



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Patrones de Expresión de mRNAs Relacionados con la  
División Celular Asimétrica Durante el Crecimiento y la  
Diferenciación de Células RCE1 (5T5)”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

***GÓMEZ FLORES CARLOS EBER***

Director de tesis: Dr. Federico Castro Muñoz-Ledo

México 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizo en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. Federico Castro Muñoz-Ledo y fue financiado en parte a través del donativo 54294 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A mis padres, a  
Mara, Cata e Isaí.

A Tzasna y Elías

A la vida y a la ciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me brindaron a lo largo del tiempo, permitiéndome así crecer como persona y como profesionalista.

A Tzasna y Elías por iniciarme en el camino de la investigación y acompañarme durante todo este tiempo. A Gaby, por regalarme tantos buenos momentos durante nuestra época de universitarios y hacer que esos días sean inolvidables. A Tere, una gran amiga y colega con quien mi aventura por el mundo científico comenzó.

Mi gratitud al Dr. Federico Castro Muñoz-Ledo sólo puede expresarse con pobreza en unas líneas de texto. Como director de tesis me enseñó valiosas lecciones que, si todo sale bien repetiré dos veces más. Gracias por su paciencia, calidez y confianza.

Agradezco el gran apoyo técnico de Erika Sánchez Guzmán y a Columba Guadarrama Olmos durante la parte experimental de este trabajo.

Gracias a la M. en C. Martha Salcedo, a la M. en C. Irma Dueñas y a la M. en C. por las valiosas observaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Gracias a mis profesores, compañeros, amigos y lectores imaginarios.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.	I
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
EL EPITELIO CORNEAL COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR .	4
DIVISIÓN CELULAR ASIMÉTRICA.	8
ANTECEDENTES	11
INSCUTEABLE Y PINS	12
NUMA	13
PAR3	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
MATERIALES	18
MÉTODOS	18
Cultivo Celular	18
Extracción de RNA Total	19
RT-PCR semicuantitativo.	21
Clonación de los Productos de PCR.	22
Búsqueda de Secuencias Homólogas a Nuclear Mitotic Aparatus Protein (NuMA1) y G-protein Signaling Modulator 2 (GPMS2).	24
Elaboración, Edición y Evaluación de Alineamientos Múltiples.	24
Análisis Filogenético.	24
Inmunotinción de Queratinocitos de Epitelio Corneal	25
RESULTADOS	27
DETECCIÓN POR PCR DE LA EXPRESIÓN DE MENSAJEROS RELACIONADOS CON DIVISIÓN CELULAR ASIMÉTRICA.	27
CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NUMA, LGN E INSC, DURANTE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS RCE1 (5T5).	34
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A NUMA1 (NUCLEAR MITOTIC APARATUS PROTEIN ) Y GPMS2 (G- PROTEIN SIGNALING MODULATOR 2).	43
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	52
REFERENCIAS.	59

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

1. SECUENCIA DE OLIGOS PARA RT-PCR	21
2. ANTICUERPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LAS INMUNOTINCIONES	26
3. PORCENTAJE DE IDENTIDAD ENTRE LAS 411 BASES DE LA SECUENCIA DE NUMA DE CONEJO CON OTRAS ESPECIES	47
4. PORCENTAJE DE IDENTIDAD ENTRE LAS 415 BASES DE LA SECUENCIA DE LGN(GPSM2) DE CONEJO CON OTRAS ESPECIES	47

### FIGURAS

1. CAPAS DE LA CORNEA	5
2. MECANISMO GENERAL PARA LA DIVISIÓN CELULAR ASIMÉTRICA EN UNA CÉLULA EPITELIAL	10
3. RNA TOTAL EXTRAÍDO DE CULTIVOS DE CÉLULAS RCE1 DE DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO	19
4. EXPRESIÓN DE LOS MENSAJEROS DE INSC, LGN Y NUMA	29
5. PCR EN GRADIENTE DE CICLOS	31
6. ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES CON SECUENCIAS DE NUMA Y LGN	33
7. CAMBIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MRNAS RELACIONADOS CON LA DCA A TRAVÉS DEL TIEMPO	36
8. LOCALIZACIÓN DE NUMA DURANTE DIFERENTES ETAPAS DE LA MITOSIS Y EN EL NÚCLEO INTERFÁSICO	38

9. LOCALIZACIÓN DE NUMA EN CÉLULAS RCE1 (5T5) A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO 38
10. LOCALIZACIÓN DE PAR3 EN CÉLULAS RCE1 (5T5) A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO 40
11. CO-LOCALIZACIÓN DE PAR3 Y DE LA QUERATINA K3 EN EPITELIOS OBTENIDOS POR CULTIVO DE CÉLULAS RCE1 A 9 DÍAS 42
12. LOCALIZACIÓN DE PAR3 EN CÉLULAS RCE1 (5T5) 42
13. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PARCIAL DE NUMA Y LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GENE 45
14. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PARCIAL DE LGN (GPSM2) Y LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GENE 46
15. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE NUMA Y REPRESENTACIÓN DE LOS SITIOS ACTIVOS DE LA PROTEÍNA 48
16. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE LGN (GPSM2) Y REPRESENTACIÓN DE LOS SITIOS ACTIVOS DE LA PROTEÍNA 49
17. ÁRBOL FILOGENÉTICO ENRAIZADO CON LA SECUENCIA PARA NUMA DE DARIO RENIO 50
18. Árbol filogenético enraizado con la secuencia para LGN de Dario renio 51

## **ABREVIATURAS**

### **Proteínas y genes.**

Insc	Inscuteable.
K3	Citoqueratina 3
K16	Citoqueratina 16
LDH	Deshidrogenasa Lactica
LGN (GPSM2)	G Protein Signaling Modulator 2
NuMA	Nuclear Mitotic Aparatus.
Par3	Partioning Defective 3
Pins	Partner of Inscuteable.
TPR	Repetidos de Tetracopectidos
GoLoco	Motivos Gα/o-LoCo

### **Cultivo celular.**

RCE1 (5T5)	Rabbit Corneal Epithelial 1, línea celular
3T3	Línea celular de fibroblastos de ratón.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbeco-Vögt.

### **Otras.**

DCA	División Celular Asimétrica
CMG	Célula Madre Ganglionar
SNC	Sistema Nervioso Central
PBS	Buffer Salino de Fosfato

PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
DNA	Acido Desoxirribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
cDNA	Acido Desoxirribonucleico complementario
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
QTY	Cantidad Relativa de producto de PCR
p/v	Peso sobre volumen
v/v	Volumen sobre volumen

## RESUMEN.

La División celular asimétrica es un tipo de mitosis diferencial, por el cual las células alcanzan la expresión de diferentes programas de diferenciación, generando así la diversidad celular ya que se generan dos células hijas diferentes a partir de una célula progenitora. Existen pocos modelos experimentales en los que puedan analizarse los factores que regulan y determinan la división asimétrica. En este trabajo examinamos la posibilidad de utilizar la línea celular RCE1(5T5) como modelo experimental, ya que *in vitro*, esta población celular sufre de manera secuencial las etapas del proceso de diferenciación de los queratinocitos corneales de mamífero. Para ello, analizamos la expresión de genes que codifican para proteínas que forman parte de la maquinaria que participa en la orientación del huso mitótico y en la ejecución correcta de esta mitosis diferencial. De manera específica estudiamos por RT-PCR semicuantitativo la expresión de los mensajeros de LGN (GPSM2), NuMA e Insc durante la proliferación y diferenciación de células RCE1 (5T5). Los productos de la reacción de PCR se clonaron y secuenciaron para confirmar la identidad de las secuencias. Estos resultados fueron apoyados por inmunotinciones con anticuerpos dirigidos contra NuMA y PAR-3. En conjunto, los resultados sugieren que durante el crecimiento y la diferenciación de las células del epitelio corneal, la división celular asimétrica ocurre constantemente, aunque pudieran ser más frecuentes durante el proceso de estratificación.

## INTRODUCCIÓN.

Las células troncales son, por definición, células caracterizadas por su capacidad para regenerar diferentes tejidos a lo largo de la vida de un individuo (Ulloa-Montoya et al., 2005). Aparentemente se localizan con mayor frecuencia en aquéllos tejidos sometidos a procesos de renovación continua; no obstante, evidencia reciente sugiere que las células troncales se encuentran en todos los tejidos y más aún, existen como elementos sistémicos cuya localización cambia dependiendo de señales específicas que las dirigen a sitios donde se requiere reparar un daño (Alison & Islam, 2009). Las células troncales (stem cells) se caracterizan por ser una población relativamente indiferenciada que transita con una frecuencia muy baja a través del ciclo celular; paradójicamente, las células troncales se distinguen por poseer un potencial proliferativo alto (Miller et al., 1993). Estas características les permiten participar en el mantenimiento del equilibrio entre la producción y pérdida de células en los tejidos donde se encuentran (Lajtha, 1979).

Una de las características distintivas de las células troncales es su capacidad de autorenovación (Ulloa-Montoya et al., 2005). Al mismo tiempo, estas células tienen el potencial para dar origen a células con la capacidad de iniciar procesos de diferenciación. Para asegurar esta propiedad, las células troncales sufren dos tipos de división celular: la división simétrica que permite la formación de dos células hijas con propiedades idénticas a la célula troncal o dos células

programadas a la diferenciación terminal (Knoblich, 2008); y la división asimétrica, que produce una sola célula troncal y una célula progenitora con potencial proliferativo y de auto-renovación limitados (Potten and Loeffler, 1990; Knoblich, 2001; Potten, 1997.). Subsecuentemente, las células progenitoras pueden atravesar varios ciclos celulares antes de expresar la diferenciación terminal.

Por otra parte las células troncales pueden ser inducidas a proliferar por estímulos específicos o por la pérdida de tejido. Por lo tanto, son las responsables de la renovación y la regeneración. Las células troncales no sólo son importantes para mantener la homeostasis y regeneración del tejido, sino también parecen tener un papel central en el proceso de carcinogénesis, ya que sus poblaciones son las únicas que permanecen tiempos prolongados en el organismo, suficientes para que mutaciones en genes críticos se acumulen (Alison & Islam, 2009). Del mismo modo, estas poblaciones son clave para ingeniería de tejidos y terapia génica ya que su manipulación puede resultar en cambios funcionales permanentes que pueden aprovecharse una vez que las células modificadas son trasplantadas o empleadas para algún otro tipo de terapia (Greenhalgh et al., 1994)

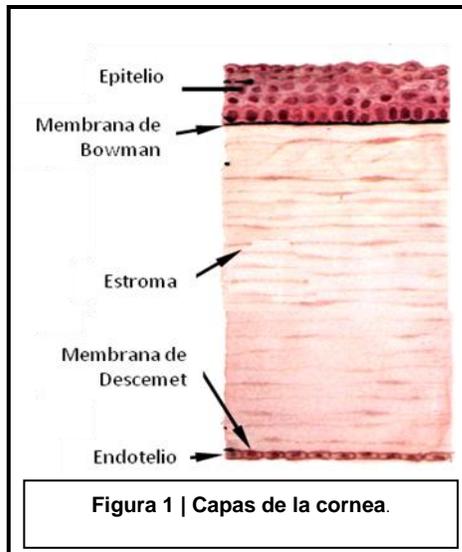
Las células troncales se han estudiado utilizando diversos sistemas experimentales, por ejemplo: las células embrionarias (Martin et al., 1981; Evans Et al., 1981; Thompson et al., 1998), los teratocarcinomas (Miller et al., 1993), o bien tejidos de mamífero adulto que *in vivo* sufren renovación continua como el sistema hematopoyético y los diferentes tipos de epitelio. Para entender las

propiedades biológicas de las células troncales uno de los epitelios más frecuentemente utilizados como modelo es la epidermis. En este tejido, algunas subpoblaciones de queratinocitos localizadas en el estrato basal reúnen las características para considerarlas como células troncales presuntivas, ya que poseen un alto potencial proliferativo, transitan con baja frecuencia a través del ciclo celular, y no muestran una especialización citológica ni bioquímica (Lavker y Sun, 1982).

Las evidencias acumuladas sugieren que estas células, al dividirse, dan origen al resto de las células basales de la epidermis, que a su vez constituyen la población en amplificación transitoria. Finalmente, la progenie de las células en amplificación transitoria expresa la diferenciación terminal y pasa hacia las capas más superficiales de la epidermis para posteriormente desprenderse durante la descamación (Fuchs, 1998). Durante este movimiento hacia la superficie, los queratinocitos sintetizan moléculas especializadas como las queratinas (Sun y Green, 1978; Coulombe et al., 1989), la involucrina (Watt, 1983) o la transglutaminasa (Kubilus y Baden, 1982).

### **El epitelio corneal como modelo para el estudio de la diferenciación celular .**

La córnea es la estructura hemisférica transparente localizada al frente del órgano ocular, y que permite el paso de luz hacia las porciones interiores, además de que protege al iris y al cristalino. Se trata de la estructura dióptrica más



importante del ojo, ya que representa cerca de  $2/3$  de la capacidad de enfoque del ojo. Es un órgano convexo-cóncavo con una capacidad de refracción de aproximadamente 48 dioptrías en la cara anterior y 4 a 5 dioptrías en la posterior; esto hace que in toto, la córnea tenga un potencial de refracción de aproximadamente 44 dioptrías.

Desde el punto de vista histológico, la córnea está formada por cinco capas que desde el exterior hacia el interior son: i) el epitelio corneal; ii) la membrana de Bowman, constituida por matriz extracelular y observada sólo en algunas especies de mamífero, como el humano; iii) el estroma, iv) la capa de Descemet y v) el endotelio de Descemet (Fig. 1). El epitelio corneal es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado que se renueva aproximadamente cada siete días (Hanna et al., 1961); ocupa el 10% del grosor total de la córnea y está compuesto por 5 o 6 capas de células superpuestas, que de acuerdo con su estado de diferenciación, se clasifican en tres grupos: (1) Una capa de células basales. (2) La capa celular poligonal o alar, que es una zona intermedia de 2-3 células de

grosor. Y finalmente (3) dos capas de células superficiales alargadas y aplanadas (Hanna et al., 1961).

La población celular que participa en la renovación del epitelio corneal, no está distribuida uniformemente a lo largo del estrato basal del epitelio; por el contrario, las evidencias sugieren que las células troncales del epitelio corneal se localizan en la transición anatómica entre la conjuntiva y la córnea, conocida como limbo (Lavker et al., 1991; Schermer et al., 1986).

Estas células al igual que otras poblaciones de células troncales, poseen las siguientes características: (1) Son células que transitan con muy baja frecuencia a través del ciclo celular, atributo crítico de las células troncales, y que metodológicamente puede detectarse a través de la retención de marca (Label Retaining Cells) (Cotsarelis et al., 1989). (2) Son células relativamente “no diferenciadas”. En este caso, las células localizadas en el limbo corneal no expresan la queratina K3, (el producto mayor de diferenciación del epitelio corneal) (Schermer et al., 1986). (3) Las células del limbo poseen una alta capacidad proliferativa, lo que se refleja en el enorme número de generaciones que se obtienen en experimentos de transferencia serial, en contraste con los queratinocitos provenientes de la córnea central (Schermer et al., 1986).

Una observación que apoya fuertemente la localización limbal de las células troncales consiste en el hecho de que la destrucción de las células del limbo tiene

resultados catastróficos en la integridad y capacidad de cicatrización del epitelio corneal (Chen y Tseng, 1990). De manera adicional, el trasplante del limbo puede remplazar con efectividad al epitelio corneal, restaurando en algunos casos la transparencia de la cornea (Tsai et al., 1990).

El análisis del crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales a menudo ha sido obstaculizado por la vida limitada de los cultivos primarios, y por requerir del aislamiento repetido de los tejidos utilizados como fuente de células para el trabajo experimental. Estas dificultades pueden ser eludidas por la creación de líneas celulares que con capacidad de diferenciarse en condiciones de cultivo particulares. (Castro-Muñozledo, 2008)

Existen dos estrategias principales para desarrollar líneas celulares. En primer lugar, las células pueden immortalizarse con oncogenes introducidos por transfección (Howeling et al., 1980), infección viral (Reddel et al., 1988, Scholte et al., 1989), o mediante el uso de vectores retrovirales (Emami et al., 1989; Agarwal y Eckert, 1990). Sin embargo, los resultados pueden ser variables y dependen del tipo celular que se desea immortalizar (Kuppuswamy y Chinnadurai, 1988), pero en la mayoría de los casos la expresión del fenotipo terminal está alterada o ausente (Hronis et al., 1984; Rosen et al., 1988; Scholte et al., 1989; Agarwal et al., 1991). Alternativamente, se puede generar líneas celulares a través de experimentos de transferencia serial como es el caso para las obtenidas a partir de intestino delgado de ratas (Quaroni et al. 1979; Nègrel et al., 1983) o fibroblastos 3T3 (Todaro y Green, 1963). En general, las líneas celulares obtenidas por cultivo

celular extendido, tienden a mostrar mayor similitud con poblaciones celulares de cultivos primarios. (Quaroni et al., 1979; Nègrel et al., 1983). Por lo tanto, una línea celular espontánea tiene ventajas en comparación con las líneas celulares inmortales obtenidas por la manipulación con un oncogén (Castro-Muñozledo, 1994)

En el caso de las células epiteliales de córnea humana y de conejo, el cultivo ha sido exitoso (Sun y Green 1977; Doran et al., 1980; Jumblatt y Neufeld, 1983), por lo cual existe disponibilidad de líneas inmortales de epitelio corneal para la investigación y prueba de fármacos. La línea celular RCE1 (5T5) se obtuvo a partir de células epiteliales de córnea de conejo. Esta línea celular establecida mantiene propiedades del epitelio corneal como son la estratificación y la diferenciación. Por lo tanto, proporciona una herramienta importante para estudiar la regulación del crecimiento y la diferenciación del epitelio corneal (Castro-Muñozledo, 1994; 1997; 2008).

### **División Celular Asimétrica.**

Los animales se desarrollan a partir de un óvulo fertilizado que se transforma en embrión. Este contiene, en su forma madura, todas las estructuras que se observan en el organismo adulto. El desarrollo embrionario puede entenderse como la composición de tres procesos; Morfogénesis, Diferenciación celular y Crecimiento. La primera comprende a los cambios ordenados

relacionados con la adquisición de la forma y construcción de tejidos y órganos; La diferenciación celular se considera como una serie de fenómenos, los cuales determinan qué células con el mismo genotipo originen poblaciones celulares con expresión diferencial en el fenotipo (diversidad celular). Por último, el crecimiento es el incremento en masa y/o volumen del organismo en desarrollo. (Ham y Veomett, 1980; Watt, 1991).

La forma en la que la diversidad celular se genera, es pobremente conocida. Uno de los mecanismos, por el que las células alcanzan la expresión de diferentes programas celulares, es un tipo de mitosis diferencial conocido como División Celular Asimétrica (DCA), que da lugar a dos células hijas diferentes a partir de una única célula progenitora. (Horvitz y Herskowitz, 1992; Betschinger & Knoblich, 2004). La división celular asimétrica depende de dos tipos de mecanismos:

1. *Mecanismos intrínsecos*: Implican la segregación diferencial de factores y moléculas como RNAs o proteínas. Estas moléculas participan en la generación de la asimetría (determinantes) al ayudar en el establecimiento de los programas de expresión genética en una de las células hijas formada a partir de la mitosis asimétrica. (Hawkins & Garriga, 1998)

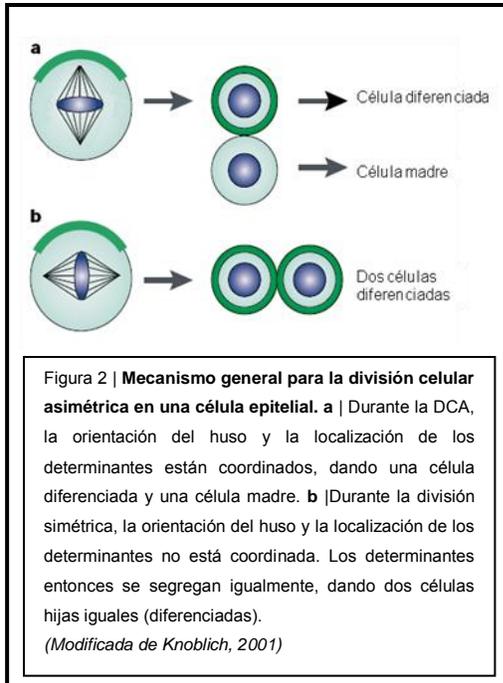
2. *Mecanismos Extrínsecos*: Estos implican la comunicación célula-célula, célula-ambiente. En metazoarios, el contexto social de una célula que se divide provee información sobre la posición de la célula y por tanto determina el establecimiento de interacciones celulares. Estas pueden ser: i) Interacciones entre una célula hija

con otras células cercanas. Este tipo de interacción puede determinar el programa celular de dicha célula hija. ii) Interacción entre células progenitoras y su entorno. Este influye en el establecimiento de la polaridad celular al modular o determinar el posicionamiento del huso y la distribución asimétrica del potencial de desarrollo en las células hijas (Kemphues & Strome 1997; Bowerman 1998).

La combinación de mecanismos intrínsecos y extrínsecos genera asimetría molecular y estructural a lo largo del córtex celular, especificando así, diferentes rutas de diferenciación a partir de la DCA. (Kemphues & Strome 1997; Bowerman 1998).

La interpretación de las señales de polaridad conduce a una reorganización de la célula, incluyendo a la localización asimétrica de componentes celulares como organelos y proteínas, la generación de dominios de membrana definidos, la polarización del citoesqueleto y el ensamble de proteínas transmembranales y citoplásmicas en andamios proteicos en la corteza celular, conllevando a eventos de señalización (Schaefer & Knoblich, 2001).

Tras la citocinesis, los determinantes segregados en una de las células hijas contribuyen al establecimiento de los diferentes programas de diferenciación celular.



Para asegurar la segregación diferencial, la formación del huso mitótico está coordinada con la distribución polar de los determinantes (Fig. 2). Para ello, el eje de polaridad se establece durante la interfase, guiando y coordinando tanto la orientación como la localización asimétrica de los determinantes durante la mitosis (Schaefer & Knoblich, 2001).

## ANTECEDENTES

Para que ocurra un evento de división asimétrica, primeramente debe establecerse un eje de polaridad dentro de la célula troncal. Este eje de polaridad se coordina con el plano apical-basal de la célula. Posteriormente, los determinantes del programa celular se distribuyen asimétricamente a lo largo del eje apico-basal y durante la mitosis, el huso mitótico se orienta a lo largo de este eje, de tal manera que cuando la célula se divide, se forman dos células hijas que contienen diferentes concentraciones de estos determinantes (Fig. 2a) (Knoblich, 2001).

Gran parte del conocimiento sobre la DCA se deriva de experimentos hechos en dos modelos, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nematodo *Ceanorhabditis elegans*. En ambos sistemas se ha identificado un conjunto de proteínas que sirve para establecer la asimetría celular durante la mitosis. Paralelismos interesantes han aparecido entre la maquinaria celular para la DCA en moscas, en gusanos y en el establecimiento de la polaridad en células epiteliales. (Schaefer & Knoblich, 2001).

La mejor comprensión de la DCA se logró en parte a través del estudio del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) de *Drosophila*, ya que muchos genes involucrados son conocidos; además se conoce la localización y las funciones de las proteínas codificadas por éstos (Matsuzaki, 2000). En este modelo las células precursoras neuronales llamadas neuroblastos, se encuentran

en un epitelio polarizado, sufren una transición para salir de la capa epitelial en un proceso llamado delaminación (Knoblich, 2001). Posteriormente los neuroblastos, se comportan como células troncales y atraviesan un número de divisiones asimétricas a lo largo del eje apical- basal, para producir un neuroblasto, y una célula más pequeña, llamada célula madre ganglionar (CMG). La CMG se divide una vez más para originar neuronas diferenciadas o células de la glía (Knoblich, 1997).

### **Inscuteable y Pins**

Durante la DCA de los neuroblastos, proteínas como Inscuteable (Insc) y Pins (Partner of Inscuteable) co-localizan en la parte apical de la corteza para determinar la ruta de diferenciación del neuroblasto, (Kraut et al., 1996; Yu et al., 2000) anclando el polo del huso a la corteza apical y alineando el huso con el eje apical-basal (Knoblich, 2001). El componente central de la maquinaria proteica que estabiliza esta señal es Insc; esta proteína interviene en varios eventos independientes durante la DCA del neuroblasto. Durante la delaminación del neuroblasto, Insc se acumula en un tallo que se extiende en la capa de células epiteliales. (Knoblich, 2001). Este tallo luego se retrae y en los neuroblastos totalmente delaminados, Insc forma una creciente en la parte apical de la corteza celular. Esta se mantiene durante la mayor parte de la primera mitosis hasta que desaparece durante la telofase (Knoblich, 1997).

Pins al igual que Insc se localiza asimétricamente en la corteza apical durante la mitosis de los neuroblastos y juega un papel importante en la

localización de los determinantes basales de la célula. Además es mediador de la orientación correcta del huso durante la división (Kraut et al., 1996; Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000). Pins contiene siete motivos de tetratricopeptido repetidos (TPR) en la región amino-terminal y tres motivos Gai/o-LoCo (GoLoCo) cerca del extremo Carboxilo-terminal. Los TPR están relacionados con las interacciones proteína-proteína; en esta región se establece la interacción con Insc. Los motivos GoLoCo son inhibidores de la disociación del GDP unido a las proteínas-G heterotrimericas. (Du et al., 2001). Sin embargo, cuando las células epiteliales carecen de la expresión de Insc, Pins se asocia con la corteza lateral (Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000). Hasta ahora, se han identificado homólogos de Pins en mamífero, uno de ellos es LGN (GPSM2) (677 residuos de aminoácidos), y que tiene un 46% de identidad con Pins de *Drosophila* (Mochizuki et al 1996).

## **NuMA**

Durante la DCA el huso mitótico tiene que rotar y colocarse en posición perpendicular al plano de división de la célula. El posicionamiento del huso respecto al eje apical-basal depende de un mecanismo de rotación poco conocido, en el que el centrosoma sufre un cambio de posición dirigido por interacciones entre los microtúbulos y el córtex celular (Du et al 2001). Durante este proceso, los microtúbulos son ordenados de tal manera que sus extremos (-) se orientan hacia los centrosomas; en células de mamífero esta organización requiere de una proteína conocida como Aparato Mitótico Nuclear (NuMA) (Gordon, 2001). Se ha sugerido que NuMA forma multimeros que pueden enlazarse con los haces de microtúbulos, y que el motor de dineína impulsa el movimiento de NuMA hacia el

extremo (-) de los microtúbulos, juntándolos hasta formar el polo del huso (Merdes et al 2000). Entonces, NuMA co-localiza con la proteína LGN (GPSM2) que parece ligar los husos a los ejes de polaridad, dando como resultado el armado y organización del huso mitótico (Du et al 2001).

### **Par3**

Una pregunta aun sin responder es el cómo se establece la polaridad de los neuroblastos en concordancia con el eje apical-basal del epitelio neuronal, ya que la polaridad juega un papel crucial en varias funciones celulares, incluyendo la DCA, la migración y el transporte vectorial de moléculas.

Una de las proteínas esenciales para el establecimiento de la polaridad celular se identificó en *Drosophila* y se le denominó Bazooka. Esta contiene tres regiones conocidas como dominios PDZ, que están implicados en interacciones proteína-proteína y uniones celulares. Bazooka se localiza en la corteza apical de las células epiteliales y de los neuroblastos mitóticos. (Kuchinke, 1998; Knoblich 2001). El gen homólogo de Bazooka se encontró en vertebrados y se llamó Par3 (Partitioning defective 3). Esta proteína se localiza en las uniones estrechas de células epiteliales, y como sus contrapartes en invertebrados, también está involucrada en el establecimiento de la polaridad epitelial.

Par3 forma un complejo macromolecular con una proteína denominada Par6 y con la proteína cinasa atípica- $\zeta$  (aPKC $\zeta$ ). La formación de este complejo proteico Par3/Par6/aPKC $\zeta$  (complejo PAR) que también se encuentra en las

uniones estrechas de las células epiteliales de mamífero (Joberty et al 2000; Brazil y Hemmings 2000), es esencial para la polarización de la célula (Ohno, 2001). Para que ello ocurra, se requiere que el complejo Par3/Par6/aPKC $\zeta$  se mantenga en la parte apical del neuroblasto (Schaefer & Knoblich 2001). Este proceso necesita que el complejo PAR se acople a la región central de la proteína Insc a través de la unión directa con Par-3 (Motoyuki et al 2002). Finalmente, una vez que el complejo PAR se ha unido a Insc, se establecen las condiciones para que ocurra la relocalización del huso mitótico, proceso en el que Insc tiene una función primordial (Kohjima et al 2002).

En general, las proteínas PAR dirigen la polaridad celular y la DCA; durante ésta última, las proteínas PAR interactúan con la maquinaria de orientación del huso mitótico y con los determinantes del programa de diferenciación celular. La naturaleza molecular de estas interacciones aun no es clara, sin embargo muchos componentes funcionales del complejo proteico PAR podrían funcionar potencialmente como moléculas de señalización (Schaefer & Knoblich, 2001).

## **HIPÓTESIS**

La evidencia acumulada sugiere que la división celular asimétrica es prácticamente ubicua para todos los tejidos con capacidad de autorenovación y/o reparación. Sin embargo, existen pocos modelos experimentales en los que puedan analizarse los factores que regulan y determinan la polarización además de la división asimétrica; siendo este tipo de división, uno de los mecanismos propuestos para generar la diversidad celular. En este trabajo examinamos la posibilidad de utilizar al epitelio corneal de mamífero como un modelo que facilite este tipo de análisis, planteando como hipótesis general la posibilidad de que el proceso de división celular asimétrica se presente con alta frecuencia durante la etapa de diferenciación del epitelio corneal en cultivo. Bajo estas condiciones, se supuso poco factible observar la división celular asimétrica en la etapas iniciales del cultivo, cuando las células se encuentran en la fase de crecimiento exponencial.

## **OBJETIVOS**

- **Objetivo General.**

Evaluar la expresión y distribución de proteínas que participan en la división celular asimétrica.

- **Objetivos particulares.**

1. Establecer por técnicas de PCR la expresión de los genes que codifican para las proteínas Insc, LGN y NuMA, en células RCE1 durante la proliferación y la diferenciación.
2. Clonar y secuenciar los productos de PCR obtenidos para confirmar la identidad de las secuencias.

3. Determinar la distribución de las proteínas de DAC en cultivo de células RCE1 mediante inmunotinciones.
4. Realizar un análisis de microscopia confocal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

La Agarosa, el X-GAL(5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), la ampicilina, el agua destilada ultra pura libre de DNAsas y RNAsas se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies Inc., (Gaithersburg, MD). El suero fetal de bovino se adquirió a HyClone Laboratories (Thermo Fisher Scientific, Logan, UT). El SDS (Dodecil sulfato de sodio), Tris (hidroximetil aminometano) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). El Extracto de levadura, el agar-agar y la Bactotripton, se obtuvieron de DIFCO Laboratories (Lawrence, KS). El Tween® 20, Triton X-100, la albúmina de suero bovino (BSA) se compraron a Sigma-Aldrich. Inc (St Louis Mo.). El medio de montaje para fluorescencia con yoduro de propidio se adquirieron de Vector Laboratories Inc., (Burlingame CA). Y el medio de montaje para fluorescencia Dako cytomation se obtuvo de Dako Denmark (Carpintería CA). El resto de los reactivos fue grado analítico.

### **Métodos**

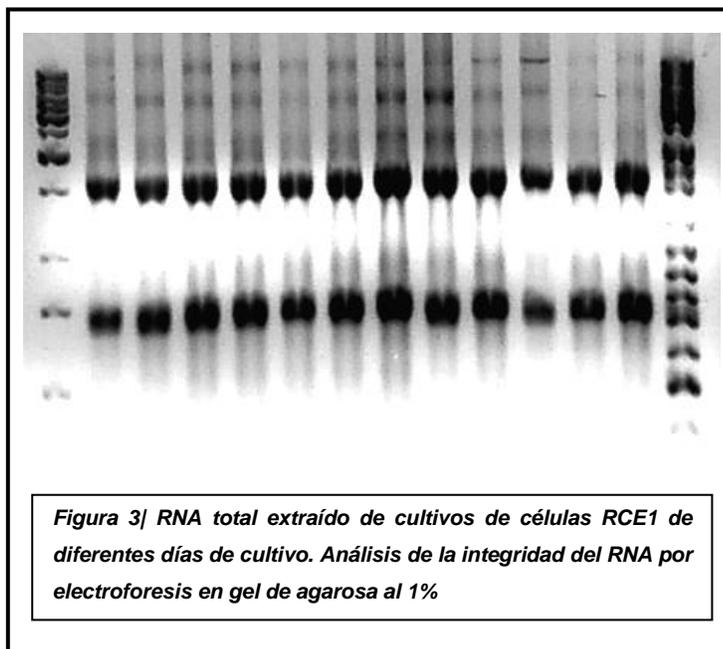
#### Cultivo Celular

Las células RCE1 (5T5) (Castro-Muñozledo, 1994) se inocularon a una densidad de  $1.98 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>; en presencia de  $1.6 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> fibroblastos 3T3 (Todaro and Green, 1963) previamente tratados con mitomicina C (Rheinwald, 1980). Las células RCE1 (5T5) se mantuvieron en una mezcla de DMEM y medio de Ham F-12 (3:1), suplementada con 5% (v/v) de suero fetal bovino, 0.4 $\mu$ g/ml de hidrocortisona,  $1 \times 10^{-9}$  M de triiodotironina, 5 $\mu$ g/ml de transferrina, 5 $\mu$ g/ml de

insulina, 10 ng/ml EGF (epidermal growth factor) y  $1 \times 10^{-10}$  M de toxina de cólera. En todos los experimentos, el medio se cambio cada tercer día; los cultivos se mantuvieron en una atmosfera con 90% de humedad y 10% de  $\text{CO}_2$ .

### Extracción de RNA Total

Las células RCE1 (5T5) se cultivaron como se indica y se obtuvieron extractos de RNA total a diferentes tiempos de cultivo. Se retiró el medio y las células se lavaron con PBS. Posteriormente se extrajeron con TRIZOL (Invitrogen Carlsbad, Calif., USA). Al lisado se le añadió cloroformo; posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se colectó el sobrenadante y el RNA se precipitó por 10 min por adición de isopropanol a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar, se resuspendió en etanol al 75%; la muestra se centrifugo una vez más, y se resuspendió en agua para ser cuantificada y corroborar la integridad del RNA (Fig. 3). La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 260nm y a 280 nm. El RNA se guardó en alícuotas a  $-72^\circ\text{C}$  hasta su uso.



### Análisis por RT-PCR

El RNA total se aisló de cultivos de células RCE1 (5T5), de fibroblastos 3T3, de cristalino de conejo y de riñón de ratón usando Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA). Una alícuota del extracto de RNA total, conteniendo 4µg de RNA, se sometió a reverso transcripción (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA., USA ) para obtener cDNA total siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de PCR, se diseñaron oligonucleótidos, utilizando como base las secuencias reportadas para los genes seleccionados en el GenBank (NCBI). Las secuencias de los oligonucleótidos, números de acceso, temperaturas de alineamiento, tamaños esperados de los productos de PCR y número de ciclos se detallan en la Tabla 1. El cDNA se amplificó utilizando Taq PCR Core Kit (Quiagen, Valencia, CA). Cada ciclo consistió en 1min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a la temperatura definida (Tabla 1), 1 min de extensión a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 min. Como control interno se utilizaron oligos para amplificar la proteína ribosomal acidica P0 (García-Villegas et al., 2007). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) conteniendo 0.5mg/ml bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador a una longitud de onda de 280-200nm. Los experimentos se repitieron por lo menos tres veces.

**Tabla 1** Secuencias de Oligos para RT-PCR

Gen	Gen Bank No. Acc.	Secuencia del Oligo	Temperatura de alineamiento (°C)	Producto Amplificado (pb)	Número de ciclos
<b>NuMA</b>	BC049791	F: 5'-GCGGCTGCATGAGACTTTGA-3' R: 5'-CGGGTTTGGAGCTGGGTGTTGT-3'	55	435	27
<b>LGN</b>	AF035152	F: 5'-AGGCAGCCGTGGATTTTTATGA-3' R: 5'-CACCACTTTTATCCCAACTCTC-3'	55	546	27
<b>Ins cuteable</b>	AB236158	F: 5'-AGTTTCCGGTGCTGTACCC-3' R: 5'-GCAGGCCATTGTGTCAAAGA-3'	55	357	36
<b>K16</b>	S79867	F: 5'-CTGGCTTTGGTGGTGGTTT-3' R: 5'-AGGCAGCTCAGTTCTAGGAGC-3'	55	1200	40
<b>LDH</b>	AF174288	F: 5'-CATTATCCCCAGATTGTCAAGT-3' R: 5'-CACCTAGTAAGGAGGAGGAAAAG-3'	55	758	35
<b>PR-P0</b>	XM_535894	F: 5'-GCAGGTGTTTGACAATGGCAGC-3' R: 5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAAGTGG-3'	60	231	23

\*F, forward; R, reverse; pb, pares de bases.

### RT-PCR semicuantitativo.

El RNA total se aisló a partir de cultivos celulares a los tiempos que se indica, y los niveles relativos de expresión de los mRNAs que codifican para NuMA, LGN e Insc se determinaron por RT-PCR semicuantitativo (Kaashoek et al., 1991), utilizando los oligonucleótidos cebadores y las condiciones de amplificación descritas en la Tabla 1. La queratina K16 fue utilizada como referencia de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, ya que es un marcador de células suprabasales durante esta etapa (Schermer et al, 1989), y fue amplificado con cebadores específicos cuya secuencia fue previamente descrita (Porter et al., 1998) (ver Tabla 1). Por otra parte, como referencia del proceso de diferenciación terminal se utilizó la expresión del mRNA que codifica para la

enzima LDH-H, y también fue cuantificado mediante el empleo de cebadores específicos previamente descritos (Hernández-Quintero, et al 2002) (véase Tabla 1). Por otra parte, como control interno para la amplificación se seleccionó al mensajero que codifica para la fosfoproteína ribosomal acídica P0 (PR-P0), y para ello se utilizaron cebadores específicos (García-Villegas et al. 2007) (véase Tabla 1.) Este control interno se escogió debido a que los niveles del mensajero de PR-P0 no cambian durante el crecimiento y la diferenciación de las células del epitelio corneal (García-Villegas et al., 2009).

Para la cuantificación de los resultados, los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio (ver párrafos anteriores) y se observaron en un transiluminador Hoefer MacroVue UVis 20 (Amersham Biosciences, ). Las imágenes se digitalizaron y las bandas correspondientes a los amplicones se cuantificaron y analizaron por densitometría utilizando el programa Quantity One, v.4.5.0, (Bio-Rad, Hercules, CA). Se utilizaron los valores de cantidad relativa para normalizarlos con respecto a la expresión de la proteína PR P0, para las mismas muestras bajo las mismas condiciones. Los resultados se trazaron como curvas de expresión semicuantitativa de los mRNA. Los experimentos se realizaron por lo menos tres veces.

### Clonación de los Productos de PCR.

La identidad de los amplicones fue establecida por secuenciación. Para ello, los amplicones se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 TOPO®, utilizando el kit de clonación TA (Invitrogen, Gaithersburg, MD). En forma breve, los amplicones para LGN y NuMA, recién generados por PCR en las condiciones y con los cebadores descritos anteriormente (Tabla 1), se utilizaron para preparar la mezcla para la reacción de clonación. Esta contenía 0.5 a 4  $\mu$ l del producto de PCR correspondiente, 1  $\mu$ l del vector pCR2.1TOPO®, 1  $\mu$ l de solución, y ajustándose a un volumen final de 6  $\mu$ l con agua de alta pureza. Esta mezcla se incubó por 5 minutos y se procedió a transformar bacterias competentes *E. coli* cepa Mach1™-T1. Las bacterias ya transformadas se sembraron en cajas con medio LB que contenía 50  $\mu$ g/ml ampicilina y 40 mg/ml X-Gal; las cajas se incubaron a 37°C por 12 h. Al finalizar ésta, se seleccionaron de 2 a 6 colonias cuya coloración fue blanca debido a que incorporaron el fragmento amplificado (ensayo de selección blanco/azul). Las colonias seleccionadas se utilizaron para inocular matraces con medio líquido LB-ampicilina, y se incubó por una noche para expandir el plásmido. Posteriormente, las células crecidas en mini-preps, se colectaron y lisaron para purificar los plásmidos correspondientes utilizando el kit de purificación Flexi Prep Kit (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA). El DNA plasmídico purificado se cuantificó espectrofotométricamente y se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (p/v).

Para confirmar la presencia del amplicón, los plásmidos recombinantes fueron sometidos a PCR en presencia de los cebadores para LGN o NuMA, o de los cebadores para los sitios de inserción, verificando que el producto de PCR fuera del tamaño adecuado. Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación de los insertos con los oligonucleótidos cebadores para los sitios de secuenciación T7 y SP6 (Invitrogen, Gaithersburg, MD). La secuenciación se llevó a cabo usando el secuenciador ABI PRISMTM 310 DNA Sequencer (Perkin-Elmer) and the Big Dye Terminator kit v3.1 (Perkin-Elmer).

#### Búsqueda de Secuencias Homólogas a Nuclear Mitotic Apparatus Protein (NuMA1) y G- protein Signaling Modulator 2 (GPMS2).

*Las secuencias homólogas a NuMA1 y a LGN se buscaron en el GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), utilizando la secuencia parcial obtenida de *Oryctolagus cuniculus*, mediante los programas BLASTN y BASTP (Altschul, et al. 1997). Entre las secuencias reportadas por el programa, se eligieron como homólogas aquellas que presentaron un valor de expectancia (E) menor, y que en ningún caso rebasó 0.01.*

#### Elaboración, Edición y Evaluación de Alineamientos Múltiples.

Esas secuencias fueron recuperadas en formato FASTA y alineadas mediante el programa CLUSTALX (Thompson, *et al.*, 1997) con los parámetros de penalización preestablecidos para el número y apertura de indel.

### Análisis Filogenético.

Finalmente el alineamiento óptimo fue sometido a análisis filogenético mediante el programa PAUP 4.0b10 para Microsoft Windows de 32 bit (D.L.S. Swofford, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA), utilizando el modelo de máxima parsimonia. Para esto, se realizó una búsqueda heurística de los 100 mejores árboles con base en el índice de consistencia. Los árboles resultantes se sometieron a un análisis de 1000 bootstrap, obteniéndose un árbol consenso en el que las ramas con un apoyo menor del 50 % fueron colapsadas. El árbol consenso se editó con el programa Tree View version Win32 v1.6.1 a fin de mejorar la presentación y favorecer el análisis.

### Inmunotinción de Queratinocitos de Epitelio Corneal

Las células RCE1 (5T5) se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio de 18.0 mm x 18.0 mm, se fijaron y permeabilizaron con metanol a -20°C, se secaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para iniciar la tinción, las células se hidrataron en PBS por 10 min. Después se bloquearon con albumina bovina (BSA) al 5%(p/v) de en PBS. Los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente por 1h (ver Tabla 2). Posteriormente, se lavaron con 0.05%(v/v) Tween 20 en PBS, para ser incubados con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con fluoresceína (ver Tabla 2). Las preparaciones fueron lavadas con 0.05%(v/v) Tween 20 en PBS y se montaron con Dako Fluorescent mounting medium o con medio de montaje para fluorescencia

Vectashield con yoduro de propidio. Para los testigos negativos, los cultivos se sometieron al protocolo de tinción descrito, eliminando el paso de inmunotinción con el anticuerpo primario. El análisis confocal se realizó en el sistema Leica high-speed confocal/multiphoton (Modelo TCS SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se realizaron secciones ópticas seriales XYZ y XZY de 0.2 a 0.4 $\mu$ m. Para impedir interferencia de las sondas fluorescentes, se tomaron imágenes de la misma sección óptica como canales independientes, y se analizaron con el programa LCS Leica Confocal Software TM v2.0 (Leica Microsystems). Los experimentos se realizaron por triplicado

**Tabla 2. Anticuerpos y reactivos utilizados para las inmunotinciones**

<b>Especificidad del Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
Policlonal de conejo contra el extremo C-terminal de NuMA humana	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.)
Policlonal de conejo contra Par3 de humano	1:50	Abcam Inc. (Cambridge, MA)
Policlonal de conejo contra $\alpha$ -Catenina de humano	1:20	Abcam Inc. (Cambridge, MA)
Monoclonal AE5 preparado contra K3 de conejo	1:50	Chemicon (Temecula CA, USA)
IgG chivo anti-igG de conejo marcado con Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes (Eugene, OR)
IgG chivo anti-igG de conejo marcado con Alexa Fluor 594	1:200	Molecular Probes (Eugene, OR)
IgG chivo anti IgG ratón marcado con Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes (Eugene, OR)
IgG chivo anti IgG ratón marcado con Alexa Fluor 594	1:200	Molecular Probes (Eugene, OR)
IgG chivo anti IgG ratón marcado con Cy5	1:100	Molecular Probes (Eugene, OR)
Rhodamina-faloidina	1:20	Molecular Probes (Eugene, OR)

## RESULTADOS

### **Detección por PCR de la expresión de mensajeros relacionados con división celular asimétrica.**

La línea celular RCE1 (5T5) es un modelo experimental que *in vitro* sufre de manera secuencial las etapas del proceso de diferenciación de los queratinocitos corneales de mamífero (Castro-Muñozledo, 1994). Puesto que la división celular asimétrica es una estrategia comúnmente utilizada para la renovación de las células troncales, y considerando que las células de esta línea inmortalizada forman un epitelio estratificado con polarización evidente, nos propusimos estudiar si los queratinocitos RCE1 (5T5) se dividen asimétricamente durante su crecimiento y diferenciación en cultivo. Para ello, analizamos la expresión de genes que codifican para proteínas que forman parte de la maquinaria que participa en la orientación del huso mitótico y en la ejecución correcta de esta mitosis diferencial. De manera específica estudiamos si las células RCE1 (5T5) expresan a los mensajeros de LGN (GPSM2), NuMA e Insc.

Al no estar disponibles las secuencias de los mensajeros de LGN (GPSM2) y NuMA del conejo, se diseñaron oligonucleótidos específicos para ser utilizados en reacciones de PCR, con base en las secuencias publicadas en el GenBank. Para diseñarlos, se realizaron alineamientos de las secuencias disponibles para diferentes mamíferos, ubicando especialmente las regiones altamente conservadas de estas secuencias. Estas secuencias conservadas sirvieron para

diseñar juegos de oligonucleótidos para los distintos genes analizados (véase Tabla 1). En el caso de *Insc*, se utilizaron oligonucleótidos cebadores previamente descritos (Izaki et al., 2006.).

Inicialmente, con el fin de establecer si los mRNAs de LGN, NuMA e *Insc* se expresaban en los queratinocitos RCE1 (5T5), se hicieron experimentos de RT-PCR bajo condiciones estándar de ciclado (30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min., alineamiento a 55°C por 1 min. y extensión a 72°C por 1 min.). Extrajimos RNA total de cultivos celulares estratificados de 10 días en cultivo (3 días después de alcanzar la confluencia). Como se observa en la Figura 4, los resultados demostraron que las células RCE1 (5T5) expresan los mRNAs que codifican para *Insc* (Fig. 4A), LGN (*GPSM2*) (Fig. 4B) y NuMA (Fig. 4C), de manera similar a lo observado en el riñón de ratón (Fig. 4A-C). En contraste, en el cristalino de conejo sólo se observaron niveles bajos para el mRNA de *Insc* (Fig. 4A-C); los fibroblastos 3T3 de ratón suizo mostraron niveles bajos para el mRNA de NuMA y al parecer no expresaron los mRNAs de *Insc* ni de LGN (*GPSM2*) (Fig. 4A-C). Los resultados sugieren, que las células RCE1 (5T5) son capaces de sufrir divisiones celulares asimétricas, ya que expresan a los genes de NuMA, LGN (*GPSM2*) e *Insc*.

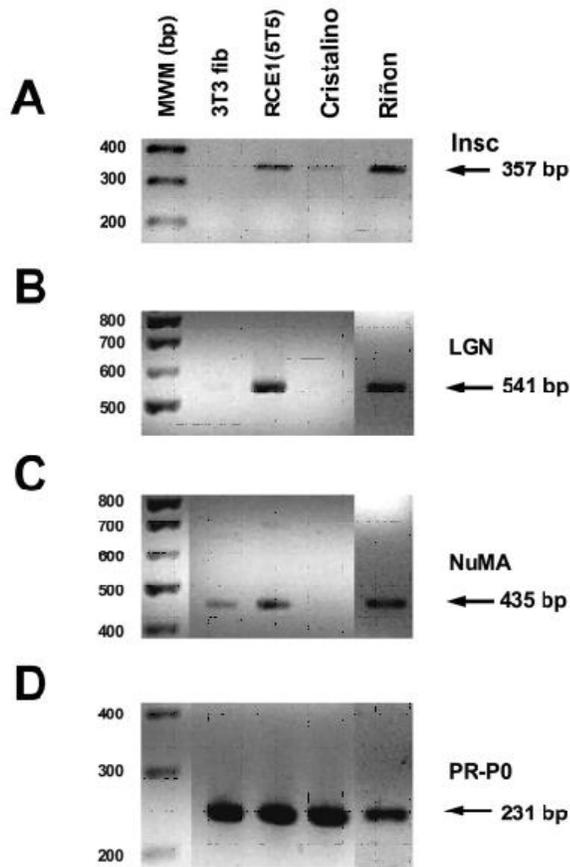
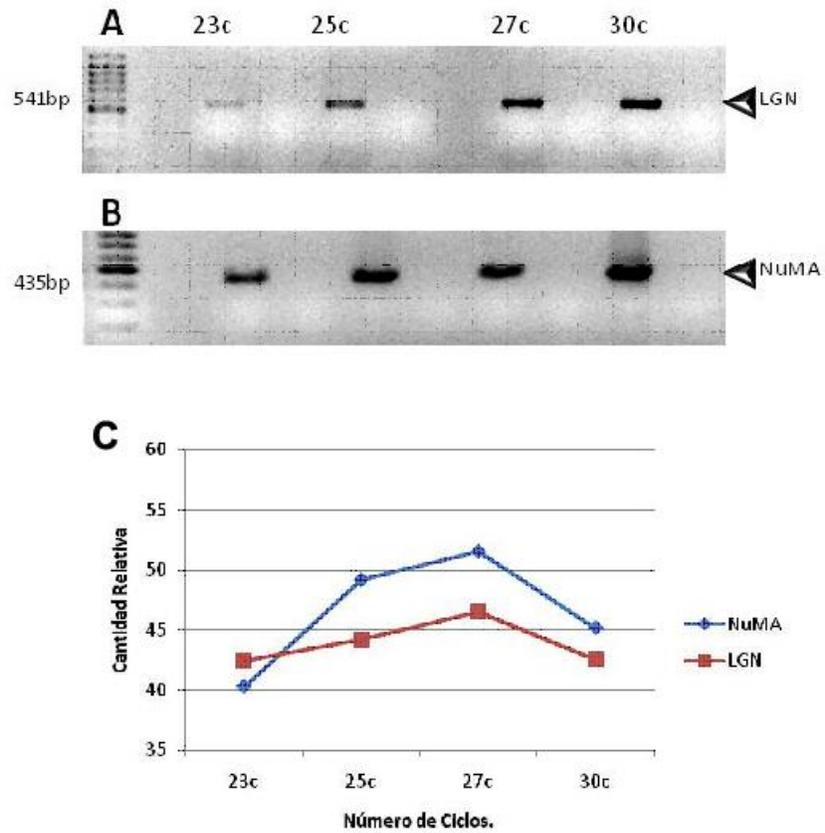


Figura 4. Expresión de los mensajeros de Insc, LGN y NuMA. Tres días después de la confluencia, el RNA total se extrajo de cultivos de células RCE1 (5T5). Se realizaron experimentos de RT-PCR bajo condiciones estándar. Como controles se empleó RNA total extraído de fibroblastos de ratón 3T3, riñón de ratón o cristalino de conejo. **(A)** Insc; **(B)** LGN y **(C)** NuMA. **(D)** La funcionalidad de los cDNA se determinó por amplificación de la fosfoproteína ribosomal ácida PR-P0. Los resultados son representativos de 6 experimentos duplicados.

Con vista en los resultados anteriores, se hizo necesario establecer el patrón de expresión de los mensajeros de NuMA, LGN e Insc a lo largo del proceso de proliferación y diferenciación de los queratinocitos RCE1 (5T5). Para lograr este objetivo se establecieron las condiciones para realizar ensayos de PCR semicuantitativo para cada uno de estos mensajeros, así como para los mensajeros que codifican para la queratina K16 que es un marcador de la fase de crecimiento exponencial en los cultivos proliferativos de epitelio corneal (Schermer et al., 1989), y para la isoenzima LDH-H, cuya expresión se encuentra asociada a la expresión del fenotipo terminal en los queratinocitos corneales (Hernández-Quintero et al., 2002). Para ello, se determinó el número de ciclos y la temperatura óptimos para obtener la mejor amplificación de cada uno de los mensajeros a cuantificar. Para determinar el número óptimo de ciclos, se hicieron reacciones de PCR en un gradiente de ciclos que comprendió desde 15 hasta 30 ciclos de reacción, manteniendo constantes la temperatura y concentración de RNA por reacción. La eficiencia de amplificación se determinó mediante el análisis densitométrico de los productos de amplificación separados por electroforesis en geles de agarosa. Los resultados se refirieron como la cantidad relativa del amplicón correspondiente respecto a la amplificación de la fosfoproteína ribosomal P0 (PR-P0, control interno). La Figura 5 demuestra que el número óptimo de ciclos para amplificar LGN (GPSM2) fue de 27 (Fig. 5). Un resultado semejante se obtuvo cuando se evaluaron las condiciones de amplificación para NuMA (Fig. 5).



**Figura 5. PCR en gradiente de ciclos.** (A) Producto de PCR de LGN (GPSM2), con un tamaño de 541bp. (B) Producto de PCR de NuMA, con un tamaño de 435bp. (C) Análisis densitométrico con la cantidad relativa de Producto de PCR en función del número de ciclos.

Finalmente, se confirmó la identidad de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando los cebadores diseñados para LGN (GPSM2) y NuMA. Para ello, los amplicones se clonaron en el plásmido pCR2.1TOPO®, y las construcciones se emplearon para transformar bacterias competentes (ver métodos). Los plásmidos se purificaron a partir de algunas colonias bacterianas transformadas, resistentes a ampicilina, y se verificó la presencia de los insertos por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Como se esperaba (Figura 6A), los plásmidos recombinantes aislados de colonias transformadas con las secuencias de LGN tuvieron un tamaño de 4514 pares de bases, mientras que los plásmidos recombinantes para NuMA tuvieron un tamaño de 4408 bp (Fig. 6A), hecho que contrasta con los 3900 pares de bases del vector sin insertos (no se muestra), lo que indicó la presencia de los amplicones de los tamaños esperados. Para verificar con mayor certeza la identidad de los insertos, los plásmidos recombinantes fueron sometidos a reacciones de PCR utilizando los cebadores específicos diseñados para amplificar las secuencias de NuMA y LGN, o a reacciones de PCR con cebadores dirigidos contra los sitios M13 que flanquean al sitio de inserción. Los resultados nos indican que las secuencias clonadas efectivamente corresponden a parte de los mRNA cuya expresión se deseaba examinar, ya que al utilizar los cebadores específicos, se obtuvieron fragmentos con los tamaños esperados (Fig. 6B, C). Debe señalarse que al utilizarse los cebadores dirigidos contra los sitios M13, se obtuvieron fragmentos 227bp más grandes (Fig. 6B, C). Como un criterio adicional, y como argumento definitivo, los insertos se secuenciaron, confirmado su identidad (ver párrafos subsecuentes). La región amplificada del mRNA de LGN

tuvo un 98% de homología con la región homóloga del mRNA del humano y 97% con el mRNA de la misma proteína en el ratón. Del mismo modo, NuMA tuvo una homología del 90% con el mRNA correspondiente en el humano, y de 80% con el mensajero del ratón.

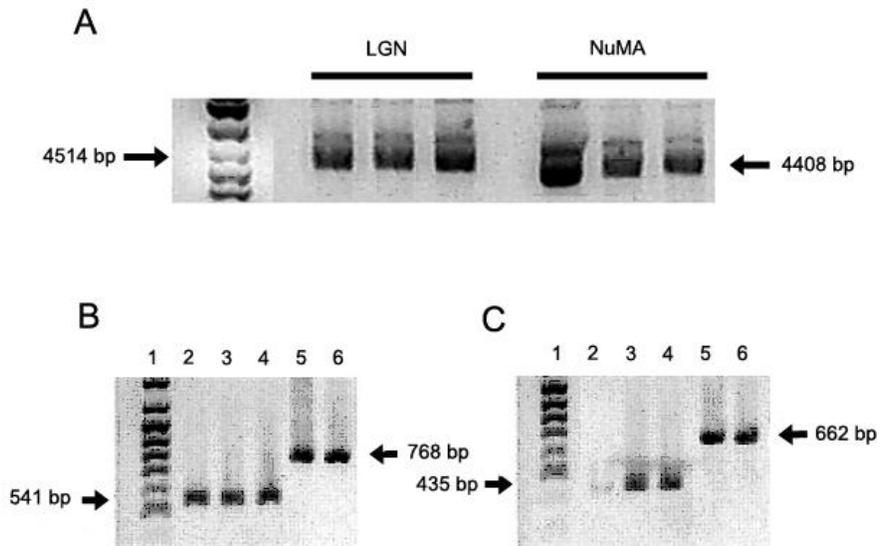


Figura 6. Análisis de los plásmidos recombinantes con secuencias de NuMA y LGN. (A) Plásmido purificado con insertos de LGN (GPSM2) y NuMA. Las flechas indican el tamaño de los plásmidos correspondientes. (B) Amplificación de los insertos de LGN (GPSM2), utilizando los cebadores específicos para esta secuencia (carriles 2, 3 y 4), o los cebadores para los sitios M13 que flanquean a la zona de inserción, resultando en un producto 227bp más grande (carriles 5 y 6). (C) Resultado de la amplificación del inserto de NuMA en el plásmido recombinante. Los carriles 2 a 4 muestran los productos de PCR obtenidos por el uso de los cebadores específicos para NuMA. Los carriles 5 y 6 muestran el producto de amplificación 227bpp más grande, generado con cebadores para los sitios M13 que flanquean al inserto.

## **Cambios en la expresión de NuMA, LGN e Insc, durante la proliferación y diferenciación de las células RCE1 (5T5).**

Con base en los resultados anteriores, analizamos si la expresión de Insc, NuMA y LGN cambia según el estado de proliferación o diferenciación de los queratinocitos corneales RCE1 (5T5). Para ello, se obtuvo RNA total de cultivos a los 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 12 días después de la siembra; y mediante RT-PCR semicuantitativo, determinamos las cantidades relativas de los niveles de mRNA de Insc, NuMA, LGN durante las diferentes etapas del cultivo. Para correlacionar los cambios en los niveles de estos mensajeros con etapas específicas de la proliferación y diferenciación, se determinaron los niveles de los mensajeros que codifican para la LDH-H, como marcador de diferenciación terminal del epitelio corneal (Hernández-Quintero et al., 2002), y para la citoqueratina K16, como marcador de células suprabasales de cultivos proliferativos de queratinocitos corneales (Schermer et al., 1989). Los resultados se normalizaron respecto a los niveles de mensajero detectados al tercer día de cultivo.

Como se demuestra en la figura 7, los niveles del mensajero de Insc fueron estables a lo largo de todo el experimento, observándose un incremento ligero (20%) al sexto día en cultivo, cuando las células alcanzaron la confluencia (Fig. 7C). En contraste, los niveles del mensajero de LGN aumentaron ligeramente a partir del 3er día de cultivo, y alcanzaron un máximo el sexto día en cultivo; posteriormente, disminuyeron para hacerse imperceptibles el día 12 en cultivo (Fig. 7D), tiempo en que los cultivos formaron un epitelio estratificado de 4 o 5 capas de células y expresaron los niveles más altos del mensajero de LDH-H (Fig. 7A), indicando que las células suprabasales expresan el fenotipo terminal (Fig.

7A). Estas observaciones fueron similares para el mensajero que codifica a NuMA, que fue prácticamente imperceptible el tercer día de cultivo, alcanzó un máximo cuando los epitelios alcanzaron la confluencia (6 día) y declinó paulatinamente para dejar de expresarse el día 12 en cultivo (Fig. 7E).. Tanto el mensajero de LGN como el de exhibieron un patrón de expresión semejante al que se observa para el mensajero de citoqueratina K16 que también alcanzó su máxima expresión a los 5-6 días (Fig. 2B) y después declinar hasta un mínimo el día 12 de cultivo). En conjunto, estos resultados sugieren que el proceso de división asimétrica es activo durante casi todo el crecimiento y diferenciación del epitelio corneal. La mayor frecuencia de las divisiones celulares asimétricas parece estar ligada a la etapa en que los queratinocitos alcanzan la confluencia e inicia su mayor actividad en la formación de un epitelio estratificado, con células suprabasales terminalmente diferenciadas.

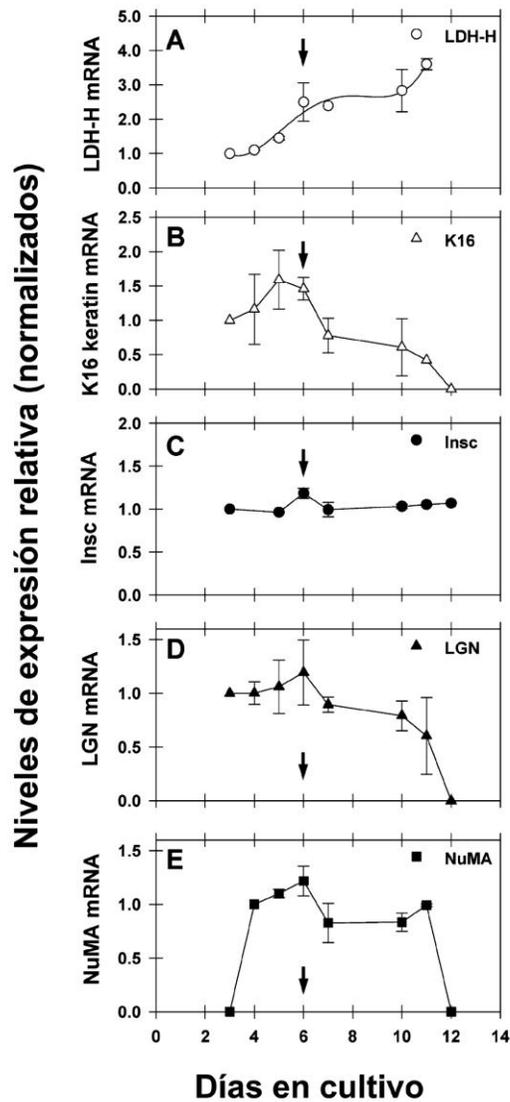
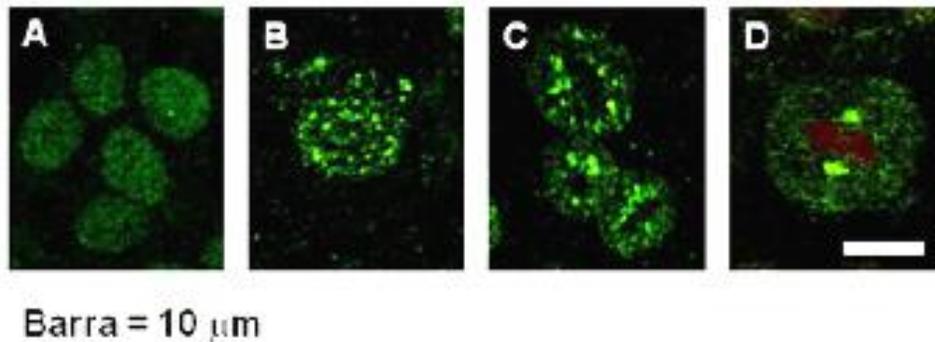
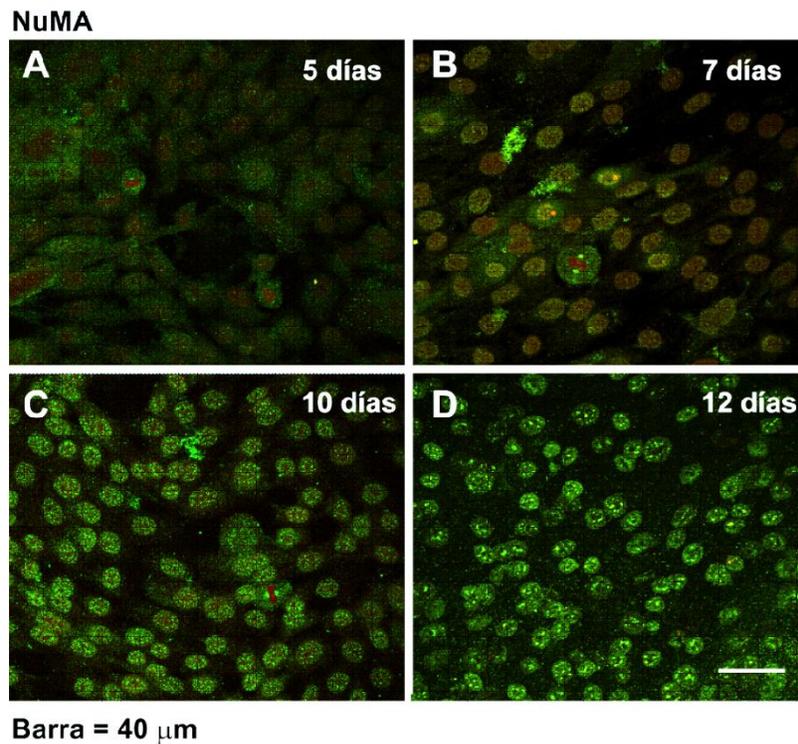


Figura 7. Cambio de los niveles de expresión de mRNAs relacionados con la DCA a través del tiempo. A) LDH-H (○); B) Citoqueratina K16 (△); C) Insc (●); D) LGN (GPSM2) (▲) y E) NuMA (■). Extractos de RNA total se obtuvieron de cultivos de células RCE1 (5T5) a los tiempos indicados. Se realizó RT-PCR semicuantitativo para determinar los niveles relativos de mRNA. La flecha indica el día en el que los cultivos alcanzan la confluencia. Los resultados corresponden al promedio de seis experimentos ( $\pm$ SEM).

Los resultados anteriores son apoyados por experimentos en los que cultivos de células RCE1 (5T5) de 4, 5, 7, 9, 10 y 12 días fueron inmunoteñidos con anticuerpos dirigidos contra NuMA. De manera general, como se puede observar en la Figura 8, la localización de NuMA cambia de acuerdo con la fase de la mitosis en la que se encuentran las células. Durante la interfase, la NuMA es intranuclear, y muestra un patrón difuso o punteado que excluye a los nucléolos (Fig. 8A). En contraste, durante la profase NuMA se agrupa en gránulos pequeños cuyo tamaño aumenta según avanza la mitosis (Fig. 8B, C); y se desplazan hacia la periferia del núcleo, dejando un espacio que será ocupado por los cromosomas (Fig. 8C). Cuando se inicia la metafase, la envoltura nuclear se rompe, y NuMA se asocia a los centrosomas en los polos del huso mitótico (Fig. 8D). Por otra parte, al examinar la inmunolocalización de NuMA a diferentes tiempos de cultivo, se observó que la proteína apenas puede detectarse en colonias de 5 días de cultivo y sólo se encontró asociada a algunos centrosomas (Fig. 9A). Posteriormente, a los 7 días en cultivo y días subsecuentes, una vez que se alcanzó la confluencia, NuMA fue observado como tinción intranuclear difusa o como un patrón de puntos o gránulos que excluye los nucléolos (Fig. 9B-D). La inmunotinción más intensa se observó al décimo día en cultivo, hecho que coincide parcialmente con los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativo (Fig. 9C). Posteriormente se observan mitosis ocasionales y la distribución de NuMA es predominantemente intranuclear mostrando el patrón punteado observado desde el 7 día de cultivo (Fig. 9D).



**Figura 8.- Localización de NuMA durante diferentes etapas de la mitosis y en el núcleo interfásico. (A)** Interfase. **(B)** Profase temprana. **(C)** Profase tardía. **(D)** Metafase. Inmunotinción de células RCE1 (5T5) con anticuerpo anti-NuMA (verde), el DNA está teñido con Ioduro de propidio (rojo).

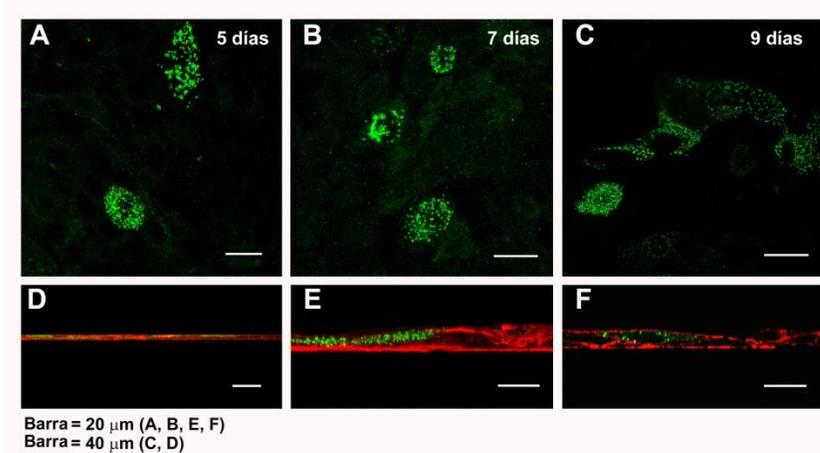


**Figura 9.- Localización de NuMA en células RCE1 (5T5) a diferentes tiempos de cultivo. (A)** Cultivos de 5 días. **(B)** Cultivos de 7 días. **(C)** Cultivos 10 días. **(D)** Células de 12 días de cultivo. Inmunotinción con anticuerpo anti-NuMA (verde), el DNA está teñido con Ioduro de propidio (rojo). Se presentan las proyecciones máximas para los canales de fluoresceína o rodamina.

Finalmente, se realizó la inmunolocalización de Par-3, que es una proteína esencial para la polaridad celular y el alineamiento del huso mitótico (Etemad-Moghadam et al., 1995; Aono et al., 2004). Par 3 mostró una distribución citoplásmica, punteada, que ocasionalmente rodeó al núcleo (Fig.10A). Par-3 fue observado en colonias de queratinocitos RCE1 (5T5) tan tempranamente como a los 5 días de cultivo, cuando las células se encontraban en la fase de crecimiento exponencial (Fig. 10A); en estos cultivos, las células positivas para Par-3 fueron escasas y se observaron dispersas entre células que no contenían la proteína (Fig. 10D). Posteriormente, cuando las células alcanzaron la confluencia e iniciaron la formación de un epitelio estratificado el número de células Par-3 positivas aumentó de manera proporcional al tiempo transcurrido después de la confluencia. De esta manera, los epitelios con un día de post-confluencia (7 días en cultivo) tuvieron 2 capas de células y un mayor número de células Par-3 positivas que los cultivos proliferativos (Fig. 10B). El mayor número de células Par-3 positivas se observó en cultivos que ya estaban organizados como epitelios con 4 capas celulares (9-10 días en cultivo, Fig. 10C).

En experimentos adicionales, las células individuales se visualizaron por tinción de los microfilamentos de actina con rodamina-faloidina, mientras que las células Par-3-positivas se inmunolocalizaron con anticuerpos específicos marcados con fluoresceína. Como se demuestra, en cultivos proliferativos, Par-3 se observó como un patrón punteado, localizado apicalmente en células no estratificadas o que iniciaban el proceso de estratificación (Fig. 10D). En contraste, cuando la distribución de Par-3 se estudió en epitelios confluentes, estratificados,

Par-3 siempre se localizó en células suprabasales, ya sea en un patrón cortical, punteado o bien en algunos casos, citoplásmicamente, alrededor del núcleo (Fig. 10E, F).

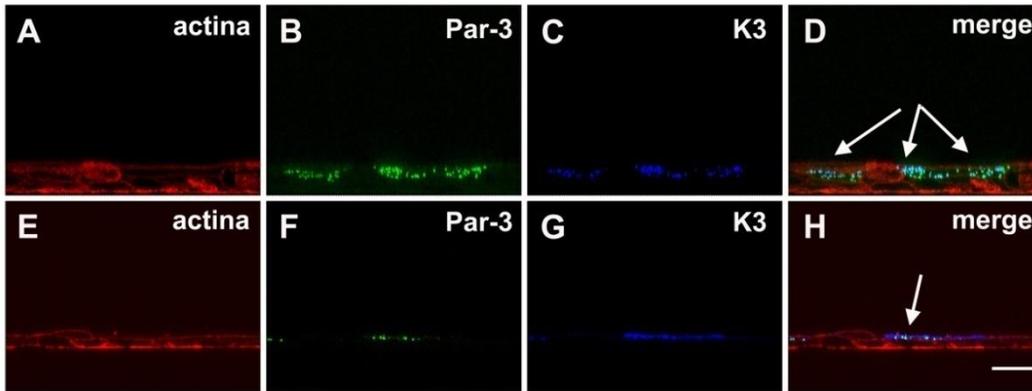


**Figura 10.- Localización de Par3 en células RCE1 (5T5) a diferentes tiempos en cultivo. (A)** Células a 5 días de cultivo. **(B)** Células a 7 días de cultivo. **(C)** Células a 9 días de cultivo. **(D-F)** Secciones transversales. Inmunotinción con anticuerpo anti-Par3 (verde), citoesqueleto de actina filamentosa (rojo). Proyecciones máximas de cada uno de los canales.

Con el propósito de establecer si las células Par-3-positivas son células que han iniciado el proceso de diferenciación terminal, realizamos nuevos experimentos de inmunotinción, en los que se determinó la distribución de células positivas para la citoqueratina K3, que es un marcador de diferenciación terminal en queratinocitos corneales (Schermer et al., 1986), y simultáneamente estudiamos la distribución de células Par-3 positivas en el epitelio. Al mismo tiempo, con el objetivo de visualizar a cada una de las células que constituyen al epitelio, se tiñeron los microfilamentos de actina con rodamina-faloidina. Como se observa en las Figuras 11 y 12, la inmunotinción de los epitelios con anticuerpos dirigidos contra Par-3 y contra la queratina K3, demuestra una posible co-localización de la proteína Par-3

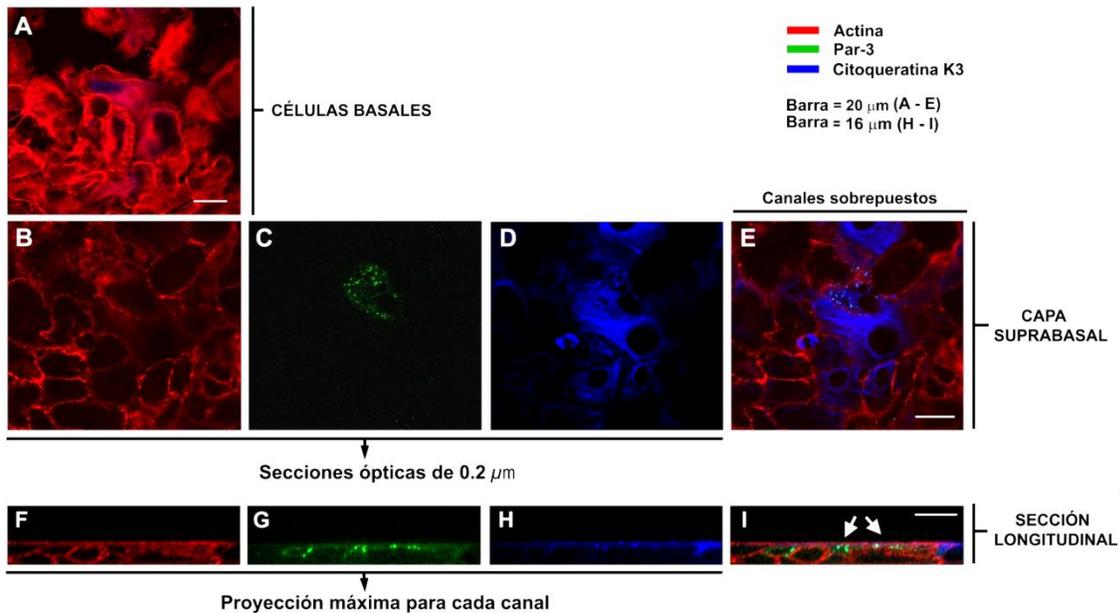
con la queratina K3 en células suprabasales (Fig. 11y 12). En todos los caso, cuando se observó esta posible co-localización entre Par-3 y la queratina K3, la inmunolocalización siempre se observó en gránulos, de posición citoplásmica y apical en células suprabasales (ver Fig. 11D y H). Con el propósito de confirmar esta co-localización se realizaron experimentos con la triple tinción utilizada anteriormente, y la estructura del epitelio se examinó por microscopía confocal haciendo cortes ópticos paralelos a la superficie de cultivo. Como se aprecia en la Figura 12, Par-3 presentó la distribución granular, citoplásmica, en ocasiones apical, en queratinocitos suprabasales (Fig. 12E y 12I). La inmunotinción de la citoqueratina K3 no mostró siempre una correlación con la distribución de Par-3. Al contrario, la mayor parte de las células queratina K3 positivas son células suprabasales que mostraron filamentos intermedios claramente definidos (ver Fig. 12E). No obstante, algunas células queratina K3-positivas fueron igualmente positivas para la proteína Par-3 (Fig. 12E, 12I); en estos casos ambas proteínas colocalizaron en los estudios de microscopía confocal. Este hecho, junto con la localización suprabasal, sugiere que Par-3 y la queratina K3 deben interaccionar durante las etapas iniciales del proceso de estratificación.

### Par3/K3/Actina



Barra = 20  $\mu\text{m}$

**Figura 11. Co-localización de Par3 y de la queratina K3 en epitelios obtenidos por cultivo de células RCE1 (5T5) a 9 días.** (A, E) Corte transversal del epitelio con por lo menos 3 estratos, teñidos para detectar actina microfilamentosa. (B, F) Inmunotinción de Par3. (C, G) inmunotinción de la queratina K3. Canales sobrelapados de la proyección máxima. (D, H) Canales sobrelapados. Inmunotinción con anticuerpo anti-Par3 (verde), citoesqueleto de actina filamentosa (rojo) en células RCE1 de 9 días. Las flechas indican la posible co-localización de Par3 con K3.



**Figura 12. Localización de Par3 en células RCE1 (5T5).** (A) Citoesqueleto de actina en células basales. (B) Citoesqueleto de actina de células suprabasales. (C) célula suprabasal Par3 positiva. (D) Filamentos de queratina K3 (E) Canales sobrelapados de los cortes ópticos que se muestran en (B, C y D). (F) Corte transversal de un epitelio, tinción de los microfilamentos de actina. (G) Inmunotinción de Par3 del mismo epitelio. (H) Inmunotinción de los filamentos de la queratina K3 en el mismo epitelio. (I) Canales sobrelapados de las inmunotinciones en (F, G, y H). Las flechas indican lugares de aparente co-localización. Inmunotinción con anticuerpo anti-Par3 (verde), citoesqueleto de actina filamentosa (rojo) en células RCE1 (5T5) de 9 días de cultivo.

## **Análisis Filogenético de Secuencias Homólogas a NuMA1 (Nuclear Mitotic Apparatus Protein ) y GPMS2 (G- protein Signaling Modulator 2).**

Una vez que se obtuvieron las secuencias de los amplicones generados con los cebadores que se diseñaron con base en las secuencias de LGN (GPMS2) y NuMA, y que se confirmó su identidad con estas proteínas, se realizaron alineamientos múltiples con secuencias homólogas obtenidas reportadas para otras especies de vertebrados. Los alineamientos Para NuMA y LGN se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente. En estas figuras se muestra la homología existente entre las secuencias parciales obtenidas para el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en este trabajo, y las correspondientes a las mismas proteínas en otros mamíferos. Para NuMA, el amplicón comprendió 411 bases localizadas en los exones 14 al 15 del gene humano y del exón 12 al 14 en el gene de ratón. La secuencia parcial tuvo 91% de homología con la secuencia del toro, 89% con el humano y 80% con la musaraña (Ver Tabla 3A). Por otra parte, en el caso de LGN, la secuencia parcial comprendió 415 bases localizadas en los exones 8 al 11 del gene humano, y de los exones 9 al 13 del gene de ratón. La secuencia parcial de LGN de conejo tuvo 92% de homología con la humana, y la menor homología la tuvo con la secuencia de la rata (Ver Tabla 4A).

Con base en estos alineamientos, realizamos árboles filogenéticos para las secuencias parciales de NuMA (Fig. 15) y LGN (Fig. 16). Posteriormente, realizamos la traducción de la secuencia de nucleótidos para predecir las secuencias de aminoácidos correspondientes. Con estas últimas, se hicieron

búsquedas mediante el programa BLASTP, que nos llevaron a calcular los porcentajes de identidad de las proteínas codificadas (Tablas 3B y 4B), la proteína NuMA tiene una homología del 92% con la proteína del caballo, y la menor homología la comparte con la proteína del ornitorrinco (26%, Tabla 3B). De la misma manera, LGN tiene su mayor homología con la proteína del humano y el chimpancé (98%), y la menor con el pez cebra (80%) (Tabla 4B). Estos resultados refuerzan la conclusión de que las regiones amplificadas por RT-PCR para LGN y NuMA pertenecen a genes homólogos para cada una de estas proteínas.

Para profundizar nuestro conocimiento sobre la estructura de estas proteínas, y conociendo sus secuencias de aminoácidos, buscamos los dominios de las proteínas, familias funcionales y sitios asociados, así como los patrones y los perfiles para identificar sitios activos. Obtuvimos información adicional sobre la posible funcionalidad y estructura de dichas secuencias de aminoácidos. En el caso de la secuencia de aminoácidos de NuMA de *O. cuniculus* observamos que la región clonada y secuenciada codifica un dominio zipper de leucina, además de sitios activos para la fosforilación (Fig. 15 A,B). Para la secuencia de aminoácidos de LGN (GPSM2) de *O. cuniculus* observamos que la secuencia parcial codificada por el amplicón que clonamos, contiene 3 sitios TPR (tetratricopéptido) y múltiples sitios activos (Fig. 16A) que incluyen sitios de fosforilación, miristoilación y glicosilación. Con base en el alineamiento, podemos concluir que se trata de regiones conservadas entre diferentes especies separadas por tiempos evolutivos considerables (Figs. 17 y 18).



## LGN (GPSM2)



**Figura 14. Alineamiento de la secuencia parcial de LGN (GPSM2) y la secuencia codificante del gene.** En azul observamos regiones codificantes para dominios TPR y en verde dominios GoLoco. La región amplificada se ve delimitada por los oligonucleótidos cebadores específicos (rojo y azul) En el alineamiento las bases que coinciden se muestran con un punto.

A. Organismo	% de identidad	B. Organismo	% de identidad
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	100%	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	100%
<i>Bos taurus</i>	91%	<i>Equus caballus</i>	92%
<i>Equus caballus</i>	90%	<i>Bos taurus</i>	91%
<i>Homo sapiens</i>	89%	<i>Homo sapiens</i>	90%
<i>Pan troglodytes</i>	89%	<i>Pan troglodytes</i>	89%
<i>Mus musculus</i>	82%	<i>Rattus norvegicus</i>	81%
<i>Monodelphis domestica</i>	80%	<i>Monodelphis domestica</i>	79%
		<i>Canis familiaris</i>	75%
		<i>Xenopus laevis</i>	51%
		<i>Danio rerio</i>	47%
		<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	26%

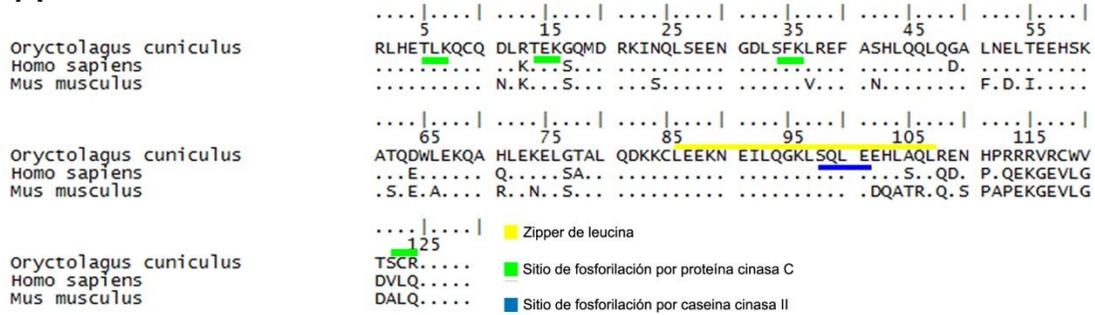
**Tabla 3. Porcentaje de identidad entre las 411 bases de la secuencia de NuMA de conejo con otras especies. (A)** Porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos. **(B)** Porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos.

A. Organismo	% de identidad	B. Organismo	% de identidad
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	100%	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	100%
<i>Homo sapiens</i>	92%	<i>Homo sapiens</i>	98%
<i>Pan troglodytes</i>	92%	<i>Pan troglodytes</i>	98%
<i>Canis familiaris</i>	92%	<i>Canis familiaris</i>	97%
<i>Macaca fascicularis</i>	91%	<i>Equus caballus</i>	97%
<i>Bos taurus</i>	90%	<i>Mus musculus</i>	97%
<i>Equus caballus</i>	90%	<i>Rattus norvegicus</i>	99%
<i>Mus musculus</i>	86%	<i>Bos taurus</i>	99%
<i>Rattus norvegicus</i>	85%	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	99%
		<i>Monodelphis domestica</i>	91%
		<i>Gallus domesticus</i>	88%
		<i>Taeniopygia guttata</i>	88%
		<i>Xenopus laevis</i>	82%
		<i>Danio rerio</i>	80%

**Tabla 4. Porcentaje de identidad entre las 415 bases de la secuencia de LGN (GPSM2) de conejo con otras especies. (A)** Porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos. **(B)** Porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos.

# NuMA

**A**

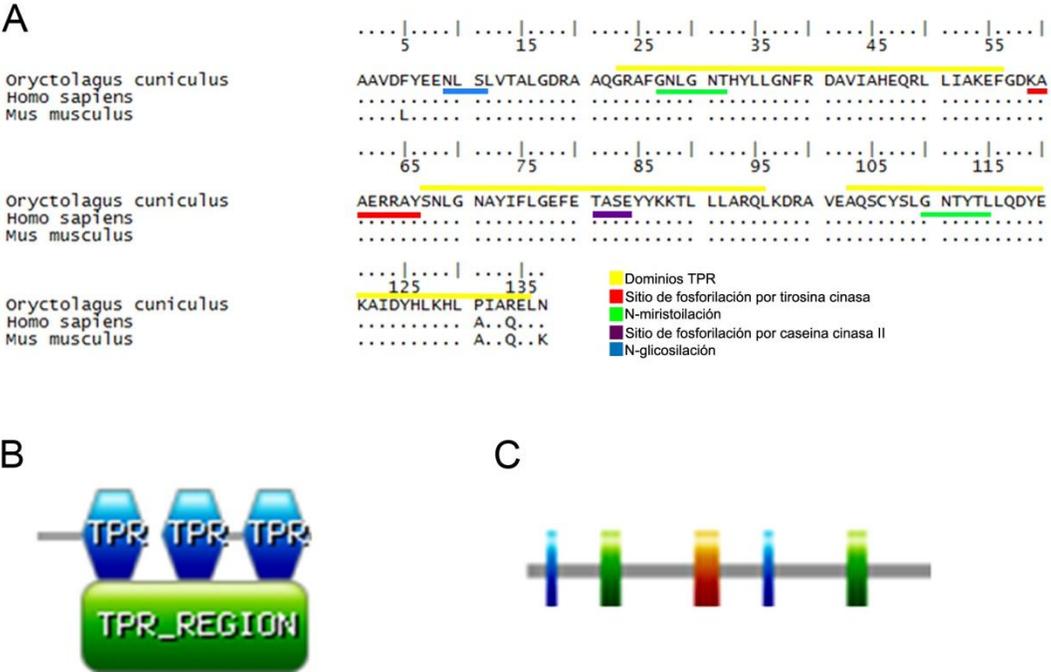


**B**

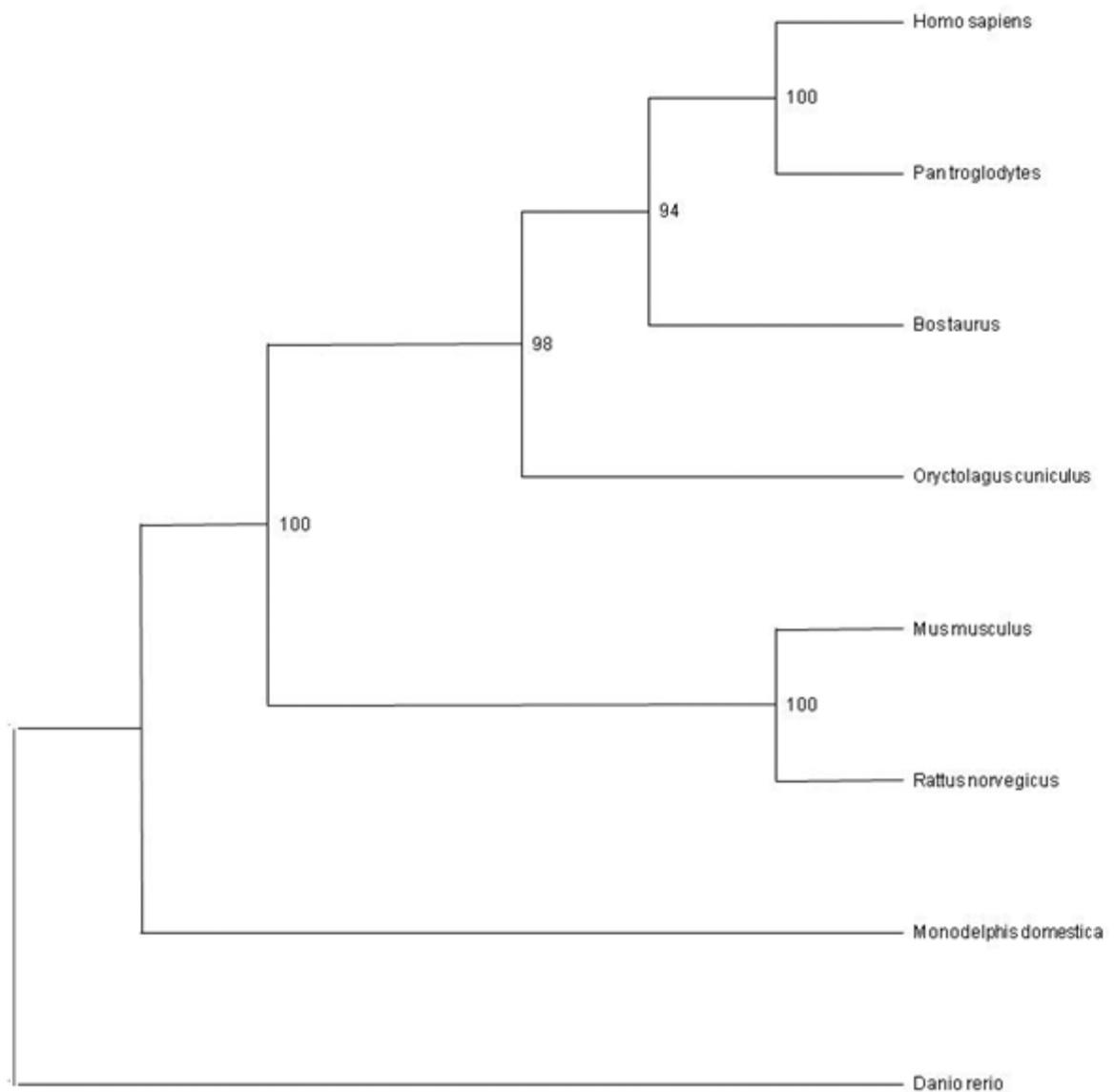


**Figura 15. Alineamiento de la secuencia de NuMA y representación de los sitios activos de la proteína. (A)** Alineamiento de los aminoácidos con las regiones activas indicadas. **(B)** Representación de los sitios activos.

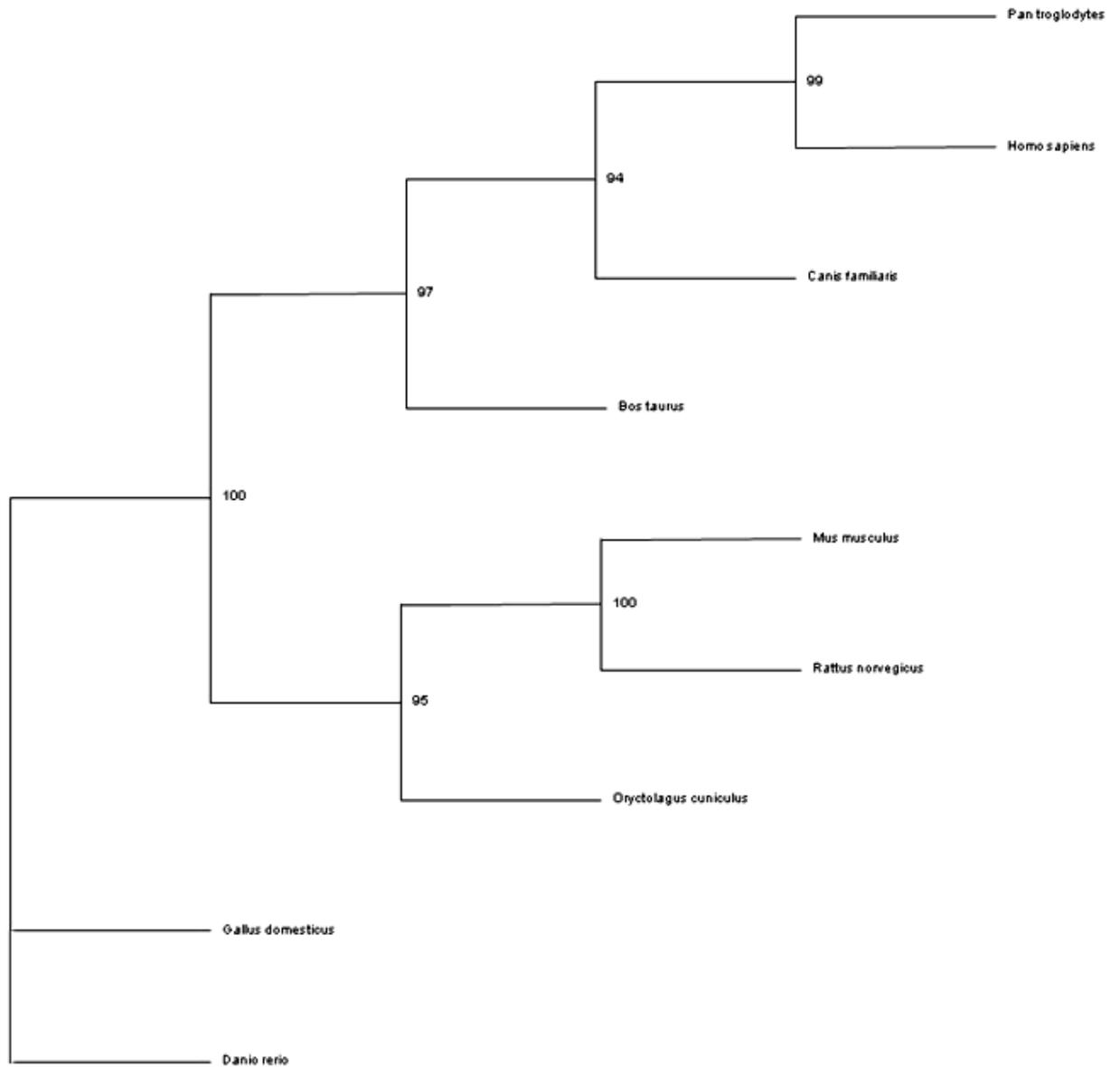
# LGN (GPSM2)



**Figura 16. Alineamiento de la secuencia de LGN (GPSM2) y representación de los sitios activos de la proteína. (A) alineamiento de los aminoácidos con las regiones activas indicadas. (B) Representación de los sitios TPR. (C) Representación de los sitios activos.**



**Figura 17. Árbol filogenético enraizado con la secuencia para NuMA de *Dario renio*.** Elaborado con un fragmento de 411 base del gen NuMA mediante un modelo de máxima parsimonia. Los valores de bootstrap producto de 1000 alteraciones se indican en las ramas



**Figura 18. Árbol filogenético enraizado con la secuencia para LGN de *Danio rerio*.** Elaborado con un fragmento de 415 base del gen LGN mediante un modelo de máxima parsimonia. Los valores de bootstrap producto de 1000 alteraciones se indican en las ramas.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.**

Si bien la polarización celular y la orientación del huso mitótico son muy importantes para el establecimiento de patrones de desarrollo y de programas de diferenciación en los invertebrados; en los vertebrados, debido al gran número de células que los compone, la importancia de éstos dos parámetros se ha diluido debido a la participación de otros procesos como la migración celular (Davidson, 1991). No obstante, en la actualidad se ha hecho evidente que la polarización de las células y la subsecuente orientación del huso mitótico son cruciales para la determinación de programas de diferenciación completos; hecho que en base a observaciones experimentales se había previsto con anticipación (Martin, 1967). Posteriormente, la relevancia de la división celular asimétrica en vertebrados se hizo evidente a partir de la aparición de las técnicas de manejo de imágenes y las metodologías del DNA recombinante. De esta manera, se establecieron correlaciones entre la determinación de programas de desarrollo embrionario y la polaridad del huso mitótico en tejidos como el cerebro del ratón (Chenn y McConell, 1995; Haydar et al., 2003), la retina de rata (Cayouette & Raff, 2003) o la epidermis de ratón (Lechler & Fuchs, 2005).

La división celular asimétrica no sólo es importante durante el desarrollo embrionario. En el adulto, las células troncales constituyen una población celular que participa en el recambio y en la reparación tisular. Estas células reúnen, entre sus características, la capacidad de dar origen a células idénticas a sí mismas; lo

que asegura la sobrevivencia del individuo al mantenerse como una población constante y por otro lado, dan origen a células determinadas que inician procesos de diferenciación específicos (Knoblich, 2008). Esta propiedad permite que en los tejidos adultos las células terminalmente diferenciadas o que mueren como parte de la expresión del fenotipo terminal, sean reemplazadas por la progenie de esta población celular (Miller et al., 2005; Alison & Islam, 2009), y depende fundamentalmente de los procesos de polarización y capacidad de modificar la orientación del huso mitótico, y por ende, de la división celular asimétrica.

La evidencia acumulada sugiere que la división celular asimétrica es prácticamente ubicua para todos los tejidos con capacidad de autorenovación y/o reparación (Knoblich, 2008). Sin embargo, existen pocos modelos experimentales en los que puedan analizarse los factores que regulan y determinan la polarización y la división asimétrica. La mayor parte de la información existente al respecto, proviene de organismos nulos para alguna de las proteínas que participan en el proceso o de experimentos con RNA de interferencia en líneas celulares. Entre estos, destacan los animales knock-out para Insc (Zigman et al., 2005), para la subunidad  $G\gamma 1$  de la proteína G heterotrimérica (Izumi et al., 2004), para p63 (Lechler & Fuchs, 2005), y la interferencia en la expresión de LGN en neuroepitelio de ratón (Konno et al., 2007), de Par-3 en células HeLA y en células de epitelio mamario humano (Sugimoto et al., 2008). En estos experimentos, se ha determinado la importancia de éstas proteínas como partes esenciales en la maquinaria para la división celular asimétrica.

Puesto que son pocos los ejemplos de división celular asimétrica documentados en mamíferos, siendo este tipo de división uno de los mecanismos principalmente propuestos para la diversidad celular (Knoblich, 2001); y considerando que existen pocos modelos experimentales que permitan disecar cómo las señales del medio ambiente pueden modificar la polarización celular y la orientación del huso mitótico, en este trabajo examinamos la posibilidad de utilizar al epitelio corneal de mamífero como un modelo que facilite este tipo de análisis. Esta decisión se hizo tomando en cuenta algunas de las características de la superficie ocular: En primer lugar, existe una gran cantidad de evidencias que sugieren que las células troncales del epitelio corneal se localizan en la capa basal del epitelio limbal (Schermer et al., 1986; Cotsarelis et al., 1989), y que al diferenciarse, sufren una división celular asimétrica (Barrandon, 2007; Sun and Lavker, 2004; Lavker et al., 1991) manteniendo su posición dentro de un microambiente o nicho (Zhang and Li, 2008).

Para entender la regulación de la asimetría celular y de la orientación del huso mitótico; así como para analizar su participación en el proceso de diferenciación del epitelio corneal, seleccionamos a la línea celular establecida RCE1 (5T5). Este modelo *in vitro* nos permite realizar este tipo de análisis ya que 1) Reproduce el proceso secuencial de diferenciación del epitelio corneal (Castro-Muñozledo, 1994), haciendo posible relacionar el tiempo de expresión de marcadores de diferenciación con la expresión de mRNAs específicos o la presencia de proteínas relacionadas con la DCA. 2) En contraste con tejido, la

disponibilidad de células RCE1 (5T5) no es una limitante para los experimentos (Castro-Muñozledo, 1994; 2008). 3) Dado que estas células constituyen un epitelio estratificado en el que se puede discernir una capa de células basales que no expresan marcadores de diferenciación y 2-3 capas de células suprabasales con expresión de marcadores del fenotipo terminal (Castro Muñozledo, 1994, 2008); es posible analizar patrones de expresión de las moléculas de interés y compararlos con los que se observan en el tejido vivo.

Como una primera aproximación al estudio de la división celular asimétrica, exploramos si las células RCE1 (5T5) expresan los transcritos de los genes *Insc*, *LGN* (*GPSM2*) y *NuMA*, los cuales son necesarios para el correcto posicionamiento y orientación del huso mitótico y la correcta ejecución de la división celular asimétrica (Knoblich, 2008). Como se observó, las células expresaron estos mRNAs siguiendo un patrón de expresión similar al mostrado por la citoqueratina K16, que es un marcador de células suprabasales en cultivos en crecimiento (Schermer et al. 1989) y en tejidos “hiperproliferativos” (Galvin et al., 1989). En estos experimentos, los mRNAs de *NuMA* y *LGN* se detectaron en cultivos proliferativos a partir del 4º día después de la inoculación, para llegar a sus niveles máximos el día en que los cultivos alcanzaron la confluencia celular e iniciaron la expresión del mRNA de LDH-H y el decremento en los niveles del mRNA de la K16 (Hernández-Quintero et al., 2002; García-Villegas et al., 2009), indicando el inicio de la diferenciación terminal. En contraste el mRNA de *Insc* se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo en cultivo.

En conjunto, estos resultados sugieren que durante el crecimiento y la diferenciación de las células del epitelio corneal, la división celular asimétrica ocurre constantemente. Las células se dividen asimétricamente a tiempos tan tempranos como el 4º día en cultivo, momento en que las células se han organizado en colonias, comienzan a estratificar en su región central, y expresan a la queratina k16 en las células suprabasales (Schermer et al., 1989). Luego, cuando las células alcanzan la confluencia, el 6to día de cultivo, la división asimétrica parece ser muy activa ya que los niveles de los mRNAs LGN y NuMA alcanzan su nivel máximo de expresión y las células comienzan a organizarse en un epitelio estratificado con 2 a 4 capas de células. Posteriormente, los niveles de estos mensajeros comienzan a decrecer, al mismo tiempo que se inicia el proceso de diferenciación terminal, como lo indica el incremento en los niveles del mensajero de LDH-H, el cual precede a la expresión de la citoqueratina K3 por 1 o 2 días (Hernández-Quintero et al., 2002; García-Villegas et al., 2009). Finalmente los mRNAs de LGN y NuMA se encuentran en sus niveles mínimos al 12º día. Esta drástica disminución podría explicarse como consecuencia de la baja frecuencia con que se requiere la división celular asimétrica para el mantenimiento del tejido.

Estas conclusiones son apoyadas por los experimentos de inmunotinción en los que observamos en cultivos proliferativos, poco estratificados a las células Par3 positivas como células basales escasas e intercaladas con células Par-3 negativas. Posteriormente, cuando los cultivos alcanzan el estado de confluencia y se organizan como un epitelio estratificado con 2 a 4 capas de células, el número

de células Par3 positivas aumenta de manera proporcional al aumento en los niveles de los mensajeros de NuMA y LGN. En el epitelio cultivado, Par-3 fue principalmente inmunolocalizado en capas suprabasales, mostrando una distribución citoplásmica con un patrón punteado. Aunque Par-3 desempeña un papel importante en la DCA a través de su asociación con Par6 y la proteína cinasa C atípica (aPKC) (Betschinger et al., 2003; Tsou et al., 2003), la distribución que reportamos en este trabajo no necesariamente corresponde al patrón de la inmunotinción descrito previamente por Watts y colaboradores (1996) y por Hung y Kempfues (1999). La distribución citoplásmica podría estar relacionada con la organización y ensamble de las uniones adherentes y uniones estrechas (Pope & Harris, 2008; Ooshio et al., 2007; Lees-Miller, 2007). Nuestros experimentos futuros deberán diseñarse para establecer las asociaciones entre los filamentos intermedios de citoqueratina 3 y los componentes de la maquinaria molecular responsable con la orientación del uso mitótico. Actualmente, nuestros resultados que sugieren una co-localización de la queratina 3 con Par-3 deberán confirmarse y extenderse antes de tener una conclusión precipitada, pero permiten postular una interacción entre la citoqueratina y Par-3. ¿Acaso, esta interacción es directa?; si es así, ¿requerirá de otros componentes macromoleculares para ser funcional?. Si no se trata de una interacción directa: ¿requiere de otros componentes ya conocidos, involucrados en la división asimétrica como ocurre en el caso de Par-3 las citoqueratinas y Albatros (Sugimoto et al., 2008)?.

Por otra parte, también nos interesa definir la naturaleza de los factores que regulan la expresión de los determinantes moleculares que son segregados

asimétricamente y podrían estar involucrados en la diferenciación de las células del epitelio corneal. Para este tipo de estudio, será necesario establecer un sistema de ensayo en el que sea factible detectar los efectos del factor a analizar y medir la respuesta de las células epiteliales tratadas con la molécula de interés.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la línea celular RCE1 (5T5) preserva una estructura proliferativa compuesta por un compartimento con células troncales, con capacidad de división celular asimétrica; y un compartimento constituido por una población de células en amplificación transitoria que gradualmente sufren diferenciación terminal.(Jensen et al., 1985; Pavlovitch et al., 1989). Aun no nos queda claro si las células en amplificación transitoria tienen la habilidad de dividirse asimétricamente. Es posible que usando como modelo las células RCE1 (5T5) podamos explorar estas cuestiones y establecer que células de la cornea atraviesan este tipo de mitosis. Por otra parte, la caracterización de estas células, podría ayudarnos en la búsqueda de marcadores moleculares que caracterizan a las células troncales corneales

## REFERENCIAS

- Alison M.R., Islam S. (2009) Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 217:144-160.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Agarwal C., Eckert R.L. (1991) Immortalization of human keratinocytes by simian virus 40 large T-antigen alters keratin gene response to retinoids. *Cancer Res.* 50(18):5947-5953
- Aono S., Legouis R., Hoose W.A., and Kempfues K.J. (2004) PAR-3 is required for epithelial cell polarity in the distal spermatheca of *C. elegans*. *Development* 131:2865-2874.
- Barrandon Y. (2007) Crossing boundaries: stem cells, holoclones, and the fundamentals of squamous epithelial renewal. *Cornea.* 26:S10-12.
- Brazil D.P., Hemmings B.A. (2000) Cell polarity: Scaffold proteins par excellence. *Curr Biol.* 16:592-594
- Betschinger J., Mechtler K., Knoblich J.A. (2003) The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature.* 422:326-330
- Betschinger J., Knoblich J.A. (2004) Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol.* 14(16):674-685.
- Bowerman B. (1998) Maternal control of pattern formation in early *Caenorhabditis elegans* embryos- Current topics in developmental biology. 39:73-117
- Castro-Muñozledo F. (1994) Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture. *J. Cell Sci.* 107:2343-2351.
- Castro-Muñozledo F., Valencia-García C., and Kuri-Harcuch W. (1997) Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 2234-2244.

- Castro-Muñozledo F. (2008) Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Exp Eye Res.* 86:459-469.
- Cayouette M., Raff M. (2003) The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development.* 130(11):2329-2339.
- Chen J.J., Tseng S.C. (1990) Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31(7):1301-1314
- Chenn A., McConnell S.K. (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-641.
- Cotsarelis G., Cheng S.Z., Dong G., Sun T.T., Lavker R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell.* 57:201-209.
- Coulombe P.A., Kopan R., Fuchs E. (1989) Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *J Cell Biol.* 109(5):2295-312.
- Davidson E.H. (2001) Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. *Development.* 113:1-26.
- Doran T.I., Vidrich A., Sun T.T. (1980) Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell.* 22:17-25
- Du Q., Stukenberg P.T., Macara I.G. (2001). A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol* 3:1069-75.
- Du Q., Taylor L., Compton D.A., Macara I.G. (2002) LGN blocks the ability of Numa to bind and stabilize microtubules: A mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Current Biology.* 12-1928-1933.
- Du Q., Macara I.G. (2004) Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMa to Heterotrimeric G proteins. *Cell.* 119:503-516.
- Emami S., Mir L., Gespach C., Rosselin G. (1989) Transfection of fetal rat intestinal epithelial cells by viral oncogenes: establishment and characterization of the E1A-immortalized SLC-11 cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(9):3194-3198.

- Etemad-Moghadam B., Guo S., Kempfues K.J. (1995) Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 83:743-752.
- Evans M.J, Kaufman M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156
- Fuchs E. (1998) Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lect* 94:47–77.
- Galvin S., Loomis C., Manabe M., Dhouailly D., Sun T.T. (1989) The major pathways of keratinocyte differentiation as defined by keratin expression: an overview. *Adv. Dermatol.* 4:277-299.
- García-Villegas R., Escamilla J., Fiorentino R., and Cereijido M. (2007) Potassium channels lost during harvesting of epithelial cells are restored with a kinetics that depends on channel species. *Cell Physiol Biochem.* 20, 405-416.
- García-Villegas R., Escamilla J., Sánchez-Guzmán E., Pastén A., Hernández-Quintero M., Gómez-Flores E., Castro-Muñozledo F. (2009). Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J Cell Physiol.* (DOI:10.1002/jcp.21771) (Published online April 3rd, 2009).
- Greenhalgh D.A., Rothnagel J.A., Roop D.R. (1994). Epidermis: an attractive target tissue for gene therapy. *J. Invest. Dermatol.* 103:63s-69s.
- Gordon M.B., Howard L., Compton D.A. (2001) Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J Cell Biol.* 152(3):425-434.
- Hawkins N., Garriga G. (1998) Asymmetric cell division: from A to Z. *Genes Dev.* 23:3625-3638
- Ham R.G., Veomett M.J. (1980) Mechanism of development. The C.V. MOSBY Co.USA. pp:843.
- Hanna C., Bicknell D.S., O'Brien J.E. (1961) [Cell turnover in the adult human eye.](#) *Arch Ophthalmol.* 65:695-8.
- Haydar T.F., Ang E. Jr., Rakic P. (2003) Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5):2890-2895.

- Hernández-Quintero M., García-Villegas R., Castro-Muñozledo F. (2002). Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in rabbit corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 74:71-82.
- Horvitz H.R., Herskowitz I. (1992) Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell.* 68(2):237-55
- Houweling A., van den Elsen P.J., van der Eb A.J. (1980) Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology.* 105(2):537-50.
- Hughes J.H., Bullock S.L., Ish-Horowicz D. (2004) Inscuteable mRNA localization is dynein-dependent and regulates apicobasal polarity and spindle length in *Drosophila* neuroblast. *Current Biology.* 14:1950-1956.
- Hung T.J., Kemphues K.J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development.* 126:127-135.
- Izaki T., Kamakura S., Kohjima M., Sumimoto H. (2006) Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:1001-1006.
- Izumi Y., Ohta N., Itoh-Furuya A., Fuse N., Matsuzaki F. (2004) Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J Cell Biol.* 164(5):729-38.
- Jensen P.K., Pedersen S., Bolund L. (1985). Basal-cell subpopulations and cell-cycle kinetics in human epidermal explant cultures. *Cell Tissue Kinet.* 18:201-215.
- Joberty G., Petersen C., Gao L., Macara I.G. (2000) [The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42.](#) *Nat Cell Biol.* 2(8):531-539.
- Jumblatt M.M., Neufeld A.H. (1983) Beta-adrenergic and serotonergic responsiveness of rabbit corneal epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24(8):1139-1143.
- Kaashoek J.G., Mout R., Falkenburg J.H., Willemze R., Fibbe W.E., Landegent J.E. (1991) Cytokine production by the bladder carcinoma cell line 5637: rapid analysis of mRNA expression levels using a cDNA-PCR procedure. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:231-235.

- Kaushik R., Yu F., Chia W., Yang X., Bahri S. (2003) Subcellular localization of LGN during mitosis: Evidence of its cortical localization in mitotic cell culture systems and its requirement for normal cell cycle progression. *Molecular Biology of the Cell*. 14: 3144-3155.
- Kemphues K.J. and Strome S. (1997) Fertilization and establishment of polarity in the embryo in *C. elegans* II (Riddle, D.L., Blumenthal, T, Meyer, B.J., and Priess, J.R., eds.) pp. 335–359, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Kisurina-Evgenieva O., Mack G., Du Q., Macara I., Khodjakov A., Compton D.A. (2004) Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. *J Cell Sci*. 117:6391-6400.
- Knoblich J.A. (2001) The *Drosophila* nervous system as a model for asymmetric cell division. *Symp Soc Exp Biol*. 53:75-89.
- Knoblich J.A. (2005) Pines for spines. *Nature Cell Biology*. 7:1157-1158
- Knoblich J.A. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division. *Cell* 132:583-597.
- Kraut R., Chia W., Jan L.Y., Jan Y.N., Knoblich J.A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature*. 383:50-55.
- Konno D., Shioi G., Shitamukai A., Mori A., Kiyonari H., Miyata T., Matsuzaki F. (2007) Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature Cell Biology*. 10:93-101
- Kohjima M., Noda Y., Takeya R., Saito N., Takeuchi K., Sumimoto H. (2002) PAR3beta, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun*. 299(4):641-646
- Kubilus J., Baden H.P. (1982) Isolation of two immunologically related transglutaminase substrates from cultured human keratinocytes. *In Vitro*. 18(5):447-55.
- Kuchinke U., Grawe F., Knust E. (1998) Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol*. 8(25):1357-1365
- Lajtha L.G. (1979) Haemopoietic stem cells: Concept and definitions. *Blood Cell*. 5:447–455.
- Lavker R.M., Sun T.T. (1982) Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science*. 215:1239-41.

- Lavker R.M., Dong G., Cheng S.Z., Kudoh K., Cotsarelis G., Sun T.T. (1991) Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32:1864-1875.
- Lehrer M.S., Sun T.T., Lavker R.M. (1998) Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *Journal Cell Science.* 111:2864-2875.
- Lechler T., Fuchs E. (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 437:275-280.
- Lees-Miller S.P. (2007) The double (strand break) life of Par-3. *Nat Cell Biol.* 9:363-365.
- Matsuzaki F. (2000) Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr Opin Neurobiol.* 10(1):38-44.
- Martin A.H. (1967) Significance of mitotic spindle fibre orientation in the neural tube. *Nature.* 216:1133-1134.
- Martin G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:7634–7638.
- Martin-Belmonte F., Mostov K. (2008) Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology.* 20:227-234.
- Merdes A., Heald R., Samejima K., Earnshaw W.C., Cleveland D.W. (2000) Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol.* 149(4):851-862
- Miller S.J., Sun T.T., Lavker R.M. (1993) Hair follicles, stem cells and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 100: 288–294,
- Miller S.J., Lavker R.M., Sun T.T. (2005) Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta.* 1756:25-52.
- Mochizuki N., Cho G., Wen B., Insel P.A. (1996) Identification and cDNA cloning of a novel human mosaic protein, LGN, based on interaction with G alpha i2. *Gene.* 181(1-2):39-43.

- Morrison S.J., Kimble J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 441:1068-1074.
- Munro E.M. (2006) PAR proteins and the cytoskeleton: a marriage of equals. *Current Opinion in Cell Biology*. 18:86-94.
- Négre R., Rampal P., Nano J.L., Cavenel C., Ailhaud G. (1983) Establishment and characterization of an epithelial intestinal cell line from rat fetus. *Exp Cell Res*. 143(2):427-437.
- Ohno S. (2001) Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*. 13:641-8.
- Ooshio T., Fujita N., Yamada A., Sato T., Kitagawa Y., Okamoto R., Nakata S., Miki A., Irie K., Takai Y. (2007) Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J Cell Sci*. 120:2352-2365.
- Pavlovitch J.H., Rizk-Rabin M., Gervaise M., Metzeau P., Grunwald D. (1989) Cell subpopulations within proliferative and differentiating compartments of epidermis. *Am J Physiol*. 256:C977-986.
- Pope K.L., Harris T.J. (2008) Control of cell flattening and junctional remodeling during squamous epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development*. 135:2227-2238.
- Porter R.M., Hutcheson A.M., Rugg E.L., Quinlan R.A., Lane E.B. (1998) cDNA cloning, expression, and assembly characteristics of mouse keratin 16. *J Biol Chem*. 273:32265-32272.
- Potten C.S., Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the Crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Potten C.S. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol*. 273:253.
- Quaroni A., Wands J., Trelstad R.L., Isselbacher K.J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol*. 80(2):248-65.
- Reddel R.R., Ke Y., Gerwin B.I., McMenamin M.G., Lechner J.F., Su R.T., Brash D.E., Park J.B., Rhim J.S., Harris C.C. (1988) Transformation of human bronchial epithelial

cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 48(7):1904-1909.

- Rheinwald J. G. (1980). Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol.* 21A:229-254.
- Schermer A., Galvin S., Sun T.T. (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.* 103:49-62
- Schermer A., Jester J.V., Hardy C., Milano D., and Sun T. T. (1989) Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation.* 42:103-110.
- Schaefer M., Shevchenko A., Shevchenko A., Knoblich J.A. (2000) A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol.* 10(7):353-62.
- Schaefer M., Knoblich J.A. (2001). Protein localization during asymmetric cell division. *Exp. Cell Res.* 271(1): 66--74.
- Scholte B.J., Kansen M., Hoogeveen A.T., Willemse R., Rhim J.S., van der Kamp A.W., Bijman J. (1989) Immortalization of nasal polyp epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Exp Cell Res.* 182(2):559-71.
- Siller K.H., Cabernard C., Doe C.Q. (2006). The NuMA protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblast. *Nature Cell Biology* 8:594-600.
- Smith C.A., Lau K.M., Rahmani Z., She Y.M., Berry D.M., Bonneil E, Thibault P, Schweisguth F., Le Borgne R., McGlade J. (2007). aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *The EMBO journal.* 26:468-480.
- Sugimoto M., Inoko A., Shiromizu T., Nakayama M., Zou P., Yonemura S., Hayashi Y., Izawa I., Sasoh M., Uji Y., Kaibuchi K., Kiyono T., Inagaki M. (2008) The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. *J. of Cell Biol.* 183:19-28.

- Sugiyama Y., Prescott A.R., Tholozan F., Ohno S., Quilan R.A. (2008) Expression and localization of apical junctional complex proteins in lens epithelial cells. *Experimental Eye Reserch*. 87:67-70.
- Sun T.T., Green H. (1973) Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell*. 14(3):469-76.
- Sun T.T., Green H. (1977) Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states. *Nature*. 269(5628):489-93
- Sun T.T., Lavker R.M. (2004) Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 9(3):202-207
- Todaro G.J., Green H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 17:299-313.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*. 282:145–1147.
- Tsai R.J., Sun T.T, Tseng S.C. (1990) Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology*. 97(4):446-55.
- Tsou M.F., Ku W., Hayashi A., Rose L.S. (2003) PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol*. 160:845-855.
- Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M., Hu W.S. (2005) Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100:12-27.
- Watt F.M. (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*. 81:100s-103s.
- Watt F.M. (1991) Cell culture models of differentiation. *FASEB J*. 5:287-294.

- Watts J.L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B.W., Mello, C.C., Priess J.R., Kemphues K.J. (1996) Par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development*. 122:3133-3140.
- Yu F., Morin X., Cai Y., Yang X., Chia W. (2000) Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell*. 100(4):399-409.
- Zhang J., Li L. (2008) Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem*. 283:9499-9503.
- Zigman M., Cayouette M., Charalambous C., Schleiffer A., Hoeller O., Dunican D., McCudden C.R., Firnberg N., Barres B.A., Siderovski D.P., Knoblich J.A. (2005) Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron*. 48:539-545.