



José Manuel Caro Vega

Tesis Doctoral

Sevilla 2020

Tesis
Doctoral

Estudio del papel de la vía Wnt-PCP en el cierre del tubo neural a nivel caudal

José Manuel Caro Vega

Sevilla 2020





Estudio del papel de la vía Wnt-PCP en el cierre del tubo neural a nivel caudal

Thesis for Doctoral Degree

José Manuel Caro Vega

Sevilla, 2020

Universidad de Sevilla



Dra. PATRICIA YBOT GONZÁLEZ, Investigadora principal y jefa del grupo de Neurodesarrollo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Investigaciones Biomédicas de Sevilla (HUVR/IBIS), como directora de la Tesis Doctoral y Dr. RICARDO PARDAL REDONDO, Profesor titular y jefe del grupo de Fisiopatología de células madre neurales, como tutor de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el licenciado José Manuel Caro Vega titulado "*Estudio del papel de la vía Wnt-PCP en el cierre del tubo neural a nivel caudal*", ha sido realizado por el bajo su dirección y supervisión en el Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Investigaciones Biomédicas de Sevilla (HUVR/IBIS), y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor con mención Internacional por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expiden el presente certificado.

Tutor:

**PARDAL
REDONDO
RICARDO -
75446171F**

Firmado digitalmente por PARDAL
REDONDO RICARDO - 75446171F
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-75446171F,
givenName=RICARDO, sn=PARDAL
REDONDO, cn=PARDAL REDONDO
RICARDO - 75446171F
Fecha: 2020.01.31 11:02:57 +01'00'

Ricardo Pardal Redondo

Directora:

**YBOT
GONZALEZ
PATRICIA -
00819786C**

Digitally signed by YBOT
GONZALEZ PATRICIA - 00819786C
DN: c=ES,
serialNumber=IDCES-00819786C,
givenName=PATRICIA, sn=YBOT
GONZALEZ, cn=YBOT GONZALEZ
PATRICIA - 00819786C
Date: 2020.02.14 08:59:23 +01'00'

Patricia Ybot González

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Neurodesarrollo del Hospital Universitario Virgen del Rocío/IBIS, y se ha financiado con los siguientes Proyectos de Investigación:

- PI14/01075: Proyecto de Investigación en Salud. Instituto de Salud Carlos III. Etiología de los defectos del tubo neural: posible implicación de la vía de señalización no canónica de Wnt en el desarrollo de Lipomielomeningocele en humanos.

- PI17/00693: Proyecto de Investigación en Salud. Instituto de Salud Carlos III. Estudio del papel de la vía no canónica de Wnt en la incidencia de lipomielomeningocele en humanos

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora de tesis la Dra. **Patricia Ybot- González** y a mi tutor el **Dr. Ricardo Pardal Redondo**, por haberme dado la oportunidad y el apoyo para realizar esta tesis doctoral. Gracias Patricia por todo este tiempo trabajando codo con codo, por haber apostado por mi, por emocionarnos esperando nuestras publicaciones y sobre todo por ser mi madre científica. Siempre positiva, luchadora y apostando por conseguir tus objetivos... y no, no es ningún peloteo.

En especial a mis compañeras/os de laboratorio y pasillo **Bea, Bea DeFe, Valle, Ana, Luis** y a mis alumnas/os **Noelia, Bea Blue, Cristina, Pablo, Miguel, Arturo, Marta**. A todos vosotros gracias por estar ahí siempre de manera incondicional y aguantarme en mis peores momentos, por ser mis compañeros de vida y por animarme siempre. En especial a mis tres Beas y Noelia, no se que hubiera sido toda esta locura sin vosotras.

A mi “*secuenciadorman*” Fran, que me ha guiado en gran parte de este trabajo. Siempre tienes un as bajo la manga para cualquier problema.

A mi gente más cercana: **Samuel, Carlos, Raúl, Israel, Iñaki, Luis, Neme, Fer, Rafa**. A aquellos que ya no están en mi vida, pero han aportado su granito de arena en muchos momentos: **José, Fran**. Gracias

Para terminar, quería prestar especial atención a mi familia, por todo su apoyo y su cariño:

A mi madre **Manuela**, por apoyarme siempre en todo y ser un ejemplo de trabajo duro. Porque para ella todo lo que pasa en tu vida está marcado por las estrellas, pero para mi la única estrella que marca mi camino eres tu.

A mi abuela **Rosa** por ser fuerte y superarlo todo. A mi abuelo **Manuel** que... gracias abuelo. Aunque para vosotros yo este trabajando con “bichos” y solo me decíais “A ver cuando curas el cáncer”. Gracias

A mi hermana **Sandra** y mi prima **Rosa**, por ser valientes, luchadoras y fuertes.

Summary

The last stage of neural tube (NT) formation involves closure of the caudal neural plate (NP), an embryonic structure formed by neuromesodermal progenitors and newly differentiated cells that becomes incorporated into the NT. Here, we show in mouse that, as cell specification progresses, neuromesodermal progenitors and their progeny undergo significant changes in shape prior to their incorporation into the NT. The caudo-rostral progression towards differentiation is coupled to a gradual reliance on a unique combination of complex mechanisms that drive tissue folding, involving pulses of apical actomyosin contraction and planar polarised cell rearrangements, all of which are regulated by the Wnt-PCP pathway. Indeed, when this pathway is disrupted, either chemically or genetically, the polarisation and morphology of cells within the entire caudal NP is disturbed, producing delays in NT closure. The most severe disruptions of this pathway prevent caudal NT closure and result in spina bifida. In addition, a decrease in *Vangl2* gene dosage also appears to promote more rapid progression towards a neural fate, but not the specification of more neural cells.

The *Vangl2* mutation in mouse also shows morphological alterations during the neural tube closure, displaying a flexion in neural folds preventing their fusion, forming cellular aggregates that were the cause of an abnormal migration of NCCs. The frequency of these aggregates in *Vangl2^{+Lp}* was increased in double mutants for Wnt-PCP signaling pathway, as well as in mutants of wound healing process, together with *Vangl2*. This points out the importance of actin filaments polymerization and cytoskeleton reorganization in neural tube closure and cellular aggregate formation. Finally, these cellular aggregates could form a tumor, similar to a lipoma primordium that appears in lipomyelomeningocele (LMMC) in humans. The strong genetic and functional evidence of the role of *Vangl2* in NTD development in *Vangl2^{+Lp}* mouse mutant leads us to evaluate the possible implication of *VANGL2* in the appearance of NTD in humans. By analyzing the coding sequence of *VANGL2* three silent mutations were found. The study of this regulatory zone showed two unidentified variants, exclusive of patients, which appeared in heterozygosis in 1/58 and in 3/58 of patients with LMMC, the latter being a novel variant.

Índice

Introducción	1
1. Desarrollo embrionario temprano en mamíferos	3
2. Desarrollo embrionario.	7
2.1 Formación del sistema nervioso central	7
2.1.1 <i>Proceso de Neurulación: Neurulación primaria</i>	8
<i>Mecanismo de cierre del tubo neural</i>	8
<i>Mecanismo de cierre del PNP</i>	10
2.1.2 <i>Proceso de Neurulación: Neurulación secundaria</i>	11
2.1.3 <i>Defectos del tubo neural</i>	12
<i>Espina bífida oculta (SBO).</i>	12
<i>Etiología de los DTN</i>	13
2.2 Cresta neural	14
2.2.1 <i>Delaminación</i>	15
2.2.2 <i>EMT</i>	16
2.2.3 <i>Determinación y diferenciación del destino de las NCCs</i>	18
3. Procesos celulares implicados en neurulación y su regulación molecular	19
3.1 Procesos celulares implicados en el cierre del tubo neural	19
3.1.1 <i>Regulación del proceso de extensión convergente (EC)</i>	19
3.1.2 <i>Contracción apical de actina</i>	21
3.1.3 <i>Fusión epitelial</i>	21
3.2 Regulación molecular del proceso de neurulación	22
3.2.1 <i>Vía de señalización Wnt</i>	22
<i>Vía no canónica o Wnt-PCP</i>	23
<i>Regulación de la vía Wnt/PCP y neurulación</i>	24
3.2.2 <i>Familia TGF-β</i>	25
3.2.3 <i>Platelet derived growth factor (PDGF)</i>	25
3.2.4 <i>Glucosaminoglicanos</i>	26
Objetivos	27
Materials and methods	31
1. Mouse strains	33

2. Embryo extraction and culture	34
3. Embryo genotyping	34
4. General morphology, histological analysis and expression study of embryos and Foetuses.....	36
4.1 Tissue preservation	36
4.2 Analysis of external malformations.....	36
4.3 Histological analysis	36
4.4 Morphological measurements	36
4.5 In situ hybridization	40
4.6 Immunohistochemistry	41
4.7 Statistical analysis.....	43
4.8 General techniques used for molecular studies of genomic DNA.....	44
<i>4.8.1. DNA extraction from peripheral blood</i>	<i>44</i>
<i>4.8.2. DNA extraction from the oral mucosa</i>	<i>44</i>
<i>4.8.3. Genomic DNA amplification by PCR</i>	<i>45</i>
<i>4.8.4. Gel electrophoresis</i>	<i>46</i>
<i>4.8.5. Automatic sequencing of PCR products.....</i>	<i>47</i>
4.9. Bioinformatics Tools.....	48
<i>4.9.1. Databases.....</i>	<i>48</i>
<i>4.9.2. Nomenclature of sequence variants</i>	<i>48</i>
<i>4.9.3. Sequence analysis</i>	<i>48</i>
<i>4.9.4. Analysis of the pathogenicity of sequence variants</i>	<i>49</i>
Result 1: Wnt-PCP pathway in the PNP.....	51
Introduction	53
1.1 Preliminary results.....	54
<i>1.1.1. Different elements of the Wnt-PCP signalling pathway are expressed during spinal neurulation.....</i>	<i>54</i>

1.1.2. Alterations to the Wnt-PCP pathway affect the PNP morphology.....	55
1.1.3. Alterations to the Wnt-PCP pathway affect actin distribution ..	58
1.1.4. Altered PNP morphology as a consequence of mutations in the Wnt-PCP pathway leads to spina bifida.....	60
1.1.5. Disruption of the Wnt-PCP pathway affects apical cell morphology.....	61
1.2 Results	64
1.2.1. Alterations to the Wnt-PCP pathway affect the PNP morphology.....	65
1.2.2. Alterations to the Wnt-PCP pathway affect actin distribution ..	65
1.2.3. The Wnt-PCP pathway controls shaping of the PNP by apical cell constriction and cell reorganisation into rosettes	68
1.2.4. NMP fate in the PNP is not determined by the <i>Vangl2</i> genotype.....	75
1.3 Discussion	80
 Resultado 2: Repercusión de alteraciones genéticas de la vía Wnt-PCP en la morfología del tubo neural tras el cierre del PNP (E10.5-E14.5)	87
Introducción.....	89
 2.1 Análisis histológico a E10.5-E14.5.....	89
2.2 Microarray: Análisis de expresión diferencial entre embriones <i>Vangl2</i>^{+/+} vs <i>Vangl2</i>^{+Lp}.....	93
<i>Análisis de expresión diferencial y análisis funcional. Estudio de procesos y rutas desregulados</i>	<i>94</i>
2.3 Estudio del origen del agregado celular	99
2.4 Estudio de expresión de <i>Sox10</i>. Seguimientos de NCCs migratorias..	101
2.4.1 Localización y número de agregados celulares en los diferentes estadios.....	101
2.4.2 Diferenciación de las NCCs que forman el agregado celular ..	108
2.4.3 Expresión de <i>Sox10</i> en otras regiones del tubo neural.....	113

2.5 Implicación de diferentes procesos que pueden conllevar a la aparición y evolución del agregado en las diferentes edades	115
2.5.1 <i>Estudio del proceso de cicatrización embrionaria “wound healing” durante la formación del agregado.....</i>	117
2.5.2 <i>Estudio de proliferación y muerte celular en el agregado.....</i>	109
2.5.3. <i>Evolución fenotípica del agregado.....</i>	118
2.6 Frecuencia en relación a dobles mutantes de la vía Wnt-PCP y otros mutantes de SB	119
2.6.1 <i>Frecuencia de aparición del agregado en el mutante $Vangl2^{+/Lp}$</i>	119
2.6.2 <i>En los dobles mutantes de la vía Wnt-PCP: $Vangl2^{+/Lp}/Daam1^{+/gt}$ y $Vangl2^{+/Lp}/Daam1^{gt/gt}$ se aumenta la incidencia del agregado celular.....</i>	120
2.6.3 <i>Análisis de aparición del agregado en otros mutantes de espina bífida: mutaciones en $Grhl3$ aumenta la aparición de EBO y del agregado celular</i>	122
<i>Estudio de aparición del agregado en mutantes $Grhl3^{Ct/Ct}$ y aumento en la frecuencia de aparición en los dobles mutantes $Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}$</i>	123
<i>Estudio de los defectos de flexión de la cola y defectos del tubo neural en $Grhl3^{Ct/Ct}$ y $Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}$</i>	124
2.7 Discusión.....	126
Resultado 3: Análisis genético del gen $VANGL2$ en pacientes con lipomielomeningocele y a sus progenitores.....	139
Introducción.....	141
3.1 Objetivos del estudio.....	143
3.2 Pacientes y controles.....	144
3.3 Resultados	144
3.3.1 <i>Secuenciación de la región codificante del gen $VANGL2$.....</i>	145

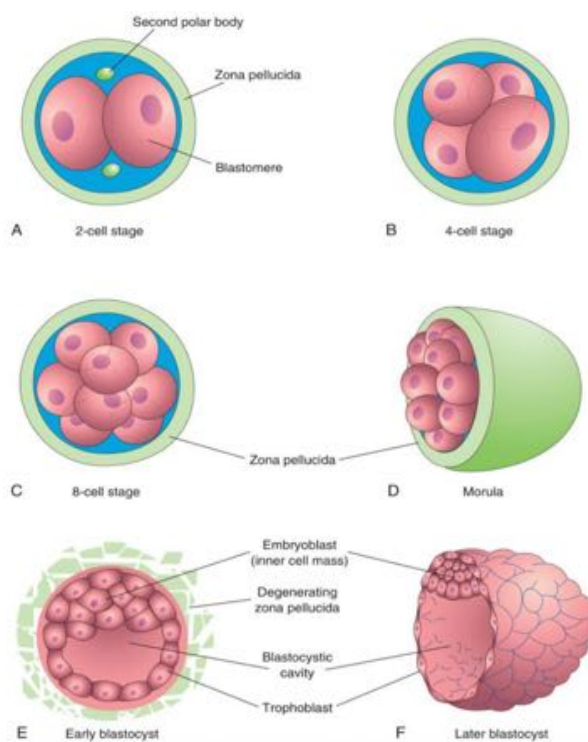
3.3.2 <i>Análisis de la patogenicidad de las variantes de secuencia</i>	150
3.3.3 <i>Secuenciación de zonas reguladoras: promotor del gen VANGL2</i>	151
3.3.4 <i>Estudio de relación de polimorfismos y combinaciones de riesgo</i>	154
3.4 <i>Discusión</i>	158
General conclusions	163
Bibliografía	167
Apéndice I. Publicaciones	197

Introducción

Introducción

1. Desarrollo embrionario temprano en mamíferos

La fertilización es el proceso por el cual el gameto masculino y femenino se fusionan para crear un nuevo organismo con potenciales genéticos derivados de ambos padres (Gilbert 2000). Después de la fertilización, el cigoto atraviesa una serie de divisiones mitóticas que conducen a células más pequeñas y nucleadas llamadas blastómeros, que dan lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios (Gilbert 2000; Zernicka-Goetz 2005). En la etapa de 8 células, los blastómeros comienzan a



maximizar el contacto entre ellos formando una estructura sólida a través de un proceso llamado de compactación. En esta etapa las células se dividen y forman la mórula (etapa de 16 células; Fig. 1D). Las células externas de la mórula dan lugar al trofoblasto (Fig. 1E), que no produce estructuras embrionarias, mientras las células internas forman la masa celular interna que va a generar el embrión (Fig. 1F).

Figura 1. Desarrollo de un embrión de mamífero desde la fertilización hasta el blastocisto. Después de la fusión del pronúcleo femenino y masculino comienza el proceso de escisión (Moore 2015).

La masa celular interna se segrega en un disco embrionario bilaminar que consta de dos capas epiteliales, epiblasto (dorsal) e hipoblasto (ventral, Fig. 2). El hipoblasto da lugar al endodermo extraembrionario, el precursor del saco vitelino. En esta etapa, el trofoblasto se ha diferenciado en 2 capas: el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, los

precursores de las membranas extraembrionarias (Gilbert 2000; Sadler 2012; Zernicka-Goetz 2005).

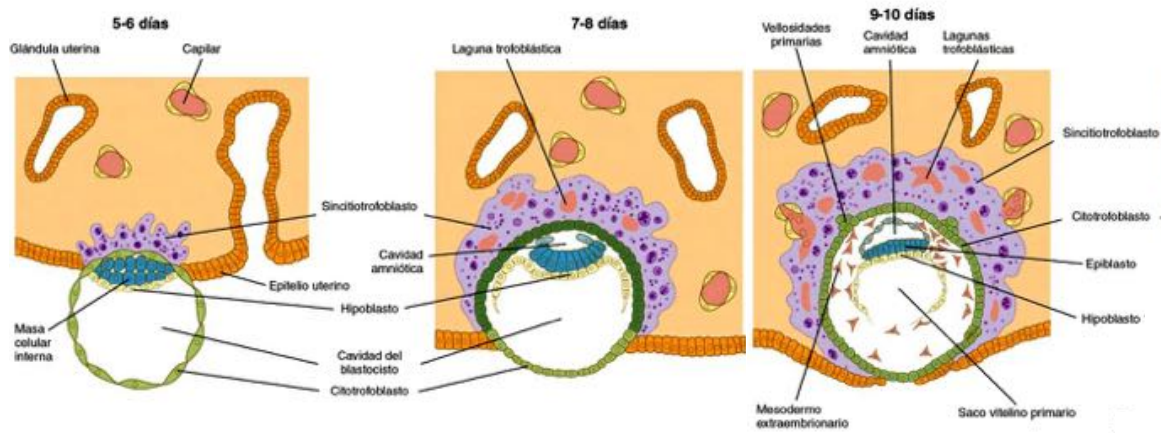


Figura 2. Esquemas de la formación del embrión bilaminar y etapas del proceso de implantación en humanos. 5-6 días: Diferenciación del hipoblasto a partir del macizo celular interno. El sincitiotrofoblasto inicia la invasión del estroma endometrial. 7-8 días: La mayor parte del embrión se encuentra incluido en el endometrio. Comienza a surgir la cavidad amniótica y el saco vitelino. 9-10 días: Diferenciación de las dos láminas que componen el disco embrionario: epiblasto e hipoblasto. Comienza a aparecer el mesodermo extraembrionario. Adaptada de (Carlson 2009).

Gastrulación. Capas germinales y formación de la línea primitiva

La gastrulación es el proceso mediante el cual se establecen las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo). El establecimiento del eje anteroposterior es un paso importante para generar el eje corporal de los vertebrados. En los mamíferos, este eje está marcado por la línea primitiva, que aparece al comienzo de la gastrulación como un engrosamiento del epiblasto en la región posterior del embrión. Esta línea primitiva se forma por la entrada de precursores endodérmicos del epiblasto al blastocele y por la migración de células del epiblasto lateral al centro (Fig. 3; Tam 1997; Gilbert 2000)

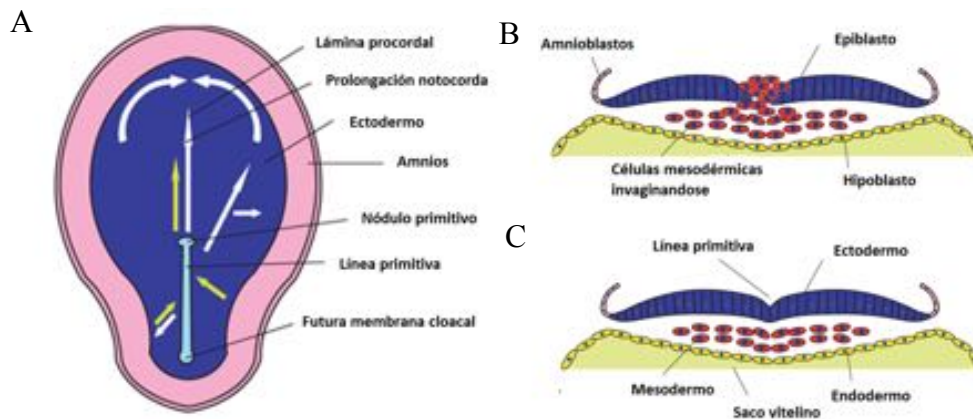


Figura 3. Esquemas de un embrión humano de 16 días. (A) Vista dorsal, en el que se ha omitido el amnios para exponer el disco embrionario. (B-C) Corte transversal que permite evidenciar la migración de las células mesenquimáticas desde la línea primitiva para desplazar al hipoblasto y dar origen al endodermo embrionario y posteriormente al mesodermo. Adaptada de (Sadler 2012).

En el extremo anterior de la línea primitiva se localiza el nódulo primitivo o nodo, un centro organizador embrionario (Ferrer-Vaquero 2010; Gilbert 2000). Las primeras células que migran son las situadas en la región más anterior de la línea primitiva y se introducen en el hipoblasto, desplazando sus células para formar el **endodermo** embrionario. Posteriormente, las células del epiblasto, que siguen invaginándose por la línea primitiva, se ubican entre el epiblasto y el endodermo recientemente formado para dar lugar a los mesodermos intra y extraembrionario. Estudios de marcado molecular de células han determinado que la migración celular sucede en un orden establecido: las primeras en migrar forman el **mesodermo paraxial** (paralelo al eje), luego, migran las que dan lugar al **mesodermo intermedio** y **lateral**, y por último, las que formarán el **mesodermo extraembrionario**, que recubre el trofoblasto y el saco vitelino (Fig. 4). Finalmente, un grupo de células del epiblasto se invagina por el nódulo primitivo y se desplaza hacia el eje anterior dando lugar al **mesodermo axial o cordamesodermo**, formando la estructura que caracteriza a los cordados: la **notocorda**, que proporciona soporte estructural al eje anteroposterior del embrión. Una vez concluida la gastrulación, el epiblasto que no invaginó se transforma en **ectodermo**. De esta manera, el mesodermo intraembrionario se interpone entre el ectodermo y el endodermo, constituyéndose un embrión trilaminar.

Estas tres capas germinales son las precursoras de diferentes estructuras durante la organogénesis (Gilbert 2000; Arkell 2012):

- **Endodermo**: esta capa forma, entre otros, el revestimiento epitelial de los tractos gastrointestinal y respiratorio, parénquima de las amígdalas, hígado, páncreas, pulmón, timo, tiroides, paratiroides y saco vitelino.

- **Mesodermo**: esta capa se divide en:

a) **Mesodermo paraxial**, que forma las somitas que se subdividen y diferencian para dar lugar a los precursores del esqueleto axial, los músculos del tronco, la dermis de la piel, los huesos específicos del cráneo y los músculos esqueléticos de las regiones de cabeza y cuello. El mesodermo paraxial contribuye, también, al desarrollo del corazón.

b) **Mesodermo intermedio**, que forma el sistema urogenital, los riñones, las gónadas y sus respectivos sistemas de conductos.

c) El **mesodermo de la placa lateral**, que da lugar al sistema circulatorio, contribuye al músculo liso y los tejidos conectivos de los órganos respiratorios y digestivos, huesos, ligamentos y tejido conectivo de las extremidades, entre otros.

- **Ectodermo**: esta capa origina el sistema nervioso central y periférico, los epitelios sensoriales del ojo, el oído y la nariz, la epidermis y las glándulas mamarias y subcutáneas.

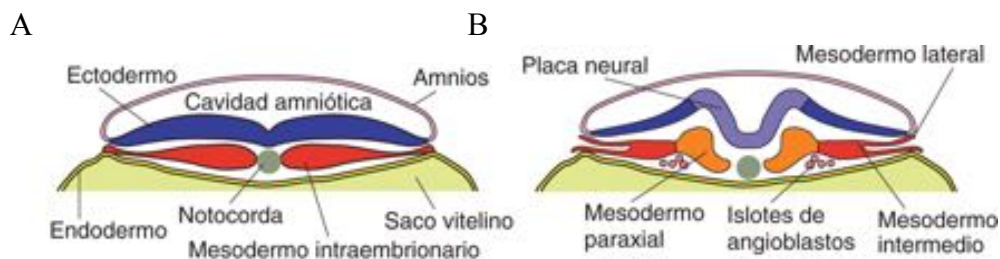


Figura 4. Esquemas de un embrión humano de 17-19 días. (A) Corte transversal de un embrión de 17 días. Formación del mesodermo intraembrionario. (B) Corte transversal de un embrión de 19 días. Formación del mesodermo paraxial, intermedio y lateral. Aparición de la placa neural. Adaptada de (Paniagua 2017).

2. Desarrollo embrionario

2.1 Formación del sistema nervioso central

A partir de una zona diferenciada del ectodermo, situada en la línea media del disco embrionario, dorsal a la notocorda, se forma la **placa neural** (Fig. 4). La formación de dicha estructura está inducida por el nodo, que suprime el destino epidérmico del ectodermo (Jessell 2000; Stern 2005), así, las células de esta placa neural conformarán el neuroectodermo que dará lugar al futuro **sistema nervioso central** (Copp 2003; Purves et al. 2001). Mediante el proceso de **Neurulación**, la placa neural se pliega sobre si misma y se une en su región dorsal, fusionándose para formar el **tubo neural (TN)**, precursor del cerebro y la médula espinal en vertebrados (Fig. 5). En humanos, este proceso comienza en la tercera semana de gestación post-fertilización, tras la gastrulación (Sadler 2005). Este fenómeno es complejo, implica numerosos procesos celulares y en ocasiones es interrumpido, resultando en **defectos del tubo neural (DTN)**, la segunda causa más frecuente de malformaciones congénitas (Sadler 2005). La mayoría de los defectos se consideran de origen multifactorial y aunque se han descrito en gran medida los eventos celulares responsables de la neurulación, todavía se desconoce el control molecular de la misma. Así, es importante comprender la regulación de este proceso, debido a la importancia clínica de los DTN.

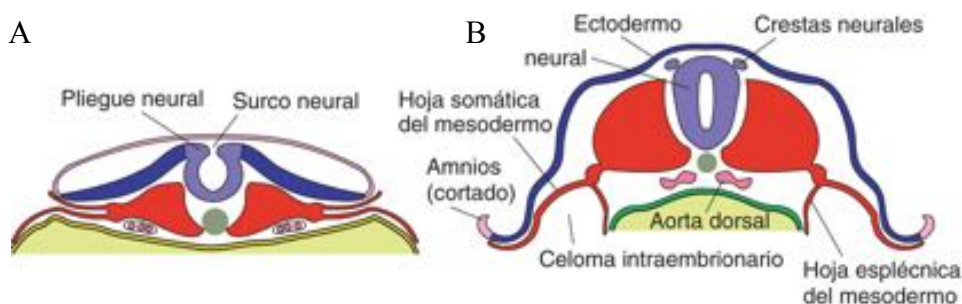


Figura 5. Esquemas de un embrión humano de 20-21 días. (A) Corte transversal de un embrión de 20 días. Formación de los pliegues neurales y el surco neural. (B) Corte transversal de un embrión de 21 días. Formación del tubo neural y las crestas neurales. Adaptada de (Paniagua 2017).

2.1.1 Proceso de Neurulación: Neurulación primaria

Mecanismo de cierre del tubo neural

El mecanismo de cierre del TN en ratón ocurre de manera secuencial a partir de tres puntos a lo largo del eje corporal (Fig. 6). Cuando el embrión tiene entre 6-7 pares de somitas, se produce la fusión de los pliegues neurales entre el futuro rombencéfalo y la columna cervical (cierre 1). Más tarde se produce la fusión en el límite entre el futuro prosencéfalo y mesencéfalo (cierre 2) y en la extremidad rostral del futuro cerebro anterior (cierre 3). Las regiones abiertas de los pliegues neurales que quedan entre los puntos de inicio de cierre se denominan neuroporos, los cuales van cerrando progresivamente a modo de cremallera, bidireccionalmente desde los cierres 1 y 2 y en dirección caudal desde el cierre 3. El cierre del neuroporo anterior (entre cierre 2 y 3) y del rombencéfalo (entre cierre 1 y 2) se produce previamente al cierre del neuroporo posterior (o PNP del inglés “posterior neuropore”), un proceso impulsado por una serie de contracciones del tejido controladas por un cableado de actina apical, plegamientos tisulares y migraciones celulares que constituyen el paso final de la neurulación primaria (Martin 2004). En embriones humanos, a los 17-18 días después de la fecundación, el

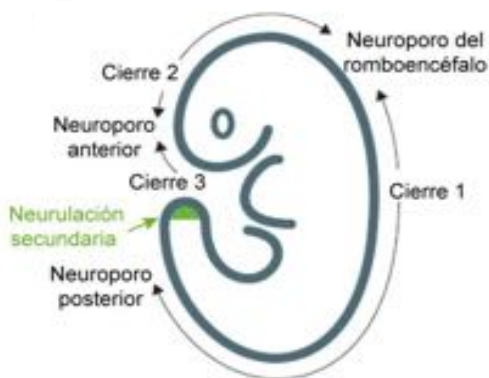


Figura 6. Puntos de cierre del tubo neural primario y neurulación secundaria en ratón. En verde, se representa la región caudal donde tiene lugar la neurulación secundaria (modificada de Copp 2013).

cierre del TN se inicia en un sitio que se parece al cierre 1 en ratón, seguido del cierre desde el extremo rostral de la placa neural (comparable al cierre 3 en ratones; Copp 2013). En humanos, todo el proceso tiene lugar entre los días 17-28 post-fertilización; en ratón, entre E8.5-E10 (Copp 2013).

Para que se den estos tres puntos de cierre es necesario una elevación de la placa neural (Fig. 7A), que se flexiona en los denominados “puntos de bisagra”. La constricción celular que forman estos puntos de bisagra requiere cambios en la forma de la célula, que involucran al citoesqueleto, así como cambios en la posición de los núcleos y en el número de células (Gilbert 2000). El plegamiento se inicia en un punto medio de bisagra (MHP, del inglés,

medial hinge point), donde las células se anclan a la notocorda y forman un surco en la línea media dorsal (Fig. 7B).

Las células de la zona MHP forman una bisagra, generando la división de la placa neural en dos regiones simétricas denominadas pliegues neurales, que comienzan a elevarse (Fig. 7C). Se produce entonces otra flexión en los puntos dorso laterales de bisagra (DLHP, del inglés, *dorsolateral hinge points*; Fig. 7D), cuyas células permanecen ancladas al ectodermo superficial de los pliegues neurales y adquieren un plegamiento apical que contribuye a crear un surco longitudinal de la placa neural (Gilbert 2000; Shum 1996; Ybot-Gonzalez 1999). En comparación con el MHP, la posición exacta de estos DLHPs varía a lo largo del eje rostrocaudal. En la zona craneal este punto aparece una vez la placa neural ya se ha elevado y su localización en esta zona concreta cambia entre especies, por lo que aun no se conocen sus marcadores moleculares específicos. Mientras, en la zona más caudal, durante el cierre del PNP, los DLHPs aparecen a partir del día E9 en embrión de ratón (Yamaguchi 2013; Shum 1996).

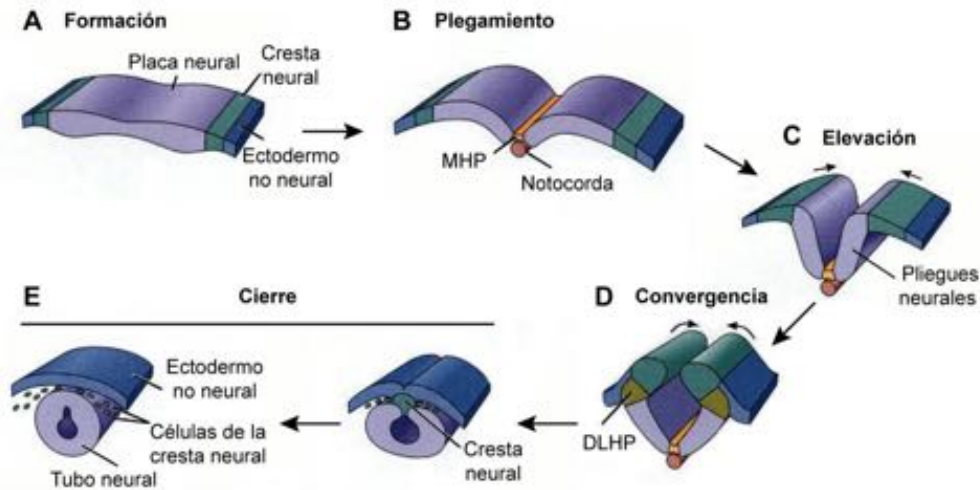


Figura 7. Representación de la neurulación primaria. (A) Formación de la placa neural. (B) Plegamiento por el punto medio de bisagra o MHP. (C) Elevación de los pliegues neurales. (D) Flexión por los puntos dorsolaterales de bisagra o DLHP. (E) Fusión de los pliegues. El tubo neural queda cubierto por el ectodermo. Modificada de (Gilbert 2000).

Mecanismo de cierre del PNP

El análisis de secciones transversales del PNP en embriones de ratón refleja 3 modos diferentes de cierre a medida que avanza el desarrollo. A las 12-15 somitas la placa neural se eleva desde el punto MHP, formando una estructura en forma de V (Modo 1, Fig. 8B). Entre las 17-25 somitas se establece una nueva morfología de los pliegues neurales que incluye el MHP y DLHPs, que facilitan el cierre durante el proceso del giro embrionario (Modo 2, Fig. 8C). En embriones con 24-27 somitas, casi al final de la neurulación primaria, la placa neural solo mantiene la flexión en los DLHPs (Modo 3, Fig. 8D; Shum 1996).

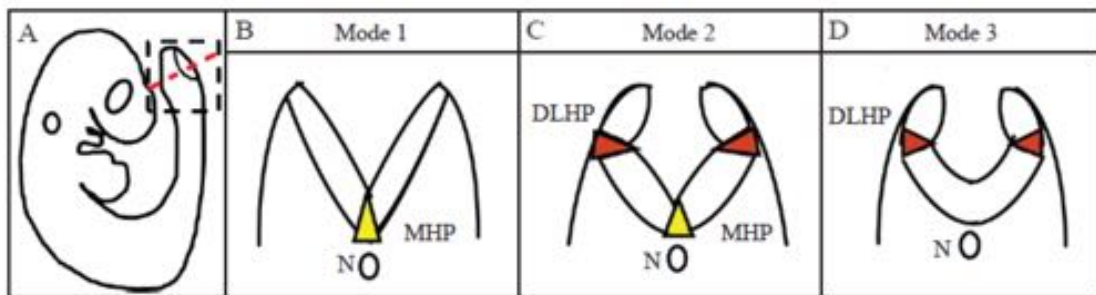


Figura 8. Representación esquemática de secciones transversales del PNP. (A) Representación de un embrión de ratón, donde el área del PNP se señala mediante un cuadro discontinuo. (B-D) Secciones transversales del PNP tomadas al nivel indicado por la línea discontinua en A. (B) Modo 1 caracterizado por la presencia del MHP (área amarilla) y por la forma en V de los pliegues neurales. (C) Modo 2 caracterizado por la presencia de MHP (área amarilla), DLHPs (áreas rojas) y por la forma de diamante del tubo neural. (D) El modo 3 se caracteriza por la ausencia de MHP, manteniendo los DLHPs (áreas rojas) y por la forma circular del tubo neural. N: notocorda. Adaptado de (Ybot-Gonzalez 2007).

Finalmente, tiene lugar la fusión de los pliegues neurales, los cuales se cubren superficialmente por el ectodermo que flanquea la placa neural (Ten 2014; Yamaguchi 2013; Copp 2003). Esta nueva conectividad tisular entre los pliegues neurales se produce por **fusión epitelial**, un proceso esencial de la morfogénesis de tejidos en vertebrados e invertebrados, evolutivamente conservado, a través del cual se produce la unión de láminas epiteliales en sus bordes, para formar una capa epitelial continua (Pai 2012; Martin 2004). Así, defectos en la maquinaria genética que controla el proceso de fusión epitelial conducen a malformaciones congénitas de importancia clínica tales como DTN (Pai 2012), defectos de cierre en la hendidura del ojo o coloboma (Weston 2003), desarrollo incompleto del labio superior presentando una hendidura o labio leporino (Ray

2012), así como hipospadias, un defecto de nacimiento en varones en el cual la abertura de la uretra se encuentra desplazada (Shen 2016).

En relación al proceso de fusión epitelial, como proceso natural que ocurre en el organismo, encontramos el proceso de curación de heridas o WH (del inglés “*wound healing*”; Martin 2004), que utiliza la misma maquinaria que la fusión epitelial. Así, el estudio de los principios genéticos que promueven la fusión durante el desarrollo embrionario permite conocer el proceso de WH, y viceversa.

2.1.2 Proceso de Neurulación: Neurulación secundaria

Tras la neurulación primaria, se genera una transición para dar lugar a una neurulación secundaria, limitada a la zona más caudal del TN (Fig. 9). Esta neurulación secundaria ocurre por una proliferación y condensación de células madre, seguido de un proceso de cavitación. Esta cavitación da lugar a un segundo TN que se unirá al canal central del TN formado durante la neurulación primaria (revisado por Greene 2009). En humanos la neurulación secundaria comienza en el estadio 12 de Carnegie (sobre el día 26 tras la fertilización). Cuando esta parte del TN se ha formado completamente comienza el proceso de disyunción, momento en el que el ectodermo neural se separa completamente del ectodermo epitelial y el mesodermo migra situándose entre ambas capas de ectodermo (Sadler 2005; Saitsu 2008)

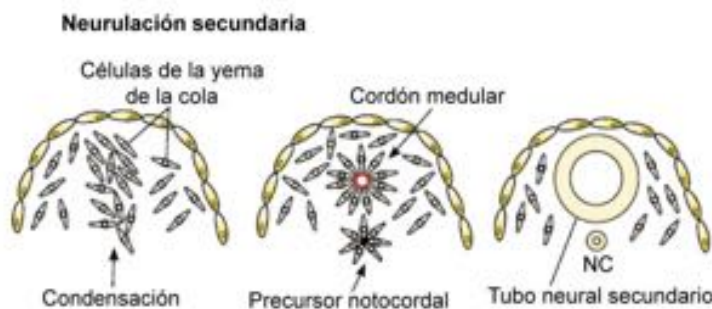


Figura 9. Representación de la neurulación secundaria. NC, notocorda. Adaptada de Nikolopoulou 2017.

2.1.3 Defectos del tubo neural

Los fallos en la neurulación primaria provocan una ausencia en la unión de los pliegues neurales dando lugar a los defectos del tubo neural (DTN). Estos se clasifican según la zona del eje anteroposterior donde se produzca el defecto. Cuando el defecto se da en el primer punto de cierre aparece la **craneorraquisquisis**, el DTN más grave, en el que permanece abierta la región desde el mesencéfalo hasta la región espinal. El fallo de fusión del TN craneal causa **anencefalia o exencefalia**, la cual se asocia a menudo con la malformación de la cara dividida cuando la perturbación tiene lugar en el cierre 3. En la parte más caudal del eje corporal, el fallo en el cierre del PNP provoca **espina bífida abierta**, único DTN compatible con la vida (Mitchell 2005). En relación a esto encontramos alrededor de 300 cepas mutantes de ratón donde el 20% presenta riesgo de exencefalia y espina bífida abierta o ambas, similar a la mayoría de DTN en humanos, del porcentaje restante el 70% presenta exencefalia, el 5% espina bífida y el otro 5% craneorraquisquisis (Harris 2007; Juriloff 2018). Existen otros defectos que aparecen por fallo del cierre del TN o el mesodermo subyacente, tales como **espina bífida oculta** (SBO), que ocurre durante el proceso de transición entre la neurulación primaria y secundaria y recibe su nombre porque el defecto aparece recubierto por la piel. Otro defecto, denominado **encefalocele**, consiste en una extrusión de tejido neural a través de un fallo en la formación del TN (Juriloff 2018; Copp 2013).

En cuanto a la prevalencia de estos defectos, encontramos variación geográfica y temporal, existiendo también diferencias entre razas y etnias. Por ejemplo, en California, la prevalencia de DTN fue superior en la población hispana (1.12/1000), más baja en la población negra y asiáticos (0.75/1000), e intermedia en los hispanos no caucásicos (0.96/1000; Mitchell 2005). En Europa, la prevalencia de los DTN aumenta hasta 9/10000 nacimientos (Zaganjor 2016).

Espina bífida oculta (SBO)

Su forma más frecuente es el mielomeningolipoma o lipomielomeningocele (LMMC). En estos casos el TN derivado del neuroectodermo no ha podido separarse de las estructuras del mesodermo, lo que provoca un anclaje de la médula y con ello un daño tanto de dicha médula como de las raíces distales. Este LMMC consiste en una

acumulación anormal de grasa en la parte más caudal de la médula espinal, comenzando debajo de la piel y extendiéndose a través de una abertura anómala en la médula espinal. Aunque puede ser asintomático, la historia natural de esta malformación suele estar acompañada de una progresión sintomática, desde una disfunción de la vejiga hasta síntomas motosensoriales en la adolescencia (Hertzler 2010). Esta patología afecta más a mujeres que a hombres, en una proporción de 1.5:1 y sus lesiones son evidentes desde los primeros años de vida (Sarris 2012).

Etiología de los DTN

La etiología de los DTN resulta compleja y no se conoce con exactitud. Sin embargo, numerosos estudios sugieren un origen multifactorial en el que están involucrados tanto factores genéticos como medioambientales. Existen varias evidencias a favor de una contribución genética significativa en el desarrollo de los DTN, siendo una de ellas el aumento en el riesgo de recurrencia (2-5%) en hermanos de pacientes con DTN en comparación al riesgo en la población general (0.1%). A pesar de la gran evidencia del componente genético de los DTN, por ahora no se ha identificado ningún gen claramente responsable. La conexión genética más sólida es con el gen que codifica a la 5,10-metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), una enzima implicada en el metabolismo intracelular del ácido fólico. Se han identificado dos polimorfismos genéticos (SNPs, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) localizados en este gen, los cuales aumentan el riesgo de DTN (Copp 2013; Padmanabhan 2006).

Respecto a los factores no genéticos, se han identificado varios factores de riesgo medioambientales y relacionados con el estado nutricional de la madre. Se ha demostrado que el ácido valproico, un agente anticonvulsivo ampliamente utilizado, y la hipertermia materna tienen un efecto teratógeno aumentando el riesgo de DTN durante el primer trimestre del embarazo. La deficiencia en la absorción o disponibilidad de folato, vitamina B12 y la diabetes mellitus materna también se han identificado como factores de riesgo de los DTN (Sadler 2012). Cabe destacar que una serie de estudios en ratón demostraron que la deficiencia de folato solo causa DTN en presencia de una predisposición genética, lo que pone en evidencia la interacción existente entre gen-ambiente en la etiología de estos defectos (Padmanabhan 2006; Copp 2010).

Está ampliamente demostrado que la suplementación con ácido fólico en la dieta materna reduce la probabilidad de aparición de DTN en el feto. Una dosis preconcepcional de 4 mg de ácido fólico/días reduce en un 72% la aparición de DTN (Van Gool 2018) en humanos, aunque el mecanismo embrionario de la acción de este continúa sin estar claro (Martin 2019). Algunos de estos defectos, como la espina bífida abierta, ha disminuido su incidencia en la población notablemente. Sin embargo, el 30% restante de los DTN resultan resistentes a la suplementación con folatos. Encontrar una asociación entre factores de riesgo y enfermedad supondría un gran avance a la hora de poder realizar un diagnóstico prenatal precoz.

2.2 Cresta neural

Una vez conformado el TN aparece una población de células en la región más dorsal del mismo llamadas células de la cresta neural (NCCs, del inglés, “neural crest cells”). La formación de las NCCs comienza con una inducción de la placa neural y sus bordes, mediado en parte por la señal de las BMP (del inglés “bone morphogenetic protein”), que actúan en la formación del tubo neural mediante un gradiente, especificando el ectodermo neural, el no neural, y la zona de inducción de cresta neural entre ambos (Mayor 1995; Wilson 1997; Marchant 1998). Estos bordes adquieren el potencial para formar NCCs como resultado de señales como *Wnt*, *fibroblast growth factor* o (FGF) o ácido retinóico procedentes del ectodermo, el mesodermo paraxial o ambos (Mayanil 2013; Sela-Donenfeld 1999).

Estas células embrionarias, que se definen por su capacidad migratoria, pluripotencialidad y expresión y regulación por parte de genes específicos, se diferencian desde el neuroectodermo y se desprenden del TN para experimentar una migración que tiene lugar tras una transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés, *epithelial mesenchymal transition*). Durante este proceso las NCCs van perdiendo capacidad de adhesión con su entorno, segregándose desde el neuroepitelio y adquiriendo carácter mesenquimal (Theveneau 2012; Bronner 2012). En última instancia, estas células migran a diferentes regiones del embrión en desarrollo, para su posterior diferenciación en neuronas y otros derivados de células neurales, ganglios del sistema nervioso periférico, hueso y cartílago de las mandíbulas, células pigmentarias o células gliales, entre otros (Kalluri 2009). Para que esto ocurra se necesita una actuación coordinada entre proteínas

de adhesión junto con componentes del citoesqueleto, proteínas de la membrana extracelular y factores de transcripción segregados desde la notocorda. Dicha transición de epitelio a mesénquima implica tres eventos importantes: (1) Delaminación, donde las NCCs se separan de las células neuroepiteliales vecinas; (2) Transición epitelial a mesénquima (EMT), una serie de eventos a nivel molecular que dirigen el cambio de fenotipo epitelial a mesenquimal, y (3) Determinación y diferenciación del destino de las células NCCs (Mayanil 2013).

2.2.1 Delaminación

Para que las NCCs se desprendan e inicien el proceso de migración desde la zona dorsal del tubo neural debe producirse una pérdida de adhesión. Para ello, las proteínas de adhesión célula-célula de los desmosomas y célula-membrana basal de los hemidesmosomas deben actuar de forma coordinada junto con componentes del citoesqueleto, proteínas de la matriz extracelular y factores de transcripción con el objetivo de eliminar las uniones y modificar sus propiedades neuroepiteliales. Este evento de delaminación es desencadenado por la activación de vías de señalización como la de BMP y la Wnt canónica, que involucra a Bmp4, Wnt1, Msx1 y c-Myb, lo que promueve la delaminación mediante la activación de ciertos genes específicos, como los factores de la familia Snail.

La vía de señalización BMP está regulada por Noggin, un antagonista específico de BMP (Zimmerman 1996). Noggin muestra un gradiente de expresión dinámico a lo largo del eje rostrocaudal, concretamente en el TN dorsal, que coincide precisamente con el inicio de la migración de las NCCs. Esto sugiere que la actividad de BMP puede ser regulada espacial y temporalmente por Noggin, en relación con la delaminación (Duband 2006). Las NCCs muestran una actividad coordinada de estos dos genes en el TN dorsal, regulando la migración de los progenitores de la cresta neural desde el neuroepitelio, desencadenando así su delaminación (Mayanil 2013; Sela-Donenfeld 1999).

2.2.2 Transición epitelio mesénquima (EMT)

La transición epitelio mesénquima es un proceso morfológico que comprende una serie de eventos moleculares donde las NCCs que han perdido su polaridad apico-basal y disuelto sus uniones, van adquiriendo un carácter mesenquimal. Solo algunas células del neuroepitelio dorsal se convierten en NCCs y siguen el proceso de EMT, mientras otras permanecen en el neuroepitelio y entran a formar parte del sistema nervioso central (Clay 2010).

El proceso se produce por la integración de señales extracelulares, que incluyen componentes de la matriz extracelular tales como colágeno o ácido hialurónico (HA, del inglés "*Hyaluronic acid*"), y ligandos, como FGF y *transforming growth factor-β* (TGF-β). Se ha demostrado que las NCCs premigratorias, ya que proceden del neuroectodermo, expresan N-cadherina y cadherina-6b, y que durante el proceso EMT estas moléculas desaparecen y son sustituidas por cadherina-7 y 11 (Nakagawa 1995). Se ha visto que la sobreexpresión de N-cadherina y cadherina-6b en el tubo neural dorsal de embriones de pollo bloquea de manera parcial el proceso de EMT, lo que apoya este modelo (Nakagawa 1995).

La regulación de estas cadherinas está mediada por la familia Snail, factores de transcripción de la familia de dedo de cinc que intervienen en la disociación de las uniones estrechas entre células. Snail regula negativamente las proteínas claudinas y ocludinas, que constituyen las uniones estrechas entre las células epiteliales, y la proteína de unión conexina-43α3 (Cx43α3), y reprime la expresión de E-cadherina, facilitando la EMT (Fig. 10; Betancur 2010; Tian 2011). Por tanto, los genes de la familia Snail son indicadores de la represión de cadherinas específicas en el tubo neural. En concreto, Slug reprime la expresión de E-cadherina promoviendo la liberación de β-catenina (Tian 2011), y su expresión es característica de aquellas células que se desprenden de la capa epitelial embrionaria y comienzan a adquirir el carácter migratorio, para migrar como células mesenquimales (Nieto 1994; Barrio 2002; Labonne 2000). Snail no solo participa en el proceso de EMT durante la diferenciación de la cresta neural. Un estudio en ratones que expresan formas dominantes negativas de Snail mueren durante el proceso de gastrulación debido a que no se forma el mesodermo funcional a partir del epiblasto, un

proceso regido por la transición EMT, la cual se encuentra bloqueada en estos embriones (Carver 2001).

Otro de los genes que media las transiciones en el ensamblaje de unión celular, la motilidad y la adhesión, es FoxD3. Este gen se expresa en la cresta premigratoria temprana y se mantiene positivamente regulado durante la EMT, reprimiendo la expresión de N-cadherina y, junto con Slug, activa la integrina- $\beta 1$, que participa en el cambio de los perfiles de cadherinas (Hatta 1987; Cheung 2005). Este cambio de una adhesión celular fuerte a una débil promueve la separación de las NCCs de la capa epitelial embrionaria permitiendo la migración celular, un paso fundamental durante el desarrollo de la cresta neural (Mayanil 2013; Halloran 2003).

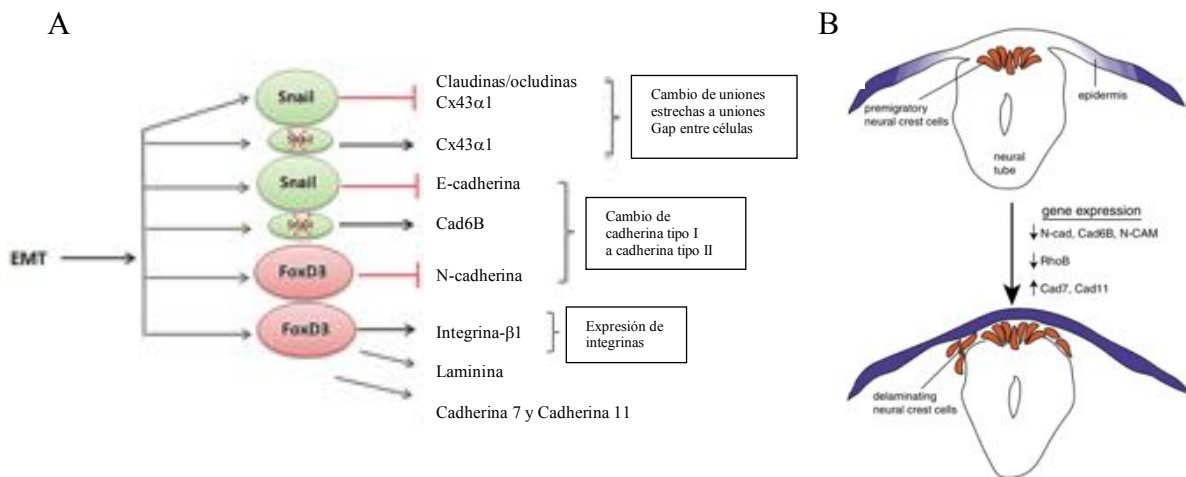


Figura 10. (A) Expresión de genes durante el proceso de EMT y su efecto en los distintos componentes de la ME. (B) Representación esquemática de una sección transversal del tubo neural y epidermis mostrando el proceso de EMT en las NCCs, así como los cambios en la expresión genética durante el proceso. → señala activación y \perp supresión. Adaptada de (Mayanil 2013; Halloran 2003).

2.2.3 Determinación y diferenciación del destino de las NCCs

Tras separarse del tejido circundante, las NCCs inician una migración a lo largo del eje rostrocaudal embrionario. Para llegar a las diferentes regiones donde van a migrar, estas células deben interpretar múltiples señales del ambiente que influyen directamente sobre su diferenciación. Entre estas señales encontramos moléculas como la fibronectina, laminina y colágenos, reconocidas por las integrinas de membrana de las NCCs. Además, los factores de transcripción de la familia SoxE, como *Sox9* y *Sox10*, son los factores principales que marcan este proceso (Fig. 11). *Sox10* se expresa durante la migración temprana de las NCCs, y junto con *Sox9*, regulan los genes efectores que darán las características finales a cada tipo celular (Stolt 2003).

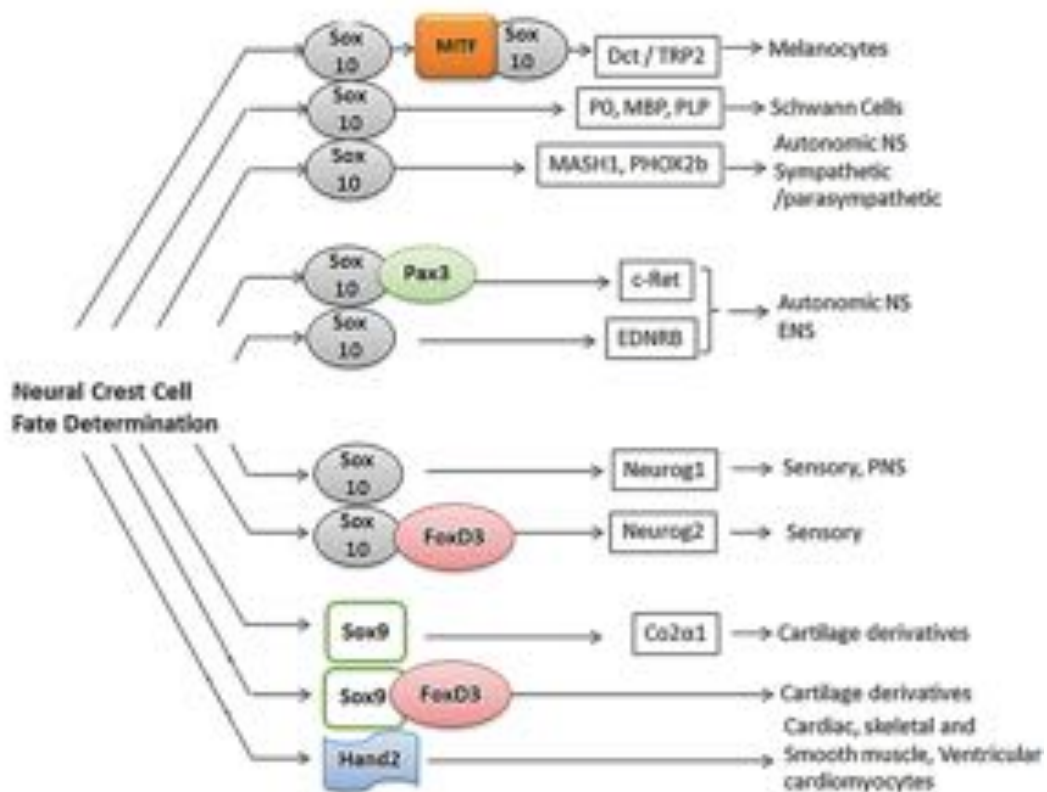


Figura 11. Regulación en la especificación de las NCCs hasta los diferentes tipos celulares. → señala activación y ⊥ supresión. Adaptada de (Mayanil 2013; Halloran 2003).

3. Procesos celulares implicados en neurulación y su regulación molecular

Muchas vías de señalización y procesos morfogénéticos se conservan evolutivamente entre aves y mamíferos. Los estudios sobre los mecanismos morfogénéticos en embriones de ratón y pollo, así como en *Xenopus* y *Zebrafish*, han permitido diseccionar las vías moleculares y celulares implicadas en la neurulación, y han ayudado enormemente a aumentar nuestra comprensión sobre el cierre del tubo neural en humanos.

3.1 Procesos celulares implicados en el cierre del tubo neural

3.1.1 Regulación del proceso de extensión convergente (EC)

La EC es un proceso que ocurre durante la gastrulación y la neurulación en vertebrados. Durante la organización temprana del ectodermo neural, las células ectodérmicas de la placa neural y el mesodermo adyacente convergen hacia la línea media y se extienden en dirección rostrocaudal. Este proceso regula los movimientos de la polaridad planar celular, lo que implica el estrechamiento (convergencia) del eje mediolateral y el alargamiento (extensión) del eje anterior-posterior del embrión en vertebrados, configurando su polaridad morfológica y funcional (Fig. 12; Keller 2002; Williams 2014).

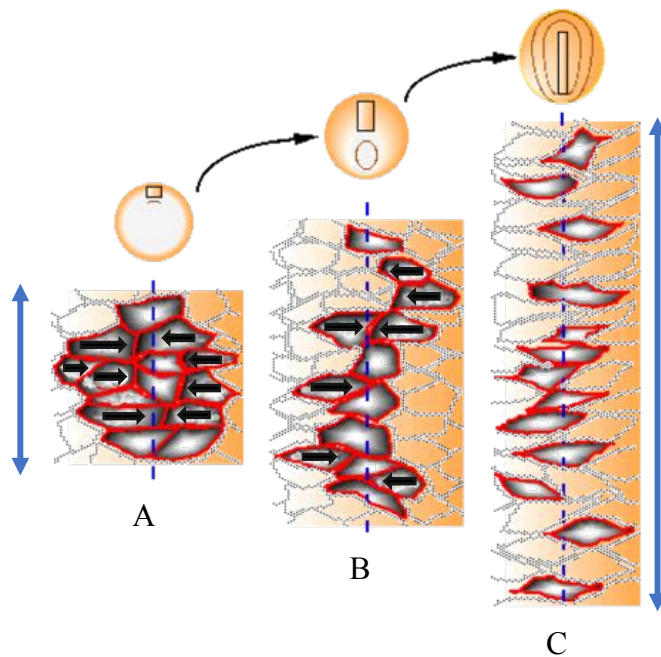


Figura 12. Representación esquemática de los movimientos de convergencia-extensión. El esquema representa el proceso en un grupo de 13 células entre todas las células del territorio dorsal (en gris) desde el comienzo de la gastrulación (A) hasta el comienzo de la neurulación (C). La línea media está representada por la línea azul discontinua. (A) En la fase de gástrula temprana las células forman una masa cohesiva. Las células más laterales de este grupo se vuelven bipolares y se mueven hacia la línea media, donde convergen; marcado con flechas negras. (B) Durante la gastrulación, estas células se intercalan con sus células vecinas, provocando una elongación del plano medio. (C) Al comienzo del estado de néurula, el fenómeno aumenta considerablemente. Las células se encuentran espaciadas y alineadas a lo largo de la línea media. Se ha producido entonces una extensión anteroposterior del grupo celular original (flechas azules). Modificada de (Shih 1992).

El proceso es esencial para la formación de la línea media y por lo tanto para el inicio de cierre del TN (Keller 2002; Sulik 1994; Ybot-Gonzalez 2007). Así, fallos en la EC, dependiente de la vía Wnt-PCP, afectan la formación de la línea media, provocando un ensanchamiento de esta, y un distanciamiento anómalo de los pliegues neurales, impidiendo la fusión dorsal del TN y dando lugar a la craneorraquisquisis (Ybot-Gonzalez 2007). En *Xenopus*, la señal de Dishevelled (Xdsh) es requerida para el proceso de EC necesario para formar la línea media que sirva de bisagra en la elevación de los pliegues neurales permitiendo así su fusión durante el cierre del tubo neural. El bloqueo de la señal Xdsh resultaba en un fallo de la EC lo que deriva en un fallo de la formación de la línea media afectando así el cierre del tubo neural (Wallingford 2002). De forma similar,

estudios realizados en *Zebrafish* con mutantes de ligandos Wnt11/Wnt5 mostraron una alteración del proceso de EC que causaba un eje anterior-posterior más amplio, mientras el eje mediolateral se acortaba (Heisenberg 2000; Kilian 2003).

3.1.2 Contracción apical de actina

La contracción de los microfilamentos subapicales de actina dentro de las células del neuroepitelio es uno de los mecanismos intrínsecos más estudiados para el cierre del tubo neural (Baker 1967; Karfunkel 1974; Nagele 1980; Sadler 1982; Schoenwolf 1988). Mientras que la actomiosina cumple un papel crucial en la neurulación, diferentes mecanismos dependientes de actina parecen impulsar el cierre del tubo neural en distintos niveles del eje corporal. De hecho, el cierre craneal en los embriones se ve afectado cuando se altera la dinámica del citoesqueleto (Stumpo 1995; Xu 1998). Además, la contractilidad de la actomiosina regulada por la vía Wnt-PCP a través de RhoA es necesaria tanto para el inicio del cierre del tubo neural (Ybot-Gonzalez 1999; Ybot-Gonzalez 2007) como para el cierre del neuroporo posterior (López-Escobar 2018). La vía Wnt-PCP regula la reorganización del citoesqueleto de actina, actuando sobre los cambios morfológicos celulares que se dan durante el neurodesarrollo, controlando tanto la polaridad como la migración celular, revisado por (Tada 2012).

3.1.3 Fusión epitelial

La dinámica celular y molecular del proceso de fusión epitelial, muy conservada en todas las especies, proviene del estudio de varios eventos morfogenéticos en los que se unen láminas epiteliales enfrentadas para formar una única capa continua. Se produce así una reorganización de dos estructuras multicelulares adyacentes para formar una estructura nueva y unificada que cierra un hueco anatómico y fisiológico (Pai 2012). Una característica importante durante este proceso de fusión es la susceptibilidad por romperse, lo que conduce a malformaciones congénitas. En relación a esto, casi todos los eventos morfogenéticos de fusión durante el desarrollo embrionario se asocian con un defecto congénito clínicamente importante. Así, la fusión epitelial interviene en numerosos procesos durante el desarrollo como el cierre dorsal del embrión de *Drosophila*, cuyo mecanismo está controlado por la vía Wnt-PCP, el cierre del tubo

neural, la fisura óptica, los párpados o la plataforma palatina (Dworkin 2011, Jacinto 2001; Hayes 2017; Yun-Jin 2012). Durante el proceso de fusión epitelial se ha descrito la formación de filopodios a ambos extremos del tejido epitelial, a medida que estos se van acercando entre si, tanto en *Drosophila* (Millard 2008), *C. elegans* (Raich 1999), como en ratón, donde las protuberancias filipodiales median la unión y fusión de los estantes palatinos (Taya 1999). En relación con el cierre del tubo neural mas caudal estas protuberancias filipodiales son creadas por la acción de microfilamentos de actina del citoesqueleto que se encuentran en los extremos de ambos pliegues durante su fusión, estableciendo el contacto inicial, logrando la “adhesión” o fusión epitelial (Rolo 2018). Por tanto, es importante una comprensión de los procesos celulares y moleculares que son responsables de la fusión epitelial, no solo para dilucidar eventos clave en la morfogénesis embrionaria, sino para conocer la patogénesis de los defectos tras el nacimiento (Pai 2012).

3.2 Regulación molecular del proceso de neurulación

Durante el proceso de neurulación existe una red molecular encargada de regular los diferentes eventos de diferenciación, proliferación, migración y muerte celular. Las diferentes vías de señalización, así como factores de transcripción como BMP y PDGF, y el HA regulan características celulares como la progresión y diferenciación del ciclo celular, inmunidad, desarrollo, motilidad, adhesión, crecimiento neuronal, morfogénesis ósea y cicatrización de heridas.

3.2.1 Vía de señalización Wnt

La vía de señalización Wnt es una vía evolutivamente conservada que regula aspectos cruciales de la determinación del destino celular, migración celular, polaridad celular, patrón neuronal y organogénesis durante el desarrollo embrionario. La señal extracelular de Wnt estimula la transducción de cascadas intracelulares, incluyendo la vía canónica o dependiente de β -catenina, que juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular, estando involucrada en numerosas procesos del desarrollo embrionario, del crecimiento y la homeostasis (Baron 2013). La actividad de esta vía depende de la concentración citoplasmática de β -catenina, que se transloca al núcleo a través de Rac1 y otros factores, donde se une a los factores

de transcripción TCF/LEF, para activar la expresión de genes diana de la vía Wnt (Berenice 2012; Baron 2013). Además de la vía canónica, encontramos la vía Wnt/Ca²⁺ que involucra a la proteína quinasa A; la vía que implica a la proteína quinasa C e interviene en el proceso de miogénesis y la vía de señalización no canónica de Wnt o vía de polaridad celular planar (vía Wnt-PCP, del inglés *planar cell polarity*; Fig. 13; Baron 2013).

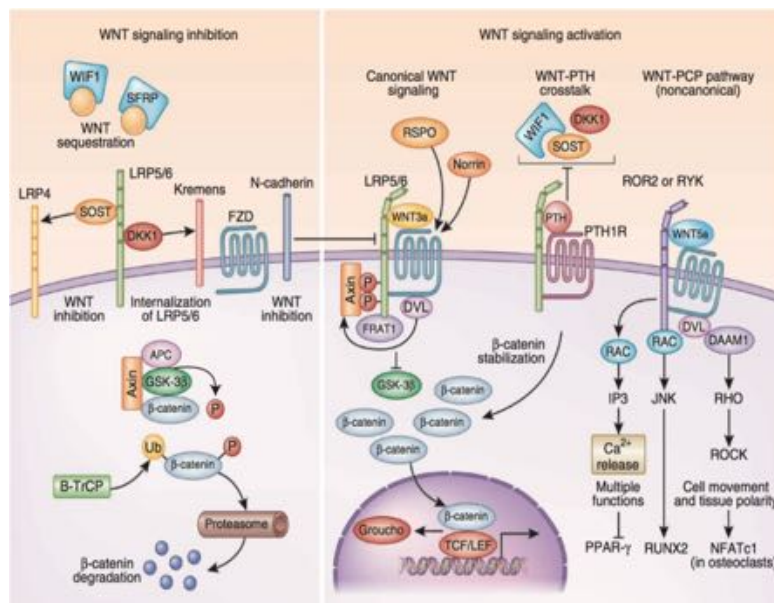


Figura 13. Vías de señalización Wnt (Baron 2013).

Vía no canónica o Wnt-PCP

La vía Wnt-PCP es una ruta de señalización conservada en la evolución que regula el proceso de neurulación, donde interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina, mediando el proceso morfológico de EC (Keller 2002). Esta vía tiene un papel crucial en el inicio del cierre del tubo neural, siendo necesaria en la regulación de los movimientos tisulares que ocurren durante este proceso (Copp 2003, Lee 2012). La coordinación de los movimientos celulares en el plano del epitelio requeridos durante el proceso de WH se produce a través de la regulación del citoesqueleto de actina, mediado por las Rho-GTPasas, al igual que se ha descrito para la vía Wnt-PCP.

Regulación de la vía Wnt-PCP y neurulación

La vía Wnt-PCP *down stream* de *Dishevelled* (*Dvl* en mamíferos) se bifurca en la rama que incluye las GTPasas de la subfamilia Rho y la quinasa asociada con Rho (*Rhoassociated kinase*, ROCK), y en la rama *Jnk* (Fig. 14). En la vía dependiente de Rho, *Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1* (*Daam1*), miembro de la familia de las forminas, juega un papel crucial, en asociación con *Dvl* para activar ROCK y promover la migración mediante la formación de fibras de actina y la maduración de la adhesión focal (Habas 2001; Goode 2007; Chihara 1997). Por otro lado, la cascada JNK compone una señal clave para la neurulación, donde los mutantes para JNK1 y 2 muestran DTN (Sabapathy 1999). *Vangl2* es una proteína transmembrana que se localiza de manera asimétrica entre los límites célula-célula, a lo largo del eje de polarización, lo que proporciona interacciones cruciales que dirigen la polarización general de las células individuales dentro del epitelio. Esta asimetría de *Vangl2* está influenciada de manera directa por *Scribble/Scrib*, que se localiza fuera del *core* de proteínas PCP tanto en mosca como en vertebrados y es miembro de la familia de proteínas PDZ requeridas para un alto número de procesos regulados por la vía PCP (Montcouquiol 2003, 2006).

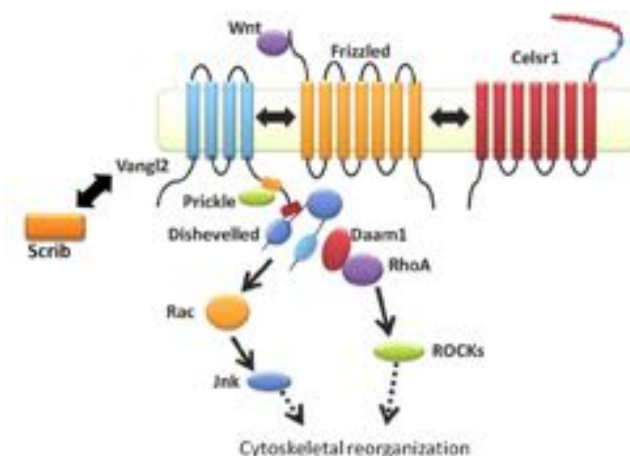


Figura 14. Vía no canónica o Wnt-PCP

La asociación entre los DTN y la mutación en genes involucrados en esta ruta de señalización revela la importancia de la vía durante la formación del tubo neural. Esta asociación se descubrió mediante la evidencia de que los ratones mutantes para alguno de los genes implicados en la vía Wnt-PCP como *Vangl2* (mutado en *Looptail* (*Lp*), cuya

mutación produce la pérdida de la asimetría de Vangl2 ((Montcouquiol 2006), *Celsr1* (mutado en *spin cycle (Scy)*, *PTK*, *Scrb1* (mutado en *Circletail (Crc)* o dobles mutantes *Fzd3/6* y *Dvl1/2/3*, desarrollan craneorraquisquisis en homocigosis y otros DTN como la espina bífida (Copp 2013; Murdoch 2014; Greene 1998; Kibar 2001; Murdoch. 2001; Curtin 2003; Lu 2004; Murdoch 2003; Pinson 2000; Suriben 2009; Andersson 2010; Paudyal 2010; McGreevy 2015). Los estudios realizados en humanos afectados por DTN también presentan mutados genes de la PCP (Chen 2018; Kibar 2011). Todos estos datos, señalan la importancia de la vía de PCP durante la formación del TN (revisado por (Copp 2013).

3.2.2 Familia TGF- β

La **familia TGF- β** regula una variedad de procesos celulares, como la progresión y diferenciación del ciclo celular, inmunidad, desarrollo, motilidad, adhesión, crecimiento neuronal, morfogénesis ósea y cicatrización de heridas (Attisano 2002; Chang 2002; Hogan 1996; Kingsley 1994; Massagué 2000). Dentro de esta familia encontramos las proteínas morfogenéticas del hueso, o *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*, factores de crecimiento implicados en el cierre del PNP de embrión de ratón (Ybot-Gonzalez 2007). Durante el desarrollo de la piel, los receptores y antagonistas de BMP regulan la proliferación y diferenciación celular en la epidermis. Cabe destacar que los gradientes de BMP, junto con morfógenos como Nodal, regulan la expresión de algunos genes de la vía Wnt-PCP durante la gastrulación, así como durante el proceso de EC en vertebrados (Roszko 2015; Gritsman 1999; Myers 2002)

3.2.3 Platelet derived growth factor (PDGF)

La familia **PDGF** está constituida por cinco isoformas diméricas que pueden presentarse en forma de homodímeros (A, B, C, D) o heterodímeros (AB), siendo el PDGFA y el PDGFB los que se encuentran en la mayoría de los tipos celulares. Estas isoformas activan la respuesta celular a través de dos receptores; el PDGFR- α , que se une a las isoformas PDGFA, PDGFB, PDGFC y PDGFAB; y el PDGFR- β , que se une a PDGFB y PDGFD. Entre las funciones de la familia PDGF están favorecer la proliferación mesenquimal, dirigir la migración, la diferenciación y la función de una variedad de tipos de células mesenquimales y migratorias especializadas, tanto durante el

desarrollo como en el animal adulto (Hoch 2003). Los análisis previos de mutantes homocigotos para PDGF y PDGFR- α han demostrado que la pérdida de señalización de PDGFR- α , ampliamente expresado en el tejido mesenquimal durante el desarrollo embrionario, resulta en la aparición de espina bífida y desviaciones del tubo neural (Payne 1997; Schatteman 1992).

3.2.4 Glucosaminoglicanos

Los **glucosaminoglicanos** son de gran importancia en varios eventos morfogénico durante el desarrollo, así como en la comunicación intercelular. Interactúan con una amplia variedad de proteínas, incluidos factores de crecimiento y quimioquinas, regulando procesos fisiológicos importantes (Linhardt 2004). Dentro de los glucosaminoglicanos encontramos el **Ácido hialurónico** (HA, del inglés “*Hyaluronic acid*”), que juega un papel importante en varios eventos morfogénicos. Durante la formación del tubo neural se ha sugerido que un aumento de HA produce un incremento en volumen de la matriz extracelular bajo de los pliegues neurales, jugando un papel importante en la elevación de estos durante el proceso de cierre del tubo neural (Schoenwolf 1983; 1988). Este componente tiene gran importancia en la diferenciación celular, migración, proliferación y angiogénesis. Tanto el HA como su receptor CD44 están implicados en procesos fisiológicos como la formación de tumores y metástasis, adhesión celular y desarrollo embrionario (Rolfé 2012; Schoenwolf 1983; West 1997). Además, se encuentra en altos niveles en la matriz extracelular durante el proceso de WH, donde su unión al receptor CD44 activa el citoesqueleto de actina y la reorientación celular, necesarios para iniciar el proceso de reepitelización (Oksala 1995).

Objetivos

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es señalar la importancia de la vía Wnt-PCP durante el cierre del neuroporo posterior (PNP), y qué repercusiones tienen las alteraciones genéticas de esta vía durante el desarrollo embrionario, en concreto durante la última fase de la neurulación primaria. Se ha observado que los fallos en la contracción apical de actina durante el cierre del PNP en los ratones heterocigotos para *Vangl2*, conllevan una malformación de los pliegues neurales, impidiendo el cierre del tubo neural. Debido al fallo de fusión de pliegues estos embriones desarrollan un agregado celular en la zona dorsal del tubo neural, asemejándose a lo que cabría esperar de un primordio de lipomielomeningocele. Para establecer posibles mutaciones en *VANGL2* en pacientes con lipomielomeningocele, se realizará un análisis tanto de la región codificante como en la zona promotor del gen.

Los objetivos principales son:

- Estudiar el papel de la vía Wnt-PCP en el cierre del PNP
- Estudiar la repercusión de alteraciones genéticas de la vía Wnt-PCP en la morfología del tubo neural tras el cierre del PNP (E11.5-E14.5)
- Analizar las posibles mutaciones en la zona promotor y región codificante del gen *VANGL2* en pacientes con lipomielomeningocele

Materials and methods

1. Mouse strains

1.1 *Looptail* (*Vangl2*) mice exhibit neurodevelopmental defects leading to short and curly tails. The *Vangl2*^{+Lp} mutant was the first mutant encoding a core component of the PCP signalling pathway, causing NTD. Homozygosity for *Vangl2*^{Lp/Lp} causes the severe NTD craniorachischisis, while heterozygosity for *Vangl2*^{+Lp} can cause SB (6%; Torban 2004). Originally obtained from Jackson Laboratories and kept on a CBA and or a C3H background (MGI: 2135272).

1.2 *Daam1* gene trap mouse strain obtained from Baygenomics (cell N° RRT390; Li 2011) and kept on C57BL/6 background. The *Daam1* mutant were generated by *gene trap* (gt), which mutant allele was designated as *Daam1*^{gt}. This mouse strain carries a mutation that causes incomplete loss of function due to an alternative splicing in the *Daam1*^{gt} allele, that generates a new fusion transcript and a subsequently a fusion protein (MGI: 1914596). *Daam1* heterozygous mutants *Daam1*^{+gt} are fertile and phenotypically normal. The cross of *Daam1*^{+gt} mice did not show the expected Mendelian inheritance ratio in the offspring, suggesting that *Daam1* deficiency resulted in neonatal or embryonic lethality.

1.3 *Daam1*^{+gt} mice were crossed with the *Vangl2*^{+Lp} mice to produce double heterozygote *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+gt} mice and *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{gt/gt} mutants. The SB incidence was incremented in the double mutant *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+gt} (22.22%), comparing with the 6.25% for *Daam1*^{+/+}/*Vangl2*^{+Lp}.

1.4 The *Curly-tail* (*Grhl3*) strain carries a conditional (floxed) allele of *Grhl3* (designated *Grhl3*^{+Ct}; Yu 2006), causing NTD. The *Grhl3*^{Ct/Ct} were crossed to *Vangl2* strain to generate double heterozygous *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct}, mice used in subsequent experimental matings. The SB incidence was incremented in the double mutant *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct} (Caddy 2010).

1.5 *CD1*: This strain was obtained from Charles River and was used for *in situ* hybridization and embryo culture.

All mice were housed in clear polycarbonate micro-isolator cages and maintained on a 12-hour light: 12-hour dark cycle (lights on from 07:00–19:00), with ad libitum access to food (Global Diet 2014S, Harlan-Teklad) and water. *Daam1*, *Looptail* and *CD1* mice were maintained in the *vivarium* of the Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) and *Grhl3* mice were maintained in the *vivarium* at the University College London, London (UK). After overnight mating, dams were checked for vaginal plugs and the day on which a copulation plug was found was designated as embryonic day 0.5 (E0.5). Litters were collected at intervals between E8.5 and E14.5, dissected from the uterus in phosphate buffered saline (PBS) or in 37°C warm Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life technologies) supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum (FBS, Gibco Life technologies), and immersed in fixative solutions or placed in culture. All procedures involving experimental animals were performed in compliance with local, national and European animal welfare laws, guidelines and policies.

2. Embryo extraction and culture

Embryos were collected at stage E8.5-E14.5 and their yolk sacs were used for *Vangl2* and *Daam1* genotyping. Embryos at E8.5 were cultured for 6 h at 37°C (Copp 2000) in the presence of cytochalasin D (CytD, 0.05 µg/ml) dissolved in DMSO (Ybot-Gonzalez 1999) or Y-27632 (10 µM) dissolved in sterile distilled water (Ybot-Gonzalez 2007b). Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for general morphology, histological analysis and expression study.

In each experiment control, embryos were cultured in the presence of the vehicle alone. After culture, the embryos were assessed for yolk sac circulation and presence of heartbeat, and only healthy embryos were used in the experiments. Embryos were analysed for external malformations, *in situ* hybridisation or histological analysis. At least three embryos were analysed for each condition.

3. Embryo genotyping

Mice were genotyped by PCR of genomic DNA, extracted from yolk sac adding to each sample 100 µl of the DNA lysis buffer (50mM tris pH=8; 5mM EDTA pH=8; 100mM NaCl and 0.5% SDS) and 5µl of proteinase K (10 mg/ml. P2308 Sigma-Aldrich). Samples were incubated at 55°C O/N. Proteinase K inactivation was performed adding

saturated NaCl solution and the DNA was precipitated using EtOH. The DNA was resuspended on dH₂O and 5 µl were used for PCR genotyping.

Daam1: primers described by Li 2011.

Forward (Fw) primer: AGCATTCTGAAAGTCATCGTCTTT

Reverse (Rv) primer 1: CCAAATTTAGAACACAGTATAGCACA

Reverse (Rv) primer 2: TATGCAGTGCTGCCATAACC

PCR protocol: BIOTAQ (BIO-21060 Bioline)

PCR conditions: 94°C 5'; 30 cycles: 94°C 30'', 58°C 30'', 72°C 1'; 72°C 10'.

Electrophoresis conditions: 2% agarose gel

Vangl2: primers described by Stanier 1995.

Forward (Fw) primer: AGAATCTGACTTACCCATGGT

Reverse (Rv) primer 1: GAGGGAGAAGAATTATGTCTG

PCR protocol: BIOTAQ (BIO-21060. Bioline)

PCR conditions: 94°C 4'; 30 cycles: 94°C 1', 58°C 1', 72°C 1'; 72°C 10'.

Electrophoresis conditions: 5% agarose gel

	Final concentration
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	4mM
Fw primer	0.32µM
Rv primer 1	0.32 µM
Rv primer 2	0.32 µM

Table 1. Specific amplification conditions for *Daam1* and *Vangl2*.

Grhl3: It doesn't need genotyping because all the *Grhl3*^{Ct/Ct} crossed to *Vangl2*^{+Lp} were heterozygous null, *Grhl3*^{+/Ct}.

4. General morphology, histological analysis and expression study of embryos and Foetuses

Embryos were collected at E8.5-14.5 and were used for different purposes.

4.1 Tissue preservation

- **For histological analysis:** fixation with 4% PFA for 1 hour or in Bouins solution (Sigma Aldrich HT1032) for 1h to 12h and stored in 70%-Ethanol at 4°C.
- **For immunohistochemistry:** embryos were fixed in 4% PFA for 1h at 4°C, washed in PBS, stored in 15% sucrose solution during 12h, embedded in gelatine (15% sucrose and 7.5% gelatine in PBS) and cryo-sectioned at 10/20 µm on a Leica CM1950 cryostat.
- **For *in situ* hybridization:** embryos were fixed in 4% PFA for 24-48h at 4°C, washed in PBS, serially dehydrated to 100% MetOH and stored at -20°C until use.

4.2 Analysis of external malformations

Embryos collected for each experiment were first analysed for external malformations and photographed by using a stereomicroscope (SteREO Discovery V8 with AxioCam Erc8, Zeiss) prior 4% PFA fixation.

4.3 Histological analysis

After fixation with 4% PFA, the embryos were stored in 70% ethanol, serially dehydrated and embedded in paraffin wax. Microtome sections (7 µm; Leica RM2255) from at least three different embryos of each experimental condition were stained with Ehrlich's haematoxylin and eosin for histological analysis and mounted with Hydromount (HS-106, National Diagnostics). Representative sections were selected and photographed by using an Olympus (Tokyo, Japan) BX-61 photomicroscope.

4.4 Morphological measurements

Analysis of the length and apico-basal width of the neural folds

The apico-basal width of the transverse section of the neural folds was quantified by measuring the length of drawn lines using ImageJ. For each neural fold, two levels of

the apico-basal width within the region juxtaposed to the paraxial mesoderm were measured (straight region of the neural fold marked with two asterisks in Fig. 15F): the most dorsal width “d” and the most ventral width “v” (Fig. 18A). Furthermore, the total neural fold length was measured in both genotypes by drawing a line along the apical side of the straight region of the neural fold using ImageJ (Fig. 18A, dotted line). We calculated the ratio between the length (l) and the apico-basal ventral width (v) of the neural fold analysing each section individually. The data were obtained from both neural folds of eight embryos for each genotype (16 neural folds/condition) and statistical significance was determined by Student’s t-test.

Analysis of PNP length

Embryos were harvested at E8.5-E9.5 and rinsed in PBS prior to fixation in 4% PFA, pH 7.4. Embryos were captured on a Zeiss Examiner LSM880 confocal using a 20×/1.0 NA Plan Apochromat dipping objective and images were processed with Imaris *software*, using the whole CellMask-stained PNPs, to measure PNP length.

Analysis of the bending and apical surface eversion of the neural folds

The degree of bending of individual neural folds was measured by applying the angle function in ImageJ to sections of the PNP. The angles were taken from the line that joins the lumen side of the MHP and the DLHP and that which joins the lumen side of the MHP and the most outward flexure of the neural fold (see Fig. 18). Statistical significance was determined by Student’s t-test using the following samples: 14 *Vangl2*^{+/+} neural folds; 20 *Vangl2*^{+Lp} neural folds; 14 *Vangl2*^{+/+} neural folds treated with cytochalasin D; 10 *Vangl2*^{+/+} neural folds treated with Y-27632.

Quantification of the apical cell arrangements at the lateral neural fold

To evaluate the apical cell arrangement, the neuropore was tilted manually as it was lowered into the gelatine, exposing a flat vision of the inner side of the anterior neural fold to the closing point of the NT. Sections of the elevating neural folds (50 μm thick) were immunolabelled for ZO1. To improve the visualisation of the flat apical sides of the cells in the neural fold after immunolabelling, 3D images were obtained from z-stacks of confocal images using ImageJ. The apical cell area was measured using ImageJ. Samples used were: 4 *Vangl2*^{+/+} embryos and 140 cells analysed; 5 *Vangl2*^{+Lp} embryos and 165

cells analysed; 3 *Vangl2^{Lp/Lp}* embryos and 127 cells analysed; 3 *Vangl2^{+/+}* embryos treated with CytD and 125 cells analysed; 2 *Vangl2^{+Lp}* embryos treated with CytD and 116 cells analysed; 3 *Vangl2^{+/+}* embryos treated with Y-27632 and 127 cells analysed; 3 *Vangl2^{+Lp}* embryos treated with Y-27632 and 109 cells analysed (2-3 sections of each embryo analysed). Global comparisons of the cellular apical area were evaluated using an ANOVA test with Welch's correction, and multiple comparisons were analysed using the post-hoc Games-Howell test. Individual comparisons of the apical cell area in the PNT of *Vangl2^{+Lp}* and after each treatment of *Vangl2^{+/+}* embryos were evaluated with a Mann–Whitney U test.

Analysis of actin and myosin planar distribution

E9.5 mouse embryos were fixed in 4% PFA and stained with phalloidin, and antibodies against MHC-IIB and p-MLC. The maximal projections of confocal images from a flat-mounted PNP were obtained using a Nikon A1 confocal microscope. All images were obtained using the same parameters.

Analysis of actin intensity

A region of interest (ROI) of 200×200 pixels was selected to obtain the intensity histograms of phalloidin labelling from the PNT of *Vangl2^{+/+}* and *Vangl2^{+Lp}* embryos using ImageJ. One ROI was used per embryo (3 *Vangl2^{+/+}* and 5 *Vangl2^{+Lp}*) and 40,000 pixels were analysed per ROI.

Analysis of actin cable orientation in aligned cell rearrangements

An ROI that covered the most anterior part of the NP (PNT) was outlined using ImageJ (540×400 pixels). Actin cables joining five to nine aligned cells were counted and their orientation was measured relative to the mediolateral axis of the embryo. The angular distribution was plotted in a histogram representing two groups: lines with angles from 0° to 45° (mediolateral orientation) and lines with angles from 45° to 90° (anterior-posterior orientation; see Fig. 2O, P). One ROI was used per embryo (5 *Vangl2^{+/+}* and 11 *Vangl2^{+Lp}*). Student's t-test was used to compare the number of actin cells alignments, and Fisher's exact test to compare the proportions of cell alignment orientations.

Analysis of actin cumulus and basal intensity

ROIs (100×100 pixels) were selected in the PNT of embryos: ten basal and ten cumuli intensity plot profiles were obtained along the linear boundary of two neighbouring cells (basal) and along cumuli using the ImageJ function ‘Plot Profile’. The distribution of the total fluorescence intensity within the ROI was measured using the histogram function of ImageJ (Fig. 24A, a, a’ and Fig. 24B, b, b’). Ten measurements/ROIs were used for each profile; two different ROIs per embryo from 3 *Vangl2*^{+/+} and 3 *Vangl2*^{+Lp} embryos. Student’s t-test was used to determine statistical significance.

Quantification of apical cumulus of actin

An ROI of 100×100 pixels in the PNT and the NSB/CLE regions were selected using ImageJ. The number of actin cumuli in those areas was determined using the ‘multi-point’ tool in ImageJ and the average number of cumuli in each area and genotype was compared (Fig. 20i, Oii, V). One ROI was used per embryo (5 *Vangl2*^{+/+} and 8 *Vangl2*^{+Lp}). Student’s t-test was used to determine statistical significance.

Analysis of paired cumuli of p-MLC in neighbouring cells (dense supracellular structures)

ROIs of 200×200 pixels were analysed to determine the number of paired p-MLC cumuli. Three ROIs were used per embryo (3 *Vangl2*^{+/+} and 3 *Vangl2*^{+Lp}). The distance between the paired cumuli was measured using ImageJ. Samples used were 188 cumuli from 3 *Vangl2*^{+/+} and 248 cumuli from 3 *Vangl2*^{+Lp} embryos. Student’s t-test was used to determine statistical significance.

Analysis of the myosin distribution

The presence of MHC-IIB was analysed in segmented images (see below) of the ZO1 immunolabelled PNP from embryos. The cell population in the PNP was divided into small (apical cell area <13 μm^2) and giant cells (apical cell area >13 μm^2). The number of cells with MHC-IIB was determined using the ‘multi-point’ tool in ImageJ. For giant cells, >50 cells/embryo were analysed from 3 embryos of each genotype; for

small cells, >600 cells/ embryo from 3 embryos per genotype were analysed. Pearson's Chi-squared test was used to determine statistical significance.

Cell dynamics

Using the semi-automated image-segmenting program Seedwater Segmenter (Mashburn 2012) confocal ZO1-stained images from flattened PNP were segmented to produce separate ROIs for each cell. The segmented images were treated as the whole PNP, and they were also divided into neural tube (NT), pre-neural tube (PNT, which included two peripheral zones and a central zone) and the node-streak border/caudal lateral epiblast (NSB/CLE), as described previously (Henrique 2015). The rectangle chosen to define each ROI was of similar dimensions, measured in ImageJ (400×600 pixels). The apical area of the cell was determined using ImageJ and a custom image analysis tool (McGreevy 2015).

4.5 *In situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridisation was carried out using sense and antisense digoxigenin-labelled riboprobes prepared using a digoxigenin RNA labelling kit (Roche) according to the manufacturer's instructions.

As described previously (Ybot-Gonzalez 2005) E9.5 (25-30 somite) mouse embryos were analysed with the probes for: *Wnt5a* (Gavin 1990) *Wnt3a* (Roelink 1991), *Daam1* (Ybot-Gonzalez 2007b), *Vangl2* (Doudney 2005), *Prickle1* (Crompton 2007), *Gpc4* (Ybot-Gonzalez 2005), *RhoA* (Ybot-Gonzalez 2007b) and *Ptk7* (Paudyal 2010). A cDNA probe for *Shroom3* was generated using the primers 5'-AGAAGTTGGAGGAGCCTAGC-3' and 5'-TGCATCATGCTGACATCAGG-3', which amplify a 519 bp region between nucleotides 246 and 765 (GenBank accession no. NM_015756.2). Mouse embryo of E11.5-E14.5 were analysed with the probe for: *Sox10* (Britsch 2001). To compare *Sox10* expression between genotypes, the *in situ* hybridization procedure was performed in only one tube, adequately marking the embryos for their later identification.

Whole embryos were photographed on a stereomicroscope (SteREO Discovery V8 with AxioCam Erc8, Zeiss) and 50-µm-thick vibratome sections on an Olympus BX-

61 photomicroscope. Sense-strand riboprobes were used as controls for specificity and produced no specific signal. At least three embryos were analysed for each probe.

4.6 Immunohistochemistry

Sections of E9.5-E14.5 embryos were embedded in gelatine (15% sucrose and 7.5% gelatine in PBS) for immunohistochemical analysis and cryosections containing the area of interest were obtained (10 and 50 μm thick) on a Leica CM1950 cryostat. Sections of at least three different embryos per each primary antibody against β -catenin, ZO1, E-cadherin, N-cadherin, Laminin, Pax3, Sox10, β -catenina, Slug, PDGFR- α , CD44, HABP, H3 and Caspase3 were blocked with PBT (PBS, 0.1% Triton and 1% BSA) and incubated overnight at 4°C with the primary antibody. After primary antibody sections were washed 3 times in PBS and incubated with appropriate secondary antibody for 1h at room temperature. Then were washed 3 times in PBS. In order to use two primary antibodies the second one was added after the secondary antibody and incubated overnight at 4°C. After this second primary antibody sections were washed 3 times in PBS and incubated with appropriate secondary antibody for 1h at R.T. Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate was used to localise F-actin (P1951, Sigma-Aldrich), diluted 1:500 in PBT (PBS and 0.1% triton). Then were washed 3 times in PBS, protected with Hydromount (HS-106, National Diagnostics), and then photographed by using an Olympus (Tokyo, Japan) BX61 microscope, for 10- μm -thick sections, or a confocal microscope (TCS-SP2-AOBS, Leica), for 50- μm -thick sections.

Whole-mount E9.5 embryos were fixed using an optimised protocol for each immunolabelling experiment. To compare between the different conditions, embryos for each experiment were kept all together in a tube throughout the entire procedure only separating them for confocal microscopy. One group of embryos was fixed with Dent's fixative and stored in 100% methanol for H3 and ZO1 immunohistochemistry. The other group of embryos was fixed in 4% PFA and stored in 100% methanol for Sox2, T and ZO1 triple immunohistochemistry. Finally, another group of embryos were fixed in 4% PFA overnight for phalloidin and MHC-IIB. For immunolabelling, the embryos were processed as described elsewhere (McGreevy 2015). The primary and secondary antibodies used are described in Table 2. The PNP was dissected out, opening the NT to facilitate flattening and analysed as whole mounts with Hydromount on a Nikon A1

confocal microscope. For ZO1 staining, a z-series (0.95 μm steps) was collected using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.664. For the triple immunohistochemistry, z-series (0.925 μm steps for ZO1 and 3 μm steps for Sox2 and T) were acquired using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.462. For phalloidin and MHC-IIB or p-MLC immunohistochemistry, z-series (0.925 μm steps) were acquired using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.462. At least three different embryos were processed for each primary antibody or phalloidin.

Primary Antibodies	Source	Dilution	Reference
β -catenin	Mouse	1:200	610153 BD-bioscience
E-cadherina	Mouse	1:200	610181 BD Transduction Laboratories
Slug	Mouse	2:100	62.1E6 Hybridoma Bank
Laminina	Rabbit	1:200	Abcam Ab11575
Sox10	Goat	1:200	AF28641, R&D Systems
Caspasa3	Rabbit	1:400	9661 Cell signalling technology, Massachussets, MA, USA
PDGFR- α	Mouse	1:100	558774 BD Pharmingen
CD44	Mouse	1:500	554869 BD Pharmingen
ZO1	Rabbit	1:150	40-2200 Invitrogen
ZO1	Goat	1:50	ab190085, Abcam
T	Goat	1:100	AF2085 R&D systems
Sox2	Mouse	1:100	MAB2018 R&D systems
Phospho histone H3	Rabbit	1:500	06-570, Upstate Biotechnology
N-Cadherin	Mouse	1:100	18-0224 Invitrogen
Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-B	Rabbit	1:150	PRB-445P Covance
Phospho-Myosin light chain 2 (Thr18/Ser19)	Rabbit	1:150	3674 Cell Signaling
Secondary antibodies	Source	Dilution	Reference
Anti-rabbit FITC conjugated	Goat	1:250	ab6717 Abcam
Anti-mouse CyTM3 conjugated IgG	Goat	1:300	115-165-166 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc

Streptoavidina FITC		1:250	11-4317 Affymetrix eBioscience, Santa Clara CA, USA
Anti-rabbit biotinilado		1:500	B8895, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Secondary antibodies	Source	Dilution	Reference
Streptoavidina Cy3		1:200	S6402 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-goat FITC conjugated	Rabbit	1:50	61-1611, Invitrogen
anti-mouse alexa fluor 488 conjugated	Donkey	1:1000	A21202, Invitrogen
Donkey anti-rabbit alexa fluor 568 conjugated	Donkey	1:500	A10042, Invitrogen
Donkey anti-goat alexa fluor 633 conjugated	Donkey	1:800	A21082, Invitrogen
Others			
Phalloidin		1:500	P1951, Sigma-Aldrich

Table 2. Primary and secondary antibodies.

4.7 Statistical analysis

Global comparisons of the cellular apical area were evaluated using an ANOVA test with Welch's correction, and multiple comparisons were analysed using the post-hoc Games-Howell test (IBM SPSS Statistics 19 software).

To estimate the difference between proportions obtained from independent samples of two populations we used the Pearson Chi-squared test. In the 2×2 table study we also obtained the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval. We used OpenEpi software (www.OpenEpi.com; updated 06/04/2013, accessed 01/03/2018). For the small sample size proportion studies, we used Fisher's exact test in OpenEpi software.

The means of two populations obtained from independent samples were compared either with a Student's t-test when the data followed a normal distribution or a non-parametric Mann–Whitney U test when the data did not follow a normal distribution. For these analyses, we used Epidat software (<http://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>; version 4.2, July 2016) and IBM SPSS Statistics 19 software.

Mann–Whitney U test was used to compare mean intensity values, and Pearson’s Chi-squared test to compare the proportion of pixels with the maximum intensity value between the two genotypes in the analysis of actin intensity.

The effect size d of Cohen and the confidence interval were calculated using ‘Calculation of Effect Sizes’ (http://www.psychometrica.de/effect_size.html; Lenhard and Lenhard, 2016). The power of the studies was calculated using Epidat software and in all statistical studies differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

The linear regression slope comparison between genotypes, in order to test the quantification of PNP length statistically, was tested using Minitab statistical software.

4.8 General techniques used for molecular studies of genomic DNA

4.8.1. DNA extraction from peripheral blood

DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Midi kit (QIAGEN GMBH Hilden, Germany) and stored at -20°C .

4.8.2. DNA extraction from the oral mucosa

Genomic DNA extraction is performed from a swab containing the patient's oral mucosa. The swab is collected by the neurosurgery service and stored at -20°C until use. Nucleic acid extraction is carried out by buffer solution A (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH = 12) 30' 92°C 800 rpm and solution B (40 mM Tris-HCL, pH = 5). DNA is subsequently extracted with 2.5 volumes of Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25: 24: 1; A0369192 ACROS ORGANICS) and allowed to precipitate o/n at 4°C . After 5' centrifugation at 13,000 rpm, addition of 500ul of molecular EtOH and 10% NaAC 3M pH 5.5 to the clean phase allows o/n precipitation at -20°C . After 13,000 rpm centrifugation at 4°C the resulting pellet is washed with 70% EtOH, which is later removed for a final resuspension in H_2O . The extraction protocol previously described allows to obtain pure DNA at an approximate concentration between 100-300 ng/ μl .

4.8.3. Genomic DNA amplification by PCR

The reagents (Table 3) and the amplification conditions (Table 4) that have been used to carry out the polymerase chain reaction (PCR) are described in the following table:

Reagents	Final concentration
Genomic DNA	5-10ng
Taq polymerase (Bioline)	1U
ClMg ²⁺ (50mM)	0.6mM
Primer solution (20µm)	0.266µm
Buffer 10x	1x
dNTPs (2mM)	0.2mM
H ₂ O sqf	20ul

Table 3. Reagents used in standard PCR. sqf: sufficient quantity for.

Phase	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	3'	
Denaturalization	95°C	1'	35
Hybridization	62°C	1' (Exon 1-7)	
	60°C	1' (Promoter region 1)	
	57°C	45'' (Promoter region 2)	
Extension	70°C	1'	
Product preservation	4°C	10'	

Table 4: Specific amplification conditions for the coding region (exon 1-7) and promoter region 1 and 2.

However, each fragment has specific amplification conditions. PCR reactions are performed individually using manually designed primers. The pairs of primers and hybridization temperatures used in the tracing of each study area are detailed in the following tables (Tables 5 and 6).

Exon	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Size (pb)	Position Chr1
1-2	AGTTGACTTCCTGAAGGTGCC	TCAGGAGCAGTCTGAAAATGCC	522	Chr1:160415714-160416236
3	CTCACCCCTTTCTCCTGTTTCC	AGGATGTGGAGTGACTGCTA	756	Chr1:160418920-160419676
4	CAACCTGCCCTAATGTGTCC	GAGTCCTGCTTGGGAAGAGAC	269	Chr1:160420330-160420599
5	TCTCCAGAGCTCCTGGAGTG	CCATTCACCCAACAAGCACC	259	Chr1:160420978-160421237
6	AAAGAGAGGTGGGCATCTGG	GAGAGAATAAGGGAAAATGAAGG	355	Chr1:160424009-160424364
7	TATGACCTAGGGGATGAAGG	AAGAAGCGAGGAGAGAAGGT	490	Chr1:160425047-160425537

Table 5: Primers for amplification of the coding region, exon 1-7. The primers were manually designed and verified at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Promotor	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Size (pb)	Position Chr1
Promoter region 1	GAGGAAAGACAGAGTTTGGG	TACTTGGAGTTCTAGCTGCG	863	Chr1:160399132-160399995
Promoter region 2	ATGTGTTAATGAGGGAGCG	GTTCTTGAGTCTGGTCACC	804	Chr1:160399928-160400732

Table 6: Primers for the amplification of the different regions of the promoter. The promoter was divided into 2 regions in order to facilitate its amplification and sequencing. Primers were built manually and re-performed a blast for verification with <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

4.8.4. Gel electrophoresis

After the PCR an electrophoresis is performed to check the correct amplification and size of each fragment. A conventional electrophoresis is used in 2% w/v agarose gels, stained with 10 mg/ml ethidium bromide, visualized under ultraviolet light with the KODAK Gel Logic 100 System, using a molecular weight marker as reference Bioline HyperLadder™ 50pb-2000pb (BIO-33054).

4.8.5. Automatic sequencing of PCR products

After PCR, enzymatic purification of the primers and dNTPs not consumed in the reaction is carried out using ExoSAP-IT (USB Corporation, USA). It consists of two hydrolytic enzymes: Exonuclease I, which degrades primers and other non-specific single-stranded DNAs, and an alkaline phosphatase that hydrolyzes the residues of dNTPs. Once the purified product is obtained, the sequencing reaction based on the Sanger method (Sanger 1977) is carried out using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing commercial kit (Applied Biosystems, USA) according to the conditions of reaction and amplification program detailed in Tables 7 and 8.

The sequencing reaction product is purified by using Perfora® DTR V3 96-Well Short Plate (EdgeBio, USA) plates, which contain a hydrated gel filtration matrix that ensures the removal of those low molecular weight residual reagents that remain after the sequencing reaction. The purified product is introduced into the corresponding sequencer device for injection into the AB3500 8 capillary sequencer (Applied Biosystems, USA). The general conditions of voltage and time injection are 1.6 KV for 8 seconds, although time and voltage parameters might be modified depending on the product to be sequenced. Electrophoresis is performed under the following general conditions of voltage and time: 9KV and 94 minutes (the race time may vary depending on of the size of the products).

Reagents	Volume
Purified PCR product (40ng)	5ul
Sequencing buffer 5X (Applied Biosystems)	2ul
BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)	0,5ul
Primer solution (10µM)	2ul
H ₂ O	0,5ul

Table 7: Reagents used in sequencing reaction

Phase	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	96	1'	
Denaturalization	96	10''	35
Hybridization	50-60	5''	
Extension	60	4''	
Product preservation	4	Infinito	

Table 8: Specific amplification conditions for each study area

For data analysis, the alignment of the obtained sequences with the reference sequence from the different public databases is performed. The sequence analysis and alignment are carried out with the Chromas and CodonCode Aligner programs respectively.

4.9 Bioinformatics Tools

4.9.1. Databases

The genetic sequences, as well as the information of the polymorphisms and mutations described, have been obtained through the UCSC Genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>), from the National Center for Biotechnological Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the Ensembl database (<http://www.ensembl.org/index.html>).

4.9.2. Nomenclature of sequence variants

The nomenclature used for the description of the sequence variants identified in this work is framed within the recommendations of the “Human Genome Variation Society” (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>; Dunnen 2001).

4.9.3. Sequence analysis

The alignment of nucleotide sequences gives information about the similarity of the sequences analyzed. This information is very useful to study inter-species

conservation and homology. For this type of analysis the CLUSTAL OMEGA tool has been used (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

- The BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) finds similar regions between biological sequences in different databases.

4.9.4. Analysis of the pathogenicity of sequence variants

- Alteration of splicing: To analyze the effect of a variant on the appearance or loss of donor or acceptor sites of splicing, it was used the tools available at <http://www.fruitfly.org/>

- Pathogenic effect of the variants found on the protein's function was analyzed using the PolyPhen and SIFT tools, which predict the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a protein using sequence homology and physical properties of amino acids. SNPs3D, which identifies the potential damage of non-synonymous base changes, was also used. It analyze the effect of the amino acid change on protein stability, using structural information and making use of the conservation and type of residues observed in a base change position in a family of proteins.

- Alteration of transcription factor binding sites: To analyze whether a variant alters the transcription factor binding site in the promoter sequence of the gene, PROMO has been used <http://alggen.lsi.upc.es/>

Result 1: Wnt-PCP pathway in the PNP

Result 1: Wnt-PCP pathway in the PNP

Introduction

Planar cell polarity (PCP) pathway was discovered in mesenchymal tissues involving cell interaction during vertebrate gastrulation. A variety of mesenchymal and epithelial cells utilize this genetic pathway to mediate the coordination of cells in directed movements. In an epithelial context, PCP lies perpendicular to the apico-basal axis, and it coordinates cell shape and cell migration. PCP is controlled by the Wnt-PCP pathway, an evolutionarily conserved process that polarizes cells in the plane of an epithelial sheet in the dimension orthogonal to the apical-basal axis of the cells (Mahaffey 2013). PCP drives cell arrangements in many developing tissues, including the *Drosophila* wing and vertebrate NT (Tada 2012; Nikolopoulou 2017; Trichas 2012). The polarised intracellular distribution of Wnt-PCP pathway elements, such as Vangl2, Celsr1 or Shroom3, seems to regulate the cytoskeletal dynamics and apical actomyosin contractility that drives cell movement (Mahaffey 2013; McGreevy 2015; Nishimura 2012; Ossipova 2015). Moreover, homozygous mutations in genes that encode core Wnt-PCP proteins impede the initiation of NT closure (a phenotype known as craniorachischisis) as a result of impairment in convergent extension (CE) movements (Nikolopoulou 2017; Keller 2002).

In vertebrates, the first evidence of central nervous system (CNS) formation is the thickening of an epiblast region anterior to the primitive streak (PS). Neurulation transforms the neural plate (NP) into a NT, the embryonic precursor of the brain and spinal cord. During the early shaping of the neural ectoderm, the prospective posterior neural cells intercalate along the mediolateral axis through CE movements to form a narrow, long midline. This structure ultimately gives rise to the notochord and the medial hinge point (MHP), the latter facilitating the elevation of the neural folds (Goto 2002; Wallingford 2002; Zohn 2003). Both NP bending and NT closure involve CE movements, facilitated by changes in the actin cytoskeleton that drive apical constriction and that are regulated by RhoA (Kinoshita 2008; Nishimura 2012; Ybot-Gonzalez 1999; Ybot-Gonzalez 2007).

Whereas actomyosin fulfils a crucial role in neurulation, different actin-dependent mechanisms appear to drive NT closure at distinct levels of the body axis. In fact, cranial closure in embryos is impaired when cytoskeletal dynamics are altered (Brouns 2000; Stumpo 1995; Xu 1998). Indeed, actomyosin contractility within neuroepithelial cells is

required for the initiation of NT closure and it is regulated by the Wnt-PCP pathway via RhoA (Ybot-Gonzalez 1999; Ybot-Gonzalez 2007), and Wnt-PCP homozygous and heterozygous mutant embryos have been shown to develop spina bifida (McGreevy 2015; Paudyal 2010; Andersson 2010; Pinson 2000; Suriben 2009). Although many studies have focused on the mechanisms driving neural fold elevation and fusion of the dorsal part of the neural folds at the posterior neuropore (PNP), it still remains unclear how the last step of neurulation is coordinated in the caudal NP.

Rostro-caudal elongation of the mouse embryo benefits from the contribution of bipotent neuromesodermal progenitors (NMPs), cells derived from the caudal epiblast (Garriock 2015; Henrique 2015; Tzouanacou 2009; Wymeersch 2016). These dual-fated cells are progenitors of the caudal neuroectoderm and somatic mesoderm, indicating that induction and formation of the caudal NP is distinct from that of the anterior NP. Here, we aim to elucidate how the Wnt-PCP pathway controls different stages of specification and differentiation, ultimately coordinating the shaping of the caudal NP, and investigate how interfering with this process affects caudal NT closure.

1.1 Preliminary results

1.1.1 Different elements of the Wnt-PCP signalling pathway are expressed during spinal neurulation

First it has set out to define the temporal and spatial expression of Wnt-PCP genes during the later stages of caudal NT closure. NT closure is completed by E10 and genes of the Wnt-PCP pathway were specifically detected in the most caudal part of the E9.5 embryo, including the PNP (e.g. *Wnt5a*, *Wnt3a*, *Vangl2*, *Prickle1*, *Gpc4* and *PtK7*; Fig. 15A-E, K, L). Other Wnt-PCP genes, like *RhoA*, *Daam1* and *Shroom3*, were also expressed in the PNP, but in a more widespread pattern (Fig. 15M-O). Cross sections of the PNP revealed a broad distribution of these mRNAs across the NP, including the MHP,

albeit weaker in the most dorsal part of the neural folds (Fig. 1.1F-J, P-T). These data indicate that Wnt signalling may be active in the PNP.

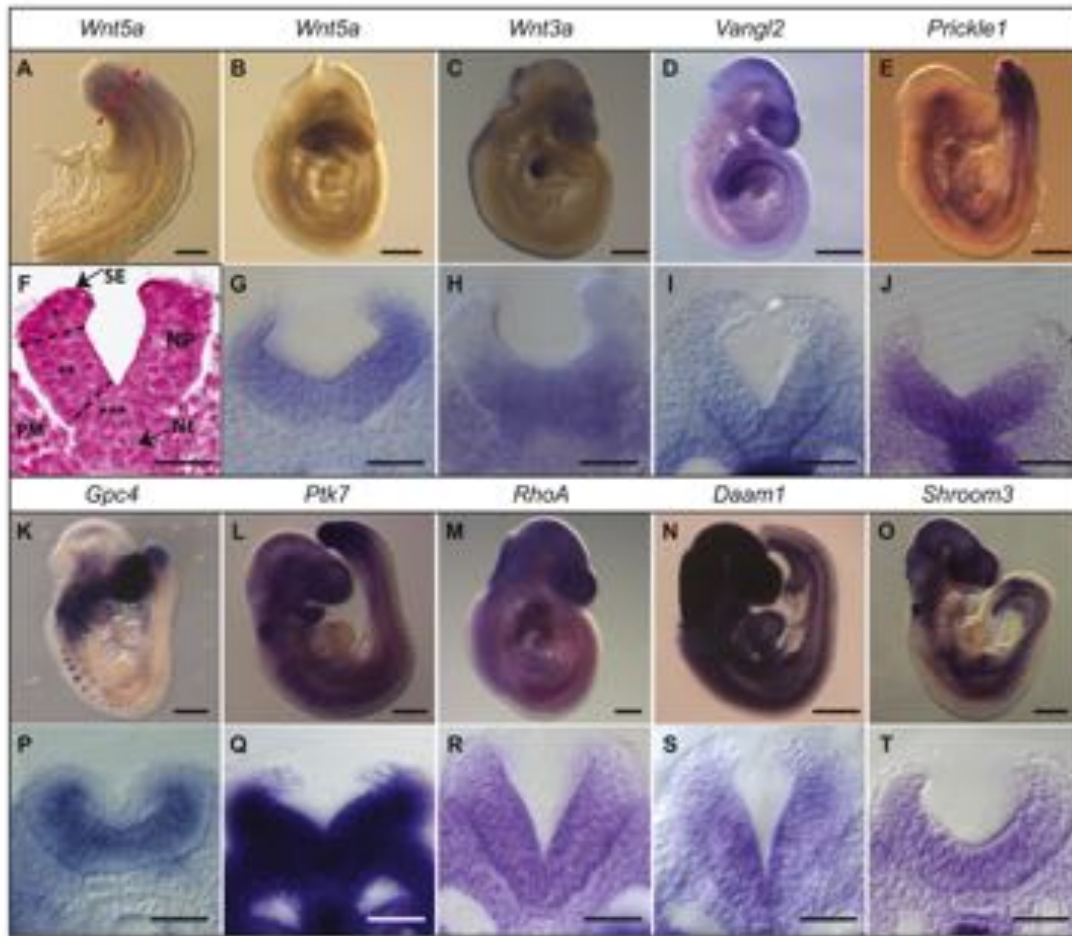


Figure 15. Elements of the Wnt-PCP pathway expressed at the posterior neuropore. (A, B, G) *In situ* hybridisation for *Wnt5a*, (C, H) *Wnt3a*, (D, I) *Vangl2*, (E, J) *Prickle1*, (K, P) *Gpc4*, (L, Q) *Ptk7*, (M, R) *RhoA*, (N, S) *Daam1* and (O, T) *Shroom3* in E9.5 mouse embryos (B-E, K-O) and corresponding transverse sections through the PNP at the level of the dashed line in A (F-J, P-T). In F, the main tissues and the domains of the neural fold are indicated: PM, paraxial mesoderm; NP, neural plate; Nt, notochord; SE, surface ectoderm. Single asterisk indicates DLHPs; double asterisk indicates the non-bending lateral neural plate; triple asterisk indicates the MHP. Scale bars: (A) 200 μ m; (B-E, K-O) 500 μ m; (F-J, P-T) 50 μ m.

1.1.2 Alterations to the Wnt-PCP pathway affect the PNP morphology

Homozygous Wnt-PCP mutant embryos develop craniorachischisis, making it difficult to study the role of Wnt-PCP genes during the later stages of NT closure. Thus, heterozygous embryos are a better tool for studying caudal NT defects (NTDs). The molecular basis of Wnt-PCP activation might involve modifications such as

phosphorylation, as previously shown for members of this pathway (Maekawa 1999; Shafer 2011; Yang 2017).

Transverse PNP sections from a *Vangl2*^{+/*Lp*} embryo revealed morphological effects at E8.5 (Fig. 16A, B). While in the E8.5 *Vangl2*^{+/*+*} embryos the lateral regions were straight showing a V-shaped cross section (mode1; Shum 1996) and the neural plate bended at the MHP (*mediam hinge point*), the *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos loss this conformation and show a destabilization, promoting a curvature in the middle zone (Fig. 16A, B, D and E). In the *Vangl2*^{*Lp/Lp*} embryo the neural folds increase this curvature in the middle zone, showing an eversion (Fig. 16C), compared with the *Vangl2*^{+/*+*} (Fig. 16A).

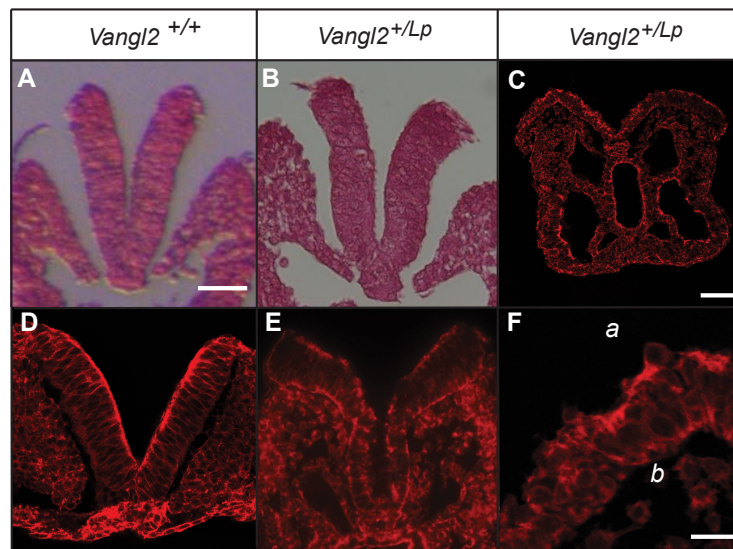


Figure 16. Disrupted neural fold morphology and apical actin distribution in *Vangl2*^{+/*+*}, *Vangl2*^{+/*Lp*} and *Vangl2*^{*Lp/Lp*} embryos. (A, B, D, E) Transverse PNP sections from E8.5 *Vangl2*^{+/*+*} and *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos. (C, F) Transverse caudal sections of an E9.5 *Vangl2*^{*Lp/Lp*} embryo. (A and B) H&E staining; (C, D, E and F) phalloidin staining. Scale bars: (A) 50 μm also for B, D and E; (C) 100μm; (F) 25 μm.

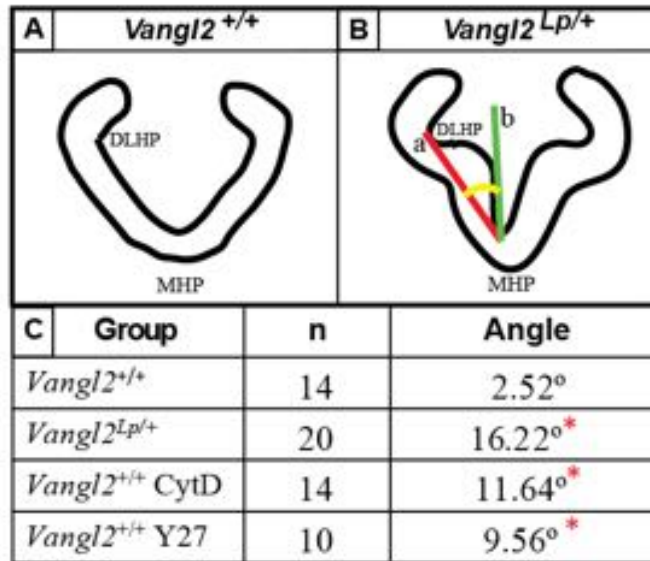


Figure 17. Evaluation of neural fold bending and apical surface eversion. (A, B) Transverse section of the PNP from a *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{Lp/+} embryo. The angles were taken from the line that joins the lumen side of the MHP and the DLHP (red line in B, a), and the line that joins the lumen side of the MHP and the most outward flexure of the neural fold, green line in B, b. (C) The table shows the degree of eversion of the neural folds for each condition (group): MHP, Medial hinge point; DLHP, dorsolateral hinge point; red asterisk indicates statistically difference of *Vangl2*^{Lp/+}, *Vangl2*^{+/+} treated with CytD and *Vangl2*^{+/+} treated with Y-27632 embryos ($p < 0.005$, Epidat 4.1 software).

There was a significant outward flexure at E9.5 *Vangl2*^{Lp/+} embryos in the NP with the basal side juxtaposed to the paraxial mesoderm; this region of the neural fold should be straight, as seen in *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 19D, E, arrowheads; compare with Fig. 19A, B). This outward flexure is combined with a dorso-ventral reduction in the apico-basal width of the NP (Fig. 18A-C). Morphometric analysis of this region demonstrated that although the dorsal width is similar (46.5 μm in *Vangl2*^{+/+} and 47.2 μm in *Vangl2*^{Lp/+}; Fig. 18A, B), the ventral width in *Vangl2*^{Lp/+} embryos (37 μm) was significantly narrower than in *Vangl2*^{+/+} embryos (40 μm ; Fig. 18B). Concomitantly, there was a 1.4-fold significant increase in the length of the neural fold in *Vangl2*^{Lp/+} embryos (145.1 μm) relative to *Vangl2*^{+/+} embryos (103.1 μm ; Fig. 18C), producing a significant difference in the length/ventral width ratio between *Vangl2*^{Lp/+} and *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 18D; for more data regarding the sample sizes and statistical analyses in all experiments, see Materials and Methods).

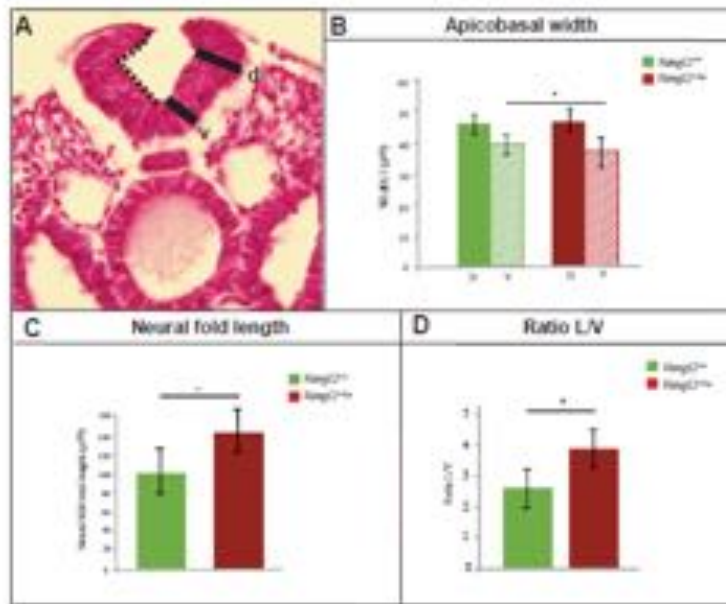


Figure 18. Variation in the apico-basal width and length of the neural folds. (A) Transverse section of *Vangl2*^{+/+} PNP showing the level of dorsal (d) and ventral (v) apico-basal widths of the straight portion of the neural fold juxtaposed to the paraxial mesoderm where the measurements were taken by the tracing line function in ImageJ. (B) Graph of the apico-basal width (in μm) at d and v of the straight portion of the neural plate in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos. (C) Graph representing the length (in μm) of the neural fold, measurements were taken with the tracing line function in ImageJ along the apical side, as shown in (A) by a dotted line. (D) The graph shows the ratio between the length (l) and the apico-basal ventral width (v) of the neural fold: (*): significant difference between *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos, $p < 0.05$

1.1.3 Alterations to the Wnt-PCP pathway affect actin distribution

Such outward flexure of the neural folds and the decrease in neural fold width have been observed previously in embryos with altered actin dynamics (Grego-Bessa 2015; Ybot-Gonzalez 1999); we therefore assessed the actin microfilament distribution in the NT of *Vangl2*^{+/Lp} embryos. As expected, actin microfilaments are distributed neatly along the apical side of the neural folds in *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 16D; Fig. 19B, C), whereas the actin belt was disrupted over the entire lumen of the *Vangl2*^{+/Lp} PNP (Fig. 16E; Fig. 19E, F) and this disruption was substantially worse in *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos (Fig. 16C, F). In *Vangl2*^{+/+} embryos exposed to cytochalasin D (CytD), a potent inhibitor of actin polymerisation, the apical localisation of F-actin was disturbed and was associated with atypical bending of the lateral NP (Fig. 19G-I) similar to that observed in the neural folds of *Vangl2*^{+/Lp} embryos. Thus, actin microfilaments are required to establish correct PNP morphology.

Activation of Wnt-PCP signalling induces the formation of the Dishevelled-Daam1-RhoA complex, and activates its downstream effector ROCK, leading to cytoskeletal remodelling (Habas 2001; Habas 2003). To analyse the role of actin microfilaments as specific downstream elements in the Wnt-PCP pathway, they blocked ROCK activity with Y-27632. The PNP in *Vangl2*^{+/+} embryos treated with Y-27632 adopted a similar morphology to that in *Vangl2*^{+Lp} embryos, as described previously (Escuin 2015), with an actin distribution similar to that observed in the NT of embryos treated with CytD (compare Fig. 19J-L with 1.2D-F and 1.2G-I). The neural folds of embryos treated with CytD and Y-27632, as in *Vangl2*^{Lp/+} embryos, underwent significant ectopic bending relative to *Vangl2*^{+/+} embryos ($p < 0.05$; Fig. 17).

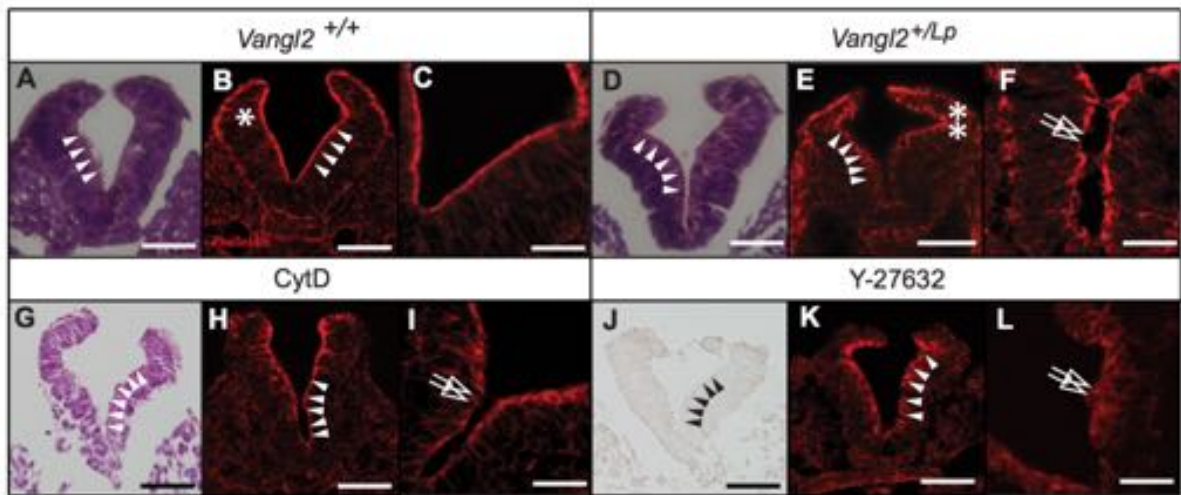


Figure 19. Disrupted neural fold morphology and apical actin distribution in *Vangl2*^{+/+}, *Vangl2*^{+Lp} and embryos treated with cytochalasin D and Y-27632. (A-L) Transverse sections through the PNP (see plane of the section in Fig. 1.1A) of *Vangl2*^{+/+} (A-C), *Vangl2*^{+Lp} (D-F), cytochalasin D-treated *Vangl2*^{+/+} (G-I) and Y-27632-treated *Vangl2*^{+/+} (J-L) E9,5 embryos. (A, D, G, J) H&E staining; (B, C, E, F, H, I, K, L) phalloidin staining. Arrowheads in A and B indicate the straight wild-type neural fold; note, by contrast, the outward flexion induced by mutation or treatment (D, E, G, H, J, K). Asterisk in B marks the curved DLHP of *Vangl2*^{+/+} embryo; double asterisk in E marks the angle of the DLHP in the *Vangl2*^{+Lp} embryos. White arrows in F, I, L point to disruption of the apical actin belt. Scale bars: (A) 50 μ m also for B, D and E; (C) 100 μ m; (F) 25 μ m; (A, B, D, E, G, H, J, K) 50 μ m; (C, F, I, L) 25 μ m.

1.1.4 Altered PNP morphology as a consequence of mutations in the Wnt-PCP pathway leads to spina bifida

Our group next explored how the loss of Vangl2 activity affects caudal neurulation. Analysis of *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos (summarised in Table 9) highlighted a tendency towards delayed NT closure in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos in association with the altered morphology of the intermediate neural folds, although NT closure was not impeded (see Copp 1994).

	<i>Vangl2</i> ^{+/+}	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>}
25-26 somites	12.5% (n=16)	12.5% (n=8)
27-28 somites	75% (n=12)	58.3% (n=12)
29-30 somites	100% (n=12)	86.6% (n=15)

Table 9: The tendency towards delayed NT closure *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos. Percentage of closed neural tubes at different stages of development, in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos: n=number of embryos analysed.

As craniorachischisis develops in *Vangl2*^{*Lp/Lp*} homozygous mutants, more severe knockdown of Wnt-PCP signalling was studied at later stages of NT closure in double *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/*gt*} mutants. *Daam1* belongs to the formin family of actin nucleators and interacts with Dishevelled and RhoA in the Wnt-PCP pathway (Habas 2001; Sato 2006). No obvious phenotypic differences were observed in the NT of embryos from the three genotypes of the *Daam1* gene trap mouse line at E10.5-E14.5 (*Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/+}, n=45; *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/*gt*}, n=79; *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{*gt/gt*}, n=20; Fig. 20A, C; data not shown). However, there was a higher incidence of spina bifida in the *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/*gt*} line (6/27, 22.22%; Fig. 20B, E) relative to *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/+} mice (1/16, 6.25%; Fig. 20D). Histological analysis revealed exacerbated angles of the neural folds at the dorsolateral hinge points (DLHPs) in *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/*gt*} embryos with spina bifida at E10.5, contrasting with the straight lateral sides of the NT associated with the closed PNP in *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/+} embryos (Fig. 20F, G). Indeed, the phenotype of the *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/*gt*} embryos was reminiscent of the early *Vangl2*^{+/*Lp*} neural fold malformations (Fig. 16B, E). The straight region of the NT of E11.5 *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/+} embryos (Fig. 20H) has a slight outward kink in *Vangl2*^{+/*Lp*}/*Daam1*^{+/+} embryos (Fig. 20I), whereas the sections anterior to the open NT displayed a characteristic malformation of the dorsal part of the lateral NT in

Vangl2^{+Lp}/*Daam1*^{+gt} embryos with spina bifida (Fig. 20J). Thus, exacerbated outward flexion of the neural fold may be responsible for the failure in dorsal closing (Fig. 20J, inset).

Our results indicate that disrupted PCP-Wnt signalling affects neural fold morphology, inducing aberrant bending that separates the dorsal tips of the neural folds and impedes correct caudal NT closure, inducing spina bifida.

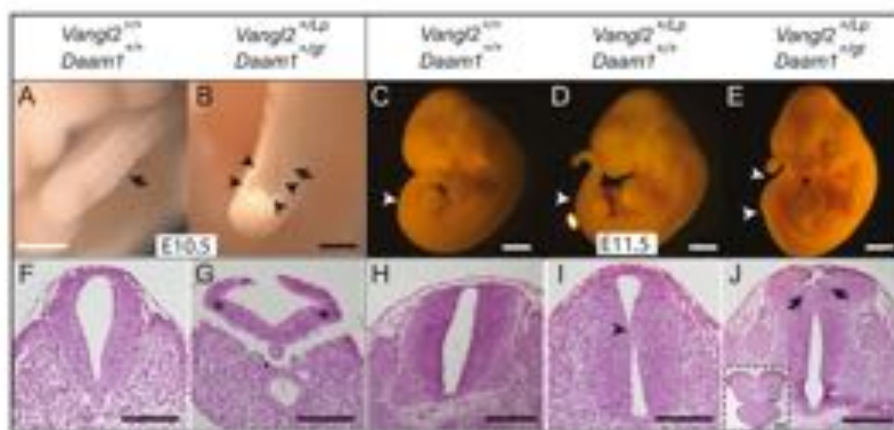


Figure 20. Downregulation of Wnt-PCP signalling leads to spina bifida. (A-J) E10.5 and E11.5 embryos of the indicated genotypes and corresponding H&E-stained transverse sections through the caudal region (F-J). Black arrows in A and B indicate the transverse section level shown in F and G, respectively. Black arrowheads in B indicate spina bifida. White arrowheads in C-E indicate the level of the transverse sections in H-J, as well as the spina bifida in E. Top arrowhead corresponds to the axial level for the section in the inset in J and bottom arrowhead corresponds to the axial level of the section in J. Asterisks in G mark DLHP of the neural folds, with an exacerbated angle. Black arrowhead in I indicates an outward kink. Black arrows in J indicate aberrant dorsal bending on both sides of the distorted neural tube. Dotted line indicates unfused dorsal tips of neural folds. Inset in J shows a section through the open spina bifida at the level marked by the top arrowhead in E. Scale bars: 50 μ m (A, B); 1 mm (E, C, D); 100 μ m (F, G, I); 200 μ m (H, J, J inset).

1.1.5 Disruption of the Wnt-PCP pathway affects apical cell morphology

Cadherins, together with β -catenin in adherens junctions and ZO1 (Tjp1) at tight junctions, regulate cytoskeletal actin assembly, anchoring the actomyosin cytoskeleton to the cell membrane before apical constriction in these cells (Nishimura 2009). Thus, they assessed whether the apical region of the cell is distorted in the lateral neural fold as a consequence of disrupting Wnt-PCP signalling or actin polymerisation. N-cadherin (Cdh2) can be controlled by *Vangl2* (Nagaoka 2014) and its distribution in adherens

junctions is disrupted in the neural folds of *Vangl2*^{+Lp} embryos, as well as in embryos treated with CytD and Y-27632 (Fig. 21A-D). To quantify the apical cell arrangement, they used either a tilted section or a 3D image of 50- μ m-thick sections of the elevating neural folds immunolabelled for ZO1.

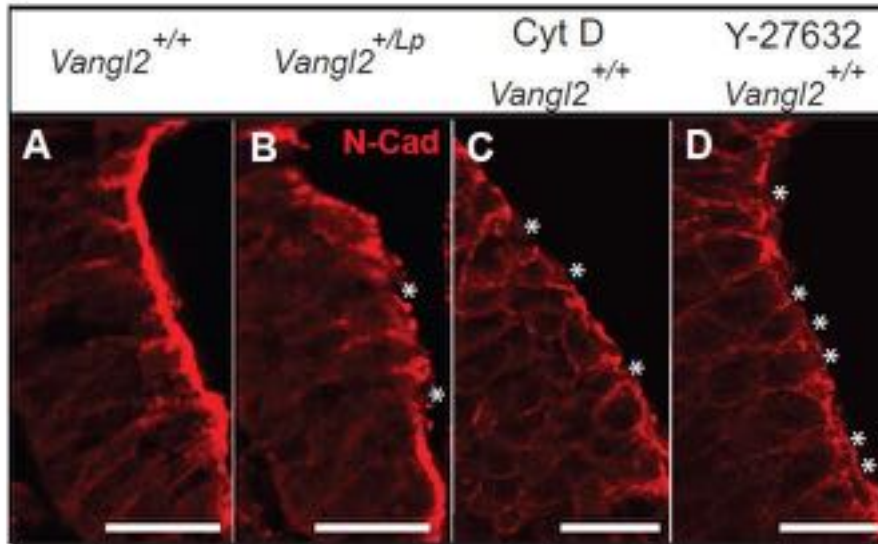


Figure 21. Planar cell arrangement in the neural folds is disrupted in *Vangl2*^{+Lp}, *Vangl2*^{Lp/Lp}, CytD- and Y-27632-treated embryos. (A-D) Transverse neural fold sections from *Vangl2*^{+/+} (A), *Vangl2*^{+Lp} (B), CytD-treated (C) and Y-27632-treated (D) embryos immunolabelled for N-cadherin. Asterisks in B-D indicate disruption of apical N-cadherin. Scale bars: 50 μ m (A, B); 25 μ m (C, D).

The mean apical area of the closing neural fold cells in *Vangl2*^{+Lp} and *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos increased significantly with respect to the *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 22A-E). Similarly, embryos treated with either CytD or Y-27632 reproduced the phenotype of *Vangl2* mutant embryos (Fig. 22A-I). This expansion in the apical cell surface area due to actin microfilament disorganisation could explain the inappropriate bending of the neural folds in these embryos.

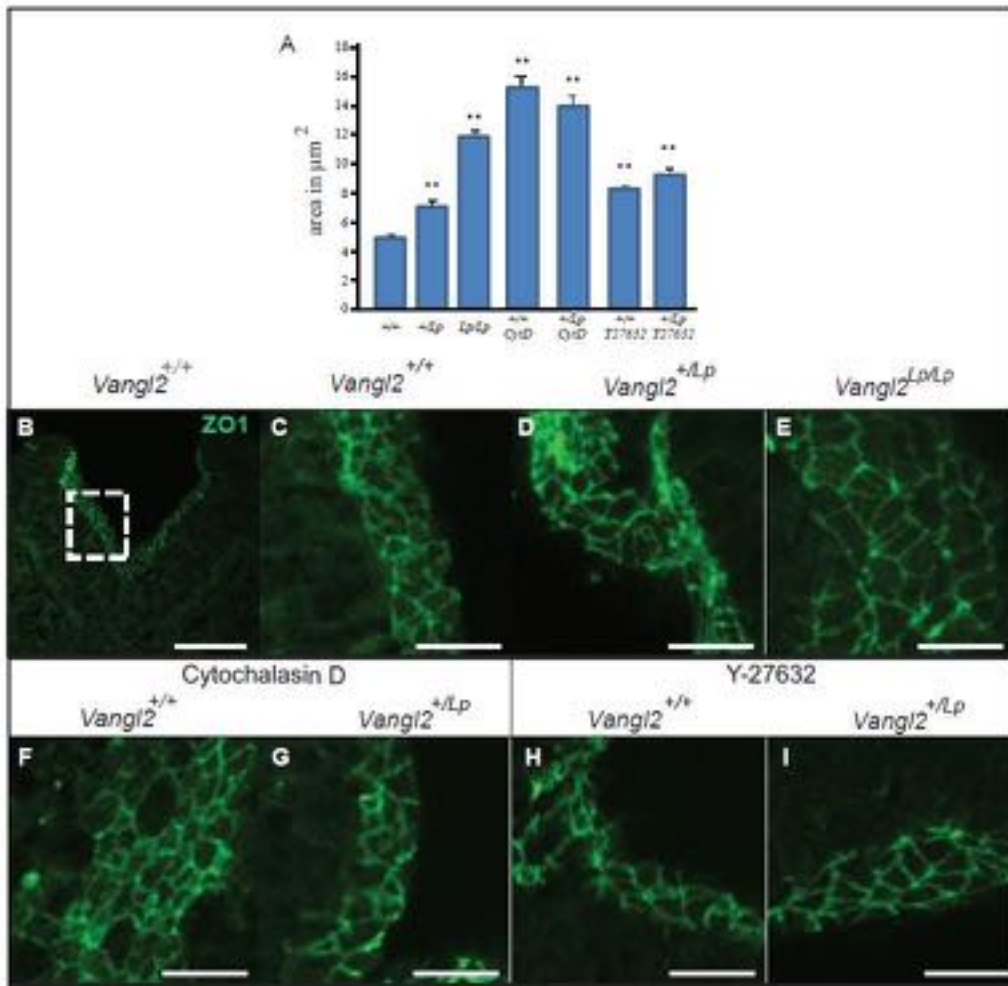


Figure 22. Planar cell arrangement in the neural folds is disrupted in *Vangl2*^{+/-}, *Vangl2*^{Lp/Lp}, CytD and Y-27632-treated embryos. (A) Average apical cell area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{s.e.m.}$) in *Vangl2*^{+/+} (+/+), *Vangl2*^{+/-} (+/-) *Vangl2*^{Lp/Lp} (*Lp/Lp*), CytD- and Y-27632-treated embryos. ** $P < 0.001$ compared with *Vangl2*^{+/+}. (B-I) Transverse sections of the PNP of the indicated genotypes, untreated or treated with cytochalasin D or Y-27632, immunolabelled for ZO1. Dashed box in F indicates the apical side of the neural fold and the region where the apical areas were measured in all embryos. Scale bars: 50 μm (B); 12.5 μm (C-I).

Together, these data indicate that Vangl2 shapes the neural folds by regulating apical actomyosin recruitment and intercellular adhesion.

1.2 Results

1.2.1 Alterations to the *Wnt-PCP* pathway affect the PNP morphology

To analyze if the flexure in the neural fold of E9.5 *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos, accompanied with the 1.4-fold increased length of the neural fold, may be producing the failure in dorsal closing of the neural folds, we measure the PNP length from the zippering point, the dorsal point at the beginning of the PNP where the neural folds joined.

Analysis of the PNP length

This analysis revealed a delay in the progression of closure, as indicated by the decrease in PNP length more accused in *Vangl2*^{+/*+*} (n=9) compared with the *Vangl2*^{+/*Lp*} (n=12) embryos E8.5-9.5 in a somite range of 12-31 (Fig. 23).

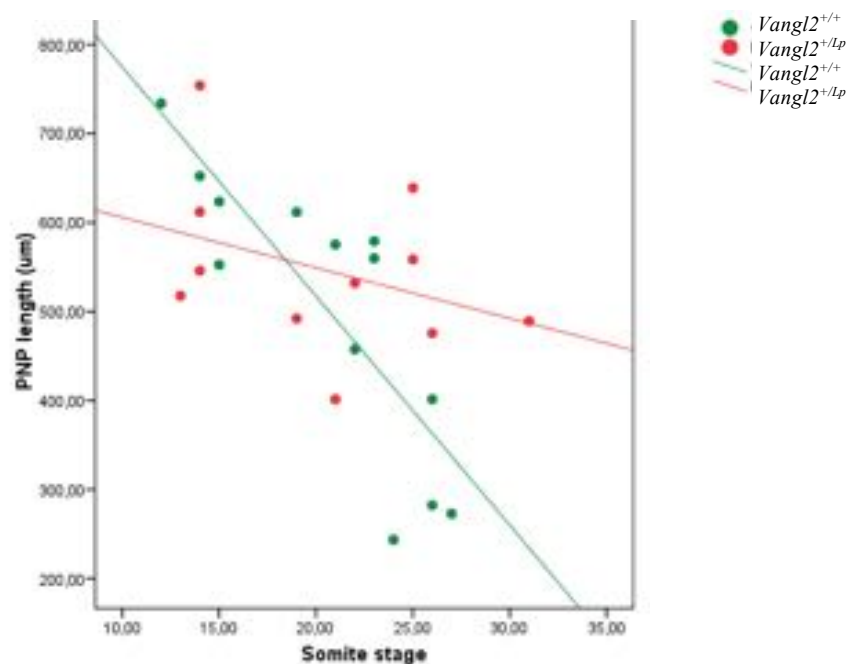


Figure 23. Quantification of PNP length in *Vangl2*^{+/*+*} and *Vangl2*^{+/*Lp*} E8.5-E9.5 embryos. Each point represents an individual embryo; $p < 0.05$ relates to linear regression slope comparison between genotypes. The linear regressions are significantly different from each other.

Due to the delay of the PNP closure, we want to study how the elevation of the neural folds in the PNP affect closure. May be a failure in the elevation of the neural folds in the *Vangl2*^{+/*Lp*} mutant contribute to closure delay.

1.2.2 Alterations to the Wnt-PCP pathway affect actin distribution

The Wnt-PCP pathway drives the polarised subcellular accumulation of the contractile actomyosin network during cranial NT closure (Mahaffey 2013; McGreevy 2015; Nishimura 2012; Ossipova 2015). To reveal the distribution of actin in the apical plane of the caudal closing NP, the distribution of phalloidin was analysed in the PNP of flat-mount *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 24A). There was significantly weaker phalloidin staining in the *Vangl2*^{+Lp} embryo compared with its wild-type counterpart (Fig. 24B, Fig. 26B).

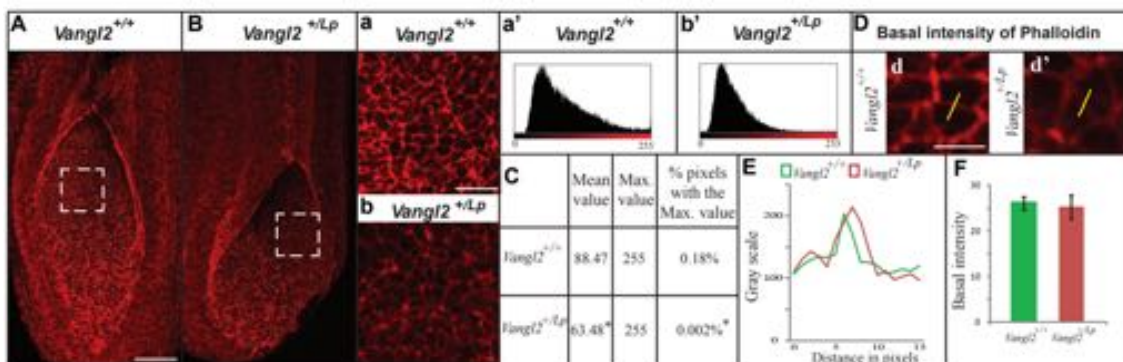


Figure 24: Quantification analysis of apical actin deposition. (A and B) Dorsal view of the maximum projection of the PNP from a *Vangl2*^{+/+} (A) and *Vangl2*^{+Lp} embryo (B) labelled with phalloidin. (a and b) Magnified images (200 x 200 pixels) of the insets in A and B, respectively. The panels a' and b' represent the intensity histograms of phalloidin labelling from the areas in (a and b), respectively. (C) Table summarizing the data from the homologous histograms obtained from 3 *Vangl2*^{+/+} and 5 *Vangl2*^{+Lp} embryos: "Mean value", average phalloidin intensity; "Max. value" maximum intensity obtained in the histogram; and "% pixels with the Max. value", the percentage of pixels with the maximum intensity. The difference between *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos were statistically significant (* p<0.001). Scale bars: (A) 50 μ m also applies to B; (a) 12.5 μ m also applies to b.

In the PNP, actin was organised into two different planar cell arrangements: linear alignment of neighbouring cells with F-actin condensed on one side of the cellular arrangement, forming actin cables (Fig. 25C); or accumulation of actin at one vertex of individual cells (Fig. 25C; Fig. 26A, C). In contrast to the cranial neural ectoderm, the actin cables in the PNP were all oriented in an anteroposterior direction, and they were restricted to the anterior PNP, mainly on the lateral side and corresponding to the neural fold juxtaposed to the paraxial mesoderm (88.5% lateral vs 11.5% central; Fig. 25A, C, E, F). However, significantly fewer linear cell arrangements were evident in *Vangl2*^{+Lp}

PNPs, with variable orientation compared with their wild-type counterparts (Fig. 25B, D-G). In addition, we observed a similar basal intensity of actin on the apical side of the boundary between cells but a significant loss of intensity in the polarised actin cumuli in *Vangl2^{+Lp}* embryos relative to *Vangl2^{+/+}* embryos (Fig.11B, D, E). Unlike the actin cables, these cumuli were distributed throughout the PNP.

Thus, *Vangl2* appears to be required for the apical and planar polarised distribution of actin microfilaments in the anterior part of the PNP where the neural folds elevate, and when this distribution is altered, morphological anomalies arise.

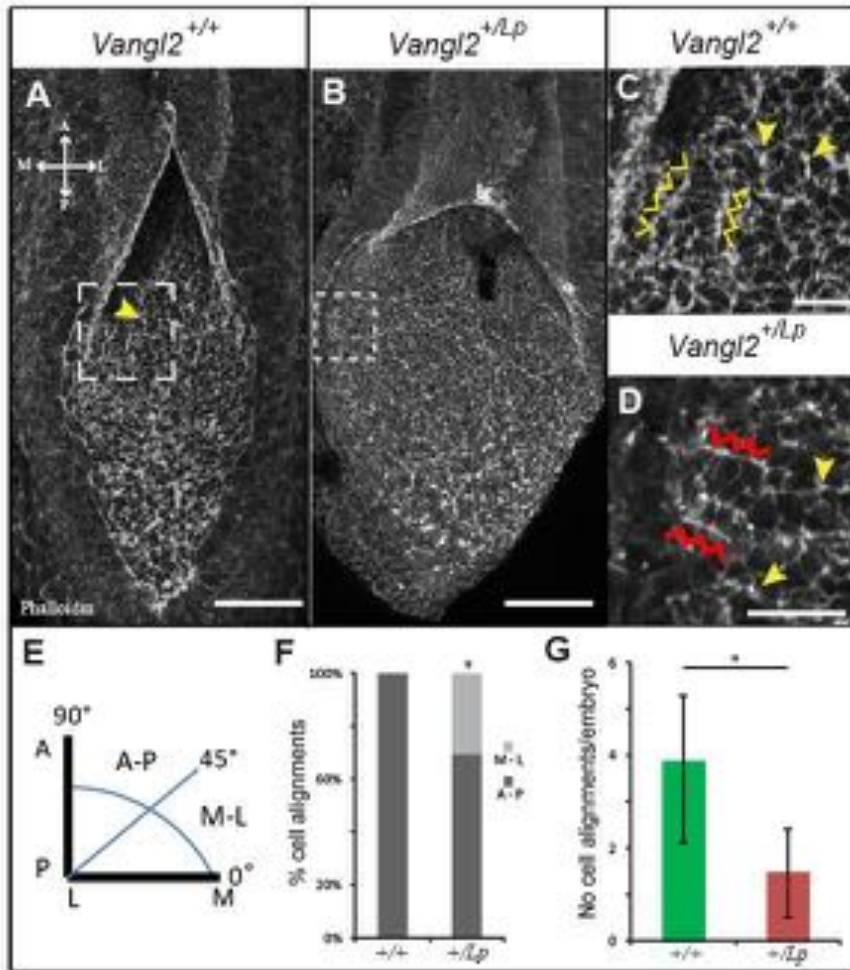


Figure 25. Orientation of F-actin cables and cell alignments in PNPs from *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos. (A, B) Dorsal views of phalloidin-stained flat-mount PNPs from *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos, respectively. (C, D) Magnification of the boxed areas in M and N, respectively. Yellow/red carets indicate cables of F-actin condensation on one side of aligned cells (mediolateral in C; anteroposterior in D); yellow arrowheads indicate cumuli of F-actin at one vertex of individual cells. (E) Diagram of cell alignment relative to the mediolateral axis of the embryo (0-45°, mediolateral orientation; 45-90°, anteroposterior orientation). (F) Proportion of cell alignments in anteroposterior (A-P; dark grey) or mediolateral (M-L; light grey) orientation (A-P orientation: 100% in *Vangl2*^{+/+} vs 69.23% in *Vangl2*^{+/Lp} embryos: **p*<0.05). (S) Number of cell alignments in *Vangl2*^{+/+} (3.71 lines/embryo) and *Vangl2*^{+/Lp} (1.4/embryo) embryos. Error bars represent s.e.m. **p*<0.05. Scale bars: 50 μm (A, B); 12.5 μm (C, D).

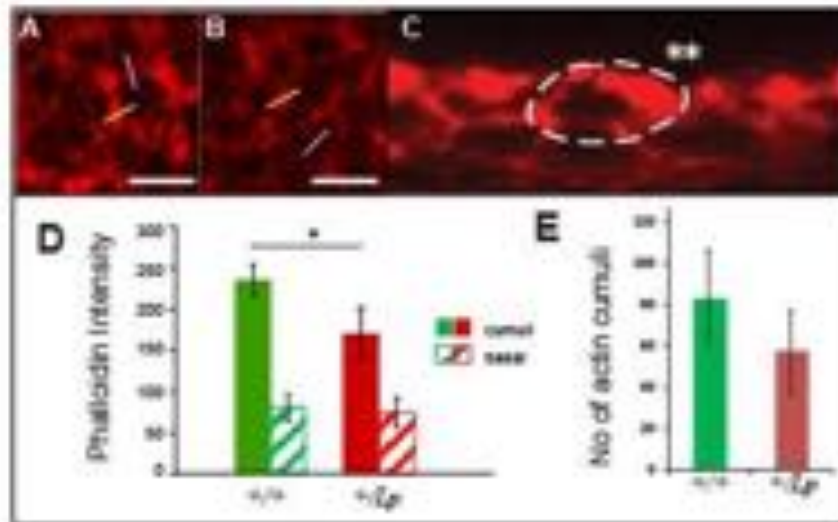


Figure 26. Actin cumulus in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos. (A, B) Magnification of an area of phalloidin-stained PNT showing an actin cumulus in *Vangl2*^{+/+} (A) and *Vangl2*^{+Lp} (B) embryos. (C) Orthogonal view of the cell marked in M by the yellow arrowhead, and outlined here, with a double asterisk marking the area of polarised actin cumuli. (D) Phalloidin intensity of the plot profile obtained from selected ROIs crossing the actin cumuli (solid bar) and basal actin at the linear boundary of two neighbouring cells (striped bar; yellow lines and purple lines, respectively, in A and B). (E) Graph of the number of actin cumuli in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos. Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$. Scale bars: 6.25 μm (A, B).

1.2.3 The Wnt-PCP pathway controls shaping of the PNP by apical cell constriction and cell reorganisation into rosettes

Having established that the apical face of the closing neural folds is affected in *Vangl2*^{+Lp} and *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos, we investigated the origin of the morphological NP malformation. A dorsal view of the PNP revealed *Vangl2* and *Daam1* expression in the lateral and more caudal PNP (Fig. 27A, B), a distribution similar to but more dispersed than that of *RhoA* (Fig. 27C). The caudal NP was very proliferative (Fig. 27D).

		<i>Vangl2</i> ^{+/+}	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>}	<i>Vangl2</i> ^{+/+} CytD	<i>Vangl2</i> ^{+/+} Y-27632
PNT	CVFR* (CZ and PZ)	16.6% (17.7% and 16.04%)	7.4% (8.7% [§] and 6.7% [§])	9.5% (10.3% and 9%)	13.5% (13.5% and 13.5%)
	Rosette complexity	11.8%	4.6%	9%	7%
	ACA ⁺ ^x (μm^2) (CZ and PZ)	7.43 (7.3 [†] and 7.5 [†])	11 (10 and 11.5)	10.17	9.93
	ACA CVFR (μm^2) ⁺⁺	6.28 [¥]	9.64	8.76	9.46
	ACA N-CVFR (μm^2)	7.65 [¥]	11.1	10.3	10
NSB/CLE	CVFR ^{**} , ^{***}	8.1%	3.1%	7.3%	8.3%
	Rosette complexity	11,3%	----	5.7%	3.9%
	ACA (μm^2) ^x , ^{xx}	11.5	17.05	14.87	11.52

Table 10. Cell morphology in the developing PNP. Significant differences were observed using the proportion comparison test when the data was compared from: the (*) *Vangl2*^{+/*Lp*}, *Vangl2*^{+/+} CytD and *Vangl2*^{+/+} Y-27632 treated embryos to the *Vangl2*^{+/+}; (**) the PNT to NSB/CLE for each condition and in (***) the *Vangl2*^{+/*Lp*} to the *Vangl2*^{+/+} embryos; and (§) CZ to the PZ in the PNT of the *Vangl2*^{+/*Lp*}. Significant difference were observed using the Mann-Whitney U test when comparing: the apical cell area (ACA) from (x) PNT to NSB/CLE for each condition and (xx) the *Vangl2*^{+/*Lp*}, *Vangl2*^{+/+} CytD and *Vangl2*^{+/+} Y-27632 treated embryos to the *Vangl2*^{+/+}; (¥) the CVFR and the N-CVFR in *Vangl2*^{+/+} embryos; (+) the *Vangl2*^{+/*Lp*}, *Vangl2*^{+/+} CytD treated embryos and *Vangl2*^{+/+} Y-27632 treated embryos compared to the *Vangl2*^{+/+} embryos; (†) No significant difference were evident between the ACA of the CZ to the PZ in the PNT of the *Vangl2*^{+/+} (p=0.72). Posterior neuropore (PNP); preneural tube (PNT); sub-zones of the PNT: central zone (CZ) and peripheral zone (PZ); most caudal part of PNP (NSB/CLE); cell with vertex forming a rosettes (CVFR); cells with no vertex forming rosettes (N-CVFR); percentage of high order rosettes (Rosette complexity); apical cell area (ACA, μm^2).

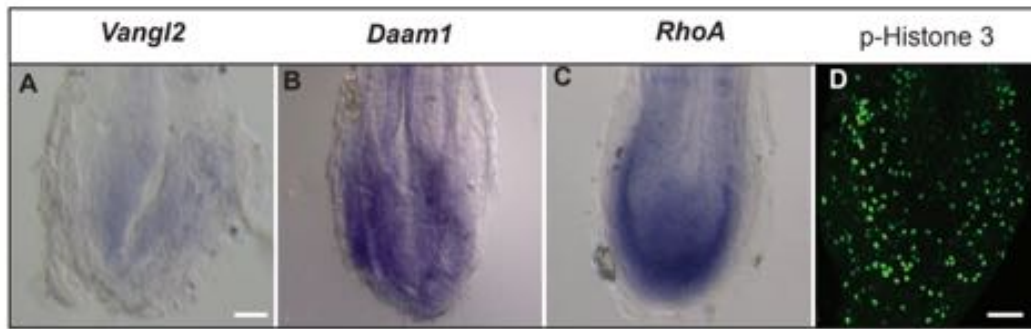


Figure 27: Wnt-PCP and proliferation in a dorsal view of the PNP. (A-C) Whole mount *in situ* hybridisation of E9.5 mouse embryos showing *Vangl2* (A), *Daam1* (B) and *RhoA* (C) mRNA expression. (D) Whole mount immunolabelling for p-Histone 3. Scale bars: (A) 100 μm , also applies to B and C. (D) 50 μm .

We studied the apical cell domain in the entire PNP, which includes the node-streak border and the caudal lateral epiblast (hereafter NSB/CLE). NMPs originate in this region (neural cell precursors; Fig. 28A), as well as in the pre-NT (PNT) where the neural folds start to elevate and that mostly houses NMPs (Fig. 28A; Henrique 2015; Wymeersch 2016). ZO1 staining of E9.5 *Vangl2*^{+/+} embryos (n=6) highlighted the apical cell organisation in the PNP (Fig. 28A). Maximum projections of confocal images were segmented to obtain the area of the apical cell domain, the presence of rosettes, and the number of vertices and their order (number of cells that meet at that vertex). The PNT was divided into two zones (see Fig. 28A), a central zone that included the midline and a peripheral zone that takes in the neural folds. Surprisingly, the mean apical cell area did not differ between the two zones (7.35 μm^2 and 7.46 μm^2 , respectively), the average in the PNT being 7.43 μm^2 . However, the average cell size in the NSB/CLE was 11.5 μm^2 , with a significant increase in the apical domain of the cells from the NSB/CLE compared with the PNT (see Table 1. 2). Hence, apical cell contraction appears to occur in a caudal-rostral direction.

Multicellular rosettes have been correlated with the epithelial cell rearrangements that drive CE in many species (Lienkamp 2012; McGreevy 2015). Cells formed rosettes within the PNP of *Vangl2*^{+/+} embryos; however, their distribution across the PNP was not uniform, and they were more concentrated in the PNT (16.6%) than in the NSB/CLE (8.1%: Table 10). When we analysed the two regions that form the PNT, we observed similar proportions in both zones (17.6% rosettes in the central and 16% in the peripheral

zone). Rosette formation is associated with a reduced apical area, a process linked to tissue folding during morphogenesis (Harding 2014). Indeed, there was a reduction in the average apical cell area in the PNT when cells forming rosettes were analysed separately (from $7.65 \mu\text{m}^2$ to $6.28 \mu\text{m}^2$; Fig. 28B, Fig. 29D, Table 10). Thus, apical constriction of cells in the entire caudal neural ectoderm elicits bending of the PNP in association with cellular rosette formation, which progresses in a caudo-rostral direction.

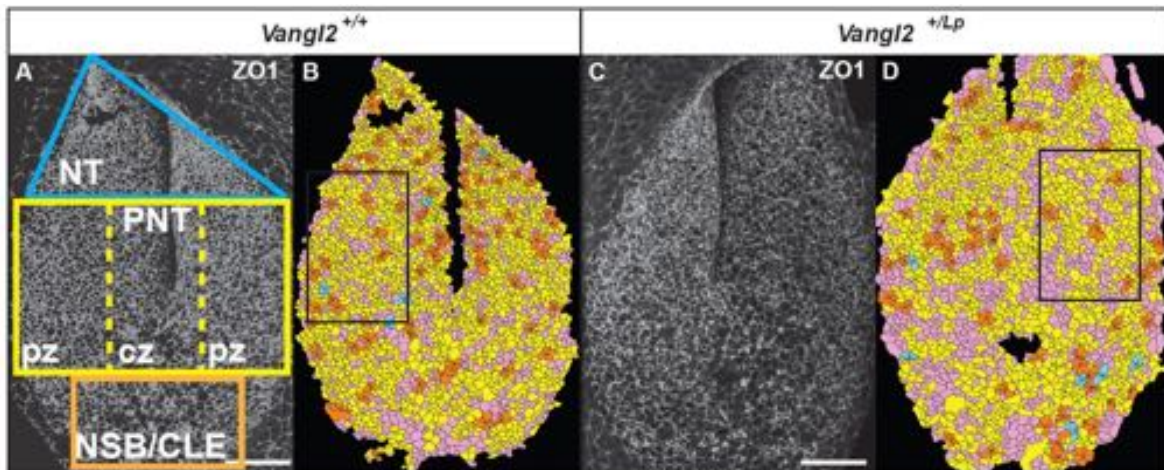


Figure 28. Cell reorganisation into rosettes at the PNP of *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos. (A-D) Dorsal views of the PNP of E9.5 *Vangl2*^{+/+} (A, B) and *Vangl2*^{+/Lp} (C, D) embryos. (A) Diagram illustrating the regionalisation of the PNP: NT, neural tube; PNT, preneural tube; pz, peripheral zones; cz, central zone; NSB/CLE, the node-streak border and the caudal lateral epiblast. (A, C) ZOI immunolabelling. (B, D) Confocal images segmented with Seedwater Segmenter, and imported to ImageJ to define the rosettes. Cells were colour-coded based on the number of cells that meet at shared vertices: orange, 5-cell rosette; blue, 6-cell rosette. Cells that shared vertices with 4 or 3 cells are in yellow and pink, respectively (not considered rosettes). Scale bars: 50 μm .

Interestingly, there was a significant increase in apical cell area in the PNT of *Vangl2*^{+/Lp} embryos (n=4) relative to *Vangl2*^{+/+} embryos (a 1.5-fold increase), which was also evident in the cells that form rosettes (Table 10, Fig. 29D). This 1.5-fold increase in apical cell size was also observed in the NSB/CLE (Table 10). Moreover, the *Vangl2*^{+/Lp} PNT had significantly fewer rosettes than did *Vangl2*^{+/+} embryos, as well as fewer higher order rosettes (rosettes formed by more than five cells in the vertex; Fig. 28C, D, Fig. 14A-C, Table 10). When we analysed the sub-zones of the PNT, although both had significantly fewer rosettes than *Vangl2*^{+/+} embryos, there was a significantly lower proportion of rosettes (6.7%) in the peripheral zone than in the central zone (8.7%; Table 10). This reduction of rosettes in the *Vangl2*^{+/Lp} PNT also affected the NSB/ CLE area, where only 3.1% of rosettes were located and no higher order rosettes were observed (Fig.

29C). Thus, the morphological changes in *Vangl2*^{+Lp} embryos resulting from altered apical constriction generates 1.5-fold larger apical areas in the entire PNP and fewer multicellular rosettes, leading to a 1.4-fold increase in the length of the neural fold (Fig. 18D).

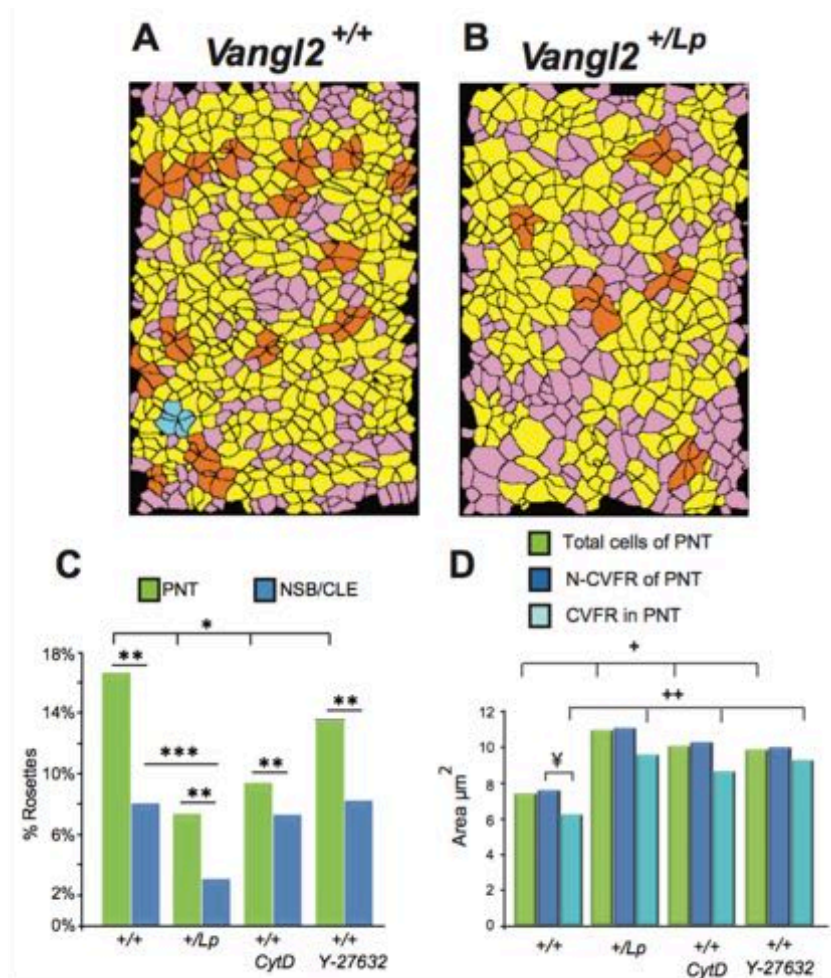


Figure 29. Altered apical cell constriction at the PNP of *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp}; CytD- and Y-27632-treated embryos. (A, B) Magnifications of the PZ (outlined in Fig.1.13 B and D, respectively). (C) Percentage of cells in rosettes in the PNT and in the NSB/CLE under the four different conditions. (D) Mean apical cell area (μm²) in the PNT, differentiating between: total cell population; cells not forming rosettes (N-CVFR); cells with a vertex forming rosettes (CVFR) in the four different conditions. Symbols all indicate significant differences ($p < 0.05$) between specific cell populations as indicated by the brackets.

The molecular motor non-muscle myosin-IIB heavy chain (MHC-IIB), together with F-actin, is involved in apical constriction. Immunolabelling revealed a scattered distribution of MHC-IIB in the *Vangl2*^{+/+} PNP, with more concentrated expression in the NSB/CLE area (Fig. 30A, Fig. 32Ai-Aiii), a distribution distinct to that in the cranial NT

(McGreevy 2015). The *Vangl2*^{+/*Lp*} PNP exhibited a more abundant and intricate MHC-IIB meshwork, although some individual cells were also observed (Fig. 30D, Fig. 31Bi-Biii). *Vangl2* lies downstream of Wnt-PCP and it regulates Rho kinases, which phosphorylate myosin light chain, the key regulator of non-muscle myosin-IIB (Ybot-Gonzalez 2007; Etienne-Manneville 2002). In *Vangl2*^{+/*+*} embryos, phosphorylated myosin-IIB (p-MLC) was found to be condensed either medioapically or in pairs of cumuli in neighbouring cells forming dense supracellular p-MLC-actin structures (Fig. 30G-I''). Interestingly, a similar apical localisation of p-MLC has been described for apical contractile pulses during *Drosophila* gastrulation (Martin 2009; Mason 2013; Vasquez 2014). By contrast, *Vangl2*^{+/*Lp*} cells in the PNP accumulated p-MLC across the entire apical domain, in both the junctional and apical domain and they failed to concentrate medioapically. Although similar numbers of p-MLC pairs formed in *Vangl2*^{+/*Lp*} as in *Vangl2*^{+/*+*} embryos, there was an abnormal distance between them (*Vangl2*^{+/*Lp*} 1.85 μ m vs *Vangl2*^{+/*+*} at 1.34 μ m; $p < 0.05$; Fig. 30J-M).

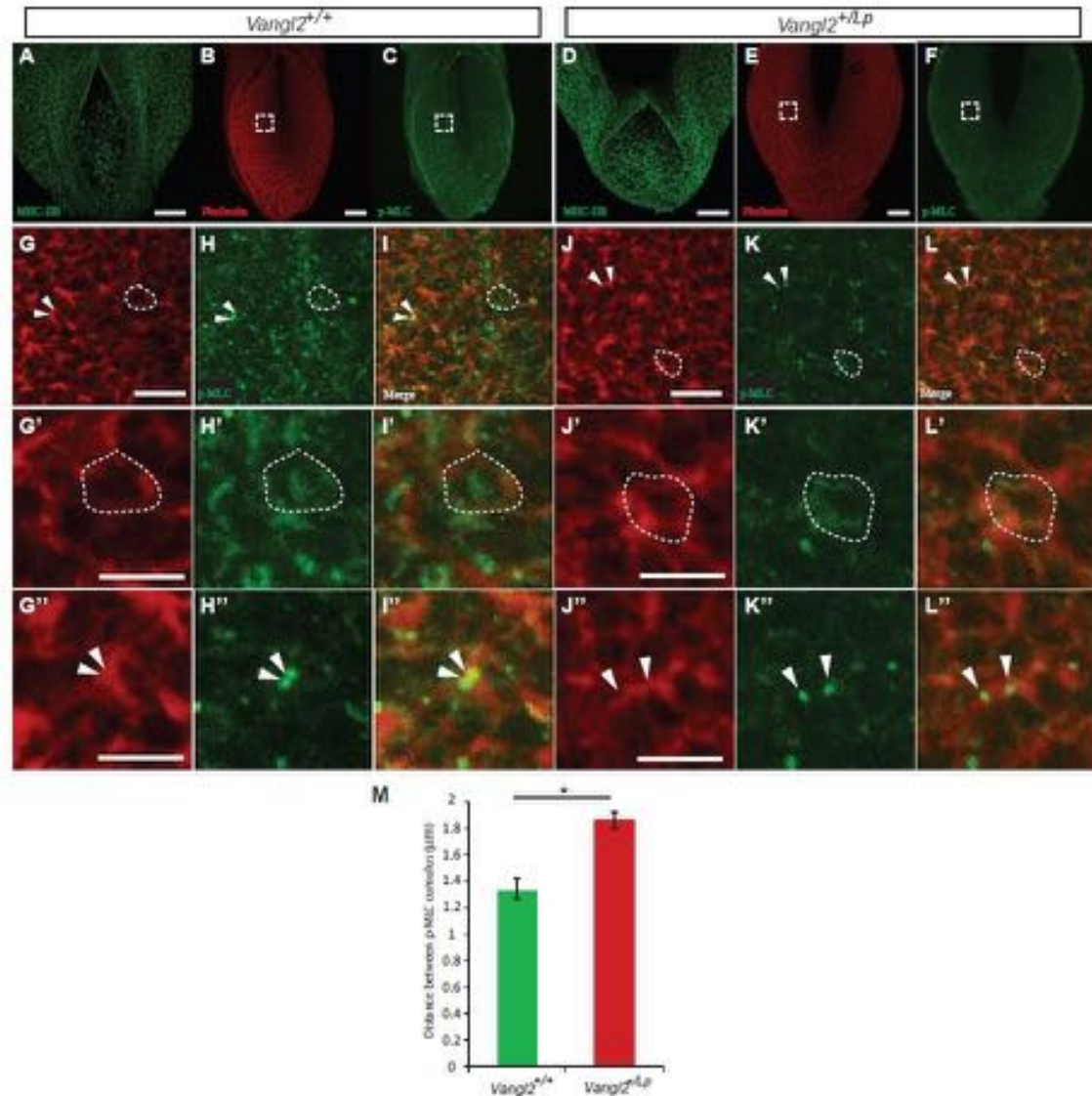


Figure 30. Mutation of the *Vangl2* gene disrupts the supracellular actomyosin meshwork. (A-L'') Dorsal view of PNP from *Vangl2*^{+/+} (A-C) and *Vangl2*^{+/Lp} (D-F) embryos labelled with anti-MHC-IIB (A, D), phalloidin (B, E) or anti-p-MLC (C, F). G, H, J and K are magnifications of the insets in B, C, E and F, respectively; I and L are merged panels of G, H and J, K, respectively; H'-I' are medioapical condensations of p-MLC in a cell outlined in G-I; K'-L' show the failed medioapical condensation of p-MLC evident at the junction and dispersed p-MLC indicated by the dashed outline in J-L. G''-I'' (*Vangl2*^{+/+}) and J''-L'' (*Vangl2*^{+/Lp}) show paired cumuli of p-MLC, as marked by the arrowheads in G-L. (M) Difference between the distance of paired p-MLC cumuli in the *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} PNT. **p*<0.05. Error bars indicate s.e.m. Scale bars: 50 μm (A-F); 12.5 μm (G-L); 6.25 μm (G'-L'').

Hence, the continuous shaping of the PNP appears to be initiated in the most caudal part of the wild-type PNP, mainly involving actomyosin apical cell constriction, probably caused by pulse contraction. Towards more anterior regions of the PNP, and in conjunction with the differentiation process, more complex mechanisms of tissue folding are acquired, all regulated by the Wnt-PCP pathway.

*1.2.4 NMP fate in the PNP is not determined by the *Vangl2* genotype*

In addition to the average increase in the apical cell area, we found a population of cells in the PNT of *Vangl2^{+Lp}* embryos that were generally bigger than the larger cells in *Vangl2^{+/+}* embryos; these large cells are referred to hereafter as ‘giant cells’ ($\geq 13 \mu\text{m}^2$; Fig. 32A). The giant cells in *Vangl2^{+/+}* embryos are mainly located in the NSB/CLE where 40% of the population were giant cells, compared with 21% in the PNT. We investigated whether this reduction follows a caudo-rostral progression by analysing the most anterior region of the PNP, the NT (Fig. 28A), in which giant cells represent only 15.6% of the population. Giant cells were more abundant and widespread in *Vangl2^{+Lp}* than in *Vangl2^{+/+}* embryos, representing 57% of the total population in the NSB/CLE, 42% in the PNT and a 31.3% in the NT (Fig. 32A). Thus, there was a caudalrostral reduction in the proportion of giant cells in *Vangl2^{+/+}* and *Vangl2^{+Lp}* embryos.

The distribution of giant cells in the PNP resembles that of MHCII (Fig. 31Aii). In fact, whereas 30.8% of the giant cells in the *Vangl2^{+/+}* PNP were MHC-II positive, this figure increased significantly to 75.7% in the PNP of *Vangl2^{+Lp}* embryos. In the small cell population (apical area $< 13 \mu\text{m}^2$) the apical accumulation of MHC-II did not vary between these two genotypes (20.3% in *Vangl2^{+/+}* and 22.97% in *Vangl2^{+Lp}*; Fig. 31A-C).

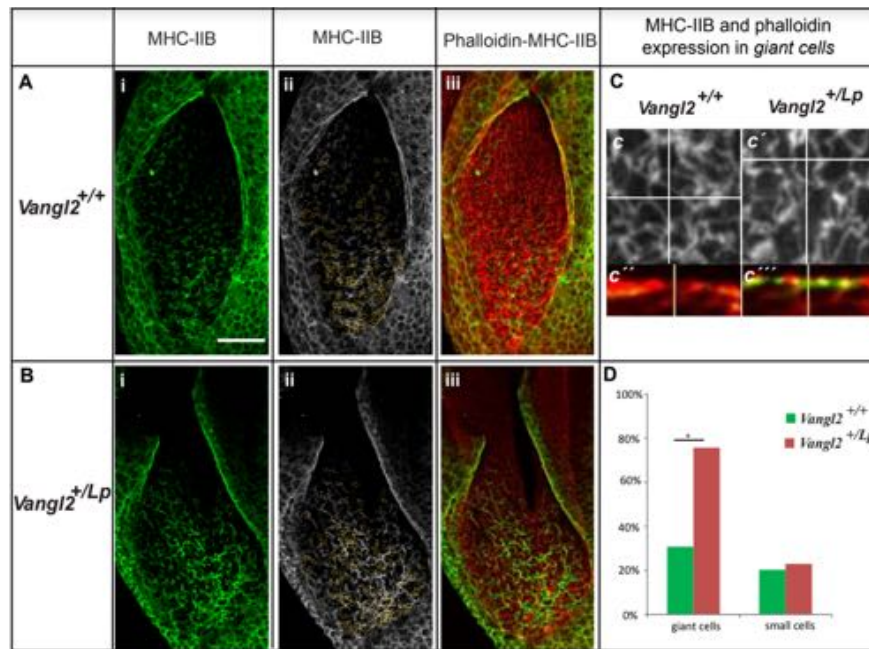


Figure 31: MHC-IIB expression in the giant cell population. (A) Dorsal view of a *Vangl2*^{+/+} and (B) *Vangl2*^{+/Lp} PNP showing the distribution of MHC-IIB (green in i and grey in ii) and of giant cells (outline in yellow in ii), and the merged MHC-IIB and phalloidin image (iii). (C) Amplification of the giant cells in *Vangl2*^{+/+} (c) and *Vangl2*^{+/Lp} (c') embryos marked by the crossing point of the two axes and the corresponding orthogonal view (c'' and c''', respectively) MHC-IIB and phalloidin. (D) Graph representing the proportion of MHC-IIB positive giant cells, with significantly more MHC-IIB positive cells in the *Vangl2*^{+/Lp} than in the *Vangl2*^{+/+} ($p < 0.05$) embryos, as well as the MHC-IIB labelled small cell population. Scale bar in Ai 50 μ m, also applying to Aii-iii, Bi-iii

The rostral and lateral part of the CLE houses NMPs (Wymeersch 2016), which initially express both T (mesoderm marker) and Sox2 (neural marker; Tsakiridis 2014). The downregulation of Wnt promotes neural differentiation (Ven 2011) and, thus, we analysed the nature of the giant cells to determine whether the *Vangl2* mutation also affected the development and differentiation of NMPs in the PNP. z-stacks of confocal images demonstrated that NMPs (T⁺/Sox2⁺) constituted 82% of the PNT in *Vangl2*^{+/+} embryos, whereas 8% of the cells had already differentiated towards a mesodermal fate (T⁺/Sox2⁻) and 5.6% to a neuronal fate (T⁻/Sox2⁺; 4.4% of the cells were of unknown nature as they were T⁻/Sox2⁻; Fig. 32B-C). Similar proportions were detected in the homologous region of *Vangl2*^{+/Lp} embryos (82.1% T⁺/Sox2⁺; 7.3% T⁺/Sox2⁻; 5.2% T⁻/Sox2⁺; 5.4% T⁻/Sox2⁻) indicating that NMP fate in the PNT was not affected by the *Vangl2* genotype (Fig. 33A, B, Table 11).

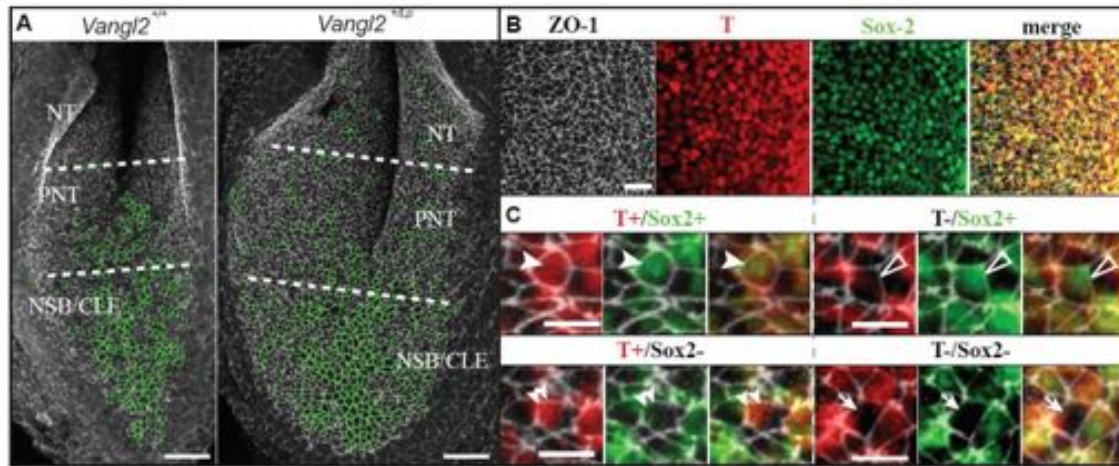


Figure 32. Giants cells and Neuromesodermal progenitors identification in the PNP. (A) Dorsal view of the PNP of E9.5 *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos immunolabelled for ZO1 (grey), with giant cells ($\geq 13 \mu\text{m}^2$) outlined in green. (B) Immunolabelling for ZO1 (grey), T (red), Sox2 (green) and the merged image in a section of the PNT showing the four cell types. (C) Magnification of NMPs ($\text{T}^+/\text{Sox2}^+$, arrowheads), neural cells ($\text{T}^-/\text{Sox2}^+$, open arrowheads), mesodermal cells ($\text{T}^+/\text{Sox2}^-$, double arrowheads) and unidentified cells ($\text{T}^-/\text{Sox2}^-$, arrows). In each set of images, left-hand panel shows ZO1/T immunolabelling, middle panel ZO1/Sox2 immunolabelling and right-hand panel ZO1/T/Sox2 merged images. The divisions of the PNP (NT, PNT and NSB/CLE) are defined in A. Scale bars: 25 μm (A); 12.5 μm (B); 6.25 μm (C).

NMPs had a significantly larger apical cell area than cells that differentiated further in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos (Table 11). However, all cell types in the *Vangl2*^{+/Lp} embryos had a larger apical area than their counterparts in the *Vangl2*^{+/+} embryos. The PNT contained more giant neural cells ($\text{T}^-/\text{Sox2}^+$) in *Vangl2*^{+/Lp} than *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 33B, Table 11). Indeed, NMPs were under-represented within the PNT of the *Vangl2*^{+/Lp} embryos, whereas neural cells were over-represented among the giant cells relative to the general population (Fig. 33B, Table 11).

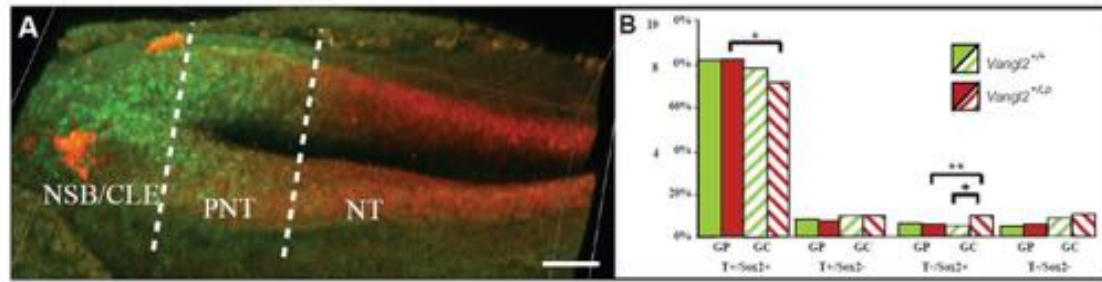


Figure 33. The progressive differentiation of neuromesodermal progenitors in the PNP is not affected by *Vangl2* heterozygosity. (A) 3D image of the PNP labelled with Sox2 (red) and T (green). (B) Graph of the different cell types in the PNT of *Vangl2*^{+/+} (green) and *Vangl2*^{+/Lp} (red) embryos in both the general population (GP, solid bars) and in the subpopulation of giant cells (GC striped bars). * $p < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁺/Sox2⁺ cells in the GC population compared with the general population of the PNT in *Vangl2*^{+/Lp} embryos; ** $p < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁻/Sox2⁺ cells in the GC population compared with the general population of the PNT in *Vangl2*^{+/Lp} embryos; + $p < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁻/Sox2⁺ cells in the GC population of the *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos. The divisions of the PNP (NT, PNT and NSB/CLE) are defined in A. Scale bars: 50 μ m (D).

	genotype		T ⁺ /Sox2 ⁺	T ⁺ /Sox2 ⁻	T ⁻ /Sox2 ⁺	T ⁻ /Sox2 ⁻
General population cells in the PNT	<i>Vangl2</i> ^{+/+}	n=1272	82%	8.09%	5.66%	4.4%
	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>}	n=1543	82.11%*	7.3%	5.2%**	5.4%
	<i>Vangl2</i> ^{+/+}	ACA (μm ²)	4.17 [‡]	2.67 [‡]	3.33 [‡]	2.66
	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>}	ACA (μm ²)	5.27 [‡]	3.81 [‡]	4.2 [‡]	3.3
	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>} vs <i>Vangl2</i> ^{+/+}	% ACA increase	126%	143%	126.6%	124%
Giant cells in the PNT	<i>Vangl2</i> ^{+/+}	n= 182	78%	9.4%	4.2% ⁺	8.4%
	<i>Vangl2</i> ^{+/<i>Lp</i>}	n= 578	71.5%*	9.3%	9.2% ^{+/**}	10.2%

Table 11: Presence of each cell type in the PNT and their apical cell areas in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos. This table shows the cell types found in the general population of the PNT of 4 *Vangl2*^{+/+} and 4 *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos according to the expression of the T and Sox2 genes, as well as in the “giant cell” population: neuromesodermal progenitors (T⁺/Sox2⁺); mesodermal cell (T⁺/Sox2⁻); neural cell (T⁻/Sox2⁺); unidentified cells (T⁻/Sox2⁻); the apical cell area (ACA) is given in μm²; n= number of cells analysed in each condition; the % ACA increase is the percentage increase in apical cell area between the *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos for each type of cell. (*) Significant difference between the percentages of T⁺/Sox2⁺ in the giant cell population compared to the general population of the PNT in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos ($p < 0.05$). (**) Significant difference between the percentages of T⁻/Sox2⁺ in the giant cell population compared to the general population of the PNT in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos ($p < 0.05$). (+) Significant difference when comparing the percentage of T⁻/Sox2⁺ in the “giant cell” population of the PNT of *Vangl2*^{+/+} vs *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos ($p < 0.05$). (‡) Significant difference when comparing the apical cell area of the NMPs (T⁺/Sox2⁺) vs the mesodermal (T⁺/Sox2⁻) or neural cell fates (T⁻/Sox2⁺) for each genotype (Anova 1 factor with the post-hoc Games-Howell test, $p < 0.05$).

Finally, the extent and intensity of *T* and *Sox2* mRNA expression was not altered in the *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos relative to their *Vangl2*^{+/+} littermates (Fig. 34A-H). In summary, the differentiation of NMPs does not appear to be altered in the PNP of *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos, although the increased apical cell size of PNP cells in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos apparently has a stronger impact on neural cells.

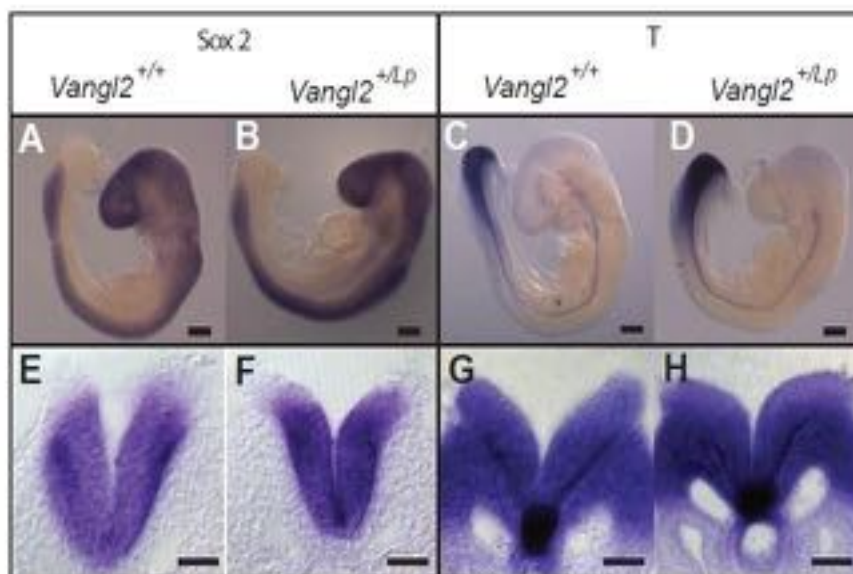


Figure 34. *Sox2* and *T* mRNA *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos. (A-H) *In situ* hybridisation of *Sox2* (A, B) and *T* (C, D) expression in *Vangl2*^{+/+} (A, C) and *Vangl2*^{+Lp} embryos (B, D), and the corresponding transverse sections through the PNP (E-H). Scale bars: 200 μ m (A-B), 50 μ m (E-H);

3. Discussion

The role of the Wnt-PCP pathway during neurulation has become clearer in recent years. Mice carrying mutations in certain Wnt-PCP genes develop craniorachischisis, demonstrating the importance of this pathway in the formation of the NP midline and in the initiation of NT closure, fuelling interest as to how the Wnt-PCP pathway influences these events. Here, we describe the cell behaviour underlying the folding of the caudal neural ectoderm and we identify distinct apical mechanisms that are acquired gradually, showing that Wnt-PCP is required to coordinate such cellular reorganisation. We also demonstrate the caudo-rostral dynamics of progression towards cell differentiation (Henrique 2015). These observations define sequential epithelial tissue dynamics unique to the caudal NP, and the role of Wnt-PCP signalling in the closure and differentiation of the spinal NT.

All cell types participate in the dynamic apical mechanisms that shape the PNP

Two morphological processes are active during NT closure in mice: inflection of the cranial neural tissue where the neural folds begin and where they are well separated; and zipping from the point of closure to close the neuropore (Galea 2017; Massarwa

2013). However, zipping is an anteroposterior process that fuses the dorsal neural folds, whereas for the PNP to achieve an appropriate shape it must first undergo posterior-to-anterior folding. Here, we show that the apical plane of the caudal NP has a continuous network of tight and adherens junctions at the apical cell borders (marked by ZO1, F-actin and N-cadherin), unifying the precursors and more differentiated cells in the PNP, and allowing the tissue to fold into a tube. In addition, we describe a progressive acquisition of more complex mechanisms of apical constriction in conjunction with caudo-rostral dynamics of cell differentiation (Henrique 2015).

In the caudal part of the PNP we found that actomyosin contraction seems to be the main mechanism responsible for folding, which is maintained to a lesser extent in the anterior regions of the PNP. The presence of paired p-MLC cumuli in adjacent cells, colocalising with actin cumuli, suggests the existence of supracellular p-MLC-actin foci. The stability of these foci is perturbed in the *Vangl2^{+Lp}* PNP, probably owing to the loss of intercellular cytoskeletal and cell adhesion integrity. These supracellular p-MLC-actin foci appear to be analogous to the punctuated actin contractions regulated by the Wnt-PCP pathway during *Xenopus* gastrulation (Kim 2011). Moreover, the distribution of MHC-IIB and the medioapical condensation of p-MLC in the PNP resemble the myosin assembly and disassembly cycles associated with apical pulses of constriction during *Drosophila* gastrulation (Martin 2009; Mason 2013; Vasquez 2014). These cycles of myosin are affected in *Drosophila* mutants with modified myosin phosphorylation. These mutants display more continuous apical myosin-IIB assembly that alters the apical F-actin distribution and decreases the rate of apical constriction (Vasquez 2014). Thus, we propose that myosin-IIB assembles apically and forms crosslinks with the apical F-actin network to induce apical contraction, which is followed by its disassembly. The disorganisation of F-actin evident in *Vangl2^{+Lp}* embryos would produce a more continuous apical distribution of myosin-IIB that is unable to bind to the F-actin network or to coalesce medioapically, and that fails to bring together supracellular p-MLC-actin cumuli. This disorganisation will reduce the rate of apical contraction, as seen in the giant cells of the *Vangl2^{+Lp}* embryos. PNP cells may undergo pulsatile rather than continuous contraction to accommodate the cytoskeletal organisation of a tissue undergoing differentiation. Such contractions would remodel the actomyosin networks in pulses, not only to shape the tissue but also altering the cellular patterning of the tissue, generating a

morphogenetic neuroepithelium as suggested previously (Vasquez 2014). These events deserve further study to characterise the underlying cell behaviours.

There is a gradual caudo-rostral formation of Wnt-PCP- dependent cellular rosettes, with fewer rosettes forming when this pathway is disrupted (Trichas 2012). Indeed, we found that *Vangl2^{+Lp}* embryos generate fewer and less complex epithelial rosettes, with the peripheral zone the most affected region of the PNT. Cadherins, linked to and dependent on a well- structured F-actin network, are key elements in the cell intercalation that occurs during epithelial rosette formation (Blankenship 2006; Mason 2013). Indeed, N- cadherin and/or Shroom3 downregulation expands the apical cell surface, producing a loss of apical F-actin and a failure of NT closing, reinforcing the role of N-cadherin in apical constriction (Morita 2010; Nandadasa 2009; Plageman 2011). *Vangl2* directly controls N-cadherin expression (Nagaoka 2014) and, thus, we propose that rosette formation is part of the general shaping of the PNP. This requires a continuous network of tight and adherens junctions, and it is impaired in *Vangl2^{+Lp}* embryos or upon exposure to CytD and Y-27632, which significantly impair rosette formation.

As we show here, apical actin cables represent another planar polarised epithelial structure that forms in the most anterior part of the PNP. Mediolaterally oriented apical actomyosin cables, regulated by the Wnt-PCP pathway, are thought to be crucial for the polarised bending of the pre-elevated cranial NP, and therefore for NT closure by inflection (McGreevy 2015; Nishimura 2012). We also observed these cell arrangements in the anterior PNP, in association with zipping but oriented in an anteroposterior direction, highlighting the difference between the mechanisms driving cranial and caudal NT closure. Thus, although the caudal epiblast cells rely on actomyosin apical pulse contraction to initiate PNP folding, cells interact more intensely at more anterior positions. There they form more rosettes and establish planar polarised cell alignments under the control of Wnt-PCP signalling, highlighting the complexity involved in shaping the anterior part of the PNP prior to closure.

Actin disorganisation provokes an abnormal increase in the apical cell surface area affecting the general morphology of the neural folds

The NP contacts the surface ectoderm dorsally, the paraxial mesoderm laterally and the notochord ventrally. Both the surface ectoderm and notochord are required to induce dorsal and midline bending of the NP (DLHPs and MHP, respectively), points that drive neural fold closing (Ybot-Gonzalez 2002; Ybot-Gonzalez 2007). Here, we show that atypical bending of the lateral neural fold in *Vangl2^{+Lp}* embryos is phenocopied by chemically inhibiting actin dynamics, demonstrating that correct apical F-actin assembly is needed to shape the neural fold and to provide it with the structural rigidity required for elevation. These alterations in *Vangl2^{+Lp}* embryos seem to affect the entire NP, e.g. the increased apical cell area or the less intense actin cumuli. However, rosette formation and polarised cell alignment are distorted in the straight part of the neural fold, juxtaposed to the paraxial mesoderm. Hence, contacts with the surface ectoderm dorsally and notochord ventral, might prevent these regions from becoming morphologically affected by the alterations to the actin cytoskeleton. Indeed, at early stages when the DLHP is absent, the outward flexure of the entire lateral fold is affected in *Vangl2^{+Lp}* embryos, and following exposure to CytD at a later stage, when the MHP is absent, the dorsal part of the neural fold remains unaffected (Ybot-Gonzalez 1999; this work). Moreover, the increase in the apical cell area in the PNT and NSB/CLE occurs at a similar rate in *Vangl2^{+/+}* and *Vangl2^{+Lp}* embryos, strengthening the idea of a general rather than a more regionalised process. The mutation of genes that affect F-actin reorganisation and that impede cranial NT closure, such as *Shroom3* and *Cofilin1*, also provokes an expansion of the apical cell area, producing a thinner NP and outward flexure of the cranial neural folds (Grego-Bessa 2015; Hildebrand 1999; McGreevy 2015). Thus, we predict that Wnt-PCP signalling organises the apical F-actin throughout the PNP, which together with myosin drives NP folding by apical contraction. In more anterior parts of the PNP, the Wnt-PCP pathway produces cellular rearrangements through F-actin, providing the neural folds with a rigid apical structure that can withstand the external forces required for their elevation. Disruption of the Wnt-PCP pathway increases the apical cell area, provoking a loss of apical rigidity that affects neural fold morphology, reducing the apico-basal width and increasing its length. These morphological changes induce aberrant bending, causing the separation of the dorsal tips of the neural folds and impeding correct NT closure, resulting in spina bifida.

Altered apico-basal polarity in the early epiblast by Wnt-PCP signalling could affect NSB/CLE cells in the caudal PNP

The PNP contains cells at different stages of specification and differentiation; caudal neural cell progenitors are initially found in the caudal NSB/CLE zone (as bipotent NMPs), then, as the axis elongates, they occupy more anterior positions in the PNT and differentiate further. Here, we show that the NMPs in the NSB/CLE of *Vangl2^{+Lp}* embryos have a larger apical area than those in the wild type, a phenotype apparently arising from a primary defect in germ layer morphogenesis. This observation is consistent with the Wnt-PCP pathway and Vangl2 being required for the formation of the epiblast and primitive streak (Tao 2009).

NMPs are first detected in the epiblast at E7.5, close to the border between the node and primitive streak. NMPs persist in the chordoneural hinge (CNH) and its surrounding areas during trunk and tail formation, peaking at E9.5 and decreasing thereafter until they are undetectable by E14.5 (Wymeersch 2016). The epiblast is disorganised and primitive streak formation defective in dual *mpk1^{+/-}*, *Prickle1^{+/-}* and *Vangl2^{+Lp}* heterozygous mutants, in association with abnormal cell morphology, disorganised actin and the loss of apico-basal polarity (Suriben 2009; Tao 2009). Hence, Vangl2 is needed to establish/maintain apico-basal polarity and for cytoskeletal reorganisation at early stages of development. We postulate that the same phenomenon occurs later in development, but as the phenotype is milder at early stages, the direct consequences of these alterations can be studied. Altered apico-basal polarity in the epiblast resulting from perturbations in the Wnt-PCP pathway affects the NSB/CLE cells in the caudal PNP, which acquire a notably larger apical domain. This phenotype is inherited by all their descendants, including the NMPs and the neural cells incorporated into the neural folds.

Here, weaker Vangl2 activity in the giant cells disrupts the balance of cell fates, increasing neural fates and reduction of NMPs in the PNT. Hence, Vangl2 appears to influence NMP differentiation into neural cells rather than NMP specification. Nkd1 expression is upregulated in mice with mutations in *Cdx2*, a protein that inhibits Dishevelled, which is in turn needed for NT closure via Wnt-PCP signalling (Ven 2011). Downregulation of *Cdx2*, or *Wnt3a*, dampens canonical Wnt signalling and favours a

neural fate (Takada 1994); the Wnt-PCP pathway might also be impaired in these mutants affecting PNP cell fate as suggested here. Further studies will be necessary to gain a more complete picture of how the Wnt-PCP pathway participates in such events.

Resultado 2: Repercusión de alteraciones genéticas de la vía Wnt-PCP en la morfología del tubo neural tras el cierre del PNP (E11.5-E14.5)

Resultado 2: Repercusión de alteraciones genéticas de la vía Wnt-PCP en la morfología del tubo neural tras el cierre del PNP (E11.5-E14.5)

Introducción

Una vez conocemos con mas detalle el proceso de cierre del PNP, así como qué mecanismos están implicados en el mismo, nos centramos en estudiar cómo afecta el problema de plegamiento de la placa neural y la contracción apical en embriones *Vangl2^{+Lp}* en estadios posteriores al cierre del PNP (E11.5-E14.5). El siguiente paso sería comprobar si las alteraciones morfológicas de los pliegues observada en estadios E8.5-9.5, así como la distribución apical de actina en embriones *Vangl2^{+Lp}*, tienen efecto una vez cerrado el tubo neural. Para ello analizamos el tubo neural de los embriones *Vangl2^{+Lp}* a edades entre E11.5-14.5. Los embriones *Vangl2^{+Lp}* presentan cola rizada y una incidencia de espina bífida del 6%. El estudio de la malformación en los pliegues de estos mutantes nos da información sobre su repercusión durante el desarrollo caudal del embrión, ayudando a comprender el origen de este defecto.

2.1 Análisis histológico a E11.5-E14.5

El análisis histológico, mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina (HE), para *Vangl2^{+/+}* a E11.5-13.5 mostraba una fusión normal de pliegues (Fig. 35B-G), con un tubo neural cerrado, cubierto por un ectodermo de superficie continuo. En relación a esto, el análisis para *Vangl2^{+Lp}* a E11.5-13.5 reveló un fallo en la unión de los pliegues neurales, donde se mantenía la pérdida de rigidez de los pliegues laterales como consecuencia de la desorganización de los cables de actina, lo que provocaba la flexión de estos y hacía que los extremos dorsales estuvieran distanciados, provocando un problema de fusión en mayor o menor grado. Encontrábamos una unión ectópica entre las paredes de ambos pliegues y una acumulación de células, formando un agregado en la zona del fallo de unión de estos (Fig. 35J-O). El giro de la cola característico de los embriones *Vangl2^{+Lp}*, presentado en mayor o menor grado, no era un indicativo de aparición del agregado de estudio, ya que este no se presentaba en todos los embriones *Vangl2^{+Lp}* analizados, apareciendo en 28 de los 57 embriones analizados entre E11.5 y 13.5. La formación de este agregado de células podría ser promovida bien por un intento de solucionar el fallo de fusión (donde se activaría el proceso de reparación de heridas embrionarias), o porque

este mismo fallo provoque la acumulación de células en esa zona (origen neural, bien del neuroectodermo, o de la cresta neural recién formada). A pesar de la formación de un agregado de mayor o menor tamaño y de que algunos agregados crecían ocupando el lumen del tubo neural (Fig. 35M, N), un factor común era encontrar un ectodermo de superficie continuo que cubría el defecto. Esta cubierta epitelial hace imposible visualizar en los estudios macroscópicos cualquier acumulación celular entre pliegues, aunque los pliegues estuvieran separados.

Nota: Ya que existe un fallo de unión de los pliegues neurales, en ocasiones el tubo neural no se cierra, por lo que los laterales del tubo neural se siguen llamando pliegues neurales.

Histológicamente se han analizado embriones *Vangl2^{+Lp}* a diferentes edades donde se encontraba el agregado celular: E11.5 (n=7), E12.5 (n=3) y E13.5 (n=3). El estudio revelaba como a E14.5 el agregado de células desaparecía completamente y la zona dorsal del fallo de unión de pliegues, donde se encontraba el agregado a edades más tempranas, no mostraba defecto alguno (Fig. 35P; n=5), ni diferencias con los pliegues en los embriones *Vangl2^{+/+}* (Fig. 35H).

Los estudios mostraron como los agregados celulares no aparecían aleatoriamente, sino que aparecían en niveles del eje rostro caudal concretos del tubo neural, mostrando una localización que se repetía en los diferentes estadios embrionarios. Encontrábamos cúmulos celulares en dos regiones a lo largo del eje rostro caudal, marcados a E11.5 en la figura 35I para *Vangl2^{+Lp}*.

Región anterior: encontrábamos una primera zona afectada, cercana al nivel de localización del primordio de la extremidad posterior, alrededor de la somita 25.

Región posterior: encontrábamos otra zona afectada, esta vez más caudal, entre las somitas 30-33.

En el estudio histológico para *Vangl2^{+Lp}* encontrábamos una gran heterogeneidad en cuanto al tamaño, forma y estructura del agregado de células, que estaba relacionada con la forma de los pliegues neurales donde estaban localizados (Fig. 35J-O). Como cabía esperar observamos una fusión normal de pliegues en *Vangl2^{+/+}* a E11.5 (Fig. 35B, E),

E12.5 (Fig. 35C, F) y E13.5 (Fig. 35D, G), mientras en los *Vangl2^{+Lp}* encontrábamos un gran índice de fallos en la fusión de los pliegues (47% a E11.5 (Fig. 35J, M), 56% a E12.5 (Fig. 35K, N) y 50% a E13.5 (Fig. 35L, O), acompañados de varios tipos de agregado:

Tipos de agregados

Tipo 1: Agregados encapsulados

Encontrábamos agregados unidos al ectodermo de superficie que adquirirían una estructura bien diferenciada e invadían el lumen del tubo neural, debido a que el fallo de fusión era más severo. Los pliegues neurales estaban tan distanciados que era imposible cualquier contacto entre ellos. Estos agregados estaban encapsulados en lo que parecería una expansión del ectodermo de superficie, tanto en la región anterior (Fig. 35M, N) como posterior (Fig. 35J).

Tipo 2: Agregados disgregados

En ocasiones aparecían cúmulos en ambas regiones, anterior y posterior, que no llegaban a formar una estructura compacta, sino que estaban formados por células disgregadas que caían al lumen y establecían una fina capa de tejido cubriendo un fallo de fusión severo, sin contacto con el tejido neural (Fig. 35K, O)

Tipo 3: Agregados bajo la zona de fusión de pliegues

Agregados con un tamaño menor, localizados bajo los pliegues neurales ya fusionados. Estos agregados aparecían en la región posterior a E13.5 y posiblemente estaban formados por una acumulación de células entre dos pliegues neurales muy próximos a su fusión, que habían establecido contacto entre sí (Fig. 35L), donde la acumulación de células podría haber facilitado el cierre. Cabe la posibilidad de que lo que observamos sea un paso intermedio entre el fallo de fusión a E12.5 y la fusión completa a E14.5.

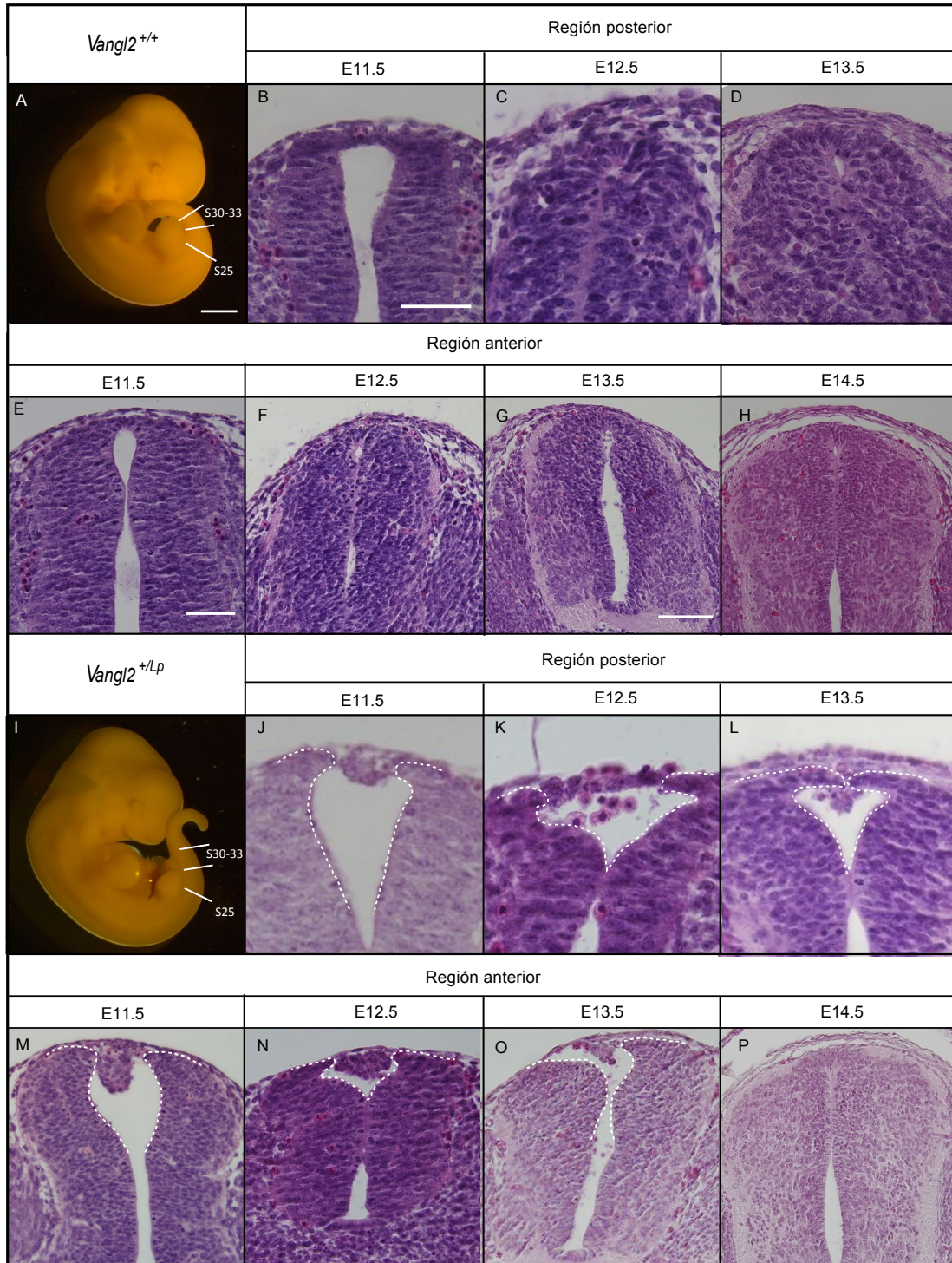


Figura 35. Análisis histológicos de embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp} a diferentes edades embrionarias. (A, I) Embrión a E11.5 fijado en Bouins, señalando los niveles de corte. (B-H) Secciones de parafina de la zona más caudal de embriones *Vangl2*^{+/+}, teñidas con hematoxilina y eosina a edades E11.5-E14.5; y (J-P) para embriones *Vangl2*^{+Lp}. Región anterior (S25) y región posterior (S30-33). Barra de escala en A: 1000 μ m (se aplica a I); 50 μ m en B (se aplica a C, D, J, K, L); 50 μ m en E (se aplica a F, M, N); 50 μ m en G (se aplica a H, O, P).

2.2 Microarray: Análisis de expresión diferencial entre embriones *Vangl2*^{+/+} vs *Vangl2*^{+Lp}

En paralelo al estudio histológico entre embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp} a los diferentes estadios de estudio, y para comprender mejor las diferencias a nivel de expresión genética entre ambos genotipos, se llevó a cabo un microarray de expresión genética, mediante el chip de Affymetrix MTA 1.0 (*Mouse Transcriptome Assays*). El estudio nos permitió conocer qué genes/rutas se encontraban alterados en nuestro mutante de estudio *Vangl2*^{+Lp}. Se utilizaron tres muestras de ARNm de tejido embrionario para el genotipo *Vangl2*^{+Lp}, así como tres muestras control *Vangl2*^{+/+} a E11.5. Para este estudio se utilizó la zona más caudal del embrión, desde la zona anterior a la inserción del primordio de la extremidad posterior (alrededor de la somita 25) hasta el final de la cola, zona donde se localizaban los agregados celulares de estudio.

Nombre de la muestra	Genotipo	RIN	Concentración (ng/ul)	Abs 260/280	Abs 260/230
C1	<i>Vangl2</i> ^{+/+}	>8	95.1	1.87	1.6
C2		>8	96.5	1.83	1.47
C3		>8	83.6	1.80	0.55
M1	<i>Vangl2</i> ^{+Lp}	>8	112.7	1.91	0.79
M2		>8	87.5	1.83	1.52
M3		>8	55.4	1.74	1.4

Tabla 12. Determinaciones de concentración y pureza en las seis muestras hibridadas en el chip MTA 1.0. (C), control; (M), mutante.

Tras la lectura de los chips, los datos se importaron en el software *Expression Console*TM de Affymetrix para calcular los valores de expresión y realizar el control de calidad de las muestras. El cálculo de intensidad de cada una de las sondas se realizó empleando los dos protocolos de análisis incluidos en el software (RMA-sketch y SST-RMA), basados en el algoritmo denominado *Robust Multi-array Average* (Irizarry 2003).

Análisis de expresión diferencial y análisis funcional. Estudio de procesos y rutas desregulados.

Para estudiar la distribución global de la fluorescencia se realizó un análisis de señal de intensidad, como medida de la expresión de los genes estudiados, de cada una de las muestras utilizando *boxplots*. El gráfico *boxplot* de señales relativas marcaba un comportamiento más alejado de la muestra M3, correspondiente a $Vangl2^{+/Lp}$ (Fig. 36A).

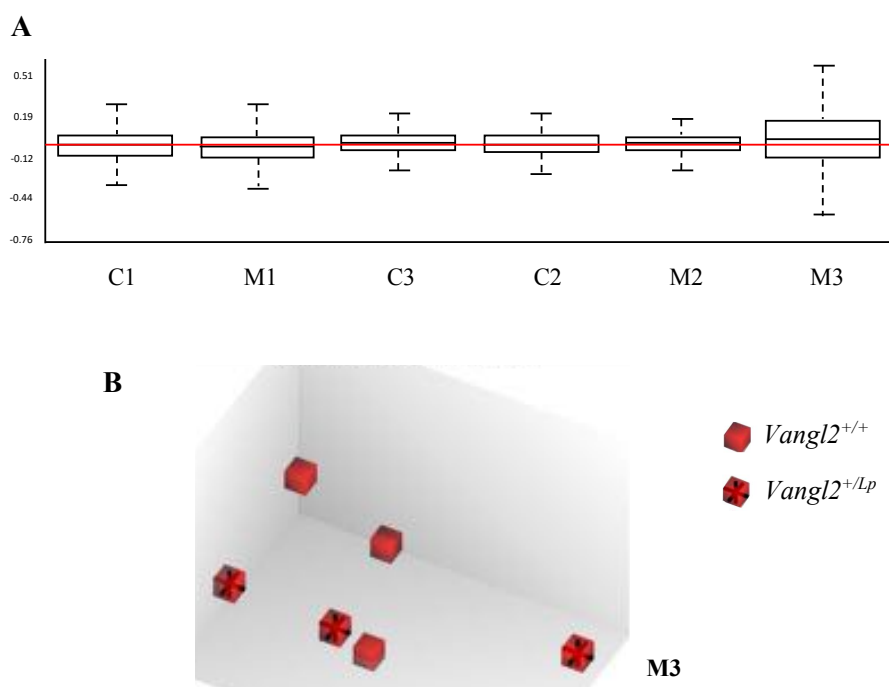


Figura 36. Gráficos boxplot y análisis PCA de las seis muestras analizadas. (A) Gráficos boxplot de las señales relativas, como medida de la expresión de los genes estudiados. (B) Análisis PCA de señales. ($Vangl2^{+/+}$) C1, C2 y C3; ($Vangl2^{+/Lp}$) M1, M2 y M3.

El análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) es una de las técnicas de aprendizaje no supervisado, las cuales suelen aplicarse como parte del análisis exploratorio de los datos. Esta técnica estadística se realiza para simplificar el análisis y visualizar el conjunto de datos multidimensionales (Fig. 36B). El análisis no diferenció las muestras $Vangl2^{+/Lp}$ de las $Vangl2^{+/+}$. La muestra más alejada en el análisis PCA es la M3 (esquina inferior derecha; Fig. 36B), de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de correlación de Spearman (Fig. 37), utilizada para valorar la asociación entre variables cuantitativas. Esto nos permite definir que la respuesta genética en la muestra $Vangl2^{+/Lp}$ M3 es diferente respecto al resto de muestras.

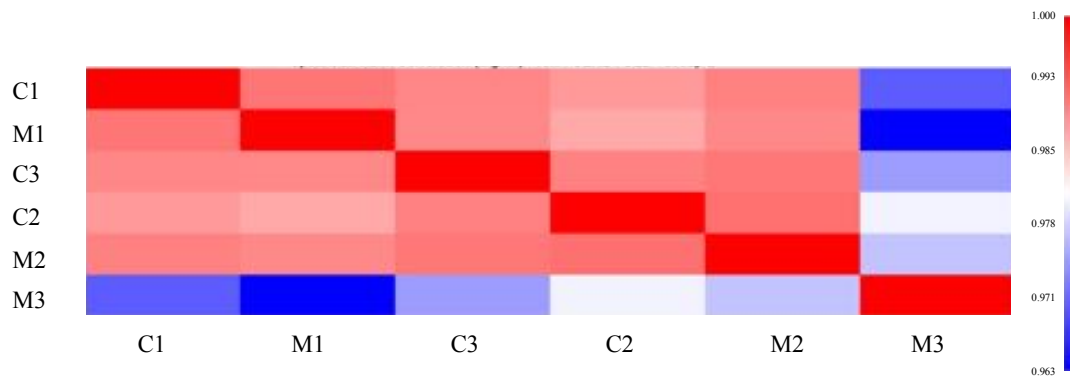


Figura 37. Estudio de correlación de Spearman. El estudio representa la similitud de las muestras según el estudio de correlación de Spearman. La escala a la derecha de la figura representa la similitud entre las muestras, donde azul es menor similitud y rojo mayor similitud.

Análisis de expresión diferencial y análisis funcional

El análisis de expresión diferencial se realizó empleando el software *Transcriptome Analysis Console* (TAC) v 3.0 de Affymetrix. En este estudio, 1426 sondas presentaron un valor $p < 0.05$ en la prueba ANOVA y un *Fold Change* (FC) comprendido entre -1.91 y +1.68. De estas 1426 sondas asociadas con $p < 0.05$, 94 presentaron un FC mayor que 1.25 (en cualquiera de las dos direcciones). La tabla 13 muestra 4 de las 10 sondas con mayor sobreexpresión y 2 de las 10 más subexpresadas en la comparación de genotipos identificados en este análisis.

GEN	<i>Fold Change</i> (<i>Vangl2^{+Lp}</i> vs <i>Vangl2^{+/+}</i>)	Valor p ANOVA
<i>Ifi204</i>	1.61	0.000156
<i>Gm11749</i>	1.46	0.045602
<i>miR-350</i>	1.43	0.044784
<i>MiRlet7f-1</i>	1.37	0.036224
<i>Gm11337</i>	-1.42	0.041055
<i>Gm17651</i>	-1.91	0.007698

Tabla 13. Análisis de expresión diferencial en ratones *Vangl2^{+Lp}* vs ratones *Vangl2^{+/+}* identificados en este análisis (resultados más relevantes).

Ifi204 (*interferon activated gene 204*), con un *Fold Change* de 1.61, codifica p204, un miembro de la familia de proteínas p200 inducible por interferón (IFN). Esta proteína está implicada en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, senescencia y tumorigénesis, participando también en procesos de adipogénesis. p204 es un potente

regulador de la síntesis de tejido adiposo a partir de la diferenciación de células precursoras derivadas del mesodermo, expresándose en los preadipocitos durante las primeras etapas de la adipogénesis (Xiao 2010). **Gm11749** muestra un *Fold Change* de 1.46 y corresponde a un transcrito de un intrón que no solapa con ningún exón completo. En cuanto a los miRNAs encontramos el **miR-350**, con un *Fold Change* de 1.43. Los miRNAs son fragmentos de RNA no codificante con un papel crítico en diversos procesos fisiológicos, que actúan como reguladores postranscripcionales para reducir la traducción de genes diana, desestabilizando o bloqueando su traducción. Influyen directamente en la transcripción de genes y alteran los niveles de modificadores epigenéticos, regulando así la expresión génica (Mayanil 2013). **miR-350** está involucrado en la regulación de la vía de las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), que interviene en el desarrollo embrionario, y la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Otros genes que aparecen son **Mirlet7f-1**, con un *Fold Change* de 1.43, relacionado con miRNAs en cáncer y tumor cerebral metastásico; así como **Gm11337**, con un *Fold Change* de -1.42, que corresponde a un transcrito que no da lugar a proteína y **Gm17651**, con un *Fold Change* de -1.91, que da lugar a una proteína de 13 aminoácidos con función desconocida.

Estas 94 sondas, que tras el análisis de expresión diferencial mostraban un FC $>\pm 1.25$, representan 44 genes diferentes, que fueron utilizados para un análisis de enriquecimiento funcional, empleando la herramienta Webgestalt (Wang 2013; Zhang 2005). De estos 44 genes se incluyeron un total de 32, que corresponden a aquellos con información en esta herramienta online. Se realizó así un estudio de categorías GO “*Gene Ontology*”, que utiliza una representación computacional del conocimiento actual sobre las funciones de los genes para determinar el proceso biológico más significativo asociado a los genes de cada uno de los clusters obtenidos.

Análisis de categorías GO

El análisis de categorías GO se encarga de correlacionar los conjuntos de genes que se expresan en condiciones experimentales específicas, para determinar los procesos, funciones y localizaciones que están sobre-/sub-representadas. La metodología más simple consiste en el procedimiento conocido como análisis de enriquecimiento, calculado como el porcentaje de genes de una categoría GO determinada que esta sobre-

/sub-representada en un conjunto de genes, en relación a un conjunto de genes de referencia. En este análisis se utilizó la herramienta (<http://geneontology.org/>), que identificó 40 procesos biológicos sobrerrepresentados ($p < 0.05$), entre los que se encontraban el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) y procesos del desarrollo embrionario. Todos ellos incluían un clúster de miRNAs localizado en el cromosoma 14qE4, que incluía los genes *miR-17hg*, *miR-18*, *miR-20a*, *miR-17*, *miR-19a*, *miR-19b-1* y *miR-92-1*. Estos miRNAs están implicados en diferentes procesos del desarrollo incluyendo SNC y la médula espinal (Yang 2017). Además, este clúster, junto con *Tm2d1* (*TM2 domain containing 1*), *Ddit3* (*DNA-damage inducible transcript 3*) e *Ifi204*, destacados en el análisis de categorías GO, está implicado en procesos de apoptosis celular. En algunos de estos procesos también participa el gen *Aldh1a2* (*aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2*), una enzima implicada en la síntesis de ácido retinoico. Se ha descrito que *Aldh1a2*, junto a *Cyp26a1*, establece los niveles adecuados de este ácido en el embrión para facilitar el desarrollo de los órganos y prevenir la espina bífida (Niederreither 2002). El ácido retinoico es un factor crucial en la caudalización del embrión, de manera que un aumento en la dosis de ácido retinoico provoca malformaciones caudales con mayor gravedad (Modak 1993).

A continuación, se llevaron a cabo análisis de elementos reguladores, rutas biológicas sobrerrepresentadas y un análisis de regiones cromosómicas y enriquecimiento de bandas citogenéticas.

Análisis de elementos reguladores

Entre las proteínas que intervienen en la regulación genética encontramos aquellas que no poseen dominios de unión al ADN, como coactivadores, remodeladores de cromatina, histona acetiltransferasas, deacetilasas, quinasas y metiltransferasas. Por otro lado, entre aquellas que se unen al ADN encontramos los factores de transcripción (TFs, del inglés “*transcription factors*”), que controlan la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero por unión a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes que regulan. Mediante el estudio de comparación de los niveles de diferentes TFs se encontraron MAZ, FOXO4, E12, NFAT, CHX10 o FREAC2, y se identificaron varios genes diana de TFs, entre los que se encontraban el receptor de la vitamina D (VDR), CEBP y PAX4. Otro de los elementos relacionados con la regulación

de la expresión génica son los miRNAs. Se identificaron 53 miRNAs entre los genes analizados, como *miR-9*, *miR-19A* (implicado en el desarrollo del SNC, hematopoyesis, desarrollo embrionario), *miR-19B*, *miR-30A-5P*, *miR-30B*, *miR-30C*, *miR-30D*, *miR-30E-5P*, *miR-190*, *miR-203*, *miR-302B*, *miR-365*, *miR-376A*, *miR-376B*, *miR-506*, *miR-519*, *miR-519A*, *miR-519B*.

Análisis de rutas biológicas

En el análisis de rutas biológicas se encuentran sobrerrepresentadas varias rutas metabólicas. Entre ellas encontramos rutas del metabolismo del ácido linoleico o araquidónico, así como la endocitosis, donde el tráfico endosómico desempeña múltiples funciones en la célula más allá de la regulación de la entrada de nutrientes esenciales (Shilo 2011). Otra de estas rutas sobrerrepresentadas es la “Diferenciación de la cresta neural” donde encontramos desregulados genes como *Hdac4*, *Mitf*, *Cdh7*, *Hdac9* y *Hoxa1*.

Análisis de regiones cromosómicas y enriquecimiento de bandas citogenéticas

Se identificaron distintas regiones cromosómicas sobrerrepresentadas en este estudio, destacando dos regiones: una en el cromosoma 14qA1, que incluye genes implicados en el desarrollo neuronal como *Fezf2* (*FEZ Family Zinc Finger 2*), y otra en 1qD que incluyen entre otros el gen *Hdac4* y el gen *Alpl2* (*Alkaline Phosphatase, Placental-Like 2*), implicado en la síntesis de ácido fólico (Sahlberg 2017).

En el análisis de enriquecimiento en bandas citogenéticas (regiones del cromosoma útiles para identificar y localizar un gen) se determina si existe un exceso o déficit de secuencias de un cromosoma entero o una porción de este. En el análisis destacan una región del cromosoma 1, que incluye al gen *Ifi204*, y una región del cromosoma 4, que incluye *Magoh*. La ausencia de este último gen *Magoh* (*Mago-Nashi Homolog, Proliferation-Associated; Drosophila*) en ratones *knockout* produce microcefalia y muerte embrionaria (MGI:1330312).

Análisis de muestras independientes

Tras observar el análisis de señales relativas, donde la muestra M3 destacaba frente al resto, decidimos realizar un análisis de muestras independientes. Cabe señalar que a la

hora de incluir las muestras *Vangl2^{+Lp}* en el estudio no sabíamos si estas presentaban agregado celular o no, por lo que podríamos pensar que las diferencias observadas en esta muestra *Vangl2^{+Lp}* quizás sean debidas a la presencia de agregado celular. Así, decidimos analizar dicha muestra individualmente con cada muestra *Vangl2^{+/+}*, mediante el software TAC (*Transcriptome Analysis Console v3.0*). Además de los genes representados durante el análisis de expresión diferencial entre los embriones *Vangl2^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}*, destacábamos la sobreexpresión de genes implicados en el cierre del tubo neural, que se correspondían con receptores de la familia del PDGF, incluyendo *Pdgfra* y *Pdgfrb*. Esta sobreexpresión nos hace pensar que quizás este sería un factor que está activo durante la formación del agregado a E11.5. Los genes diferencialmente expresados están resumidos en la Tabla 14:

<i>Vangl2^{+Lp}</i>	<i>Vangl2^{+/+}</i>		
M3 vs	C1	C2	C3
	<i>Fold change (Vangl2^{+Lp} vs Vangl2^{+/+})</i>		
<i>Pdgfra</i>	-1.33	-1.22	-1.35
<i>Pdgfrb</i>	-1.49	-1.03	

Tabla 14. Genes diferencialmente expresados en el análisis individual de la muestra M3 vs C1, C3 y C2.

2.3 Estudio del origen del agregado celular

Para verificar los resultados del microarray se realizó un estudio inmunohistoquímico de moléculas específicas para los diferentes tejidos que se encontraban en la zona afectada. Estos tejidos incluían: el **neuroectodermo**, que forma los pliegues neurales del tubo neural; el **ectodermo de superficie** contiguo sobre el tubo; el **mesodermo paraxial lateral** que subyace a los laterales del neuroectodermo; y las células de la **cresta neural** o NCCs (del inglés “*Neural crest cells*”), población celular que se origina por un engrosamiento del neuroectodermo, y cuyas células están situadas entre el tubo neural y el ectodermo dorsal (Juriloff 2018). El esclarecimiento del origen del cúmulo celular nos dará información sobre si su aparición viene ligada a un proceso de cicatrización y rescate del fallo en la fusión del tubo neural, o si, por lo contrario, es un efecto secundario al propio fallo.

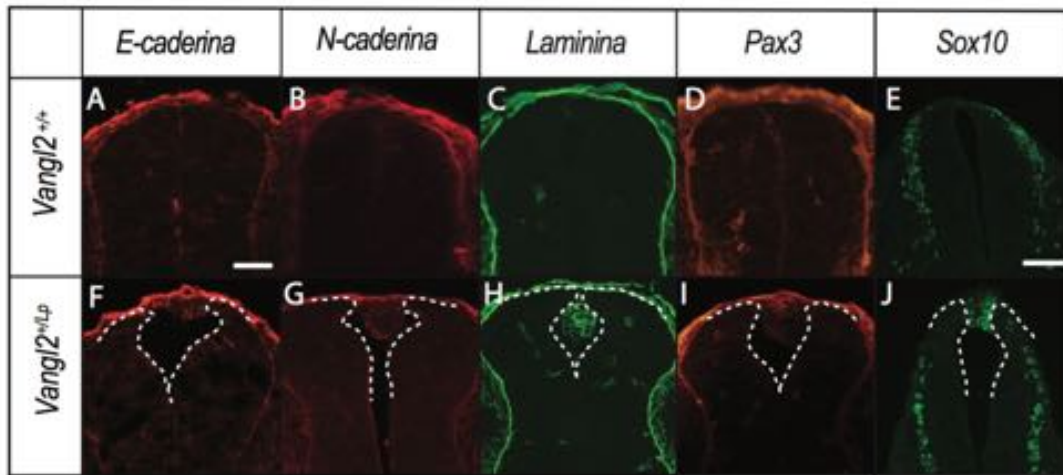


Figura 38. Evaluación del posible origen epitelial de las células que componen el agregado celular. (A-E) Secciones de criostato de la zona más caudal de embriones E11.5 *Vangl2*^{+/+} y (F-J) *Vangl2*^{+Lp}. (A, F) Expresión de E-cadherina; (B, G) N-cadherina; (C, H) Laminina; (D, I) Slug y (E, J) Sox10. Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-D, F-I); 50 μ m en E (se aplica a J).

La flexión de los pliegues neurales observada en los *Vangl2*^{+Lp} a E9.5 podría ser la causa de una separación anómala de los pliegues, dificultando su fusión y provocando la aparición del agregado celular de estudio (Fig. 38F-J). Una primera aproximación sobre la procedencia de este agregado fue un estudio de presencia de moléculas específicas para cada tejido. Para estudiar el carácter epitelial y neural se estudió E-cadherina y N-cadherina, respectivamente. Observamos expresión de E-cadherina (Fig. 38F, n=5), así como N-cadherina (Fig. 38G, n=3) en el agregado celular en *Vangl2*^{+Lp}. La laminina, componente de la membrana basal implicado en el control de la migración de las NCCs (Perris 2000), se expresaba de manera uniforme a lo largo del neuroepitelio del tubo neural, así como en el ectodermo de superficie para ambos genotipos (Fig. 38C, H; n=3), además en *Vangl2*^{+Lp} parecía estar rodeando grupos de células en el interior del agregado celular, posiblemente indicando la presencia de membrana basal entre ellas (Fig. 38H; Hamill 2009). El estudio del posible papel de las NCCs en la formación del agregado se llevó a cabo con marcadores de células que comienzan a adquirir el carácter migratorio (Slug), así como aquellas que ya son capaces de migrar, marcadas con Sox10. Podemos observar expresión de Slug y Sox10 en la acumulación de células en la zona dorsal de *Vangl2*^{+Lp} (Fig. 38I, J; n=3), en comparación con una ausencia de expresión en dicha zona en los *Vangl2*^{+/+} (Fig. 38D, E; n=3).

2.4 Estudio de expresión de *Sox10*. Seguimiento de NCCs migratorias

La información obtenida mediante el microarray, donde se mostraba una desregulación de la “ruta de diferenciación de la cresta neural”, nos daba un indicativo de que esta población celular podría estar involucrada en la formación del agregado. En la parte dorsal del tubo neural encontramos la cresta neural, cuyas células migran a las diferentes regiones del embrión en desarrollo. Para que tenga lugar esa migración, las NCCs pasan por los procesos de delaminación, transición epitelio mesénquima y adquisición del carácter migratorio, previo a alcanzar su destino final. El agregado formado parecía ser una acumulación de células procedentes de los bordes de los pliegues neurales (zona de formación de NCCs) que se dirigen hacia la zona del fallo de fusión de estos. Esto, junto con los datos obtenidos en el microarray y la fuerte señal de *Sox10* como marcador de NCCs migratorias, tras el estudio inmunohistoquímico, nos hace centrarnos el estudio en conocer la implicación de este tipo celular en la formación agregado.

2.4.1 Localización y número de agregados celulares en los diferentes estadios

Para estudiar de manera más específica el agregado realizamos el estudio de expresión del *Sox10*, mediante la técnica de hibridación *in situ*. La expresión de *Sox10* está restringida a la cresta neural en migración (Southard-Smith 1998). A diferencia con lo observado en los estudios de histología, la posibilidad de estudiar la expresión de *Sox10* en el embrión entero aportará información sobre la localización exacta de los agregados, así como la presencia de uno o varios agregados/embrión. Esta técnica, además, permite un estudio a nivel celular tras seccionar las zonas de interés. Así, este nuevo estudio nos acerca un poco más al conocimiento de las características celulares del agregado.

Independientemente del genotipo se observó en todos los embriones el patrón de expresión de *Sox10* esperado, expresándose en las somitas, en los ganglios de la raíces dorsales o ganglios espinales, y en los ganglios nerviosos simpáticos y craneales Fig. 39 y 40; Matera 2008). Además, en los embriones *Vangl2^{+Lp}*, *Sox10* marcaba los agregados celulares de forma diferente dependiendo de la edad de gestación (Fig. 39). Cabe señalar que en el embrión de ratón existe una zona de transición entre neurulación primaria y

secundaria entre las somitas 25-32, rango de somitas durante el cual puede finalizar la neurulación primaria para dar paso a la neurulación secundaria (López-Escobar 2018).

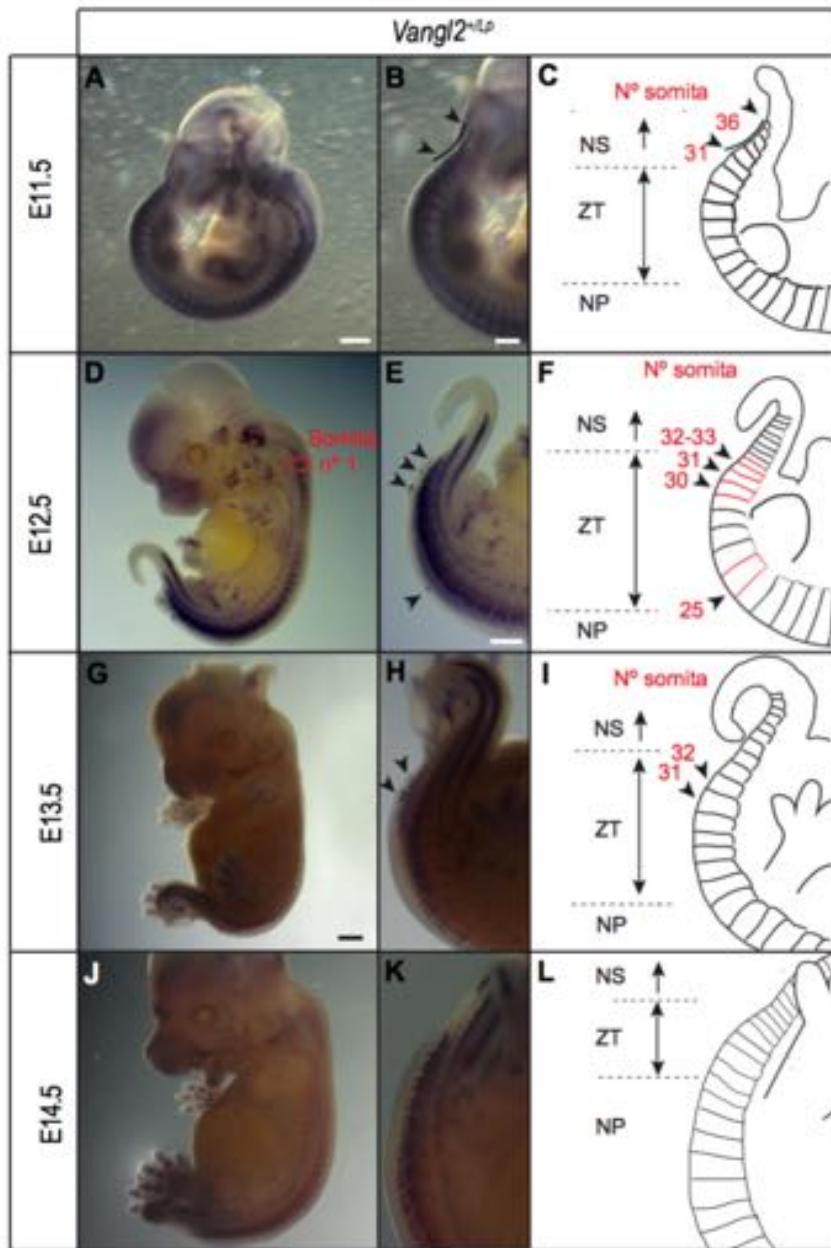


Figura 39. Relación entre la localización de los agregados celulares y el número de somita. (A, D, G, J) Expresión del ARNm de *Sox10* en embriones E11.5-E14.5 *Vangl2*^{+/Lp}. (B, E, H, K) Amplificación de la región caudal. (C, F, I, L) Localización de los agregados en relación con el número de somita, marcados por cabezas de flechas negras. NS, neurulación secundaria; ZT, zona de transición; NP, neurulación primaria. Barras de escala: 1000 μ m en A (válido para D); 1000 μ m en G (válido para J); 500 μ m en B; 500 μ m en E (válido para H, K).

A continuación, realizamos un estudio de localización de los agregados celulares según número de somita, así como un estudio de la expresión de *Sox10* en embriones *Vangl2^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}* a estadios embrionarios de E11.5-E14.5:

E11.5

La expresión de *Sox10* estaba ausente en los agregados de la región anterior (somita 25; Fig. 39A, B), pero presentaban una acumulación de células que expresaban *Sox10* (*Sox10⁺*) entre los pliegues neurales en el extremo más caudal del tubo neural localizado en la región posterior descrita en el estudio de histológico (línea entre cabezas de flecha en la Fig. 39B). El patrón de expresión de *Sox10* observado en los embriones *Vangl2^{+Lp}* no se correspondía con la localización de los agregados descrita mediante los estudios histológicos, donde se observaban agregados celulares a dos niveles a lo largo del eje rostrocaudal, una región anterior y otra posterior. Esto podría ser debido a que las NCCs que componen el agregado de la región anterior aún no habrían adquirido el carácter migratorio, y por tanto no expresaban *Sox10*, por lo que deberían encontrarse en etapas anteriores durante la diferenciación de la cresta neural.

En la región posterior del tubo neural los embriones *Vangl2^{+/+}* mostraban expresión de *Sox10* en aquellas células diferenciadas a cresta neural, que todavía no habrían migrado (Fig. 40a, n=6); dicha expresión en los embriones *Vangl2^{+Lp}* se encontraba más elevada (Fig. 40b). Dentro de esa región posterior, las secciones más anteriores de los embriones *Vangl2^{+Lp}* mostraban células *Sox10⁺* en la zona dorsal (Fig. 40b'), mientras en *Vangl2^{+/+}* estas células ya habrían migrado, dejando la zona dorsal negativa al marcaje de *Sox10* (Fig. 40a').

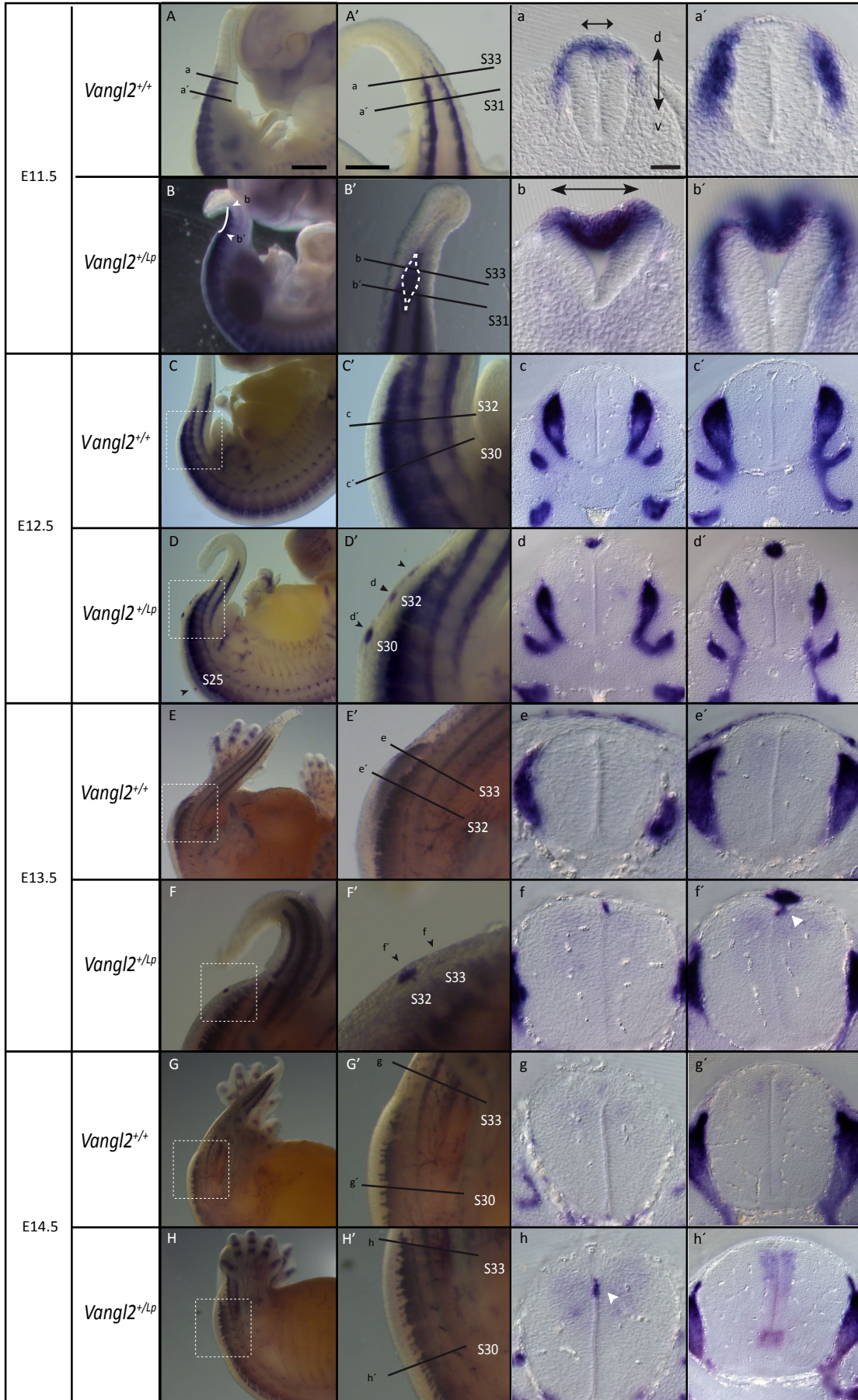


Figura 40. Expresión de *Sox10* en embriones *Vangl2^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}* a distintos estadios embrionarios. (A, C, E, G) Expresión de *Sox10* en la zona más caudal de embriones *Vangl2^{+/+}* a E11.5-E14.5. (B, D, F, H) Expresión de *Sox10* en la zona más caudal de embriones *Vangl2^{+Lp}* a E11.5-E14.5. (A', B') Vista ampliada desde arriba de la región caudal de los embriones *Vangl2^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}* a E11.5. (C' - H') ampliación del cuadro blanco punteado en C-H. (a-h, a'-h') Secciones transversales del tubo neural en A' - H' respectivamente. Las líneas y las cabezas de flecha negras indican la altura del eje anteroposterior a la que corresponden las secciones transversales del tubo neural. Las flechas negras en a y b indican la distancia entre los extremos dorsales de los pliegues neurales. Las cabezas de flecha blancas indican células *Sox10⁺* que se encuentran migrando hacia el interior del tubo neural. d-v, eje dorsoventral; Cabezas de flecha blanca en f' y h' marcan expresión de *Sox10* en células que se adentran en el lumen o difunden hacia el interior de los pliegues. Barras de escala: 1000 μm en A (también se aplica en B-H); 500 μm en A' (también se aplica en B' -H'); 100 μm en a (también se aplica en b-h, a'-h').

E12.5

El patrón de los agregados *Sox10⁺* se correspondía con la localización de los agregados según el estudio histológico en este estadio, aportándonos datos de localización más precisos, permitiéndonos clasificar de una forma más específica los cúmulos como anteriores y posteriores:

Cúmulos anteriores

Cúmulos de **Nivel 1**: cercanos al nivel de localización del primordio de la extremidad posterior (alrededor de la somita 25)

Cúmulos posteriores

Con estos estudios se han podido distinguir tres tipos de cúmulos posteriores:

Cúmulo de **Nivel 2**: localizado en la somita 30

Cúmulo de **Nivel 3**: localizado en la somita 31

Cúmulo de **Nivel 4**: localizado entre las somitas 32-33

La mayoría de los embriones *Vangl2^{+Lp}* analizados presentaban agregados *Sox10⁺* en los **cuatro niveles de estudio** (Fig. 39D; n=5/8), mientras que el resto solo presentaban agregados *Sox10⁺* en los **niveles 2-4**, estando ausente el agregado de la somita 25 (n=3/8). El estudio de expresión de *Sox10* en los embriones *Vangl2^{+/+}* mostraba el patrón esperado

(Fig. 40c, c'; Fig. 41C-G), donde se observa como esas células de la cresta neural ya han migrado en su totalidad (Matera 2008), sin mostrar señal alguna de expresión de *Sox10* en la zona dorsal del tubo neural (n=7). En el caso de los embriones *Vangl2^{Lp}*, además de presentar la expresión observada en los *Vangl2^{+/+}*, presentaban la expresión ectópica donde la fusión de los extremos dorsales de los pliegues neurales era incompleta, formando un agregado de células (Fig. 40d, d'; Fig. 41J-M). Mientras algunos agregados *Sox10⁺* de **nivel 1** se encontraban entre unos pliegues separados (n=3/5), encontrábamos otros bajo unos pliegues fusionados por completo (Fig. 41N, n=2/5). Encontrábamos agregados en el **nivel 2** entre unos pliegues neurales bastante separados, que difícilmente podrían unir entre si (Fig. 41L, L', M; n=5/8); mientras el resto de los agregados en este nivel se encontraban bajo pliegues neurales ya fusionados (n=3/8). Los agregados en los **niveles 3 y 4** (Fig. 41J, K; n=5/8) eran de menor tamaño, y se encontraban entre unos pliegues neurales próximos a la fusión, pero aun alejados entre si, evidenciando el fallo neural. El resto de los agregados de los **niveles 3 y 4** se encontraban bajo unos pliegues neurales fusionados (n=3/8).

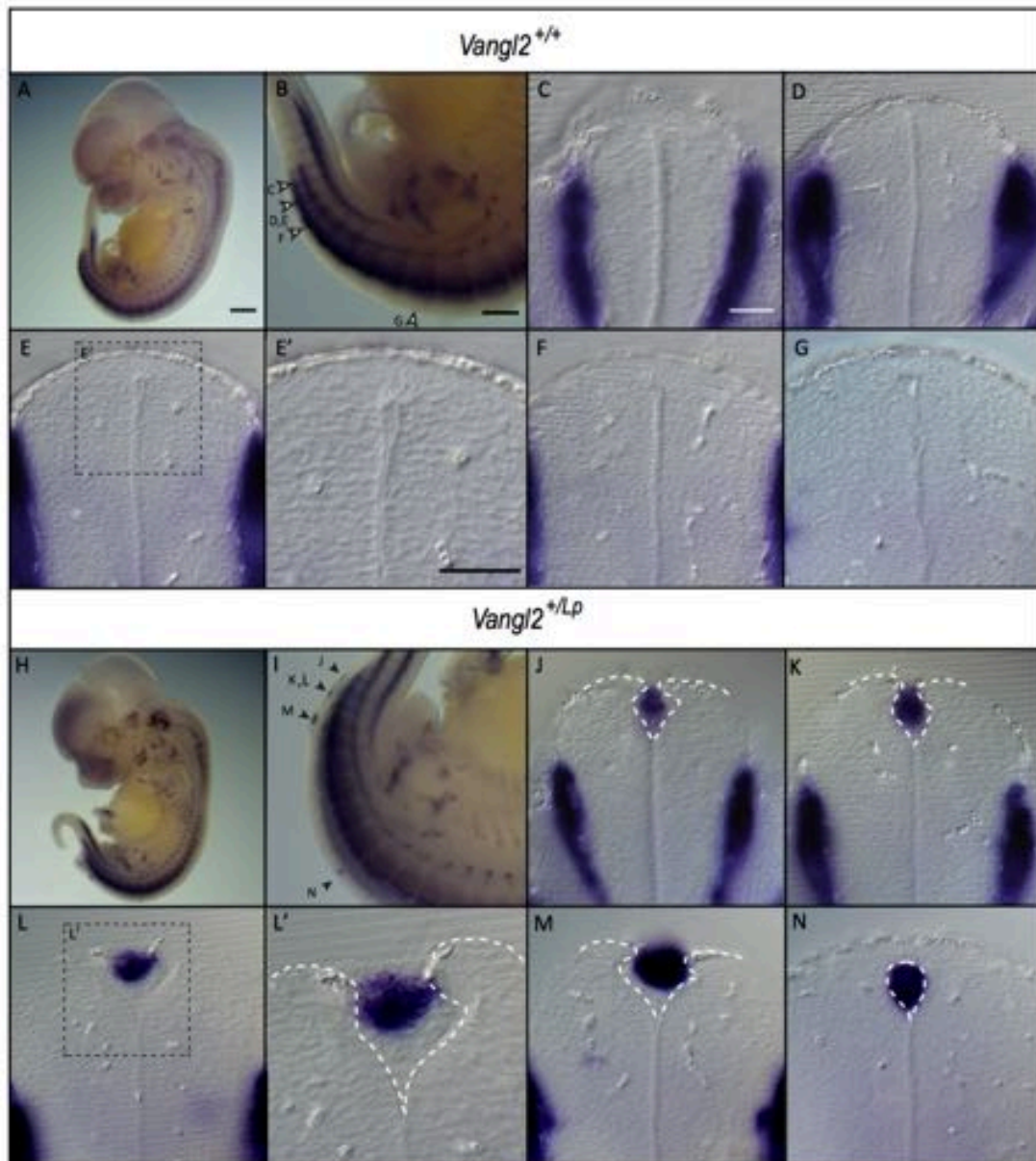


Figura 41. Análisis de la expresión de *Sox10* en los agregados celulares de embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp} a E12.5. (A, H) Distribución de la expresión del ARNm de *Sox10* en embriones a E12.5 *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp}. (B, I) Amplificación de la región en la que se localizan las zonas de aparición de los agregados celulares en los 4 niveles de estudio. (C-G) Secciones transversales de la región caudal marcada con cabezas de flecha para *Vangl2*^{+/+}, donde D es más caudal que E. (J-N) Secciones transversales de la región caudal marcada con cabezas de flecha para *Vangl2*^{+Lp}, donde K es más caudal que L. (E', L') Amplificación del agregado celular señalado en E y L. Las cabezas de flecha marcan la localización de los agregados de estudio. Las líneas discontinuas representan la morfología de los pliegues neurales. Barras de escala: 1mm en A (también para H); 0.5mm en B (también para I); 50µm en C (también para D, E, F, G, J, K, L, M y N); 50 µm en E' (también para L).

E13.5 y E14.5

No se encontró agregado celular en el **nivel 1** a E13.5 tras el estudio de expresión con *Sox10* (Fig. 39G, H; n=12). Mientras, en el **nivel 2**, los agregados presentaban un tamaño menor y en ocasiones encontrábamos células *Sox10*⁺ que se desprendían del agregado, migrando entre la zona dorsal de los pliegues neurales, para adentrarse en el lumen del tubo neural (Fig. 40f', n=1/12). Este grupo de células se podía también observar a E14.5 en el **nivel 3** como una hilera de células *Sox10*⁺, que parecía migrar hacia el interior de los pliegues (Fig. 40h, n=1/6). No se encontró agregado celular en el **nivel 4** en ninguna de las dos edades.

Este estudio mostraba como el patrón de expresión de *Sox10* a E13.5 en embriones *Vangl2^{+/-Lp}* mostraba diferencias en cuanto a la localización de este en los estudios histológicos, al igual como ocurría a E11.5. El número de agregados marcados con *Sox10* disminuía, respecto a los estudios histológicos. La ausencia de agregado celular tras el estudio de expresión con *Sox10* a E14.5, se correspondía con los análisis histológicos a esa misma edad.

2.4.2 Diferenciación de las NCCs que forman el agregado celular

En cuanto a la localización de los agregados celulares, el hecho de encontrar diferencias tras los estudios histológicos y de hibridación *in situ* se basaba en que no todos los agregados expresaban *Sox10*. Durante el proceso de diferenciación de la cresta neural se produce una transición epitelio mesénquima (EMT), donde las NCCs que han perdido su polaridad apico-basal y disuelto sus uniones van adquiriendo carácter mesenquimal. Solo algunas células del neuroepitelio se convierten en NCCs y siguen el proceso de EMT, mientras otras permanecen en el neuroepitelio y entran a formar parte del sistema nervioso central. A E11.5, los agregados en la región anterior y posterior observados en los estudios histológicos, no mostraban expresión de *Sox10* mediante los estudios de *in situ*, a excepción del cúmulo celular sobre el **nivel 3 y 4** (Fig. 40B', b, b'). En este estadio embrionario estos agregados probablemente estaban formados por células que aún no habían adquirido su capacidad migratoria, ya que la expresión de *Sox10* se da exclusivamente una vez las NCCs son capaces de migrar. Durante el desarrollo, la transición EMT no es un proceso irreversible. Varios procesos durante el desarrollo van

acompañados de un proceso inverso a la EMT, durante el cual el mesénquima se desdiferencia a linaje epitelial a través de una serie de eventos moleculares, conocidos como transición mesénquima epitelial (o MET del inglés “mesenchymal epithelial transition”; Pei 2019). Para conocer la naturaleza de los agregados negativos para la expresión de *Sox10* se realizó un estudio inmunohistoquímico de los distintos genes que marcan las diferentes fases que intervienen en la diferenciación de la cresta neural a los diferentes estadios embrionarios, con el objetivo de conocer la etapa de diferenciación en la que se encuentran estas NCCs.

Se analizaron genes característicos de NCCs premigratorias, que expresan E-cadherina y N-cadherina, ya que estas se producen por un engrosamiento de neuroectodermo. Cabe señalar que la pérdida de estos genes es considerada como un evento fundamental en la etapa de delaminación, paso previo a la EMT. Se analizaron además genes que marcan el proceso de EMT como β -catenina y Slug, este último característico de la migración temprana de las NCCs cuando comienzan a adquirir el carácter migratorio. Por lo tanto, la expresión de Slug en el agregado indicaría que las células estarían adquiriendo capacidad migratoria. Se realizó así un análisis de estos genes a edades entre E11.5-E13.5 mostrando la expresión en los cúmulos anteriores (**Nivel 1**) y cúmulos posteriores, estos últimos agrupando los **niveles posteriores 2-4**, ya que compartían una misma expresión según el marcador.

Marcador epitelial: E-cadherina

En los **cúmulos anteriores** (25s) a E11.5-E13.5 encontramos expresión de E-cadherina en la zona más dorsal del agregado, expresión que se correspondía con la cantidad de ectodermo de superficie que cubría el fallo de unión de pliegues (Fig. 42A, C, E; n=3, respectivamente). Cabe señalar que en las tres edades de estudio se observa expresión de E-cadherina en un grupo de células localizadas en el lumen del tubo neural que parecían haber perdido el contacto con el agregado, y que posiblemente se habrían desdiferenciado mediante el proceso de MET, adquiriendo de nuevo carácter epitelial (Fig. 42A, C, E; n=1, respectivamente). En los **cúmulos posteriores** (30-33s) podemos observar una mayor expresión de E-cadherina en los cúmulos a edades más tempranas E11.5 (Fig. 42B; n=3). Mientras, en estadios más avanzados la señal disminuye en el

tejido del agregado, evidenciando la pérdida del carácter epitelial (Fig. 42D, F; n=3, respectivamente).

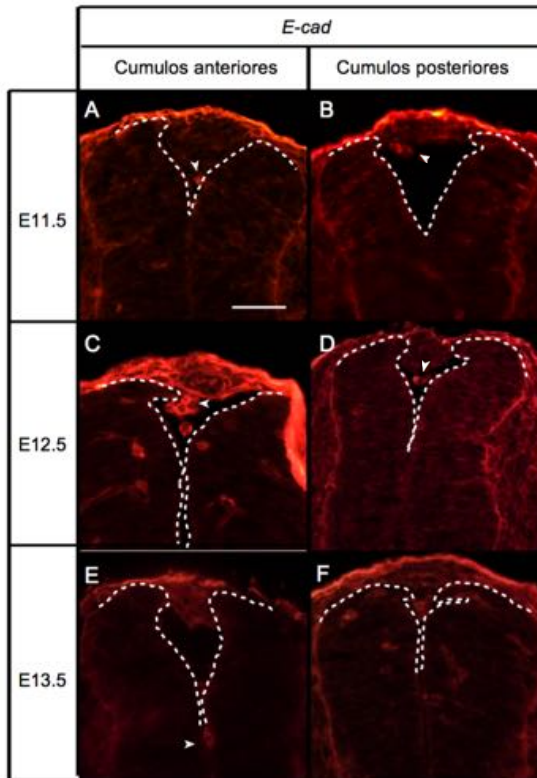


Figura 42. Expresión de E-cadherina en los agregados celulares de nivel 1 (25s) y nivel 2 (30s). (A, C, E) Estudio inmunohistoquímico del marcador E-cadherina para las secciones del nivel 1 y (B, D, F) nivel 2 a edades entre E11.5-E13.5. Cabeza de flecha en A-E marca expresión de E-cadherina en células que parecen disgregarse y caer al lumen. Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-F).

Marcador neural: N-cadherina

Se ha demostrado que las NCCs premigratorias expresan N-cadherina y que durante el proceso EMT estas moléculas desaparecen, lo que supone un cambio en la adhesión celular que promueve la separación de las NCCs de la capa epitelial embrionaria permitiendo la migración (Nakagawa 1995). La expresión de N-cadherina en los **cúmulos anteriores** a E11.5 y E12.5, localizada en la zona más dorsal del agregado, mostraba como este estaba formado por NCCs premigratorias (Fig. 43A, C; n=3, respectivamente). A E13.5 esta señal en los **cúmulos anteriores** estaba limitada al ectodermo de superficie, cubriendo el defecto de fusión de pliegues (Fig. 43E, n=3). Del mismo modo, los **cúmulos posteriores presentaban** expresión de N-cadherina en la zona más dorsal, lo que se correspondía con en el ectodermo que recubrían los pliegues neurales para ambas edades, estando ausente en el tejido más basal del agregado (Fig. 43B, D; n=3, respectivamente). Cabe señalar la expresión de N-cadherina en un grupo de células que parecía haber perdido el contacto con el agregado, células que también expresaban E-cadherina, y que

posiblemente se habrían desdiferenciado mediante el proceso de MET, adquiriendo de nuevo características de NCCs premigratorias (Fig. 43E, F).

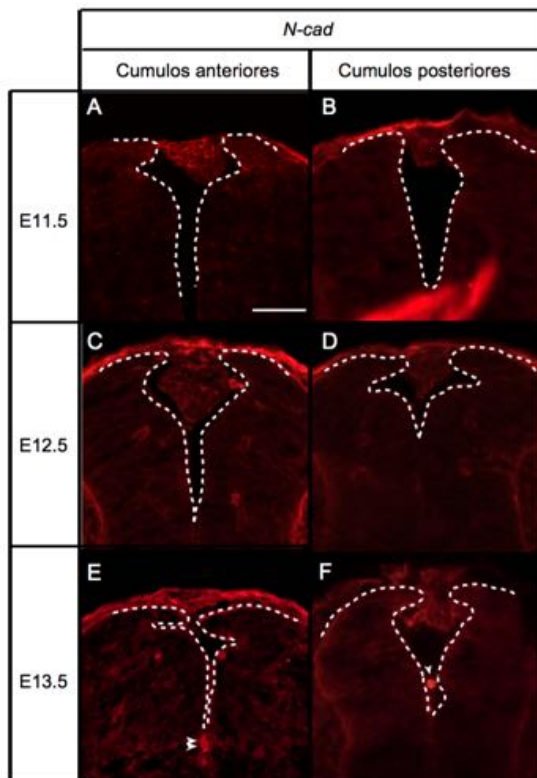


Figura 43. Expresión de N-cadherina en los agregados celulares de nivel 1 (25s) y nivel 2 (30s). (A, C, E) Estudio inmunohistoquímico del marcador N-cadherina para las secciones del nivel 1y del nivel 2 (B, D, F) a edades entre E11.5-E13.5. Doble cabeza de flecha en E y F marca expresión expresión de N-cadherina en células que parecen disgregarse y caer al lumen. Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-F).

Marcador del proceso EMT: β -catenina

La expresión de β -catenina en los **cúmulos anteriores** a E11.5-E13.5 se encontraba de manera homogénea en todo el agregado, marcando la entrada en el proceso de EMT (Fig. 44A, C, E; n=3 respectivamente). En los **cúmulos posteriores** la expresión de β -catenina se limitaba al ectodermo que recubría el pliegue neural para las tres edades (Fig. 44B, D, F), expresión que se incrementaba en un grupo de células que parecía estar cayendo al lumen (Fig. 44D).

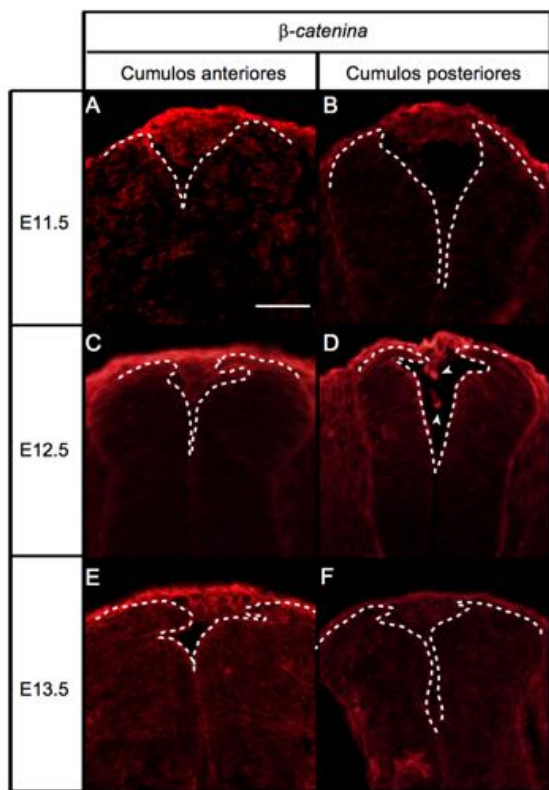


Figura 44. Expresión de β -catenina en los en los agregados celulares de nivel 1 (25s) y nivel 2 (30s). (A, C, E) Estudio inmunohistoquímico del marcador β -catenina para las secciones del nivel 1 y del nivel 2 (B, D, F) a edades entre E11.5- E13.5. Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-F).

Marcador de migración temprana: Slug

En los **cúmulos anteriores** podríamos encontrar expresión de Slug en la zona más dorsal de aquellos agregados a E11.5, marcando aquellas NCCs que comienzan a adquirir capacidad migratoria (Fig. 45A, n=7). Esta expresión pasaba a ser más homogénea a edades posteriores E12.5-13.5, expresándose tanto en la zona dorsal como basal del agregado, marcando células que estarían adquiriendo el carácter migratorio (Fig. 45C, E; n=6, n=3, respectivamente). En los **cúmulos posteriores** a E11.5 encontramos una expresión leve para Slug, ya que a esta edad los agregados posteriores estarían en formación, en etapas anteriores a la EMT durante la diferenciación de la cresta neural (Fig. 45B). A E12.5 los **agregados posteriores** comenzaban a encapsularse, donde encontrábamos señal de Slug en la zona más dorsal y que comenzaba a integrarse en el tejido del agregado (Fig. 45D). Esta señal se localizaba en la zona más basal en aquellos **agregados posteriores** a E13.5 (Fig. 45F). Cabe destacar la expresión de Slug en la zona del lumen, donde los pliegues neurales entraban en contacto, principalmente en células que parecían haberse disgregado del cúmulo de células (Fig. 45F).

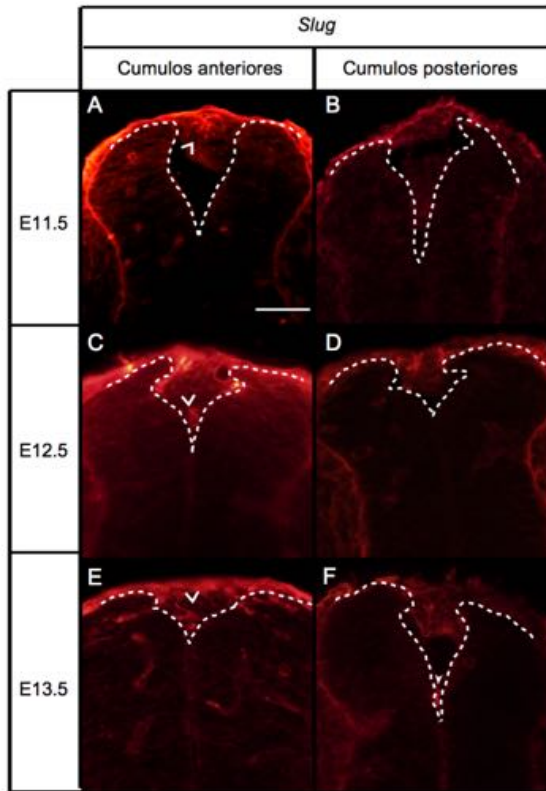


Figura 45. Expresión de Slug en los en los agregados celulares de nivel 1 (25s) y nivel 2 (30s). (A, C, E) Estudio inmunohistoquímico del marcador Slug para las secciones del nivel 1y del nivel 2 (B, D, F) a edades entre E11.5-E13.5. Expresión de Slug en una zona concreta del agregado (ángulo en A, C, E). Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-F).

En conjunto, la presencia de E-cadherina y N-cadherina en la zona más dorsal de los agregados celulares, señala la acumulación de NCCs premigratorias en la zona de fallo de fusión. La expresión de aquellos marcadores del proceso de EMT, como β -catenina, señalaba que las células que conforman el agregado comenzaban a adquirir características mesenquimales, para finalmente adquirir capacidad migratoria, evento marcado por la señal de Slug. Este estudio nos aporta información sobre el origen y evolución a nivel molecular del agregado, permitiendo así conocer la diferenciación del tejido a medida que avanza el desarrollo embrionario.

2.4.3 Expresión de *Sox10* en otras regiones del tubo neural

El análisis de expresión de *Sox10* tras los experimentos de hibridación *in situ* reveló un patrón en el interior del tubo neural que solo se encontraba a E13.5 y E14.5, tanto en los embriones *Vangl2*^{+/+} como en los *Vangl2*^{+Lp}, aunque con diferencias claras. En los embriones *Vangl2*^{+/+} esta expresión se podía apreciar levemente tanto a E13.5 (Fig. 46B, C; n=12) como a E14.5 (Fig. 46H, I; n=3). Se podía observar una señal localizada en la mitad más dorsal del tubo, tanto en las regiones anteriores (**Nivel 1**; Fig.46B, H),

como posteriores (**nivel 2-4**; Fig.46C, I); mientras, se observaba una señal ventral levemente expresada en el **nivel 1**, casi imperceptible (Fig. 46B, H), que no se observaba en las regiones más posteriores (**nivel 2-4**; Fig. 46C, I).

En los embriones *Vangl2^{+Lp}*, además de la expresión normal y ectópica descritas anteriormente, se identificó el mismo patrón de expresión de *Sox10* que en los embriones *Vangl2^{+/+}*, pero con una expresión exacerbada, tanto en la zona dorsal como ventral del tubo neural (n=6/18). Este aumento de expresión en los embriones *Vangl2^{+Lp}* variaba según la altura del eje anteroposterior y el estadio embrionario, apreciándose dos zonas *Sox10⁺* claramente diferenciadas en el interior del tubo neural. En el **nivel 1** la señal dorsal correspondía con el dominio de expresión de *Mash1* y *Ngn1*, genes proneurales que controlan la especificación neuronal (Gómez-Skarmeta 2003), mientras la señal ventral correspondía con la localización de precursores de oligodendrocitos (Oh 2005), que son marcados con *Sox10*, tanto a E13.5 (n=4/12; Fig. 46D) como a E14.5 (n=2/6; Fig. 46J). En las regiones más posteriores del tubo neural (**nivel 2-4**) se observó como la señal dorsal se encontraba más difusa y menos intensa (Fig. 46E, K), respecto al **nivel 1** (Fig. 46D, J), mientras la señal ventral disminuía su intensidad a E13.5 (Fig. 46E), respecto al **nivel 1** (Fig. 46D), estando ausente a E14.5 (Fig. 46K).

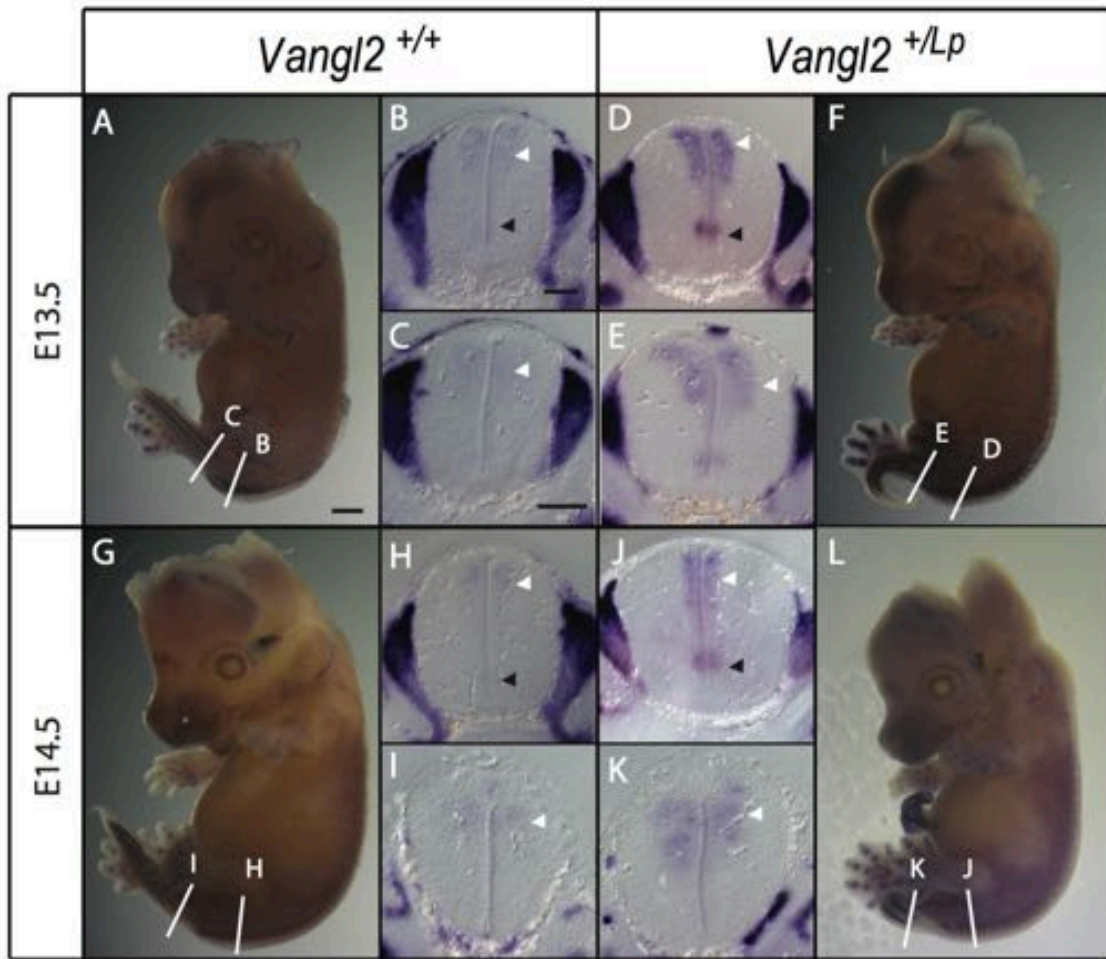


Figura 46. Patrón de expresión de *Sox10* en el tubo neural de embriones silvestres y heterocigotos desde E12.5 a E14.5. (A, G) Expresión de *Sox10* en embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp} (F, L) a E13.5 y E14.5, respectivamente. (B-E) Secciones transversales del tubo neural correspondientes a embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{+Lp} a E13.5 y (H-K) E14.5. Las líneas blancas indican la altura del eje anteroposterior a la que corresponden las secciones transversales del tubo neural. Las cabezas de flecha negra en B, D, H, J marcan señal de *Sox10* en la región ventral del interior del tubo neural. Las cabezas de flecha blancas en B-E, H-K marcan expresión en la región dorsal. Barras de escala: 1000 μ m en A (también se aplica en F, G, L); 50 μ m en B (también se aplica en D, H, J); 50 μ m en C (también se aplica en E, I, K).

2.5 Implicación de diferentes procesos que pueden conllevar a la aparición y evolución del agregado en las diferentes edades.

2.5.1 Estudio del proceso de cicatrización embrionaria “wound healing” durante la formación del agregado

Nos preguntamos si el proceso de cicatrización embrionaria “wound healing” (WH), un proceso de curación de heridas que ocurre durante en el desarrollo embrionario

y que no causa cicatriz, podría estar actuando en el fallo de unión observado durante el cierre del tubo neural en los embriones *Vangl2*^{+/*Lp*}. Uno de los primeros factores de crecimiento que aparecen como respuesta en el proceso de la cicatrización embrionaria es el PDGF. Para estudiar su posible papel en la formación del agregado celular analizamos embriones a E11.5 y E12.5. Estudiamos genes como el PDGFR α , receptor del PDGF, así como el nivel de ácido hialurónico (HA), utilizando la proteína de unión al HA (HABP) conjugada con fluorescencia. El HA, al unirse a su receptor *CD44*, activa Rac1, una Rho GTPasa requerida para el crecimiento de los filopodios, que se encuentran en las laminas epiteliales próximas a su fusión para establecer el contacto inicial durante el proceso de fusión epitelial (Oliferenko 2000).

En los embriones *Vangl2*^{+/*+*} a E11.5-E12.5 la expresión de PDGFR- α (n=5), CD44 (n=3) y HABP (n=3) se localizaba en el ectodermo de superficie (Fig. 47A-C). Nuestros resultados mostraron que los agregados celulares a E11.5-E12.5 en los *Vangl2*^{+/*Lp*} expresaban aquellos genes característicos del proceso de WH como el receptor PDGFR- α , cuya expresión se veía incrementada y estaba localizada en la zona más dorsal del agregado cubriendo unos pliegues neurales bastante separados en el caso de E11.5 (Fig. 47D, n=5). El estudio de CD44 y HABP mostraba un patrón similar, mostrando un aumento de expresión en el ectodermo de superficie que cubría el defecto de cierre (Fig. 47E, F; n=3, respectivamente).

Estos resultados, que engloban PDGFR- α , así como CD44 y HABP, demuestran que ambas vías de señalización se encuentran sobreexpresadas. Este proceso, que actúa en el cierre natural del tubo neural a modo de cremallera, está actuando en la zona del fallo de fusión de pliegues, de forma paralela a la formación del agregado. Así, para poder proseguir el proceso de fusión, se produce una sobreexpresión de la maquinaria molecular del WH, como se ha descrito que ocurre en los procesos de cicatrización de heridas.

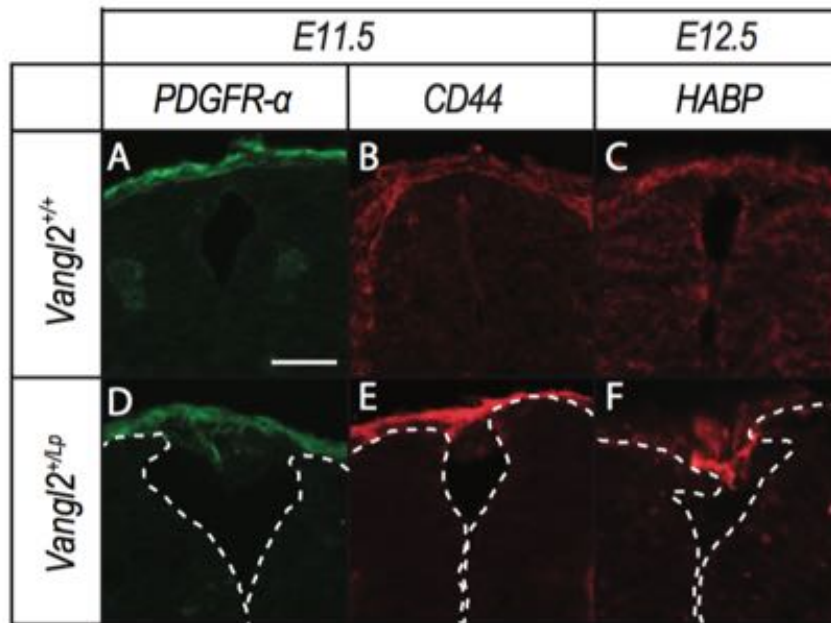


Figura 47. Expresión de distintos marcadores del proceso de WH en el agregado celular. Secciones transversales del tubo neural en embriones *Vangl2*^{+/+} y *Vangl2*^{Lp}. (A, D) Análisis de expresión a E11.5 para PDGFR- α , (B, E) CD44 y (C, F) a E12.5 para HABP. Barra de escala en A (50 μ m), también válida para B-F.

2.5.2 Estudio de proliferación y muerte celular en el agregado

Para estudiar la dinámica de crecimiento en tamaño de los agregados se realizó un análisis inmunohistoquímico en estadios E11.5-E13.5 con fosfohistona3 (H3), que marca la transición G2/M y tiñe la cromatina condensada justo antes de la segregación cromosómica, por lo que se utiliza como un marcador de proliferación celular. El estudio se llevó a cabo concretamente en el **nivel 1** (25 somitas). Se podía observar la activación de este proceso en la zona dorsal de pliegue donde se forma el agregado, así como en el agregado en formación en *Vangl2*^{Lp} a E11.5 (Fig. 48A, n=3). Esta expresión se mantenía tanto a E12.5 (Fig. 48B, n=6) como a E13.5 (Fig. 48C, n=3), por lo que el agregado continuaba creciendo al menos hasta E13.5.

Debido a que en algunos agregados se observaba un grupo de células que parecía disgregarse y caían al lumen del tubo neural, y que estos agregados no se encontraban a E14.5, se llevó a cabo un estudio de muerte celular mediante Caspasa 3 a E11.5 (Fig. 48E, n=3), E12.5 (Fig. 48F, n=3) y E13.5 (Fig. 48G, n=3). Los resultados evidenciaban la existencia del fenómeno de apoptosis en el agregado de estudio, indicando muerte celular

en los agregados de mayor tamaño, en los que encontramos células en la zona más basal del agregado, células que habían perdido el contacto con este y se encontraban disgregadas sufriendo el fenómeno de apoptosis.

El estudio histoquímico mostraba como algunos agregados celulares se encontraban entre unos pliegues neurales totalmente fusionados, agregados donde encontrábamos una estructura que parecía ser un vaso sanguíneo. La presencia de esta estructura, que parecía formar parte del agregado y se localizaba bajo el punto de fusión de ambos pliegues, indicaría una posible irrigación del cúmulo. Podemos observar como las células que están dentro del vaso son completamente diferentes a las células que lo rodean, y que presentan una similitud con células sanguíneas, donde encontramos un núcleo grande y redondo, céntrico (Fig. 48D, H).

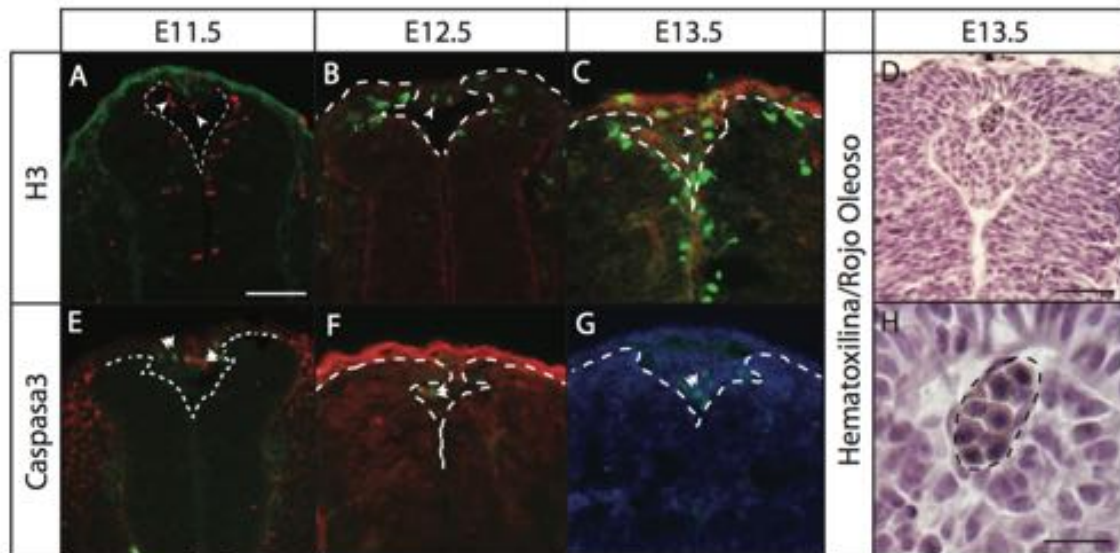


Figura 48. Análisis inmunohistoquímico de marcadores del proceso proliferación celular (H3) y muerte (Caspasa 3) en embriones *Vangl2*^{+Lp} a E11.5-E13.5. (A-C) Secciones de criostato de la zona caudal (nivel 1) de embriones *Vangl2*^{+Lp} marcando expresión de H3 (Verde). (E-G) Secciones de criostato de la zona caudal (nivel 1) de embriones *Vangl2*^{+Lp} marcando expresión de Caspasa 3 (Verde). (D, H) Sección de la zona más dorsal del tubo neural, mostrando un vaso sanguíneo. Las cabezas de flecha blancas en A-C marcan proliferación en el agregado celular. Doble cabezas de flecha en E-G marcan células apoptóticas en la zona mas basal del agregado. Barra de escala en A: 100 μ m (se aplica a B, C, E-G); 50 μ m en D; 20 μ m en H.

2.5.3. Evolución fenotípica del agregado

Los estudios histológicos de los agregados entre E12.5-13.5 revelaron un tipo celular nucleado con pequeñas vacuolas ocupando todo el citoplasma celular, organización que se asemeja a la morfología típica de los preadipocitos multiloculares (Fig. 49A, A', D; n=5). Para corroborar esta hipótesis se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica el estudio de expresión de uno de los factores que favorece la diferenciación a preadipocitos, el PDGFR- α (Hepler 2017; Louveau 2016). Además de la expresión observada de este factor durante el estudio del proceso de WH, llama la atención la expresión en aquellas células PDGFR- α^+ que parecen haberse desprendido del agregado celular (Fig. 49B, E; n=4). Mediante una tinción con rojo oleoso para la detección de adipocitos y preadipocitos (n=3), encontramos células que acumulan gotas lipídicas en su citoplasma. Estas células (marcadas con cabeza de flecha negras en la Fig. 49C, F) se desprendían del cúmulo en la zona más dorsal del tubo neural y presentaban acumulaciones lipídicas propias de los preadipocitos multiloculares.

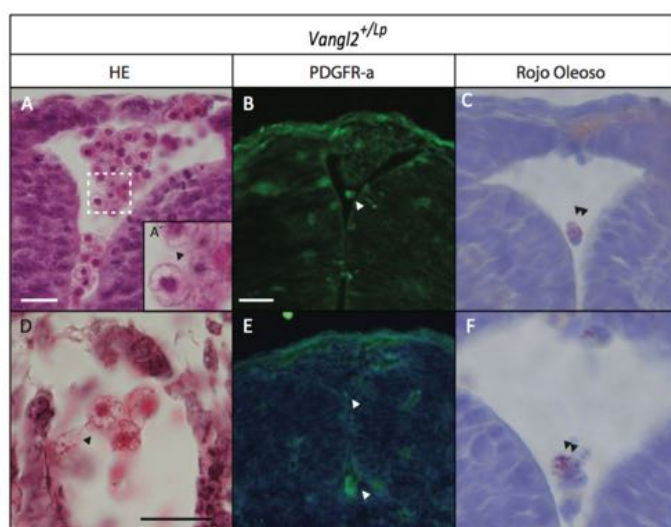


Figura 49. Estudio de diferenciación a preadipocitos multiloculares. (A, D) Tinción de HE en la zona dorsal del tubo neural (E12.5, E13.5). (B, E) Expresión del factor PDGFR-a en el agregado celular (E12.5, E13.5). (C-F) Tinción de rojo Oleoso, mostrando acumulación de gotas lipídicas en las células que caen al lumen del tubo neural (E12.5). Barra de escala en A: 20 μ m (se aplica a C); 50 μ m en B (se aplica a E); 20 μ m en D (se aplica a F).

2.6 Frecuencia en relación a dobles mutantes de la vía Wnt-PCP y otros mutantes de SB

2.6.1 Frecuencia de aparición del agregado en el mutante *Vangl2*^{+/*Lp*}

Tras realizar el estudio histológico apreciamos que el agregado celular no se encontraba en todos los embriones analizados, variando su frecuencia de aparición según

el estadio embrionario (Tabla 15). El agregado estaba presente en un 47% de los embriones *Vangl2^{+Lp}* analizados a E11.5 (n=34), en un 56% de los embriones *Vangl2^{+Lp}* analizados a E12.5 (n=9) y un 50% a E13.5 (n=14). Los embriones *Vangl2^{+/+}* analizados, no presentaban agregado 0% a E11.5, E12.5 y E13.5 (n=44, 11, 7; respectivamente). A la hora de analizar embriones en estadios más avanzados E14.5, no se encontró indicio del agregado celular, tanto en *Vangl2^{+Lp}* (n=9) como en *Vangl2^{+/+}* (n=7).

	Número de agregados (%)	Sin agregado	Número de agregados (%)	Sin agregado
	<i>Vangl2^{+/+}</i>		<i>Vangl2^{+Lp}</i>	
E11.5	0/44 (0%)	44/44	16/34 (47%)	18/34
E12.5	0/11 (0%)	11/11	5/9 (56%)	4/9
E13.5	0/7 (0%)	11/11	7/14 (50%)	7/14
E14.5	0/7 (0%)	7/7	0/9 (0%)	9/9

Tabla 15. Frecuencia de aparición del agregado celular de estudio a edades comprendidas entre E11.5-14.5 en embriones *Vangl2^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}*. N = n° total de embriones analizados.

*2.6.2 En los dobles mutantes de la vía Wnt-PCP: *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* y *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{gt/gt}* se aumenta la incidencia del agregado celular*

Daam1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1) pertenece a la familia de las forminas e interactúa con Dishevelled (Dvl) y RhoA, mediando la ruta de señalización Wnt-PCP no canónica (Habas 2001; Sato 2006). *Daam1*, como formina, participa en la polimerización de actina y la reorganización del citoesqueleto, y se expresa en ciertos órganos durante el desarrollo en ratón, incluyendo el tubo neural y el corazón. Durante el presente estudio no se encontraron diferencias fenotípicas en el tubo neural de los embriones E10.5-E14.5 con genotipo *Vangl2^{+/+}/Daam1^{+/+}*, *Vangl2^{+/+}/Daam1^{+gt}* y *Vangl2^{+/+}/Daam1^{gt/gt}*. Sin embargo, se observó un aumento en la incidencia de espina bífida al analizar los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* (6/27, 22.22%) en comparación con *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+/+}* (1/16, 6.25%; (López-Escobar 2018). Los análisis histológicos durante el cierre del tubo neural más caudal para estos dobles mutantes de la vía Wnt-PCP, que presentaban espina bífida a E10.5, revelaron un aumento en el ángulo de los pliegues neurales en los DLHP, en comparación con la morfología recta asociada

al PNP cerrado en los *Vangl2^{+/+}/Daam1^{+/+}* (Fig. 20 F, G). Esta flexión anómala, que se mantenía a E11.5 en los *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+/+}* y *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* podría estar más exacerbada, aumentando la severidad del fallo de unión de pliegues en los dobles mutantes, lo que conlleva al aumento de espina bífida descrito anteriormente. Además, mutantes para *Daam1*, presentan déficit en la maquinaria de cicatrización embrionaria (Li 2011). Nos planteamos así estudiar la frecuencia de aparición del agregado en embriones *Daam1^{+gt}* y *Daam1^{gt/gt}* entre E11.5-13.5, y cómo afecta la interacción con el mutante *Vangl2* entre E11.5-14.5 en los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* y *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{gt/gt}*.

La frecuencia de aparición del agregado en los embriones entre E11.5 y 14.5 *Daam1^{+gt}* fue del 0% para todas las edades E11.5 (n=5), E12.5 (n=4), E13.5 (n=4) y E14.5 (n=6). Del mismo modo, el estudio del homocigoto *Daam1^{gt/gt}* no mostró presencia alguna de agregado a E13.5 (n=4). En los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* encontramos un incremento en la aparición del agregado celular a E11.5 (82%; n=17; Tabla 16), en comparación con el 47% a E11.5 observado en el mutante *Vangl2^{+Lp}* (Tabla 15). A E12.5 la frecuencia de aparición en los *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* se mantenía en un 82% (n=11) y un 64% (n=11) para E13.5 (Tabla 16), de nuevo incrementada al comparar con la frecuencia en el mutante *Vangl2^{+Lp}*, con un 56% para E12.5 y un 50% para E13.5 (Tabla 15). No se encontraron indicios del agregado celular en embriones *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* en estadios más avanzados E14.5 (n=3; Tabla 16).

	Número de agregados (%)	Sin agregado	Número de agregados (%)	Sin agregado
	<i>Daam1^{+gt}</i>		<i>Daam1^{gt/gt}</i>	
E11.5	0/5 (0%)	5/5		
E12.5	0/4 (0%)	4/4		
E13.5	0/4 (0%)	4/4	0/4 (0%)	4/4
	<i>Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}</i>		<i>Vangl2^{+Lp}/Daam1^{gt/gt}</i>	
E11.5	14/17 (82%)	3/17	1/1 (100%)	0/1
E12.5	9/11 (82%)	2/11	3/4 (75%)	1/4
E13.5	7/11 (64%)	4/11	6/7 (86%)	1/7
E14.5	0/3 (0%)	3/3		

Tabla 16. Frecuencia de aparición del agregado celular de estudio a edades desde E11.5-13.5 en embriones *Daam1^{+gt}*; *Daam1^{gt/gt}*; así como para dobles mutantes a edades desde E11.5-14.5 en embriones *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* y *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{gt/gt}*.

2.6.3 Análisis de aparición del agregado en otros mutantes de espina bífida: mutaciones en *Grhl3* aumenta la aparición de EBO y del agregado celular.

La cepa *Curly-tail*, con mutación en *Grhl3*, tiene una penetrancia parcial en el caso de los defectos espinales. En los embriones salvajes, el PNP estaba cerrado a 30 somitas, mientras el 50% de los embriones *Curly-tail* mostraban un PNP aún abierto con 30-34 somitas. Incluso en estadios más avanzados, el 20% de los embriones *Curly-tail* tenían un PNP abierto, lo que corresponde con el 15-20% de los fetos que exhiben SB durante el desarrollo en esta cepa. El grado de curvatura de la cola en embriones a E10.5 aumentaba significativamente en los embriones con el alelo de *Grhl3* en homocigosis. Este aumento de curvatura, que se opone al cierre del tubo neural, se correlaciona con una tasa reducida de proliferación celular en el *epigaster*, precursor del intestino posterior, y la notocorda a E9.5 que, en combinación con la proliferación normal en el neuroepitelio, produce un desequilibrio de crecimiento entre los tejidos dorsal y ventral (Copp 1988; O'Shea 1987; Van Straaten 2001). Esto resulta en un fallo o retraso de cierre del tubo neural espinal, dando lugar al defecto en la flexión de la cola y a SB (Van Straaten 2001; Van Straaten 1992). De hecho, enderezar de manera mecánica la región más caudal del

embrión con una guía, permite una progresión normal del cierre del PNP en cultivos de embriones *Grhl3^{Ct/Ct}* (Brook 1991). Además de presentar baja incidencia de exencefalia, precursora del desarrollo de anencefalia (De Castro 2018) y espina bífida, los mutantes para *Grhl3* muestran problemas en la maquinaria de cicatrización (Ting 2005); siendo uno de los genes esenciales del proceso de cicatrización embrionaria. Todo esto nos lleva a estudiar el mutante *Grhl3*, ya que nos aportará información de si el agregado se da en otros modelos animales de espina bífida o es exclusivo a mutantes de genes de la vía Wnt-PCP.

Estudio de aparición del agregado en mutantes $Grhl3^{Ct/Ct}$ y aumento en la frecuencia de aparición en los dobles mutantes $Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}$

Se estudió si la interacción genética entre *Grhl3* y el gen del core PCP *Vangl2* afectaba a la frecuencia de aparición del agregado. Estudios previos han demostrado la interacción genética de ambos genes para regular la vía PCP, donde *Grhl3* funciona como un regulador transcripcional clave en mamíferos. Además, los embriones *Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}* mostraban un fallo de sellado epitelial y un aumento de espina bífida (De Castro 2018; Caddy 2010).

La flexión anómala de los pliegues neurales durante el cierre del tubo neural, característica de los mutantes *Vangl2^{+/Lp}* era el resultado de la desorganización de actina en los pliegues neurales (Fig. 50B, F), en comparación con aquellos pliegues sin flexión en *Vangl2^{+/+}* (Fig. 50A, E). A pesar de que la morfología de los pliegues neurales en el mutante *Grhl3* no se veía alterada, la oposición biomecánica al cierre del PNP en los *Grhl3^{Ct/Ct}* podría estar causando el fallo de fusión de pliegues, provocando la migración ectópica de NCCs hacia la zona de fallo (Fig. 50C, G). Se analizaron embriones entre E11.5-12.5. El 20% de los *Grhl3^{Ct/Ct}* analizados presentaban agregado celular, tanto a E11.5 (Tabla 17, n=1/5), como a E12.4 (Tabla 17, n=1/5). En los dobles mutantes *Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}* se observaba una mayor frecuencia de aparición del agregado de estudio, presentándose en el 93% de los *Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/Ct}* analizados a E11.5 (Tabla 17, Fig. 50D, H; n=13/14). Encontramos así un aumento en la frecuencia de aparición del agregado en los dobles heterocigotos respecto a los *Vangl2^{+/Lp}/Grhl3^{+/+}* (93% vs 47%) a E11.5 (Tabla 15 y 18), por lo que la doble mutación aumentaba el fallo de fusión de

pliegues, en comparación con *Vangl2*^{+Lp} y *Grhl3*^{Ct/Ct} por separado. Mientras, el agregado no aparecía en los *Vangl2*^{+/+}/*Grhl3*^{+Ct} (Tabla 17, n=11).

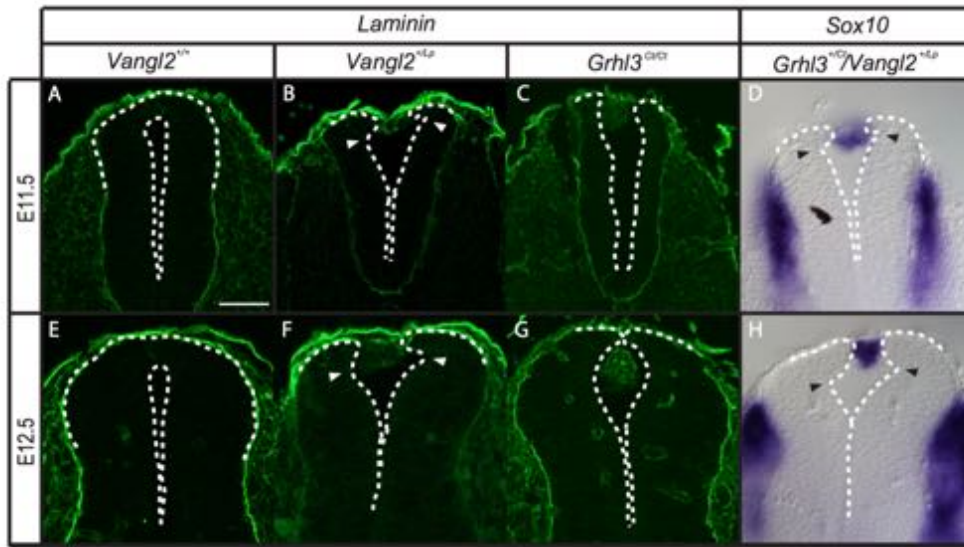


Fig. 50. Morfología de los pliegues neurales en mutantes *Vangl2*^{+Lp}, *Grhl3*^{Ct/Ct} y *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct}. (A, E) Pliegues neurales rectos en *Vangl2*^{+/+} a E11.5-12.5. (B, F, D, H) Flexión anómala de los pliegues neurales causada por la mutación en *Vangl2* en *Vangl2*^{+Lp} y en dobles mutantes *Grhl3*^{+Ct}/*Vangl2*^{+Lp} a E11.5-12.5. (C, G) Pliegues neurales rígidos en *Grhl3*^{Ct/Ct} a E11.5-12.5. (A-C, E-G) Estudio inmunohistoquímico de laminina. (C, F) Hibridación *in situ* para *Sox10*. Cabezas de flecha blancas en B, D, F, H señalan la flexión anómala de los pliegues neurales. Barra de escala en A: 50 μ m (se aplica a B-H).

	Número de agregados (%)	Sin agregado	Número de agregados (%)	Sin agregado	Número de agregados (%)	Sin agregado
	<i>Grhl3</i> ^{Ct/Ct}		<i>Vangl2</i> ^{+/+} / <i>Grhl3</i> ^{+Ct}		<i>Vangl2</i> ^{+Lp} / <i>Grhl3</i> ^{+Ct}	
E11.5	1/5 (20%)	4/5	0/11 (0%)	1/11	13/14 (93%)	1/14
E12.5	1/5 (20%)	4/5				

Tabla 17. Frecuencia de aparición del agregado celular de estudio a edades desde E11.5-12.5 en embriones *Grhl3*^{Ct/Ct}, *Vangl2*^{+/+}/*Grhl3*^{+Ct} y dobles mutantes *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct}.

*Estudio de los defectos de flexión de la cola y defectos del tubo neural en *Grhl3*^{Ct/Ct} y *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct}*

Se analizaron los defectos de flexión de la cola, así como defectos del tubo neural, tanto para embriones *Grhl3*^{Ct/Ct} y *Vangl2*^{+/+}/*Grhl3*^{+Ct}, como en embriones dobles mutantes *Vangl2*^{+Lp}/*Grhl3*^{+Ct}. Se ha descrito que la longitud del PNP en *Grhl3*^{+Ct} era mayor en comparación con *Grhl3*^{+/+} en un rango de 28-31 somitas, mientras que en

Grhl3^{Ct/Ct} la longitud del PNP era mayor en un rango desde 8-11 somitas hasta 28-31 somitas, en comparación con los *Grhl3^{+/+}* y *Grhl3^{+/Ct}* (De Castro 2018). Estos datos sugerían que el cierre espinal requiere de la función de *Grhl3* y que el fallo en la neurulación espinal ocurre inmediatamente tras el comienzo del cierre, en torno a 5-7 somitas, afectando al cierre del tubo neural espinal durante todo el proceso. Así, el fallo de cierre del PNP ocurre en un momento o etapa anterior en *Grhl3^{Ct/Ct}* que en *Grhl3^{+/Ct}*.

Se ha descrito que los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+/Ct}* presentaban un aumento de defectos en la flexión de la cola. Analizamos estos defectos en nuestros dobles mutantes, en comparación con *Grhl3^{Ct/Ct}* y *Vangl2^{+/+}/Grhl3^{+/Ct}*, obteniendo datos que concuerdan con el estudio de (De Castro 2018). En conjunto, el análisis de los diferentes mutantes a E11.5-E12.5 mostraba una incidencia de espina bífida y otros defectos en 2/11 embriones (18%) para los *Grhl3^{Ct/Ct}*, donde encontrábamos embriones con fallo en el cierre 1 y 2 (n=1) y embriones con exencefalia y SB (n=1). Esta incidencia disminuía a 2/25 embriones (8%) en el mutante *Grhl3^{+/Ct}*, donde encontrábamos embriones con fallo en el cierre 1 (n=2). En los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+/Ct}* observamos 4/27 embriones afectados con espina bífida y otros defectos (15%), aumentando la incidencia respecto a los embriones *Grhl3^{+/Ct}*. Encontrábamos embriones con SB caudal (n=1), defectos en los arcos branquiales (n=1) y embriones malformados, con retraso en el crecimiento, los cuales no serían viables (n=2; Tabla 18^(d)).

Genotipo	Fenotipo E11.5				Fenotipo E12.5			
	Nº de embriones	Cola lisa (%)	Defectos de flexión de la cola (%)	Espina bífida y otros defectos (%)	Nº de embriones	Cola lisa (%)	Defectos de flexión de la cola (%)	Espina bífida y otros defectos (%)
<i>Grhl3^{Ct/Ct}</i>	6	33% (2)	67% (4)	17% (1 ^a)	5	20% (1)	80% (4)	20% (1 ^b)
<i>Vangl2^{+/+}/Grhl3^{+/Ct}</i>	16	100% (16)	0% (0)	12,5% (2 ^c) 1 bola (sin defecto)	9	88,9% (8)	11,1% (1)	0% (0) 1 bola (sin defecto)
<i>Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+/Ct}</i>	19	0% (0)	100% (19)	21% (4 ^d)	8	0% (0)	100% (8)	0% (0)

Tabla 18. Análisis de embriones *Grhl3^{Ct/Ct}*, *Vangl2^{+/+}/Grhl3^{+/Ct}* y dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+/Ct}* a edades comprendidas entre E11.5-12; analizando los defectos de flexión de la cola y el número de espina bífida y otros defectos, respecto al total por genotipo. (a) fallo en el cierre 1/fallo en el cierre 2; (b) exencefalia con SB; (c) 2 embriones con fallo en el cierre 1; (d) SB caudal; defecto en los arcos branquiales; 2 malformados, con retraso en el crecimiento.

2.7 Discusión

La pérdida de rigidez de los pliegues neurales en los embriones *Vangl2*^{+/-Lp}, como consecuencia directa de la desorganización en los filamentos de actina durante el cierre del tubo neural, produce que estos se flexionen, lo que induce al distanciamiento de sus extremos dorsales impidiendo su fusión. Como consecuencia de este fallo de fusión parte de la población de NCCs, que migrarían a sus destinos en una situación normal durante los procesos ontogenéticos (Catala 1997), comienzan a acumularse en la zona abierta dorsal del tubo neural, provocando la formación de los agregados celulares de estudio. Se forman así una serie de agregados celulares a lo largo del eje rostro-caudal, que comienzan a formarse a E11.5 y permanecen durante el desarrollo embrionario hasta E14.5, edad a partir de la cual los embriones no presentan señal alguna de malformación dorsal, presentando un tubo neural completamente cerrado.

La cresta neural y el proceso de WH tienen un papel fundamental en la formación del agregado

El aumento de expresión de proteínas como PDGFR- α , CD44 y HABP en la zona del fallo de fusión de pliegues sugiere una posible participación del proceso de WH, que estaría actuando de forma paralela a la migración anómala de las NCCs, facilitando la fusión epitelial en la zona de fallo. La posición de los agregados se localiza en lo que se ha delimitado como zona de transición entre la neurulación primaria y secundaria, región comprendida entre la somita 25 y la 30 (López-Escobar 2018). Debido a que los embriones heterocigotos para *Vangl2* tienen un retraso en el cierre del tubo neural a nivel caudal (López-Escobar 2018), esta zona de transición se extiende hasta la somita 32-33. En ratón existe un momento en que termina la neurulación primaria y comienza la secundaria (Schoenwolf 1984). En pollo y humano, antes de que termine de cerrarse completamente el tubo más anterior, a través de la neurulación primaria, la formación del tubo más posterior se continúa mediante la neurulación secundaria, en una zona más ventral. Esto último se produce sin tomar contacto con el tubo neural dorsal, y ambos acaban uniéndose eventualmente en un solo tubo en la zona de transición (Lowery 2004). Encontramos así una región de superposición entre ambas neurulaciones, y no una continuación, como ocurre en ratón (Criley 1969; Schoenwolf 1980; Schoenwolf 1984; Saitsu 2004; Dady 2014). Esta zona de superposición en humano no está del todo bien

definida, ya que no se conoce con exactitud la posición exacta cuando se inicia la neurulación secundaria (Dady 2014). Parece ser que los tipos de defectos del cierre del tubo neural ocurren con menor frecuencia y en regiones más caudales en embriones de ratón que en los embriones de humano y pollo (Schoenwolf 1984). Los lipomas lumbosacros en humanos se dan más frecuentemente en la zona de las vertebrae L4, L5 y S1, zona vertebral que incluye la zona de solapamiento entre ambas neurulaciones. Debido a que los agregados celulares que encontramos en los embriones de ratón *Vangl2^{+Lp}* se localizarían en esa misma zona vertebral, y que en este caso sería una zona sin solapamiento entre ambas neurulaciones, podríamos establecer una relación entre la desaparición de nuestro agregado celular en *Vangl2^{+Lp}* y la permanencia de los lipomas lumbosacros en humanos, con la presencia o no de dicha zona de superposición en ambos casos. La ausencia de superposición entre las dos neurulaciones en el embrión de ratón podría estar ayudando a la integración/dilución de la masa de células en el tejido del tubo neural.

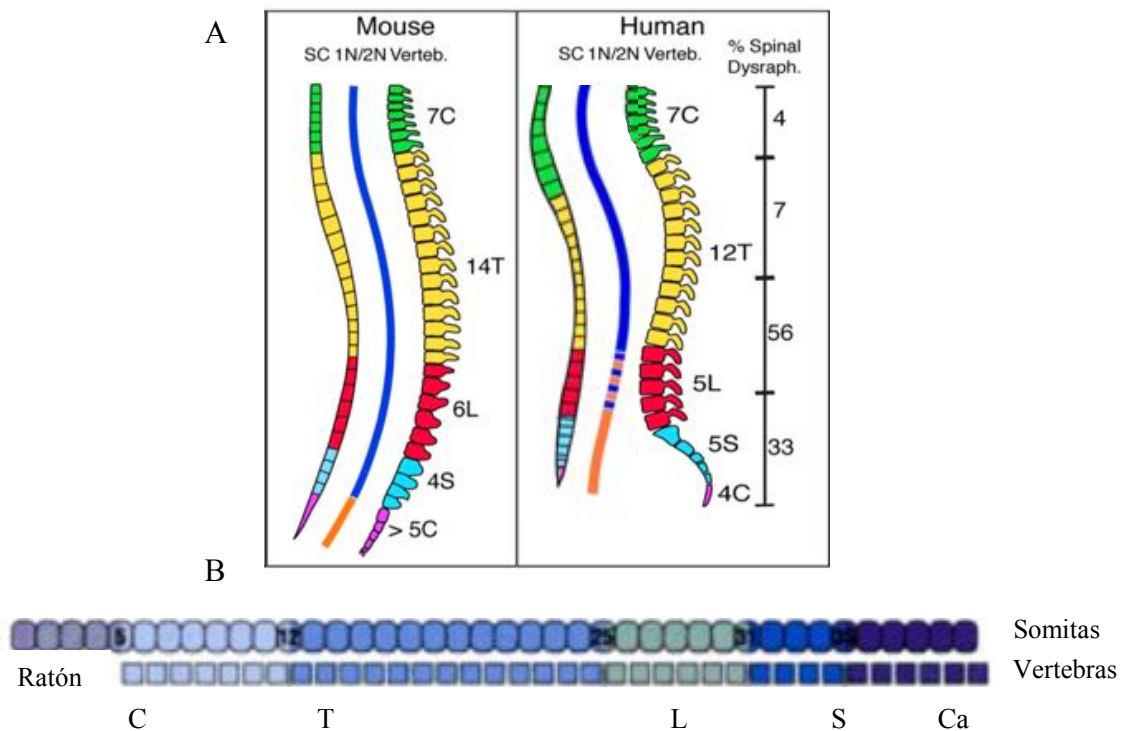


Figura 51. Representación esquemática de la columna vertebral en ratón y humano. (A) Representación de la correspondencia topológica entre diferentes categorías de vértebras, la médula espinal y las regiones de neurulación primaria y secundaria. El límite entre 1N/2N se definió por la posición del cierre del neuroporo posterior, en el ratón después de la última vértebra sacra (Somita 36). En humanos, la zona de superposición se representa por líneas punteadas. (B) Regionalización de las vertebrae según las somitas en ratón. (C, cervical; T, torácica; L, lumbar; S, sacra; y C, caudal). (SC) Médula espinal. (1N/2N; líneas azul y naranja) regiones de neurulación primaria y secundaria respectivamente. Adaptada de (Dady 2014, Wolpert 2010).

Las alteraciones morfológicas en los pliegues neurales en $Vanlg2^{+Lp}$ causan una acumulación de células en la zona del fallo del cierre del tubo neural

Estos agregados están formados por NCCs que parecen tener su origen en la zona dorsal del tubo neural, entre el neuroectodermo y el ectodermo de superficie. La presencia de procesos mitóticos en los agregados celulares indica que los agregados de células están en continuo crecimiento. Posiblemente las NCCs que forman estos agregados están sufriendo un proceso de EMT según entran a formar parte de este. Este proceso queda evidenciado por el cambio de expresión en el agregado celular de *E-cadherina* y *N-cadherina* (NCCs premigratorias), así como *Slug* (migración temprana) y *Sox10* (NCCs con capacidad migratoria), señalando que el agregado está formado por NCCs en las diferentes etapas de diferenciación de la cresta neural. La desregulación de *Hdac9* y *Hdac4* observada en el estudio de Microarray podría deberse a un descontrol de procesos celulares relacionados con estas histonas, como la proliferación y diferenciación, procesos activos durante la formación del agregado celular de estudio (Sando 2012; Sugo 2010). Varios procesos durante el desarrollo van acompañados de un proceso inverso a la EMT, durante el cual el mesénquima se desdiferencia a linaje epitelial a través de una serie de eventos moleculares, conocidos como transición mesénquima epitelial (o MET del inglés “mesenchymal epithelial transition”; Pei 2019). En ciertos casos las células pueden encontrarse en un estado intermedio entre ambos procesos EMT-MET, un fenómeno que se observa por ejemplo en el carcinoma, en células madres embrionarias o células madres pluripotentes, que se someten a estos procesos para diferenciarse en células somáticas. Por lo tanto, las células somáticas diferenciadas pueden reprogramarse en células pluripotentes por un EMT-MET secuencial, donde MET sería un paso crítico para la adquisición de la pluripotencia (Pei 2019). La ausencia de expresión de *Sox10*⁺ en los agregados del **nivel 1 y 4** observados mediante los estudios histológicos a E13.5, puede deberse a que se esté dando este proceso de desdiferenciación, por el que las células mesenquimales migratorias adquirirían de nuevo carácter epitelial mediante el proceso MET (Radisky 2008). Esto explicaría también la presencia de aquellas células aisladas que caen al lumen del tubo neural y que expresaban E-cadherina y N-cadherina.

El agregado celular podría ser un primordio de lipoma, similar al lipoma del lipomielomeningocele (LMMC) de humanos

Nos planteamos la posibilidad de que el agregado en cuestión fuera un primordio de lipoma, similar al lipoma lumbar, formado por una masa de células de tejido adiposo que junto con un tubo neural no cerrado forma la patología lipomielomeningocele (LMMC) en humanos, la forma más común de la espina bífida oculta (Rossi 2004, Lew 2007). Los lipomas lumbares son trastornos congénitos de la región terminal de la médula espinal con un elevado potencial para causar una disfunción significativa de esta. Su embriogénesis es desconocida y pueden presentar una clínica variable, reconociéndose diferentes subtipos anatómicos, los cuales tienen una difícil correlación con el pronóstico clínico. En cuanto a su origen han surgido una serie de hipótesis diferentes en las últimas décadas, señalando el proceso de neurulación secundaria como causante del defecto, aunque ninguna de ellas ha sido respaldada por evidencia experimental (Naidich 1983; Catala 1997; Jones 2018). El grupo de Tom S. Jacques (Jones 2018) proponen un origen embriológico alternativo de los lipomas espinales, debido a una diferenciación de las células de la cresta neural, con un alto potencial para diferenciar e incluso transdiferenciar en un rango muy amplio de tipos celulares. Estos lipomas estarían formados por NCCs presentes dentro del tubo neural secundario, así como en el tubo neural primario (Osório 2009). La expresión de PDGFR- α , como factor que favorece la diferenciación a preadipocitos, junto con la acumulación de gotas lipídicas en aquellas células que parecían desprenderse del agregado celular, abre la posibilidad de que el agregado pueda eventualmente diferenciarse a tejido graso y formar una tumoración, evento similar a lo que ocurre en los casos de LMMC o espina bífida oculta en humanos (McComb 1997).

El tejido del lipoma espinal consiste en adipocitos maduros rodeados de gruesas bandas de tejido conectivo, dentro de las cuales podemos encontrar fibras nerviosas periféricas y vasos sanguíneos engrosados (Pierre-Kahn 1997; Walsh 1980; Zerah 2008; Lellouch-Tubiana 1999; Takeyama 2006). Esta serie de características, no comunes a los lipomas no espinales, plantea la cuestión de si el término "lipoma" es el nombre más preciso para esta patología. El grupo de Tom S. Jacques (Jones 2018) propone el término *conus hamartoma* como un lipoma formado por células maduras no malignas formando una masa desorganizada, donde encontramos células que generalmente no se encuentran en esa región. En su estudio, una elevada cantidad de tipos celulares identificados dentro

de las muestras de lipoma podían derivarse de las NCCs, o estar asociadas con estas. Se conoce que las NCCs poseen la capacidad para diferenciarse en un rango amplio de tipos celulares, incluidos adipocitos y médula ósea (Billon 2007; Isern 2014; Paylor 2014; Sowa 2013). Esto plantea la posibilidad de que la diferenciación de la cresta neural pueda tener un papel en la embriogénesis de lipoma, lo que nos hace establecer una posible similitud entre el lipoma típico que se da en el LMMC y el agregado celular observado en los *Vangl2^{+Lp}*, con características similares a lo observado en los lipomas espinales. Existían indicios que establecían esta similitud, entre los que se encontraban: la presencia de vasos sanguíneos, la naturaleza neural de las células que formaban el agregado, la expresión del factor PDGFR- α , así como la presencia de células vacuoladas (similares a preadipocitos multiloculares) o la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma de aquellas células que se desprendían desde la zona dorsal del tubo neural. Además, la sobreexpresión de *Ifi204* en el presente trabajo, involucrado en procesos de adipogénesis (Xiao 2010), podría indicar una activación temprana de la síntesis de tejido adiposo, señalando la posibilidad de que este tipo celular esté presente en los agregados celulares más diferenciados. En cuanto a la aparición de tejido adiposo en ratón existen estudios que ubican la aparición de preadipocitos durante el desarrollo por primera vez alrededor de E10.5 utilizando como marcador el PDGFR- α , así como *Dlk1/Pref1*, una proteína marcador que solo se encuentra en los preadipocitos (Hepler 2017; Hudak 2014; Louveau 2016). La entrada de las NCCs en el proceso de EMT permitiría la adquisición del carácter mesenquimal, permitiendo la diferenciación de la masa de células a preadipocitos (Billon 2007). En nuestros embriones *Vangl2^{+Lp}*, la diferenciación eventual de las células que forman el agregado a preadipocitos podría ser la causa del aumento de *Ifi204* observado en el estudio microarray. *Ifi204* codifica p204, una proteína reguladora de la síntesis de tejido adiposo, la cual se expresa en los preadipocitos durante las primeras etapas de la adipogénesis (Xiao 2010). Las similitudes encontradas en el origen y localización del agregado celular en ratón, con respecto a lo que se sabe de lipomas en humanos, señala la importancia del estudio de estos agregados para acercarnos al conocimiento de los lipomas espinales (Jones 2018). En conjunto, estos datos hacen de los mutantes *Vangl2* un posible modelo animal para estudios del origen del lipoma que se da en el LMMC en humanos. Esto abre varias posibilidades de investigación enfocados a la prevención o estudios genéticos en humanos relacionados con aquellos genes desregulados en nuestro modelo, que ayuden en el manejo de esta enfermedad.

La acumulación ectópica de las células Sox10⁺ que forman el agregado podría ser la causa del aumento de miR-350 observado en el análisis Microarray

La desregulación de miRNAs está relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades en humanos y otros organismos (Ha 2011; Mendell 2012; Ardekani 2010), y se conoce que la restauración de estos a sus niveles normales puede reducir o incluso eliminar enfermedades, incluidos tumores en modelos animales (Wahid 2010). El análisis de miRNAs se llevó a cabo en el estudio de Microarray, en relación con la regulación del desarrollo de la cresta neural, donde los miRNAs pueden actuar en diferentes momentos del desarrollo provocando cambios críticos en los programas de expresión génica, regulando redes de genes cruciales para el desarrollo de esta población celular (Mayanil 2013). En la comparación de *Vangl2^{+Lp}* vs *Vangl2^{+/+}* encontramos el *miR-350* (FC = 1.43), que regula positivamente la expresión de *Sox10* (Gokey 2012). Se podría estar produciendo un *feedback* positivo provocado por la acumulación ectópica de las células *Sox10⁺* que forman el agregado, lo que conllevaría al aumento observado de *miR-350*. Este aumento de *miR-350* podría estar desregulando las vías JNK y MAPK, donde está involucrado (Ge 2013, Yang 2016). La cascada JNK compone un efector posterior de la señalización de la vía Wnt-PCP, y constituye una señal clave para la neurulación, ya que actúa sobre el citoesqueleto e induce eventos de polarización celular. Esta vía JNK es uno de los casetes de señalización más importantes de la vía de señalización MAPK, por lo que está implicada en procesos morfogénicos durante el desarrollo embrionario, y donde mutantes de la vía presentan defectos del tubo neural (Kuan 1999; Chi 2005; Sabapathy 1999; Zhang 2015). Así, podríamos llevar a cabo una modificación o silenciamiento de miRNAs, en concreto de *miR-350* en la zona dorsal del tubo neural a E11, regulando sus niveles durante el estadio de aparición del agregado celular, evaluando el posible efecto del nivel de este miRNAs en la aparición del agregado y progresión de este a edades más avanzadas. Un ejemplo de ello es el diseño de anti-miRNAs para el silenciamiento de genes que se sobreexpresan en el cáncer, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico o “epidermal growth factor receptor” (EGFR). A pesar de que esto es una de las estrategias terapéuticas antineoplásicas más efectivas *in vitro*, las barreras fisiológicas y celulares obstaculizan la eficacia *in vivo* de las tecnologías anti-miRNAs (Costa 2013). Otro estudio posible sería comprobar si la regulación de *miR-350* a sus niveles normales causaría efecto en las vías JNK y MAPK, que están reguladas por *miR-350*, lo que podría conllevar a respuestas terapéuticas significativas (Ohlsson 2009).

El dominio de expresión de Sox10 en el eje dorsoventral del tubo neural se corresponde con el dominio de expresión de los genes proneurales Mash1 y Ngn1

Las células *Sox10*⁺ que formaban los agregados celulares en la zona dorsal de pliegues se internalizan en el tubo neural a E13.5, provocando una expresión ectópica de *Sox10* en el interior del tubo neural. El dominio de expresión de *Sox10* en el eje dorsoventral del tubo neural en los *Vangl2*^{+Lp} a E14.5 podría explicar el destino final de aquellas células que se internalizaban a E13.5. Este hecho explicaría porque no se había registrado previamente la presencia de agregados celulares en este estadio mediante técnicas histológicas. La médula espinal está subdividida dorsoventralmente en dos regiones, dorsal (D) y ventral (V). Estas regiones están definidas por dominios de expresión de **factores de transcripción o *prepattern genes*** que se solapan, y cuyas interacciones reguladoras cambian con el tiempo. Una vez establecidos los diferentes dominios de expresión, la actividad combinada de sus productos define las características de los **dominios progenitores o *progenitor domains***, en los que van a producirse los diferentes subtipos neuronales. La formación de una correcta red neuronal requiere la generación de un número correcto de neuronas con una identidad específica en el tubo neural dorsal. La regulación de este proceso comienza temprano en el desarrollo del sistema nervioso, donde las células en la zona ventricular del tubo neural, que poseen identidades diferentes, están determinadas por **genes proneurales específicos o *proneural genes***, que imparten su identidad particular a los diferentes tipos de neuronas. Estos genes proneurales codifican factores de transcripción específicos, dentro de la clase de proteínas hélice-bucle-hélice básico (bHLH), que controlan la especificación de estas poblaciones neuronales entre los que se encuentran *Math1*, *Ngn1/2*, *Ngn3* o *Mash1*, y en cuya regulación participan genes como *Shh*, que produce una regulación ventral, y *BMPs* y *Wnt* encargados de su regulación dorsal. ***Sox10*** persiste en las células neurales progenitoras, regulando múltiples efectores posteriores de las vías de diferenciación y ejerciendo un papel regulador en los genes proneurales, donde la expresión de *Sox10* es crucial para la adquisición de las características finales de las células (diferenciación) durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (Mayanil 2013; Kim 2003)

En pollo y ratón *Mash* y *Ngn1/2* se expresan en poblaciones de células progenitoras que no solapan, dando lugar a los diferentes tipos de neuronas. Aunque las neuronas dI4 parecen surgir del dominio correspondiente a *Mash1*, se especifican a partir de células

con bajos niveles o niveles nulos de este factor y requieren de la actividad de *Ngn2*. Esto es debido a la heterogeneidad de *Mash1* en la zona ventricular, donde las células con elevados niveles de *Mash1* se especifican preferentemente a neuronas dl3 y dl5, mientras aquellas con bajos niveles de *Mash1* se mantienen como células progenitoras o se especifican en neuronas dl4 (Helms 2005). Aunque se conoce que *Ngn2* limita la actividad de *Mash1* a la hora de inducir neuronas dl3 y dl5, la forma de actuación de este factor no está del todo clara, y difiere del resto de factores en la zona de estudio. Por tanto, el balance de actividad de estos dos factores, *Msh1* y *Ngn2*, juega un papel central en la determinación de la correcta composición de neuronas encontradas en la medula espinal dorsal (Helms 2005). Una vez especificado el tipo celular se produce una migración hacia la zona más externa del tubo neural para dar lugar a interneuronas dorsales, interneuronas ventrales y motoneuronas (Fig. 52; Gómez-Skarmeta 2003). Este mecanismo, mediante el cual estos factores interactúan para dar lugar a la diversidad neuronal, aun no esta del todo claro y requiere la identificación de nuevas dianas para definir donde interactúan las diferentes señales (Helms 2005).

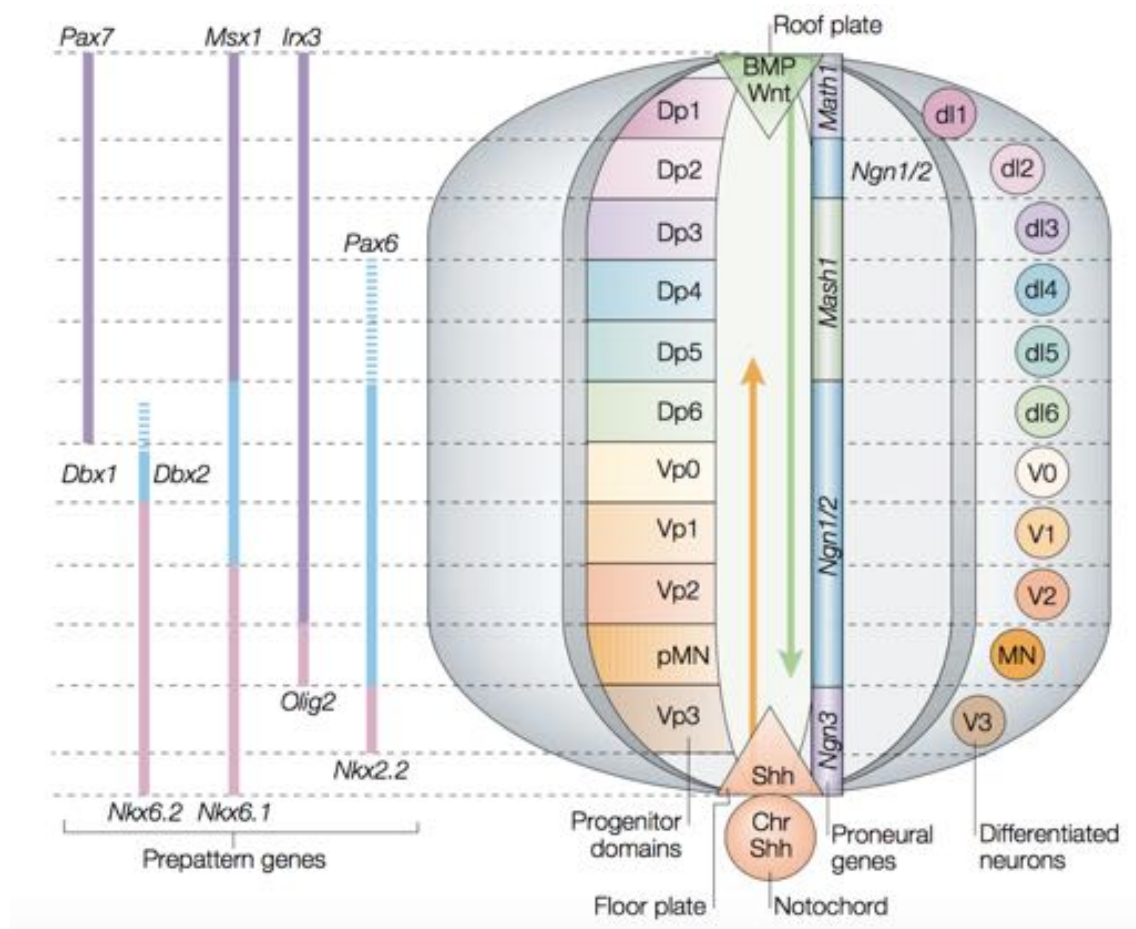


Figura 52. Expresión de genes proneurales y factores morfogenéticos en el tubo neural. Se muestran los dominios de expresión de los genes proneurales en la zona ventricular, así como los dominios progenitores donde se especifican las diferentes neuronas. Encontramos *Sonic Hedgehog* (Shh) y *Cordina* (Chr) en la notocorda, mientras la señal de BMP y Wnt se encuentra en la zona dorsal del tubo neural. Estos factores actúan en gradientes opuestos para modelar la médula espinal, actuando sobre los genes proneurales y factores en los diferentes territorios dorsal/ventral (D/V). La combinación de los distintos factores morfogenéticos, que se secretan desde distintas localizaciones del tubo neural, generan determinados territorios dorsoventrales que definen los diferentes dominios progenitores (Dp1–Dp6, Vp0–Vp3 y pMN), donde se especifican las interneuronas dorsales dI1–dI6, interneuronas ventrales V0–V3 y motoneuronas MN. Modificada de (Gómez-Skarmeta 2003).

El dominio de expresión dorsoventral de *Sox10* en el tejido del tubo neural para los *Vangl2^{+Lp}* a E13.5-E14.5 se correspondía con el dominio de expresión de *Mash1*, responsable de la neurogénesis en el Sistema Nervioso Autónomo, concretamente del destino de las neuronas simpáticas, y *Ngn1* o *Neurog1* responsable de la diferenciación de neuronas sensoriales. Se conoce que una vez ha sido inducido *Mash1* y *Phox2b* se puede producir una represión directa o indirecta del factor *Sox10*, lo que sugiere que un aumento de expresión podría interferir con la diferenciación neuronal. Se conoce que la sobreexpresión de *Sox10* inhibe la diferenciación de neuronas entéricas y células de la glía, favoreciendo la generación de melanoblastos. Una posible alteración en la expresión de *Mash1* y *Ngn1* en aquellas células *Sox10⁺* en el tejido del tubo neural observado en los *Vangl2^{+Lp}*, podría repercutir en los procesos en los que estos genes proneurales participan, pudiendo provocar una posible alteración de la población neuronal (Mayanil 2013).

El aumento de expresión de *Sox10* observado en la zona más ventral del tubo neural en los *Vangl2^{+Lp}* a E13.5-E14.5, se correspondía con la localización de precursores de oligodendrocitos (OLPs), donde este factor está expresado (Oh 2005). Las células *Sox10⁺* en el interior del tubo neural podrían diferenciarse a OLPs, cuyo dominio coincide con el dominio progenitor de neuronas motoras (pMN; Fig. 52). De hecho, se sabe que las neuronas motoras y los OLPs se generan secuencialmente a partir del dominio progenitor de neuronas motoras. A E12.5, cuando los OLPs comienzan a emerger cerca del dominio progenitor ventral, la generación de neuronas motoras ya está casi completa. Se ha propuesto que se requiere la extinción de la expresión de *Ngn2* en este dominio común para promover la especificación de los oligodendrocitos. Teniendo en cuenta que a E14.5, cuando la oligodendrogénesis está completamente activada, la expresión de *Ngn1/2* está

casi excluida en el dominio de los OLPs, una expresión persistente de *Ngn1/2* en dicho dominio en los *Vangl2^{+Lp}* podría traducirse en un retraso en la especificación de OLPs, alterando la actividad neurogénica (Oh 2005). Podríamos hacer un estudio a E14.5 con HuCD, un marcador de diferenciación neural (Wang 2015), para analizar si la elevada expresión de *Sox10* estaría afectando este proceso en los *Vangl2^{+Lp}*, así como un estudio con *Olig2* (Fig. 52), un factor de transcripción determinante en la generación de neuronas motoras y oligodendrocitos (Lu 2002; Takebayashi 2002; Zhou 2002), para conocer los niveles de estos tipos celulares.

Los dobles mutantes de la vía Wnt-PCP Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt} y espina bífida Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+Ct} aumentan la frecuencia de aparición del agregado celular de estudio

La vía Wnt-PCP se encarga de modular el citoesqueleto de actina y orienta las células en el plano del epitelio durante el desarrollo. Las proteínas del *core* PCP se mueven a la membrana apical de la célula durante el inicio de la PCP, mediante un tráfico de vesículas. Este proceso requiere una reorganización dinámica de los filamentos de actina, proceso que implica a la cofilina (Cfl1). Esta proteína, que se encuentra en el citosol celular coopera con Vangl2, localizada de manera asimétrica en la zona anterior de la célula (Davey 2017). Esta interacción Vangl2/Cfl1 controla el inicio de la PCP, donde la Cfl1 se encarga de despolimerizar los filamentos de actina, un paso esencial en la remodelación del citoesqueleto, evento necesario para el tráfico de vesículas (Mahaffey 2013). Otro de los genes de la ruta de señalización Wnt-PCP no canónica es *Daam1*, cuya proteína Daam1, localizada en la zona apical posterior de la célula, se une a Dvl y Rho para la polimerización de los filamentos de actina y la reorganización del citoesqueleto (Habas 2001; Sato 2006). La mutación en *Daam1* provoca un fallo de regulación del citoesqueleto, ya que la actina no se polimeriza, señalando la importancia de Daam1 en la organización celular de este componente (Luo 2016). La insuficiencia de Daam1 en los *Daam1^{+gt}* y *Daam1^{gt/gt}* no provoca la aparición del agregado celular, pero su interacción con el fallo en la organización de actina característico de *Vangl2*, aumenta la frecuencia de aparición del agregado de estudio en los dobles mutantes de la vía Wnt-PCP *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}*. La mutación en *Vangl2^{+Lp}* provoca que Vangl2 no se empaquete en vesículas, provocando un defecto en el tráfico endosomal; esto provoca la pérdida de asimetría de Vangl2, que junto con la asimetría de otras proteínas de la vía, propaga una

señal posicional requerida para el inicio de la PCP (Merte 2010). Se ha visto que el remodelado del citoesqueleto de actina tiene un papel esencial en el tráfico de vesículas hacia sus localizaciones apropiadas en la membrana apical. En relación a esto, los dobles mutantes *Cfl1/Vangl2* no realizan el tráfico de vesículas de PCP a la membrana de la célula (Mahaffey 2013; Fanto 2004; Montcouquiol 2006). Así, el aumento de *Hdac4* observado en el estudio de Microarray, relacionado con el proceso de endocitosis, podría ser debido a una afectación del tráfico de proteínas Wnt-PCP, consecuencia de la mutación en *Vangl2*. La afectación de la vía Wnt-PCP por la mutación en *Vangl2* afecta a la vía ROCK, donde actúa el factor de transcripción *Mitf* “microphthalmia-associated transcription factor”. *Mitf* actúa regulando directamente la expresión de DIAPH1, que codifica la formina Dia1, un efector de RhoA, regulando la polimerización y coordinación del citoesqueleto de actina (Carreira 2006). En este sentido, la desregulación observada de este factor podría deberse a la desorganización del citoesqueleto de actina característica de nuestro mutante *Vangl2*. Así, el fallo en la organización del citoesqueleto de actina provocado por la mutación en *Vangl2*, junto con la falta de polimerización de esta provocada por *Daam1*, resultaría en una pérdida de rigidez en los pliegues neurales más severa que en los mutantes individuales. Esto podría ser la causa de la aparición de un fallo más severo de unión de pliegues, en comparación con *Vangl2^{+Lp}*, estableciéndose una posible relación entre la aparición del agregado y el grado de severidad del problema de cierre del tubo neural. El estudio señala la importancia de la vía Wnt-PCP en el cierre del tubo neural, donde una afectación doble de la vía provoca un aumento en la frecuencia de aparición del agregado de estudio.

La aparición de agregados en los *Grhl3^{Ct/Ct}*, aunque con menor frecuencia que en los *Vangl2^{+Lp}*, se correlaciona con el desequilibrio de crecimiento anómalo en los tejidos característico del mutante para *Grhl3*, lo que da lugar a una deformación de la placa neural suprayacente (Copp 1988; O’Shea 1987; Van Straaten 2001), impidiendo la fusión correcta de los pliegues neurales. Este fallo de fusión estaría provocando la migración ectópica de las NCCs hacia la zona de fallo en los *Grhl3^{Ct/Ct}*, formando el agregado. En los dobles mutantes *Vangl2^{+Lp}/Grhl3^{+Ct}* el fallo de fusión de unos pliegues neurales flexionados de forma anómala se encuentra exacerbado, tanto por un efecto biomecánico en la elevación y aposición de los pliegues neurales, como por el fallo de sellado epitelial, consecuencia de la mutación en *Grhl3* (Van Straaten 2001), lo que estaría afectando aún

más el proceso de fusión de pliegues, aumentando la incidencia de DTN y del agregado celular de estudio.

Resultado 3: Análisis genético del gen *VANGL2* en pacientes con lipomielomeningocele y a sus progenitores.

Resultado 3: Análisis genético del gen *VANGL2* en pacientes con lipomielenoencefalo y a sus progenitores.

Introducción

El desarrollo depende de la expresión diferencial de un genoma constante para producir diversos tipos celulares durante la embriogénesis. El programa genético durante el desarrollo opera principalmente a través de la expresión regulada de genes que codifican factores de transcripción y componentes de las vías de señalización celular. Existen vías importantes durante el desarrollo embrionario, cuya interrupción conduce a una gran variedad de embriopatías, y donde la identificación de genes mutados aporta una gran fuente de información para la identificación de genes homólogos y ortólogos relacionados con DTN en humanos. Los DTN tienen una etiología compleja e involucran factores genéticos y ambientales cuya identidad y número siguen siendo en gran parte desconocidos. Se han identificado varias regiones candidatas en el genoma relacionadas con los DTN, como regiones en los cromosomas 2, 7 y 10, sin embargo, estos estudios se complican por una probable heterogeneidad génica y una penetrancia variable, lo que dificulta la identificación de genes asociados a estos defectos (Bassuk 2009). Los estudios con modelos animales han demostrado un papel esencial de la vía Wnt-PCP en la neurulación. Debido a la fuerte evidencia genética y funcional del papel de los genes *Vangl* en la neurulación, y en particular del papel de *Vangl2* en el desarrollo de DTN en el mutante de ratón *Vangl2^{+Lp}* (Murdoch 2001; Kibar 2001), el grupo de P Gross (Kibar 2011) evaluaron la posible interacción de este gen en la aparición de DTN en humanos. Mediante el análisis del gen *VANGL2* en 673 pacientes afectados con DTN, donde el 67% estaban afectados con mielomeningocele o espina bífida abierta y un 30% afectados con varias formas de DTN espinales cerrados, se encontraron 6 nuevas mutaciones en heterocigosis que podrían ser patogénicas. Cuatro de estas mutaciones podrían provocar daños en la función de la proteína, y se encontraban en cuatro pacientes: uno de ellos con espina bífida abierta y tres con espina bífida cerrada, dentro de este último grupo encontrábamos 1 paciente con lipoma. Mientras, las otras dos afectaban a residuos altamente conservados durante la evolución, y se encontraban en dos pacientes: uno de ellos con espina bífida abierta y el otro con espina bífida cerrada con presencia de lipoma.

Los análisis recientes del transcriptoma durante la neurulación y organogénesis en humanos y ratón han identificado la dinámica global de los cambios de expresión durante el desarrollo, aumentando el conocimiento acerca de la regulación génica y proporcionando indicios de cómo funcionan las redes de regulación transcripcional que subyacen estos procesos (Mayanil 2013). Del mismo modo, el análisis del epigenoma, que constituye el conjunto de modificaciones de histonas, uniones de factores de transcripción y otras características estructurales asociadas con la regulación de genes, ha dado una visión renovada a los mecanismos implicados en el proceso de neurulación.

La metilación del ADN es una modificación epigenética caracterizada por la incorporación de grupos metilos a citosinas dentro de las islas CpG. Estas islas CpG son regiones de ADN que se encargan de regular la expresión de ciertos genes, cuya activación dinámica durante la formación del embrión juega un papel relevante en las vías de señalización implicadas en el desarrollo. Un patrón de metilación alterado puede dar lugar a diferentes enfermedades provocando un desbalance epigenético, lo que da lugar a una inestabilidad genómica y a silenciamiento génico. Esta alteración en la metilación de las islas CpG en áreas promotoras lleva asociada una represión transcripcional, lo que puede dar lugar a intensos cambios de estructura en la cromatina, producidos por la interacción de metilcitosinas con diferentes complejos proteicos que reclutan enzimas que modifican histonas, como las acetilasas y metilasas (Schenkel 2016, 2017).

Por lo tanto, además de la secuencia codificante, hay también que tener en cuenta el estado de las regiones reguladoras de los genes, donde una alteración en la expresión del gen puede dar lugar a una enfermedad congénita.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los SNP representan las variantes genéticas más comunes encontradas en el genoma humano. Estas alteraciones de un solo nucleótido, localizadas tanto en regiones codificantes como en no codificantes, se dividen en neutras y funcionales. De acuerdo con su amplia localización e importancia funcional, ya sea en la estructura del gen o del ARNm, los SNP funcionales se dividen en SNP reguladores (rSNP), localizados en la zona promotora de los genes que codifican proteínas, afectando los niveles de expresión

génica (Sadee 2011; Sadee 2009; Ramírez-Bello 2013) y SNPs-ARN estructurales (srSNP), localizados en los pre-ARNm y ARNm maduros, incluyendo las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) y regiones intrónicas. Estos srSNP pueden llegar a afectar a la estructura, estabilidad y función de los ARN, incluyendo los sitios de *splicing*, la funcionalidad de las proteínas, la respuesta a medicamentos y la interacción con diversas proteínas de unión a ARN (o RBP del inglés “RNA-Binding Proteins”). Así, estos SNP pueden tener una implicación directa en el desarrollo de enfermedades comunes, donde los srSNP 593A/G, 598T/G y 620T/C en el gen TNFR2 aumentan la degradación de su ARNm (Ramírez-Bello 2013).

El último tipo de SNP sería los SNPs codificantes (cSNP), localizados en los exones, y se subdividen en sinónimos (sSNP), cuando no cambia el aminoácido, y no sinónimos (nsSNP), si el cambio de nucleótido cambia un aminoácido, los cuales afectan la secuencia, estructura y función proteica (Hunt 2009, Ramírez-Bello 2017; Yu 2012; Lee 2012). De esta manera, los polimorfismos funcionalmente importantes se han empleado como marcadores genéticos en el desarrollo de diversas enfermedades complejas u otros rasgos complejos como el sSNP 3435C/T del exón 26 del gen MDR1, que afecta a la velocidad de plegamiento y la función de P-gp en la membrana de las células, o los nsSNP del gen TLR5, que induce una mayor cantidad de CCL20 en respuesta a la flagelina y confiere riesgo para la enfermedad de Crohn, y del gen PTPN22, que genera riesgo para la artritis reumatoide (Ramírez-Bello 2017).

Nos planteamos así el estudio genético del gen *VANGL2* en pacientes que presentaban una variable lipomatosa o lipomielomeningocele, que es la de mayor prevalencia dentro de los casos de espina bífida oculta, para evaluar los posibles SNP o mutaciones encontrados en la región codificante y región reguladora, y establecer una relación con la enfermedad.

3.1 Objetivos del estudio

1. Analizar la secuencia codificante del gen *VANGL2*
2. Analizar la zona promotor del gen *VANGL2*

3.2 Pacientes y Controles

Selección de sujetos: Los individuos incluidos en el estudio son aquellos pacientes atendidos en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Virgen del Rocío para el grupo “pacientes” e individuos sanos elegidos al azar y admitidos en el Hospital Infantil Virgen del Rocío por causas no relacionadas con los defectos del tubo neural para el grupo “control”. Para ambos grupos se están tomando solo aquellos en los que se cuente con la participación del paciente y de sus dos progenitores (para poder analizar el posible carácter hereditario de las anomalías genéticas detectadas, apartado 6.2).

Todos los participantes incluidos en el presente estudio han firmado un consentimiento informado para cirugía y estudios de genética clínica y molecular, cumpliendo con las normas de protección de datos expuestas en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, así como con lo estipulado por la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de Julio de 2007), habiendo sido también aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España).

Pacientes con LMMC

Para el estudio incluido en el presente trabajo se ha contado con muestras de ADN genómico extraído a partir de tejido de la mucosa bucal, de un total de 58 pacientes con LMMC y de sus progenitores.

Individuos control

Para la evaluación de los polimorfismos identificadas se han incluido muestras de ADN genómico de un grupo de 66 individuos control no relacionados entre sí, sin ningún antecedente personal o familiar relacionado con LMMC. Las muestras que se han utilizado como controles se han obtenido del Biobanco del Hospital Virgen del Rocío. El método de extracción de ADN usado fue a partir de sangre periférica.

3.3 Resultados

Durante este estudio, se ha llevado a cabo un análisis de la región codificante del gen *VANGL2*, así como de una zona reguladora dentro del promotor del gen. El análisis

nos permite evaluar la frecuencia y el tipo de posibles polimorfismos o mutaciones en *VANGL2* en aquellos pacientes afectados con LMMC.

3.3.1 Secuenciación de la región codificante del gen *VANGL2*

La secuencia genómica utilizada para el diseño de primers para *VANGL2* ha sido obtenida a partir de las bases de datos NCBI (NG_023420.1) y Ensembl (ENSG00000162738). Esta secuencia cuenta con 28105 pb, que dan lugar a dos transcritos: ID: ENST00000368061 de 5354 pb, el cual da lugar a una proteína de 521 aminoácidos (ENSP00000357040.2) y otro transcrito de menor tamaño (ENST00000483408.1) de 349 pb, que no da lugar a proteína (datos obtenidos a partir de la base de datos Ensembl).

La región codificante completa de *VANGL2*, de 1566 pb de longitud, se amplificó en un total de 6 amplicones que cubrían desde 123 pb *upstream* del 5'UTR y 158 pb *downstream* del 3'UTR. Cada exón fue amplificado en un amplicón excepto el primer y segundo exón codificante, que fueron amplificados juntos. Los fragmentos de secuencia intrónica flanqueante que fueron secuenciados estaban en un rango entre 20-60 pb.



Figura 53. Esquema que muestra la localización del gen *VANGL2* en el cromosoma 1 y sus dos transcritos. El gen presenta 8 exones, solo 7 de ellos codificantes (zona coloreada del gen; <http://www.ensembl.org/index.html>).

Exons/ Introns Translated sequence Flanking sequence Intron sequence UTR

Variants 3 prime UTR 5 prime UTR Coding sequence Frameshift Missense Splice acceptor Splice region Start lost

Stop gained Synonymous

Markup loaded

Show All entries Showhide columns Filter

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
	5' upstream sequence					ggccctgcacccccccctcatccctcccctccgcccctcccc
1	ENSE00001446226	160.400.554	160.400.892	-	-	306	ATGAGGCGCAGGCTCCGATCTGATTCAGATTTGATTCTGTATCCAGTCCCGCC AAAGGCGCTAGAGCCCGCTAATCCCGCCGCCACCCCGCGGGCCATCGAGGGG AAGAGCCAGCGTCTGGGACATACAGCGCTGACAGATCAAGAGCCGCTCAAC ATCCCAAGCCCGCGCTGTGCCAGGAGGGGAGTTGGAAACACAGAGCCT GCGGATACAAAGCCGATGCCGAGCGGCCCGCCAGCCACCCAGCTCCAG CGCC
	Intron 1-2	160.400.870	160.415.647			14,778	gtgagtcggggggggggggggcgcg.....ctcaatagattcttcctatcaccag
2	ENSE00001446225	160.415.648	160.415.908	-	2	261	AGAGGCTGATTTTCTAGACAAGCCACCTCCAGCAATGAGTCCCTCCAG GTCAGGTGACTCCTGAAGCTCTCGGCTAAGAAAGAGCTGAAAGGGT GCCCTTCCCGCCCAAGCCCTAGCCAGCGCTGATCTTAGAGCCAGGAG TCCAGAGCTGACACAGTCCAGATCTCGACTTCTTAAGAGGGCCATC CCAGCTCCCAAGAGAG
	Intron 2-3	160.415.909	160.416.061			153	gtggcaggcctgcagggtgacatg.....tgcctttctgggttcctgcccag
3	ENSE00001068145	160.416.062	160.416.182	2	0	121	CTTCCAGGACACCTCTAAGAGTCAATGCGCAGACAGAGTCTG GCAATCACCGGAGCTCTCTGGACAATGATCACAGCCAGGAGC G
	Intron 3-4	160.416.183	160.419.001			2,819	gtgagcactgggatgggtggctc.....gtggctggccctctctgctgtag
4	ENSE00001068146	160.419.002	160.419.609	0	2	608	GATGCAATGGGGMAACACACAGTATGACACCTCAGAGCCAGCACTCC CAAGACCTCAACCAATCAAGGACAGGACAGTCTCCAGCTCCAGC CACAGTATGAGCAAGCGCCAGCCCTGCTCTCTTTCAGACTCCCTG GCTTCTGCTCCCGCATGCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTG TCCAGGCTTCTATGCTCTGCTTACCTTACCTTATCTCTTCTGAGCTGG CTCTTCTTCCAGCCCAAGCTCTGCTCCAGCTCTTCTGCTGCTG CTTATGCTCTTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTG CTGATCTGAGCCAGCTACAGGGCTGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CCCTTCTTCTGCTTACCTAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CGTTCACTCAAGCTCTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CATCTCAG
	Intron 4-5	160.419.610	160.420.410			801	gtactagncrnggctgggaggy.....cccctctgctgctctccccacag
5	ENSE00001068142	160.420.411	160.420.547	2	1	137	ATCTCCAGTGTGGTCCCTGAGAGTATACATGACTCCCTGTCTACAA CCCTGCTCTCAACCTGCCAAGCTCTCTCAAGAAAGCTGCTTCAAGGT GTATCTCTGAG
	Intron 5-6	160.420.548	160.421.051			504	gtgagagcctgctctctgccc.....tctcctctatctgttctctgtcag
6	ENSE00003640582	160.421.052	160.421.187	1	2	136	AAACAGACCAACACTOCACCTGGCCAGCTGATGATGATGATGATGATG GCTGCAAGAGCAAGAGTCAATGATCTATGAGAGGCTGATGATGATG CAAGAGAGGGCCAG
	Intron 6-7	160.421.188	160.424.051			2,864	gtgggtccctgggggagggag.....ggccagtcocctcctgtccocctag
7	ENSE00001068143	160.424.052	160.424.283	2	0	232	GCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GATCTCCAGTGTGGTCCCTGAGAGTATACATGACTCCCTGTCTACAA GACCTGCTCTCAACCTGCCAAGCTCTCTCAAGAAAGCTGCTTCAAGGT GTATCTCTGAG
	Intron 7-8	160.424.284	160.425.117			834	gtgagcctgcccctgctgcccagatc.....atgagccctctcttctccattcag

Exón 1 codificante

Exón 2 codificante

Exón 3 codificante

Exón 4 codificante

Exón 5 codificante

Exón 6 codificante

Figura 54. Distintas regiones del gen *VANGL2*. Se representa la secuencia de los exones codificantes 1-6, donde se da información sobre la localización de los fragmentos ampliados, así como las regiones intrónicas (<http://www.ensembl.org/index.html>).

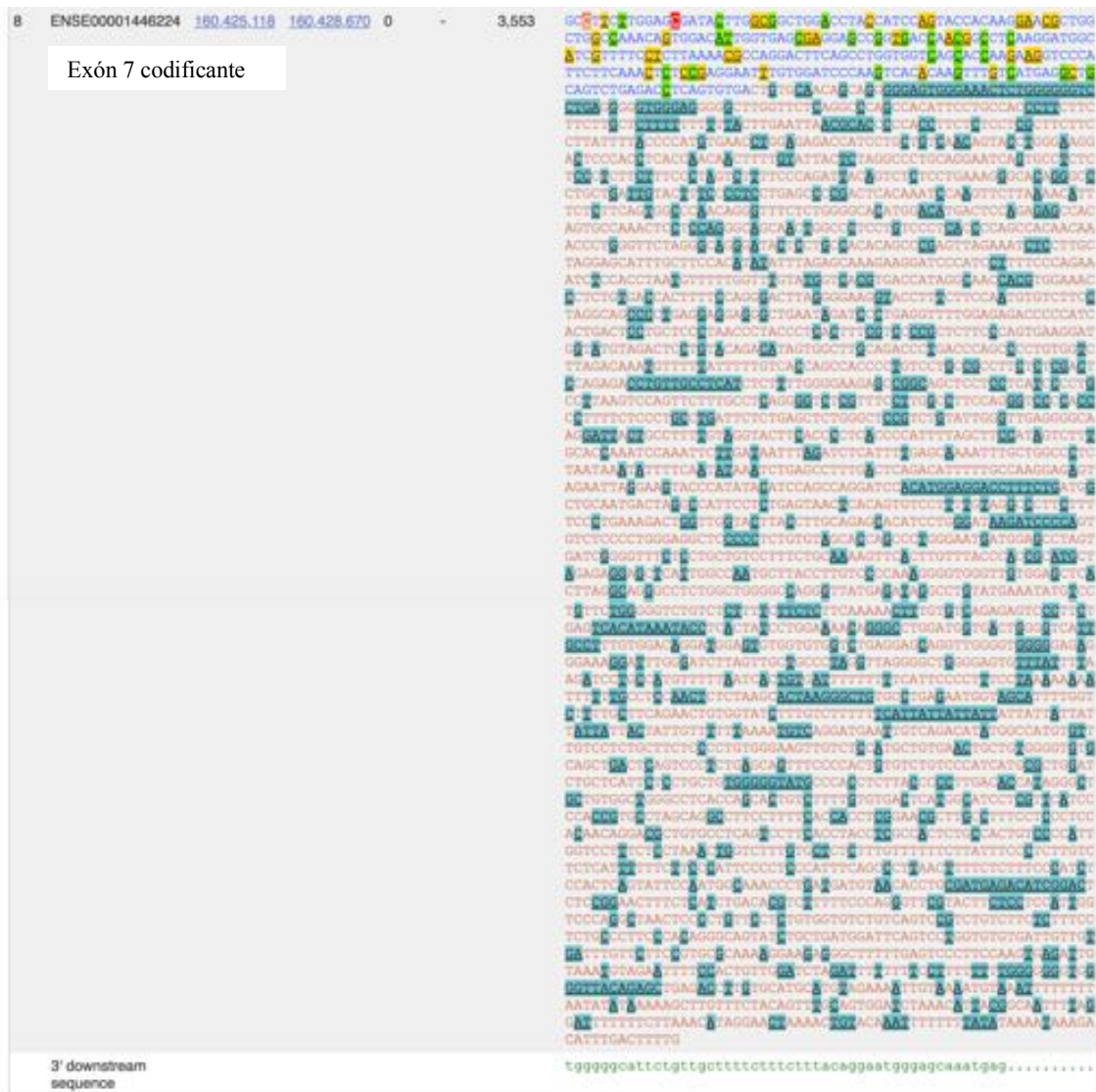


Figura 55. Se representa la secuencia del exón 7 codificante de *VANGL2*, donde se da información sobre la localización del fragmento ampliado (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Dentro de las variantes encontradas en la región codificante del gen se identificaron 3 polimorfismos, tanto en pacientes como en controles, previamente descritos por el grupo de P. Gross (Kibar 2011). En 43 de los 58 pacientes con LMMC, se encontró el sSNP rs12086448 (c.1134A>G; p.Lys379Lys). Dicha variante génica se encuentra altamente conservada en diferentes especies de vertebrados, y está localizada en el exón 6 codificante. Consiste en un cambio puntual A>G en la posición 1134 de la región codificante del gen *VANGL2*, generando un cambio sinónimo del aminoácido lisina (Lys o K) en la posición aminoacídica 379 de la proteína VANGL2 (Fig. 56). El residuo Lys379 se localiza cerca del extremo carboxilo en el lado citoplásmico del cuarto dominio transmembrana de VANGL2. Esta sustitución de lisina a lisina es un cambio químico

conservador, observado en muchos ortólogos de vertebrados. De los 43 pacientes que portaban la variante génica, 28 presentaban el alelo G (48%) y los 15 restantes presentaban GG (26%). El análisis de los controles mostró dicho polimorfismo en 34 de las 66 muestras analizadas (51%), mientras presentaban GG en 13/66 muestras (20%; Ver Tabla 19).

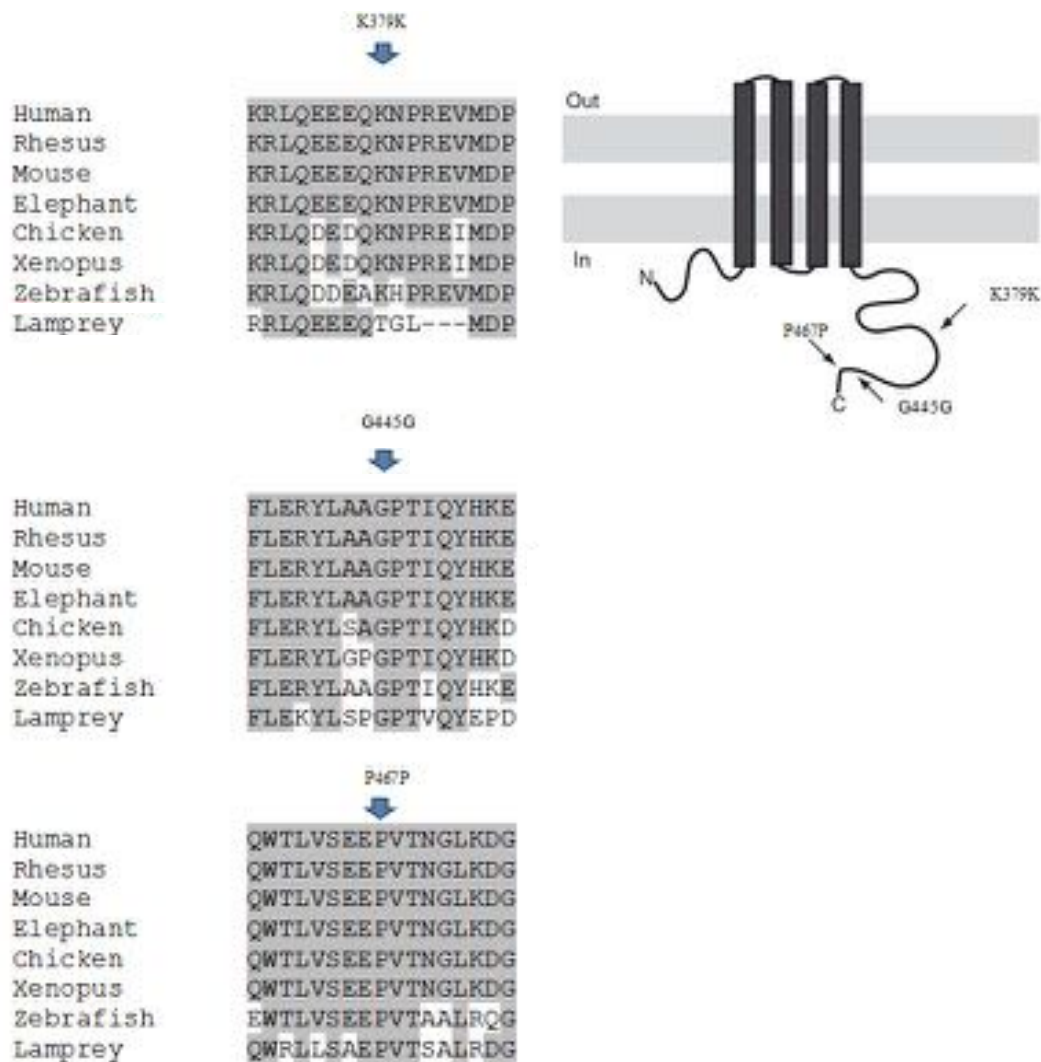


Figura 56. A partir de los datos obtenidos de los rs12086448 en el exón 6 codificante y los rs17380127 y rs17380141 en el exón 7 codificante se muestra la posición del aminoácido correspondiente y su localización aproximada en la proteína VANGL2 (Adaptada de **kibar 2011**). Se muestra también el estado de conservación de estos en las distintas especies de estudio; en gris los aminoácidos conservados entre especies (Imagen propia realizada con la información recogida en UCSC *Genome browser*: <http://genome.ucsc.edu/>).

En el exón 7 codificante del gen encontramos el sSNP rs17380127 (c.1335A>C; p. Gly445Gly) y rs17380141 (c.1401G>A; p. Pro467Pro). Dichas variantes génicas se encuentran altamente conservadas en diferentes especies de vertebrados. Además, se presentaban de manera simultánea en las mismas muestras de estudio, por lo que estaban asociadas. Estos sSNP consisten en un cambio puntual A>C en la posición 1335 y G>A en la posición 1401, respectivamente, de la región codificante del gen *VANGL2*, generando un cambio sinónimo del aminoácido glicina (Gly o G) en la posición aminoacídica 445, para el rs17380127, y prolina (Pro o P) en la posición aminoacídica 467 para el rs17380141, de la proteína *VANGL2*. Ambos residuos Gly445 y Pro467 se localizan cerca del extremo carboxilo en el lado citoplásmico del cuarto dominio transmembrana de *VANGL2*. Estas sustituciones Gly-Gly y Pro-Pro son un cambio químico conservador, observados en muchos ortólogos de vertebrados. De los 29 pacientes que portaban las variantes génicas, 23 presentaban el alelo C o A (40%), mientras los 6 restantes presentaban CC o AA (10%), para los rs17380127 y rs17380141 respectivamente. El análisis de las muestras control mostró, en ambos casos, que dichos polimorfismos se encontraban en 28/66 muestras (42%), mientras que encontrábamos 2/66 muestras con el alelo en homocigosis (3%; Ver Tabla 19).

Los polimorfismos encontrados en el exón 6 y 7 de la región codificante de *VANGL2* no tenían relevancia funcional aparente. Además, los polimorfismos identificados ocurren en una frecuencia similar en los pacientes con LMMC y en controles. Tras realizar un estudio de asociación con los tres polimorfismos, rs12086448:A>G (p.Lys379Lys), rs17380127:A>C (p.Gly445Gly) y rs17380141:G>A (p.Pro467Prol), pudimos comprobar que existía una asociación entre los dos sSNP encontrados en el exón 7. Los rs17380127 y rs17380141 estaban asociados, de manera que ambos aparecían o estaban ausentes en las mismas muestras.

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas o genotípicas entre el grupo pacientes y el control ($p>0.05$), consistente con estudios previos (Kibar 2011).

	Crom.	Alelo de referencia	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Frecuencia en pacientes	Frecuencia en controles	Predicción
Exón 6 Altamente conservado							
rs12086448	1	A	p. Lys379Lys	c.1134A>G	A: 26% (15/58) G: 48% (28/58) GG:26%(15/58)	A: 29% (19/66) G: 51% (34/66) GG: 20% (13/66)	Codifica el mismo aminoácido
Exón 7							
rs17380127	1	A	p. Gly445Gly	c.1335A>C	A: 50% (29/58) C: 40 % (23/58) CC: 10% (6/58)	A: 55% (36/66) C: 42% (28/66) CC: 3% (2/66)	Codifica el mismo aminoácido
rs17380141	1	G	p. Pro467Pro	c.1401G>A	G: 50% (29/58) A: 40 % (23/58) AA: 10% (6/58)	G: 55% (36/66) A: 42% (28/66) AA: 3% (2/66)	Codifica el mismo aminoácido

Tabla 19. sSNP encontrados tras el estudio de los exones codificantes, su frecuencia, así como información sobre el cambio de aminoácido en VANGL2.

3.3.2 Análisis de la patogenicidad de las variantes de secuencia

Efecto patogénico de las variantes encontradas sobre la función de la proteína

El estudio de los sSNP, en base a un posible efecto patogénico sobre la estructura o función de VANGL2, no mostró resultados ya que ninguno provocaba cambio de aminoácido. El estudio se llevó a cabo usando los programas: PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*; <http://sift.jevl.org/>) y SNPs3D (<http://snps3d.org/>).

Alteración del splicing

La regulación del *splicing* es un mecanismo de control de la expresión génica que permite la generación de diversidad transcriptómica, y por tanto proteómica, lo que juega un papel esencial en muchos procesos biológicos, como el desarrollo embrionario y el crecimiento celular. Los procesos de *splicing* están modulados de acuerdo al tipo celular, el estado de desarrollo o en respuesta a estímulos externos (Hagiwara 2005). Por lo tanto, el conocimiento del *splicing* alternativo y su regulación es necesario para la comprensión de la expresión génica en diferentes tejidos y especies.

Los sSNP encontrados en la región codificante de *VANGL2* se encontraban lejos de los posibles sitios de *splicing*, por lo que el estudio de alteración de este mecanismo no mostró aparición de nuevos sitios aceptores o donadores de *splicing* (según <http://www.fruitfly.org/>).

3.3.3 Secuenciación de zonas reguladoras: promotor del gen *VANGL2*

Existen secuencias reguladoras que están localizadas en el ADN no codificante de los genes, las cuales controlan su expresión. Estas secuencias son regiones abiertas del genoma a las que se pueden unir factores de transcripción (TNFs) para regular los niveles de transcripción del gen. Así, las variaciones en estas regiones reguladoras constituyen una fuente de variación. Se realizó un estudio de elementos reguladores en el gen *VANGL2*, analizando las marcas de acetilación de la lisina 27 de la histona (H3K27ac), que se asocia a elementos reguladores activos, localizados en regiones abiertas del genoma (Shlyueva 2014). Estas marcas fueron determinadas anteriormente en estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)-Seq en líneas celulares humanas (Bernstein 2006; Mikkelsen 2007) donde se identificaron 7 regiones que estaban conservadas entre especies de vertebrados, que eran activas en etapas tempranas del desarrollo, lo que sugería que podían estar actuando como reguladores del gen.

Tras el estudio de estas zonas mediante UCSC *Genome browser*, nos centramos en una zona correspondiente al promotor del gen *VANGL2*.

Secuenciación del promotor

El estudio de la zona promotor en los pacientes y controles reveló cinco polimorfismos. Encontramos tres rSNP descritos: rs11582932, rs11265385, y rs115492172, y dos variantes sin identificar localizados en el chr1:160400441 y chr1:160400555 (Ver Tabla 20). Tras el estudio se observó una asociación de los polimorfismos rs11582932 y rs11265385, ya que aparecían de manera simultánea en las mismas muestras. De los polimorfismos encontrados, solo las localizadas en el chr1:160400441 y chr1:160400555 eran exclusivas de pacientes, apareciendo en heterocigosis en 1/58 (1,7%) y 3/58 (5,2%) respectivamente, comparando con los controles 0/66 (0%) en cada caso (Tabla 20).

Polimorfismos	Alelo de referencia	Frecuencia en pacientes	Controles separados
Región promotora			
rs11582932	T	T: (22/58) 37,9%; G: (32/58) 55,2%; GG: (4/58) 6,9%	T: (34/66) 51,5%; G: (29/66) 43,9%; GG: (3/66) 4,5%
rs11265385	T	T: (22/58) 37,9%; G: (32/58) 55,2%; GG: (4/58) 6,9%	T: (34/66) 51,5%; G: (29/66) 43,9%; GG: (3/66) 4,5%
rs115492172	G	G: (56/58) 96,6%; C: (2/58) 3,4%; CC: (0/58) 0%	G: (63/66) 95,5%; C: (3/66) 4,5%; CC: (0/66) 0%
chr1:160400441	A	A: (57/58) 98,36%; G: (1/58) 1,7%; GG: (0/58) 0%	A: (66/66) 100%; G: (0/66) 0%; GG: (0/66) 0%
chr1:160400555	C	C: (57/58) 94,8%; A: (3/58) 5,2%; AA: (0/58) 0%	C: (66/66) 100%; A: (0/66) 0%; AA: (0/66) 0%

Tabla 20. Muestra los distintos polimorfismos encontrados en el promotor y sus frecuencias en nuestros análisis de secuenciación. En negro la frecuencia del alelo normal, en naranja la frecuencia del alelo mutante y en rojo la frecuencia del alelo en homocigosis.

Estudio de unión de TNFs

El estudio predictivo de alteración de sitios de unión de TNFs en la secuencia promotora del gen *VANGL2* en humano, según presente el alelo silvestre o mutado, está indicado en la Tabla 21. El análisis se llevó a cabo *in silico* mediante PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) teniendo en cuenta las 10 pb antes y después del polimorfismo correspondiente en cada caso, anotando los TNFs que se unen o no con la base del polimorfismo.

Humano	Sin polimorfismo	Con polimorfismo
rs11582932	VDR [T00885] RXR-alpha [T01345] FOXP3 [T04280] RAR-beta [T00721] PXR-1:RXR-alpha [T05671]	c-Jun [T00133] ER-alpha [T00261] RXR-alpha [T01345] RAR-alpha1 [T00719] ATF3 [T01313]
rs11265385	T3R-beta1 [T00851]	TFII-I [T00824] PEA3 [T00685] MAZ [T00490]
rs115492172	C/EBPbeta [T00581] NF-1 [T00539] E2F-1 [T01542] GR-alpha [T00337] NFI/CTF [T00094]	E2F-1 [T01542] GR-alpha [T00337]
chr1:160400441	GR-beta [T01920] YY1 [T00915] C/EBPbeta [T00581] C/EBPalpha [T00105]	-
chr1:160400555	TFII-I [T00824] Pax-5 [T00070] P53 [T00671] Sp1 [T00759] WT1 [T00899] ETF [T00270] MAZ [T00490]	MAZ [T00490] ENKTF-1 [T00255]

Tabla 21. TNFs que dejaban de unirse (marcados en rojo), se mantenían (marcados en azul) o se unían *de novo* (marcados en verde).

Como ejemplo se muestra el estudio con el polimorfismo no descrito chr1:160400555:

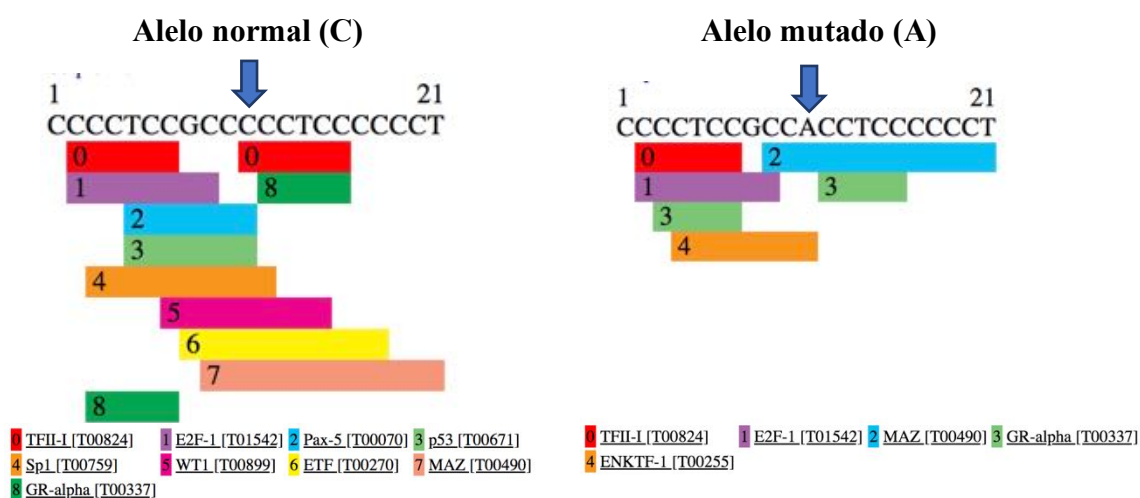


Figura 57. TNFs de unión a la zona de estudio para el polimorfismo no descrito chr1:160400555 con el alelo normal (C) o mutado (A). Imagen obtenida mediante mediante PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3).

3.3.4 Estudio de relación de polimorfismos y combinaciones de riesgo

Relación de las mutaciones en la región codificante

En los pacientes encontramos una tendencia a presentar **homocigosis** para el rs12086448 y **heterocigosis** para los rs17380127 y rs17380141. Esta tendencia se presenta en **9/58 en pacientes vs 7/66 en controles** (Tabla 22; *). Otra tendencia sería presentar homocigosis en los tres rsSNP: rs12086448, rs17380127 y rs17380141; tendencia que se da en 5/58 en pacientes vs 2/66 en controles (Tabla 22; **).

Así **14/58 pacientes** presentaban los rsSNP rs12086448, rs17380127 y rs17380141 frente a **9/66 en controles**. Aún así, los datos no muestran que ninguna de las variantes en la región codificante sea un factor de riesgo para sufrir la enfermedad.

Relación de las mutaciones en la región codificante y el promotor

El factor de riesgo tiende a encontrarse en aquellos pacientes con estas tres condiciones:

- **HET/HOM** para el rs12086448 del exón 6
- **HOM** para los rsSNP rs17380127 y rs17380141 del exón 7
- **HET** para los rsSNP rs11582932 y rs11265385 del promotor

En nuestro estudio **3/58 pacientes** con LMMC vs **0/66 controles** tienen esta condición (Tabla 22).

Exon 6	Exon 7	Promotor	Frecuencia de aparición	
	Asociadas	Asociadas		
rs12086448	rs17380127 rs17380141	rs11582932 rs11265385	Pacientes	Controles
+/+	+/+	+/+	8/58	15/66
		+/-	4/58	0/66
		-/-	0/58	2/66
	+/-	+/+	0/58	2/66
		+/-	1/58	0/66
		-/-	2/58	0/66
	-/-	+/+	0/58	0/66
		+/-	0/58	0/66
		-/-	0/58	0/66
+/-	+/+	+/+	8/58	7/66
		+/-	8/58	8/66
		-/-	0/58	0/66
	+/-	+/+	0/58	6/66
		+/-	11/58	11/66
		-/-	0/58	2/66
	-/-	+/+	0/58	0/66
		+/-	1/58	0/66
		-/-	0/58	0/66
-/-	+/+	+/+	1/58	1/66
		+/-	0/58	3/66
		-/-	0/58	0/66
	+/-	+/+	4/58*	2/66*
		+/-	5/58*	5/66*
		-/-	0/58	0/66
	-/-	+/+	1/58**	1/66**
		+/-	2/58**	0/66**
		-/-	2/58**	1/66**

Tabla 22. Frecuencia de aparición de las distintas asociaciones entre los sSNP encontrados en la región codificante de *VANGL2*: rs12086448 (Exón 6), rs17380127 y rs17380141 (Exón 7); y los rSNP en la zona promotor: rs11582932 y rs11265385. Frecuencias de aparición de cada asociación. (+/+): Silvestre; (+/-): Heterocigosis; (-/-): Homocigosis; Factor de riesgo (rojo).

Tras el estudio del rSNP rs115492172, observado en **2/58 pacientes vs 3/6 controles**, y las variantes no descritas en el cromosoma 1 (chr1:160400441 y chr1:160400555) encontrados en el promotor, podemos observar como estas dos últimas son variantes exclusivas de pacientes (Tablas 4.13 y 4.14).

chr1:160400441

La variante en el chr1:160400441 aparece en **1/58 pacientes** secuenciados, mientras no aparece en los **controles 0/66**. El paciente que porta esta variante presenta (Paciente A; Tabla 24):

Paciente A

- **HET** para los sSNP rs17380127 y rs17380141 del exón 7
- **HOM** para los rSNP rs11582932 y rs11265385 del promotor
- **HET** para el rs115492172 del promotor
- **HET** para la variante chr1:160400441, no descrita
- **HET** para la variante chr1:160400555, no descrita

chr1:160400555

Esta última variante en el chr1:160400555, aparece en **3/58 pacientes** secuenciados, mientras no aparece en **controles 0/66**. La variante, además de aparecer en el caso del paciente señalado anteriormente (Paciente A; Tabla 24), se presenta en otros dos pacientes (Paciente B, que solo presenta esta variante; Tabla 24) y Paciente C (Tabla 14):

Paciente B

- **HET** para la variante chr1:160400555, no descrita

Paciente C

- **HET** para el rs12086448 del exón 6
- **HET** para los rSNP rs11582932 y rs11265385 del promotor
- **HET** para el rs115492172 del promotor
- **HET** para la variante chr1:160400555, no descrita

Con el fin de analizar la historia familiar y el posible carácter hereditario de las anomalías genéticas observadas se incluyó el análisis genético de los progenitores de los **pacientes B y C**, con mutación exclusiva en el **chr1:160400555**. Se observó como la mutación era exclusiva de pacientes afectados con LMMC y no se encontraba en sus progenitores, por lo que aparecía *de novo*.

Controles

Exón 6	Exón 7	Promotor				
		Asociadas	Asociadas	Controles		
rs12086448	rs17380127 rs17380141	rs11582932 rs11265385	Frecuencia	rs115492172 +/-	chr1:160400441 +/-	chr1:160400555 +/-
+/+	+/+	+/+	15/66	/	/	/
+/+	+/-	-/-	0/66	/	/	/
+/-	+/+	+/-	8/66	/	/	/
+/-	+/-	+/-	11/66	1/66***	/	/
-/-	+/+	+/-	3/66	2/66****	/	/

Tabla 23. Frecuencia de aparición en controles de las distintas asociaciones entre los sSNP y rSNP encontrados en la Tabla 22 y los rSNP: rs115492172 y chr1: 160400441, chr1:160400555. (+/+): Silvestre; (+/-): Heterocigosis; (-/-): Homocigosis

Pacientes

Exón 6	Exón 7	Promotor				
		Asociadas	Asociadas	Pacientes		
rs12086448	rs17380127 rs17380141	rs11582932 rs11265385	Frecuencia	rs115492172 +/-	chr1:160400441 +/-	chr1:160400555 +/-
+/+	+/+	+/+	8/58	/	/	1/58 [^] Paciente B
+/+	+/-	-/-	2/58	1/58*	1/58* Paciente A	1/58 [^] Paciente A
+/-	+/+	+/-	8/58	1/58**	/	1/58* Paciente C
+/-	+/-	+/-	11/58	/	/	/
-/-	+/+	+/-	0/58	/	/	/

Tabla 24. Frecuencia de aparición en pacientes de las distintas asociaciones entre los SNPs analizados en Tabla 22 y los rSNP: rs115492172 y chr1: 160400441, chr1:160400555. (+/+): Silvestre; (+/-): Heterocigosis; (-/-): Homocigosis

3.4 Discusión

Como ya sabemos, el modelo de ratón *Looptail*, mutado en *Vangl2*, presenta espina bífida en heterocigosis y craneorraquiscasis en homocigosis. Además, mutaciones en otro miembro de la familia, *VANGLI1*, se asocian con DTN espinales en humanos (Kibar 2001; Murdoch 2001). Los datos de Kibar, en un conjunto de pacientes con DTN espinales, confirmaban una importante contribución de los genes de la vía Wnt-PCP en la patogénesis de los DTN en humanos. Teniendo en cuenta estos datos genéticos, que demostraban la importancia de *VANGL2* en la aparición de DTN, decidimos analizar el papel de su gen en pacientes con LMMC, para evaluar la frecuencia y el tipo de mutaciones, comparados con individuos control no afectados.

Identificación de variantes dentro de la secuencia de VANGL2 en pacientes con LMMC

En el presente trabajo se ha realizado un primer análisis mutacional de la secuencia codificante de *VANGL2* en el contexto de LMMC, el cual reveló la presencia de tres mutaciones silenciosas, las cuales no mostraban efecto patogénico sobre la estructura o función de *VANGL2* según herramientas bioinformáticas (p.Lys379Lys, p.Gly445Gly, p.Pro467Pro). Estas variantes, previamente descritas (Kibar 2011), se encontraban también en el grupo de controles analizados y podríamos definir las como sSNP. Las tres variantes se localizaban cerca del extremo carboxilo en el lado citoplasmático del cuarto dominio transmembrana de *VANGL2*, donde encontramos un motivo de unión al dominio PDZ involucrado en la interacción proteína-proteína (Torban 2004). A pesar de que los 3 polimorfismos no muestren cambio de aminoácido ni efecto patogénico, la asociación de estos podría producir cambios en la estructura de la proteína, provocando alteraciones en la unión con otras proteínas, afectando al proceso de señalización. Estas 3 mutaciones sin sentido en *VANGL2* representan alelos de baja penetrancia que deben interactuar con otros genes y factores ambientales para modular la incidencia y gravedad de los DTN. Actualmente se acepta que la aparición de un fenotipo no depende solo de mutaciones “raras” con efecto funcional y elevada penetrancia, sino también de variaciones “comunes” y con baja penetrancia que en combinación serán responsables de la enfermedad (Duarte 2013). Los resultados obtenidos tras el análisis mutacional apoyan el modelo aditivo de herencia, en el que contribuyen distintos genes que actúan de forma

multiplicativa modulando la penetrancia de otras mutaciones o la expresión de la enfermedad en aquellos individuos afectados. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio con mutantes de la vía Wnt-PCP (mutantes *Daam1*) y vía del ácido fólico (mutantes *Folr1* y *Mthfr*), en combinación con diabetes materna, la cual provoca defectos en el desarrollo, demostraron que un ambiente materno de diabetes producía una desregulación de estas vías, afectando a la expresión de sus componentes (López-Escobar 2015; López-Escobar 2019; Pavlinkova 2011). Nuestros estudios sobre la posible implicación de la vía Wnt-PCP en el desarrollo del ojo mostraba como los mutantes de esta vía presentaban defectos oculares, similares a los defectos de embriones de madres diabéticas, y que estos mutantes expuestos a diabetes aumentaban el número y severidad de las embriopatías estudiadas. Esto permitía concluir que la diabetes alteraba la vía Wnt-PCP y, por tanto, el desarrollo del ojo (Pavlinkova 2011). Este aumento en el porcentaje de defectos, respecto a los mutantes de la vía del ácido fólico, se observaba también en el estudio de interacción de esta vía con la diabetes materna, señalando la importancia de este factor materno en la expresión de *Folr1* (López-Escobar 2019). Esto señala una clara implicación del factor ambiental en el desarrollo de embriopatías, por lo que sería interesante estudiar los posibles factores maternos en aquellos embarazos de los pacientes con mutaciones silenciosas (sSNP), analizando si las madres habían estado expuestas a algún fármaco, diabetes materna o epilepsias durante el embarazo.

Las mutaciones silenciosas o SNPs (es decir, polimorfismos de un solo nucleótido que no afectan la secuencia de aminoácidos) no producen alteración en la secuencia codificante y, por tanto, no se espera que cambien la función de la proteína en la que se encuentran. Se ha confirmado que las mutaciones silenciosas que ocurren naturalmente pueden tener efecto sobre las proteínas, afectando a su plegamiento, junto con otros efectos conocidos (Rauscher 2018). Por ejemplo, pueden cambiar la forma o velocidad en que el ARN se corta y empalma, afectando la expresión y función de la proteína en cuestión. El equipo dirigido por Francisco Baralle demostró que un elevado número de mutaciones silenciosas en CFTR, gen responsable de la enfermedad pulmonar de la fibrosis quística en humanos, pueden causar cambios en el *splicing*, dando como resultado la omisión del exón, lo que inactiva la proteína en cuestión (Pagani 2005). Las mutaciones que alteran la estructura primaria de una proteína pueden afectar estas propiedades, pero se conoce que las mutaciones silenciosas también pueden tener un papel relevante. Así, las mutaciones silenciosas con funciones importantes podrían estar dispersas por el

genoma humano (Pearson 2006). Existen estudios que aportan información sobre el efecto de estos SNPs en varios ámbitos, donde el uso de codones para la síntesis de proteínas no es aleatorio (Kimchi-Sarfaty 2007; Bercovitch 2004; Supek 2005; Sharp 1987). Los codones sinónimos, respecto a la síntesis de un determinado aminoácido, no se usan con la misma frecuencia. Existe una presión selectiva que favorece los codones más comunes con el objetivo de mejorar la velocidad y la fidelidad de la traducción (Clarke 2008). Cuando estos codones comunes se cambian a codones raros, usados con menor frecuencia para la síntesis de un determinado aminoácido, se puede ver afectado el momento de plegamiento cotraduccional. Este tipo de plegamiento, que ocurre en proteínas con varios dominios de plegamientos secuenciales (Anthony 2005), puede dar lugar a una función alterada de la proteína en cuestión. Este hecho puede tener importancia clínica. Un ejemplo de ello es el sSNP C3435T, ubicado en el exón 26 del gen de multirresistencia a drogas (MDR1), que daba lugar a una actividad alterada y a una funcionalidad reducida de la glucoproteína-P (P-gp), una proteína de transporte de membrana de mamífero, producto de MDR1. Esta mutación silenciosa alteraba la especificidad de la P-gp por el sustrato, alterando la interacción con fármacos e inhibidores. La P-gp contribuye a la farmacocinética y multirresistencia a drogas de las células cancerosas. El sSNP daba lugar a una conformación alterada de la P-gp, afectando el plegamiento cotraduccional y la inserción de P-gp en la membrana, alterando así la estructura de los sitios de interacción de sustrato e inhibidor (Kimchi-Sarfaty 2007).

El análisis de los rSNP encontrados en la zona promotor (rs11582932, rs11265385 y rs115492172) mostraba una asociación de los polimorfismos rs11582932 y rs11265385. Estas mutaciones asociadas presentaban un factor de riesgo en **heterocigosis** cuando se encontraban en pacientes con **heterocigosis/homocigosis** de la mutación rs12086448 del exón 6 y **homocigosis** de la rs17380127 y rs17380141 en el exón 7, ya que la condición era exclusiva de 3 de los pacientes analizados, estando ausente en controles. Las mutaciones silenciosas encontradas en *VANGL2* podrían estar actuando sobre el plegamiento de la proteína, provocando efectos que serían objeto de estudio. Estos SNPs podrían estar afectando la interacción proteína-proteína, así como la localización asimétrica de *VANGL2* entre los límites célula-célula. Esta localización podríamos estudiarla transfectando células que expresen *VANGL2*, como células de neuroblastoma IMR-32, con un vector que contenga el gen mutado en los SNPs de estudio más GFP y comprobando si alguno de los SNPs afectaba la localización subcelular de la proteína,

perdiendo su asimetría. Los SNPs también podrían estar afectando la señal de la vía Wnt-PCP, lo que podríamos estudiar mediante una transfección con un plásmido reportero AP1 (pAP1-Luc), usado para medir la activación de Rho-GTPasas por Wnt5a, un efector *downstream* de la señalización de la vía Wnt-PCP, donde realizaríamos ensayos de indicador de luciferasa (Chen 2018, Zhu 2018). Cabe destacar que los pacientes presentaban una tendencia a presentar las tres mutaciones de estudio rs12086448, rs17380127 y rs17380141 en homocigosis, o la rs12086448 en homocigosis y rs17380127, rs17380141 en heterocigosis, por lo que podríamos pensar que, aunque no se esté causando un cambio de aminoácido, la situación de homocigosidad o heterocigosidad de estas mutaciones en la zona codificante estaría relacionada de alguna manera con el defecto neural en los pacientes.

No solo distintos genes pueden actuar en conjunto, sino que la expresión de la enfermedad puede verse modulada por la contribución de mutaciones en la zona promotor del gen. El estudio de acetilación de H3K27ac mediante UCSC *Genome browser* nos llevó a centrarnos en una zona concreta del promotor del gen *VANGL2*. Las variantes sin identificar localizadas en el chr1:160400441 y chr1:160400555, exclusivas de pacientes, aparecían en **heterocigosis** en 1/58 (1,7%) y 3/58 (5,2%) respectivamente. Cabe destacar que el **paciente B** solo presenta **heterocigosis** de la mutación chr1:160400555 en la zona promotor, sin señal alguna del resto de mutaciones analizadas en este estudio, tanto en la zona codificante como en la zona promotor, por lo que podríamos señalarla como un factor de riesgo para la aparición del LMMC. La mutación en chr1:160400555 podríamos datarla como una variante *novel*, ya que aparecen por primera vez en el paciente, no está en sus progenitores y no está descrita en ninguna base de datos. Estos resultados, junto con futuros estudios de funcionalidad en la regulación del gen *VANGL2*, permitirían realizar un consejo genético y un diagnóstico precoz intraútero. Podríamos pensar que la aparición o no de las distintas mutaciones encontradas en nuestro estudio estaría relacionada con el tipo de lipoma que aparece en cada caso. Sería interesante hacer una clasificación por tipos de lipomas y tejidos afectados en cada paciente, para poder establecer una posible relación con el tipo de mutación. Habría que realizar un análisis de las muestras quirúrgicas y describir el espectro de cambios histológicos que ocurren y, tras contrastar la información con el departamento de histopatología, correlacionar la histología con el tipo anatómico de lipoma, con el fin de determinar los distintos subtipos histológicos.

Respecto a ideas de futuro, que ya se están llevando a cabo por el grupo de P. Ybot, podríamos hacer un estudio en líneas celulares humanas IMR-32 que expresen *VANGL2*. Para ellos creamos un vector al que insertamos la región del promotor humano completo y al cual añadimos un *reporter gene* (red tomato), lo que nos permitiría hacer un estudio de expresión. Este vector se transfectaría en líneas celulares humanas que expresen *VANGL2*, lo que permitiría la validación de los constructos en las células transfectadas. Tras su validación se podrá utilizar para probar la actividad de las regiones reguladoras de los pacientes. Se podría hacer un estudio en líneas celulares humanas que expresen *VANGL2*, mediante técnicas como Chip-seq, RNA-Seq, *Topologically associating domains* o estudios de proteómica.

General conclusions

General conclusions

Wnt-PCP signalling, via Vangl2, facilitate the PNT folding by a combination of complex mechanisms involving pulses of apical actomyosin contraction and planar polarised cell rearrangements.

Disrupted PCP-Wnt signalling affects neural fold morphology, inducing aberrant bending that separates the dorsal tips of the neural folds and impedes correct caudal NT closure, inducing spina bifida.

The gap between neural folds in the *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos induce an abnormal migration of NCCs, forming cellular aggregates.

The failure of the NT closure in the *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos activates the wound healing process, easing the dorsal sealling by the surface ectoderm.

The combination of neural plate stretching caused by *Grhl3* mutation together with the outward flexure observed in *Vangl2*^{+/*Lp*} leads to a higher incidence of fusion failures, evidenced by a higher rate of cellular aggregates in double *Vangl2*^{+/*Lp*} / *Grhl3*^{+/*Ct*} mutants.

The cells of the aggregate resulting from EMT may be the origin of preadipocytes, making *Vangl2* a mouse model for the study of the origin of LMMC.

De novo mutations in the promoter zone and the association of common mutations in the coding zone of *VANGL2* gen found in patients with LMMC indicate the importance of the Wnt-PCP pathway in this pathology.

Bibliografía

Bibliografía

- Andersson, E.R., Lenka B., Kristin B., Terry P.Y., Ernest A. and Vitezslav B. 2010. “Genetic Interaction between Lrp6 and Wnt5a during Mouse Development.” *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (1): 237–45. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22101>.
- Anthony, V., and Skach W.R.. 2005. “Molecular Mechanism of P-Glycoprotein Assembly into Cellular Membranes.” *Current Protein & Peptide Science* 3 (5): 485–501. <https://doi.org/10.2174/1389203023380503>.
- Ardekani, A.M., and Mozhgan, M.N.. 2010. “The Role of MicroRNAs in Human Diseases.” *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*.
- Arkell, R.M., and Tam P.P.L.. 2012. “Initiating Head Development in Mouse Embryos: Integrating Signalling and Transcriptional Activity.” *Open Biology*. <https://doi.org/10.1098/rsob.120030>.
- Attisano, L., and Wrana J.L.. 2002. “Signal Transduction by the TGF- β Superfamily.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1071809>.
- Baker, P.C., and Schroeder T.E.. 1967. “Cytoplasmic Filaments and Morphogenetic Movement in the Amphibian Neural Tube.” *Developmental Biology* 15 (5): 432–50. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(67\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(67)90036-X).
- Baron, R., and Kneissel M.. 2013. “WNT Signaling in Bone Homeostasis and Disease: From Human Mutations to Treatments.” *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3074>.
- Barrio, M.G., and Nieto M.A.. 2002. “Overexpression of Snail Family Members Highlights Their Ability to Promote Chick Neural Crest Formation.” *Development (Cambridge, England)*.
- Bassuk, A.G., and Kibar Z.. 2009. “Genetic Basis of Neural Tube Defects.” *Seminars in Pediatric Neurology* 16 (3): 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.spn.2009.06.001>.
- Begnaud, S., Chen T., Delacour D., Mège R-M., and Ladoux B.. 2016. “Mechanics of Epithelial Tissues during Gap Closure.” *Current Opinion in Cell Biology* 42 (9): 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.006>.
- Bercovitch, L., and Terry P.. 2004. “Pseudoxanthoma Elasticum 2004.” *Journal of the American Academy of Dermatology* 51 (1 SUPPL.): 13–14. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.01.015>.

- Berenice, A., Juarez C., Rosales-Reynoso M.A., and Barros-Nunez P.. 2012. “WNT-Beta-Catenin Signaling Pathway and Its Relationship with Cancer.” *Cirugia y Cirujanos* 80 (4): 362–70.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D., Cuff J., Fry B., et al. 2006. “A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Betancur, P., Bronner-Fraser M., and Sauka-Spengler T.. 2010. “Assembling Neural Crest Regulatory Circuits into a Gene Regulatory Network.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113245>.
- Billon, N., Iannarelli P., Caetano M., Glavieux-Pardanaud C., Richardson W., Kessar N., Dani C., and Dupin E.. 2007. “The Generation of Adipocytes by the Neural Crest.” *Development (Cambridge, England)* 134 (12): 2283–92.
<https://doi.org/10.1242/dev.002642>.
- Blankenship, J.T., Backovic S.T., Sanny J.S., Weitz O., and Zallen J.A.. 2006. “Multicellular Rosette Formation Links Planar Cell Polarity to Tissue Morphogenesis.” *Dev Cell* 11 (4): 459–70.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17011486.
- Britsch, S., Goerich D.E., Riethmacher D., Peirano R.I., Rossner M., Nave K.A., Birchmeier C., and Wegner M.. 2001. “The Transcription Factor Sox10 Is a Key Regulator of Peripheral Glial Development.” *Genes and Development*.
<https://doi.org/10.1101/gad.186601>.
- Bronner, M.E., and LeDouarin N.M.. 2012. “Development and Evolution of the Neural Crest: An Overview.” *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.042>.
- Brook, F. A., Shum A. S.W., Van Straaten H. W.M., and Copp A. J.. 1991. “Curvature of the Caudal Region Is Responsible for Failure of Neural Tube Closure in the Curly Tail (Ct) Mouse Embryo.” *Development*.
- Brouns, M.R., Matheson S.F., Hu K.Q., Delalle I., Caviness V.S., Silver J., Bronson R.T., and Settleman J.. 2000. “The Adhesion Signaling Molecule P190 RhoGAP Is Required for Morphogenetic Processes in Neural Development.” *Development* 127 (22): 4891–4903.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt>

=Citation&list_uids=11044403.

- Caddy, J., Wilanowski T., Darido C., Dworkin S., Ting S., Zhao Q., Rank G., et al. 2010. "Epidermal Wound Repair Is Regulated by the Planar Cell Polarity Signaling Pathway." *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.008>.
- Carlson, B.M. 2009. "Embriología Humana y Biología Del Desarrollo." *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. [https://doi.org/10.1016/S0304-5013\(09\)73057-2](https://doi.org/10.1016/S0304-5013(09)73057-2).
- Carreira, S., Goodall J., Denat L., Rodriguez M., Nuciforo P., Hoek K.S., Testori A., Larue L., and Goding C.R.. 2006. "Mitf Regulation of Dial Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness." *Genes and Development* 20 (24): 3426–39. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>.
- Carver, E.A., Jiang R., Lan Y., Oram K. F., and Gridley T.. 2001. "The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.23.8184-8188.2001>.
- Catala, M.. 1997. "Embryogenesis: Why Do We Need a New Explanation for the Emergence of Spina Bifida with Lipoma?" *Child's Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/s003810050092>.
- Chang, H., Brown C.W., and Matzuk M.M.. 2002. "Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily." *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0003>.
- Chen, Z., Lei Y., Cao X., Zheng Y., Wang F., Bao Y., Peng R., Finnell R.H., Zhang T., and Wang H.. 2018. "Genetic Analysis of Wnt/PCP Genes in Neural Tube Defects." *BMC Medical Genomics* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0355-9>.
- Cheung, M., Chaboissier M.C., Mynett A., Hirst E., Schedl A., and Briscoe J.. 2005. "The Transcriptional Control of Trunk Neural Crest Induction, Survival, and Delamination." *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.010>.
- Chi, H., Sarkisian M.R., Rakic P., and Flavell R.A.. 2005. "Loss of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 (MEKK4) Results in Enhanced Apoptosis and Defective Neural Tube Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (10): 3846–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500026102>.
- Chihara, K., Amano M., Nakamura N., Yano T., Shibata M., Tokui T., Ichikawa H., Ikebe R., Ikebe M., and Kaibuchi K.. 1997. "Cytoskeletal Rearrangements and Transcriptional Activation of C-Fos Serum Response Element by Rho-Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 272 (40): 25121–27.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25121>.
- Clarke IV, T.F., and Clark P.L.. 2008. "Rare Codons Cluster." *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003412>.
- Clay, M.R., and Halloran M.C.. 2010. "Control of Neural Crest Cell Behavior and Migration: Insights from Live Imaging." *Cell Adhesion and Migration*.
<https://doi.org/10.4161/cam.4.4.12902>.
- Copp, A.J., Brook F.A., and Roberts H.J.. 1988. "A Cell-Type-Specific Abnormality of Cell Proliferation in Mutant (Curly Tail) Mouse Embryos Developing Spinal Neural Tube Defects." *Development* 104 (2): 285–95.
- Copp, A.J., Checiu I., and Henson J.N.. 1994. "Developmental Basis of Severe Neural Tube Defects in the Loop-Tail (Lp) Mutant Mouse: Use of Microsatellite DNA Markers to Identify Embryonic Genotype." *Dev Biol* 165 (1): 20–29.
- Copp, A.J., and Greene N.D.E.. 2010. "Genetics and Development of Neural Tube Defects." *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.2643>.
- Copp, A.J., Greene N.D.E., and Murdoch J.N.. 2003. "The Genetic Basis of Mammalian Neurulation." *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg1181>.
- Copp, A.J., and Greene N.D.E.. 2013. "Neural Tube Defects-Disorders of Neurulation and Related Embryonic Processes." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1002/wdev.71>.
- Copp, A.J., Stanier P., and Greene N.D.E.. 2013. "Neural Tube Defects: Recent Advances, Unsolved Questions, and Controversies." *The Lancet Neurology*.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70110-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70110-8).
- Costa, P.M., and Pedroso De Lima M.C.. 2013. "MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression." *Pharmaceuticals* 6 (10): 1195–1220. <https://doi.org/10.3390/ph6101195>.
- Criley, B.B. 1969. "Analysis of the Embryonic Sources and Mechanisms of Development of Posterior Levels of Chick Neural Tubes." *Journal of Morphology* 128 (4): 465–501. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051280406>.
- Crompton, L.A., Roure C.D., and Rodriguez T.A.. 2007. "Early Embryonic Expression Patterns of the Mouse Flamingo and Prickle Orthologues." *Dev Dyn* 236 (11): 3137–43. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17937400.
- Curtin, J.A., Quint E., Tsipouri V., Arkell R.M., Cattnach B., Copp A.J., Henderson

- D.J., et al. 2003. "Mutation of *Celsr1* Disrupts Planar Polarity of Inner Ear Hair Cells and Causes Severe Neural Tube Defects in the Mouse." *Current Biology: CB* 13 (13): 1129–33. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00374-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00374-9).
- Dady, A., Havis E., Escriou V., Catala M., and Duband J.L.. 2014. "Junctional Neurulation: A Unique Developmental Program Shaping a Discrete Region of the Spinal Cord Highly Susceptible to Neural Tube Defects." *Journal of Neuroscience* 34 (39): 13208–21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1850-14.2014>.
- Davey, C.F., and Moens C.B.. 2017. "Planar Cell Polarity in Moving Cells: Think Globally, Act Locally." <https://doi.org/10.1242/dev.122804>.
- De Castro, S.C.P., Hirst C.S., Savery D., Rolo A., Lickert H., Andersen B., Copp A.J., and Greene N.D.E.. 2018. "Neural Tube Closure Depends on Expression of Grainyhead-like 3 in Multiple Tissues." *Developmental Biology* 435 (2): 130–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.016>.
- De Castro, S.C.P., Gustavsson P., Marshall A.R., Gordon W.M., Galea G., Nikolopoulou E., Savery D., et al. 2018. "Overexpression of Grainyhead-like 3 Causes Spina Bifida and Interacts Genetically with Mutant Alleles of *Grhl2* and *Vangl2* in Mice." *Human Molecular Genetics*, September. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy313>.
- Donkelaar, H.J.T., Bekker M., Renier W.O., Hori A., and Shiota K.. 2014. "Neurulation and Neural Tube Defects." In *Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54687-7_4.
- Doudney, K., and Stanier P.. 2005. "Epithelial Cell Polarity Genes Are Required for Neural Tube Closure." In *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30052>.
- Duarte, C.W., Vaughan L.K., Beasley T.M., and Tiwari H.K.. 2013. "Multifactorial Inheritance and Complex Diseases." In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 1–15. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00014-8>.
- Duband, J.. 2006. "Neural Crest Delamination and Migration: Integrating Regulations of Cell Interactions, Locomotion, Survival and Fate." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 589: 45–77. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_4.
- Dunnen, J.T.D., and Antonarakis E.. 2001. "Nomenclature for the Description of Human Sequence Variations." *Human Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s004390100505>.

- Dworkin, S., Jane S.M., and Darido C.. 2011. “The Planar Cell Polarity Pathway in Vertebrate Epidermal Development, Homeostasis and Repair.” *Organogenesis* 7 (3): 202–8. <https://doi.org/10.4161/org.7.3.18431>.
- Escuin, S., Vernay B., Savery D., Gurniak C.B., Witke W., Greene N.D., and Copp A.J.. 2015. “Rho-Kinase-Dependent Actin Turnover and Actomyosin Disassembly Are Necessary for Mouse Spinal Neural Tube Closure.” *J Cell Sci* 128 (14): 2468–81.
- Etienne-Manneville, S., and Hall A.. 2002. “Rho GTPases in Cell Biology.” *Nature* 420 (6916): 629–35. <https://doi.org/10.1038/nature01148>.
- Fanto, M., and McNeill H.. 2004. “Planar Polarity from Flies to Vertebrates.” *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.00973>.
- Ferrer-Vaquer, A., Viotti M., and Hadjantonakis A.K.. 2010. “Transitions between Epithelial and Mesenchymal States and the Morphogenesis of the Early Mouse Embryo.” *Cell Adhesion and Migration*. <https://doi.org/10.4161/cam.4.3.12000>.
- Galea, G.L., Cho Y.J., Galea G., Mole M.A., Rolo A., Savery D., Moulding D., et al. 2017. “Biomechanical Coupling Facilitates Spinal Neural Tube Closure in Mouse Embryos.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (26): E5177–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700934114>.
- Garriock, R.J., Chalamalasetty R.B., Kennedy M.W., Canizales L.C., Lewandoski, M. and Yamaguchi T.P.. 2015. “Lineage Tracing of Neuromesodermal Progenitors Reveals Novel Wnt-Dependent Roles in Trunk Progenitor Cell Maintenance and Differentiation.” *Development* 142 (9): 1628–38.
- Gavin, B.J., McMahon J.A., and McMahon A.P.. 1990. “Expression of Multiple Novel Wnt-1/Int-1-Related Genes during Fetal and Adult Mouse Development.” *Genes Dev* 4 (12B): 2319–32.
- Ge Y., Pan S., Guan D., Yin H., Fan Y., Liu J., Zhang S., et al. 2013. “MicroRNA-350 Induces Pathological Heart Hypertrophy by Repressing Both P38 and JNK Pathways.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1832 (1): 1–10.
- Gilbert, S.F.. 2000. *Developmental Biology. 6th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 6th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.* <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.68.094404>.
- Gokey, N.G., Srinivasan R., Lopez-Anido C., Krueger C., and Svaren J.. 2012. “Developmental Regulation of MicroRNA Expression in Schwann Cells.” *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.06270-11>.

- Gómez-Skarmeta, J.L., Campuzano S., and Modolell J.. 2003. "Half a Century of Neural Patterning: The Story of a Few Bristles and Many Genes." *Nature Reviews Neuroscience* 4 (7): 587–98. <https://doi.org/10.1038/nrn1142>.
- Goode, B.L., and Eck M.J.. 2007. "Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly." *Annual Review of Biochemistry* 76: 593–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>.
- Goto, T., and Keller R.. 2002. "The Planar Cell Polarity Gene Strabismus Regulates Convergence and Extension and Neural Fold Closure in *Xenopus*." *Dev Biol* 247 (1): 165–81.
- Greene, N.D.E., Gerrelli D., Van Straaten H.W., and Copp A.J.. 1998. "Abnormalities of Floor Plate, Notochord and Somite Differentiation in the Loop-Tail (Lp) Mouse: A Model of Severe Neural Tube Defects." *Mechanisms of Development* 73 (1): 59–72.
- Greene, N.D.E., and Copp A.J.. 2009. "Development of the Vertebrate Central Nervous System: Formation of the Neural Tube." *Prenatal Diagnosis*. <https://doi.org/10.1002/pd.2206>.
- Grego-Bessa, J., Hildebrand J., and Anderson K.V.. 2015. "Morphogenesis of the Mouse Neural Plate Depends on Distinct Roles of Cofilin 1 in Apical and Basal Epithelial Domains." *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.115493>.
- Gritsman, K., Zhang J., Cheng S., Heckscher E., Talbot W.S., and Schier A.F.. 1999. "The EGF-CFC Protein One-Eyed Pinhead Is Essential for Nodal Signaling." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80720-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80720-5).
- Ha, T.. 2011. "MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease." *Immune Network*. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.3.135>.
- Habas, R., Dawid I.B., and He X.. 2003. "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled Signaling Is Required for Vertebrate Gastrulation." *Genes Dev* 17 (2): 295–309.
- Habas, R., Kato Y., and He X.. 2001. "Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1." *Cell* 107 (7): 843–54. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00614-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00614-6).
- Hagiwara, M.. 2005. "Alternative Splicing: A New Drug Target of the Post-Genome Era." *Biochimica et Biophysica Acta* 1754 (1–2): 324–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.09.010>.
- Halloran, M.C., and Jason D.B. 2003. "Current Progress in Neural Crest Cell Motility and Migration and Future Prospects for the Zebrafish Model System." *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10374>.

- Hamill, K.J., Kligys K., Hopkinson S.B., and Jones J.C.R.. 2009. "Laminin Deposition in the Extracellular Matrix: A Complex Picture Emerges." *Journal of Cell Science* 122 (24): 4409–17. <https://doi.org/10.1242/jcs.041095>.
- Harding, M.J., McGraw H.F., and Nechiporuk A.. 2014. "The Roles and Regulation of Multicellular Rosette Structures during Morphogenesis." *Development* 141 (13): 2549–58.
- Harris, M.J., and Juriloff D.M.. 2007. "Mouse Mutants with Neural Tube Closure Defects and Their Role in Understanding Human Neural Tube Defects." *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*. <https://doi.org/10.1002/bdra.20333>.
- Hatta, K., Takagi S., Fujisawa H., and Takeichi M. 1987. "Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos." 227: 215–27.
- Hayes, P., and Solon J.. 2017. "Drosophila Dorsal Closure: An Orchestra of Forces to Zip Shut the Embryo." *Mechanisms of Development* 144 (April): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.005>.
- Heisenberg, C.P., Tada M., Rauch G.J., Saúde L., Concha M.L., Geisler R., Stemple D.L., Smith J.C., and Wilson S.W.. 2000. "Silberblick/Wnt11 Mediates Convergent Extension Movements during Zebrafish Gastrulation." *Nature* 405 (6782): 76–81. <https://doi.org/10.1038/35011068>.
- Helms, A.W., Battiste J., Henke, R.M. Nakada Y., Simplicio N., Guillemot F., and Johnson J.E.. 2005. "Sequential Roles for Mash1 and Ngn2 in the Generation of Dorsal Spinal Cord Interneurons." *Development* 132 (12): 2709–19. <https://doi.org/10.1242/dev.01859>.
- Henrique, D., Abranches E., Verrier L., and Storey K.G.. 2015. "Neuromesodermal Progenitors and the Making of the Spinal Cord." *Development* 142 (17): 2864–75.
- Hepler, C., Vishvanath L., and Gupta R.K.. 2017. "Sorting out Adipocyte Precursors and Their Role in Physiology and Disease." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.293704.116>.
- Hertzler, D.A., DePowell J.J., Stevenson C.B., and Mangano F.T.. 2010. "Tethered Cord Syndrome: A Review of the Literature from Embryology to Adult Presentation." *Neurosurgical Focus*. <https://doi.org/10.3171/2010.3.focus1079>.
- Hildebrand, J.D., and Soriano P.. 1999. "Shroom, a PDZ Domain-Containing Actin-Binding Protein, Is Required for Neural Tube Morphogenesis in Mice." *Cell* 99 (5):

485–97.

- Hoch, R.V., and Soriano P.. 2003. “Roles of PDGF in Animal Development.” *Development* 130 (20): 4769–84. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>.
- Hogan, B.L.M. 1996. “Bone Morphogenetic Proteins in Development.” *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(96\)80064-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80064-5).
- Hudak, C.S., Gulyaeva O., Wang Y., Park S., Lee L., Kang C., and Sul H.S.. 2014. “Ptf-1 Marks Very Early Mesenchymal Precursors Required for Adipose Tissue Development and Expansion.” *Cell Reports* 8 (3): 678–87. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.060>.
- Hunt, R., Sauna Z.E., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., and Kimchi-Sarfaty C.. 2009. “Silent (Synonymous) SNPs: Should We Care about Them?” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2.
- Irizarry, R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Uwe Scherf U., and Speed T.P.. 2003. “Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data.” In *Selected Works of Terry Speed*, 601–16. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1347-9_15.
- Isern, J., García-García A., Martín A.M., Arranz L., Martín-Pérez D., Torroja C., Sánchez-Cabo F., and Méndez-Ferrer S.. 2014. “The Neural Crest Is a Source of Mesenchymal Stem Cells with Specialized Hematopoietic Stem Cell Niche Function.” *ELife* 3 (September): e03696. <https://doi.org/10.7554/eLife.03696>.
- Jacinto, A., Martinez-Arias A., and Martin P.. 2001. “Mechanisms of Epithelial Fusion and Repair.” *Nature Cell Biology* 3 (5): E117–23. <https://doi.org/10.1038/35074643>.
- Jessell, T.M., and Sanes J.R.. 2000. “Development: The Decade of the Developing Brain.” *Current Opinion in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00136-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00136-7).
- Jones, V., Wykes V., Cohen N., Thompson D., and S Jacques T.. 2018. “The Pathology of Lumbosacral Lipomas: Macroscopic and Microscopic Disparity Have Implications for Embryogenesis and Mode of Clinical Deterioration.” *Histopathology* 72 (7): 1136–44. <https://doi.org/10.1111/his.13469>.
- Juriloff, D., and Harris M.. 2018. “Insights into the Etiology of Mammalian Neural Tube Closure Defects from Developmental, Genetic and Evolutionary Studies.” *Journal of Developmental Biology* 6 (3): 22. <https://doi.org/10.3390/jdb6030022>.
- Kalluri, R., and Weinberg R.A.. 2009. “The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

- Karfunkel, P.. 1974. "The Mechanisms of Neural Tube Formation." *International Review of Cytology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60927-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60927-4).
- Keller, R.. 2002. "Shaping the Vertebrate Body Plan by Polarized Embryonic Cell Movements." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1079478>.
- Kibar, Z., Salem S., Bosoi C., Pauwels E., De Marco P., Merello E., Bassuk A., Capra V., and Gros P.. 2011. "Contribution of VANGL2 Mutations to Isolated Neural Tube Defects." *Clinical Genetics*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01515.x>.
- Kibar, Z., Vogan K.J., Groulx N., Justice M.J., Underhill D.A., and Gros P.. 2001. "Ltap, a Mammalian Homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, Is Altered in the Mouse Neural Tube Mutant Loop-Tail." *Nature Genetics* 28 (3): 251–55. <https://doi.org/10.1038/90081>.
- Kilian, B., Mansukoski H., Barbosa F.C., Ulrich F., Tada M., and Heisenberg C.P.. 2003. "The Role of Ppt/Wnt5 in Regulating Cell Shape and Movement during Zebrafish Gastrulation." *Mechanisms of Development* 120 (4): 467–76. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00004-2).
- Kim, H.Y., and Davidson L.A.. 2011. "Punctuated Actin Contractions during Convergent Extension and Their Permissive Regulation by the Non-Canonical Wnt-Signaling Pathway." *J Cell Sci*.
- Kim, J., Lo L., Dormand E., and Anderson D.J.. 2003. "SOX10 Maintains Multipotency and Inhibits Neuronal Differentiation of Neural Crest Stem Cells." *Neuron* 38 (1): 17–31. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00163-6).
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh J.M., Kim I.W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., and Gottesman M.M.. 2007. "A 'Silent' Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity." *Science* 315 (5811): 525–28. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>.
- Kingsley, D.M. 1994. "The TGF- β Superfamily: New Members, New Receptors, and New Genetic Tests of Function in Different Organisms." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.133>.
- Kinoshita, N., Sasai N., Misaki K., and Yonemura S.. 2008. "Apical Accumulation of Rho in the Neural Plate Is Important for Neural Plate Cell Shape Change and Neural Tube Formation." *Mol Biol Cell* 19 (5): 2289–99.
- Kuan, C.Y., Yang D.D., Samanta Roy D.R., Davis R.J., Rakic P., and Flavell R.A.. 1999. "The Jnk1 and Jnk2 Protein Kinases Are Required for Regional Specific Apoptosis during Early Brain Development." *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/S0896->

6273(00)80727-8.

- Labonne, C., and Bronner-Fraser M.. 2000. "Snail-Related Transcriptional Repressors Are Required in *Xenopus* for Both the Induction of the Neural Crest and Its Subsequent Migration." *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9609>.
- Lee Y.H., Bae S.C., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G.2012. "The Association between the PTPN22 C1858T Polymorphism and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis Update." *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1117-3>.
- Lee, Y.S., Wysocki A., Warburton D., and Tuan T.L.. 2012. "Wound Healing in Development." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 96 (3): 213–22. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21017>.
- Lellouch-Tubiana, A., Zerah M., Catala M., Brousse N., and Kahn A.P.. 1999. "Congenital Intraspinous Lipomas: Histological Analysis of 234 Cases and Review of the Literature." *Pediatric and Developmental Pathology* 2 (4): 346–52. <https://doi.org/10.1007/s100249900133>.
- Lew, S.M., and Kothbauer K.F. 2007. "Tethered Cord Syndrome: An Updated Review." *Pediatric Neurosurgery*. <https://doi.org/10.1159/000098836>.
- Li, D., Hallett M.A., Zhu W., Rubart M., Liu Y., Yang Z., Chen H., et al. 2011. "Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis 1 (Daam1) Is Required for Heart Morphogenesis." *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.055566>.
- Lienkamp, S.S., Liu K., Karner C.M., Carroll T.J., Ronneberger O., Wallingford J.B., and Walz G.. 2012. "Vertebrate Kidney Tubules Elongate Using a Planar Cell Polarity-Dependent, Rosette-Based Mechanism of Convergent Extension." *Nat Genet* 44 (12): 1382–87.
- Linhardt, R.J., and Toida T.. 2004. "Role of Glycosaminoglycans in Cellular Communication." *Accounts of Chemical Research*. <https://doi.org/10.1021/ar030138x>.
- Liu G., Yan T., Li X., Sun J., Zhang B., Wang H., Zhu Y.. 2018. "Daam1 Activates RhoA to Regulate Wnt5a-Induced Glioblastoma Cell Invasion." *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6124>.
- López-Escobar, B., Cano D.A., Rojas A., De Felipe B., Palma F., Sánchez-Alcázar J.A., Henderson D., and Ybot-González P.. 2015. "The Effect of Maternal Diabetes on the Wnt-PCP Pathway during Embryogenesis as Reflected in the Developing Mouse Eye." *DMM Disease Models and Mechanisms* 8 (2): 157–68.

<https://doi.org/10.1242/dmm.017723>.

- López-Escobar, B., Caro-Vega J.M., Vijayraghavan D.S., Plageman T.F., Sanchez-Alcazar, J.A., Moreno R.C., Savery D., Márquez-Rivas J., Davidson L.A., and Ybot-González P.. 2018. “The Non-Canonical Wnt-PCP Pathway Shapes the Mouse Caudal Neural Plate.” *Development (Cambridge, England)* 145 (9). <https://doi.org/10.1242/dev.157487>.
- López-Escobar, B., Wlodarczyk B.J., Caro-Vega J.M., Lin Y., Finnell, L.H. and Ybot-González. P. 2019. “The Interaction of Maternal Diabetes with Mutations That Affect Folate Metabolism and How They Affect the Development of Neural Tube Defects in Mice.” *Developmental Dynamics* 248 (10): 900–917. <https://doi.org/10.1002/dvdy.92>.
- Louveau, I., Perruchot M.H., Bonnet M., and Gondret F.. 2016. “Invited Review: Pre- and Postnatal Adipose Tissue Development in Farm Animals: From Stem Cells to Adipocyte Physiology.” In *Animal*. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000872>.
- Lowery, L.A., and Sive H.. 2004. “Strategies of Vertebrate Neurulation and a Re-Evaluation of Teleost Neural Tube Formation.” *Mechanisms of Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.04.022>.
- Lu, Q.R., Sun T., Zhu Z., Ma N., Garcia M., Stiles C.D., and Rowitch D.H.. 2002. “Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/Oligodendrocyte Connection.” *Cell* 109 (1): 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00678-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00678-5).
- Lu, X., Borchers, A.G.M., Jolicoeur C., Rayburn H., Baker J.C., and Tessier-Lavigne M.. 2004. “PTK7/CCK-4 Is a Novel Regulator of Planar Cell Polarity in Vertebrates.” *Nature* 430 (6995): 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature02677>.
- Luo, W., Lieu Z.Z., Manser E., Bershadsky A.D., and Sheetz M.P.. 2016. “Formin DAAM1 Organizes Actin Filaments in the Cytoplasmic Nodal Actin Network.” *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163915>.
- Maekawa, M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., and Narumiya S.. 1999. “Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton through Protein Kinases ROCK and LIM-Kinase.” *Science* 285 (5429): 895–98.
- Mahaffey, J.P., Grego-Bessa J., Liem K.F., and Anderson K.V.. 2013. “Cofilin and Vangl2 Cooperate in the Initiation of Planar Cell Polarity in the Mouse Embryo.” *Development (Cambridge)* 140 (6): 1262–71. <https://doi.org/10.1242/dev.085316>.

- Marchant, L., Linker C., Ruiz P., Guerrero N., and Mayor R.. 1998. "The Inductive Properties of Mesoderm Suggest That the Neural Crest Cells Are Specified by a BMP Gradient." *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8902>.
- Martin, A.C., Kaschube M., and Wieschaus E.F.. 2009. "Pulsed Contractions of an Actin-Myosin Network Drive Apical Constriction." *Nature* 457 (7228): 495–99. <https://doi.org/10.1038/nature07522>.
- Martin, J.B., Muccioli M., Herman K., Finnell R.H., and Plageman T.F.. 2019. "Folic Acid Modifies the Shape of Epithelial Cells during Morphogenesis via a Folr1 and MLCK Dependent Mechanism." *Biology Open* 8 (1): bio041160. <https://doi.org/10.1242/bio.041160>.
- Martin, P. 2004. "Parallels between Tissue Repair and Embryo Morphogenesis." *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.01253>.
- Mashburn, D.N., Lynch H.E., Ma X., and Hutson M.S.. 2012. "Enabling User-Guided Segmentation and Tracking of Surface-Labeled Cells in Time-Lapse Image Sets of Living Tissues." *Cytometry A* 81 (5): 409–18.
- Mason, F.M., Tworoger M., and Martin A.C.. 2013. "Apical Domain Polarization Localizes Actin-Myosin Activity to Drive Ratchet-like Apical Constriction." *Nat Cell Biol* 15 (8): 926–36.
- Massagué, J.. 2000. "How Cells Read TGF- β Signals." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35043051>.
- Massarwa, R., and Niswander L.. 2013. "In Toto Live Imaging of Mouse Morphogenesis and New Insights into Neural Tube Closure." *Development* 140 (1): 226–36. <https://doi.org/10.1242/dev.085001>.
- Matera, I., Watkins-Chow D.E., Loftus S.K., Hou L., Incao A., Silver D.L., Rivas C., Elliott E.C., Baxter L.L., and Pavan W.J.. 2008. "A Sensitized Mutagenesis Screen Identifies Gli3 as a Modifier of Sox10 Neurocristopathy." *Human Molecular Genetics* 17 (14): 2118–31. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn110>.
- Mayanil, C.S. 2013. "Transcriptional and Epigenetic Regulation of Neural Crest Induction during Neurulation." *Developmental Neuroscience* 35 (5): 361–72. <https://doi.org/10.1159/000354749>.
- Mayor, R., Morgan R., and Sargent M.G.. 1995. "Induction of the Prospective Neural Crest of *Xenopus*." *Development*.
- McComb, J.G. 1997. "Spinal and Cranial Neural Tube Defects." *Seminars in Pediatric Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1071-9091\(97\)80034-4](https://doi.org/10.1016/S1071-9091(97)80034-4).

- McGreevy, E.M., Vijayraghavan D., Davidson L.A., and Hildebrand J.D.. 2015. “Shroom3 Functions Downstream of Planar Cell Polarity to Regulate Myosin II Distribution and Cellular Organization during Neural Tube Closure.” *Biology Open* 4 (2): 186–96. <https://doi.org/10.1242/bio.20149589>.
- Mendell, J.T., and Olson E.N.. 2012. “MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.005>.
- Merte, J., Jensen D., Wright K., Sarsfield S., Wang Y., Schekman R., and Ginty D.D.. 2010. “Sec24b Selectively Sorts Vangl2 to Regulate Planar Cell Polarity during Neural Tube Closure.” *Nature Cell Biology* 12 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1038/ncb2002>.
- Mikkelsen, T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., et al. 2007. “Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06008>.
- Millard, T.H., and Martin P.. 2008. “Dynamic Analysis of Filopodial Interactions during the Zippering Phase of Drosophila Dorsal Closure.” *Development* 135 (4): 621–26. <https://doi.org/10.1242/dev.014001>.
- Mitchell, L.E. 2005. “Epidemiology of Neural Tube Defects.” *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 135C (1): 88–94. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30057>.
- Modak, S.P., Ghatpande S.K., Rane R.K., and Mulherkar L.. 1993. “Caudalization by Retinoic Acid Is Correlated with Inhibition of Cell Population Growth and Expansion of Chick Blastoderms Cultured in Vitro.” *International Journal of Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1387/ijdb.8180004>.
- Montcouquiol, M., Rachel R.A., Lanford P.J., Copeland N.G., Jenkins N.A., and Kelley M.W.. 2003. “Identification of Vangl2 and Scrb1 as Planar Polarity Genes in Mammals.” *Nature* 423 (6936): 173–77. <https://doi.org/10.1038/nature01618>.
- Montcouquiol, M., Sans N., Huss D., Kach J., Dickman J.D., Forge A., Rachel R.A., et al. 2006. “Asymmetric Localization of Vangl2 and Fz3 Indicate Novel Mechanisms for Planar Cell Polarity in Mammals.” *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4680-05.2006>.
- Moore, K., Persaud T.V.N., and Torchia M.. 2015. *The Developing Human Embryo - 10th Edition - Clinically Orientated Embryology*.
- Morita, H., Nandadasa S., Yamamoto T.S., Terasaka-Iioka C., Wylie C., and Ueno N.. 2010. “Nectin-2 and N-Cadherin Interact through Extracellular Domains and Induce

- Apical Accumulation of F-Actin in Apical Constriction of *Xenopus* Neural Tube Morphogenesis.” *Development* 137 (8): 1315–25. <https://doi.org/10.1242/dev.043190>.
- Murdoch, J.N., Doudney K., Paternotte C., Copp A.J., and Stanier P.. 2001. “Severe Neural Tube Defects in the Loop-Tail Mouse Result from Mutation of *Lpp1*, a Novel Gene Involved in Floor Plate Specification.” *Human Molecular Genetics* 10 (22): 2593–2601. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.22.2593>.
- Murdoch, J.N., Damrau C., Paudyal A., Bogani D., Wells S., Greene N.D.E., Stanier P., and Copp A.J.. 2014. “Genetic Interactions between Planar Cell Polarity Genes Cause Diverse Neural Tube Defects in Mice.” *Disease Models & Mechanisms* 7 (10): 1153–63. <https://doi.org/10.1242/dmm.016758>.
- Murdoch, J.N., Henderson D.J., Doudney K., Gaston-Massuet C., Phillips H.M., Paternotte C., Arkell R., Stanier P., and Copp A.J.. 2003. “Disruption of *Scribble* (*Scrb1*) Causes Severe Neural Tube Defects in the Circletail Mouse.” *Human Molecular Genetics* 12 (2): 87–98. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg014>.
- Myers, D.C., Sepich D.S., and Solnica-Krezel L.. 2002. “Bmp Activity Gradient Regulates Convergent Extension during Zebrafish Gastrulation.” *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0523>.
- Nagaoka, T., Ohashi R., Inutsuka A., Sakai S., Fujisawa N., Yokoyama M., Huang Y.H., Igarashi M., and Kishi M.. 2014. “The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component *Vangl2* Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin.” *Cell Rep* 6 (5): 916–27.
- Nagele, R.G., and Lee H.Y.. 1980. “Studies on the Mechanism of Neurulation in the Chick: Microfilament-mediated Changes in Cell Shape during Uplifting of Neural Folds.” *Journal of Experimental Zoology* 213 (3): 391–98. <https://doi.org/10.1002/jez.1402130310>.
- Naidich, T.P., McLone D.G., and Mutluer S.. 1983. “A New Understanding of Dorsal Dysraphism with Lipoma (Lipomyeloschisis): Radiologic Evaluation and Surgical Correction.” *American Journal of Roentgenology*. <https://doi.org/10.2214/ajr.140.6.1065>.
- Nakagawa, S., and Takeichi M.. 1995. “Neural Crest Cell-Cell Adhesion Controlled by Sequential and Subpopulation-Specific Expression of Novel Cadherins.” *Undefined*.
- Nandadasa, S., Tao Q., Menon N.R., Heasman J., and Wylie. C. 2009. “N- and E-Cadherins in *Xenopus* Are Specifically Required in the Neural and Non-Neural

- Ectoderm, Respectively, for F-Actin Assembly and Morphogenetic Movements.” *Development* 136 (8): 1327–38.
- Niederreither, K., Fraulob V., Garnier J.M., Chambon P., and Dollé P.. 2002. “Differential Expression of Retinoic Acid-Synthesizing (RALDH) Enzymes during Fetal Development and Organ Differentiation in the Mouse.” *Mechanisms of Development* 110 (1–2): 165–71. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00561-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00561-5).
- Nieto, M.A., Sargent M.G., Wilkinson D.G., and Cooke J.. 1994. “Control of Cell Behavior during Vertebrate Development by Slug, a Zinc Finger Gene.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7513443>.
- Nikolopoulou, E., Galea G.L., Rolo A., Greene N.D.E., and Copp A.J.. 2017. “Neural Tube Closure: Cellular, Molecular and Biomechanical Mechanisms.” *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>.
- Nishimura, T., Honda H., and Takeichi M.. 2012. “Planar Cell Polarity Links Axes of Spatial Dynamics in Neural-Tube Closure.” *Cell* 149 (5): 1084–97.
- Nishimura, T., and Takeichi M.. 2009. “Chapter 2 Remodeling of the Adherens Junctions During Morphogenesis.” *Current Topics in Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)89002-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)89002-9).
- Oh, S., Huang X., and Chiang C.. 2005. “Specific Requirements of Sonic Hedgehog Signaling during Oligodendrocyte Development.” *Developmental Dynamics* 234 (3): 489–96. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20422>.
- Ohlsson Teague, E.M., Van der Hoek K.H., Van der Hoek M.B., Perry N., Wagaarachchi P., Robertson S.A., Print C.G., Hull L.M.. 2009. “MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis.” *Molecular Endocrinology* 23 (2): 265–75. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0387>.
- Oksala, O., Salo T., Tammi R., Häkkinen L., Jalkanen M., Inki P., and Larjava H.. 1995. “Expression of Proteoglycans and Hyaluronan during Wound Healing.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 43 (2): 125–35. <https://doi.org/10.1177/43.2.7529785>.
- Oliferenko, S., Kaverina I., Small J.V., and Huber L.A.. 2000. “Hyaluronic Acid (HA) Binding to CD44 Activates Rac1 and Induces Lamellipodia Outgrowth.” *The Journal of Cell Biology* 148 (6): 1159–64. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1159>.
- Osório, L., Teillet M. A., Palmeirim I., and Catala M.. 2009. “Neural Crest Ontogeny during Secondary Neurulation: A Gene Expression Pattern Study in the Chick Embryo.” *International Journal of Developmental Biology*.

- <https://doi.org/10.1387/ijdb.072517lo>.
- Ossipova, O., Kim K., and Sokol S.Y.. 2015. "Planar Polarization of Vangl2 in the Vertebrate Neural Plate Is Controlled by Wnt and Myosin II Signaling." *Biol Open* 4 (6): 722–30. <https://doi.org/10.1242/bio.201511676>.
- O'Shea, K.S. 1987. "Differential Deposition of Basement Membrane Components during Formation of the Caudal Neural Tube in the Mouse Embryo." *Development* 99 (4): 509–19.
- Padmanabhan, R. 2006. "Etiology, Pathogenesis and Prevention of Neural Tube Defects." *Congenital Anomalies*. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2006.00104.x>.
- Pagani, F., Raponi M., and Baralle F.E.. 2005. "Synonymous Mutations in CFTR Exon 12 Affect Splicing and Are Not Neutral in Evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (18): 6368–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502288102>.
- Pai, Y.J., Abdullah N.L., Mohd.-Zin S.W., Mohammed R.S., Rolo A., Greene N.D.E., Abdul-Aziz N.M., and Copp A.J.. 2012. "Epithelial Fusion during Neural Tube Morphogenesis." *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*. <https://doi.org/10.1002/bdra.23072>.
- Paniagua Gómez-Álvarez, R.. 2017. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Paudyal, A., Damrau C., Patterson V.L., Ermakov A., Formstone C., Lalanne Z., Wells S., et al. 2010. "The Novel Mouse Mutant, Chuzhoi, Has Disruption of Ptk7 Protein and Exhibits Defects in Neural Tube, Heart and Lung Development and Abnormal Planar Cell Polarity in the Ear." *BMC Developmental Biology* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-87>.
- Pavlinkova, G., Salbaum J.M., and Kappen C.. 2011. "Maternal Diabetes Alters Transcriptional Programs in the Developing Embryo." In *Current Research in Embryology*, 26–46. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-274>.
- Paylor, B., Joe A.W., Rossi F.W.V., and Lemos D.R.. 2014. "In Vivo Characterization of Neural Crest-Derived Fibro/Adipogenic Progenitor Cells as a Likely Cellular Substrate for Craniofacial Fibrofatty Infiltrating Disorders." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451 (1): 148–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.089>.
- Payne, J., Shibasaki F., and Mercola M.. 1997. "Spina Bifida Occulta in Homozygous

- Patch Mouse Embryos.” *Developmental Dynamics* 209 (1): 105–16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199705\)209:1<105::AID-AJA10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<105::AID-AJA10>3.0.CO;2-0).
- Pearson, H.. 2006. “Silent Mutations Speak Up.” *Nature*, December. <https://doi.org/10.1038/news061218-12>.
- Pei, D., Shu X., Gassama-Diagne A., and Thiery J.P.. 2019. “Mesenchymal–Epithelial Transition in Development and Reprogramming.” *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0195-z>.
- Perris, R., and Perissinotto D.. 2000. “Role of the Extracellular Matrix during Neural Crest Cell Migration.” *Mechanisms of Development*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00365-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00365-8).
- Pierre-Kahn, A., Zerah M., Renier D., Cinalli G., Sainte-Rose C., Lellouch-Tubiana A., Brunelle F., et al. 1997. “Congenital Lumbosacral Lipomas.” *Child’s Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/s003810050090>.
- Pinson, K.I., Brennan J., Monkley S., Avery B.J., and Skarnes W.C.. 2000. “An LDL-Receptor-Related Protein Mediates Wnt Signalling in Mice.” *Nature* 407 (6803): 535–38. <https://doi.org/10.1038/35035124>.
- Plageman Jr., T.F., Zacharias A.L., Gage P.J., and Lang R.A.. 2011. “Shroom3 and a Pitx2-N-Cadherin Pathway Function Cooperatively to Generate Asymmetric Cell Shape Changes during Gut Morphogenesis.” *Dev Biol* 357 (1): 227–34.
- Purves, D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A., McNamara J.O., and Williams S.M.. 2001. “The Initial Formation of the Nervous System: Gastrulation and Neurulation.”
- Raich, W.B., Agbunag C., and Hardin J.. 1999. “Rapid Epithelial-Sheet Sealing in the *Caenorhabditis Elegans* Embryo Requires Cadherin-Dependent Filopodial Priming.” *Current Biology* 9 (20): 1139–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80015-9).
- Radisky, D.C., and LaBarge M.A.. 2008. “Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype.” *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.05.007>.
- Ramírez-Bello, J., and Jiménez-Morales M.. 2017. “Implicaciones Funcionales de Los Polimorfismos de Un Solo Nucleótido (SNP) En Genes Codificantes de Proteínas y No Codificantes En Enfermedades Multifactoriales.” *Gaceta Medica de Mexico* 153 (2): 238–50.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón G., Tovilla-Zárate C., Frago J. M., and Badiano J..

2013. “Polimorfismos de Un Solo Nucleótido (SNP): Implicaciones Funcionales de Los SNP Reguladores (RSNP) y de Los SNP-ARN Estructurales (SrSNP) En Enfermedades Complejas Correspondencia.” Vol. 149.
- Rauscher, R., and Ignatova Z.. 2018. “Timing during Translation Matters : Synonymous Mutations in Human Pathologies Influence Protein Folding and Function,” 1–8.
- Ray, H.J., and Niswander L.. 2012. “Mechanisms of Tissue Fusion during Development.” *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.068338>.
- Roelink, H., and Nusse R.. 1991. “Expression of Two Members of the Wnt Family during Mouse Development--Restricted Temporal and Spatial Patterns in the Developing Neural Tube.” *Genes Dev* 5 (3): 381–88.
- Rolfe, K.J., and Grobbelaar A.O.. 2012. “A Review of Fetal Scarless Healing.” *ISRN Dermatology* 2012: 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/698034>.
- Rolo, A., Escuin S., Greene N.D.E., and Copp A.J.. 2018. “Rho GTPases in Mammalian Spinal Neural Tube Closure.” *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1235388>.
- Rossi, A., Biancheri R., Cama A., Piatelli G., Ravegnani M., and Tortori-Donati P.. 2004. “Imaging in Spine and Spinal Cord Malformations.” *European Journal of Radiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2003.10.015>.
- Roszko, I., Sepich, D.S., Jessen J.R., Chandrasekhar A., and Solnica-Krezel L.. 2015. “A Dynamic Intracellular Distribution of Vangl2 Accompanies Cell Polarization during Zebrafish Gastrulation.” *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.119032>.
- Sabapathy, K., Jochum W., Hochedlinger K., Chang L., Karin M., and Wagner E.F.. 1999. “Defective Neural Tube Morphogenesis and Altered Apoptosis in the Absence of Both JNK1 and JNK2.” *Mechanisms of Development* 89 (1–2): 115–24.
- Sadee, W., Wang D., Papp A.C., Pinsonneault J.K., Smith R.M., Moyer R.A., and Johnson A.D.. 2011. “Pharmacogenomics of the RNA World: Structural RNA Polymorphisms in Drug Therapy.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.314>.
- Sadee, W. 2009. “Measuring Cis-Acting Regulatory Variants Genome-Wide: New Insights into Expression Genetics and Disease Susceptibility.” *Genome Medicine*. <https://doi.org/10.1186/gm116>.
- Sadler, T.W. 2005. “Embryology of Neural Tube Development.” In *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*.

- <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30049>.
- Sadler, T.W., Greenberg D., Coughlin P., and Lessard J.L.. 1982. "Actin Distribution Patterns in the Mouse Neural Tube during Neurulation." *Science* 215 (4529): 172–74. <https://doi.org/10.1126/science.7031898>.
- Sadler, T.W. 2012. *Langman's Medical Embryology 12th Ed. Wolters Kluwer*.
- Saitsu, H., and Shiota K.. 2008. "Involvement of the Axially Condensed Tail Bud Mesenchyme in Normal and Abnormal Human Posterior Neural Tube Development." *Congenital Anomalies*. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2007.00178.x>.
- Saitsu, H., Yamada S., Uwabe C., Ishibashi M., and Shiota K.. 2004. "Development of the Posterior Neural Tube in Human Embryos." *Anatomy and Embryology* 209 (2): 107–17. <https://doi.org/10.1007/s00429-004-0421-2>.
- Sando, R., Goukko N., Pieraut S., Liao L., Yates J., and Maximov A.. 2012. "HDAC4 Governs a Transcriptional Program Essential for Synaptic Plasticity and Memory." *Cell* 151 (4): 821–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.037>.
- Sanger, F., Nicklen S., and Coulson A.R.. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Sarris, C.E, Tomei K.L., Carmel P.W., and Gandhi C.D.. 2012. "Lipomyelomeningocele: Pathology, Treatment, and Outcomes." *Neurosurgical Focus* 33 (4): E3. <https://doi.org/10.3171/2012.7.FOCUS12224>.
- Sato, A., Khadka D.K., Liu W., Bharti R., Runnels L.W., Dawid I.B, and Habas R.. 2006. "Profilin Is an Effector for Daam 1 in Non-Canonical Wnt Signaling and Is Required for Vertebrate Gastrulation." *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.02590>.
- Schatteman, G.C., Morrison-Graham K., Koppen A.V., Weston J.A., and Bowen-Pope D.F.. 1992. "Regulation and Role of PDGF Receptor β -Subunit Expression during Embryogenesis." *Development*.
- Schenkel, L.C., Kernohan K.D., McBride A., Reina D., Hodge A., Ainsworth P.J., Rodenhiser D.I., et al. 2017. "Identification of Epigenetic Signature Associated with Alpha Thalassemia/Mental Retardation X-Linked Syndrome." *Epigenetics and Chromatin* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0118-4>.
- Schenkel, L.C., Rodenhiser D.I., Ainsworth P.J., Paré G., and Sadikovic B.. 2016. "DNA Methylation Analysis in Constitutional Disorders: Clinical Implications of the

- Epigenome.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1113496>.
- Schoenwolf, G.C., and Fisher M.. 1983. “Analysis of the Effects of Streptomyces Hyaluronidase on Formation of the Neural Tube.” *Journal of Embryology and Experimental Morphology* Vol. 73: 1–15.
- Schoenwolf, G.C. 1984. “Histological and Ultrastructural Studies of Secondary Neurulation in Mouse Embryos.” *The American Journal of Anatomy* 169 (4): 361–76. <https://doi.org/10.1002/aja.1001690402>.
- Schoenwolf, G.C, and Delongo J.. 1980. “Ultrastructure of Secondary Neurulation in the Chick Embryo.” *The American Journal of Anatomy* 158 (1): 43–63. <https://doi.org/10.1002/aja.1001580106>.
- Schoenwolf, G.C. 1984. “Histological and Ultrastructural Studies of Secondary Neurulation in Mouse Embryos.” *American Journal of Anatomy* 169 (4): 361–76. <https://doi.org/10.1002/aja.1001690402>.
- Schoenwolf, G.C., Folsom D., and Moe A.. 1988. “A Reexamination of the Role of Microfilaments in Neurulation in the Chick Embryo.” *The Anatomical Record* 220 (1): 87–102. <https://doi.org/10.1002/ar.1092200111>.
- Sela-Donenfeld, D., and Kalcheim C.. 1999. “Regulation of the Onset of Neural Crest Migration by Coordinated Activity of BMP4 and Noggin in the Dorsal Neural Tube.” *Development (Cambridge, England)*.
- Shafer, B., Onishi K., Lo C., Colakoglu G., and Zou Y.. 2011. “Vangl2 Promotes Wnt/Planar Cell Polarity-like Signaling by Antagonizing Dvl1-Mediated Feedback Inhibition in Growth Cone Guidance.” *Dev Cell* 20 (2): 177–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.002>.
- Sharp, P.M., and Li W.. 1987. “The Codon Adaptation Index—a Measure of Directional Synonymous Codon Usage Bias, and Its Potential Applications.” *Nucleic Acids Research* 15 (3): 1281–95. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>.
- Shen, J., Overland M., Sinclair A., Cao M., Yue X., Cunha G., and Baskin L.. 2016. “Complex Epithelial Remodeling Underlie the Fusion Event in Early Fetal Development of the Human Penile Urethra.” *Differentiation*. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.06.003>.
- Shih, J., and Keller R.. 1992. “Cell Motility Driving Mediolateral Intercalation in Explants of *Xenopus Laevis*.” *Development* 116 (4).
- Shilo, B., and Schejter E.D.. 2011. “Regulation of Developmental Intercellular Signalling

- by Intracellular Trafficking.” *The EMBO Journal* 30 (17): 3516–26. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.269>.
- Shlyueva, D., Stampfel G., and Stark A.. 2014. “Transcriptional Enhancers: From Properties to Genome-Wide Predictions.” *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3682>.
- Shum, A.S.W., and Copp A.J.. 1996. “Regional Differences in Morphogenesis of the Neuroepithelium Suggest Multiple Mechanisms of Spinal Neurulation in the Mouse.” *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/BF00196316>.
- Southard-Smith, E.M, Kos L., and Pavan W.J.. 1998. “Sox10 Mutation Disrupts Neural Crest Development in Dom Hirschsprung Mouse Model.” *Nature Genetics* 18 (1): 60–64. <https://doi.org/10.1038/ng0198-60>.
- Sowa, Y., Imura T., Numajiri T., Takeda K., Mabuchi Y., Matsuzaki Y., and Nishino K.. 2013. “Adipose Stromal Cells Contain Phenotypically Distinct Adipogenic Progenitors Derived from Neural Crest.” *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084206>.
- Stanier, P., Henson J.N., Eddleston J., Moore G.E., and Copp A.J.. 1995. “Genetic Basis of Neural Tube Defects: The Mouse Gene Loop-Tail Maps to a Region of Chromosome 1 Syntenic with Human 1q21-Q23.” *Genomics*. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80165-I](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80165-I).
- Stern, C.D. 2005. “Neural Induction: Old Problem, New Findings, yet More Questions.” *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.01794>.
- Stolt, C.C., Lommes P., Sock E., Chaboissier M.C., Schedl A., and Wegner M.. 2003. “The Sox9 Transcription Factor Determines Glial Fate Choice in the Developing Spinal Cord.” *Genes and Development* 17 (13): 1677–89. <https://doi.org/10.1101/gad.259003>.
- Stumpo, D. J., Bock C.B., Tuttle J.S., and Blackshear P.J.. 1995. “MARCKS Deficiency in Mice Leads to Abnormal Brain Development and Perinatal Death.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (4): 944–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.944>.
- Sugo, N., Oshiro H., Takemura M., Kobayashi T., Kohno Y., Uesaka N., Song W., and Yamamoto N.. 2010. “Nucleocytoplasmic Translocation of HDAC9 Regulates Gene Expression and Dendritic Growth in Developing Cortical Neurons.” *The European Journal of Neuroscience* 31 (9): 1521–32. <https://doi.org/10.1111/j.1460->

9568.2010.07218.x.

- Sulik, K., Dehart D.B., Inagaki T., Carson J.L., Vrablic T., Gesteland K., and Schoenwolf G.C.. 1994. "Morphogenesis of the Murine Node and Notochordal Plate." *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/aja.1002010309>.
- Supek, F., and Vlahoviček K.. 2005. "Comparison of Codon Usage Measures and Their Applicability in Prediction of Microbial Gene Expressivity." *BMC Bioinformatics* 6 (July). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-182>.
- Suriben, R., Kivimäe S., Fisher D.A.C., T Moon R.T., and Cheyette B.N.R.. 2009. "Posterior Malformations in Dact1 Mutant Mice Arise through Misregulated Vangl2 at the Primitive Streak." *Nature Genetics* 41 (9): 977–85. <https://doi.org/10.1038/ng.435>.
- Tada, M., and Kai M.. 2012. "Planar Cell Polarity in Coordinated and Directed Movements." In *Current Topics in Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394592-1.00004-1>.
- Takada, S., Stark K.L., Shea M.J., Vassileva G., McMahon J.A., and McMahon A.P. 1994. "Wnt-3a Regulates Somite and Tailbud Formation in the Mouse Embryo." *Genes Dev* 8 (2): 174–89.
- Takebayashi, H., Nabeshima Y., Yoshida S., Chisaka O., Ikenaka K., and Nabeshima Y.I.. 2002. "The Basic Helix-Loop-Helix Factor Olig2 Is Essential for the Development of Motoneuron and Oligodendrocyte Lineages." *Current Biology* 12 (13): 1157–63. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00926-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00926-0).
- Takeyama, J., Hayashi T., Saito M., Shimanuki Y., Watanabe M., Sasano H., and Shirane R.. 2006. "Spinal Hamartoma Associated with Spinal Dysraphism." *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 22 (9): 1098–1102. <https://doi.org/10.1007/s00381-005-0016-0>.
- Tam, P.P.L., and Behringer R.R.. 1997. "Mouse Gastrulation: The Formation of a Mammalian Body Plan." *Mechanisms of Development*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(97\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00123-8).
- Tao, H., Suzuki M., Kiyonari H., Abe T., Sasaoka T., and Ueno N.. 2009. "Mouse Prickle1, the Homolog of a PCP Gene, Is Essential for Epiblast Apical-Basal Polarity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (34): 14426–31.
- Taya, Y., O'Kane S., and Ferguson M.W.. 1999. "Pathogenesis of Cleft Palate in TGF-Beta3 Knockout Mice." *Development (Cambridge, England)* 126 (17): 3869–79.
- Theveneau, E., and Mayor R.. 2012. "Neural Crest Delamination and Migration: From

- Epithelium-to-Mesenchyme Transition to Collective Cell Migration.” *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.041>.
- Tian, X., Liu Z., Niu B., Zhang J., Tan T.K., Lee S.R., Zhao Y., Harris D.C.H., and Zheng G.. 2011. “E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/567305>.
- Ting, S.B., Caddy J., Hislop N., Wilanowski T., Auden A., Zhao L.L., Ellis S., et al. 2005. “A Homolog of Drosophila Grainy Head Is Essential for Epidermal Integrity in Mice.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1107511>.
- Torban, E., Wang H., Groulx N., and Gros P.. 2004. “Independent Mutations in Mouse Vangl2 That Cause Neural Tube Defects in Looptail Mice Impair Interaction with Members of the Dishevelled Family.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52703–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408675200>.
- Trichas, G., Smith A.M., White N., Wilkins V., Watanabe T., Moore A., Joyce B., et al. 2012. “Multi-Cellular Rosettes in the Mouse Visceral Endoderm Facilitate the Ordered Migration of Anterior Visceral Endoderm Cells.” *PLoS Biol* 10 (2): e1001256.
- Tsakiridis, A., Huang Y., Blin G., Skylaki S., Wymeersch F., Osorno R., Economou C., et al. 2014. “Distinct Wnt-Driven Primitive Streak-like Populations Reflect in Vivo Lineage Precursors.” *Development* 141 (6): 1209–21.
- Tzouanacou, E., Wegener A., Wymeersch F.J., Wilson V., and Nicolas J.F.. 2009. “Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis.” *Dev Cell* 17 (3): 365–76.
- Valastyan, S., and Weinberg R.A.. 2011. “Roles for MicroRNAs in the Regulation of Cell Adhesion Molecules.” *Journal of Cell Science* 124 (7): 999–1006. <https://doi.org/10.1242/jcs.081513>.
- Van Gool, J.D., Hirche H., Lax H., and Schaepdrijver L.D.. 2018. “Folic Acid and Primary Prevention of Neural Tube Defects: A Review.” *Reproductive Toxicology* 80: 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.05.004>.
- Van Straaten, H.W.M, and Copp A.J.. 2001. “Curly Tail: A 50-Year History of the Mouse Spina Bifida Model.” *Anatomy and Embryology* 203 (4): 225–37. <https://doi.org/10.1007/s004290100169>.
- Van Straaten, H.W., Hekking J.W., Copp A.J., and Bernfield M.. 1992. “Deceleration and Acceleration in the Rate of Posterior Neuropore Closure during Neurulation in the Curly Tail (Ct) Mouse Embryo.” *Anatomy and Embryology* 185 (2): 169–74.

- <https://doi.org/10.1007/BF00185918>.
- Van de Ven, C., Bialecka M., Neijts R., Young T., Rowland J.E., Stringer E.J., Van Rooijen C., et al. 2011. “Concerted Involvement of Cdx/Hox Genes and Wnt Signaling in Morphogenesis of the Caudal Neural Tube and Cloacal Derivatives from the Posterior Growth Zone.” *Development* 138 (16): 3451–62. <https://doi.org/10.1242/dev.066118>.
- Vasquez, C.G., Tworoger M., and Martin A.C. 2014. “Dynamic Myosin Phosphorylation Regulates Contractile Pulses and Tissue Integrity during Epithelial Morphogenesis.” *J Cell Biol* 206 (3): 435–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402004>.
- Wahid, F., Shehzad A., Khan T., and Kim Y.Y.. 2010. “MicroRNAs: Synthesis, Mechanism, Function, and Recent Clinical Trials.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>.
- Wallingford, J.B., and Harland R.M.. 2002. “Neural Tube Closure Requires Dishevelled-Dependent Convergent Extension of the Midline.” *Development* 129 (24): 5815–25. <https://doi.org/10.1242/dev.00123>.
- Walsh, J.W., and Markesbery W.R.. 1980. “Histological Features of Congenital Lipomas of the Lower Spinal Canal.” *Journal of Neurosurgery* 52 (4): 564–69. <https://doi.org/10.3171/jns.1980.52.4.0564>.
- Wang, F., Tidei J.J., Polich E.D., Gao Y., Zhao H., Perrone-Bizzozero N.I., Guo W., and Zhao X.. 2015. “Positive Feedback between RNA-Binding Protein HuD and Transcription Factor SATB1 Promotes Neurogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (36): E4995–5004. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513780112>.
- Wang, J., Duncan D., Shi Z., and Zhang B.. 2013. “WEB-Based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): Update 2013.” *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt439>.
- Wang, M., Marco P., Capra V., and Kibar Z.. 2019. “Update on the Role of the Non-Canonical Wnt/Planar Cell Polarity Pathway in Neural Tube Defects.” *Cells* 8 (10): 1198. <https://doi.org/10.3390/cells8101198>.
- West, D.C., Shaw D.M., Lorenz P., Adzick N.S., and Longaker M.T.. 1997. “Fibrotic Healing of Adult and Late Gestation Fetal Wounds Correlates with Increased Hyaluronidase Activity and Removal of Hyaluronan.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29 (1): 201–10. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00133-1).

- Weston, C.R., Wong A., Hall J.P., Goad M.E.P, Flavell R.A., and Davis R.J.. 2003. “JNK Initiates a Cytokine Cascade That Causes Pax2 Expression and Closure of the Optic Fissure.” *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1087303>.
- Williams, M., Yen W., Lu X., and Sutherland A.. 2014. “Distinct Apical and Basolateral Mechanisms Drive Planar Cell Polarity-Dependent Convergent Extension of the Mouse Neural Plate.” *Developmental Cell* 29 (1): 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.02.007>.
- Wilson, P.A., Lagna G., Suzuki A., and Hemmati-Brivanlou A.. 1997. “Concentration-Dependent Patterning of the Xenopus Ectoderm by BMP4 and Its Signal Transducer Smad1.” *Development*.
- Wolpert, L., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Robertson E., Principios del Desarrollo, and Puntos Clave. 2010. “Lewis Wolpert, Thomas Jessell, Peter Lawrence, Elliot Meyerowitz, Elizabeth Robertson, Principios del desarrollo.”
- Wymeersch, F.J., Huang Y., Blin G., Cambray N., Wilkie R., Wong F.C., and Wilson V.. 2016. “Position-Dependent Plasticity of Distinct Progenitor Types in the Primitive Streak.” *Elife* 5: e10042.
- Xiao, J., Sun B., and Cai G.P.. 2010. “Transient Expression of Interferon-Inducible P204 in the Early Stage Is Required for Adipogenesis in 3T3-L1 Cells.” *Endocrinology* 151 (7): 3141–53. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1381>.
- Xu, W., Baribault H., and Adamson E.D.. 1998. “Vinculin Knockout Results in Heart and Brain Defects during Embryonic Development.” *Development (Cambridge, England)* 125 (2): 327–37.
- Yamaguchi, Y., and Miura M.. 2013. “How to Form and Close the Brain: Insight into the Mechanism of Cranial Neural Tube Closure in Mammals.” *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1227-7>.
- Yang, C., Zheng S., Wu H., and Chen S.. 2016. “Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs.” *Chinese Medical Journal* 129 (19): 2365–72. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190677>.
- Yang, P., Cai L., Zhang G., Bian Z., and Han G.. 2017. “The Role of the MiR-17–92 Cluster in Neurogenesis and Angiogenesis in the Central Nervous System of Adults.” *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23991>.
- Yang, W., Garrett L., Feng D., Elliott G., Liu X., Wang N., Wong Y.M., Choi N.T., Yang Y., and Gao B.. 2017. “Wnt-Induced Vangl2 Phosphorylation Is Dose-Dependently Required for Planar Cell Polarity in Mammalian Development.” *Cell Res* 27 (12):

- 1466–84. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.127>.
- Ybot-Gonzalez, P., Copp A.J., and Greene N.D.E.. 2005. “Expression Pattern of Glypican-4 Suggests Multiple Roles during Mouse Development.” *Dev Dyn* 233 (3): 1013–17.
- Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet C., Girdler G., Klingensmith J., Arkell R., Greene N.D.E., and Copp A.J.. 2007. “Neural Plate Morphogenesis during Mouse Neurulation Is Regulated by Antagonism of Bmp Signalling.” *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.008177>.
- Ybot-Gonzalez, P., Savery D., Gerrelli D., Signore M., Mitchell C.E., Faux C.H., Greene N.D.E., and Copp A.J.. 2007b. “Convergent Extension, Planar-Cell-Polarity Signalling and Initiation of Mouse Neural Tube Closure.” *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.000380>.
- Ybot-Gonzalez, P., Cogram P., Gerrelli D., and Copp A.J.. 2002. “Sonic Hedgehog and the Molecular Regulation of Mouse Neural Tube Closure.” *Development* 129 (10).
- Ybot-Gonzalez, P., and Copp A.J.. 1999. “Bending of the Neural Plate during Mouse Spinal Neurulation Is Independent of Actin Microfilaments.” *Developmental Dynamics*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199907\)215:3<273::AID-AJA9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199907)215:3<273::AID-AJA9>3.0.CO;2-H).
- Yu, F.H., Mantegazza M., Westenbroek R.E., Robbins C.A., Kalume F., Burton K.A., Spain W.J., McKnight G.S., Scheuer T., and Catterall W.A.. 2006. “Reduced Sodium Current in GABAergic Interneurons in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy.” *Nat Neurosci* 9 (9): 1142–49.
- Yu, H., Liu H., Wang L.E., and Wei Q.. 2012. “A Functional NQO1 609C>T Polymorphism and Risk of Gastrointestinal Cancers: A Meta-Analysis.” *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030566>.
- Zaganjor, I., Sekkarie A., Tsang B.L., Williams, Razzaghi J.H., Mulinare J., Sniezek J.E., Cannon M.J., and Rosenthal J.. 2016. “Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review.” *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151586>.
- Zerah, M., Roujeau T., Catala M., and Pierre-Kahn A.. 2008. “Spinal Lipomas.” In *The Spina Bifida: Management and Outcome*, 445–74. Springer Milan. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0651-5_36.
- Zernicka-Goetz, M. 2005. “Developmental Cell Biology: Cleavage Pattern and Emerging Asymmetry of the Mouse Embryo.” *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- Zhang, B., Kirov S., and Snoddy J.. 2005. “WebGestalt: An Integrated System for Exploring Gene Sets in Various Biological Contexts.” *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gki475>.
- Zhang, T., Leng Z., Liu W., Wang X., Yan X., and Yu L.. 2015. “Suppressed Expression of Mitogen-Activated Protein Kinases in Hyperthermia Induced Defective Neural Tube.” *Neuroscience Letters* 594 (May): 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.046>.
- Zhou, Q., and Anderson D.J.. 2002. “The BHLH Transcription Factors OLIG2 and OLIG1 Couple Neuronal and Glial Subtype Specification.” *Cell* 109 (1): 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00677-3).
- Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar J.M., and Harland R.M.. 1996. “The Spemann Organizer Signal Noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4.” *Cell* 86 (4): 599–606. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80133-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80133-6).
- Zohn, I.E., Chesnutt C.R., and Niswander L.. 2003. “Cell Polarity Pathways Converge and Extend to Regulate Neural Tube Closure.” *Trends Cell Biol* 13 (9): 451–54.

Apéndice I. Publicaciones

RESEARCH ARTICLE

The non-canonical Wnt-PCP pathway shapes the mouse caudal neural plate

Beatriz López-Escobar^{1,*}, José Manuel Caro-Vega^{1,*}, Deepthi S. Vijayraghavan², Timothy F. Plageman³, José A. Sanchez-Alcazar⁴, Roberto Carlos Moreno¹, Dawn Savery⁵, Javier Márquez-Rivas⁶, Lance A. Davidson² and Patricia Ybot-González^{1,7,‡}

ABSTRACT

The last stage of neural tube (NT) formation involves closure of the caudal neural plate (NP), an embryonic structure formed by neuromesodermal progenitors and newly differentiated cells that becomes incorporated into the NT. Here, we show in mouse that, as cell specification progresses, neuromesodermal progenitors and their progeny undergo significant changes in shape prior to their incorporation into the NT. The caudo-rostral progression towards differentiation is coupled to a gradual reliance on a unique combination of complex mechanisms that drive tissue folding, involving pulses of apical actomyosin contraction and planar polarised cell rearrangements, all of which are regulated by the Wnt-PCP pathway. Indeed, when this pathway is disrupted, either chemically or genetically, the polarisation and morphology of cells within the entire caudal NP is disturbed, producing delays in NT closure. The most severe disruptions of this pathway prevent caudal NT closure and result in spina bifida. In addition, a decrease in *Vangl2* gene dosage also appears to promote more rapid progression towards a neural fate, but not the specification of more neural cells.

KEY WORDS: Caudal neurulation, NMPs, NTDs, Wnt-PCP, Apical contraction, Tissue folding

INTRODUCTION

The organisation and reorganisation of epithelial sheets is a fundamental requirement for reaching developmental milestones such as gastrulation and neural tube (NT) closure, and for events effected by changes in cell shape. Epithelial cells are polarised along their apico-basal axis and are attached tightly to one another by lateral adhesions close to the apical surface of the cell. The tight binding of each epithelial cell to its neighbours means that the apical constriction of several cells will produce a fold in the epithelial

sheet. Such apical constriction also occurs to establish epithelial rosettes, which are transient arrangements of five or more epithelial cells around a central point that also contribute to tissue remodelling during development. Apical constriction is produced by contraction of the actomyosin meshwork in the apical domain of these cells, and it is believed to be the driving force for epithelial folding during organogenesis (reviewed by Fletcher et al., 2014; Siedlik and Nelson, 2015; Sutherland, 2016).

Planar cell polarity (PCP) lies perpendicular to the apico-basal axis, and it coordinates morphogenetic cell movements, cell shape and cell migration in an epithelial context, driving cell arrangements in many developing tissues, including the *Drosophila* wing and vertebrate NT (Tada and Kai, 2012; Nikolopoulou et al., 2017; Trichas et al., 2012). PCP is controlled by the Wnt-PCP pathway. The polarised intracellular distribution of Wnt-PCP pathway elements, such as *Vangl2*, *Celsr1* or *Shroom3*, seems to regulate the cytoskeletal dynamics and apical actomyosin contractility that drives cell movement (Mahaffey et al., 2013; McGreevy et al., 2015; Nishimura et al., 2012; Ossipova et al., 2015). Moreover, homozygous mutations in genes that encode core Wnt-PCP proteins impede the initiation of NT closure (a phenotype known as craniorachischisis) as a result of impairment in convergent extension (CE) movements (Nikolopoulou et al., 2017; Keller, 2002).

In vertebrates, the first evidence of central nervous system (CNS) formation is the thickening of an epiblast region anterior to the primitive streak (PS). Neurulation transforms the neural plate (NP) into a NT, the embryonic precursor of the brain and spinal cord. During the early shaping of the neural ectoderm, the prospective posterior neural cells intercalate along the mediolateral axis through CE movements to form a narrow, long midline. This structure ultimately gives rise to the notochord and the medial hinge point (MHP), the latter facilitating the elevation of the neural folds (Goto and Keller, 2002; Wallingford and Harland, 2002; Zohn et al., 2003). Both NP bending and NT closure involve CE movements, facilitated by changes in the actin cytoskeleton that drive apical constriction and that are regulated by RhoA (Kinoshita et al., 2008; Nishimura et al., 2012; Ybot-Gonzalez and Copp, 1999; Ybot-Gonzalez et al., 2007b).

Whereas actomyosin fulfils a crucial role in neurulation, different actin-dependent mechanisms appear to drive NT closure at distinct levels of the body axis. In fact, cranial closure in embryos is impaired when cytoskeletal dynamics are altered (Brouns et al., 2000; Stumpo et al., 1995; Xu et al., 1998). Indeed, actomyosin contractility within neuroepithelial cells is required for the initiation of NT closure and it is regulated by the Wnt-PCP pathway via RhoA (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999; Ybot-Gonzalez et al., 2007b), and Wnt-PCP homozygous and heterozygous mutant embryos have been shown to develop spina bifida (McGreevy et al., 2015; Paudyal et al., 2010; Andersson et al., 2010; Pinson et al., 2000; Suriben

¹Grupo de Neurodesarrollo, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla 41013, Spain.

²Department of Bioengineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA. ³College of Optometry, the Ohio State University, Columbus OH 43210, USA.

⁴Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), and CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, Sevilla 41013, Spain. ⁵Newlife Birth Defects Research Centre, Institute of Child Health, University College London, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK. ⁶Unidad de Gestión Clínica de Neurocirugía, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla 41013, Spain. ⁷Unidad de Gestión Clínica de Neurología y Neurofisiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla 41009, Spain.

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (pybot-ibis@us.es)

id B.L., 0000-0002-4338-1830; J.M.C., 0000-0003-4795-3485; R.C.M., 0000-0002-0700-3488; P.Y., 0000-0001-7836-2659

et al., 2009). Although many studies have focused on the mechanisms driving neural fold elevation and fusion of the dorsal part of the neural folds at the posterior neuropore (PNP), it still remains unclear how the last step of neurulation is coordinated in the caudal NP.

Rostro-caudal elongation of the mouse embryo benefits from the contribution of bipotent neuromesodermal progenitors (NMPs), cells derived from the caudal epiblast (Garriock et al., 2015; Henrique et al., 2015; Tzouanacou et al., 2009; Wymeersch et al., 2016). These dual-fated cells are progenitors of the caudal neuroectoderm and somatic mesoderm, indicating that induction and formation of the caudal NP is distinct from that of the anterior NP. Here, we aim to elucidate how the Wnt-PCP pathway controls different stages of specification and differentiation, ultimately

coordinating the shaping of the caudal NP, and investigate how interfering with this process affects caudal NT closure.

RESULTS

Different elements of the Wnt-PCP signalling pathway are expressed during spinal neurulation

We first set out to define the temporal and spatial expression of Wnt-PCP genes during the later stages of caudal NT closure. NT closure is completed by embryonic day (E) 10 and genes of the Wnt-PCP pathway were specifically detected in the most caudal part of the E9.5 embryo, including the PNP (e.g. *Wnt5a*, *Wnt3a*, *Vangl2*, *Prickle1*, *Gpc4* and *Ptk7*; Fig. 1A-E,K,L). Other Wnt-PCP genes, like *RhoA*, *Daam1* and *Shroom3*, were also expressed in the PNP, but in a more widespread pattern (Fig. 1M-O). Cross-sections of the

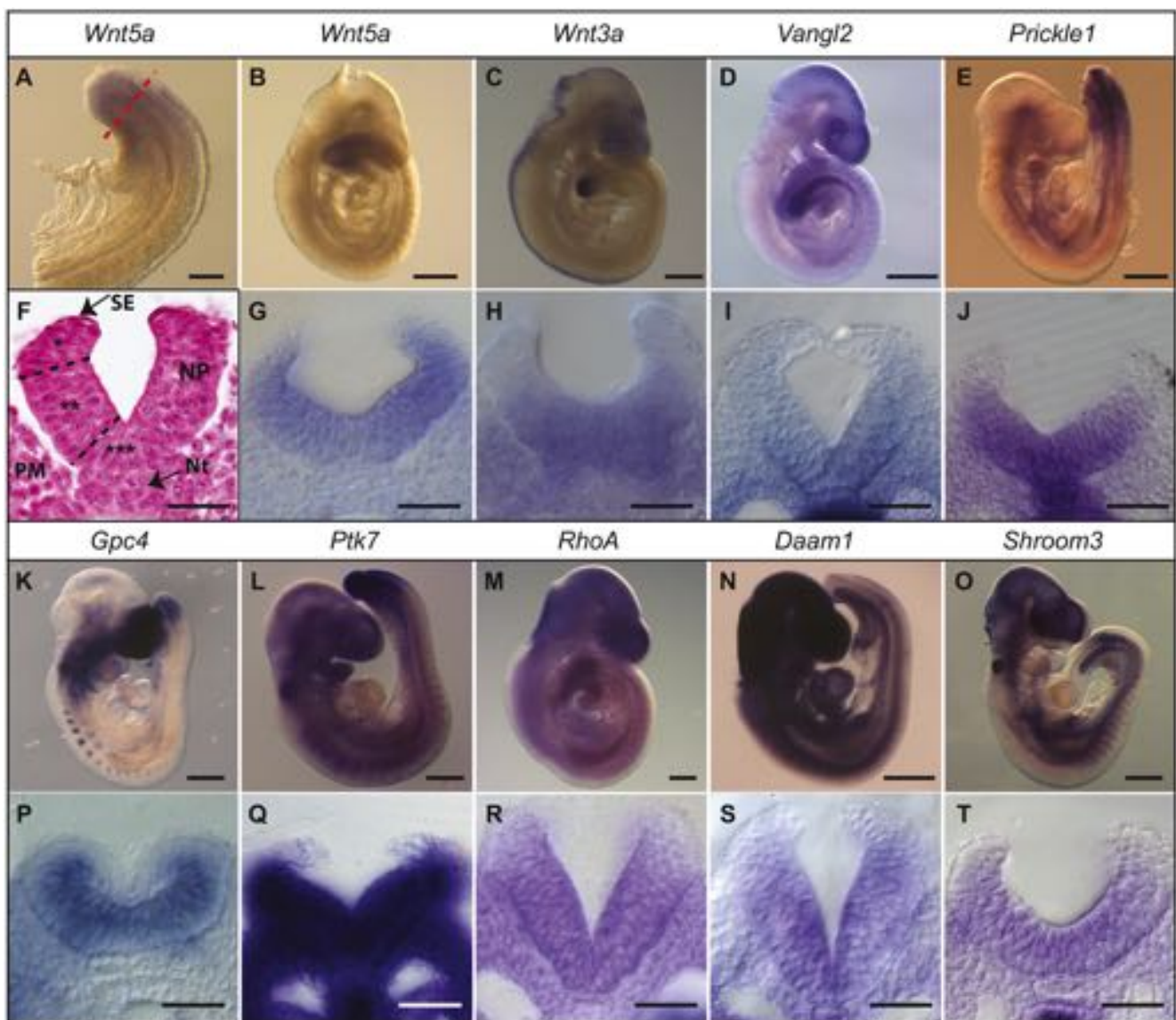


Fig. 1. Elements of the Wnt-PCP pathway expressed at the posterior neuropore. *In situ* hybridisation for *Wnt5a* (A,B,G), *Wnt3a* (C,H), *Vangl2* (D,I), *Prickle1* (E,J), *Gpc4* (K,P), *Ptk7* (L,Q), *RhoA* (M,R), *Daam1* (N,S) and *Shroom3* (O,T) in E9.5 mouse embryos (B-E,K-O) and corresponding transverse sections through the PNP at the level of the dashed line in A (F-J,P-T). In F, the main tissues and the domains of the neural fold are indicated: PM, paraxial mesoderm; NP, neural plate; Nt, notochord; SE, surface ectoderm. Single asterisk indicates DLHPs; double asterisk indicates the non-bending lateral neural plate; triple asterisk indicates the MHP. Scale bars: 200 μ m (A); 500 μ m (B-E,K-O); 50 μ m (F-J,P-T).

PNP revealed a broad distribution of these mRNAs across the NP, including the MHP, albeit weaker in the most dorsal part of the neural folds (Fig. 1F–J,P–T). These data indicate that Wnt signalling may be active in the PNP.

Alterations to the Wnt-PCP pathway affect actin distribution and the morphology of the PNP

Homozygous Wnt-PCP mutant embryos develop craniorachischisis, making it difficult to study the role of Wnt-PCP genes during the later stages of NT closure. Thus, heterozygous embryos are a better tool for studying caudal NT defects (NTDs). Analysis of the PNP in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos revealed similar *Rhoa* expression and stronger *Prickle1* expression in *Vangl2*^{+Lp} embryos along with weaker *Daam1* expression (Fig. S1A–C). Quantitative RT-PCR analysis was used to verify these results and to compare stage-matched embryos and although the expression of the genes in the Wnt-PCP pathway appeared to differ in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos, the fold change was not considered significantly different (Fig. S1D). These results suggest that the molecular basis of Wnt-PCP activation might involve other modifications, such as phosphorylation, as previously shown for members of this pathway (Maekawa et al., 1999; Shafer et al., 2011; Yang et al., 2017).

Transverse PNP sections from a *Vangl2*^{+Lp} embryo revealed morphological effects at E9.5 (Fig. 2A,D), as also observed at earlier stages (Fig. S2A,B). There was a significant outward flexure in the NP of these embryos, with the basal side juxtaposed to the paraxial mesoderm; this region of the neural fold should be straight, as seen in *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 2D,E, arrowheads; compare with Fig. 2A,B, Fig. S2B,E). This outward flexure is combined with a dorso-ventral reduction in the apico-basal width of the NP (Fig. S3A–C). Morphometric analysis of this region demonstrated that although the dorsal width is similar (46.5 μ m in *Vangl2*^{+/+} and 47.2 μ m in *Vangl2*^{+Lp}; Fig. S3A,B), the ventral width in *Vangl2*^{+Lp} embryos (37 μ m) was significantly narrower than in *Vangl2*^{+/+} embryos (40 μ m; Fig. S3B). Concomitantly, there was a 1.4-fold significant increase in the length of the neural fold in *Vangl2*^{+Lp} embryos (145.1 μ m) relative to *Vangl2*^{+/+} embryos (103.1 μ m; Fig. S3C), producing a significant difference in the length/ventral width ratio between *Vangl2*^{+Lp} and *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. S3D; for more data regarding the sample sizes and statistical analyses in all experiments, see Materials and Methods section and Table S7).

Such outward flexure of the neural folds and the decrease in neural fold width have been observed previously in embryos with altered actin dynamics (Grego-Bessa et al., 2015; Ybot-Gonzalez and Copp, 1999); we therefore assessed the actin microfilament distribution in the NT of *Vangl2*^{+Lp} embryos. As expected, actin microfilaments are distributed neatly along the apical side of the neural folds in *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 2B,C), whereas the actin belt was disrupted over the entire lumen of the *Vangl2*^{+Lp} PNP (Fig. 2E,F, Fig. S2D,E) and this disruption was substantially worse in *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos (Fig. S2C,F). In *Vangl2*^{+/+} embryos exposed to cytochalasin D (CytD), a potent inhibitor of actin polymerisation, the apical localisation of F-actin was disturbed and was associated with atypical bending of the lateral NP (Fig. 2G–I) similar to that observed in the neural folds of *Vangl2*^{+Lp} embryos. Thus, actin microfilaments are required to establish correct PNP morphology.

Activation of Wnt-PCP signalling induces the formation of the Dishevelled-Daam1-RhoA complex, and activates its downstream effector ROCK, leading to cytoskeletal remodelling (Habas et al., 2001, 2003). To analyse the role of actin microfilaments as specific

downstream elements in the Wnt-PCP pathway, we blocked ROCK activity with Y-27632. The PNP in *Vangl2*^{+/+} embryos treated with Y-27632 adopted a similar morphology to that in *Vangl2*^{+Lp} embryos, as described previously (Escuin et al., 2015), with an actin distribution similar to that observed in the NT of embryos treated with CytD (compare Fig. 2J–L with 2D–F and 2G–I). The neural folds of embryos treated with CytD and Y-27632, as in *Vangl2*^{Lp/+} embryos, underwent significant ectopic bending relative to *Vangl2*^{+/+} embryos ($P < 0.05$; Fig. S4).

The Wnt-PCP pathway drives the polarised subcellular accumulation of the contractile actomyosin network during cranial NT closure (Mahaffey et al., 2013; McGreevy et al., 2015; Nishimura et al., 2012; Ossipova et al., 2015). To reveal the distribution of actin in the apical plane of the caudal closing NP, the distribution of phalloidin was analysed in the PNP of flat-mount *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 2M). There was significantly weaker phalloidin staining in the *Vangl2*^{+Lp} embryo compared with its wild-type counterpart (Fig. 2N, Fig. S5). In the PNP, actin was organised into two different planar cell arrangements: linear alignment of neighbouring cells with F-actin condensed on one side of the cellular arrangement, forming actin cables (Fig. 2O*i*); or accumulation of actin at one vertex of individual cells (Fig. 2O*i*,P, Ti). In contrast to the cranial neural ectoderm, the actin cables in the PNP were all oriented in an anteroposterior direction, and they were restricted to the anterior PNP, mainly on the lateral side and corresponding to the neural fold juxtaposed to the paraxial mesoderm (88.5% lateral vs 11.5% central; Fig. 2M,O*i*,Q,R). However, significantly fewer linear cell arrangements were evident in *Vangl2*^{+Lp} PNPs, with variable orientation compared with their wild-type counterparts (Fig. 2N,O*ii*,Q–S). In addition, we observed a similar basal intensity of actin on the apical side of the boundary between cells but a significant loss of intensity in the polarised actin cumuli in *Vangl2*^{+Lp} embryos relative to *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 2T*ii*,U,V). Unlike the actin cables, these cumuli were distributed throughout the PNP.

Thus, *Vangl2* appears to be required for the apical and planar polarised distribution of actin microfilaments in the anterior part of the PNP where the neural folds elevate, and when this distribution is altered, morphological anomalies arise.

Altered PNP morphology as a consequence of mutations in the Wnt-PCP pathway leads to spina bifida

We next explored how the loss of *Vangl2* activity affects caudal neurulation. Analysis of *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos (summarised in Table S1) highlighted a tendency towards delayed NT closure in *Vangl2*^{+Lp} embryos in association with the altered morphology of the intermediate neural folds, although NT closure was not impeded (see Copp et al., 1994).

As craniorachischisis develops in *Vangl2*^{Lp/Lp} homozygous mutants, more severe knockdown of Wnt-PCP signalling was studied at later stages of NT closure in double *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+gt} mutants. *Daam1* belongs to the formin family of actin nucleators, and interacts with Dishevelled and RhoA in the Wnt-PCP pathway (Habas et al., 2001; Sato et al., 2006). No obvious phenotypic differences were observed in the NT of embryos from the three genotypes of the *Daam1* gene trap mouse line at E10.5–E14.5 (*Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/+}, $n=45$; *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+gt}, $n=79$; *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+/+}, $n=20$; Fig. 3A,C; data not shown). However, there was a higher incidence of spina bifida in the *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+gt} line (6/27, 22.22%; Fig. 3B,E) relative to *Vangl2*^{+Lp}/*Daam1*^{+/+} mice (1/16, 6.25%; Fig. 3D). Histological analysis revealed exacerbated angles of the neural folds at the

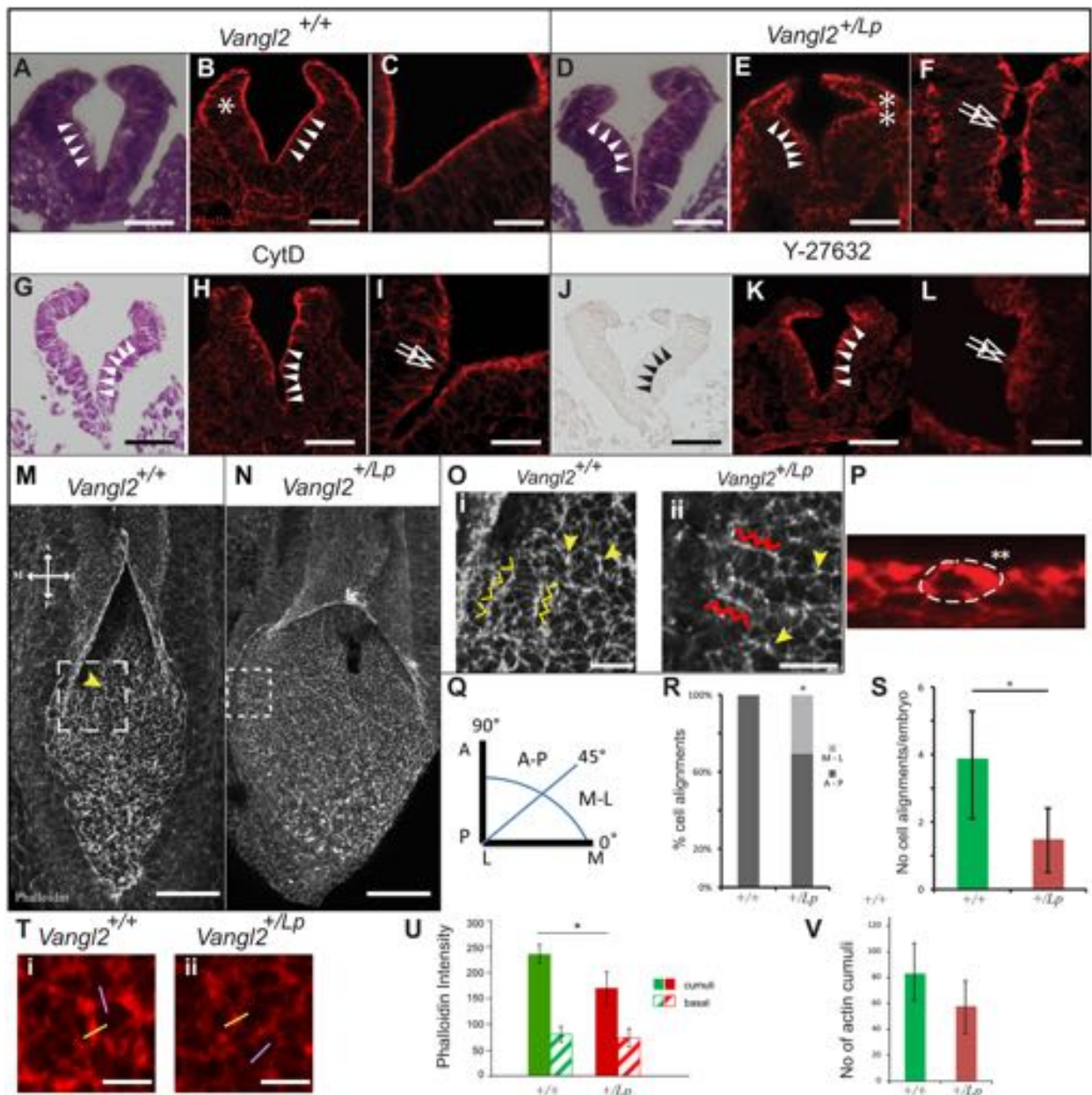


Fig. 2. Disrupted neural fold morphology and apical actin distribution in E9.5 *Vangl2*^{+/Lp} embryos, and in embryos treated with cytochalasin D and Y-27632. (A-L) Transverse sections through the PNP (see plane of the section in Fig. 1A) of *Vangl2*^{+/+} (A-C), *Vangl2*^{+/Lp} (D-F), cytochalasin D-treated *Vangl2*^{+/+} (G-I) and Y-27632-treated *Vangl2*^{+/+} (J-L) embryos. (A,D,G,J) H&E staining; (B,C,E,F,H,I,K,L) phalloidin labelling. Arrowheads in A and B indicate the straight wild-type neural fold; note, by contrast, the outward flexion induced by mutation or treatment (D,E,G,H,J,K). Asterisk in B marks the curved DLHP of *Vangl2*^{+/+} embryo; double asterisk in E marks the angle of the DLHP in the *Vangl2*^{+/Lp} embryos. White arrows in F,I,L point to disruption of the apical actin belt. (M,N) Dorsal views of phalloidin-stained flat-mount PNPs from *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos, respectively. (O-I) Magnification of the boxed areas in M and N, respectively. Yellow/red carets indicate cables of F-actin condensation on one side of aligned cells (mediolateral in Oi; anteroposterior in Oii); yellow arrowheads indicate cumuli of F-actin at one vertex of individual cells. (P) Orthogonal view of the cell marked in M by the yellow arrowhead, and outlined here, with a double asterisk marking the area of polarised actin cumuli. (Q) Diagram of cell alignment relative to the mediolateral axis of the embryo (0–45°, mediolateral orientation; 45–90°, anteroposterior orientation). (R) Proportion of cell alignments in anteroposterior (A-P; dark grey) or mediolateral (M-L; light grey) orientation (A-P orientation: 100% in *Vangl2*^{+/+} vs 69.23% in *Vangl2*^{+/Lp} embryos; **P*<0.05). (S) Number of cell alignments in *Vangl2*^{+/+} (3.71 lines/embryo) and *Vangl2*^{+/Lp} (1.4/embryo) embryos. (T,ii) Magnification of an area of phalloidin-stained PNP showing an actin cumulus in *Vangl2*^{+/+} (Ti) and *Vangl2*^{+/Lp} (Tii) embryos. (U) Phalloidin intensity of the plot profile obtained from selected ROIs crossing the actin cumuli (solid bar) and basal actin at the linear boundary of two neighbouring cells (striped bar; yellow lines and purple lines, respectively, in Ti and Tii). (V) Graph of the number of actin cumuli in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} embryos. Error bars represent s.e.m. **P*<0.05. Scale bars: 50 μ m (A,B,D,E,G,H,J,K,M,N); 25 μ m (C,F,I,L); 12.5 μ m (O,i,Oii); 6.25 μ m (T,i,Tii).

dorsolateral hinge points (DLHPs) in *Vangl2*^{+/Lp}/*Daam1*^{+/gt} embryos with spina bifida at E10.5, contrasting with the straight lateral sides of the NT associated with the closed PNP in

Vangl2^{+/+}/*Daam1*^{+/gt} embryos (Fig. 3F,G). Indeed, the phenotype of the *Vangl2*^{+/Lp}/*Daam1*^{+/gt} embryos was reminiscent of the early *Vangl2*^{+/Lp} neural fold malformations (Fig. 2D). The straight region

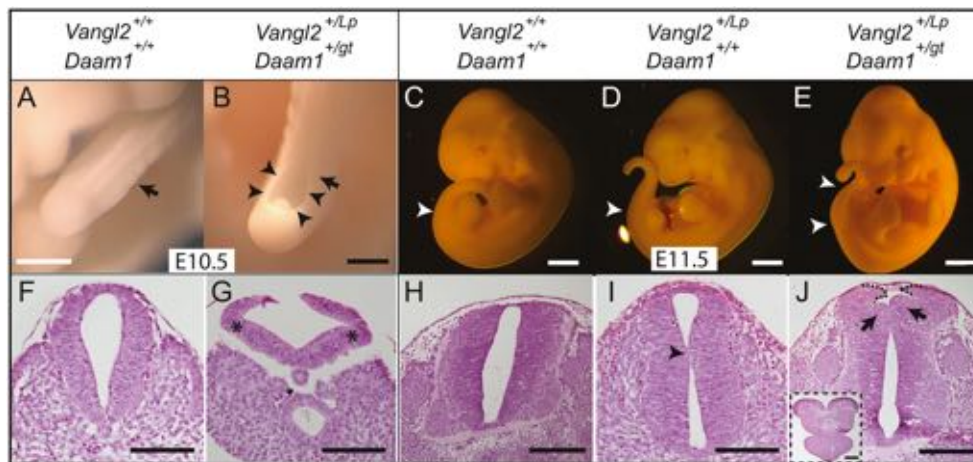


Fig. 3. Downregulation of Wnt-PCP signalling leads to spina bifida. (A–J) E10.5 (A, B) and E11.5 (C–E) embryos of the indicated genotypes and corresponding H&E-stained transverse sections through the caudal region (F–J). Black arrows in A and B indicate the transverse section level shown in F and G, respectively. Arrowheads in B indicate spina bifida. White arrowheads in C–E indicate the level of the transverse sections in H–J, as well as the spina bifida in E. Top arrowhead corresponds to the axial level for the section in the inset in J and bottom arrowhead corresponds to the axial level of the section in J. Asterisks in G mark DLHP of the neural folds, with an exacerbated angle. Black arrowhead in I indicates an outward kink. Black arrows in J indicate aberrant dorsal bending on both sides of the distorted neural tube. Dotted line indicates unfused dorsal tips of neural folds. Inset in J shows a section through the open spina bifida at the level marked by the top arrowhead in E. Scale bars: 50 μ m (A, B); 1 mm (C, D); 100 μ m (F, G, I); 200 μ m (H, J, J inset).

of the NT of E11.5 *Vangl2*^{+/+}/*Daam1*^{+/+} embryos (Fig. 3H) has a slight outward kink in *Vangl2*^{+/Lp}/*Daam1*^{+/+} embryos (Fig. 3I), whereas the sections anterior to the open NT displayed a characteristic malformation of the dorsal part of the lateral NT in *Vangl2*^{+/Lp}/*Daam1*^{+/gt} embryos with spina bifida (Fig. 3J). Thus, exacerbated outward flexion of the neural fold may be responsible for the failure in dorsal closing (Fig. 3J, inset).

Our results indicate that disrupted PCP-Wnt signalling affects neural fold morphology, inducing aberrant bending that separates the dorsal tips of the neural folds and impedes correct caudal NT closure, inducing spina bifida.

Disruption of the Wnt-PCP pathway affects apical cell morphology

Cadherins, together with β -catenin in adherens junctions and ZO1 (Tjp1) at tight junctions, regulate cytoskeletal actin assembly, anchoring the actomyosin cytoskeleton to the cell membrane before apical constriction in these cells (Nishimura and Takeichi, 2009). Thus, we assessed whether the apical region of the cell is distorted in the lateral neural fold as a consequence of disrupting Wnt-PCP signalling or actin polymerisation. N-cadherin (Cdh2) can be controlled by *Vangl2* (Nagaoka et al., 2014) and its distribution in adherens junctions is disrupted in the neural folds of *Vangl2*^{+/Lp} embryos, as well as in embryos treated with CytD and Y-27632 (Fig. 4A–D). Similar disruption of ZO1 and β -catenin was observed (Fig. S6). To quantify the apical cell arrangement, we used either a tilted section or a 3D image of 50- μ m-thick sections of the elevating neural folds immunolabelled for ZO1. The mean apical area of the closing neural fold cells in *Vangl2*^{+/Lp} and *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos increased significantly with respect to the *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 4E–I). Similarly, embryos treated with either CytD or Y-27632 reproduced the phenotype of *Vangl2* mutant embryos (Fig. 4E–M; summarised in Table S2). This expansion in the apical cell surface area due to actin microfilament disorganisation could explain the inappropriate bending of the neural folds in these embryos.

Together, these data indicate that *Vangl2* shapes the neural folds by regulating apical actomyosin recruitment and intercellular adhesion.

The Wnt-PCP pathway controls shaping of the PNP by apical cell constriction and cell reorganisation into rosettes

Having established that the apical face of the closing neural folds is affected in *Vangl2*^{+/Lp} and *Vangl2*^{Lp/Lp} embryos, we investigated the origin of the morphological NP malformation. A dorsal view of the PNP revealed *Vangl2* and *Daam1* expression in the lateral and more caudal PNP (Fig. S7A, B), a distribution similar to but more dispersed than that of *RhoA* (Fig. S7C). The caudal NP was very proliferative (Fig. S7D). We studied the apical cell domain in the entire PNP, which includes the node-streak border and the caudal lateral epiblast (hereafter NSB/CLE). NMPs originate in this region (neural cell precursors; Fig. 5E), as well as in the pre-NT (PNT) where the neural folds start to elevate and that mostly houses NMPs (Fig. 5E; Henrique et al., 2015; Wymeersch et al., 2016). ZO1 staining of E9.5 *Vangl2*^{+/+} embryos ($n=6$) highlighted the apical cell organisation in the PNP (Fig. 5A). Maximum projections of confocal images were segmented to obtain the area of the apical cell domain, the presence of rosettes, and the number of vertices and their order (number of cells that meet at that vertex). The PNT was divided into two zones (see Fig. 5E), a central zone that included the midline and a peripheral zone that takes in the neural folds. Surprisingly, the mean apical cell area did not differ between the two zones (7.35 μ m² and 7.46 μ m², respectively), the average in the PNT being 7.43 μ m. However, the average cell size in the NSB/CLE was 11.5 μ m², with a significant increase in the apical domain of the cells from the NSB/CLE compared with the PNT (see Table S3). Hence, apical cell contraction appears to occur in a caudal-rostral direction.

Multicellular rosettes have been correlated with the epithelial cell rearrangements that drive CE in many species (Lienkamp et al., 2012; McGreevy et al., 2015). Cells formed rosettes within the PNP of *Vangl2*^{+/+} embryos; however, their distribution across the PNP was not uniform, and they were more concentrated in the PNT (16.6%) than in the NSB/CLE (8.1%; Table S3). When we analysed the two regions that form the PNT, we observed similar proportions in both zones (17.6% rosettes in the central and 16% in the peripheral zone). Rosette formation is associated with a reduced apical area, a process linked to tissue folding during morphogenesis

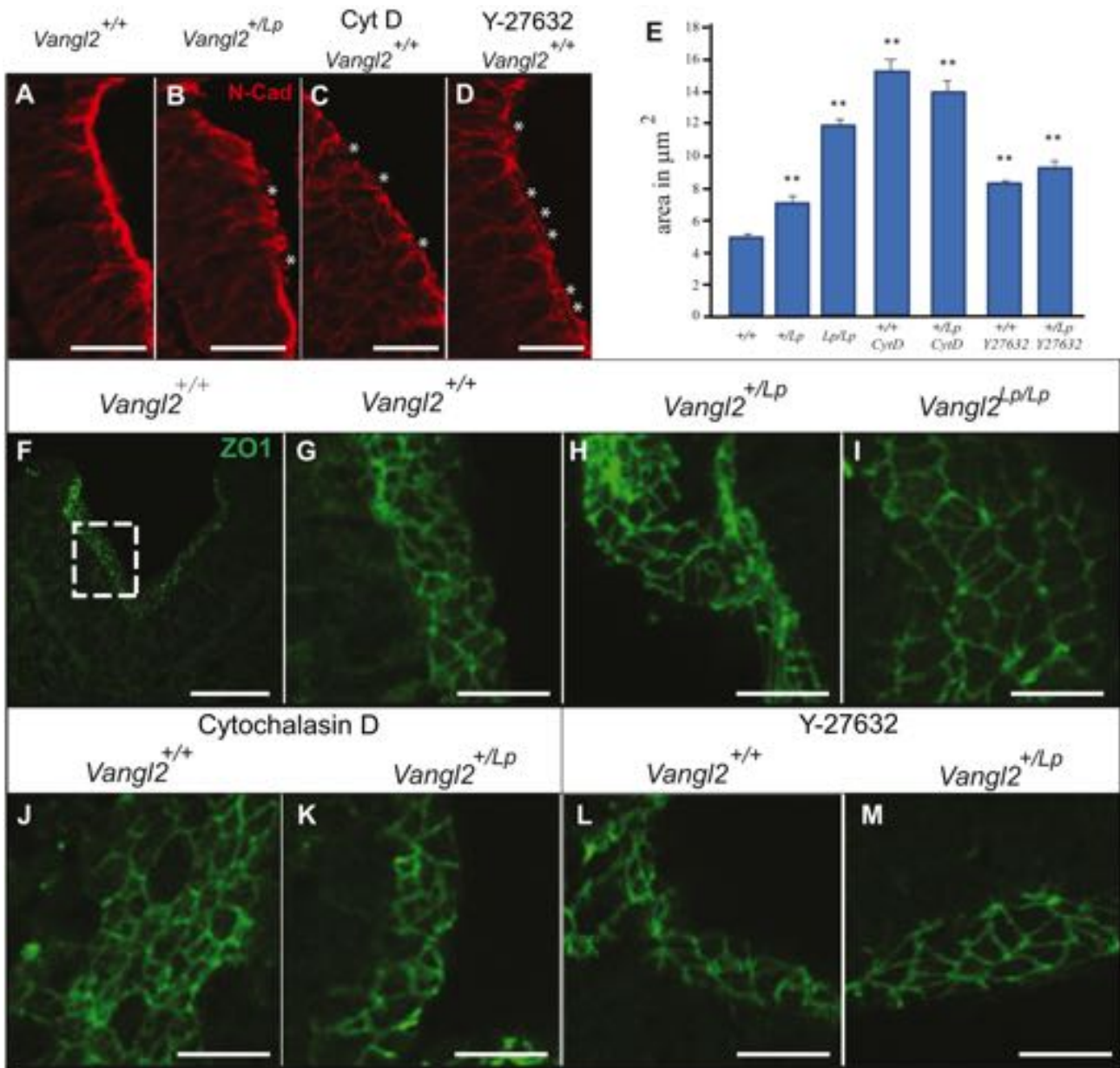


Fig. 4. Planar cell arrangement in the neural folds is disrupted in *Vangl2*^{+Lp}, *Vangl2*^{Lp/Lp}, CytD- and Y-27632-treated embryos. (A-D) Transverse neural fold sections from *Vangl2*^{+/+} (A), *Vangl2*^{+Lp} (B), CytD-treated (C) and Y-27632-treated (D) embryos immunolabelled for N-cadherin. Asterisks in B-D indicate disruption of apical N-cadherin. (E) Average apical cell area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{s.e.m.}$) in *Vangl2*^{+/+} (+/+), *Vangl2*^{+Lp} (+/Lp), *Vangl2*^{Lp/Lp} (Lp/Lp), CytD- and Y-27632-treated embryos. ** $P < 0.001$ compared with *Vangl2*^{+/+}. (F-M) Transverse sections of the PNP of the indicated genotypes, untreated or treated with cytochalasin D or Y-27632, immunolabelled for ZO1. Dashed box in F indicates the apical side of the neural fold and the region where the apical areas were measured in all embryos. Scale bars: 50 μm (A,B,F); 25 μm (C,D); 12.5 μm (G-M).

(Harding et al., 2014). Indeed, there was a reduction in the average apical cell area in the PNT when cells forming rosettes were analysed separately (from $7.65 \mu\text{m}^2$ to $6.28 \mu\text{m}^2$; Fig. 5B,I, Table S3). Thus, apical constriction of cells in the entire caudal neural ectoderm elicits bending of the PNP in association with cellular rosette formation, which progresses in a caudo-rostral direction.

Interestingly, there was a significant increase in apical cell area in the PNT of *Vangl2*^{+Lp} embryos ($n=4$) relative to *Vangl2*^{+/+} embryos (a 1.5-fold increase), which was also evident in the cells that form rosettes (Table S3, Fig. 5I). This 1.5-fold increase in apical

cell size was also observed in the NSB/CLE (Table S3). Moreover, the *Vangl2*^{+Lp} PNT had significantly fewer rosettes than did *Vangl2*^{+/+} embryos, as well as fewer higher order rosettes (rosettes formed by more than five cells in the vertex; Fig. 5C,D,F-H, Table S3). When we analysed the sub-zones of the PNT, although both had significantly fewer rosettes than *Vangl2*^{+/+} embryos, there was a significantly lower proportion of rosettes (6.7%) in the peripheral zone than in the central zone (8.7%; Table S3). This reduction of rosettes in the *Vangl2*^{+Lp} PNT also affected the NSB/CLE area, where only 3.1% of rosettes were located and no higher order rosettes were observed (Fig. 5H). Thus, the morphological

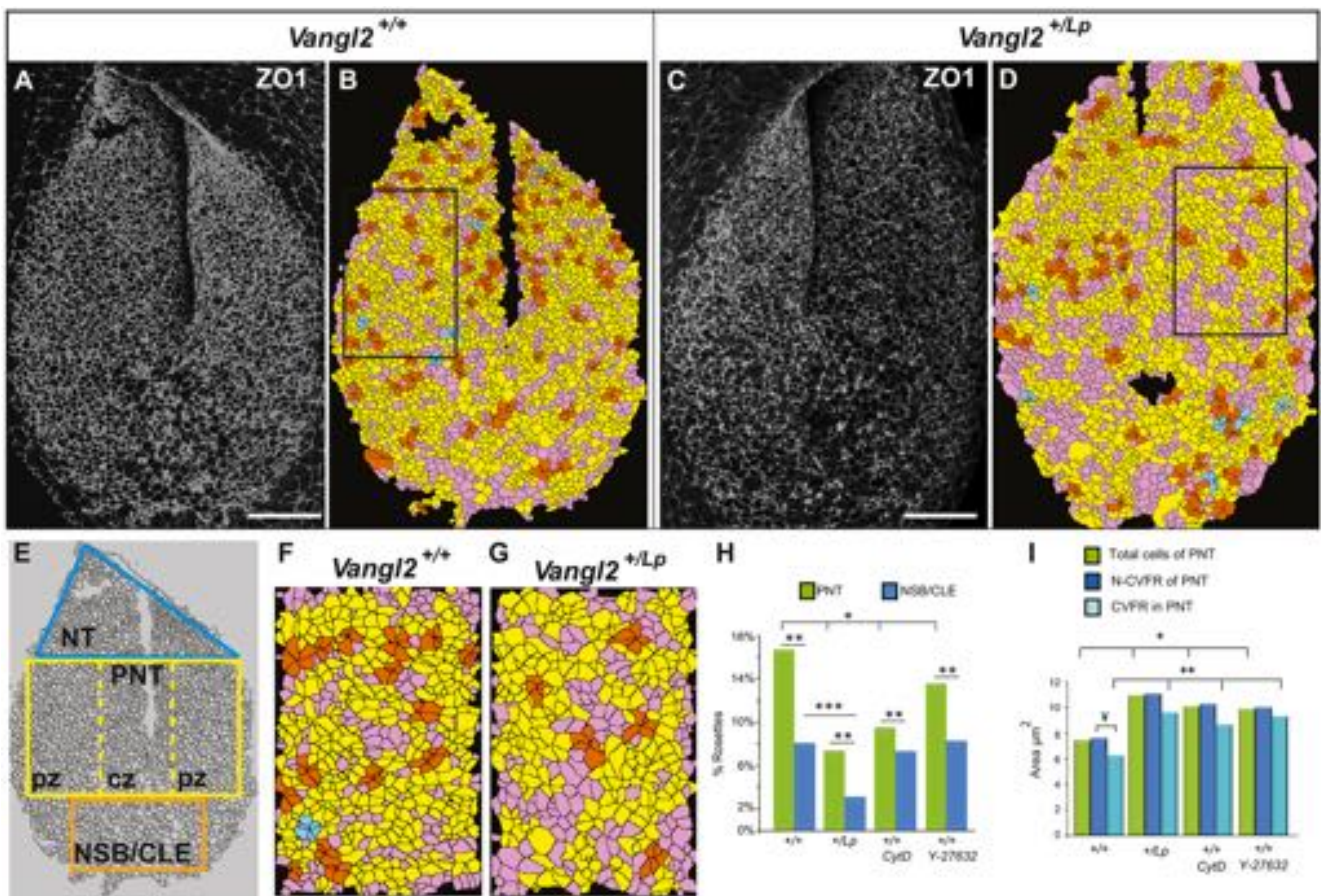


Fig. 5. Altered apical cell constriction and cell reorganisation into rosettes at the PNP of *Vangl2*^{+/*Lp*}, *Vangl2*^{*Lp/Lp*}, *CytD*- and *Y-27632*-treated embryos. (A-D) Dorsal views of the PNP of E9.5 *Vangl2*^{+/*+*} (A,B) and *Vangl2*^{+/*Lp*} (C,D) embryos. (A,C) ZO1 immunolabelling. (B,D) Confocal images segmented with Seedwater Segmenter, and imported to ImageJ to define the rosettes. Cells were colour-coded based on the number of cells that meet at shared vertices: orange, 5-cell rosette; blue, 6-cell rosette. Cells that shared vertices with 4 or 3 cells are in yellow and pink, respectively (not considered rosettes). (E) Diagram illustrating the regionalisation of the PNP: NT, neural tube; PNT, preneural tube; pz, peripheral zones; cz, central zone; NSB/CLE, the node-streak border and the caudal lateral epiblast. (F,G) Magnifications of the PZ (outlined in B and D, respectively). (H) Percentage of cells in rosettes in the PNT and in the NSB/CLE under the four different conditions. (I) Mean apical cell area (μm^2) in the PNT, differentiating between: total cell population; cells not forming rosettes (N-CVFR); cells with a vertex forming rosettes (CVFR) in the four different conditions. Symbols all indicate significant differences ($P < 0.05$) between specific cell populations as indicated by the brackets. Scale bars: 50 μm .

changes in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos resulting from altered apical constriction generates 1.5-fold larger apical areas in the entire PNP and fewer multicellular rosettes, leading to a 1.4-fold increase in the length of the neural fold (Fig. S3D).

CytD ($n=4$; Fig. S8A,B) and *Y-27632* ($n=4$; Fig. S8C,D) also increased the apical cell area in the PNT, and the number of cells forming rosettes (Fig. 5I, Table S3), indicating that the alterations in *Vangl2*^{+/*Lp*} embryos were provoked by actin microfilament disorganisation. *CytD* and *Y-27632* also significantly reduced the total number of rosettes per PNT and NSB/CLE relative to *Vangl2*^{+/*+*} embryos (Fig. 5H, Table S3).

The molecular motor non-muscle myosin-II heavy chain (MHC-II), together with F-actin, is involved in apical constriction. Immunolabelling revealed a scattered distribution of MHC-II in the *Vangl2*^{+/*+*} PNP, with more concentrated expression in the NSB/CLE area (Fig. 6A, Fig. S9A), a distribution distinct to that in the cranial NT (McGreevy et al., 2015). The *Vangl2*^{+/*Lp*} PNP exhibited a more abundant and intricate MHC-II meshwork, although some individual cells were also observed (Fig. 6D, Fig. S9B). *Vangl2* lies downstream of Wnt-PCP and it regulates Rho

kinases, which phosphorylate myosin light chain, the key regulator of non-muscle myosin-II (Ybot-Gonzalez et al., 2007b; Etienne-Manneville and Hall, 2002). In *Vangl2*^{+/*+*} embryos, phosphorylated myosin-II (p-MLC) was found to be condensed either medioapically or in pairs of cumuli in neighbouring cells forming dense supracellular p-MLC-actin structures (Fig. 6G-I'). Interestingly, a similar apical localisation of p-MLC has been described for apical contractile pulses during *Drosophila* gastrulation (Martin et al., 2009; Mason et al., 2013; Vasquez et al., 2014). By contrast, *Vangl2*^{+/*Lp*} cells in the PNP accumulated p-MLC across the entire apical domain, in both the junctional and apical domain and they failed to concentrate medioapically. Although similar numbers of p-MLC pairs formed in *Vangl2*^{+/*Lp*} as in *Vangl2*^{+/*+*} embryos, there was an abnormal distance between them (*Vangl2*^{+/*Lp*} 1.85 μm vs *Vangl2*^{+/*+*} at 1.34 μm ; $P < 0.05$; Fig. 6J-M).

Hence, the continuous shaping of the PNP appears to be initiated in the most caudal part of the wild-type PNP, mainly involving actomyosin apical cell constriction, probably caused by pulse contraction. Towards more anterior regions of the PNP, and in

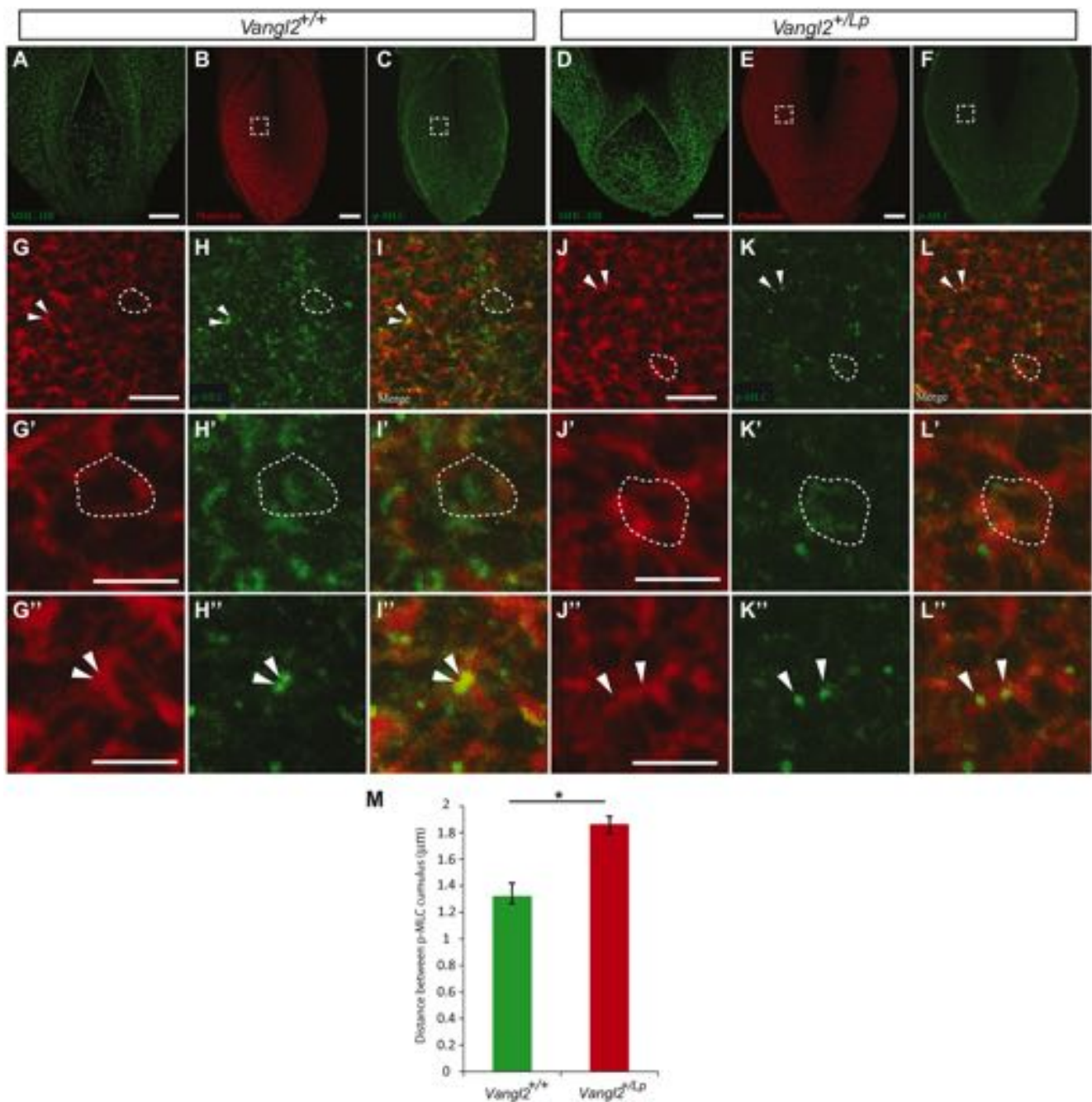


Fig. 6. Mutation of the *Vangl2* gene disrupts the supracellular actomyosin meshwork. (A-L'') Dorsal view of PNP from *Vangl2*^{+/+} (A-C) and *Vangl2*^{+/Lp} (D-F) embryos labelled with anti-MHC-IIB (A,D), phalloidin (B,E) or anti-p-MLC (C,F). G, H, J and K are magnifications of the insets in B, C, E and F, respectively; I and L are merged panels of G,H and J,K, respectively; H'-I' are medioapical condensations of p-MLC in a cell outlined in G-I; K'-L' show the failed medioapical condensation of p-MLC evident at the junction and dispersed p-MLC indicated by the dashed outline in J-L. G''-I'' (*Vangl2*^{+/+}) and J''-L'' (*Vangl2*^{+/Lp}) show paired cumuli of p-MLC, as marked by the arrowheads in G-L. (M) Difference between the distance of paired p-MLC cumuli in the *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+/Lp} PNT. **P*<0.05. Error bars indicate s.e.m. Scale bars: 50 μm (A-F); 12.5 μm (G-L); 6.25 μm (G'-L'').

conjunction with the differentiation process, more complex mechanisms of tissue folding are acquired, all regulated by the Wnt-PCP pathway.

NMP fate in the PNP is not determined by the *Vangl2* genotype

In addition to the average increase in the apical cell area, we found a population of cells in the PNT of *Vangl2*^{+/Lp} embryos that were

generally bigger than the larger cells in *Vangl2*^{+/+} embryos; these large cells are referred to hereafter as 'giant cells' ($\geq 13 \mu\text{m}^2$; Fig. 7A). The giant cells in *Vangl2*^{+/+} embryos are mainly located in the NSB/CLE where 40% of the population were giant cells, compared with 21% in the PNT. We investigated whether this reduction follows a caudo-rostral progression by analysing the most anterior region of the PNP, the NT (Fig. 5E), in which giant cells represent only 15.6% of the population. Giant cells were more

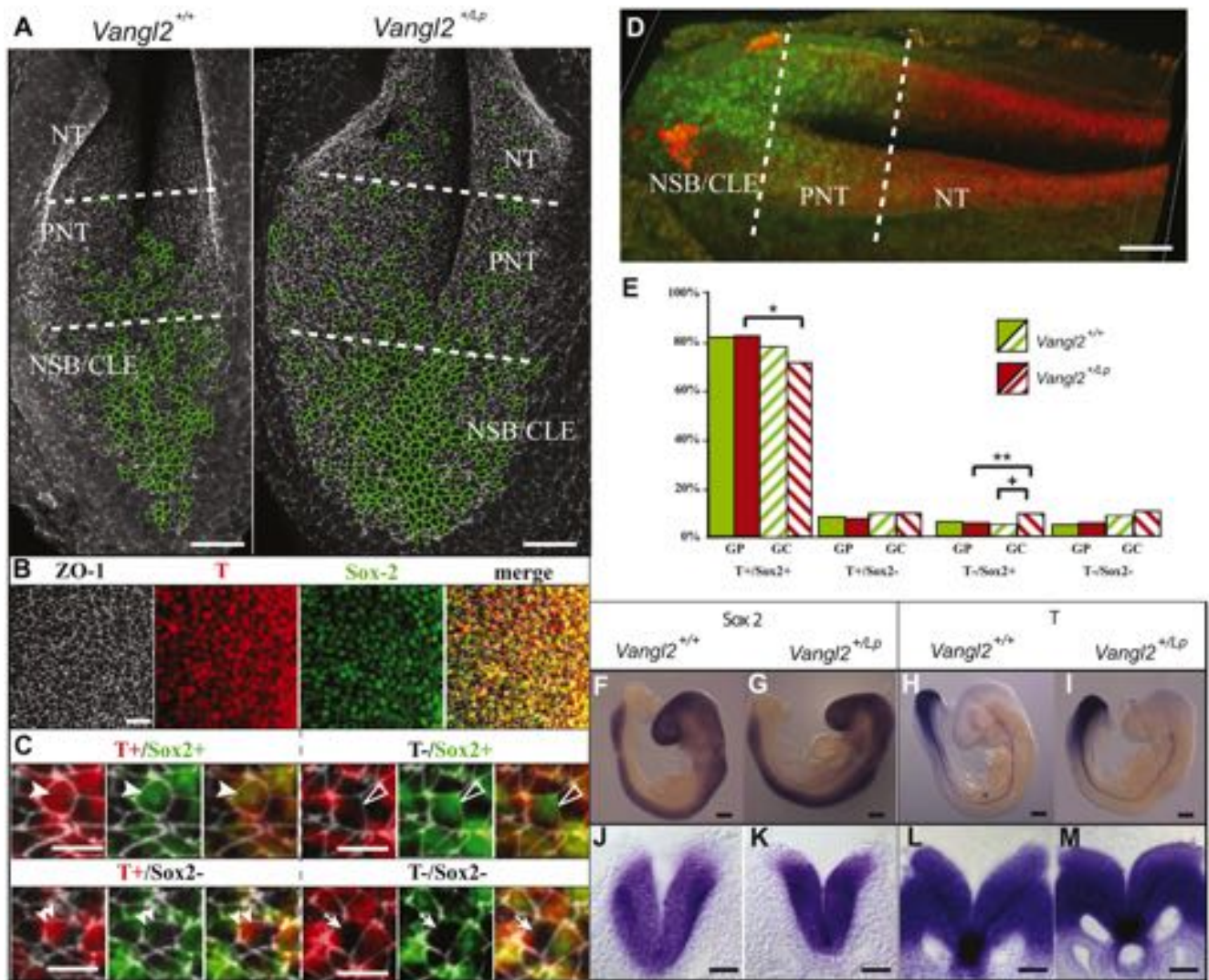


Fig. 7. The progressive differentiation of neuromesodermal progenitors in the PNP is not affected by *Vangl2* heterozygosity. (A) Dorsal view of the PNP of E9.5 *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos immunolabelled for ZO1 (grey), with giant cells ($\geq 13 \mu\text{m}^2$) outlined in green. (B) Immunolabelling for ZO1 (grey), T (red), Sox2 (green) and the merged image in a section of the PNT showing the four cell types. (C) Magnification of NMPs (T⁺/Sox2⁺, arrowheads), neural cells (T⁻/Sox2⁺, open arrowheads), mesodermal cells (T⁺/Sox2⁻, double arrowheads) and unidentified cells (T⁻/Sox2⁻, arrows). In each set of images, left-hand panel shows ZO1/T immunolabelling, middle panel ZO1/Sox2 immunolabelling and right-hand panel ZO1/T/Sox2 merged images. (D) 3D image of the PNP labelled with Sox2 (red) and T (green). (E) Graph of the different cell types in the PNT of *Vangl2*^{+/+} (green) and *Vangl2*^{+Lp} (red) embryos in both the general population (GP, solid bars) and in the subpopulation of giant cells (GC striped bars). * $P < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁺/Sox2⁺ cells in the GC population compared with the general population of the PNT in *Vangl2*^{+Lp} embryos; ** $P < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁻/Sox2⁻ cells in the GC population compared with the general population of the PNT in *Vangl2*^{+Lp} embryos; * $P < 0.05$, significant difference between the percentage of T⁻/Sox2⁺ cells in the GC population of the *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos. (F-I) *In situ* hybridisation of Sox2 (F,G) and T (H,I) expression in *Vangl2*^{+/+} (F,H) and *Vangl2*^{+Lp} embryos (G,I), and the corresponding transverse sections through the PNP (J-M). The divisions of the PNP (NT, PNT and NSB/CLE) are defined in A and D. Scale bars: 25 μm (A); 12.5 μm (B); 6.25 μm (C); 50 μm (D,J-M); 200 μm (F-I).

abundant and widespread in *Vangl2*^{+Lp} than in *Vangl2*^{+/+} embryos, representing 57% of the total population in the NSB/CLE, 42% in the PNT and a 31.3% in the NT (Fig. 7A). Thus, there was a caudal-rostral reduction in the proportion of giant cells in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos.

The distribution of giant cells in the PNP resembles that of MHC-II (Fig. S9A). In fact, whereas 30.8% of the giant cells in the *Vangl2*^{+/+} PNP were MHC-II positive, this figure increased significantly to 75.7% in the PNP of *Vangl2*^{+Lp} embryos. In the small cell population (apical area $< 13 \mu\text{m}^2$) the apical accumulation of MHC-II did not vary between these two genotypes (20.3% in *Vangl2*^{+/+} and 22.97% in *Vangl2*^{+Lp}; Fig. S9A-D).

The rostral and lateral part of the CLE houses NMPs (Wymeersch et al., 2016), which initially express both T (mesoderm marker) and Sox2 (neural marker) (Tsakiridis et al., 2014). The downregulation of Wnt promotes neural differentiation (van de Ven et al., 2011) and, thus, we analysed the nature of the giant cells to determine whether the *Vangl2* mutation also affected the development and differentiation of NMPs in the PNP. *z*-stacks of confocal images demonstrated that NMPs (T⁺/Sox2⁺) constituted 82% of the PNT in *Vangl2*^{+/+} embryos, whereas 8% of the cells had already differentiated towards a mesodermal fate (T⁺/Sox2⁻) and 5.6% to a neuronal fate (T⁻/Sox2⁺) (4.4% of the cells were of unknown nature as they were T⁻/Sox2⁻; Fig. 7B-D; Movie 1). Similar

proportions were detected in the homologous region of *Vangl2*^{+Lp} embryos (82.1% T⁺/Sox2⁺; 7.3% T⁺/Sox2⁻; 5.2% T⁻/Sox2⁺; 5.4% T⁻/Sox2⁻) indicating that NMP fate in the PNT was not affected by the *Vangl2* genotype (Fig. 7E, Table S4).

NMPs had a significantly larger apical cell area than cells that differentiated further in *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{+Lp} embryos (Table S4). However, all cell types in the *Vangl2*^{+Lp} embryos had a larger apical area than their counterparts in the *Vangl2*^{+/+} embryos. The PNT contained more giant neural cells (T⁻/Sox2⁺) in *Vangl2*^{+Lp} than *Vangl2*^{+/+} embryos (Fig. 7E, Table S4). Indeed, NMPs were under-represented within the PNT of the *Vangl2*^{+Lp} embryos, whereas neural cells were over-represented among the giant cells relative to the general population (Fig. 7E, Table S4). Finally, the extent and intensity of *T* and *Sox2* mRNA expression was not altered in the *Vangl2*^{+Lp} embryos relative to their *Vangl2*^{+/+} littermates (Fig. 7F-M). In summary, the differentiation of NMPs does not appear to be altered in the PNP of *Vangl2*^{+Lp} embryos, although the increased apical cell size of PNP cells in *Vangl2*^{+Lp} embryos apparently has a stronger impact on neural cells.

DISCUSSION

The role of the Wnt-PCP pathway during neurulation has become clearer in recent years. Mice carrying mutations in certain Wnt-PCP genes develop craniorachischisis, demonstrating the importance of this pathway in the formation of the NP midline and in the initiation of NT closure, fuelling interest as to how the Wnt-PCP pathway influences these events. Here, we describe the cell behaviour underlying the folding of the caudal neural ectoderm and we identify distinct apical mechanisms that are acquired gradually, showing that Wnt-PCP is required to coordinate such cellular reorganisation. We also demonstrate the caudo-rostral dynamics of progression towards cell differentiation (Henrique et al., 2015). These observations define sequential epithelial tissue dynamics unique to the caudal NP, and the role of Wnt-PCP signalling in the closure and differentiation of the spinal NT.

All cell types participate in the dynamic apical mechanisms that shape the PNP

Two morphological processes are active during NT closure in mice: inflection of the cranial neural tissue where the neural folds begin and where they are well separated; and zipping from the point of closure to close the neuropore (Galea et al., 2017; Massarwa and Niswander, 2013). However, zipping is an anteroposterior process that fuses the dorsal neural folds, whereas for the PNP to achieve an appropriate shape it must first undergo posterior-to-anterior folding. Here, we show that the apical plane of the caudal NP has a continuous network of tight and adherens junctions at the apical cell borders (marked by ZO1, F-actin and N-cadherin), unifying the precursors and more differentiated cells in the PNP, and allowing the tissue to fold into a tube. In addition, we describe a progressive acquisition of more complex mechanisms of apical constriction in conjunction with caudo-rostral dynamics of cell differentiation (Henrique et al., 2015).

In the caudal part of the PNP we found that actomyosin contraction seems to be the main mechanism responsible for folding, which is maintained to a lesser extent in the anterior regions of the PNP. The presence of paired p-MLC cumuli in adjacent cells, colocalising with actin cumuli, suggests the existence of supracellular p-MLC-actin foci. The stability of these foci is perturbed in the *Vangl2*^{+Lp} PNP, probably owing to the loss of intercellular cytoskeletal and cell adhesion integrity. These supracellular p-MLC-actin foci appear to be analogous to the

punctuated actin contractions regulated by the Wnt-PCP pathway during *Xenopus* gastrulation (Kim and Davidson, 2011). Moreover, the distribution of MHC-IIB and the medioapical condensation of p-MLC in the PNP resemble the myosin assembly and disassembly cycles associated with apical pulses of constriction during *Drosophila* gastrulation (Martin et al., 2009; Mason et al., 2013; Vasquez et al., 2014). These cycles of myosin are affected in *Drosophila* mutants with modified myosin phosphorylation. These mutants display more continuous apical myosin-IIB assembly that alters the apical F-actin distribution and decreases the rate of apical constriction (Vasquez et al., 2014). Thus, we propose that myosin-IIB assembles apically and forms crosslinks with the apical F-actin network to induce apical contraction, which is followed by its disassembly. The disorganisation of F-actin evident in *Vangl2*^{+Lp} embryos would produce a more continuous apical distribution of myosin-IIB that is unable to bind to the F-actin network or to coalesce medioapically, and that fails to bring together supracellular p-MLC-actin cumuli. This disorganisation will reduce the rate of apical contraction, as seen in the giant cells of the *Vangl2*^{+Lp} embryos. PNP cells may undergo pulsatile rather than continuous contraction to accommodate the cytoskeletal organisation of a tissue undergoing differentiation. Such contractions would remodel the actomyosin networks in pulses, not only to shape the tissue but also altering the cellular patterning of the tissue, generating a morphogenetic neuroepithelium as suggested previously (Vasquez et al., 2014). These events deserve further study to characterise the underlying cell behaviours.

There is a gradual caudo-rostral formation of Wnt-PCP-dependent cellular rosettes, with fewer rosettes forming when this pathway is disrupted (Trichas et al., 2012). Indeed, we found that *Vangl2*^{+Lp} embryos generate fewer and less complex epithelial rosettes, with the peripheral zone the most affected region of the PNT. Cadherins, linked to and dependent on a well-structured F-actin network, are key elements in the cell intercalation that occurs during epithelial rosette formation (Blankenship et al., 2006; Mason et al., 2013). Indeed, N-cadherin and/or Shroom3 downregulation expands the apical cell surface, producing a loss of apical F-actin and a failure of NT closing, reinforcing the role of N-cadherin in apical constriction (Morita et al., 2010; Nandadasa et al., 2009; Plageman et al., 2011). *Vangl2* directly controls N-cadherin expression (Nagaoka et al., 2014) and, thus, we propose that rosette formation is part of the general shaping of the PNP. This requires a continuous network of tight and adherens junctions, and it is impaired in *Vangl2*^{+Lp} embryos or upon exposure to CytD and Y-27632, which significantly impair rosette formation.

As we show here, apical actin cables represent another planar polarised epithelial structure that forms in the most anterior part of the PNP. Mediolaterally oriented apical actomyosin cables, regulated by the Wnt-PCP pathway, are thought to be crucial for the polarised bending of the pre-elevated cranial NP, and therefore for NT closure by inflection (McGreevy et al., 2015; Nishimura et al., 2012). We also observed these cell arrangements in the anterior PNP, in association with zipping but oriented in an anteroposterior direction, highlighting the difference between the mechanisms driving cranial and caudal NT closure. Thus, although the caudal epiblast cells rely on actomyosin apical pulse contraction to initiate PNP folding, cells interact more intensely at more anterior positions. There they form more rosettes and establish planar polarised cell alignments under the control of Wnt-PCP signalling, highlighting the complexity involved in shaping the anterior part of the PNP prior to closure.

Actin disorganisation provokes an abnormal increase in the apical cell surface area affecting the general morphology of the neural folds

The NP contacts the surface ectoderm dorsally, the paraxial mesoderm laterally and the notochord ventrally. Both the surface ectoderm and notochord are required to induce dorsal and midline bending of the NP (DLHPs and MHP, respectively), points that drive neural fold closing (Ybot-Gonzalez et al., 2002, 2007a). Here, we show that atypical bending of the lateral neural fold in *Vangl2^{+Lp}* embryos is phenocopied by chemically inhibiting actin dynamics, demonstrating that correct apical F-actin assembly is needed to shape the neural fold and to provide it with the structural rigidity required for elevation. These alterations in *Vangl2^{+Lp}* embryos seem to affect the entire NP, e.g. the increased apical cell area or the less intense actin cumuli. However, rosette formation and polarised cell alignment are distorted in the straight part of the neural fold, juxtaposed to the paraxial mesoderm. Hence, contacts with the surface ectoderm dorsally and notochord ventral, might prevent these regions from becoming morphologically affected by the alterations to the actin cytoskeleton. Indeed, at early stages when the DLHP is absent, the outward flexure of the entire lateral fold is affected in *Vangl2^{+Lp}* embryos, and following exposure to CytD at a later stage, when the MHP is absent, the dorsal part of the neural fold remains unaffected (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999; this work). Moreover, the increase in the apical cell area in the PNT and NSB/CLE occurs at a similar rate in *Vangl2^{+Lp}* and *Vangl2^{+/+}* embryos, strengthening the idea of a general rather than a more regionalised process. The mutation of genes that affect F-actin reorganisation and that impede cranial NT closure, such as *Shroom3* and cofilin 1, also provokes an expansion of the apical cell area, producing a thinner NP and outward flexure of the cranial neural folds (Grego-Bessa et al., 2015; Hildebrand and Soriano, 1999; McGreevy et al., 2015). Thus, we predict that Wnt-PCP signalling organises the apical F-actin throughout the PNP, which together with myosin drives NP folding by apical contraction. In more anterior parts of the PNP, the Wnt-PCP pathway produces cellular rearrangements through F-actin, providing the neural folds with a rigid apical structure that can withstand the external forces required for their elevation. Disruption of the Wnt-PCP pathway increases the apical cell area, provoking a loss of apical rigidity that affects neural fold morphology, reducing the apico-basal width and increasing its length. These morphological changes induce aberrant bending, causing the separation of the dorsal tips of the neural folds and impeding correct NT closure, resulting in spina bifida.

Altered apico-basal polarity in the early epiblast by Wnt-PCP signalling could affect NSB/CLE cells in the caudal PNP

The PNP contains cells at different stages of specification and differentiation; caudal neural cell progenitors are initially found in the caudal NSB/CLE zone (as bipotent NMPs), then, as the axis elongates, they occupy more anterior positions in the PNT and differentiate further. Here, we show that the NMPs in the NSB/CLE of *Vangl2^{+Lp}* embryos have a larger apical area than those in the wild type, a phenotype apparently arising from a primary defect in germ layer morphogenesis. This observation is consistent with the Wnt-PCP pathway and *Vangl2* being required for the formation of the epiblast and primitive streak (Tao et al., 2009).

NMPs are first detected in the epiblast at E7.5, close to the border between the node and primitive streak. NMPs persist in the chordoneural hinge (CNH) and its surrounding areas during trunk and tail formation, peaking at E9.5 and decreasing thereafter until

they are undetectable by E14.5 (Wymeersch et al., 2016). The epiblast is disorganised and primitive streak formation defective in dual *mpk1^{+/-}* (*Prickle1^{+/-}*) and *Vangl2^{+Lp}* heterozygous mutants, in association with abnormal cell morphology, disorganised actin and the loss of apico-basal polarity (Suriben et al., 2009; Tao et al., 2009). Hence, *Vangl2* is needed to establish/maintain apico-basal polarity and for cytoskeletal reorganisation at early stages of development. We postulate that the same phenomenon occurs later in development, but as the phenotype is milder at early stages, the direct consequences of these alterations can be studied. Altered apico-basal polarity in the epiblast resulting from perturbations in the Wnt-PCP pathway affects the NSB/CLE cells in the caudal PNP, which acquire a notably larger apical domain. This phenotype is inherited by all their descendants, including the NMPs and the neural cells incorporated into the neural folds.

Here, weaker *Vangl2* activity in the giant cells disrupts the balance of cell fates, increasing neural fates and reduction of NMPs in the PNT. Hence, *Vangl2* appears to influence NMP differentiation into neural cells rather than NMP specification. *Nkd1* expression is upregulated in mice with mutations in *Cdx2*, a protein that inhibits Dishevelled, which is in turn needed for NT closure via Wnt-PCP signalling (van de Ven et al., 2011). Downregulation of *Cdx2*, or *Wnt3a*, dampens canonical Wnt signalling and favours a neural fate (Takada et al., 1994); the Wnt-PCP pathway might also be impaired in these mutants affecting PNP cell fate as suggested here. Further studies will be necessary to gain a more complete picture of how the Wnt-PCP pathway participates in such events.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The *Daam1* gene trap mutant mice were obtained from Baygenomics (RRT390; Li et al., 2011) and they were maintained on a C57 background. The loop-tail (*Vangl2^{Lp}*) inbred strain carrying the *Vangl2* mutation was originally obtained from Jackson Laboratories and it was maintained on a CBA background. Mutant mice exhibit neurodevelopmental defects leading to short, curly tails and occasionally spina bifida. *Daam1^{+gt}* mice were crossed with the *Vangl2^{+Lp}* mice to produce double heterozygote *Vangl2^{+Lp}/Daam1^{+gt}* mice. After overnight mating, *Vangl2^{+Lp}* and *Daam1^{+gt}* pairs were checked for vaginal plugs and the day on which a copulation plug was found was designated as E0.5. The mice were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on from 08:00 to 20:00), and they had *ad libitum* access to food (Global Diet 2014 S, Harlan-Teklad) and water. All procedures involving experimental animals were performed in compliance with local, national and European animal welfare laws, guidelines and policies.

Embryo extraction, culture and genotyping

Embryos were collected at stage E10.5-E12 and their yolk sacs were used for *Vangl2* and *Daam1* genotyping as described previously (Li et al., 2011; Stanier et al., 1995). Embryos were cultured for 6 h at 37°C (Copp et al., 2000) in the presence of cytochalasin D (CytD, 0.05 µg/ml) dissolved in DMSO (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999) or Y-27632 (10 µM) dissolved in sterile distilled water (Ybot-Gonzalez et al., 2007b). In each experiment control, embryos were cultured in the presence of the vehicle alone. After culture, the embryos were assessed for yolk sac circulation and presence of heartbeat, and only healthy embryos were used in the experiments. Embryos were analysed for external malformations and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for *in situ* hybridisation, or Haematoxylin and Eosin (H&E) and phalloidin staining (P1951-IMG, diluted 1:500 in PBS; Sigma). At least three embryos were analysed for each condition.

In situ hybridisation

Whole-mount *in situ* hybridisation was carried out using sense and antisense digoxigenin-labelled riboprobes prepared using a digoxigenin RNA labelling kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. As

described previously (Ybot-Gonzalez et al., 2005) E9.5 (25–30 somite) mouse embryos were analysed with the probes for: *Wnt5a* (Gavin et al., 1990), *Wnt3a* (Roelink and Nusse, 1991), *Daam1* (Ybot-Gonzalez et al., 2007b), *Vangl2* (Doudney et al., 2005), *Prickle1* (Crompton et al., 2007), *Gpc4* (Ybot-Gonzalez et al., 2005), *RhoA* (Ybot-Gonzalez et al., 2007b) and *Ptk7* (Paudyal et al., 2010). A cDNA probe for *Shroom3* was generated using the primers 5'-AGAAGCTGGAGGAGCCTAGC-3' and 5'-TGCATCATGCTGACATCAGG-3', which amplify a 519 bp region between nucleotides 246 and 765 (GenBank accession no. NM_015756.2). Whole embryos were photographed on a stereomicroscope (SteREO Discovery V8 with AxioCam Erc8, Zeiss) and 50- μ m-thick vibratome sections on an Olympus BX-61 photomicroscope. Sense-strand riboprobes were used as controls for specificity and produced no specific signal. At least three embryos were analysed for each probe.

Quantitative RT-PCR

The expression of genes in the Wnt-PCP pathway was analysed by quantitative RT-PCR. *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{Lp} embryos at developmental stage E9.5 were preserved in RNA-later (Ambion) until total RNA was extracted with the TRIreagent (Bioline) according to the manufacturer's recommendations. The PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time Kit, Takara Bio) was used for RT-PCR using the ViiA7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The primers used are described in Table S5. *Gapdh* was the housekeeping gene used, and the reactions were run in triplicate and repeated on several independent samples for each genotype. The fold change in gene expression was determined using the Ct method (Livak and Schmittgen, 2001), normalising expression to the housekeeping target gene. Fold changes in the range of -1.5 and 1.5 were not considered different. Three whole *Vangl2*^{+/+} and 3 *Vangl2*^{Lp} embryos were analysed.

General morphology, and histological analysis of embryos and foetuses

Foetuses obtained between E11.5 and E17.5 were analysed for external malformations and photographed on a stereomicroscope (SteREO Discovery V8 with AxioCam Erc8, Zeiss) prior to fixing in 4% PFA. The embryos were stored in 70% ethanol and then embedded in paraffin wax to obtain transverse sections (7 μ m thick). The sections were stained with Ehrlich H&E, and representative sections were selected from at least three serially sectioned embryos for each condition and photographed on an Olympus BX-61 photomicroscope. At least three embryos for each condition were analysed.

Immunohistochemistry

Sections of E9.5 embryos were embedded in gelatine (15% sucrose and 7.5% gelatine in PBS) for immunohistochemical analysis and cryosections containing the area of interest were obtained (10 and 50 μ m thick) on a Leica CM1950 cryostat. Sections were processed for each primary antibody against β -catenin, ZO1 or N-cadherin as described previously (López-Escobar et al., 2015), and they were then incubated with the appropriate secondary antibody (see Table S6). Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate was used to localise F-actin (P1951, Sigma-Aldrich), diluted 1:500 in PBT (PBS and 0.1% triton). Sections were protected with Hydromount (HS-106, National Diagnostics); 10- μ m-thick sections were photographed on an Olympus BX61 microscope and the 50- μ m-thick sections were analysed by confocal microscopy (TCS-SP2-AOBS, Leica).

Whole-mount E9.5 embryos were fixed using an optimised protocol for each immunolabelling experiment. To compare between the different conditions, embryos for each experiment were kept all together in a tube throughout the entire procedure only separating them for confocal microscopy. One group of embryos was fixed with Dent's fixative and stored in 100% methanol for H3 and ZO1 immunohistochemistry. The other group of embryos was fixed in 4% PFA and stored in 100% methanol for Sox2, T and ZO1 triple immunohistochemistry. Finally, another group of embryos were fixed in 4% PFA overnight for phalloidin and MHC-IIB. For immunolabelling, the embryos were processed as described elsewhere (McGreevy et al., 2015). The primary and secondary antibodies used are described in Table S6. The PNP was dissected out, opening the NT to facilitate flattening and analysed as whole mounts with Hydromount on a

Nikon A1 confocal microscope. For ZO1 staining, a z-series (0.95 μ m steps) was collected using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.664. For the triple immunohistochemistry, z-series (0.925 μ m steps for ZO1 and 3 μ m steps for Sox2 and T) were acquired using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.462. For phalloidin and MHC-IIB or p-MLC immunohistochemistry, z-series (0.925 μ m steps) were acquired using a 20 \times glycerol-objective in a 2048 \times 2048 format, applying a zoom of 1.462. At least three different embryos were processed for each primary antibody or phalloidin.

Analysis of the length and apico-basal width of the neural folds

The apico-basal width of the transverse section of the neural folds was quantified by measuring the length of drawn lines using ImageJ. For each neural fold, two levels of the apico-basal width within the region juxtaposed to the paraxial mesoderm were measured (straight region of the neural fold marked with two asterisks in Fig. 1A): the most dorsal width (Fig. S3, 'd') and the most ventral width (Fig. S3, 'v'). Furthermore, the total neural fold length was measured in both genotypes by drawing a line along the apical side of the straight region of the neural fold using ImageJ (Fig. S3, dotted line). We calculated the ratio between the length (L) and the apico-basal ventral width (v) of the neural fold analysing each section individually. The data were obtained from both neural folds of eight embryos for each genotype (16 neural folds/condition) and statistical significance was determined by Student's *t*-test.

Analysis of the bending and apical surface eversion of the neural folds

The degree of bending of individual neural folds was measured by applying the angle function in ImageJ to sections of the PNP. The angles were taken from the line that joins the lumen side of the MHP and the DLHP and that which joins the lumen side of the MHP and the most outward flexure of the neural fold (see Fig. S3). Statistical significance was determined by Student's *t*-test using the following samples: 14 *Vangl2*^{+/+} neural folds; 20 *Vangl2*^{Lp} neural folds; 14 *Vangl2*^{+/+} neural folds treated with cytochalasin D; 10 *Vangl2*^{+/+} neural folds treated with Y-27632.

Quantification of the apical cell arrangements at the lateral neural fold

To evaluate the apical cell arrangement, the neuropore was tilted manually as it was lowered into the gelatine, exposing a flat vision of the inner side of the anterior neural fold to the closing point of the NT. Sections of the elevating neural folds (50 μ m thick) were immunolabelled for ZO1. To improve the visualisation of the flat apical sides of the cells in the neural fold after immunolabelling, 3D images were obtained from z-stacks of confocal images using ImageJ. The apical cell area was measured using ImageJ. Samples used were: 4 *Vangl2*^{+/+} embryos and 140 cells analysed; 5 *Vangl2*^{Lp} embryos and 165 cells analysed; 3 *Vangl2*^{Lp} embryos and 127 cells analysed; 3 *Vangl2*^{+/+} embryos treated with CytD and 125 cells analysed; 2 *Vangl2*^{Lp} embryos treated with CytD and 116 cells analysed; 3 *Vangl2*^{+/+} embryos treated with Y-27632 and 127 cells analysed; 3 *Vangl2*^{Lp} embryos treated with Y-27632 and 109 cells analysed (2–3 sections of each embryo analysed). Global comparisons of the cellular apical area were evaluated using an ANOVA test with Welch's correction, and multiple comparisons were analysed using the post-hoc Games-Howell test. Individual comparisons of the apical cell area in the PNT of *Vangl2*^{Lp} and after each treatment of *Vangl2*^{+/+} embryos were evaluated with a Mann–Whitney U test.

Analysis of actin and myosin planar distribution

E9.5 mouse embryos were fixed in 4% PFA and stained with phalloidin, and antibodies against MHC-IIB and p-MLC. The maximal projections of confocal images from a flat-mounted PNP were obtained using a Nikon A1 confocal microscope. All images were obtained using the same parameters.

Analysis of actin intensity

A region of interest (ROI) of 200 \times 200 pixels was selected to obtain the intensity histograms of phalloidin labelling from the PNT of *Vangl2*^{+/+} and *Vangl2*^{Lp} embryos using ImageJ. One ROI was used per embryo (3 *Vangl2*^{+/+} and 5 *Vangl2*^{Lp}) and 40,000 pixels were analysed per ROI.

Mann–Whitney U test was used to compare mean intensity values, and Pearson's Chi-squared test to compare the proportion of pixels with the maximum intensity value between the two genotypes.

Analysis of actin cable orientation in aligned cell rearrangements

An ROI that covered the most anterior part of the NP (PNT) was outlined using ImageJ (540×400 pixels). Actin cables joining five to nine aligned cells were counted and their orientation was measured relative to the mediolateral axis of the embryo. The angular distribution was plotted in a histogram representing two groups: lines with angles from 0° to 45° (mediolateral orientation) and lines with angles from 45° to 90° (anterior-posterior orientation; see Fig. 2O,P). One ROI was used per embryo (5 *Vangl2*^{+/+} and 11 *Vangl2*^{+Lp}). Student's *t*-test was used to compare the number of actin cells alignments, and Fisher's exact test to compare the proportions of cell alignment orientations.

Analysis of actin cumulus and basal intensity

ROIs (100×100 pixels) were selected in the PNT of embryos: ten basal and ten cumuli intensity plot profiles were obtained along the linear boundary of two neighbouring cells (basal) and along cumuli using the ImageJ function 'Plot Profile'. The distribution of the total fluorescence intensity within the ROI was measured using the histogram function of ImageJ (Fig. S5A,a,a' and Fig. S5B,b,b'). Ten measurements/ROIs were used for each profile; two different ROIs per embryo from 3 *Vangl2*^{+/+} and 3 *Vangl2*^{+Lp} embryos. Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Quantification of apical cumulus of actin

An ROI of 100×100 pixels in the PNT and the NSB/CLE regions were selected using ImageJ. The number of actin cumuli in those areas was determined using the 'multi-point' tool in ImageJ and the average number of cumuli in each area and genotype was compared (Fig. 2O_i,O_{ii},V). One ROI was used per embryo (5 *Vangl2*^{+/+} and 8 *Vangl2*^{+Lp}). Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Analysis of paired cumuli of p-MLC in neighbouring cells (dense supracellular structures)

ROIs of 200×200 pixels were analysed to determine the number of paired p-MLC cumuli. Three ROIs were used per embryo (3 *Vangl2*^{+/+} and 3 *Vangl2*^{+Lp}).

The distance between the paired cumuli was measured using ImageJ. Samples used were 188 cumuli from 3 *Vangl2*^{+/+} and 248 cumuli from 3 *Vangl2*^{+Lp} embryos. Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Analysis of the myosin distribution

The presence of MHC-IIb was analysed in segmented images (see below) of the ZO1 immunolabelled PNP from embryos. The cell population in the PNP was divided into small (apical cell area <13 μm²) and giant cells (apical cell area >13 μm²). The number of cells with MHC-IIb was determined using the 'multi-point' tool in ImageJ. For giant cells, >50 cells/embryo were analysed from 3 embryos of each genotype; for small cells, >600 cells/embryo from 3 embryos per genotype were analysed. Pearson's Chi-squared test was used to determine statistical significance.

Cell dynamics

Using the semi-automated image-segmenting program Seedwater Segmenter (Mashburn et al., 2012), confocal ZO1-stained images from flatted PNP were segmented to produce separate ROIs for each cell. The segmented images were treated as the whole PNP, and they were also divided into neural tube (NT), pre-neural tube (PNT, which included two peripheral zones and a central zone) and the node-streak border/caudal lateral epiblast (NSB/CLE), as described previously (Henrique et al., 2015). The rectangle chosen to define each ROI was of similar dimensions, measured in ImageJ (400×600 pixels). The apical area of the cell was determined using ImageJ and a custom image analysis tool (McGreevy et al., 2015).

The same macro was also used to determine the presence of rosettes and their complexity (number of cells with a vertex forming a rosette). In order to calculate vertex complexity (i.e. the number of cells at a shared junction), we

used custom ImageJ macros to extract individual vertices from the segmented output produced by SeedWater Segmenter. The Segmenter algorithm produces an indexed image in which each cell has been identified and its area filled with a unique identifying integer as its intensity. To detect shared junctions between cells, we centred a circle with a user-defined radius at each pixel within the indexed image (McGreevy et al., 2015). We then counted the number of unique integer intensities detected within the circle. When three or more intensities were detected, the centre pixel of the circle was filled in on a blank image. After the circle had been passed over the entire image, the blank image contained a cluster of filled-in pixels corresponding to each vertex. We ran the 'Find Particles' function on this image to extract individual 'vertex' ROIs for each vertex pixel cluster. To find the order of these vertex pixel clusters, we used the original indexed image to detect the number of unique intensities appearing within each vertex ROI. Cells were colour-coded based on their coordination number using another custom macro and the percentage of cells in each bin was plotted. The average number of cells counted in each experiment was: *Vangl2*^{+/+} embryos (*n*=6), NT area 250 cells/embryo, PNT area 1200 cells/embryo, NSB/CLE area 344 cells/embryo; *Vangl2*^{+Lp} embryos (*n*=4), NT area 482 cells/embryo, PNT area 1250 cells/embryo, NSB/CLE area 240 cells/embryo; *Vangl2*^{+/+} embryos treated with CytD (*n*=4), PNT area 1256 cells/embryo, NSB/CLE area 360 cells/embryo; *Vangl2*^{+/+} embryos treated with Y-27623 (*n*=4), PNT area 1216 cells/embryo, NSB/CLE area 456 cells/embryo. Cells with an apical area greater than 13 μm were considered 'giant cells' and those smaller than 13 μm 'small cells'. For the triple immunohistochemistry (ZO1, Sox2 and T), 318 cells/embryo from 4 *Vangl2*^{+/+} embryos and 385 cells/embryo from 4 *Vangl2*^{+Lp} embryos were analysed and for the giant cell population 45 cells/embryo and 144 cells/embryo from 4 *Vangl2*^{+/+} and 4 *Vangl2*^{+Lp} embryos were analysed, respectively. The percentage of cells with a vertex forming a rosette, the rosette order, number of giant cells and analysis of T and Sox2 expression in giant cells were compared using a proportion comparison test, Pearson's Chi-squared test. Comparisons of the apical cell area were calculated using the Mann–Whitney U test. Global comparison of the apical cell area of the NMPs (T⁺/Sox2⁺) vs the mesodermal (T⁺/Sox2⁻) or neural cell fates (T⁻/Sox2⁺) for each genotype was analysed using an ANOVA test with Welch's correction, and multiple comparisons were analysed using the post-hoc Games-Howell test (*P*<0.05).

Statistical analysis

Global comparisons of the cellular apical area were evaluated using an ANOVA test with Welch's correction, and multiple comparisons were analysed using the post-hoc Games-Howell test (IBM SPSS Statistics 19 software).

To estimate the difference between proportions obtained from independent samples of two populations we used the Pearson Chi-squared test. In the 2×2 table study we also obtained the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval. We used OpenEpi software (www.OpenEpi.com; updated 06/04/2013, accessed 01/03/2018). For the small sample size proportion studies, we used Fisher's exact test in OpenEpi software.

The means of two populations obtained from independent samples were compared either with a Student's *t*-test when the data followed a normal distribution or a non-parametric Mann–Whitney U test when the data did not follow a normal distribution. For these analyses, we used Epidat software (<http://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>; version 4.2, July 2016) and IBM SPSS Statistics 19 software.

The effect size *d* of Cohen and the confidence interval were calculated using 'Calculation of Effect Sizes' (http://www.psychometrica.de/effect_size.html; Lenhard and Lenhard, 2016). The power of the studies was calculated using Epidat software and in all statistical studies differences were considered to be statistically significant at *P*<0.05.

Acknowledgements

We are very thankful to Jose Ramón Martínez-Morales, Solveig Thorsteinsdottir, David Cano and Andrew J. Copp for valuable advice and comments on the manuscript. We thank Tristan Rodriguez, Jennifer Murdoch, Roel Nusse and Andrew McMahon for generously providing us with mouse cDNA plasmids of *Prickle1*, *Ptk7*, *Wnt3a* and *Wnt5a*, respectively. We also gratefully acknowledge Patricia Fernandez del Valle and Juan Manuel Praena for their invaluable advice

with the statistical analysis, Konstantin Levitskiy for helping with the confocal microscopy images, and Mark Sefton and Arturo Amarilla for revising the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., R.C.M., J.M.-R.; Methodology: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., R.C.M., D.S., D.S.V., T.F.P., J.A.S.-A. L.A.D.; Software: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., D.S.V., L.A.D.; Validation: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., J.A.S.-A.; D.S.V., T.F.P., L.A.D.; Formal analysis: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., D.S.V., J.A.S.-A., R.C.M., D.S.; Investigation: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., R.C.M., J.A.S.-A., D.S.; Resources: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V., D.S.V., T.F.P., J.A.S.-A., D.S., J.M.-R., L.A.D.; Data curation: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V.; Writing - original draft: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V.; Writing - review & editing: P.Y.-G., J.A.S.-A., J.M.-R., D.S.V., T.F.P., L.A.D.; Visualization: P.Y.-G., B.L.-E., J.M.C.-V.; Supervision: P.Y.-G., L.A.D.; Project administration: P.Y.-G.; Funding acquisition: P.Y.-G., J.M.-R.

Funding

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PS09/00050, CP08/00111, CPII14/00033, PI14/01075 and PI17/00693 to P.Y.-G.) co-financed by the European Regional Development Fund "A way to achieve Europe"; the Andalusian Health Service, Junta de Andalucía (Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucía; PI-0438-2010 to P.Y.-G.); the Andalusian Regional Ministry of Economy, Science and Innovation (Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía; P11-cts-7634 to P.Y.-G.); the National Institutes of Health (R01 HD044750 to L.A.D.); and the National Science Foundation (CMMI-1100515 to L.A.D.). In addition, D.S.V. was supported by the "Biomechanics in Regeneration" Training Program from the National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (BiRM T32 EB003392). Deposited in PMC for release after 12 months.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.157487.supplemental>

References

- Andersson, E. R., Bryjova, L., Biris, K., Yamaguchi, T. P., Arenas, E. and Bryja, V. (2010). Genetic interaction between Lrp6 and Wnt5a during mouse development. *Dev. Dyn.* **239**, 237-245.
- Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S. P., Weitz, O. and Zallen, J. A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Dev. Cell* **11**, 459-470.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T. and Settlemans, J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **127**, 4891-4903.
- Copp, A. J., Checiu, I. and Henson, J. N. (1994). Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Dev. Biol.* **165**, 20-29.
- Copp, A., Cogram, P., Fleming, A., Gerrelli, D., Henderson, D., Hynes, A., Koltsi-Joannou, M., Murdoch, J. and Ybot-Gonzalez, P. (2000). Neurulation and neural tube closure defects. *Methods Mol. Biol.* **136**, 135-160.
- Crompton, L. A., Du Roure, C. and Rodriguez, T. A. (2007). Early embryonic expression patterns of the mouse Flamingo and Prickle orthologues. *Dev. Dyn.* **236**, 3137-3143.
- Doudney, K., Ybot-Gonzalez, P., Paternotte, C., Stevenson, R. E., Greene, N. D., Moore, G. E., Copp, A. J. and Stanier, P. (2005). Analysis of the planar cell polarity gene Vangl2 and its co-expressed paralogue Vangl1 in neural tube defect patients. *Am. J. Med. Genet. A* **136**, 90-92.
- Escuin, S., Vernay, B., Savery, D., Gurniak, C. B., Witke, W., Greene, N. D. and Copp, A. J. (2015). Rho-kinase-dependent actin turnover and actomyosin disassembly are necessary for mouse spinal neural tube closure. *J. Cell Sci.* **128**, 2468-2481.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fletcher, A. G., Osterfield, M., Baker, R. E. and Shvartsman, S. Y. (2014). Vertex models of epithelial morphogenesis. *Biophys. J.* **106**, 2291-2304.
- Galea, G. L., Cho, Y. J., Galea, G., Mole, M. A., Rolo, A., Savery, D., Moulding, D., Culshaw, L. H., Nikolopoulou, E., Greene, N. D. E. et al. (2017). Biomechanical coupling facilitates spinal neural tube closure in mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E5177-E5186.
- Garriock, R. J., Chalamalasetty, R. B., Kennedy, M. W., Canizales, L. C., Lewandoski, M. and Yamaguchi, T. P. (2015). Lineage tracing of neuromesodermal progenitors reveals novel Wnt-dependent roles in trunk progenitor cell maintenance and differentiation. *Development* **142**, 1628-1638.
- Gavin, B. J., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1990). Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev.* **4**, 2319-2332.
- Goto, T. and Keller, R. (2002). The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **247**, 165-181.
- Grego-Bessa, J., Hildebrand, J. and Anderson, K. V. (2015). Morphogenesis of the mouse neural plate depends on distinct roles of cofilin 1 in apical and basal epithelial domains. *Development* **142**, 1305-1314.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843-854.
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/ Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* **17**, 295-309.
- Harding, M. J., McGraw, H. F. and Nechiporuk, A. (2014). The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis. *Development* **141**, 2549-2558.
- Henrique, D., Abranches, E., Verrier, L. and Storey, K. G. (2015). Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development* **142**, 2864-2875.
- Hildebrand, J. D. and Soriano, P. (1999). Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell* **99**, 485-497.
- Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-1954.
- Kim, H. Y. and Davidson, L. A. (2011). Punctuated actin contractions during convergent extension and their permissive regulation by the non-canonical Wnt-signaling pathway. *J. Cell Sci.* **124**, 635-646.
- Kinoshita, N., Sasai, N., Misaki, K. and Yonemura, S. (2008). Apical accumulation of Rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2289-2299.
- Lenhard, W. and Lenhard, A. (2016). Calculation of Effect Sizes. Available: http://www.psychometrica.de/effect_size.html. Dettelbach (Germany): Psychometrica.
- Li, D., Hallett, M. A., Zhu, W., Rubart, M., Liu, Y., Yang, Z., Chen, H., Haneline, L. S., Chan, R. J., Schwartz, R. J. et al. (2011). Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development* **138**, 303-315.
- Lienkamp, S. S., Liu, K., Karner, C. M., Carroll, T. J., Ronneberger, O., Wallingford, J. B. and Walz, G. (2012). Vertebrate kidney tubules elongate using a planar cell polarity-dependent, rosette-based mechanism of convergent extension. *Nat. Genet.* **44**, 1382-1387.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* **25**, 402-408.
- López-Escobar, B., Cano, D. A., Rojas, A., de Felipe, B., Palma, F., Sánchez-Alcázar, J. A., Henderson, D. and Ybot-González, P. (2015). The effect of maternal diabetes on the Wnt-PCP pathway during embryogenesis as reflected in the developing mouse eye. *Dis. Model. Mech.* **8**, 157-168.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898.
- Mahaffey, J. P., Grego-Bessa, J., Liem, K. F., Jr and Anderson, K. V. (2013). Cofilin and Vangl2 cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo. *Development* **140**, 1262-1271.
- Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* **457**, 495-499.
- Mashburn, D. N., Lynch, H. E., Ma, X. and Hutson, M. S. (2012). Enabling user-guided segmentation and tracking of surface-labeled cells in time-lapse image sets of living tissues. *Cytometry Part A* **81A**, 409-418.
- Mason, F. M., Tworoger, M. and Martin, A. C. (2013). Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. *Nat. Cell Biol.* **15**, 926-936.
- Massarwa, R. and Niswander, L. (2013). In toto live imaging of mouse morphogenesis and new insights into neural tube closure. *Development* **140**, 226-236.
- McGreevy, E. M., Vijayraghavan, D., Davidson, L. A. and Hildebrand, J. D. (2015). Shroom3 functions downstream of planar cell polarity to regulate myosin II distribution and cellular organization during neural tube closure. *Biol. Open* **4**, 186-196.
- Morita, H., Nandadasa, S., Yamamoto, T. S., Terasaka-lioka, C., Wylie, C. and Ueno, N. (2010). Nectin-2 and N-cadherin interact through extracellular domains and induce apical accumulation of F-actin in apical constriction of *Xenopus* neural tube morphogenesis. *Development* **137**, 1315-1325.
- Nagaoka, T., Ohashi, R., Inutsuka, A., Sakai, S., Fujisawa, N., Yokoyama, M., Huang, Y. H., Igarashi, M. and Kishi, M. (2014). The Wnt/planar cell polarity pathway component Vangl2 induces synapse formation through direct control of N-cadherin. *Cell Rep.* **6**, 916-927.
- Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N. R., Heasman, J. and Wylie, C. (2009). N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural

- ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development* **136**, 1327-1338.
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E. and Copp, A. J.** (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* **144**, 552-566.
- Nishimura, T. and Takeichi, M.** (2009). Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **89**, 33-54.
- Nishimura, T., Honda, H. and Takeichi, M.** (2012). Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* **149**, 1084-1097.
- Ossipova, O., Kim, K. and Sokol, S. Y.** (2015). Planar polarization of Vangl2 in the vertebrate neural plate is controlled by Wnt and Myosin II signaling. *Biol. Open* **4**, 722-730.
- Paudyal, A., Damrau, C., Patterson, V. L., Ermakov, A., Formstone, C., Lalanne, Z., Wells, S., Lu, X., Norris, D. P., Dean, C. H. et al.** (2010). The novel mouse mutant, *chuzhoi*, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev. Biol.* **10**, 87.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. and Skarnes, W. C.** (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-538.
- Plageman, T. F., Jr, Zacharias, A. L., Gage, P. J. and Lang, R. A.** (2011). Shroom3 and a Pitx2-N-cadherin pathway function cooperatively to generate asymmetric cell shape changes during gut morphogenesis. *Dev. Biol.* **357**, 227-234.
- Roelink, H. and Nusse, R.** (1991). Expression of two members of the Wnt family during mouse development—restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev.* **5**, 381-388.
- Sato, A., Khadka, D. K., Liu, W., Bharti, R., Runnels, L. W., Dawid, I. B. and Habas, R.** (2006). Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development* **133**, 4219-4231.
- Shafer, B., Onishi, K., Lo, C., Colakoglu, G. and Zou, Y.** (2011). Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. *Dev. Cell* **20**, 177-191.
- Siedlik, M. J. and Nelson, C. M.** (2015). Regulation of tissue morphodynamics: an important role for actomyosin contractility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 80-85.
- Stanier, P., Henson, J. N., Eddleston, J., Moore, G. E. and Copp, A. J.** (1995). Genetic basis of neural tube defects: the mouse gene loop-tail maps to a region of chromosome 1 syntenic with human 1q21-q23. *Genomics* **26**, 473-478.
- Stumpo, D. J., Bock, C. B., Tuttle, J. S. and Blackshear, P. J.** (1995). MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 944-948.
- Suriben, R., Kivimäe, S., Fisher, D. A. C., Moon, R. T. and Cheyette, B. N. R.** (2009). Posterior malformations in Dact1 mutant mice arise through misregulated Vangl2 at the primitive streak. *Nat. Genet.* **41**, 977-985.
- Sutherland, A. E.** (2016). Tissue morphodynamics shaping the early mouse embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* **55**, 89-98.
- Tada, M. and Kai, M.** (2012). Planar cell polarity in coordinated and directed movements. *Curr. Top. Dev. Biol.* **101**, 77-110.
- Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A. and McMahon, A. P.** (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* **8**, 174-189.
- Tao, H., Suzuki, M., Kiyonari, H., Abe, T., Sasaoka, T. and Ueno, N.** (2009). Mouse *prickle1*, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 14426-14431.
- Trichas, G., Smith, A. M., White, N., Wilkins, V., Watanabe, T., Moore, A., Joyce, B., Sugnaseelan, J., Rodriguez, T. A., Kay, D. et al.** (2012). Multi-cellular rosettes in the mouse visceral endoderm facilitate the ordered migration of anterior visceral endoderm cells. *PLoS Biol.* **10**, e1001256.
- Tsakiridis, A., Huang, Y., Blin, G., Skylaki, S., Wymeersch, F., Osorno, R., Economou, C., Karagianni, E., Zhao, S., Lowell, S. et al.** (2014). Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Development* **141**, 1209-1221.
- Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F. J., Wilson, V. and Nicolas, J. F.** (2009). Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis. *Dev. Cell* **17**, 365-376.
- van de Ven, C., Bialecka, M., Neijts, R., Young, T., Rowland, J. E., Stringer, E. J., Van Rooijen, C., Meijlink, F., Nóvoa, A., Freund, J.-N. et al.** (2011). Concerted involvement of Cdx/Hox genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone. *Development* **138**, 3451-3462.
- Vasquez, C. G., Tworoger, M. and Martin, A. C.** (2014). Dynamic myosin phosphorylation regulates contractile pulses and tissue integrity during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* **206**, 435-450.
- Wallingford, J. B. and Harland, R. M.** (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* **129**, 5815-5825.
- Wymeersch, F. J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F. C. K. and Wilson, V.** (2016). Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* **5**, e10042.
- Xu, W., Baribault, H. and Adamson, E. D.** (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* **125**, 327-337.
- Yang, W., Garrett, L., Feng, D., Elliott, G., Liu, X., Wang, N., Wong, Y. M., Choi, N. T., Yang, Y. and Gao, B.** (2017). Wnt-induced Vangl2 phosphorylation is dose-dependently required for planar cell polarity in mammalian development. *Cell Res.* **27**, 1466-1484.
- Ybot-Gonzalez, P. and Copp, A. J.** (1999). Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev. Dyn.* **215**, 273-283.
- Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D. and Copp, A. J.** (2002). Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* **129**, 2507-2517.
- Ybot-Gonzalez, P., Copp, A. J. and Greene, N. D. E.** (2005). Expression pattern of glypican-4 suggests multiple roles during mouse development. *Dev. Dyn.* **233**, 1013-1017.
- Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D. E. and Copp, A. J.** (2007a). Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* **134**, 3203-3211.
- Ybot-Gonzalez, P., Savery, D., Gerrelli, D., Signore, M., Mitchell, C. E., Faux, C. H., Greene, N. D. E. and Copp, A. J.** (2007b). Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development* **134**, 789-799.
- Zohn, I. E., Chesnutt, C. R. and Niswander, L.** (2003). Cell polarity pathways converge and extend to regulate neural tube closure. *Trends Cell Biol.* **13**, 451-454.