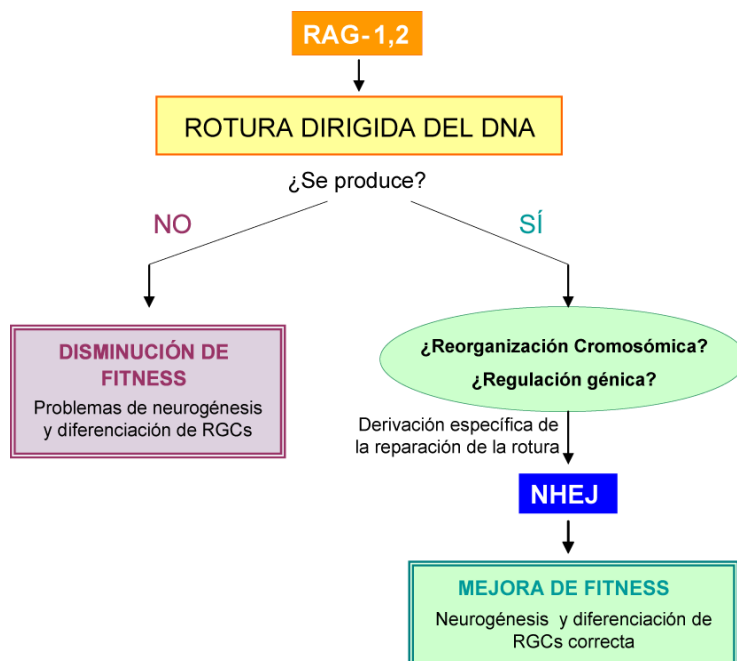


FIGURA 5.1- POSIBLE INTERRELACIÓN DE LA GENERACIÓN Y LA REPARACIÓN DE ROTURAS DE DNA EN EL DESARROLLO NEURAL DE LA RETINA.

La actividad endonucleasade RAG-1,2 podría estar generando roturas dirigidas en el DNA neural. La generación de las mismas parece estar relacionada con la aptitud (fitness) neural, y podría afectar a posibles procesos de recombinación cromosómica o regulación génica. Las roturas de RAG-1,2 parecen derivarse específicamente a la vía NHEJ para su reparación.

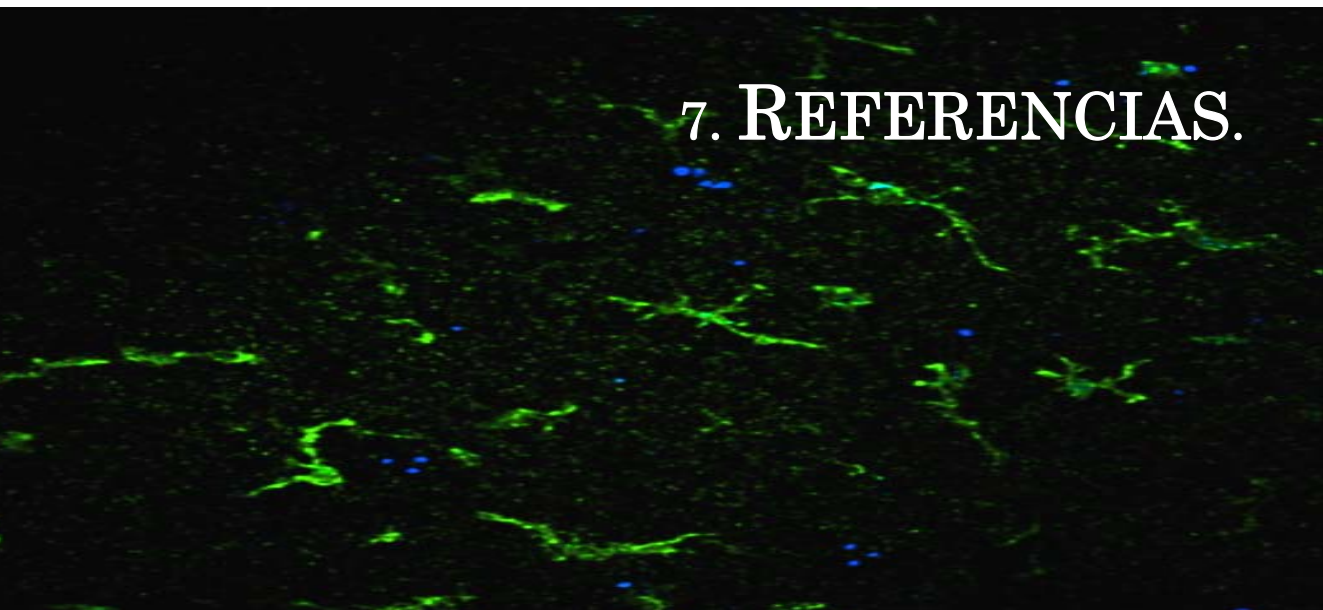
A fluorescence microscopy image of a tissue section. The image shows a cross-section of tissue with various layers. A prominent feature is a bright green, wavy band on the left side. The central and right portions of the tissue exhibit a dense, granular texture with a mix of green and blue fluorescence. The background is dark, highlighting the fluorescent structures.

6. CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

1. La presencia de las proteínas de reparación del DNA por la vía NHEJ DNA-PKcs y Pol μ y, al menos, una de las subunidades del complejo endonucleasa RAG-1,2, es necesaria para la viabilidad celular durante el desarrollo temprano de la retina murina.
2. La falta de RAG-2, DNA-PKcs y Pol μ afecta al proceso de neurogénesis de la retina, alterando específicamente la viabilidad de las células ganglionares de la retina.
3. RAG-2, DNA-PKcs y Pol μ participan también en el proceso de maduración de las células ganglionares, siendo necesarias para la correcta emisión de los axones y para los procesos de la navegación axonal intrarretiniana.
4. La falta de Pol μ provoca alteraciones en la estructura de la retina embrionaria y también en la localización de las neuronas recién diferenciadas. Además, en la retina adulta, se asocia a alteraciones en la irrigación de la retina y en la distribución y ramificación de los astrocitos.
5. La ausencia en el desarrollo de RAG-2, DNA-PKcs o Pol μ afecta a la distribución espacial en la retina de las proteínas de guía axonal L1CAM y BRAVO, ambas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.
6. La ausencia de las proteínas de generación y reparación de roturas del DNA RAG-2 y DNA-PKcs interfiere con la maduración microglial en la retina.
7. La transposición de LINE-1 no parece intervenir en el proceso de neurogénesis temprana de la retina murina. Sin embargo, a lo largo del desarrollo, LINE-1 se acumula en el DNA en tejidos neurales, incluyendo la retina y parece ser capaz de integrarse en roturas asociadas a la presencia de RAG-2.

7. REFERENCIAS.



7. REFERENCIAS.

A

- Abner CW, McKinnon PJ (The DNA double-strand break response in the nervous system. *DNA Repair (Amst)* 3:1141-1147.2004).
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG (Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394:744-751.1998).
- Aoki T, Tashiro K, Miyatake S, Nakano T, Oda Y, Kikuchi H, Honjo T (Expression of the RAG-2 gene in murine central nervous system tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 181:151-158.1991).
- Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K, Abe M (Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2438-2443.1997).
- Armananzas R, Ascoli GA (Towards the automatic classification of neurons. *Trends Neurosci* 38:307-318.2015).
- Arno B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, Comi G, Becher B, Martino G, Muzio L (Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun* 5:5611.2014).
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513:532-541.2009).

B

- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J (Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 61:852-864.2009).
- Baillie JK, Barnett MW, Upton KR, Gerhardt DJ, Richmond TA, De Sapio F, Brennan PM, Rizzu P, Smith S, Fell M, Talbot RT, Gustincich S, Freeman TC, Mattick JS, Hume DA, Heutink P, Carninci P, Jeddloh JA, Faulkner GJ (Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature* 479:534-537.2011).

- Baleriola J (2008) Caracterización del significado funcional de la muerte neural temprana. Procesos de modificación del material genético durante el desarrollo de la retina de ratón., p 183 Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Baleriola J, Suarez T, de la Rosa EJ (DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell Death Differ* 17:1697-1706.2010).
- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A (Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86:159-171.1996).
- Barlow JH, Faryabi RB, Callen E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, Casellas R, Robbiani DF, Staudt L, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A (Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* 152:620-632.2013).
- Barral S, Beltramo R, Salio C, Aimar P, Lossi L, Merighi A (Phosphorylation of histone H2AX in the mouse brain from development to senescence. *Int J Mol Sci* 15:1554-1573.2014).
- Barzilai A, Biton S, Shiloh Y (The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst)* 7:1010-1027.2008).
- Barzilai A, McKinnon PJ (Genome maintenance in the nervous system; insight into the role of the DNA damage response in brain development and disease. *DNA Repair (Amst)* 12:541-542.2013).
- Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M, Price BD (The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 247:79-83.1998).
- Bejarano-Escobar R, Holguin-Arevalo MS, Montero JA, Francisco-Morcillo J, Martin-Partido G (Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240:1841-1855.2011).
- Bernardinelli Y, Muller D, Nikonenko I (Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plast* 2014:232105.2014).
- Bertocci B, De Smet A, Berek C, Weill JC, Reynaud CA (Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* 19:203-211.2003).
- Bertocci B, De Smet A, Weill JC, Reynaud CA (Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity* 25:31-41.2006).
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.2007).
- Bladen CL, Lam WK, Dynan WS, Kozlowski DJ (DNA damage response and Ku80 function in the vertebrate embryo. *Nucleic Acids Res* 33:3002-3010.2005).
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J (Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122:1165-1174.1996).
- Blunt T, Gell D, Fox M, Taccioli GE, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA (Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10285-10290.1996).
- Borghesi L, Hsu LY, Miller JP, Anderson M, Herzenberg L, Schlissel MS, Allman D, Gerstein RM (B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 199:491-502.2004).

- Bottenstein JE (Advances in vertebrate cell culture methods. *Science* 239:G42, G48.1988).
- Boya P, de la Rosa EJ (Cell death in early neural life. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:281-293.2005).
- Bredemeyer AL, Helmink BA, Innes CL, Calderon B, McGinnis LM, Mahowald GK, Gapud EJ, Walker LM, Collins JB, Weaver BK, Mandik-Nayak L, Schreiber RD, Allen PM, May MJ, Paules RS, Bassing CH, Sleckman BP (DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing lymphocytes. *Nature* 456:819-823.2008).
- Brzostek-Racine S, Gordon C, Van Scoy S, Reich NC (The DNA damage response induces IFN. *J Immunol* 187:5336-5345.2011).
- Buis J, Wu Y, Deng Y, Leddon J, Westfield G, Eckersdorff M, Sekiguchi JM, Chang S, Ferguson DO (Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell* 135:85-96.2008).
- Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K (Increased I1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 81:306-313.2014).
- Bunt-Milam AH, Saari JC (Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* 97:703-712.1983).
- Burne JF, Raff MC (Retinal ganglion cell axons drive the proliferation of astrocytes in the developing rodent optic nerve. *Neuron* 18:223-230.1997).
- Bushman DM, Chun J (The genomically mosaic brain: aneuploidy and more in neural diversity and disease. *Semin Cell Dev Biol* 24:357-369.2013).
- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW (Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 29:1-35.2006).

C

- Cai X, Evrony GD, Lehmann HS, Elhosary PC, Mehta BK, Poduri A, Walsh CA (Single-cell, genome-wide sequencing identifies clonal somatic copy-number variation in the human brain. *Cell Rep* 10:645.2015).
- Camarero G, Leon Y, Gorospe I, De Pablo F, Alsina B, Giraldez F, Varela-Nieto I (Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Dev Biol* 262:242-253.2003).
- Cellerino A, Bahr M, Isenmann S (Apoptosis in the developing visual system. *Cell Tissue Res* 301:53-69.2000).
- Cepko C (Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nat Rev Neurosci* 15:615-627.2014).
- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:589-595.1996).
- Clarke LE, Barres BA (Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14:311-321.2013).
- Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V (Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* 52:356-362.1998).
- Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, Wu L, Wilson A, Shortman K (The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 170:4926-4932.2003).

- Cordaux R, Batzer MA (The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10:691-703.2009).
- Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Carson CT, Macia A, Moran JV, Gage FH (Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20382-20387.2011).
- Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, Morell M, O'Shea KS, Moran JV, Gage FH (L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460:1127-1131.2009).
- Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascues J (Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.1992).
- Cuadros MA, Navascues J (The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189.1998).
- Cuadros MA, Navascues J (Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res* 132:51-59.2001).
- Chan-Ling T, Stone J (Degeneration of astrocytes in feline retinopathy of prematurity causes failure of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2148-2159.1992).
- Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ (Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47:497-510.2012).
- Chaumeil J, Micsinai M, Ntziachristos P, Roth DB, Aifantis I, Kluger Y, Deriano L, Skok JA (The RAG2 C-terminus and ATM protect genome integrity by controlling antigen receptor gene cleavage. *Nat Commun* 4:2231.2013).
- Chavarria T, Baleriola J, Mayordomo R, de Pablo F, de la Rosa EJ (Early neural cell death is an extensive, dynamic process in the embryonic chick and mouse retina. *ScientificWorldJournal* 2013:627240.2013).
- Chayot R, Danckaert A, Montagne B, Ricchetti M (Lack of DNA polymerase mu affects the kinetics of DNA double-strand break repair and impacts on cellular senescence. *DNA Repair (Amst)* 9:1187-1199.2010).
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S (Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3595-3602.2006).
- Chechlacz M, Vemuri MC, Naegele JR (Role of DNA-dependent protein kinase in neuronal survival. *J Neurochem* 78:141-154.2001).
- Chow RL, Lang RA (Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:255-296.2001).
- Chun J, Schatz DG (Rearranging views on neurogenesis: neuronal death in the absence of DNA end-joining proteins. *Neuron* 22:7-10.1999).
- Chun JJ, Schatz DG, Oettinger MA, Jaenisch R, Baltimore D (The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* 64:189-200.1991).

D

- Dakubo GD, Wang YP, Mazerolle C, Campsall K, McMahon AP, Wallace VA (Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* 130:2967-2980.2003).
- Davis DM, Dyer MA (Retinal progenitor cells, differentiation, and barriers to cell cycle reentry. *Curr Top Dev Biol* 93:175-188.2010).

- de la Rosa EJ, de Pablo F (Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* 23:454-458.2000).
- de la Rosa EJ, Diaz B, de Pablo F (Organoculture of the chick embryonic neuroretina. *Curr Top Dev Biol* 36:133-144.1998).
- De Pablo F, Alarcon C, Diaz B, Garcia-De Lacoba M, Lopez-Carranza A, Morales AV, Pimentel B, Serna J, De la Rosa EJ (Complementary roles of the insulin family of factors and receptors in early development and neurogenesis. *Int J Dev Biol Suppl* 1:109S-110S.1996).
- Deibel MR, Jr., Riley LK, Coleman MS, Cibull ML, Fuller SA, Todd E (Expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in human thymus during ontogeny and development. *J Immunol* 131:195-200.1983).
- Dekkers MP, Barde YA (Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development. *Science* 340:39-41.2013).
- Dekkers MP, Nikolettou V, Barde YA (Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *J Cell Biol* 203:385-393.2013).
- Delhay S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P, Michiels T (Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7835-7840.2006).
- Deriano L, Chaumeil J, Coussens M, Multani A, Chou Y, Alekseyenko AV, Chang S, Skok JA, Roth DB (The RAG2 C terminus suppresses genomic instability and lymphomagenesis. *Nature* 471:119-123.2011).
- Deriano L, Roth DB (Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet* 47:433-455.2013).
- Deyer WJ, Gray W. R. and Hood, L. (The genetic, molecular and cellular basis of antibody formation: some facts and a unifying hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 32:353-367.1967).
- Dhingra N, Yadav SP, de Villartay JP, Picard C, Sabharwal RK, Dinand V, Ghuman SS, Sachdeva A (Severe combined immunodeficiency caused by a new homozygous RAG1 mutation with progressive encephalopathy. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 7:44-49.2014).
- Diaz B, Pimentel B, de Pablo F, de La Rosa EJ (Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur J Neurosci* 11:1624-1632.1999).
- Diaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ (In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* 127:1641-1649.2000).
- Djabali M, Mattei MG, Nguyen C, Roux D, Demengeot J, Denizot F, Moos M, Schachner M, Goridis C, Jordan BR (The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics* 7:587-593.1990).
- Dominguez O, Ruiz JF, Lain de Lera T, Garcia-Diaz M, Gonzalez MA, Kirchhoff T, Martinez AC, Bernad A, Blanco L (DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J* 19:1731-1742.2000).
- Durkin SG, Glover TW (Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 41:169-192.2007).

E

- Edelman GM, Gally JA (Somatic recombination of duplicated genes: an hypothesis on the origin of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:353-358.1967).
- Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R, Jaenisch R (Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428:44-49.2004).
- Eilam R, Peter Y, Elson A, Rotman G, Shiloh Y, Groner Y, Segal M (Selective loss of dopaminergic nigro-striatal neurons in brains of Atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12653-12656.1998).
- Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y (Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472:51-56.2011).
- El Waly B, Buhler E, Haddad MR, Villard L (Nhej1 Deficiency Causes Abnormal Development of the Cerebral Cortex. *Mol Neurobiol.*2014).
- Elshatory Y, Everhart D, Deng M, Xie X, Barlow RB, Gan L (Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* 27:12707-12720.2007).
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-1451.2000).
- Erskine L, Herrera E (The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308:1-14.2007).
- Erwin JA, Marchetto MC, Gage FH (Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci* 15:497-506.2014).
- Escudero B, Lucas D, Albo C, Dhup S, Bacher JW, Sanchez-Munoz A, Fernandez M, Rivera-Torres J, Carmona RM, Fuster E, Carreiro C, Bernad R, Gonzalez MA, Andres V, Blanco L, Roche E, Fabregat I, Samper E, Bernad A (Polmu deficiency increases resistance to oxidative damage and delays liver aging. *PLoS One* 9:e93074.2014).
- Evrony GD, Cai X, Lee E, Hills LB, Elhosary PC, Lehmann HS, Parker JJ, Atabay KD, Gilmore EC, Poduri A, Park PJ, Walsh CA (Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell* 151:483-496.2012).
- Evrony GD, Lee E, Mehta BK, Benjamini Y, Johnson RM, Cai X, Yang L, Haseley P, Lehmann HS, Park PJ, Walsh CA (Cell lineage analysis in human brain using endogenous retroelements. *Neuron* 85:49-59.2015).

F

- Ferrer I, Soriano E, del Rio JA, Alcantara S, Auladell C (Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog Neurobiol* 39:1-43.1992).
- Finlay BL (The developing and evolving retina: using time to organize form. *Brain Res* 1192:5-16.2008).
- Finlay BL, Slattery M (Local differences in the amount of early cell death in neocortex predict adult local specializations. *Science* 219:1349-1351.1983).
- Frade JM, Barde YA (Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20:35-41.1998).

- Frade JM, Bovolenta P, Martinez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A (Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development* 124:3313-3320.1997).
- Francisco-Morcillo J, Bejarano-Escobar R, Rodriguez-Leon J, Navascues J, Martin-Partido G (Ontogenetic cell death and phagocytosis in the visual system of vertebrates. *Dev Dyn* 243:1203-1225.2014).
- Frappart PO, Lee Y, Russell HR, Chalhoub N, Wang YD, Orii KE, Zhao J, Kondo N, Baker SJ, McKinnon PJ (Recurrent genomic alterations characterize medulloblastoma arising from DNA double-strand break repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1880-1885.2009).
- Frappart PO, McKinnon PJ (Ataxia-telangiectasia and related diseases. *Neuromolecular Med* 8:495-511.2006).
- Frappart PO, McKinnon PJ (Mouse models of DNA double-strand break repair and neurological disease. *DNA Repair (Amst)* 7:1051-1060.2008).
- Fronkova E, Krejci O, Kalina T, Horvath O, Trka J, Hrusak O (Lymphoid differentiation pathways can be traced by TCR delta rearrangements. *J Immunol* 175:2495-2500.2005).
- Fruttiger M, Calver AR, Kruger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa S, Richardson WD (PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17:1117-1131.1996).
- Fugmann SD (The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination. *Semin Immunol* 22:10-16.2010).
- Fulop GM, Phillips RA (The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347:479-482.1990).

G

- Galli-Resta L, Ensini M (An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* 16:2318-2324.1996).
- Galli-Resta L, Leone P, Bottari D, Ensini M, Rigosi E, Novelli E (The genesis of retinal architecture: an emerging role for mechanical interactions? *Prog Retin Eye Res* 27:260-283.2008).
- Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, Chaudhuri J, Horner J, DePinho RA, Alt FW (Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 404:897-900.2000).
- Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, Davidson L, Ferrini R, Stamato T, Orkin SH, Greenberg ME, Alt FW (A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 95:891-902.1998).
- Gapud EJ, Sleckman BP (Unique and redundant functions of ATM and DNA-PKcs during V(D)J recombination. *Cell Cycle* 10:1928-1935.2011).
- Gariano RF (Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res* 22:295-306.2003).
- Gatz SA, Ju L, Gruber R, Hoffmann E, Carr AM, Wang ZQ, Liu C, Jeggo PA (Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *J Neurosci* 31:10088-10100.2011).

- Gearhart PJ, Wood RD (Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. *Nat Rev Immunol* 1:187-192.2001).
- Gigi V, Lewis S, Shestova O, Mijuskovic M, Deriano L, Meng W, Luning Prak ET, Roth DB (RAG2 mutants alter DSB repair pathway choice in vivo and illuminate the nature of 'alternative NHEJ'. *Nucleic Acids Res* 42:6352-6364.2014).
- Gilmore EC, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr., Herrup K (Cell birth, cell death, cell diversity and DNA breaks: how do they all fit together? *Trends Neurosci* 23:100-105.2000).
- Gonitel R, Moffitt H, Sathasivam K, Woodman B, Detloff PJ, Faull RL, Bates GP (DNA instability in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3467-3472.2008).
- Gosink EC, Chong MJ, McKinnon PJ (Ataxia telangiectasia mutated deficiency affects astrocyte growth but not radiosensitivity. *Cancer Res* 59:5294-5298.1999).
- Gould TW, Oppenheim RW (Stepping stone to death. *Nat Neurosci* 4:1053-1054.2001).
- Gozalbo-Lopez B, Andrade P, Terrados G, de Andres B, Serrano N, Cortegano I, Palacios B, Bernad A, Blanco L, Marcos MA, Gaspar ML (A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements of the postgastrulation mouse embryo. *Mol Cell Biol* 29:1266-1275.2009).
- Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS (Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2:249-268.2012).
- Gray H (Gray's Anatomy - The 100th Edition. *Can Med Assoc J* 82:323.1960).
- Green DR (Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.2005).
- Gu Y, Sekiguchi J, Gao Y, Dikkes P, Frank K, Ferguson D, Hasty P, Chun J, Alt FW (Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2668-2673.2000).
- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F, Laumonnier F, Odent S, Le Vacon G, Joly-Helas G, David V, Bendavid C, Pinoit JM, Henry C, Impallomeni C, Germano E, Tortorella G, Di Rosa G, Barthelemy C, Andres C, Faivre L, Frebourg T, Saugier Veber P, Campion D (Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry* 66:947-956.2009).

H

- Hah YS, Lee JH, Kim DR (DNA-dependent protein kinase mediates V(D)J recombination via RAG2 phosphorylation. *J Biochem Mol Biol* 40:432-438.2007).
- Harman BC, Miller JP, Nikbakht N, Gerstein R, Allman D (Mouse plasmacytoid dendritic cells derive exclusively from estrogen-resistant myeloid progenitors. *Blood* 108:878-885.2006).
- Helmink BA, Sleckman BP (The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annu Rev Immunol* 30:175-202.2012).
- Hendrickson EA (Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am J Hum Genet* 61:795-800.1997).

- Hiom K, Melek M, Gellert M (DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations. *Cell* 94:463-470.1998).
- Hoeijmakers JH (DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361:1475-1485.2009).
- Holt CE (Does timing of axon outgrowth influence initial retinotectal topography in *Xenopus*? *J Neurosci* 4:1130-1152.1984).
- Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M (Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 20:165-196.2002).

I

- Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Kolotii AD, Yurov YB (Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. *Hum Mol Genet* 18:2656-2669.2009).
- Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB (Single cell genomics of the brain: focus on neuronal diversity and neuropsychiatric diseases. *Curr Genomics* 13:477-488.2012).

J

- Jackson MJ (Redox regulation of muscle adaptations to contractile activity and aging. *J Appl Physiol* (1985) 119:163-171.2015).
- Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T (DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 94:166-200.2011).
- Jessen JR, Jessen TN, Vogel SS, Lin S (Concurrent expression of recombination activating genes 1 and 2 in zebrafish olfactory sensory neurons. *Genesis* 29:156-162.2001).
- Jette N, Lees-Miller SP (The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog Biophys Mol Biol* 117:194-205.2015).
- Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE (Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One* 8:e56293.2013).
- Joseph B, Hermanson O (Molecular control of brain size: regulators of neural stem cell life, death and beyond. *Exp Cell Res* 316:1415-1421.2010).
- Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312:1798-1802.2006).

K

- Kano H, Godoy I, Courtney C, Vetter MR, Gerton GL, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. (L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes Dev* 23:1303-1312.2009).
- Karanjawala ZE, Hinton DR, Oh E, Hsieh CL, Lieber MR (Developmental retinal apoptosis in *Ku86*^{-/-} mice. *DNA Repair (Amst)* 2:1429-1434.2003).

- Karo JM, Schatz DG, Sun JC (The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells. *Cell* 159:94-107.2014).
- Katyal S, McKinnon PJ (DNA repair deficiency and neurodegeneration. *Cell Cycle* 6:2360-2365.2007).
- Kaufmann SH, Hengartner MO (Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-534.2001).
- Kayyem JF, Roman JM, de la Rosa EJ, Schwarz U, Dreyer WJ (Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. *J Cell Biol* 118:1259-1270.1992).
- Kholodnyuk ID, Szeles A, Yang Y, Klein G, Imreh S (Inactivation of the human fragile histidine triad gene at 3p14.2 in monochromosomal human/mouse microcell hybrid-derived severe combined immunodeficient mouse tumors. *Cancer Res* 60:7119-7125.2000).
- Ko L, Chin WW (Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 278:11471-11479.2003).
- Kong X, Shen Y, Jiang N, Fei X, Mi J (Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell Signal* 23:1273-1280.2011).
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 23:291-297.2000).

L

- Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, Brunette S, Dilworth FJ, Megeney LA (Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4230-4235.2010).
- Laszkiewicz A, Sniezewski L, Kasztura M, Bzdion L, Cebrat M, Kisielow P (Bidirectional activity of the NWC promoter is responsible for RAG-2 transcription in non-lymphoid cells. *PLoS One* 7:e44807.2012).
- Lee Y, Barnes DE, Lindahl T, McKinnon PJ (Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires Atm. *Genes Dev* 14:2576-2580.2000).
- Lee Y, McKinnon PJ (ATM dependent apoptosis in the nervous system. *Apoptosis* 5:523-529.2000).
- Lee Y, McKinnon PJ (Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. *Neuroscience* 145:1365-1374.2007).
- Lee Y, McKinnon PJ (Detection of apoptosis in the central nervous system. *Methods Mol Biol* 559:273-282.2009).
- Levi-Montalcini R (The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.1987).
- Levin LA (Models of neural injury. *J Glaucoma* 10:S19-21.2001).
- Lewin B (2004) *Genes VIII*. p 1002 New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Lewis S, Gifford A, Baltimore D (DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. *Science* 228:677-685.1985).
- Lewis SM, Agard E, Suh S, Czyzyk L (Cryptic signals and the fidelity of V(D)J joining. *Mol Cell Biol* 17:3125-3136.1997).
- Li J, Ishii T, Feinstein P, Mombaerts P (Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature* 428:393-399.2004).
- Lieber MR (The polymerases for V(D)J recombination. *Immunity* 25:7-9.2006).

- Lieber MR (The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181-211.2010).
- Lin JM, Landree MA, Roth DB (V(D)J recombination catalyzed by mutant RAG proteins lacking consensus DNA-PK phosphorylation sites. *Mol Immunol* 36:1263-1269.1999).
- Lin WC, Desiderio S (Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2733-2737.1994).
- Liu C, Srihari S, Cao KA, Chenevix-Trench G, Simpson PT, Ragan MA, Khanna KK (A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 42:6106-6127.2014).
- Lorke DE, Ip CW, Schumacher U (Increased number of microglia in the brain of severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Histochem Cell Biol* 130:693-697.2008).
- Lucas D, Delgado-Garcia JM, Escudero B, Albo C, Aza A, Acin-Perez R, Torres Y, Moreno P, Enriquez JA, Samper E, Blanco L, Fairen A, Bernad A, Gruart A (Increased learning and brain long-term potentiation in aged mice lacking DNA polymerase mu. *PLoS One* 8:e53243.2013).
- Lucas D, Escudero B, Ligos JM, Segovia JC, Estrada JC, Terrados G, Blanco L, Samper E, Bernad A (Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair. *PLoS Genet* 5:e1000389.2009).
- Lucas D, Lain de Lera T, Gonzalez MA, Ruiz JF, Dominguez O, Casanova JC, Martinez AC, Blanco L, Bernad A (Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts. *Eur J Immunol* 35:1601-1611.2005).
- Luo XM, Lei MY (Recombination activating gene-2 regulates CpG-mediated interferon-alpha production in mouse bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 7:e47952.2012).

M

- Madabhushi R, Pan L, Tsai LH (DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 83:266-282.2014).
- Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA (Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22:5194-5202.2002).
- Maness PF, Schachner M (Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10:19-26.2007).
- Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J (Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25-40.2011).
- Marquardt T, Gruss P (Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* 25:32-38.2002).
- Martin MJ, Blanco L (Decision-making during NHEJ: a network of interactions in human Polmu implicated in substrate recognition and end-bridging. *Nucleic Acids Res* 42:7923-7934.2014).
- Martin MJ, Garcia-Ortiz MV, Esteban V, Blanco L (Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Polmu. *Nucleic Acids Res* 41:2428-2436.2013).

- Martomo SA, Gearhart PJ (Somatic hypermutation: subverted DNA repair. *Curr Opin Immunol* 18:243-248.2006).
- Masland RH (The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886.2001).
- Mayordomo R, Valenciano AI, de la Rosa EJ, Hallbook F (Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur J Neurosci* 18:1744-1750.2003).
- McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, Shumilina S, Lasken RS, Vermeesch JR, Hall IM, Gage FH (Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 342:632-637.2013).
- McConnell MJ, MacMillan HR, Chun J (Mathematical modeling supports substantial mouse neural progenitor cell death. *Neural Dev* 4:28.2009).
- McGowan PO, Hope TA, Meck WH, Kelsoe G, Williams CL (Impaired social recognition memory in recombination activating gene 1-deficient mice. *Brain Res* 1383:187-195.2011).
- McKinnon PJ (DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 10:100-112.2009).
- McKinnon PJ, Caldecott KW (DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8:37-55.2007).
- McLoon SC, Barnes RB (Early differentiation of retinal ganglion cells: an axonal protein expressed by premigratory and migrating retinal ganglion cells. *J Neurosci* 9:1424-1432.1989).
- Messier TL, O'Neill JP, Hou SM, Nicklas JA, Finette BA (In vivo transposition mediated by V(D)J recombinase in human T lymphocytes. *EMBO J* 22:1381-1388.2003).
- Miller MW (Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *J Comp Neurol* 355:6-14.1995).
- Miller RH, Ffrench-Constant C, Raff MC (The macroglial cells of the rat optic nerve. *Annu Rev Neurosci* 12:517-534.1989).
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.1988).
- Mladenov E, Iliakis G (Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711:61-72.2011).
- Moon AF, Garcia-Diaz M, Batra VK, Beard WA, Bebenek K, Kunkel TA, Wilson SH, Pedersen LC (The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst)* 6:1709-1725.2007).
- Morales G, Sanchez-Puelles JM, Schwarz U, de la Rosa EJ (Synergistic neurite-outgrowth promoting activity of two related axonal proteins, Bravo/Nr-CAM and G4/Ng-CAM in chicken retinal explants. *Eur J Neurosci* 8:1098-1105.1996).
- Morcillo J, Martinez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, Bovolenta P (Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133:3179-3190.2006).
- Morillo SM, Escoll P, de la Hera A, Frade JM (Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:109-114.2010).
- Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, Taccioli GE, Sekiguchi J, Moran JV (Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446:208-212.2007).

- Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV (DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 31:159-165.2002).
- Motea EA, Berdis AJ (Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1804:1151-1166.2010).
- Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH (Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435:903-910.2005).
- Muotri AR, Gage FH (Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* 441:1087-1093.2006).
- Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, Gage FH (L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468:443-446.2010).

N

- Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Alburquerque-Bejar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One* 7:e49830.2012).
- Navascues J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA (Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91-102.2000).
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB (Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32:367-402.2014).
- Neumann CJ, Nusslein-Volhard C (Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289:2137-2139.2000).
- Nick McElhinny SA, Havener JM, Garcia-Diaz M, Juarez R, Bebenek K, Kee BL, Blanco L, Kunkel TA, Ramsden DA (A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* 19:357-366.2005).
- Nikoletopoulou V, Lickert H, Frade JM, Rencurel C, Giallonardo P, Zhang L, Bibel M, Barde YA (Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467:59-63.2010).
- Nishana M, Raghavan SC (Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* 137:271-281.2012).

O

- Ohsawa R, Kageyama R (Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* 1192:90-98.2008).
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan CY, Rakic P (Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21:4752-4760.2001).
- Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ (Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10017-10022.2006).

- Oster SF, Deiner M, Birgbauer E, Sretavan DW (Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve. *Semin Cell Dev Biol* 15:125-136.2004).
- Otaegi G, de Pablo F, Vicario-Abejon C, de la Rosa EJ (Retinal and olfactory bulb precursor cells show distinct responses to FGF-2 and laminin. *Cell Biol Int* 31:752-758.2007).
- Owens T, Khorooshi R, Wlodarczyk A, Asgari N (Interferons in the central nervous system: a few instruments play many tunes. *Glia* 62:339-355.2014).

P

- Palakodeti A, Lucas I, Jiang Y, Young DJ, Fernald AA, Karrison T, Le Beau MM (Impaired replication dynamics at the FRA3B common fragile site. *Hum Mol Genet* 19:99-110.2010).
- Pan L, Deng M, Xie X, Gan L (ISL1 and BRN3B co-regulate the differentiation of murine retinal ganglion cells. *Development* 135:1981-1990.2008).
- Papavasiliou FN, Schatz DG (Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 109 Suppl:S35-44.2002).
- Pekny M, Pekna M (Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94:1077-1098.2014).
- Philips GT, Stair CN, Young Lee H, Wroblewski E, Berberoglu MA, Brown NL, Mastick GS (Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type. *Dev Biol* 279:308-321.2005).
- Piret B, Schoonbroodt S, Piette J (The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 18:2261-2271.1999).
- Pittman AJ, Law MY, Chien CB (Pathfinding in a large vertebrate axon tract: isotopic interactions guide retinotectal axons at multiple choice points. *Development* 135:2865-2871.2008).
- Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA (Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* 341:1237758.2013).
- Pollerberg GE, Thelen K, Theiss MO, Hochlehnert BC (The role of cell adhesion molecules for navigating axons: density matters. *Mech Dev* 130:359-372.2013).
- Pryor JM, Waters CA, Aza A, Asagoshi K, Strom C, Mieczkowski PA, Blanco L, Ramsden DA (Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E4537-4545.2015).

Q

- Qiu JX, Kale SB, Yarnell Schultz H, Roth DB (Separation-of-function mutants reveal critical roles for RAG2 in both the cleavage and joining steps of V(D)J recombination. *Mol Cell* 7:77-87.2001).

R

- Raff MC, Abney ER, Miller RH (Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev Biol* 106:53-60.1984).
- Ramsden DA (Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid Redox Signal* 14:2509-2519.2011).

- Raper J, Mason C (Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001933.2010).
- Rass E, Grabarz A, Bertrand P, Lopez BS ([Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother* 16:1-10.2012).
- Reese BE (Development of the retina and optic pathway. *Vision Res* 51:613-632.2011).
- Rehen SK, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH, Chun J (Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13361-13366.2001).
- Rehen SK, Yung YC, McCreight MP, Kaushal D, Yang AH, Almeida BS, Kingsbury MA, Cabral KM, McConnell MJ, Anliker B, Fontanoz M, Chun J (Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci* 25:2176-2180.2005).
- Richardson L, Venkataraman S, Stevenson P, Yang Y, Moss J, Graham L, Burton N, Hill B, Rao J, Baldock RA, Armit C (EMAGE mouse embryo spatial gene expression database: 2014 update. *Nucleic Acids Res* 42:D835-844.2014).
- Rodriguez-de la Rosa L, Contreras-Rodriguez J, Cediell-Algovia R, Leon Y, Sanchez-Calderon H, Murillo-Cuesta S, Riquelme-Galiana R, de Diego-Sastre JJ, Prim-Espada MP, Varela-Nieto I ([Neurotrophic action of insulin-like growth factor-I in the inner ear]. *Rev Neurol* 45:245-250.2007).
- Rodriguez-Gallardo L, Lineros-Dominguez Mdel C, Francisco-Morcillo J, Martin-Partido G (Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol (Berl)* 210:303-316.2005).
- Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J, Fugmann S, Ferguson DO, Schatz DG, Sekiguchi J (Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197:553-565.2003).
- Rosin N, Elcioglu NH, Beleggia F, Isguven P, Altmuller J, Thiele H, Steindl K, Joset P, Rauch A, Nurnberg P, Wollnik B, Yigit G (Mutations in XRCC4 cause primary microcephaly, short stature and increased genomic instability. *Hum Mol Genet.*2015).
- Ruiz JF, Dominguez O, Lain de Lera T, Garcia-Diaz M, Bernad A, Blanco L (DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:99-109.2001).
- Ruiz JF, Lucas D, Garcia-Palomero E, Saez AI, Gonzalez MA, Piris MA, Bernad A, Blanco L (Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res* 32:5861-5873.2004).

S

- Sakurai T (The role of NrCAM in neural development and disorders--beyond a simple glue in the brain. *Mol Cell Neurosci* 49:351-363.2012).
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martin-Oliva D, Marin-Teva JL, Navascues J, Cuadros MA (Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506:224-239.2008).

- Sartorius CA, Takimoto GS, Richer JK, Tung L, Horwitz KB (Association of the Ku autoantigen/DNA-dependent protein kinase holoenzyme and poly(ADP-ribose) polymerase with the DNA binding domain of progesterone receptors. *J Mol Endocrinol* 24:165-182.2000).
- Schatz DG, Ji Y (Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 11:251-263.2011).
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.2012).
- Schlissel M, Constantinescu A, Morrow T, Baxter M, Peng A (Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 7:2520-2532.1993).
- Schmittgen TD, Livak KJ (Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-1108.2008).
- Seki M, Gearhart PJ, Wood RD (DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep* 6:1143-1148.2005).
- Sen SK, Huang CT, Han K, Batzer MA (Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. *Nucleic Acids Res* 35:3741-3751.2007).
- Sharma RK, Netland PA (Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 1176:11-17.2007).
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. (RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.1992).
- Shiraishi T, Druck T, Mimori K, Flomenberg J, Berk L, Alder H, Miller W, Huebner K, Croce CM (Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3B/FHIT and Fra14A2/Fhit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5722-5727.2001).
- Shirazi Fard S, Jarrin M, Boije H, Fillon V, All-Eriksson C, Hallbook F (Heterogenic final cell cycle by chicken retinal Lim1 horizontal progenitor cells leads to heteroploid cells with a remaining replicated genome. *PLoS One* 8:e59133.2013).
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. (Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154:180-191.1995).
- Sidman RL (Organ-culture analysis of inherited retinal degeneration in rodents. *Natl Cancer Inst Monogr* 11:227-246.1963).
- Siegert S, Cabuy E, Scherf BG, Kohler H, Panda S, Le YZ, Fehling HJ, Gaidatzis D, Stadler MB, Roska B (Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nat Neurosci* 15:487-495, S481-482.2012).
- Singer T, McConnell MJ, Marchetto MC, Coufal NG, Gage FH (LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci* 33:345-354.2010).
- Sinn R, Wittbrodt J (An eye on eye development. *Mech Dev* 130:347-358.2013).
- Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R (Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett* 232:48-57.2006).
- Sobol RW (Genome instability caused by a germline mutation in the human DNA repair gene POLB. *PLoS Genet* 8:e1003086.2012).

- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A (Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491:109-113.2012).
- Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S (Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep* 8:1271-1279.2014).
- Starr DA (A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *J Cell Sci* 122:577-586.2009).
- Strasser A (The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:189-200.2005).
- Symington LS, Gautier J (Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45:247-271.2011).

T

- Tao C, Zhang X (Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Dev Dyn* 243:1501-1510.2014).
- Taylor AR, Prevette D, Urioste AS, Oppenheim RW, Milligan CE (Cell cycle events distinguish sensory neuronal death from motoneuron death as a result of trophic factor deprivation. *Mol Cell Neurosci* 24:323-339.2003).
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG (Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:1075-1085.1997).
- Thomas CA, Paquola AC, Muotri AR (LINE-1 retrotransposition in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:555-573.2012).
- Tsai CL, Drejer AH, Schatz DG (Evidence of a critical architectural function for the RAG proteins in end processing, protection, and joining in V(D)J recombination. *Genes Dev* 16:1934-1949.2002).
- Turinetto V, Giachino C (Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 43:2489-2498.2015).

U

- Unterholzner L (The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology* 218:1312-1321.2013).
- Upton KR, Baillie JK, Faulkner GJ (Is somatic retrotransposition a parasitic or symbiotic phenomenon? *Mob Genet Elements* 1:279-282.2011).

V

- Valenciano AI, Boya P, de la Rosa EJ (Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol* 53:1515-1528.2009).
- Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ (Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J Neurochem* 99:524-536.2006).

- van den Hurk JA, Meij IC, Seleme MC, Kano H, Nikopoulos K, Hoefsloot LH, Sistermans EA, de Wijs IJ, Mukhopadhyay A, Plomp AS, de Jong PT, Kazazian HH, Cremers FP (L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol Genet* 16:1587-1592.2007).
- van der Burg M, Ijspeert H, Verkaik NS, Turul T, Wiegant WW, Morotomi-Yano K, Mari PO, Tezcan I, Chen DJ, Zdzienicka MZ, van Dongen JJ, van Gent DC (A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest* 119:91-98.2009).
- Varela-Nieto I, de la Rosa EJ, Valenciano AI, Leon Y (Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol Neurobiol* 28:23-50.2003).
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.2001).

- Volterra A, Meldolesi J (Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.2005).
- Voyvodic JT, Burne JF, Raff MC (Quantification of normal cell death in the rat retina: implications for clone composition in cell lineage analysis. *Eur J Neurosci* 7:2469-2478.1995).

W

- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138-8143.2008).
- Wallace VA, Raff MC (A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* 126:2901-2909.1999).
- Wang Y, Ghosh G, Hendrickson EA (Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12430-12435.2009).
- Wang YP, Dakubo G, Howley P, Campsall KD, Mazarolle CJ, Shiga SA, Lewis PM, McMahon AP, Wallace VA (Development of normal retinal organization depends on Sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat Neurosci* 5:831-832.2002).
- Watanabe M, Rutishauser U, Silver J (Formation of the retinal ganglion cell and optic fiber layers. *J Neurobiol* 22:85-96.1991).
- Watanabe T, Raff MC (Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332:834-837.1988).
- Weissman L, Jo DG, Sorensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, Bohr VA (Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res* 35:5545-5555.2007).
- Westra JW, Rivera RR, Bushman DM, Yung YC, Peterson SE, Barral S, Chun J (Neuronal DNA content variation (DCV) with regional and individual differences in the human brain. *J Comp Neurol* 518:3981-4000.2010).
- Willis DM, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, Shao JS, Ornitz DM, Towler DA (Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem* 277:37280-37291.2002).
- Wong RH, Chang I, Hudak CS, Hyun S, Kwan HY, Sul HS (A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* 136:1056-1072.2009).
- Woodbine L, Gennery AR, Jeggo PA (The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* 16:84-96.2014).
- Woodbine L, Neal JA, Sasi NK, Shimada M, Deem K, Coleman H, Dobyns WB, Ogi T, Meek K, Davies EG, Jeggo PA (PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest* 123:2969-2980.2013).

X

- Xing B, Bachstetter AD, Van Eldik LJ (Microglial p38alpha MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNFalpha. *Mol Neurodegener* 6:84.2011).

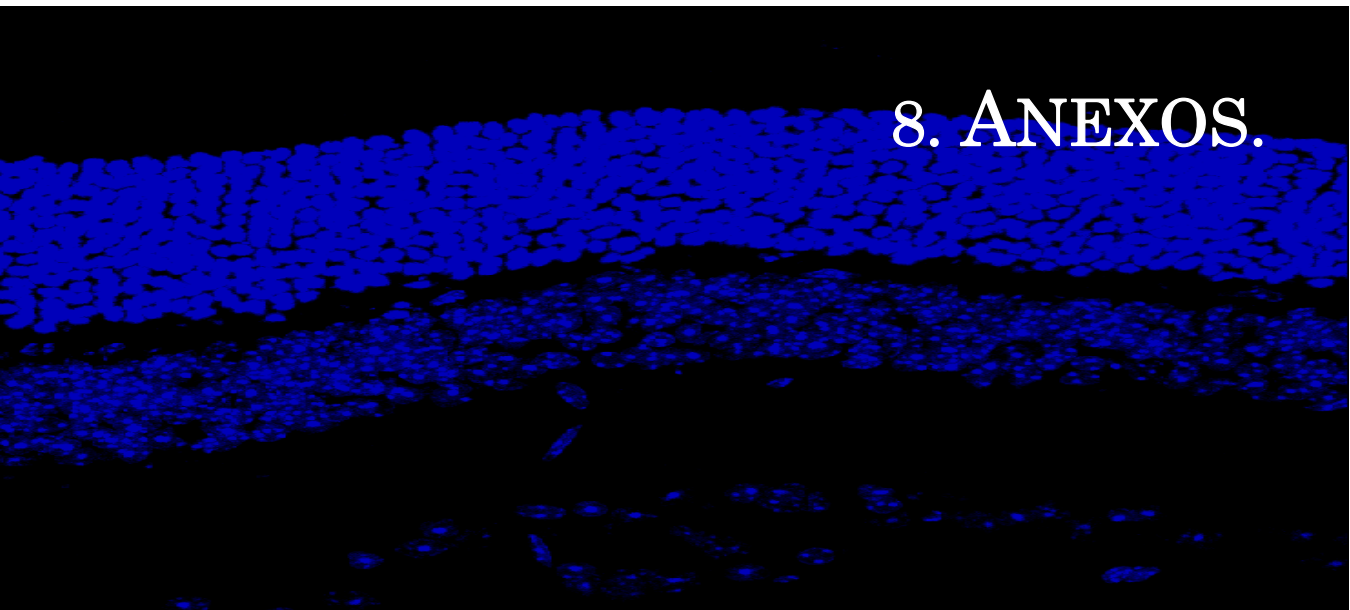
Y

- Yamada T, Yamanaka I (Microglial localization of alpha-interferon receptor in human brain tissues. *Neurosci Lett* 189:73-76.1995).
- Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ (ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24:1571-1580.2003).
- Yant SR, Kay MA (Nonhomologous-end-joining factors regulate DNA repair fidelity during Sleeping Beauty element transposition in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23:8505-8518.2003).
- Yeo W, Gautier J (Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol* 274:233-244.2004).
- Young RW (Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212:199-205.1985).
- Yuan J, Yankner BA (Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.2000).
- Yucel Y, Gupta N (Glaucoma of the brain: a disease model for the study of transsynaptic neural degeneration. *Prog Brain Res* 173:465-478.2008).

Z

- Zha S, Alt FW, Cheng HL, Brush JW, Li G (Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4518-4523.2007).
- Zhang X, Serb JM, Greenlee MH (Mouse retinal development: a dark horse model for systems biology research. *Bioinform Biol Insights* 5:99-113.2011).
- Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A (Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11:105-109.2001).

8. ANEXOS.



1- MICROGLIA-MEDIATED IGF-I NEUROPROTECTION IN THE *rd10* MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA.Microglia-Mediated IGF-I Neuroprotection in the *rd10* Mouse Model of Retinitis PigmentosaAna I. Arroba,¹ Noemí Álvarez-Lindo,¹ Nico van Rooijen,² and Enrique J. de la Rosa¹

PURPOSE. To characterize the effect of IGF-I in the *rd10* mouse model of retinitis pigmentosa at the cellular level, focusing on the role of microglia in the neurodegenerative process.

METHODS. Both organotypic retinal explants and intravitreal injections were used to assess the effect of IGF-I on photoreceptor cell death in the *Pde6b^{rd10}* mice. Cell death was determined by TUNEL in retinal sections and by ELISA of free nucleosomes in retinal extracts. The number and distribution of microglial cells was visualized by immunolabeling with Cd11b and Iba1 antibodies. Depletion of microglia in culture was achieved by treatment with liposomes containing clodronate.

RESULTS. Both ex vivo and in vivo IGF-I treatment reduced the number of TUNEL-positive nuclei in *rd10* mouse retinas. In addition, IGF-I treatment in explants increased the number of microglial cells in the ONL. Depletion of microglia in explants with liposomes containing clodronate diminished the neuroprotective effect of IGF-I but also moderately reduced photoreceptor cell death in *rd10* retinas cultured in the absence of IGF-I.

CONCLUSIONS. IGF-I is able to attenuate photoreceptor cell death both ex vivo and in vivo in the *rd10* mouse retina. Microglia is required for the neuroprotective effect of IGF-I in the dystrophic retina. In addition, microglial cells play a detrimental role, seemingly led to neuroprotection by IGF-I. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:9124–9130) DOI:10.1167/iovs.11-7736

Retinitis pigmentosa (RP) comprises a large group of inherited retinal dystrophies that are clinically similar but genetically heterogeneous (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/disease.htm>). RP evolves with a loss of visual function that, in most models studied, parallels photoreceptor cell death.^{1–3} Consequently, moderate success in attenuating vision loss in animal models of RP has been achieved using molecules that promote

cell survival, some of which have progressed to the clinical development stage^{4,5} (clinicaltrials.gov/ct2/results?term=retinitis+pigmentosa).

Proinsulin, insulin, and insulin-like growth factors (IGFs) are well characterized attenuators of cell death in the developing and adult nervous system.^{6–9} Proinsulin delays photoreceptors death and prolongs visual function in the *rd10* mouse model of RP,¹⁰ whereas insulin extends cone survival in the *rd1* mouse.¹¹ Recently, we demonstrated that IGF-I also attenuates photoreceptor apoptosis ex vivo in both genetic and experimentally induced RP models.¹² To fully explore the therapeutic potential of growth factors of this family in RP, it is crucial to understand the molecular and cellular mechanisms underlying these observed effects.

Among other effects, IGF-I promotes the proliferation of macrophages and microglial cells.¹³ Microglia constitute a particular macrophage/monocyte lineage in the central nervous system (CNS) and thus perform the usual immune surveillance function.^{14–17} As in other parts of the CNS, microglial cells in the retina continuously monitor the environment and respond to alterations with morphologic, migratory, and proliferative adaptations that include the autocrine/paracrine secretion of growth factors and proinflammatory cytokines.^{18,19} Extensive studies in the injured brain have revealed that exacerbation of damage is a common consequence of the microglial response. However, a graded response ranging from the induction of neuroprotection to the exacerbation of injury has also been described, depending on multiple factors, such as the nature and severity of the damage and the local environmental features.^{20,21} Studies in the retina have linked microglial activation to increased neuronal injury in experimental models of RP, glaucoma, light-induced photoreceptor degeneration, diabetic retinopathy, and age-related macular degeneration.^{22–29} Further studies are required to determine whether microglia play a beneficial role in retinal dystrophies and, more important, to identify strategies to prevent their detrimental effects.

The *rd1* mouse is the most commonly studied mouse model of RP, though it is not without disadvantages. The onset of RP in this model occurs early, and disease progression is aggressive. Consequently, electroretinographic recordings of visual function are of very low intensity, even when partial rescue is reported. Of particular relevance to studies of cell death regulation, a partial overlap is observed between developmental cell death in the inner nuclear layer (INL) and pathologic cell death in the outer nuclear layer (ONL).^{2,30} To circumvent these problems, we performed our studies in the *rd10* mouse, which carries a missense mutation in the *Pde6b* gene (as opposed to the nonsense mutation in the same gene of the *rd1* mouse), resulting in a less aggressive phenotype,^{31–33} and used this model to further characterize the effects of IGF-I on retinal dystrophies. IGF-I induced a decrease in photoreceptor apoptosis in retinal explants, in parallel to an increase in microglial cell number. The IGF-I neuroprotective effect was corroborated by intravitreal injection. Microglia depletion with clodronate-encapsulated liposomes reduced the neuroprotective ef-

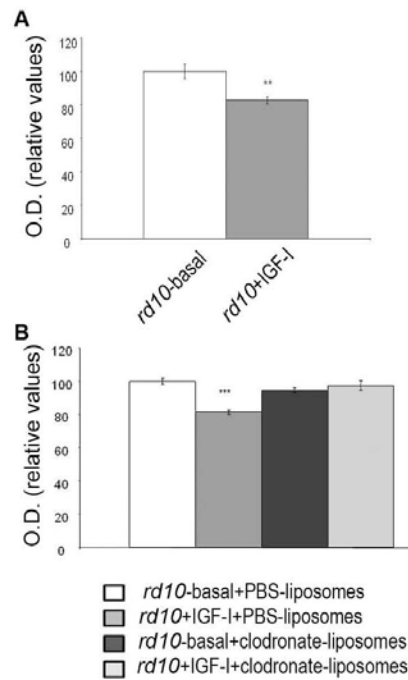
From the ¹3D Lab (Development, Differentiation and Degeneration), Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; and the ²Department of Molecular Cell Biology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

Supported by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Grants SAF2007-66175, SAF2010-21879, and PET2008-0065 (EJdR) and Fundación Médica Mutua Madrileña (EJdR). AIA was supported by a postdoctoral contract from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias.

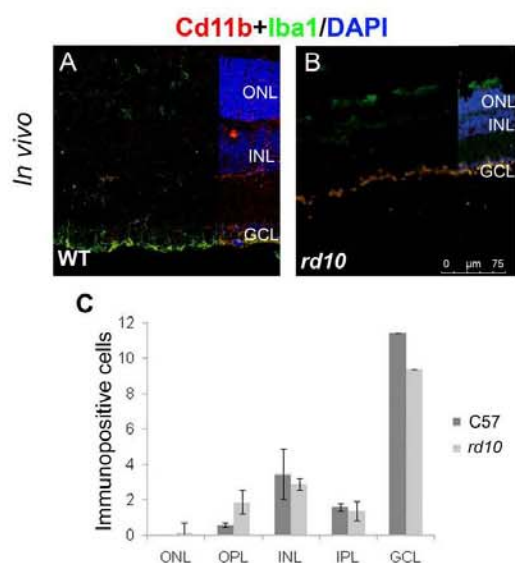
Submitted for publication April 14, 2011; revised August 9 and October 18, 2011; accepted October 22, 2011.

Disclosure: A.I. Arroba, ProRetina Therapeutics, S.L. (F); N. Álvarez-Lindo, ProRetina Therapeutics, S.L. (F); N. van Rooijen, None; E.J. de la Rosa, ProRetina Therapeutics, S.L. (F)

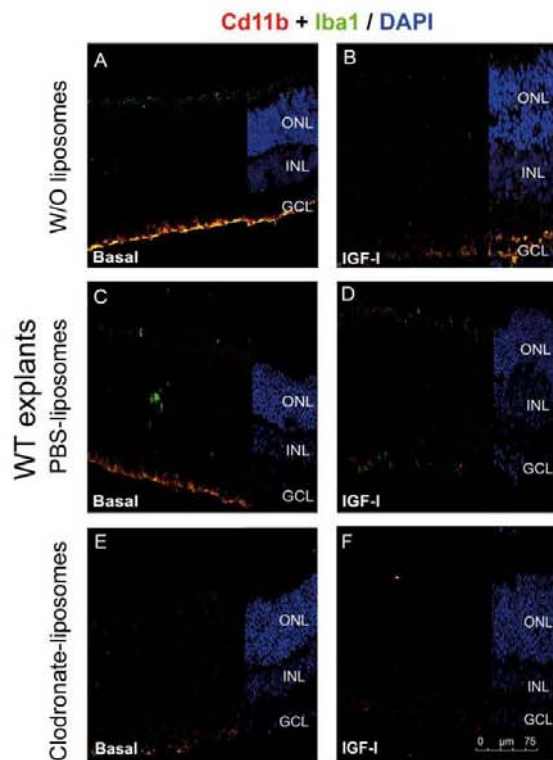
Corresponding author: Enrique J. de la Rosa, 3D Lab and the Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu 9, Madrid, Spain E-28040; ejdelarosa@cib.csic.es.



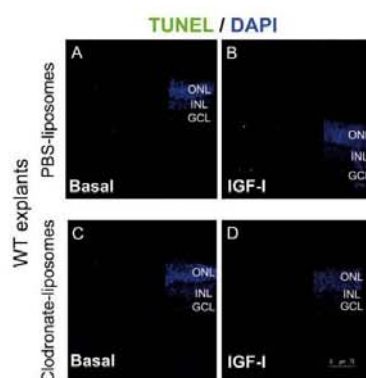
Supplementary Figure 1.- Quantification of cell death by ELISA of free nucleosomes in *rd10* mouse retinal extracts. P23 retinal explants from *rd10* mice were cultured for 24h in basal medium or in the presence of IGF-I (20 nM) (A), in conjunction with control PBS-encapsulated liposomes or clodronate-encapsulated liposomes (B). Total retinal extracts were then prepared and cell death quantified by ELISA. Data represent the mean \pm SEM of normalized OD measurements in duplicate samples from 3 independently cultured retinas in 3 independent experiments. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$.



Supplementary Figure 2.- Quantification of microglial cells in the *rd10* mouse retina. P24 retinas from wild type (WT) or *rd10* mice were processed for cryosectioning (A and B). Retinal sections were immunostained with Cd11b (red) and with Iba1 (green) to visualize microglial cells, and counterstained with DAPI (blue). C) Cd11b-positive and Iba1-positive microglial cells were counted in every retinal layer of an entire equatorial section, as shown in A and B. Average total numbers of microglial cells per section and retinal layer (\pm SEM) are shown. Retinal layers are labeled as ONL (outer nuclear layer), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer), IPL (inner plexiform layer) and GCL (ganglion cell layer). At least 3 retinas and 4 non-adjacent sections per retina were scored for each experimental point. Scale bar = 75 μ m in A and B.



Supplementary Figure 3.- IGF-I elicits no microglial response in wild type mouse retinal explants. P23 retinal explants from wild type mice were cultured for 24h in basal medium (A, C, E) or in the presence of IGF-I (20 nM; B, D, F), in conjunction with control PBS-encapsulated liposomes (C and D) or clodronate-encapsulated liposomes (E and F), and subsequently processed for cryosectioning. Retinal sections were immunostained with Cd11b (red) and with Iba1 (green) to visualize microglial cells, and counterstained with DAPI (blue). Retinal layers are labeled as ONL (outer nuclear layer), INL (inner nuclear layer) and GCL (ganglion cell layer). Scale bar = 75 μm in A-F.



Supplementary Figure 4.- Clodronate-liposomes elicit no effect on photoreceptor apoptosis in wild type mouse retinal explants. P23 retinal explants from wild type mice were cultured for 24h in basal medium (A and C) or in the presence of IGF-I (20 nM; B and D), in conjunction with control PBS-encapsulated liposomes (A and B) or clodronate-encapsulated liposomes (C and D). Explants were subsequently processed for cryosectioning. Cell death was visualized by TUNEL (green; A-D) and the structure of the retina counterstained with DAPI (blue; A-D). Retinal layers are labeled as ONL (outer nuclear layer), INL (inner nuclear layer) and GCL (ganglion cell layer). Scale bar = 75 μ m in A-D.

2- MICROGLIA-MÜLLER GLIA CROSSTALK IN THE *rd10* MOUSE MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA.

Microglia-Müller Glia Crosstalk in the *rd10* Mouse Model of Retinitis Pigmentosa

Ana I. Arroba, Noemí Álvarez-Lindo, Nico van Rooijen
and Enrique J. de la Rosa

Abstract Retinitis pigmentosa refers to a large, genetically heterogeneous group of retinal dystrophies. This condition is characterized by the gradual onset of blindness due to progressive deterioration of the retina, a process that includes photoreceptor and retinal-pigmented-epithelium cell decay and death, microglial recruitment, reactive gliosis, and vascular disorganization and regression. We found that early in the degenerative process, the *rd10* mouse retina exhibits high levels of photoreceptor cell death and reactive Müller gliosis. In explant cultures, both degenerative processes were abrogated by IGF-I treatment. Moreover, the beneficial effect of IGF-I was diminished by microglial depletion using clodronate-containing liposomes. Interestingly, in the absence of IGF-I, microglial depletion partially prevented cell death without affecting Müller gliosis. These findings strongly suggest a role for microglia-Müller glia crosstalk in neuroprotection. However, a subpopulation of microglial cells appears to promote neurodegeneration in the dystrophic retina. Our findings indicate that beneficial neuroprotective effects may be achieved through strategies that modulate microglial cell responses.

Keywords Retinal dystrophy · Retinal degeneration · Neuroprotection · Clodronate · IGF-I

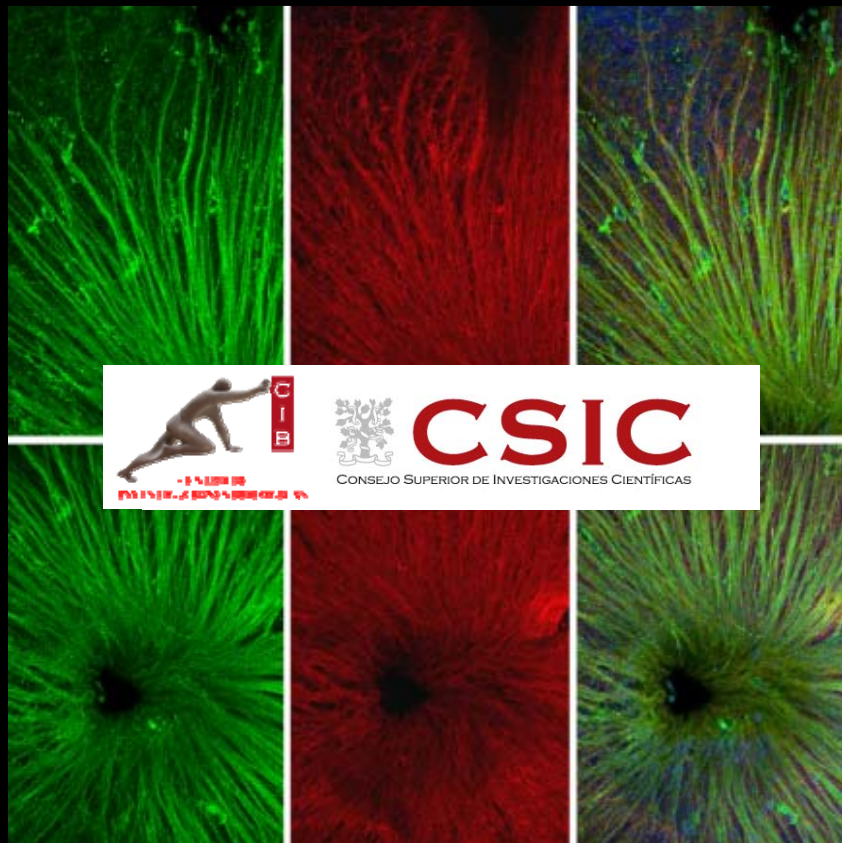
E. J. de la Rosa (✉) · A. I. Arroba · N. Álvarez-Lindo
3D Lab (Development, Differentiation and Degeneration), Department of Cellular and Molecular
Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, C/ Ramiro de Maeztu 9, E-28040
Madrid, Spain
e-mail: ejdelarosa@cib.csic.es

A. I. Arroba
email: anaarroba@gmail.com

N. Álvarez-Lindo
e-mail: alvarezlnl@cib.csic.es

N. van Rooijen
Department of Molecular Cell Biology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, VUMC,
Amsterdam, The Netherlands
e-mail: nvanrooijen@clodronateliposomes.org

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. CIB-CSIC.



FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS

