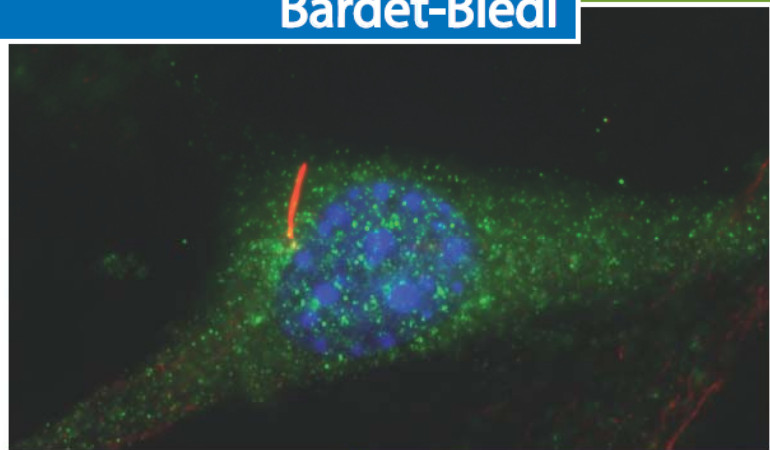




Tesina de Grado- Licenciatura en Bioquímica

Estudio de la localización sub-celular de proteínas asociadas al síndrome de Bardet-Biedl



Febrero 2012

Belén Torrado

Dr. José Badano
orientador

Dra. Florencia Irigoín
co-orientadora

Laboratorio de Genética
Molecular Humana
Institut Pasteur de Montevideo

Agradecimientos

En primer lugar a José, por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio.

A Florencia y a José porque me han acompañado en este proceso de aprendizaje con mucha paciencia y esmero, compartiendo generosamente su conocimiento, haciéndome sentir siempre contenida y apoyada, para ellos mi más sincero agradecimiento.

A mis compañeras del laboratorio, Cecilia, Magdalena, Rossina y Victoria por su ayuda día a día, por compartir su experiencia y allanarme el camino tantas veces.

A mis compañeras del Instituto, Josefina por ayudarme con la citometría y a Soledad con la microscopía. También a las chicas de la salita común por todas las jornadas compartidas.

A mis amigas, las que conozco desde pequeña y las que conocí entre libros en la facultad, que siempre me han alentado y apoyado para conseguir cada meta, a las que quiero infinitamente.

Por último a mi Familia y a Zelmar porque son mi bastón, son incondicionales e imprescindibles en mi vida, y sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

El síndrome de Bardet-Biedl (BBS) es una enfermedad humana causada por defectos en el funcionamiento de la cilia primaria, un organelo relacionado con la transducción de importantes vías de señalización. Todas las proteínas mutadas en BBS que han sido estudiadas hasta hace poco se han localizado en la cilia, cuerpo basal y centrosoma. Sin embargo, un análisis *in silico* de su secuencia aminoacídica ha identificado la presencia de señales de exportación nuclear (NES), excepto en BBS8. Además, datos recientes de nuestro laboratorio han mostrado que BBS2 y BBS7 tienen la capacidad de entrar al núcleo donde interactúan con RNF-2 regulando la transcripción génica. La localización de estas proteínas es dinámica, tanto en lo que respecta a su presencia en el núcleo como a su capacidad de entrar en las cilias. Sin embargo, no se conocen cuál o cuáles son las señales que dirigen estos cambios en la localización. En este trabajo nos enfocamos en estudiar la localización subcelular de proteínas BBS y analizar si los cambios de localización se relacionan con la progresión del ciclo celular, basándonos en la estrecha relación existente entre este y la ciliación. En cultivos no sincronizados observamos localización centrosómica, cuerpo basal y/o axonema ciliar para las proteínas BBS1, BBS2, BBS4 y BBS7, además de nuclear para BBS1 y BBS2. Para estudiar la relación entre el ciclo celular y la localización dinámica de BBS2 y BBS7 pusimos a punto un protocolo de sincronización de células en estadio G0 y fase S. El análisis de cultivos celulares sincronizados mostró localización nuclear de BBS2 en células en G0, y una disminución de la proteína en el núcleo de células en fase S. En el caso de BBS7 la proteína parece localizarse en el núcleo únicamente en células en G0 (ciliadas) pero en presencia de suero. Este resultado fue corroborado por Western blot en fracciones subcelulares y es compatible con lo observado utilizando una línea celular que expresa BBS7 fusionada a GFP en forma estable. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el marco de este trabajo indican que BBS2 y BBS7 se localizarían en el núcleo cuando la célula está ciliada y que al menos en el caso de BBS7 sería dependiente de factores presentes en el suero, los cuales probablemente operen a través de las cilias. Estudios futuros estarán abocados a elucidar los mecanismos moleculares que regulan la translocación al núcleo de estas proteínas.

Índice

	Pág.
1. Introducción	7
1.1. La cilia primaria: un organelo celular particular	7
1.2. Las ciliopatías	12
1.3. Síndrome de Bardet-Biedl	13
1.4. Proteínas BBS	14
2. Materiales y métodos	19
2.1. Trabajo con células de mamíferos	19
2.1.1. Cultivo de células de mamífero	19
2.1.2. Transfección de células para la incorporación de plásmidos	19
• Transfección con fosfato de calcio	19
• Transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen)	20
2.1.3. Sincronización de cultivos celulares y citometría de flujo	21
2.1.3.1. Sincronización de cultivos celulares	21
• Sincronización en fase G0	21
• Sincronización en fases G1/S, S y G2	21
2.1.3.2. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo	22
2.1.4. Fraccionamiento subcelular	24
2.1.5. Obtención de extractos totales de células	24
2.1.6. Inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia	24
2.2. Análisis de Proteínas	26
2.2.1. Cuantificación de Proteínas	26
2.2.2. Preparación de muestras para SDS-PAGE	26
2.2.3. Electroforesis SDS-PAGE	26
2.2.4. Western blot	27

2.3. Obtención y caracterización de líneas celulares expresando BBS7-EGFP en forma estable	28
2.3.1. Clonado de BBS7 en el vector pEGFP-N2 (Clontech)	28
2.3.1.1. Amplificación del gen de BBS7 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.3.1.2. Electroforesis en gel de agarosa	29
2.3.1.3. Extracción de ADN de geles de agarosa	30
2.3.1.4. Digestión con enzimas de restricción	30
2.3.1.5. Ligación en vectores	30
• Ligación en vector pGEM-T	30
• Ligación en vector pEGFP-N2	31
2.3.1.6. Transformación de bacterias para obtención de plásmido	32
2.3.1.7. Selección de bacterias transformadas	33
• pGEM-T	33
• pEGFP-N2	33
2.3.1.8. Extracción y purificación de ADN plasmídico de las bacterias	34
2.3.2. Producción de líneas celulares expresando BBS7-EGFP establemente	34
2.4. Análisis estadístico de los datos	35
3. Resultados	36
3.1. Análisis de la localización subcelular de proteínas BBS	36
3.2. Relación entre la localización subcelular de BBS2 y BBS7 y el ciclo celular	43
3.2.1. Puesta a punto de la técnica de sincronización de cultivos celulares	44
3.2.2. Localización de BBS2 y BBS7 en cultivos sincronizados	48

3.2.3. Localización subcelular de BBS7 en líneas establemente transfectadas con BBS7-GFP.....	51
3.2.3.1. Línea celular NIH3T3 expresando BBS7-EGFP en forma estable	52
3.2.3.2. Línea celular IMCD3 expresando BBS7-GFP en forma estable	53
4. Discusión y Conclusión	55
5. Referencias.....	61

1. Introducción

1.1. La cilia primaria: un organelo celular particular

Las cilia son estructuras altamente conservadas que se proyectan desde la superficie de la mayoría de las células eucariotas (<http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html>; Figura 1.1). Poseen un esqueleto, axonema ciliar, compuesto por 9 dobletes de microtúbulos que se organizan a partir de un centríolo modificado denominado cuerpo basal, este último formado por 9 tripletes de microtúbulos (Figura 1.2). Aunque estructuralmente las cilia primarias están altamente relacionadas con las cilia móviles y los flagelos, se diferencian de estos por la presencia de una única cilia por célula, la ausencia de dineína ciliar lo que las hace inmóviles y la ausencia del par central de microtúbulos (9+0). Existen excepciones a estas características, como las cilia del oído interno, los quincilios, que a pesar de tener una configuración 9+2 son inmóviles (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009). También existen cilia con configuración 9+0 que poseen dineína ciliar y son móviles, un ejemplo son las células del nodo del embrión, donde el batido ciliar es fundamental para determinar la asimetría derecha-izquierda del cuerpo (Nonaka et al., 1998; Supp et al., 1997).

Si bien el interior y la membrana ciliar son continuos con el citosol y la membrana plasmática respectivamente, las cilia presentan una composición característica de proteínas por lo que es considerada como un organelo celular. La continuidad de la membrana plasmática con la membrana ciliar permite aumentar el área de contacto de la célula con el medio extracelular. Estas membranas difieren en su composición, en particular, la cilia posee en su membrana una mayor densidad de módulos de señalización, como canales iónicos, receptores, proteínas efectoras, etc., necesarios para percibir el medio extracelular y así poder controlar procesos celulares tanto durante el desarrollo embrionario como en el mantenimiento de la homeostasis celular (Christensen et al., 2007). Un ejemplo de módulos de señalización son las policistinas (PC1 y PC2): PC2 es un canal de Ca^{2+} y PC1 comparte características con receptores celulares. Ambas proteínas se localizan en la membrana ciliar y funcionan en conjunto detectando el movimiento de fluidos (Pazour et al., 2002; Yoder et al., 2002). La disfunción de alguna de estas proteínas produce la enfermedad humana poliquistosis renal (Geng et al., 2006). Sin embargo, no todos los canales iónicos importantes se localizan en la cilia, como es el caso de CFTR (del inglés: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Kreda et al., 2005).

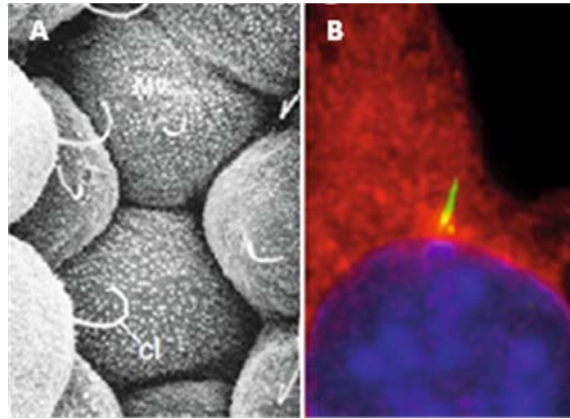


Figura 1.1. Cilia primaria (A) Microscopía electrónica de barrido de células del epitelio ciliado del túbulo colector del riñón, donde se observa una cilia primaria (cl) por célula. (B) Inmunofluorescencia de una célula NIH3T3 donde la cilia primaria se ha marcado con un anticuerpo anti- α tubulina detirosinada acoplado a un fluoróforo verde. El núcleo teñido con DAPI. (Adaptado de Pedersen and Rosenbaum, 2008)

Como la síntesis de proteínas no ocurre en la cilia, las células tienen un sistema de transporte denominado transporte intraflagelar (IFT: del inglés, *intraflagellar transport*) que es fundamental para la formación, mantenimiento y función de estos organelos. Este mecanismo de transporte utiliza como motores moleculares a la kinesina y dineína citoplasmáticas que mueven complejos proteicos denominados A y B (Kozminski et al., 1993; Pedersen and Rosenbaum, 2008)(Figura 1.2). La composición particular de proteínas de la cilia implica la existencia de mecanismos de clasificación y transporte de esas proteínas a la cilia. En la base de este organelo un grupo de proteínas forman una zona de transición que se ha propuesto que actúa como una barrera selectiva que restringe la entrada de proteínas a la cilia (Satir and Christensen, 2007). Si bien el funcionamiento de esta barrera (poro flagelar/ciliar) aún no está claro, la translocación de proteínas del citosol a la cilia comparte ciertas características con la translocación de proteínas al núcleo (Rosenbaum and Witman, 2002). En este sentido, se ha reportado que al menos dos proteínas ciliares, retinitis pigmentosa 2 y KIF17, utilizan una señal de localización nuclear no clásica (NLS, del inglés: *nuclear localization signal*) para ser enviadas a la cilia, y que el ingreso a este organelo es mediado por Importina- β 2 y un gradiente de Ran GTP/GDP (Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011). Este mecanismo es también utilizado para translocar proteínas al núcleo celular. En varias proteínas de membrana ciliar (PC2, CNGB1b y rodopsina) se ha encontrado un motivo conservado (R6VxP) responsable de la localización ciliar (Geng et al., 2006; Jenkins et al., 2006; Mazelova et al., 2009). Se cree que las proteínas de la membrana ciliar son probablemente transportadas desde el Golgi en vesículas que son exocitadas en la base de la cilia o que están presentes en vesículas asociadas a la cilia y que se convierten en membrana ciliar cuando la cilia emerge desde la célula (Christensen et al., 2007). Sin embargo para la mayoría de las proteínas ciliares las señales y mecanismos de localización ciliar aún no han sido elucidados completamente

e involucrarían diferentes componentes o motivos dependiendo de las especies proteicas involucradas (Satir and Christensen, 2007). La complejidad de este organelo ha quedado en evidencia a partir de diferentes esfuerzos por determinar su composición proteica, datos que han sido integrados en una base de datos no redundante conocida como el proteoma ciliar (www.ciliaproteome.org) (Gherman et al., 2006).

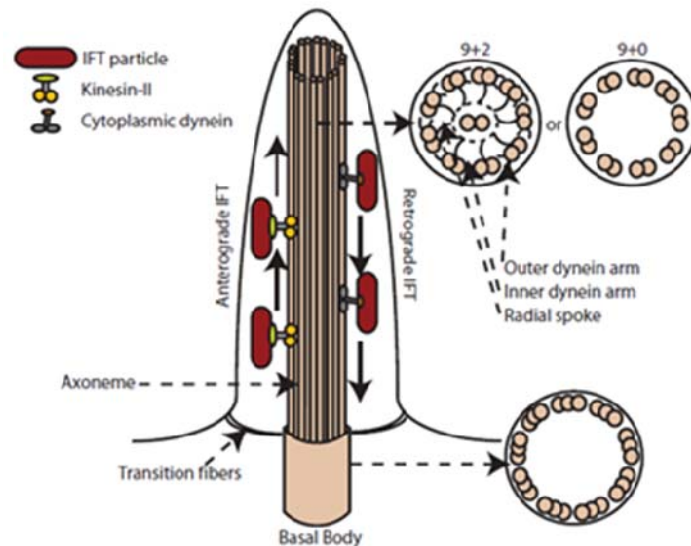


Figura 1.2. Esquema de la estructura ciliar. Se muestra el axonema compuesto por dobletes de microtúbulos con su estructura 9+0 (cilios primarios) o 9+2 (cilios móviles) y el cuerpo basal compuesto por tripletes de microtúbulos. También los complejos proteicos y los motores moleculares del IFT. (Adaptado de Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009)

En células normales, el ensamblaje/desensamblaje de la cilia (ciclo ciliar) y el ciclo celular están estrechamente regulados. Cuando la célula se divide cada célula hija hereda un centrosoma que se convierte en el centro organizador de microtúbulos (Debec et al., 2010). Los centrosomas están formados por dos centriolos organizados en forma perpendicular y rodeados de una matriz pericentriolar desde donde se ensamblan los microtúbulos. Los centriolos son cilindros compuestos por formas estables de tubulina modificada (Edde et al., 1990). En células proliferando, los centrosomas se duplican durante la transición de G1 a S, y se separan en G2 para transformarse en los polos del huso mitótico (Hinchcliffe et al., 1999). Las cilia están coordinadas con estos cambios de función de los centrosomas ya que se organizan a partir del cuerpo basal, el cual deriva del centriolo madre del centrosoma. Las cilia están presentes en células en las fases G0, G1, y principios de fase S del ciclo celular. Las mismas son reabsorbidas antes de la mitosis, y reaparecen luego de la citocinesis (Rieder et al., 1979; Wheatley, 1995) (Figura 1.3). Sin embargo, la estrecha relación entre el ciclo ciliar y el celular no se basa sólo en el uso compartido de los centriolos. Esta relación está apoyada también en la actividad de proteínas centrosómicas que participan en el control de la ciliogénesis [revisado en (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009;

Santos and Reiter, 2008)]. Análisis proteómicos de centrosomas de mamíferos han puesto en evidencia su complejidad, se han identificado cientos de polipéptidos de los cuales varios son esenciales para el funcionamiento del centrosoma, y muchos aún no han sido caracterizados (Spektor et al., 2007). A su vez, varias proteínas involucradas en la división celular participan en el control de la ciliogénesis, y algunas proteínas ciliares han sido implicadas en la regulación directa del ciclo celular [revisado en (Irigoín and Badano, 2011)]. Por ejemplo, la proteína centrosómica CP110, implicada en la citocinesis y en la duplicación del centrosoma (Chen et al., 2002), parece participar activamente en el ciclo ciliar. CP110 interactúa con Cep97 y CEP290 para inhibir la ciliogénesis (Spektor et al., 2007). Por otro lado, IFT88, una proteína ciliar que forma parte del complejo B del IFT, imprescindible para la ciliogénesis, restringe la transición G1/S en células no ciliadas. La sobreexpresión de IFT88 impide esa transición e induce apoptosis y por el contrario, la disminución de sus niveles por ARN interferente promueve la progresión del ciclo celular a fase S, G2 y M. El control del ciclo lo produce IFT88 al interactuar con la proteína nuclear Che-1, inhibiendo la unión de esta última a la proteína Retinoblastoma (Rb), un inhibidor del crecimiento y proliferación celular (Robert et al., 2007).

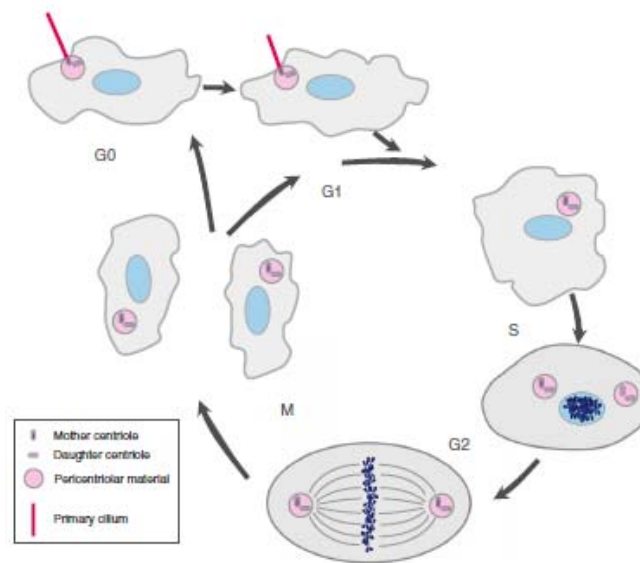


Figura 1.3. El ensamblaje y desensamblaje de las cilia está coordinado con el ciclo celular. La cilia primaria se forma en G0/G1 y se desensambla antes de la mitosis. (Adaptado de Pedersen and Rosenbaum, 2009)

Durante mucho tiempo las cilia primarias, por ser inmóviles, fueron considerados organelos vestigiales sin función aparente. Hoy día se sabe que las cilia primarias actúan como “antenas” celulares que cumplen diversos roles biológicos fundamentales para la interacción de las células con el medio que las rodea. Es así que las cilia primarias operan como estructuras mecano- y quimio-sensoras y participan activamente en la transducción de vías de señalización importantes

durante el desarrollo embrionario y para la formación, mantenimiento y función de diversos tejidos y órganos, como por ejemplo la vía de Wnt, Hedgehog (Hh) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGF α) (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009; Gerdes et al., 2007; Huangfu et al., 2003; Ross et al., 2005; Schneider et al., 2005; Simons et al., 2005) (Figura 1.4).

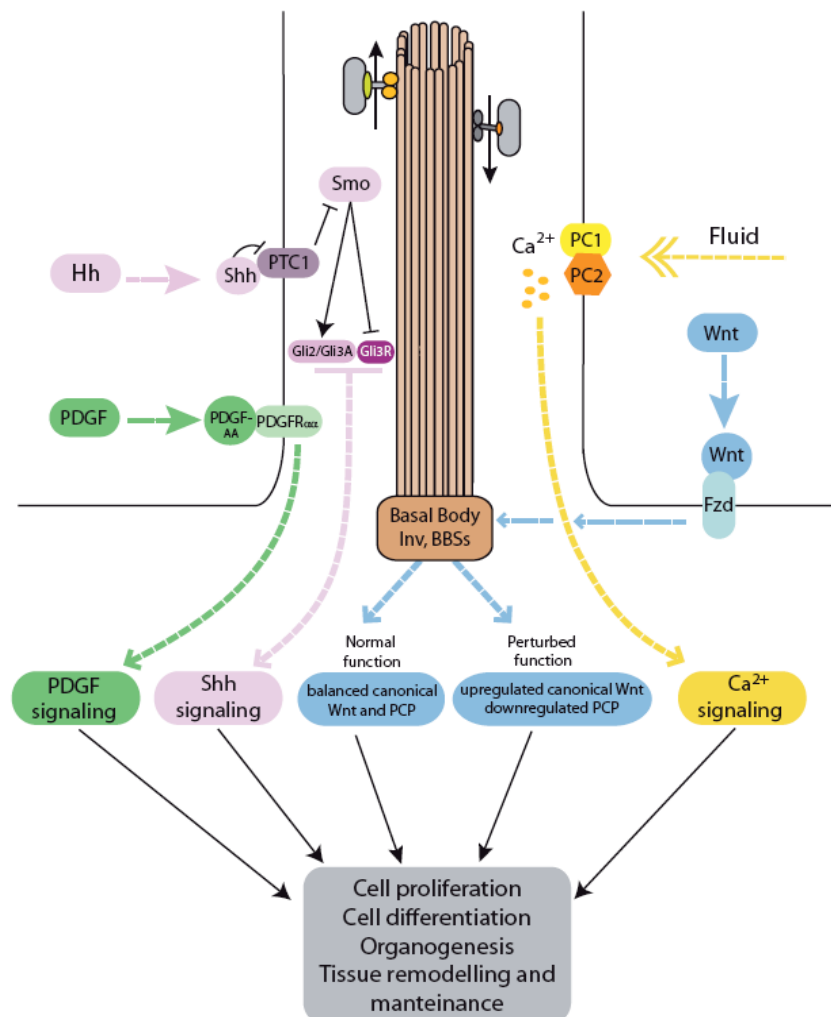


Figura 1.4. Vías de señalización que operan a través de la cilia. Esquema de la participación de la cilia en importantes vías de señalización como Wnt (celeste), Shh (violeta) y PDGF- α (verde), y en la señalización por Ca²⁺ mediada por las policistinas. Estas vías participan durante el desarrollo embrionario y para controlar la homeostasis celular. (Adaptado de Irigoín and Badano, 2011)

1.2. Las ciliopatías

Debido al rol que cumplen las cilias en la transducción de señales en vías importantes en el desarrollo embrionario no debe sorprender que el mal funcionamiento de estos organelos tenga consecuencias biológicas significativas y sea causal de diversas patologías humanas que colectivamente se han denominado ciliopatías [revisado en (Badano et al., 2006b; Fliegauf et al., 2007)]. Las ciliopatías son un grupo de patologías diversas que comprenden desde enfermedades relativamente específicas en cuanto a los tejidos u órganos afectados hasta enfermedades altamente pleiotrópicas, como el síndrome de Alstrom (OMIM 203800) o de Bardet-Biedl (BBS), en las cuales los pacientes presentan problemas en múltiples órganos y sistemas (Badano et al., 2006b; Fliegauf et al., 2007). Interesantemente, las ciliopatías comparten ciertos fenotipos conocidos como fenotipos asociados a cilias (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Fenotipos asociados a ciliopatías

	PQR	NFP	SNSL	EVC	JATD	OFD	SALM	SJ	BBS	SMK
quistes renales	x	x	x		x	x	x	x	x	x
malformaciones del SNC				x	x	x	x	x	x	x
degeneración de retina			x		x		x	x	x	
defectos simetría der-izq		x	x		x			x	x	x
polidactilia				x	x	x		x	x	x
malformaciones gonadales				x					x	x
enfermedades del corazón				x			x		x	
retardo mental				x	x	x		x	x	x
obesidad							x		x	
diabetes							x		x	
defectos del esqueleto				x	x	x				

PQR: Poliquistosis renal; NPHP: Nefronoptosis (OMIM 256100); SNSL: Síndrome de Senior-Løken (OMIM 266900); EVC: Ellis van Creveld (OMIM 225500); JATD: distrofia torácica asfixiante, Síndrome Jeune (OMIM 208500); OFD: síndrome Orofaciodigital; SALM: Síndrome de Alström (OMIM 203800); SJ: Síndrome Joubert (OMIM 213300); BBS: Síndrome Bardet-Biedl; MKS: Síndrome Meckel-Gruber; SNC: sistema nervioso central. [Adaptado de (Irigoín and Badano, 2011)]

Distintos factores pueden explicar porque la disfunción ciliar resulta en este amplio espectro de patologías afectando distintos tejidos y órganos de manera diferente. Uno de estos factores es el rol biológico que cumple la proteína que al estar afectada causa la enfermedad. A modo de ejemplo, mutaciones que afecten un receptor específico que necesita localizarse en las cilias para

su correcto funcionamiento seguramente tendrán consecuencias fenotípicas más específicas y restringidas que cuando la alteración afecta proteínas con un rol ciliar global, por ejemplo en la formación o mantenimiento del organelo. Por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican para PC1 y PC2 causan un tipo de poliquistosis renal (Gonzalez-Perrett et al., 2001; Mochizuki et al., 1996; TEPKDConsortium, 1994; Yoder et al., 2002), mientras que alteraciones en proteínas localizadas en el cuerpo basal, que pueden afectar la formación, mantenimiento y funcionalidad de las cilias, como las proteínas BBS (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009), afectan en mayor o menor medida todas las funciones asociadas con estos organelos resultando así en patologías altamente pleiotrópicas. El fenotipo final causado por el mal funcionamiento de una determinada proteína ciliar a su vez depende de otros factores, como por ejemplo, el patrón de expresión tanto espacial como temporal de la misma, la dependencia que determinado tipo celular o tejido tenga con respecto a la función ciliar y cuán compleja sea la función de la proteína tanto en el contexto de las cilias como fuera de ellas.

Por tanto, resulta importante entender el rol biológico de las proteínas afectadas en las ciliopatías, teniendo en cuenta además la posibilidad de que algunas de estas macromoléculas cumplan roles en compartimentos celulares diferentes de la cilia/centrosoma/cuerpo basal. Por ejemplo, ya se mencionó a IFT88, que puede controlar el ciclo celular en células no ciliadas (Robert et al., 2007).

1.3. Síndrome de Bardet-Biedl

El síndrome de Bardet-Biedl (BBS; OMIM 209900) es una ciliopatía humana que presenta un fenotipo multisistémico que se caracteriza principalmente por defectos progresivos, como degeneración de retina y obesidad, así como por defectos estructurales como polidactilia, malformaciones gonadales y renales. Existen también un número de características adicionales (diabetes, anosmia, problemas cardíacos congénitos y asma entre otros) que varían significativamente en su prevalencia [revisado por (Katsanis, 2004; Katsanis et al., 2001b)]. Los pacientes con BBS muestran similitudes en la fisonomía facial que comprende hipertelorismo con baja fisuras palperbrales, puente nasal plano con fosas nasales antevertidas, pliegues nasolabiales prominentes y el labio superior delgado, entre otras. Los pacientes presentan una estatura por debajo de la media de la población y acumulación de adiposidad en el tronco y extremidades proximales (Beales et al., 1999) (Figura 1.5).

Este síndrome es poco común en poblaciones caucásicas, con una prevalencia de 1:140.000-160.000 nacidos vivos en América del Norte y Europa. Sin embargo, existen regiones, como Newfoundland y Kuwait, que tienen una prevalencia mayor 1:13.000-17.000 debido

posiblemente a un efecto fundador, resultando en la introducción de mutaciones en genes de BBS en un pool genético limitado (Katsanis, 2004; Katsanis et al., 2001b). BBS es un síndrome genéticamente heterogéneo donde mutaciones en diferentes genes pueden causar la enfermedad (Katsanis et al., 2001a), al día de hoy se han clonado 16 genes causales (BBS1-12, MKS1, NPHP6/CEP290, FRITZ/C2orf86, SDCCAG8) [(Kim et al., 2010; Leitch et al., 2008; Otto et al., 2010; Stoetzel et al., 2007) y referencias comprendidas]. Inicialmente se consideró a BBS como una enfermedad autosómica recesiva pero el análisis mutacional de distintos genes BBS ha demostrado que esta enfermedad, por lo menos en algunas familias, se comporta como un rasgo oligogénico en el cual mutaciones en diferentes *loci* de BBS pueden interactuar genéticamente modulando la expresividad y/o penetrancia del fenotipo (Badano et al., 2003b; Badano et al., 2006a; Beales et al., 2003; Katsanis, 2004).

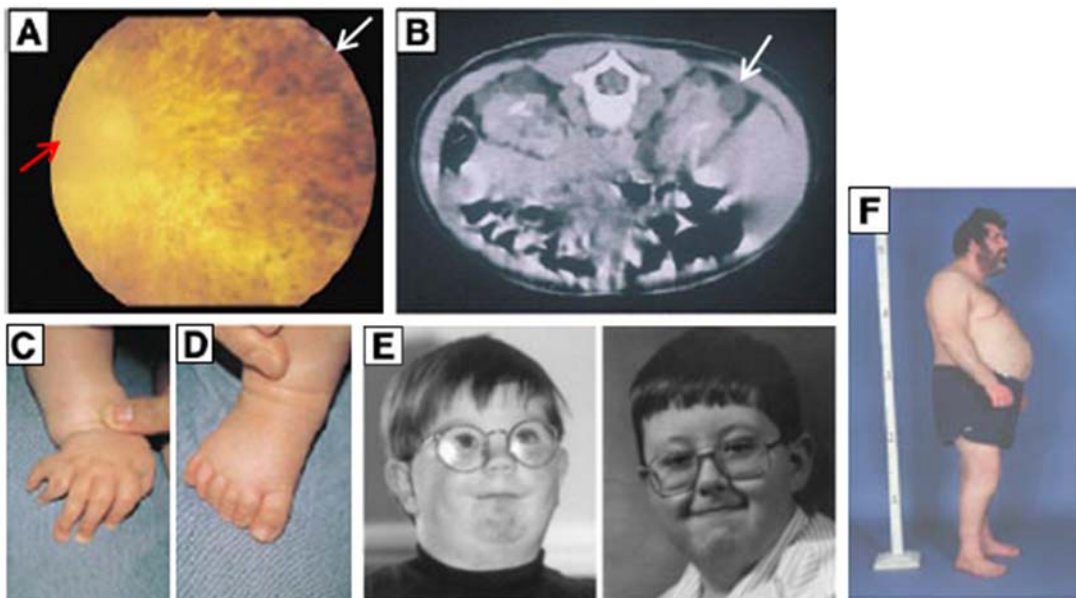


Figura 1.5. Fotos obtenidas de pacientes con BBS. (A) Degeneración de retina en paciente de 32 años (nótese el agregado de pigmentación negra (flecha blanca) y la presencia de principio de cataratas (flecha roja)). **(B)** Sección transversal del tórax donde se observa poliquistosis renal (flecha blanca) en un niño. **(C-D)** Polidactilia. **(E)** Apariencia facial de niños con BBS. **(F)** Reducción de la estatura y distribución de adiposidad torácica características. (Adaptado de Katsanis, 2001a; Beales, 1999).

1.4. Proteínas BBS

En el contexto de la biología ciliar, las proteínas BBS tendrían roles tanto estructurales como funcionales. Solo para algunas BBS puede deducirse su posible función por homología con proteínas de función conocida. Por ejemplo, *BBS3* codifica para ARL6 (del inglés: *ADP-ribosylation factor-like*) una proteína perteneciente a la superfamilia Ras, GTPasas pequeñas, que son esenciales para varios procesos de tráfico intracelular asociado a membrana (Chiang et al., 2004; Fan et al., 2004). *TRIM32* fue identificado como *BBS11* y codifica para una E3 ubiquitin-ligasa

(Chiang et al., 2006). Otro caso es el de BBS6, BBS10 y BBS12 que definen una nueva rama de la superfamilia de las chaperoninas de tipo II (Figura 1.6.C-D) (Stoetzel et al., 2007). El resto de las proteínas BBS no poseen homología con proteínas de función conocida.

Según estudios realizados en *Caenorhabditis elegans*, *bbs1*, *bbs7* y *bbs8* están involucradas en el transporte intraflagelar, ya que mutaciones en los genes que las codifican no permiten coordinar el movimiento de ninguno de los complejos IFT dentro de la cilia (Blacque et al., 2004; Ou et al., 2005; Ou et al., 2007). Además, se ha mostrado que las proteínas BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 y BBS9 junto con la proteína BBIP10 forman un complejo, el BBSome (Loktev et al., 2008; Nachury et al., 2007). Inicialmente se involucró a este complejo en el transporte vesicular, en el tráfico de membrana hacia y dentro de la cilia. Se ha propuesto que la actividad del BBSome es mediada por una interacción con Rab8 GDP/GTP, el cual en su estado unido a GTP promueve la extensión de la membrana ciliar (Nachury et al., 2007). Sin embargo, también se han planteado otros roles del BBSome, como anclaje de microtúbulos (Kim et al., 2004; Loktev et al., 2008), transporte intraflagelar (Ou et al., 2005) y ubiquitinación (Gerdes et al., 2007), por lo que el rol del BBSome no ha sido completamente elucidado.

Algunas proteínas BBS no tienen homología con proteínas de función conocida pero comparten cierta homología de secuencia entre sí. BBS1, BBS2 y BBS7 comparten una región de homología que comprende repetidos WD40, lo que sugiere que podrían pertenecer a una sub-familia de proteínas (Figura 1.6.A-B) (Badano et al., 2003a). También, BBS4 y BBS8 comparten dominios repetidos TPR (del inglés: *tetratricopeptide repeats*) generalmente asociados a interacciones proteína-proteína (Nachury et al., 2007). Por otro lado, *BBS9* también conocido como *PTHB1* (del inglés: *parathyroid hormone-responsive gene B1*), codifica para una proteína que no tiene homología con ninguna otra proteína BBS (Nishimura et al., 2005).

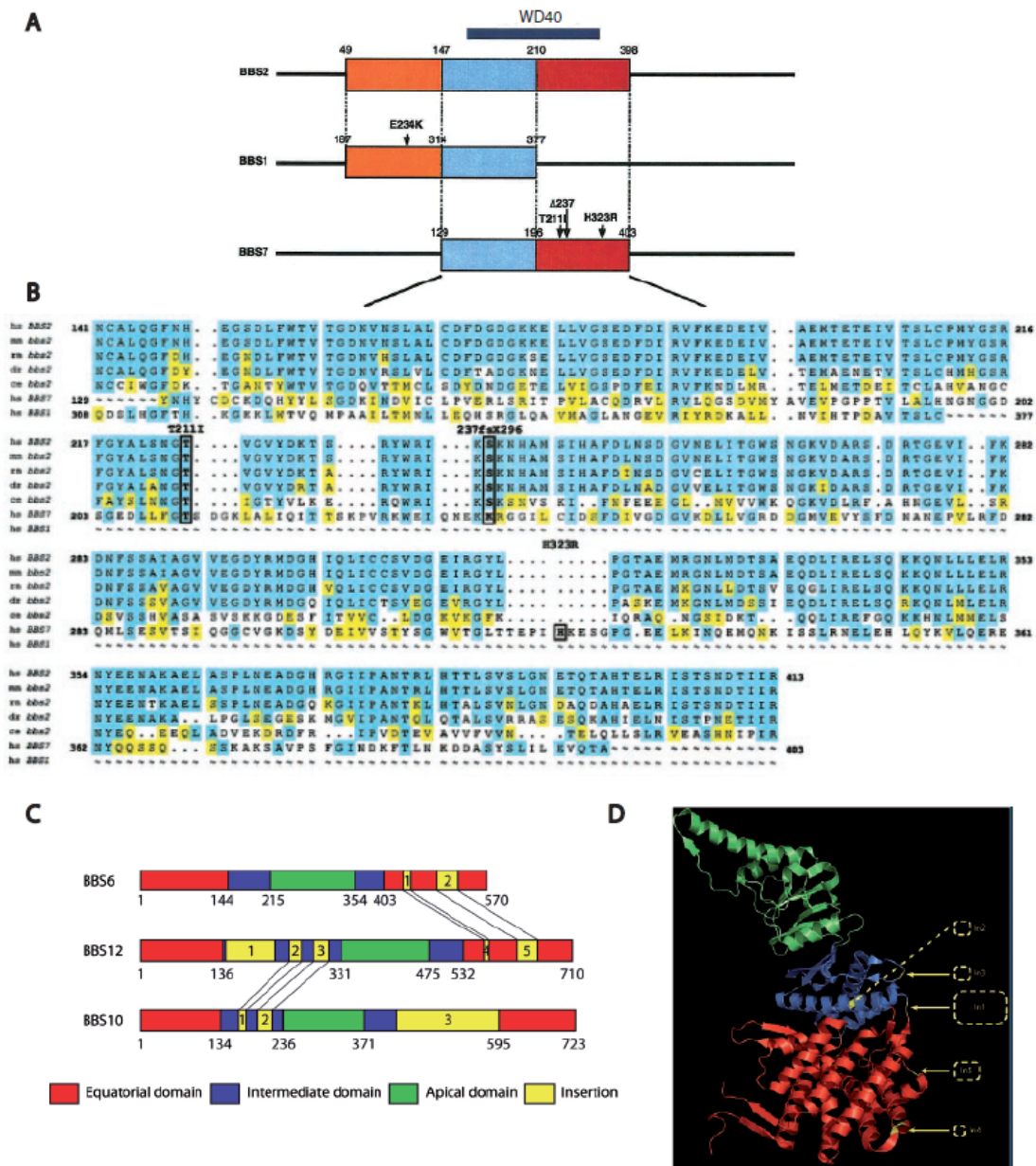


Figura 1.6. Homología entre proteínas BBS. (A-B) Dominio compartido entre BBS1, BBS2 y BBS7. (A) Representación esquemática de la región compartida entre estas tres proteínas. La región de homología entre BBS1 y BBS2 se muestra en naranja, entre BBS2 y BBS7 se muestra en rojo, y el área de homología compartida por las tres se observa en celeste. Los números corresponden a residuos aminoácidos. Se muestra la región del dominio WD40. **(B)** Alineamiento de ortólogos de BBS2 y la región de homología en BBS7 y BBS1. hs: Homo sapiens; mm: *Mus musculus*; rn: *Rattus norvegicus*; dr: *Danio rerio*; y ce: *Caenorhabditis elegans*. **(C-D) Dominio compartido entre BBS6, BBS10 y BBS12. (C)** BBS12, BBS10 y BBS6 son representadas con la típica organización de las chaperoninas del grupo II en tres dominios (ecuatorial, intermedio, apical). Puntos de inserción que aparecen comúnmente en BBS12 y BBS6 y en BBS12 y BBS10, se resaltan en amarillo con líneas negras. **(D)** Dibujo de cinta de la subunidad α de las chaperoninas del grupo II. (Adaptado de Badano et al., 2003 y Stoetzel et al., 2007)

Además de la participación en la formación y mantenimiento de la cilia, se ha reportado que las proteínas BBS modulan la vía de señalización de Wnt, alterando el balance entre las diferentes salidas de la vía. Consecuentemente, la disminución de las proteínas *bbs1*, *bbs4* y *bbs6* en el pez cebra y ratón produce defectos en la vía de señalización involucrada en la polaridad celular plana (PCP, del inglés: *planar cell polarity*) y una sobre-estimulación de la vía canónica a través de la estabilización de β -catenina, el principal efector de la vía (Gerdes et al., 2007; Ross et al., 2005). Defectos en la vía de Wnt pueden estar causalmente relacionados a un número de fenotipos asociados con ciliopatías (Gerdes et al., 2007).

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la función exacta de cada una de las proteínas BBS, tanto en las cilias como fuera de ellas, no se entiende completamente. Por estas razones, nuestro laboratorio se ha enfocado en caracterizar en profundidad la función de algunos miembros de este grupo de proteínas.

Todas las proteínas BBS analizadas hasta hace poco se han localizado en centrosoma, cuerpos basales y/o axonema de las cilias (Tabla 1.2). A su vez, datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio indican que por lo menos algunas de ellas, BBS2 y BBS7, cumplirían importantes funciones extra-ciliares, dado que no sólo se localizan en centrosomas, cuerpos basales y cilias sino que a su vez tienen la capacidad de entrar al núcleo donde participarían activamente regulando la transcripción génica (Gascue et al., 2011). Un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de las 16 proteínas BBS conocidas muestra la presencia de señales de exportación nuclear (NES, del inglés: *nuclear export signals*) en todas ellas, con excepción de BBS8, sugiriendo que las proteínas BBS podrían localizarse en el núcleo al menos transitoriamente y serían activamente exportadas fuera de este compartimento celular. En el caso de BBS7, se reportó que la región NES que se encuentra entre los residuos 625-634 es funcional ya que al mutar esta región, BBS7 se acumula en el núcleo (Gascue et al., 2011). Además, se observó que BBS7 se acumula en el núcleo cuando las células se tratan con leptomicina B, un inhibidor químico de la exportación nuclear mediada por CRM1/NES (Kudo et al., 1999). BBS2 y BBS7 (así como BBS1, BBS4, BBS5, BBS6, BBS8 y BBS10) interactúan con RNF2 (del inglés: *Ring Finger Protein 2*), un miembro del grupo *polycomb* (PcG). Las proteínas PcG regulan la expresión de distintos genes involucrados en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular a través del remodelado de cromatina (Schwartz and Pirrotta, 2007). Hemos demostrado que las proteínas BBS regulan los niveles proteicos de RNF2 y mediante este mecanismo son capaces de regular los niveles de ARNm de un número de genes blanco de esta proteína PcG, tanto en líneas celulares como *in vivo* en el pez cebra.

La entrada al núcleo de BBS7 y BBS2 aparenta ser transitoria y sumamente importante en lo que refiere a la regulación de los niveles de RNF2. Sin embargo, aún no conocemos los mecanismos utilizados por estas proteínas para entrar al núcleo, las señales que determinan su localización (ninguna posee señales de localización nuclear clásicas) y si esta capacidad es compartida por otras proteínas BBS.

Tabla 1.2. Localización reportada de las proteínas BBS

BBS	Localización	Técnica	Referencia
BBS1	axonema ciliar	inmunofluorescencia	(Jin et al., 2010)
BBS2	centrosoma, cuerpos basales, cilia, núcleo	inmunofluorescencia	(May-Simera et al., 2009); (Jin et al., 2010); (Gascue et al., 2011)
BBS3	cuerpos basales, axonema ciliar	microscopía de fluorescencia de GFP	(Fan et al., 2004)
BBS4	centrosoma, cuerpos basales, cilia	inmunofluorescencia	(Kim et al., 2004); (Nachury et al., 2007)
BBS5	cuerpos basales, cilia	inmunofluorescencia	(Li et al., 2004); (Jin et al., 2010)
BBS6	cuerpos basales	inmunofluorescencia, fraccionamiento y sedimentación en gradiente de sacarosa	(Kim et al., 2005)
BBS7	centrosoma, cuerpos basales, cilia, núcleo	Inmunofluorescencia (tratamiento con leptomicina B, BBS7 mutado sin region NES)	(Gascue et al., 2011)
BBS8	centrosoma, cuerpos basales	inmunofluorescencia	(Ansley et al., 2003)
BBS9	centrosoma, cuerpos basales, cilia	inmunofluorescencia	(Zhang et al.)
BBS10	cuerpos basales	inmunofluorescencia	(Marion et al., 2009)
BBS11	-	-	-
BBS12	cuerpos basales	inmunofluorescencia	(Marion et al., 2009)

En este contexto, **los objetivos de este trabajo son:**

- i) caracterizar en detalle la localización subcelular de las proteínas BBS enfocando nuestros estudios en evaluar la capacidad de estas proteínas de entrar al núcleo celular.
- ii) ganar información sobre la/las señales que controlan los cambios en la localización de estas proteínas. En este sentido, nos enfocaremos a estudiar la relación entre localización y ciclo celular, proceso estrechamente regulado y coordinado con el ensamblaje/desensamblaje de las cilias.

Creemos que este tipo de estudios nos permitirá entender en mayor profundidad el rol de las proteínas BBS, quizás aportando datos para comprender cómo la información captada por las cilias es capaz de alcanzar el núcleo para finalmente modular la expresión génica. Dado que muchos de los genes cuya expresión se ve alterada en ausencia de las proteínas BBS codifican para proteínas que cumplen roles fundamentales durante el desarrollo y el mantenimiento de distintos tejidos y órganos, la caracterización de las proteínas BBS brindará nuevas herramientas para entender la base celular de los distintos fenotipos asociados a esta y otras ciliopatías.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Trabajo con células de mamíferos

2.1.1. Cultivo de células de mamífero

La línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón fue mantenida en medio DMEM (del inglés: *Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con D-glucosa (4,5 g/L), piruvato de sodio (110 mg/L) y 10% suero bovino fetal (SBF) a 37°C en 5% CO₂. La línea celular murina IMCD3, proveniente de células del túbulo colector de riñón, fue mantenida en medio DMEM/F12 (1:1) con 10% SBF a 37°C en 5% CO₂. Ambas líneas se cultivaron en presencia de antibióticos: estreptomycin (100 µg/mL) y penicilina (100 unidades/mL).

2.1.2. Transfección de células para la incorporación de plásmidos

- **Transfección con fosfato de calcio**

Esta metodología se basa en la introducción de ADN plasmídico en células eucariotas mediante la formación de un precipitado de fosfato de calcio y ADN. El precipitado se adhiere a la superficie celular e ingresa al interior por endocitosis (Graham and van der Ebb, 1973; Wigler et al., 1977).

Para transfectar una placa de 10cm de diámetro se sembraron las células el día anterior sin antibiótico para que estuvieran en una confluencia de aproximadamente 60% al momento de la

transfección. Primero se mezclaron 90µL de cloruro de calcio 2,5M con 20µg de ADN plasmídico y se añadieron 650µL de agua destilada. Luego se agregó lentamente el buffer HBS (2X; 50mM HEPES, 10mM KCl, 12mM dextrosa, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄, pH 7.05) al tiempo que la solución era aireada con una pipeta Pasteur para facilitar la mezcla y formación del precipitado. Se dejó incubar 30 minutos y se esparció la mezcla gota a gota sobre el cultivo celular. Pasadas 6 horas de la transfección se lavó el cultivo con buffer fosfato salino (NaCl 8.01 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.78 g/L, KH₂PO₄ 0.27g/L, pH 7.4; PBS) y se cambió el medio agregándole antibiótico (penicilina/estreptomicina).

- **Transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen)**

Este método se basa en el transporte de ADN al interior de células eucariotas mediante lípidos catiónicos. El ADN cargado negativamente por los grupos fosfato se une a los lípidos catiónicos, que en presencia de lípidos neutros y en medio acuoso forma liposomas unilamelares. Con estos reactivos el ADN queda unido a la superficie de los liposomas que a través de cargas positivas residuales interaccionan con los residuos de ácido siálico de la superficie celular. El mecanismo de entrada del ADN a la célula se cree que involucra la endocitosis de los liposomas (Felgner et al., 1987).

Las células se plaquearon en medio sin antibiótico el día anterior para que estuvieran en una confluencia del 90% al momento de la transfección. Se realizaron dos pasos en paralelo, por un lado se diluyó el ADN plasmídico en medio de cultivo sin suero (OPTI-MEM, Invitrogen) y por otro se mezcló Lipofectamina en OPTI-MEM dejándolo reposar 5 minutos. Los volúmenes empleados están relacionados al tamaño de la placa a transfectar (Tabla 2.1). Se incubó durante 20 minutos la mezcla de ADN y Lipofectamina. Se añadieron los complejos formados al cultivo celular y se agitó de manera que se dispersaran por la placa. Después de 6 horas se cambió el medio agregándole antibiótico.

Tabla 2.1. Volúmenes empleados en la transfección con Lipofectamina según el tamaño de la placa

Diámetro de placa	Vol de OPTI-MEM	ADN	Lipofectamina
10cm	2 x 1,5mL	24µg	40µL
60mm	2 x 500µL	8µg	10µL
35mm	2 x 250µL	4µg	5µL

2.1.3. Sincronización de cultivos celulares y citometría de flujo

Como se mencionó en la introducción, la ciliogénesis está estrechamente relacionada al ciclo celular y se sabe que algunas proteínas ciliares regulan directamente la progresión del ciclo celular. Existe la posibilidad de que la localización de las proteínas BBS pueda depender de la presencia o ausencia de cilios. Con el fin de analizar esta dependencia se sincronizaron cultivos celulares para estudiar si existen cambios de localización de algunas proteínas BBS entre células ciclando (no ciliadas) y células en estadio G₀ del ciclo celular (ciliadas). La sincronización de los cultivos se verificó mediante citometría de flujo. La localización subcelular se analizó mediante Western blot e inmunofluorescencia.

2.1.3.1. Sincronización de cultivos celulares

- **Sincronización en fase G₀**

Para sincronizar las células en fase G₀ se realizaron dos protocolos distintos:

- 1) Cultivo en ausencia de SBF durante 72 horas. El SBF posee componentes (factores de crecimiento y otros aún no identificados) que son indispensables para el crecimiento y proliferación celular. Es así que el cultivo de células en ausencia de suero induce a las mismas a salir del ciclo y entrar en fase G₀ (Campisi et al., 1984). 24 horas en ausencia de SBF es suficiente para que las células que ya pasaron el primer punto de chequeo completen el ciclo y entren en G₀ (Pardee, 1974, 1989). El cultivo por 72 horas se realiza a fin de dar tiempo a las células a ciliar.
- 2) Cultivo de células en confluencia. Las células en confluencia, debido a la inhibición por contacto, entran en G₀. Se plaquearon las células de manera que alcanzaran un 100% de confluencia y se mantuvieron así 72 horas.

La sincronización por ambos métodos fue analizada mediante citometría de flujo (ver más abajo).

- **Sincronización en fases G₁/S, S y G₂**

Para obtener cultivos celulares enriquecidos en células en las distintas fases del ciclo se puso a punto la técnica de doble bloqueo con timidina realizando algunas modificaciones a un protocolo ya descrito (Kim et al., 2005). Con este protocolo las células se arrestan en la interfase G₁/S, ya que se impide la síntesis de ADN por una retroinhibición negativa de la síntesis de nucleótidos (Jackman and O' Connor, 2001).

Previo al tratamiento con timidina se decidió llevar las células a G0 cultivándolas en ausencia de SBF 24 horas a fin de homogeneizar la población celular de partida. Pasadas las 24 horas se agregó DMEM con 20% de SBF durante 2 horas para estimular a las células a retomar el ciclo celular. De esta manera se consiguió que la mayoría de las células estuvieran en igual condición para enfrentarse al arresto con timidina con el protocolo ya descrito. Las células fueron crecidas en 2mM de timidina durante 18 horas, lavadas con PBS y crecidas en medio sin timidina por 8 horas. Nuevamente las células fueron incubadas con 2mM de timidina por 18 horas, y finalmente se cultivaron con medio fresco a fin de que reanudaran el ciclo. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo a distintos tiempos para monitorear su progresión a lo largo del ciclo celular y obtener una determinación cuantitativa de las subpoblaciones en las distintas etapas. Pasadas 3 y 7 horas de la reactivación un 60 y 43 % de células se encuentran en fase S y G2 respectivamente.

2.1.3.2. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

El análisis en el citómetro de flujo se realizó mediante el marcado de los ácidos nucleicos con yoduro de propidio (IP). Este agente se intercala estequiométricamente en el ADN permitiendo identificar el contenido de ADN de la célula mediante intensidad de fluorescencia. Las células en la fase G0 y G1 del ciclo celular tienen un contenido de ADN de 1C, en G2 de 2C siendo la intensidad de fluorescencia de estas células el doble que la de las anteriores. Este análisis en el citómetro de flujo no permite diferenciar células en estadio G0 de las que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular. En la fase S el contenido de ADN va a ser intermedio entre 1C-2C, por lo que la intensidad de fluorescencia de células en fase S va a estar comprendida entre la intensidad correspondiente a células en G0 y en G2 (Figura 2.1).

Para analizar las células por citometría se partió de 1×10^6 células las cuales se fijaron con 1 mL de etanol 70% a 4°C agitando con un vortex para obtener una suspensión monodispersa. Se centrifugó a 260g durante 5 minutos, se lavó con PBS y se volvió a centrifugar. Se resuspendió el pellet en 270 μ L de PBS y se filtraron las células para que no hubieran agregados. Se incubó a la suspensión celular fijada con 15 μ L de ARNasa (1mg/mL) a 37°C 15 minutos. Luego, para la coloración, se agregó en oscuridad 15 μ L de IP (1mg/mL) y se incubó durante al menos 15 minutos.

El citómetro de flujo utilizado fue el CyAn ADP (Dako). El laser usado para excitar al IP fue el azul (488nm) ya que el IP tiene un máximo de absorción a 536nm. Este laser también es el utilizado para analizar las propiedades de dispersión de la luz de la célula que dan información de tamaño y

granularidad de la célula. Esta información es colectada por los detectores forward scatter (FSC) y side scatter (SSC) respectivamente. El IP tiene un máximo de emisión a 623nm por lo que el detector utilizado fue el FL2 que colecta luz en un ancho de banda de 575/25nm.

Las adquisiciones se analizaron en gráficos monoparamétricos como histogramas y biparamétricos como diagramas de puntos con el software Summit (Figura 2.1). En cada ensayo se inició la obtención de los datos en un diagrama SSC vs FSC (Figura 2.1.1). En este se seleccionaron las células a analizar mediante la realización de una ventana que descartaba restos celulares. Para las células seleccionadas se graficó intensidad de fluorescencia de IP (lineal) vs área de fluorescencia de IP, para descartar agregados celulares (Figura 2.1.2). Los agregados se identifican porque tienen la misma intensidad de fluorescencia que células individuales (ya que tienen el mismo contenido de ADN), pero poseen el doble de área porque al ser células pegadas demoran más tiempo en atravesar el laser. En el último diagrama mencionado se trazó una ventana seleccionando las células individuales y se analizaron 10.000 eventos. Los datos obtenidos se graficaron en un histograma de número de eventos vs. área de fluorescencia (Figura 2.1.3), donde fácilmente se reconocen las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo. Para obtener datos cuantitativos de porcentaje de células en cada fase se usó un gráfico biparamétrico, intensidad de fluorescencia de IP (lineal) vs área de fluorescencia de IP, que permite obtener datos más confiables (Figura 2.1.4).

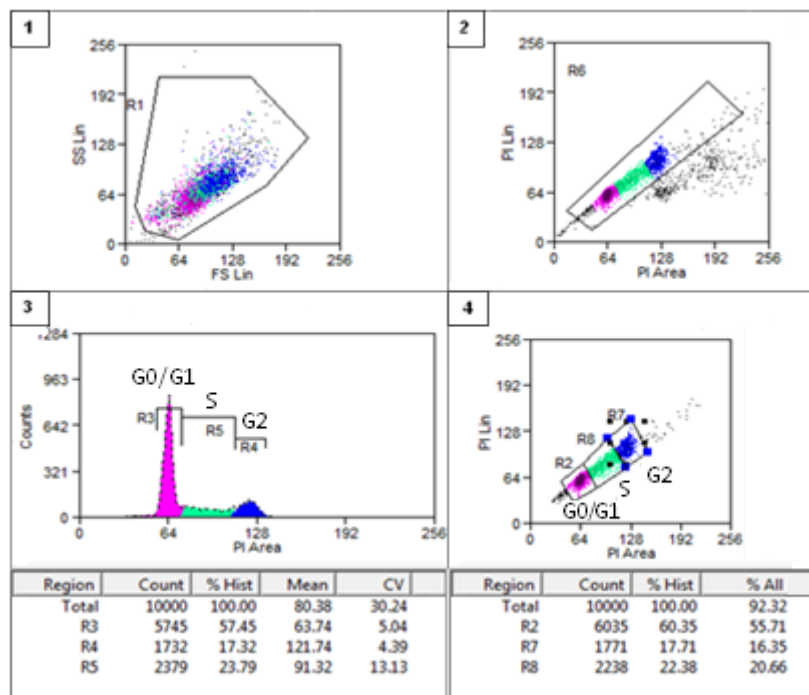


Figura 2.1. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo. Ejemplo de análisis de datos obtenidos en el citómetro de flujo a partir de un cultivo no sincronizado.

2.1.4. Fraccionamiento subcelular

Se realizó fraccionamiento subcelular de la línea NIH3T3 utilizando un kit comercial (Qproteome Cell Compartment Kit, QIAGEN). Mediante la adición secuencial de diferentes buffers de extracción y posterior centrifugación diferencial, proteínas de distintos compartimentos pueden ser aisladas selectivamente. El primer buffer que es agregado a las células rompe la membrana plasmática sin solubilizarla permitiendo el aislamiento de proteínas citosólicas, permanecen intactos los organelos. Se incubó la muestra en un agitador rotatorio para favorecer este proceso y se centrifuga a 1000g. El pellet de la primera centrifugación es resuspendido en un buffer que solubiliza la membrana plasmática y de los organelos, excepto la membrana nuclear. Se incubó la muestra en un agitador rotatorio para favorecer este proceso y se centrifuga a 6000g. El sobrenadante contiene proteínas de membrana y del lumen de los organelos. El pellet que contiene al núcleo es solubilizado con el agregado de una nucleasa (Benzonasa) que permite remover hasta las proteínas fuertemente unidas a los ácidos nucleicos. Se centrifuga a 6800g y el sobrenadante contiene las proteínas nucleares. La eficiencia del fraccionamiento se analizó por Western Blot detectando proteínas nucleares (histona H3 o RNF2) y centrosomales (γ -tubulina) en las diferentes fracciones como se describe más abajo. Es importante destacar que la utilización de este kit nos permitió obtener fracciones nucleares que no presentaban contaminación con proteínas centrosómicas, algo que era fundamental en nuestros estudios y que no logramos utilizando métodos de fraccionamiento más tradicionales basados en centrifugación diferencial.

2.1.5. Obtención de extractos totales de células

Se prepararon extractos totales mediante la lisis de células usando detergente. Células en placa de 10cm de diámetro se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el medio de cultivo y se agregó 1mL de buffer compuesto por Tris/HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, EDTA 5mM y Tritón 1%, suplementado con inhibidor de proteasas. Luego de 5 minutos la placa se rastrilló y el sobrenadante se pasó a un microtubo. La suspensión se agitó en un vortex cada 2 minutos durante 20 minutos para favorecer el proceso de lisado. La muestra se mantuvo siempre en hielo para minimizar la degradación de proteínas. A continuación se centrifugó en una microcentrífuga a 13.500 g durante 15 minutos a 4°C.

2.1.6. Inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia

Para la visualización de diferentes proteínas en células en cultivo realizamos inmunofluorescencia. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio y fijadas con metanol a -20°C por 10 minutos o paraformaldehído (PFA) 4% (p/v) a temperatura ambiente por 10 minutos. Se

permeabilizaron las membranas con Tritón X100 0,1% (p/v) durante 10 minutos con agitación y luego se bloqueó con SBF 5,5% (v/v) por una hora, todo a temperatura ambiente. Después las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2.2) en PBS durante 2 horas. Se visualizó la unión de los anticuerpos mediante la incubación con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos durante una hora a temperatura ambiente (Tabla 2.2). Para observar la localización de γ -tubulina y tubulina acetilada se incubaron las células con anticuerpos monoclonales anti- γ tubulina y anti-tubulina acetilada, luego se visualizó la unión de estos anticuerpos utilizando un único anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado a un fluoróforo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) o TO-PRO-3, ambos intercalantes del ADN, incubando las células 10 minutos a temperatura ambiente. Entre cada etapa del protocolo descrito se realizaron lavados con PBS. Los cubreobjetos secos fueron montados con la solución de montaje Prolong Gold Antifade (Invitrogen) sobre portaobjetos. Los preparados fueron observados mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) o uno confocal (Leica SP5).

Tabla 2.2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpos	tipo	origen	dilución
Primarios			
anti-BBS1 policlonal de conejo	antisuero	Lab. Dr. Katsanis	1/250
anti-BBS2 policlonal de conejo	antisuero	Lab. Dr. Katsanis	1/200
anti-BBS2 policlonal de conejo(H-246)	purif. por afinidad	Santa Cruz	1/200
anti-BBS4 policlonal de conejo	antisuero	Lab. Dr. Katsanis	1/200
anti-BBS7 policlonal de conejo	antisuero	Lab. Dr. Katsanis	1/100
anti-BBS8 policlonal de conejo	antisuero	Lab. Dr. Katsanis	1/200
anti-GFP policlonal	purif. por afinidad	Invitrogen	1/400
anti-myc monoclonal de ratón	purif. por afinidad	Sigma	1/1000
anti-tubulina acetilada monoclonal de ratón	purif. por afinidad	Sigma	1/1000
anti-γ tubulina monoclonal de ratón	purif. por afinidad	Sigma	1/1000
Secundarios			
anti-IgG conejo hecho en burro - Alexa-fluor 488		Invitrogen	1/1000
anti-IgG ratón hecho en cabra - TMR		Invitrogen	1/1000

Nota: Los anticuerpos policlonales contra proteínas BBS fueron realizados contra péptidos de las proteínas correspondientes. Los antisueros anti-BBS1, BBS2, BBS7 y BBS4 fueron cedidos por el Laboratorio del Dr. Nicholas Katsanis (Duke University) y han sido previamente utilizados para la localización de proteínas en células en cultivo por inmunofluorescencia (Gascue et al., 2011; Kim et al., 2004; Tan et al., 2007).

2.2. Análisis de Proteínas

2.2.1. Cuantificación de Proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método espectrofotométrico indirecto del ácido bicinconínico (BCA). Este ensayo se basa principalmente en dos reacciones. En una reacción dependiente de la temperatura y de un pH alcalino los enlaces peptídicos reducen los iones Cu^{2+} del sulfato de cobre a Cu^+ , por lo que la cantidad de Cu^{2+} que se reduce es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra. Luego cada ion Cu^+ es quelado por dos moléculas de BCA formando un producto de color púrpura que presenta un máximo de absorbancia a $\lambda=562\text{nm}$ (Smith et al., 1985).

Se preparó una mezcla de soluciones de ácido bicinconínico y sulfato cúprico (50:1). Se utilizaron una serie de diluciones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida para realizar una curva de calibración que permitió estimar la concentración de las muestras problema. Todo se realizó por duplicado y se normalizó respecto al blanco (buffer utilizado para obtener los extractos). Se sembraron $10\mu\text{L}$ de todas las muestras a cuantificar en una placa de 96 pocillos, se agregó $200\mu\text{L}$ del reactivo a cada muestra, luego se incubó 30 minutos a 37°C y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro que permite leer placas, a una longitud de onda de 570nm .

2.2.2. Preparación de muestras para SDS-PAGE

A las muestras se le adicionó buffer de muestra Laemmli (4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125M Tris HCl), y se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar completamente las proteínas.

En los casos en que la concentración de proteínas fue baja se precipitaron las mismas con ácido tricloroacético (TCA). Se agregó TCA 10% final, se incubó en hielo 30 minutos. Luego se centrifugó a $10.000g$ en una microcentrífuga por 20 minutos a 4°C , se lavaron los residuos con 1mL de acetona a 4°C , se volvió a centrifugar a 10.000rpm 20 minutos a 4°C y se disolvió el pellet en buffer muestra procediendo como ya se describió.

2.2.3. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio (SDS). El porcentaje del gel separador fue de 10%, porcentaje que depende del tamaño de la proteína de interés. Se preparó primero el gel separador 10% y se vertió en el soporte para armado de geles, una vez que gelificó se preparó el gel concentrador 5% volcándose en el mismo

soporte, por último se colocó el peine para formar los pocillos. Las proporciones de los componentes se indican en Tabla 2.3. En ambos geles se agregó por último el persulfato de amonio y el TEMED porque son los que inician la polimerización.

Se sembraron las muestras y el marcador de peso molecular (250-10 KDa, Fermentas) en el gel de poliacrilamida. Se realizó la corrida a 100V utilizando buffer Tris glicina SDS (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3; TGS).

Tabla 2.3. Gel de poliacrilamida. Proporciones de los componentes utilizados.

	separador 10%	concentrador 5%
H₂O	5,9 mL	3,4 mL
acrilamida 30%	5,0 mL	830 µL
buffer 1,5M Tris-HCl pH 8.8	3,8 mL	-
buffer 1M Tris-HCl pH 6,8	-	630 µL
SDS 10%	150 µL	50 µL
persulfato de amonio APS 10%	150 µL	50 µL
TEMED	6 µL	5 µL
Vol. Total	15 mL	5 mL

2.2.4. Western blot

Finalizada la corrida se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (del inglés: *polyvinylidene difluoride*) utilizando un sistema húmedo de Hoefers. Se transfirió a 400mA durante 2 horas a 4°C.

La membrana se bloqueó con una solución de PBS conteniendo, 0,1% Tween-20 y 5% leche descremada toda la noche (O.N, del inglés: *overnight*) a 4°C. Luego se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 2.4) 2 horas a temperatura ambiente con agitación (excepto el anticuerpo anti-BBS7 que se incubó O.N). Después se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 2.4) conjugado a una peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés: *horseradish peroxidase*). Entre cada etapa se realizaron 3 lavados con PBS y 0,1% Tween-20 (PBS-T) de por lo menos 3 minutos cada uno. Como sustrato para la enzima se utilizó un sustrato quimioluminiscente (Western Blot Pierce ECL, Thermo Scientific), incubándose 1 minuto. Para revelar se colocó la membrana dentro de un protector plástico en un caset de revelado junto con una placa fotográfica, se variaron los tiempos de exposición para obtener una buena relación señal/background. Por último se reveló utilizando una máquina de revelado automático (Amersham Hyperprocessor).

Tabla 2.4. Diluciones de anticuerpos utilizados en Western Blot

Anticuerpos	origen	dilución	incubación
<i>primarios</i>			
anti-BBS2 policlonal de conejo	Lab. de Katsanis	1/500	O.N, 4°C
anti-BBS2 policlonal de conejo (H-246)	Santa Cruz	1/500	O.N, 4°C
anti-BBS7 policlonal de cabra (L19)	Santa Cruz	1/100	O.N, 4°C
anti-GFP policlonal conejo	Invitrogen	1/1000	2hs, T amb
anti-myc monoclonal de ratón	Sigma	1/5000	2hs, T amb
anti- γ tubulina monoclonal de ratón	Sigma	1/2000	2hs, T amb
<i>secundarios</i>			
anti-IgG conejo conjugado a HRP	Sigma	1/50000	1h, T amb
anti-IgG ratón conjugado a HRP	Santa Cruz	1/15000	1h, T amb
anti-IgG cabra conjugado a HRP	Santa Cruz	1/8000	1h, T amb

2.3. Obtención y caracterización de líneas celulares expresando BBS7-EGFP en forma estable

Para obtener líneas celulares que expresen en forma estable una proteína de interés es necesario lograr que el plásmido que codifica para dicha proteína se inserte en el genoma celular. Así, las células se transfectan con el plásmido en cuestión que debe poseer un casete de resistencia para un antibiótico. Luego se cultivan células en presencia del antibiótico de forma de seleccionar aquellas que poseen el plásmido. Si la selección se realiza por suficiente tiempo se seleccionarán aquellas células que hayan incorporado el plásmido al genoma.

2.3.1. Clonado de BBS7 en el vector pEGFP-N2 (Clontech)

Para expresar BBS7 fusionada a GFP se clonó el gen de la proteína en el plásmido pEGFP-N2. BBS7 fue amplificada por PCR y se clonó primero en el plásmido pGEM-T para simplificar el procedimiento. El clonado en pGEM-T es más simple, no requiere la digestión con enzimas de restricción. Para clonar en pEGFP-N2 se requiere hacer una digestión del plásmido y del inserto, pero la digestión es más eficiente al hacerse sobre vectores. En productos de PCR la enzima debe cortar en los extremos de la doble hebra, en cambio el vector tiene continuidad en la doble hebra y permite que se produzca un complejo de corte más estable.

2.3.1.1. Amplificación del gen de BBS7 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ambas isoformas del gen BBS7 (Badano et al., 2003a) fueron amplificadas por PCR. Esta reacción permite, mediante la enzima Taq polimerasa, aumentar las copias del ADN molde de manera exponencial. Implica la utilización de oligonucleótidos cortos que sean complementarios al molde y sirvan como cebadores para iniciar la reacción, también nucleótidos (dNTPs) para la síntesis de las nuevas hebras, así como un buffer adecuado para la enzima.

La amplificación de la isoforma larga de BBS7 (BBS7.1) se hizo a partir de ADN copia preparado a partir de ARN de células Hela (disponible en el laboratorio), mientras que la isoforma corta (BBS7.2) se amplificó a partir de un plásmido que tenía clonado BBS7.2 (pCMV-myc-BBS7, disponible en el laboratorio). Se utilizó el mismo primer directo para ambas isoformas el cual se diseñó para que tuviera un sitio de corte para la enzima de restricción XhoI, y se utilizó un primer reverso específico para cada isoforma, ambos contenían un sitio de corte para BamHI (según Tabla 2.5). La enzima que se utilizó fue la Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) que es de alta fidelidad, la cual introduce menos errores que la Taq polimerasa.

El programa de amplificado en el termociclador para BBS7.1 comenzó con la desnaturalización del ADN a 98°C por 5 minutos, luego 35 ciclos que constaban primero de una desnaturalización para separar las hebras de 98°C por 10 segundos, hibridación de los primers a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto, por último, al finalizar los ciclos, una extensión a 72°C por 10 minutos. El programa de amplificado en el termociclador para BBS7.2 varió en la temperatura de hibridación de los primers que se realizó a 56°C por 30 segundos.

Tabla 2.5. Primers utilizados en la amplificación por PCR de BBS7. Se resaltan los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción

oligonucleótidos	secuencia
BBS7 frwd	ACTGCTCGAGATGGATCTGATTTAAACCGAATG
BBS7.1-Rev	ATCG GGATCCC TGCTGCATCGAAGAATGAAA
BBS7.2-Rev	ATCG GGATCCC ACCATAGAGTCTTTCAAGATGTGCAGGT

2.3.1.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para la detección del producto de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%. Se disolvió agarosa en buffer Tris-ácido bórico-EDTA (Tris 890mM; ácido bórico 890mM; EDTA 20mM pH 8; TBE) para hacer el gel, y se agregaron 3µL de bromuro de etidio 10mg/mL (intercalante de ADN) cada 100mL de gel para visualizar los ácidos nucleicos bajo luz UV. Se sembró un marcador

de peso molecular y a las muestras se les adicionó buffer de carga. Se corrió a 100V el tiempo necesario para separar los fragmentos de ADN.

2.3.1.3. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para purificar el ADN a partir del gel de agarosa se cortó la banda del peso esperado y se utilizó un kit comercial (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen). El procedimiento comienza con la solubilización de la agarosa en un buffer caotrópico, la alta concentración de sales caotrópicas permite que el ADN se una a la sílica (Boom et al., 1990; Chen and Thomas, 1980; Marko et al., 1982) que se encuentra en las columnas de purificación, luego se realizan lavados con isopropanol que permiten remover las sales o contaminantes y finalmente se eluye el ADN de las columnas con agua destilada.

2.3.1.4. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de nucleótidos y producen un corte en la hebra de ADN. Estos sitios varían entre 4 y 8 nucleótidos, y la mayoría son palindrómicos, en los cuales la secuencia se lee igual hacia delante o hacia atrás. Luego de la digestión las enzimas dejan extremos cohesivos o romos.

Pueden hacerse digestiones con dos enzimas a la vez si hay un buffer en el cual las dos puedan funcionar. En la reacción de digestión se colocó el ADN a cortar (3µg/mL), 1,5µL de la/s enzima/s de restricción, 3µL buffer, 0,3µL de BSA (10mg/mL) que mejora la estabilidad y la eficiencia de la enzima, y H₂O (csp 30 µL). Se incubaron las digestiones a 37°C O.N. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa (protocolo descrito parte 2.3.1.2) para verificar que la digestión fue completa.

2.3.1.5. Ligación en vectores

- **Ligación en vector pGEM-T**

Vector utilizado para clonar productos de PCR, se utilizó como intermediario en el proceso de clonado.

El vector pGEM-T tiene extremos 3' con timina, este nucleótido sobresaliendo permite hibridar con el inserto si a este se le agrega adenina en los extremos, una característica de la polimerasa Taq. Como los productos de PCR fueron producidos con una polimerasa de alta fidelidad que no agrega estas adeninas libres, se incubaron 47,4µL del producto de PCR con 1 µL de la enzima Taq polimerasa, 5,5µL del buffer Taq 10x y 1,1 µL de dATPs (10mM) durante 20 minutos a 72°C.

Para la ligación en pGEM-T se utilizó la T4 DNA ligasa (1 µL) en buffer de ligación (5µL de buffer 2X) que permite catalizar el enlace fosfodiéster entre el 5' fosfato y el 3' hidroxilo del producto de PCR (con sus extremos A, 3 µL) y el vector (con sus extremos T, 50ng) en una hora a temperatura ambiente.

Las construcciones pGEM-T/BBS7 se mandaron secuenciar al servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur utilizando los oligonucleótidos para SP6 y T7.

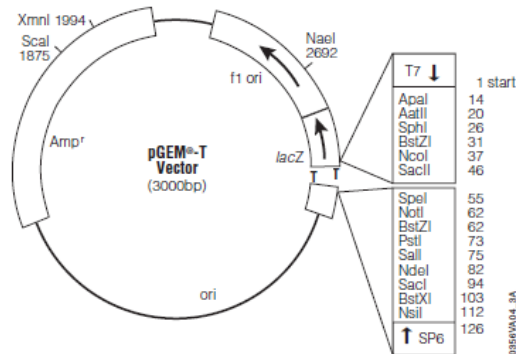


Figura 2.2. Vector pGEM-T (Promega). Pueden observarse: los marcadores de selección como el gen de resistencia a ampicilina y el gen lacZ, los extremos T, y el sitio de clonado múltiple (MCS) con las enzimas de restricción que pueden ser utilizadas para clonar.

- **Ligación en vector pEGFP-N2**

El vector pEGFP-N2 fue utilizado para expresar BBS7 fusionado por su extremo C-terminal a EGFP (del inglés: *enhanced green fluorescent protein*). El vector pEGFP-N2 codifica para una variante del GFP salvaje que fue optimizada para emitir una fluorescencia más brillante y producir una mayor expresión en células de mamíferos. El máximo de excitación es a 488nm y el máximo de emisión es a 507nm. El sitio de clonado múltiple (MCS) se encuentra entre el promotor de CMV (citomegalovirus) y el ORF de EGFP. Los genes clonados en el MCS se expresan fusionados al Nt de EGFP si están en el mismo marco abierto de lectura.

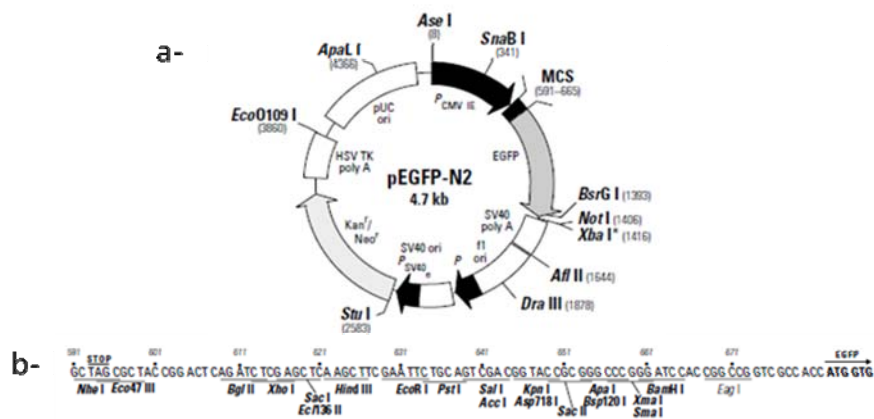


Figura 2.3. Vector pEGFP-N2. Pueden observarse: **(a)** el promotor de CMV seguido del MCS y downstream el gen que codifica para EGFP, los marcadores de selección como el gen de resistencia a kanamicina y neomicina **(b)** el sitio de clonado múltiple con las enzimas de restricción que pueden ser utilizadas para clonar.

Para el clonado en el vector pEGFP-N2 se realizó una doble digestión del mismo con las enzimas de restricción BamHI y XhoI según protocolo descrito 2.3.1.4. Estas cortan una sola vez en el sitio de clonado múltiple del pEGFP-N2 dejando el vector abierto con extremos cohesivos pronto para la ligación.

Los sitios de restricción para estas enzimas fueron agregados flanqueando al gen BBS7 que fue previamente clonado en pGEM-T. Se digirió el vector pGEM-T que contenía el inserto con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, se hizo una electroforesis en gel de agarosa (protocolo descrito parte 2.6.2) y de allí se purificó el inserto para la ligación.

La digestión con dos enzimas de restricción permite darle direccionalidad a la ligación. La reacción de ligación es igual que la descrita para el vector pGEM-T pero se incubó a 4°C O.N.

2.3.1.6. Transformación de bacterias para obtención de plásmido

El método utilizado fue shock térmico en células quimiocompetentes. Se incubaron en hielo durante 30 minutos 30µL de bacterias competentes (MAX Efficiency DH5α, Invitrogen) con 2 µL del producto de la mezcla de ligación. Luego, se realizó un shock térmico a 42°C por 45 segundos y nuevamente se incubaron en hielo por 2 minutos. Se agregaron 900 µL de medio SOC, se agitó a 200 rpm a 37°C durante una hora.

2.3.1.7. Selección de bacterias transformadas

- **Con pGEM-T**

El vector pGEM-T tiene dos marcadores de selección: resistencia a ampicilina, que permite determinar qué bacterias incorporaron el plásmido, y el metabolismo de X-gal, que permite determinar qué bacterias incorporaron el plásmido con el inserto a clonar.

El gen de resistencia a ampicilina codifica para la enzima beta-lactamasa que rompe el anillo beta-lactámico de los antibióticos. Las bacterias que hayan incorporado este plásmido serán resistentes al antibiótico y serán capaces de crecer en un medio con ampicilina.

El vector tiene a su vez el gen *lac z* en el sitio de clonado múltiple. Este gen codifica para un polipéptido α que es parte de la enzima beta-galactosidasa. Si la bacteria incorporó el plásmido con el inserto no es capaz de sintetizar el polipéptido α que hace funcional a la enzima (al unirse con el polipéptido Ω que produce la bacteria), por lo que si crece en un medio con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, análogo de la galactosa) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, estimula la transcripción del gen *lac z*) no podrá metabolizar X-gal a un precipitado azul insoluble, mientras que las bacterias que incorporaron el plásmido sin el inserto sí lo harán. Según el color de las colonias crecidas en LB agar con ampicilina + X-gal e IPTG se puede determinar qué bacterias incorporaron el plásmido recircularizado (azules) y cuales el plásmido con inserto (blancas). Las que no incorporaron nada mueren.

En placas de LB agar con ampicilina (0,1mg/mL) se agregó por rastrillado 40 μ L de X-gal y 5,6 μ L de IPTG 1M, y se sembraron 100 μ L de las bacterias transformadas. Las placas y se incubaron a 37°C O.N.

- **Con pEGFP-N2**

El vector pEGFP-N2 tiene el gen Tn5 que le confiere la resistencia a kanamicina, este gen codifica para la enzima aminoglicosido fosfotransferasa que modifica el antibiótico y previene la interacción del mismo con la subunidad 70S del ribosoma impidiendo que afecte la transcripción. Las células que incorporen el plásmido van a ser capaces de crecer en medio con dicho antibiótico.

En placas de LB agar con kanamicina (0,1mg/mL) se sembraron 100 μ L de las bacterias transformadas y se incubaron a 37°C O.N.

2.3.1.8. Extracción y purificación de ADN plasmídico de las bacterias

Una muestra de las colonias seleccionadas fueron crecidas en 5mL de medio LB con 5µL de ampicilina (100 mg/mL) o kanamicina (50 mg/mL), agitándose a 200rpm a 37°C O.N. El medio enriquecido en bacterias se utilizó para hacer una minipreparación de ADN plasmídico mediante el Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). El kit utiliza la lisis alcalina de las bacterias y se basa en la diferencia en la renaturalización del ADN plasmídico y del ADN genómico, se da más rápido la del ADN plasmídico por ser más pequeño y quedar las hebras enlazadas. Primero se realiza la desnaturalización con SDS (Birnboim, 1983; Birnboim and Doly, 1979), después se hace una rápida neutralización en condiciones alcalinas que produce una renaturalización intracatenaria del ADN genómico formando un agregado insoluble que precipita y en el ADN plasmídico se produce una rehibridación intercatenaria que permite que el plásmido se mantenga en solución. Se coloca el sobrenadante en una columna de sílica, allí se adhiere el ADN debido a la alta concentración de sales caotrópicas. Se realizan lavados con buffer y así se remueven posibles contaminantes y se eluye el ADN con una solución con baja concentración de sal o agua.

Luego de extraer el ADN plasmídico se verificó la presencia de los insertos mediante digestión con enzimas de restricción (protocolo descrito 2.3.1.4) y por análisis por electroforesis en gel de agarosa (protocolo descrito 2.3.1.2).

2.3.2. Producción de líneas celulares expresando BBS7-EGFP establemente

Con el fin de generar líneas celulares que expresen de forma estable BBS7 fusionada a EGFP, se transfectaron células NIH3T3 e IMCD3 con los vectores correspondientes para cada isoforma de BBS7 unida a EGFP. La línea celular NIH3T3 fue transfectada con fosfato de calcio, mientras que la línea IMCD3 se transfectó con Lipofectamina ya que el porcentaje de transfección con fosfato de calcio es muy bajo en esta línea celular.

La selección de las células que incorporaron el plásmido comenzó 48 horas después de la transfección. Se realizó con neomicina (G418) ya que el plásmido le confiere a la célula resistencia a este antibiótico. La dosis de G418 utilizada fue previamente determinada en curvas de muerte celular, siendo la concentración óptima para la selección la mínima necesaria para matar todas las células en un período de 10-14 días. El antibiótico actúa sobre las células en división por lo que afecta antes a aquellas que proliferan más rápido. Para realizar las curvas de muerte celular se cultivaron células con distintas concentraciones de G418 (0-800µg/mL) durante 12 días, cambiando el medio cada 48 horas. Este tiempo fue suficiente para que todas las células del

control estuvieran muertas. Así se determinó la concentración óptima de neomicina: 150 µg/mL de G418 para la línea celular NIH3T3 y 800 µg/mL para IMCD3.

Las células NIH3T3 transfectadas fueron cultivadas con G418 a la concentración antes indicada por 12 días. Posteriormente se procedió a clonar utilizando el método del cilindro. Para ello se seleccionaron grupos de células que parecieran provenir de una única, asegurando así que esas células tenían inserto un mismo número de copias del plásmido en el mismo sitio del genoma. Se comenzó marcando bajo microscopio óptico clones de células. Se colocó un cilindro sobre la marca, se tripsinizaron y recogieron las células contenidas en el cilindro, que fueron sembradas en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos. Cabe destacar que con esta herramienta no se obtiene una clonación perfecta pero sí un enriquecimiento en células clonales.

Para la línea IMCD3 transfectada la clonación se realizó luego de un mes de selección mediante citometría de flujo y separación de células individuales (single cell deposition). Lamentablemente, por problemas técnicos la separación no fue exitosa y no pudimos repetirla hasta el momento.

2.4. Análisis estadístico de los datos

Se utilizó la prueba de χ^2 de Pearson para probar la independencia de dos variables entre sí. Esta prueba mide la discrepancia entre una distribución observada y otra esperada (teórica) de los datos, y determina si las diferencias existentes entre ambas se deben al azar. El χ^2 se calcula:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(\text{observada}_i - \text{teórica}_i)^2}{\text{teórica}_i}$$

Las variables analizadas fueron la presencia/ausencia de gránulos y las fases del ciclo celular: G0 y S en el ensayo de sincronización de cultivos celulares y análisis de BBS2 por inmunofluorescencia.

Para el mismo ensayo se calculó el *odds ratio* (oportunidad relativa) que indica cuanto más probable es la ocurrencia del evento que su no ocurrencia. Es el cociente de dos razones: el numerador es la razón de la probabilidad de que un evento suceda y la probabilidad de que no suceda bajo ciertas condiciones y el denominador es la razón de la probabilidad de que dicho evento suceda y la probabilidad de que no suceda bajo las condiciones complementarias.

3. Resultados

3.1. Análisis de la localización subcelular de proteínas BBS

Las proteínas BBS estudiadas hasta hace poco han sido reportadas con localización en la cilia, cuerpo basal y centrosoma (Tabla 1.2). Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio indican que BBS2 y BBS7 pueden ingresar al núcleo celular. Además, un análisis *in silico* en busca de regiones NES en la secuencia aminoacídica de las restantes proteínas BBS indica que existe la posibilidad de que también puedan ingresar al núcleo, con excepción de BBS8 (Gascue et al., 2011). Para estudiar esta posibilidad se analizó la localización subcelular de algunas proteínas BBS mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos policlonales disponibles en el laboratorio (anti-BBS1, BBS2, BBS4, BBS7 y BBS8) y empleando cultivos no sincronizados de la línea celular murina NIH3T3.

Comenzamos nuestro análisis evaluando la localización subcelular de la proteína BBS1. En este caso se observó que, de forma similar a lo reportado previamente, BBS1 se localiza en centrosomas y cuerpo basal de las cilias (Figura 3.1, flechas blancas), así como también en el axonema ciliar, de algunas células ciliadas (Figura 3.1 D-I, flechas abiertas). A su vez, en algunas células se observó a BBS1 en el núcleo (Figura 3.1, flechas dobles) presentando un patrón de tinción que indicaría que BBS1 estaría excluida de sitios correspondientes a heterocromatina. Se realizaron controles negativos para corroborar que la señal con el anticuerpo anti-BBS1, y los demás anticuerpos anti-BBS, es específica. Se utilizó un suero pre-inmune como control, aunque no era el suero pre-inmune correspondiente al conejo donde se generó el antisuero anti-BBS1 (Figura 3.2.A), y también se realizó un control de conjugado, en ausencia de anticuerpo primario. (Figura 3.2.C). En ninguno de los dos casos observamos tinción nuclear.

Para confirmar la presencia de BBS1 en el núcleo intentamos realizar un Western blot sobre fracciones subcelulares citosólicas y nucleares. Sin embargo, el antisuero anti-BBS1 no funcionó en Western blot (datos no mostrados).

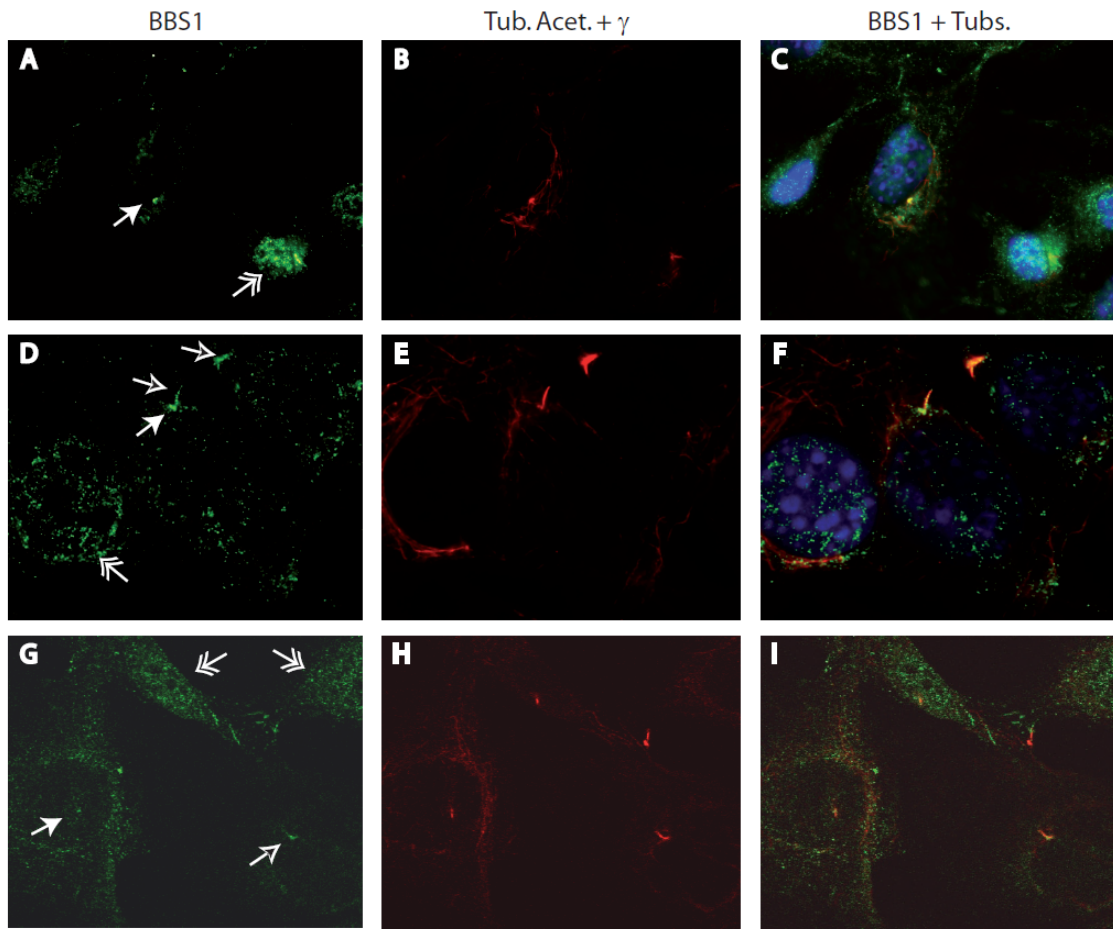


Figura 3.1. Localización subcelular de BBS1 en células NIH3T3. Fotos provenientes de microscopía de epifluorescencia excepto (G-I) que fueron obtenidas con microscopio confocal, muestran un plano del análisis confocal. En verde se muestra BBS1, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada), en azul el núcleo que fue teñido con DAPI para microscopía de epifluorescencia.

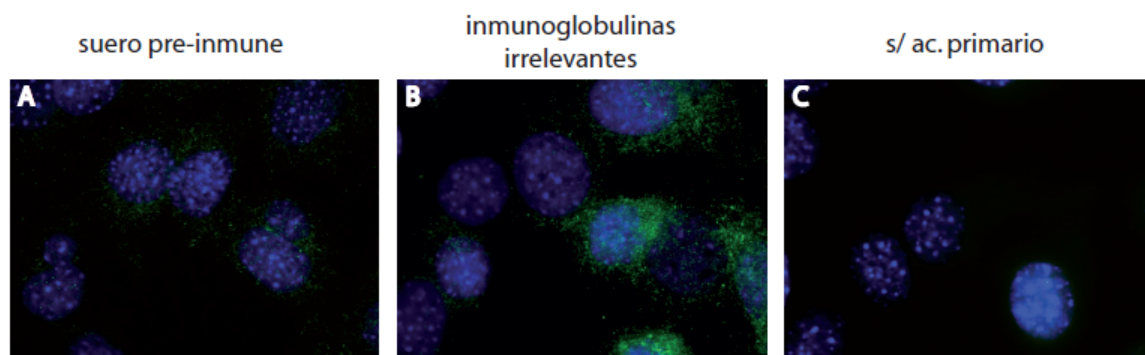


Figura 3.2. Control negativo de anticuerpos. Fotos provenientes de microscopía de epifluorescencia. (A) se incubó con suero de conejo pre-inmune (B) se incubó con inmunoglobulinas de conejo irrelevantes (C) control del anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo, no se incubó con anticuerpo primario. En azul el núcleo que fue teñido con DAPI.

La localización de BBS2 se estudió utilizando dos reactivos: un antisuero producido contra un péptido de la proteína, cedido por el laboratorio del Dr. N. Katsanis (Duke University, USA) y un anticuerpo policlonal comercial (Santa Cruz) también producido contra un péptido y purificado por afinidad utilizando el mismo péptido.

Utilizando el antisuero se observó la misma localización que la reportada previamente usando este reactivo (Gascue et al., 2011): una clara tinción nuclear (Figura 3.3.A-F). Nuestros datos indican que BBS2 se localiza dentro del núcleo presentando un patrón de puntos discretos dentro de este compartimento, excepto en aquellas células que están en división en donde BBS2 aparece homogéneamente distribuido en el citoplasma, excluido del núcleo en las etapas finales de la división celular (Figura 3.3.D-F, doble flecha). Además, aunque menos frecuente, en algunas células se observó tinción en centrosoma y cuerpo basal (datos no mostrados) como ha sido reportado previamente (May-Simera et al., 2009). A diferencia de lo observado con el antisuero, utilizando el anticuerpo comercial se observó tinción en el axonema ciliar en la mayoría de las células ciliadas, además de un puntillado principalmente citoplasmático (Figura 3.3.G-L, flecha abierta). Se realizó un control negativo utilizando inmunoglobulinas irrelevantes que es lo más correcto para anticuerpos purificados por afinidad (Figura 3.2.B) y no se observó tinción en la cilia.

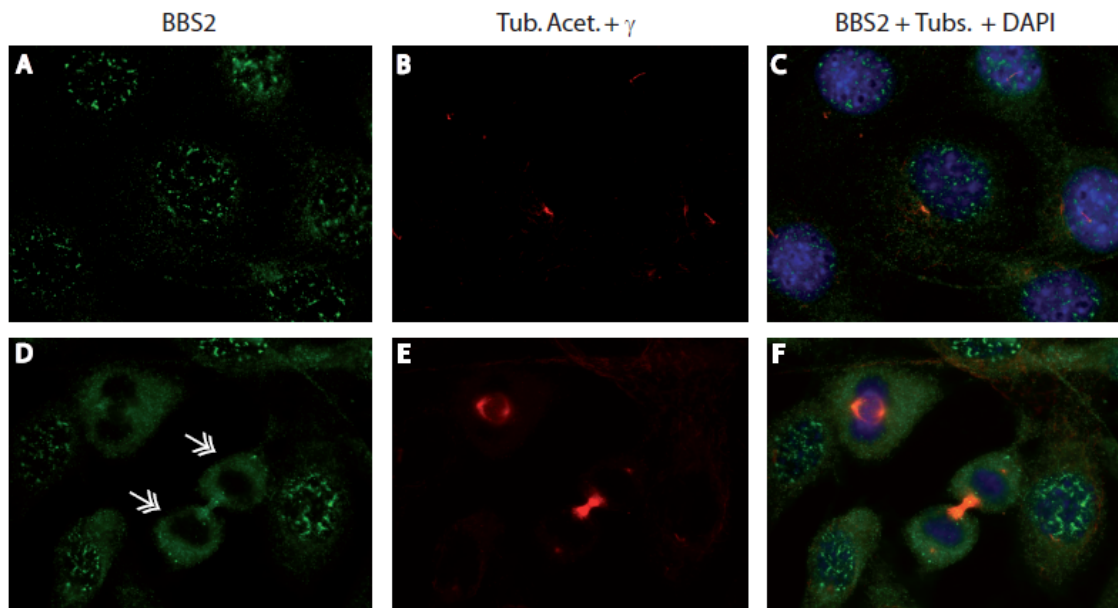
Para confirmar la presencia de BBS2 en el núcleo se analizaron por Western blot fracciones subcelulares, citosólica y nuclear, utilizando los reactivos que se usaron en inmunofluorescencia. Ninguno de los dos reactivos reconoció claramente la proteína endógena, probablemente porque los niveles de la misma son muy bajos y no sea detectable por esta técnica. Por lo tanto, transfectamos en forma transiente células NIH3T3 con un plásmido que expresa BBS2 fusionado al epítipo myc (disponible en el laboratorio, Protocolo 2.1.2). En este plásmido la expresión de la proteína se encuentra bajo el control de un promotor fuerte como es el del citomegalovirus (CMV), por lo que 48 hs post-tranfección se logra obtener niveles importantes de la proteína de interés. Así, se prepararon extractos totales y se obtuvieron fracciones citosólica y nuclear de células transfectadas con pMyc-BBS2 y se analizaron por Western blot. Como se muestra en la Figura 3.4.B y D, en estas condiciones ambos reactivos detectaron la proteína myc-BBS2, al igual que un anticuerpo anti-myc (Figura 3.4.C). Con ambos reactivos además, se observó la presencia de BBS2 tanto en el citoplasma como en el núcleo. La pureza de la fracción nuclear se evaluó estudiando en la misma la presencia de γ -tubulina, una proteína presente en el centrosoma y que con muchos protocolos de fraccionamiento subcelular contamina la fracción nuclear. En nuestro caso era muy importante que el procedimiento de fraccionamiento permitiera obtener fracciones nucleares libres de centrosoma, ya que en el centrosoma se localizan varias de las proteínas que

se están estudiando y que queremos saber si entran al compartimiento nuclear. Como se ve en la Figura 3.4.B, la fracción nuclear no está contaminada con γ -tubulina, por lo que la presencia de BBS2 en dicho compartimento no es un artefacto producto de contaminación. Además, como control de que la fracción citoplasmática no estuviera contaminada con la nuclear se utilizó un anticuerpo anti-RNF2, una proteína nuclear. Esta se detectó únicamente en la fracción nuclear (Figura 3.4.A), avalando el fraccionamiento.

Si se comparan los Western blot obtenidos con fracciones subcelulares de células transfectadas con myc-BBS2 y sin transfectar (Figura 3.4.A y B), utilizando el antisuero anti-BBS2, se observa una banda tenue (Figura 3.4.A, flecha roja) en la fracción nuclear de células sin transfectar que parece corresponder a BBS2, sugiriendo que en condiciones basales BBS2 se encuentra en el núcleo, tal como se observó por inmunofluorescencia utilizando el mismo reactivo. Asimismo observamos que el antisuero también reconoce otras bandas (Figura 3.4.A y B, flechas azules) de PM cercano al de BBS2 que parecen ser inespecíficas, ya que su intensidad es la misma en extractos de células sin transfectar o transfectadas con pMyc-BBS2.

A la hora de interpretar los resultados es importante tener en cuenta que el kit de fraccionamiento advierte tener componentes que son capaces de interferir en la cuantificación de las proteínas, por lo que es posible que no se haya cargado la misma cantidad de proteína de las distintas fracciones. Por este motivo no deben utilizarse estos resultados para concluir sobre la abundancia relativa de BBS2 en una fracción con respecto a otra. Simplemente nos permite decir, en forma cualitativa, que nuestra proteína de interés, en este caso BBS2, se detecta en la fracción nuclear.

antisuero (lab. Dr Katsanis)



anticuerpo (Sta. Cruz)

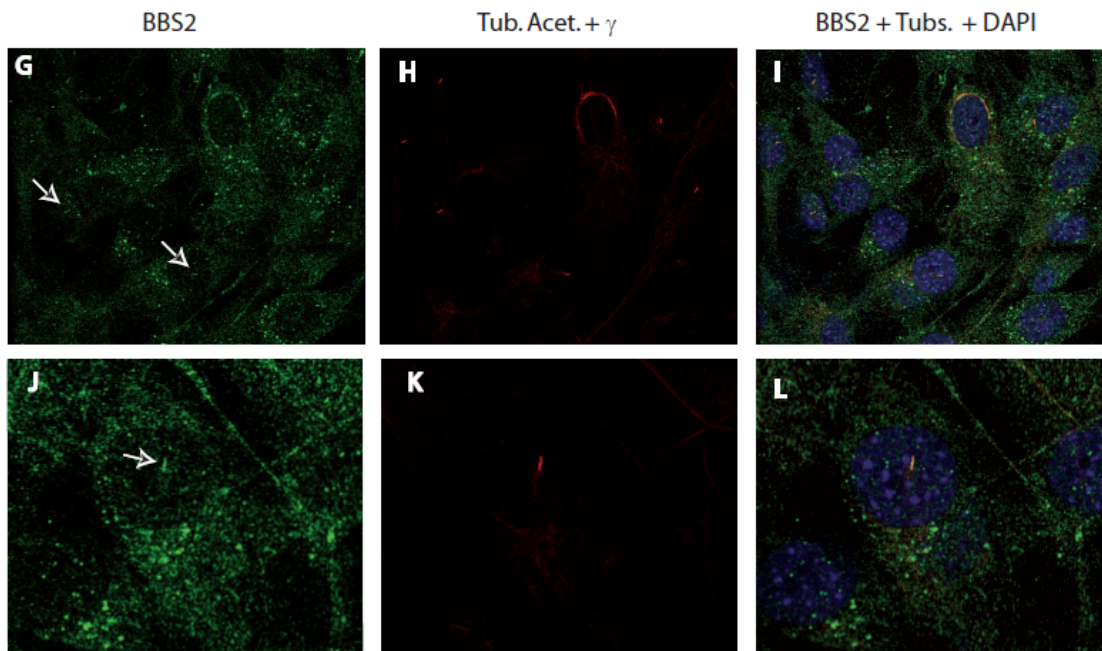


Figura 3.3. Localización de BBS2 en células NIH3T3 por inmunofluorescencia. (A-F) Fotos obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Para la detección de BBS2 se utilizó un antisuero anti-BBS2 obtenido del laboratorio del Dr. Katsanis. **(G-L)** Fotos obtenidas con microscopía confocal (se muestra uno de los planos del análisis confocal). En este caso para la detección de BBS2 se utilizó un anticuerpo comercial (Sta. Cruz). En verde se muestra BBS2, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada), en azul el núcleo que fue teñido con DAPI (A-F) o TO-PRO (G-L)

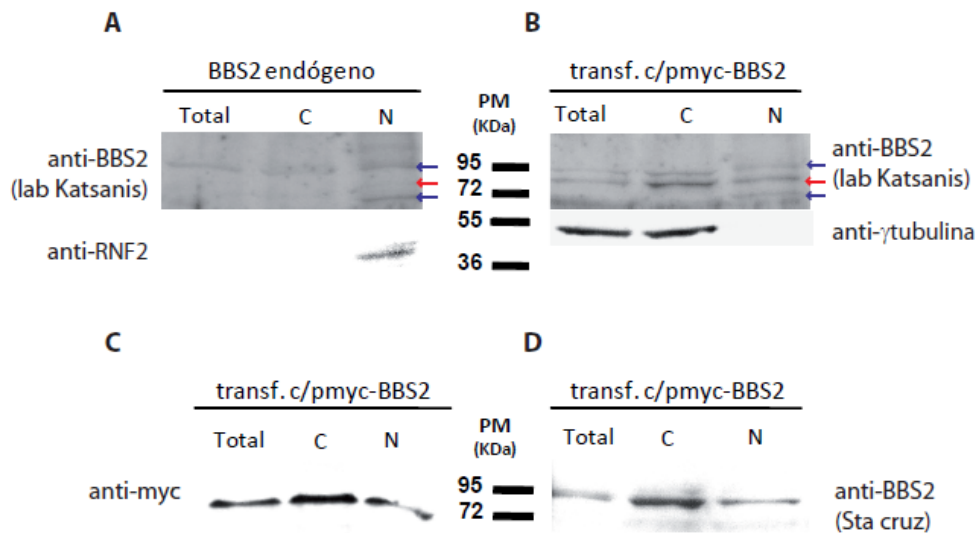


Figura 3.4. Localización subcelular de BBS2 en células NIH3T3 por fraccionamiento subcelular y Western blot. Se realizó un fraccionamiento subcelular de células NIH normales (A) o transfectadas con pMyc-BBS2 (B-D) a fin de aumentar los niveles de BBS2. (A-B) BBS2 se detectó en las fracciones (Total, C: citosólica, N: nuclear) usando el antisuero del laboratorio de Dr. Katsanis. Además se controló la purificación detectando en las fracciones γ -tubulina (citoplasmática) y RNF-2 (nuclear). (C) la proteína de fusión myc-BBS2 se detectó usando un anticuerpo anti-myc (D) BBS2 se detectó usando un anticuerpo comercial (Sta. Cruz).

En el caso de BBS4, nuestros ensayos de inmunofluorescencia muestran una clara co-tinción de BBS4 y γ -tubulina (Figura 3.5, flechas blancas), similar a datos ya publicados que reportan a BBS4 como una proteína de localización centrosómica/cuerpo basal (Kim et al., 2004). En este caso, nuestros datos de inmunofluorescencia no mostraron a BBS4 en el núcleo. Intentamos estudiar la localización de BBS4 por Western blot en fracciones subcelulares pero, al igual que con el suero anti-BBS1, el antisuero anti-BBS4 no funcionó en Western blot.

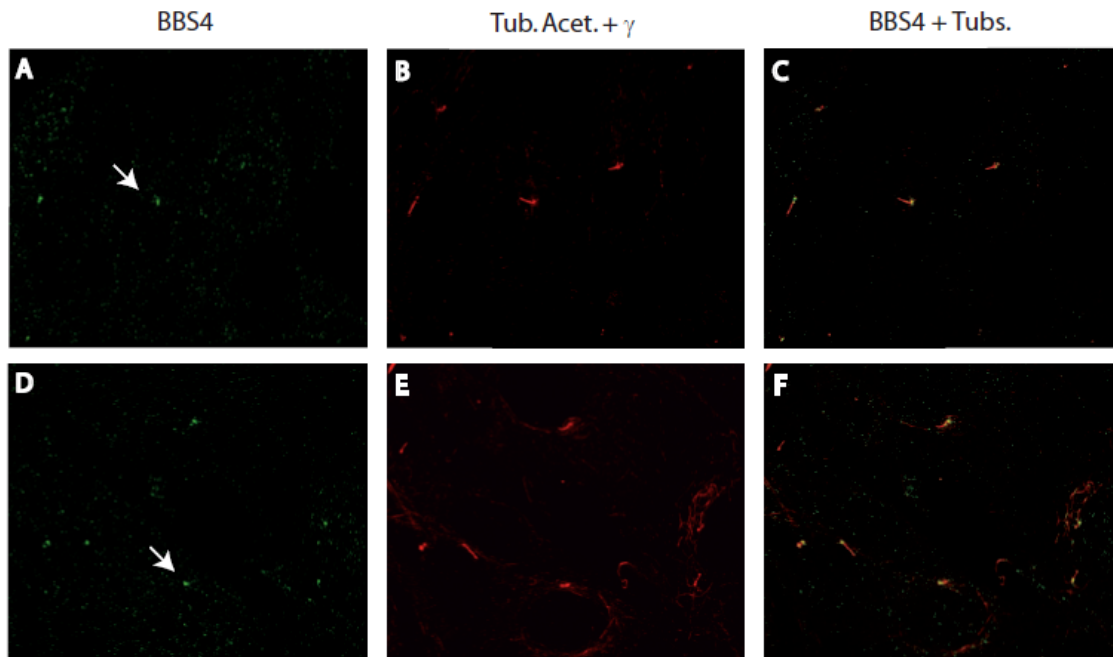


Figura 3.5. Localización subcelular de BBS4 en células NIH3T3. Fotos obtenidas por microscopía confocal (se muestra uno de los planos). En verde se muestra BBS4, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada).

En el caso de BBS7 observamos que la proteína presenta una localización perinuclear, especialmente concentrada en la región donde se encuentra el centrosoma (Figura 3.6.A-F, indicado con una punta de flecha). En algunas células ciliadas a su vez encontramos a BBS7 co-localizando con centrosomas, cuerpos basales y el axonema ciliar (Figura 3.6.D-F, flecha blanca) tal como ha sido reportado (Gascue et al., 2011). Si bien experimentos previos en el laboratorio lograron mostrar en un bajo porcentaje de células la presencia nuclear de BBS7 por inmunofluorescencia, en este estudio no fuimos capaces de observar esta localización en las distintas condiciones ensayadas. Sin embargo, utilizando fracciones subcelulares y Western blot detectamos la presencia de BBS7 en el núcleo (Figura 3.6.G), tal como había sido demostrado previamente [Figura 3.6.H, adaptado de (Gascue et al., 2011)].

Por último, quisimos evaluar la localización de BBS8, una proteína previamente descrita como centrosómica/cuerpo basal (Ansley et al., 2003). Sin embargo utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético de esta proteína no se observó la localización reportada para BBS8, sino que se vió una señal artefactual. En este caso, será necesario adquirir o desarrollar nuevos anticuerpos para poder estudiar la localización de esta proteína.

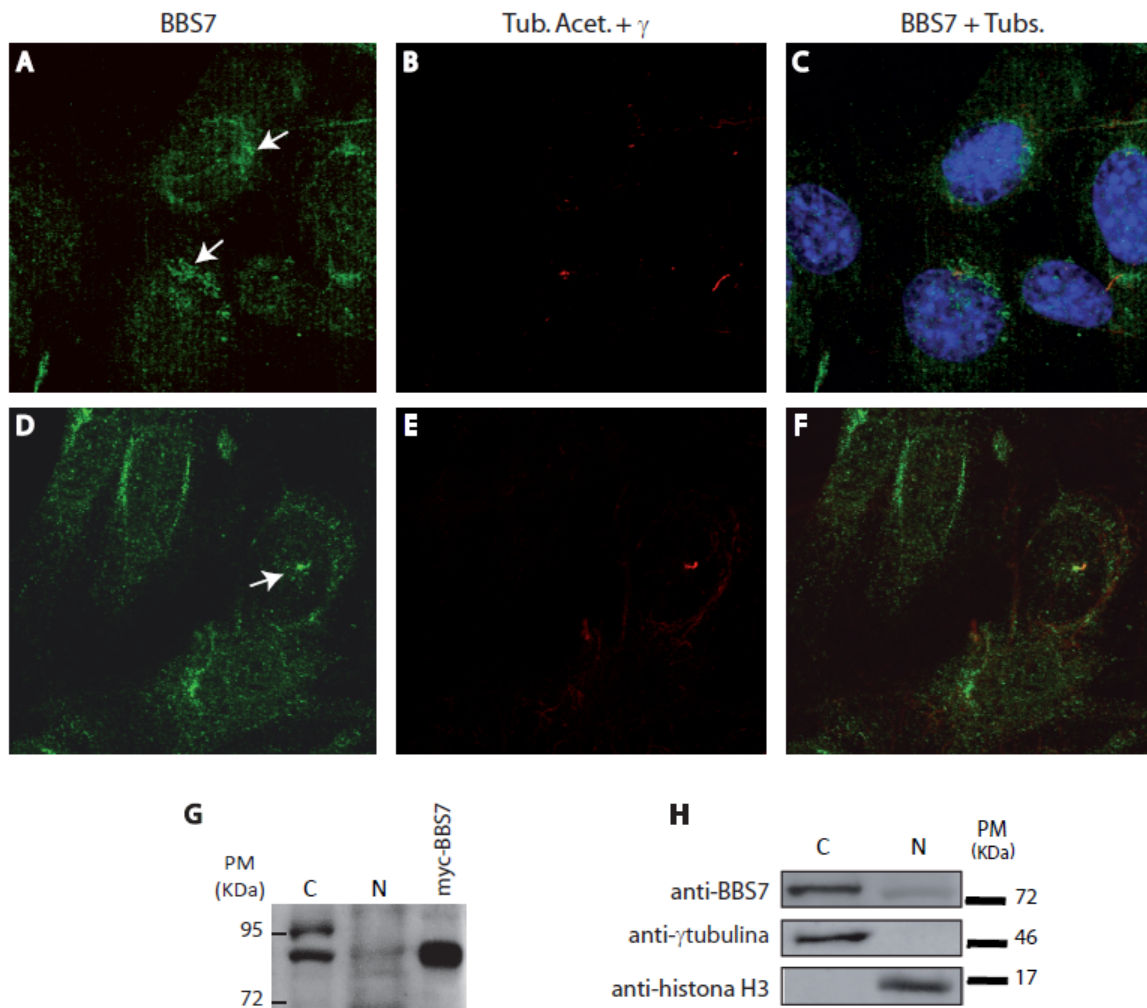


Figura 3.6. Localización subcelular de BBS7 en células NIH3T3. (A-F) Fotos obtenidas por microscopía confocal. En células NIH3T3 se muestra en verde BBS7, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada) y en azul el núcleo que fue teñido con TO-PRO. (G) Western blot con distintas fracciones sub-celulares (C: citosólica, N: nuclear) de un cultivo de NIH3T3. Como control se corrió también un extracto total de células transfectadas con pMyc-BBS7. Las proteínas fueron separadas en un gel de 8%. La detección de BBS7 se realizó usando un anticuerpo comercial (Sta Cruz). (H) Figura tomada de Gascue et al. 2011 donde se muestra un Western blot de fracciones citoplasmática y nuclear de células HEK293 donde se analizó BBS7 y, como control del fraccionamiento, γ -tubulina (citoplasmática) e histona H3 (nuclear). En este caso las proteínas fueron separadas en un gel de 10%.

En resumen, puede observarse que los patrones de localización de las proteínas BBS estudiadas varían tanto entre ellas como en cada caso particular entre distintas células, lo que sugiere que la localización está regulada o responde a algún estímulo. A su vez, en el caso de BBS1, BBS2 y BBS7 se observó que las proteínas pueden localizarse en el núcleo celular.

3.2. Relación entre la localización subcelular de BBS2 y BBS7 y el ciclo celular

Pensamos que para entender el rol biológico de las proteínas BBS es necesario estudiar a fondo sus patrones de localización subcelular y comprender a qué responden los cambios que observamos en los mismos. En este contexto, sería importante saber cuáles son las señales o

estímulos que por ejemplo hacen que estas proteínas entren al núcleo. Debido a la estrecha relación que hay entre el ciclo celular y la ciliación, se decidió analizar si existe relación entre el ciclo celular y los cambios de localización de las proteínas BBS. En esta parte del estudio nos centramos principalmente en BBS7 y BBS2 por distintos motivos. Además de nuestros resultados, datos obtenidos en el laboratorio han mostrado que estas proteínas tienen efectivamente la capacidad de entrar al núcleo e interactuar con un regulador de la transcripción génica (Gascue et al., 2011). A su vez se demostró que la localización nuclear es transitoria y posiblemente regulada y por tanto, comenzar a entender las señales involucradas en esta regulación es un interés importante del laboratorio. A su vez, las proteínas BBS7, BBS1 y BBS2 comparten una región de homología en la secuencia aminoacídica que no fue encontrada en otras proteínas BBS, lo que sugiere que pueden pertenecer a una sub-familia particular (Badano et al., 2003a), haciendo interesante el estudio particular del comportamiento de al menos dos de ellas. Por lo tanto, en esta sección estudiamos la localización subcelular de BBS7 y BBS2 en células que están ciclando o quiescentes, enfocándonos en evaluar la capacidad de estas proteínas de entrar al núcleo.

3.2.1. Puesta a punto de la técnica de sincronización de cultivos celulares

Para estudiar si existen cambios de localización de las proteínas BBS2 y BBS7 en distintos estadios del ciclo celular fue necesario poner a punto un protocolo de sincronización de cultivos celulares, con el fin de obtener poblaciones celulares enriquecidas en diferentes fases del ciclo.

Se sincronizaron cultivos celulares de las líneas murinas NIH3T3 e IMCD3 con un protocolo de doble bloqueo con timidina (descrito en la sección 2.1.3) en el cual las células se detienen en la interfase G1/S. Una vez que las células fueron liberadas del arresto se analizaron a distintos tiempos para monitorear la progresión en el ciclo celular. Como se mencionó en la sección 2.1.3.2, este análisis se realizó en el citómetro de flujo basado en la cuantificación de ADN total, y no permite diferenciar células en estadio G0 de las que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular.

En primer lugar evaluamos cultivos sin sincronizar de cada línea celular, datos que posteriormente fueron utilizados como control. Los histogramas obtenidos muestran que los cultivos celulares poseen células en distintas fases del ciclo celular (Figura 3.7, paneles superiores).

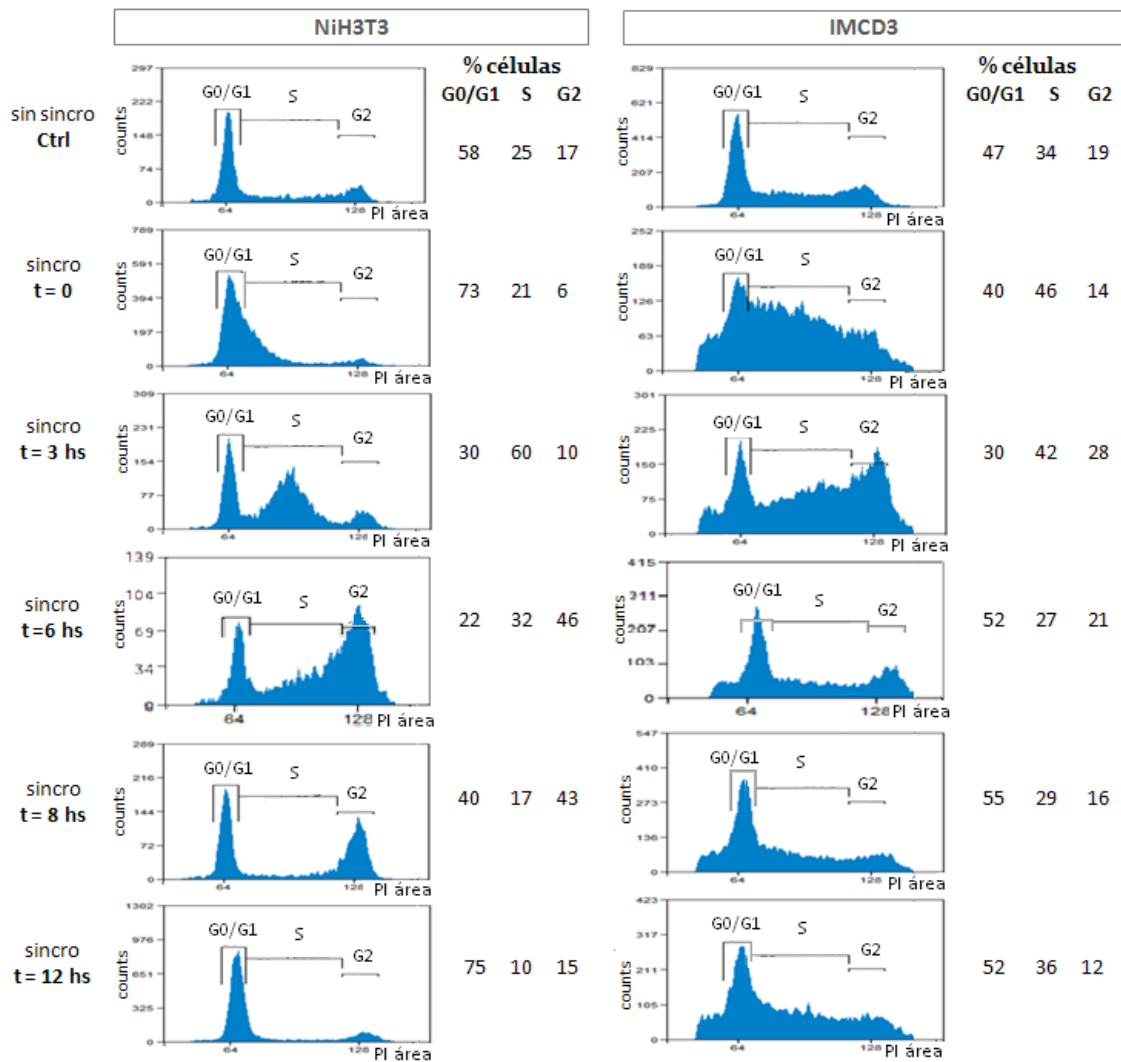


Figura 3.7. Sincronización de cultivos celulares. Análisis en citómetro de flujo. En los histogramas se grafica el número de células vs contenido de ADN medido en base a el área de fluorescencia de yoduro de propido. Sincronización con doble bloqueo por timidina de dos líneas celulares NIH3T3 e IMCD3.

Cuando se sincronizaron cultivos de la línea IMCD3 y se analizaron por citometría de flujo, los gráficos obtenidos mostraron picos anchos, no se lograron separar las células en fase S de células en G2 y además observamos células con menor contenido de ADN (población sub G1) probablemente apoptóticas (Figura 3.7). El histograma de las células sin sincronizar muestra un patrón normal, lo que hizo pensar que el procedimiento de arresto con timidina afecta la viabilidad de estas células. Se hicieron varios intentos con este protocolo pero no se logró sincronizar cultivos de esta línea celular, de allí que los estudios se continuaron con la línea NIH3T3 que sí se pudo sincronizar.

En los histogramas obtenidos con las células NIH3T3 se observa claramente el arresto de las células en la interfase G1/S en el tiempo 0. A las 3 horas de ser liberadas del arresto un 60% de las células se encontraban en fase S. Luego, entre las 6 y 8 horas, entre un 43% y un 46% de las

células se encontraban en G2 (Figura 3.7). Cabe destacar que obtener una mayor proporción de células en esta etapa es difícil por la rapidez con que ocurre la misma. Dado que en todos los tiempos se obtuvo un porcentaje de células en G0/G1 importante, se pensó que esta fracción de células, al comienzo de la sincronización, no estaban en G1 sino que era una población detenida en G0 (cerca de un 20%) que al no estar ciclando no se ve afectada por el bloqueo con timidina. Por este motivo, y para optimizar los resultados, se intentó estimular a que el 100% de las células se encontrara ciclando antes de comenzar el protocolo de sincronización. Para ello se plaquearon las células 24 horas antes con medio DMEM sin SBF, tiempo suficiente para dejar a la mayoría quiescentes, luego se realizó un pulso con DMEM y 20% SBF para estimular a que una alta proporción de las células comiencen a ciclar al mismo momento. Con esta modificación se obtuvieron los resultados de la Figura 3.8. De esta manera se logró que a las 2 horas luego que las células retomaran el ciclo, se pudiera obtener una población altamente enriquecida en células en fase S (75%).

Con el objetivo de obtener una población celular enriquecida en G0 se utilizó el método de arresto por ausencia de suero durante 72 horas. Como se observa en el histograma de la Figura 3.9.a con este método se obtuvo una población con un 83% de células en G0.

Otro método utilizado para enriquecer la población en G0 fue cultivar las células 100% confluentes durante 72 horas sin sacarles el suero. Se utilizó este método alternativo con la intención de verificar que los efectos del ciclo celular en la localización de las proteínas no se vieran solapados con posibles efectos por ausencia de factores presentes en el suero. Mediante este método se obtuvo un 86% de células en G0 (Figura 3.9.b).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sincronización de los cultivos de NIH3T3, para los posteriores ensayos se decidió utilizar dos condiciones: G0 y S. La primera como una condición de células que no están ciclando (compatible con la presencia de cilias) y la segunda como células en proliferación que a priori no deberían presentar cilias. G2 no se utilizó ya que nos resultó difícil obtener una población altamente enriquecida en células en esta etapa.

Con el protocolo puesto a punto se sincronizaron células para estudiar la localización subcelular de BBS2 y BBS7.

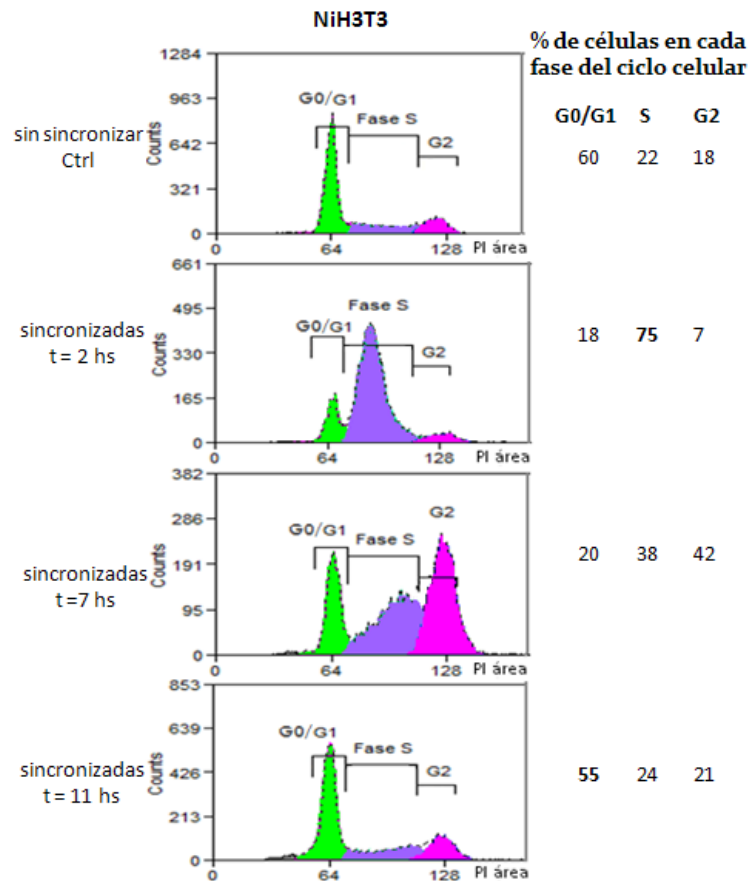


Figura 3.8. NIH3T3 sincronizadas por doble bloqueo con timidina. Análisis en citómetro de flujo.

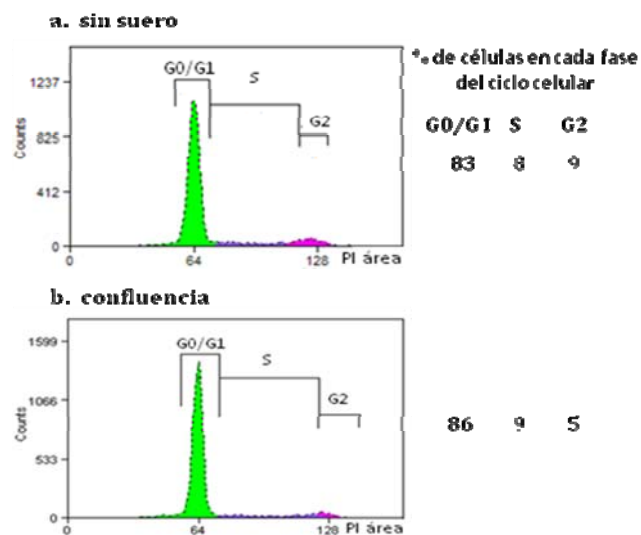


Figura 3.9. NIH3T3 sincronizadas en G0. Análisis en citómetro de flujo. Enriquecimiento en G0 por dos métodos distintos: las células se cultivaron 72 horas (a) en ausencia de suero (b) en 100% de confluencia.

3.2.2. Localización de BBS2 y BBS7 en cultivos sincronizados

El estudio de la localización de las proteínas de interés se realizó mediante inmunofluorescencia y, dadas las dificultades de visualización e interpretación inherentes a este ensayo, también se utilizaron métodos bioquímicos. Para esto se sincronizaron células NIH3T3 en G0 (mediante la ausencia de suero y por confluencia, ambas por 72 horas) y en fase S (mediante doble bloqueo con timidina, recogidas 3 horas luego de que las células retomaron el ciclo). La sincronización se realizó en placas de 10cm donde a su vez colocamos un cubreobjetos (18 mm x 18 mm). Al momento de levantar las células, el cubreobjeto se procesó para inmunofluorescencia, parte del cultivo se utilizó para controlar la sincronización por citometría de flujo y parte para fraccionamiento subcelular y análisis mediante Western blot con los anticuerpos correspondientes. Para el estudio de BBS2 por inmunofluorescencia se utilizó el antisuero anti-BBS2 que mostraba localización nuclear. En la Figura 3.10.A y B, puede observarse que en el estadio G0 del ciclo celular el patrón de localización es igual al anteriormente observado, puntos discretos o gránulos dentro del núcleo y muy poca tinción citoplasmática (doble flecha). Esto no varió con el método de sincronización empleado. Sin embargo, en fase S una proporción de células carece de gránulos nucleares intensos (Figura 3.10.C, flecha amarilla) o tiene menor cantidad, mientras que algunas células mantienen el patrón observado en G0 (Figura 3.10.C, doble flecha). Para evaluar estas diferencias se cuantificó el porcentaje de células que presentaban tinción con gránulos nucleares tanto en G0 como en fase S. Se analizaron 201 células en 23 campos elegidos al azar en el preparado. La cuantificación mostró que la presencia de gránulos se da en el 100% de las células en G0 mientras que sólo alrededor del 50% de las células en fase S los presentan ($51 \pm 17 \%$; con un $p < 0.001$ y un OR de 207; Figura 3.10.D). Es importante tomar en cuenta los datos de citometría que indicaron que en este ensayo se obtuvieron 62% de células efectivamente en fase S. En este contexto, el porcentaje de células con gránulos es comparable con el porcentaje de células que no se encontraba en fase S. Será interesante por tanto realizar otros estudios para testear esta posibilidad, por ejemplo tiñendo las células con marcadores específicos de cada etapa. En conclusión, nuestros datos son compatibles con una posible disminución de BBS2 en el núcleo cuando la célula está en proliferación activa como lo es la fase S. Dado que los anticuerpos disponibles no permiten la detección de BBS2 endógeno por Western blot, no pudimos confirmar por esta técnica los resultados preliminares obtenidos por inmunofluorescencia.

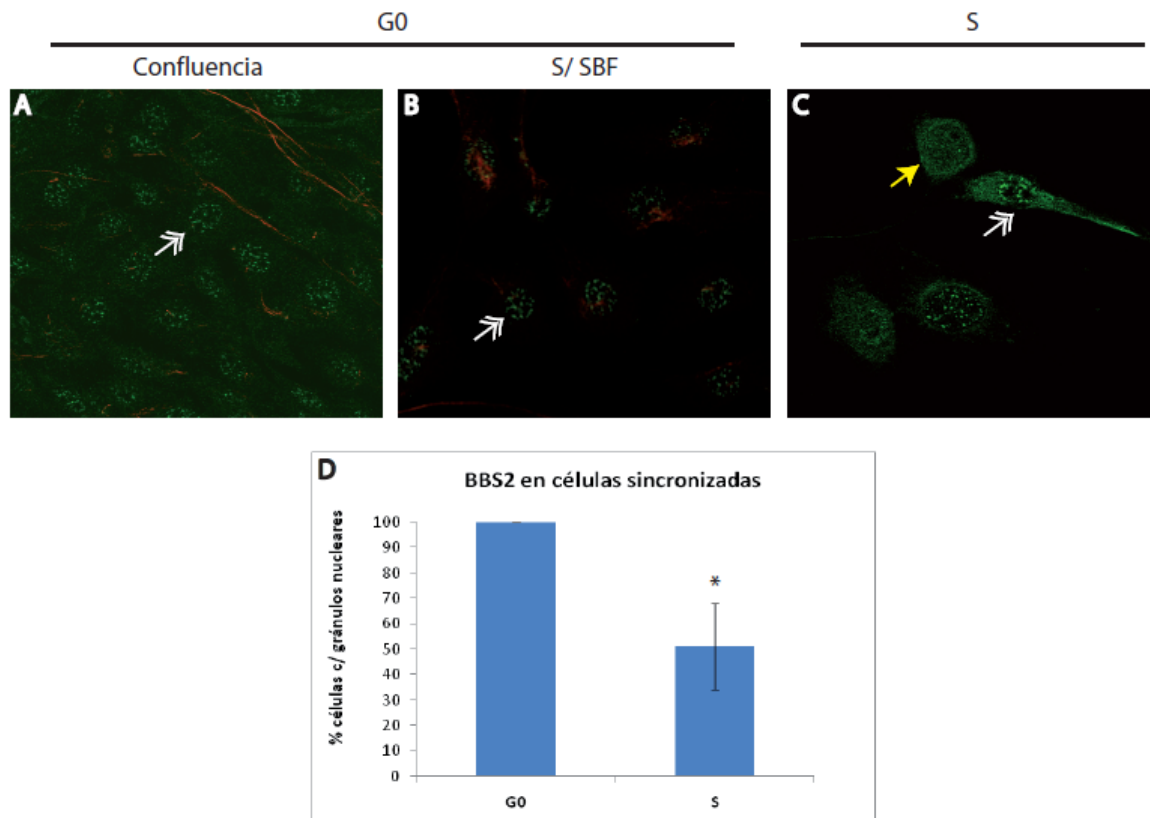


Figura 3.10. Localización subcelular de BBS2 en cultivos sincronizados de células NIH3T3. (A-C) Inmunofluorescencia. Fotos obtenidas por microscopio confocal. Cultivos sincronizados en estadio G0 (s/suero y confluencia) y fase S. En verde se muestra BBS2, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada). **(D)** Cuantificación de los gránulos nucleares que aparecen en inmunofluorescencia en células G0 y S. (*) indica $p < 0,001$ por el test de Chi cuadrado

En el caso de BBS7, el análisis por inmunofluorescencia muestra que esta proteína se localiza principalmente en la región perinuclear en células arrestadas en G0 por ausencia de suero (Figura 3.11.B). Algunos núcleos se presentan con menos tinción que otros. Un patrón similar se observa cuando las células están en fase S, donde BBS7 parece acompañar el esqueleto de microtúbulos que también se encuentra rodeando el núcleo (Figura 3.11.C). Sin embargo, en las células arrestadas en G0 por confluencia, se deja de ver ese marcado patrón perinuclear, y la proteína parece más homogéneamente distribuida en toda la célula, incluyendo el núcleo, aunque es difícil la visualización por el número de células presente (Figura 3.11.A). Ésta diferencia de localización dependiente del método de sincronización puede estar relacionada a la necesidad de la presencia de factores que forman parte del suero para que BBS7 pueda ingresar al núcleo. En la figura 3.11.A puede notarse que hay co-localización de BBS7 con el cuerpo basal (flecha blanca). Es importante notar que para facilitar el análisis de la localización de BBS7 en la Figura 3.11.A, obtenida por microscopía confocal, se eligió uno de los planos del preparado. Otro punto importante a destacar es que en las imágenes de células en G0 a veces es difícil la visualización de

las cilias, ya que se encuentran perpendiculares al plano de la foto o solapadas con marcas de otros microtúbulos del citoesqueleto.

Dado que los resultados de la inmunofluorescencia no permitían concluir acerca de cambios en la localización de BBS7 en las distintas fases, estudiamos la presencia de las proteínas en fracciones citosólicas y nucleares por Western blot. En este análisis se observan dos bandas intensas en las fracciones citosólicas de G0 y S correspondientes probablemente a las 2 isoformas de BBS7 (Badano et al., 2003a). Interesantemente, la banda de menor peso molecular aparece en la fracción nuclear de células en G0 arrestadas por estar en confluencia (Figura 3.11.D, se indica con flecha roja). Esto sería concordante con la información proveniente de la inmunofluorescencia, donde en confluencia el núcleo no se ve excluido. Las mismas fracciones fueron utilizadas para detectar γ -tubulina y analizar la pureza de la fracción nuclear. Como se ve en la Figura 3.11.D, la fracción nuclear no está contaminada con material derivado del centrosoma.

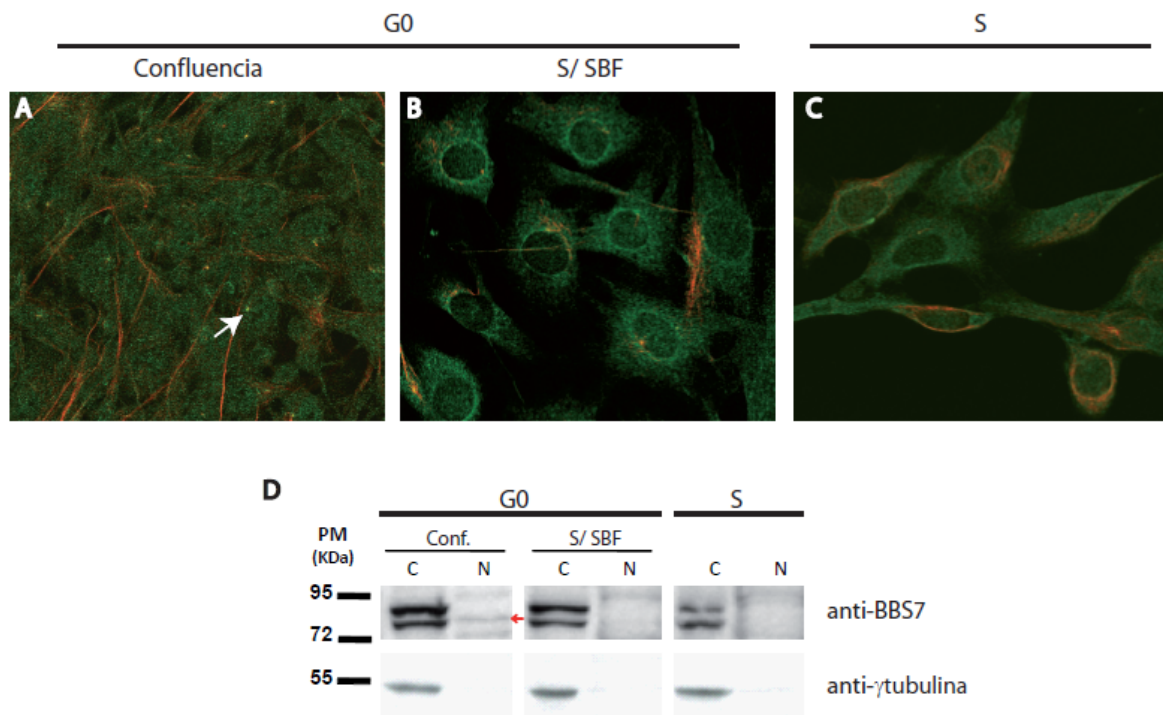


Figura 3.11. Localización subcelular de BBS7 en cultivos sincronizados de células NIH3T3. Cultivos sincronizados en estadio G0 (s/suero y confluencia) y fase S. (A-C) Inmunofluorescencia. Fotos obtenidas por microscopio confocal. En verde se muestra BBS7, en rojo centrosoma/cuerpos basales (γ -tubulina) y cilias (tubulina acetilada). (D) Western blot con las distintas fracciones sub-celulares (C: citosólica, N: nuclear) de los cultivos sincronizados. Se incubó con anticuerpo anti-BBS7, y como control del fraccionamiento con anti- γ tubulina.

En resumen, nuestros datos muestran que podría haber cambios en la localización subcelular de BBS2 y BBS7 relacionados al hecho de que las células estén o no en división activa y/o a la presencia de factores presentes en el suero.

3.2.3. Localización subcelular de BBS7 en líneas establemente transfectadas con BBS7-GFP

El objetivo de esta parte del trabajo fue generar líneas celulares estables donde la proteína de interés se expresara fusionada a EGFP con el fin de obtener una herramienta de trabajo útil que permitiera continuar con el estudio de localización subcelular de estas proteínas. La ventaja de la fusión con GFP es que se puede observar su localización por inmunofluorescencia sin necesidad de utilizar anticuerpos. Además, al no tener que fijar el preparado permite observar en tiempo real la localización de una proteína en la célula. A su vez esta estrategia tiene ventajas frente a una transfección transiente ya que permite, dependiendo del número de copias que se integren al genoma, expresar la proteína de interés en niveles más bajos, en algunos casos similares a los niveles endógenos. De esta manera, aumenta la probabilidad de poder recapitular la localización fisiológica de la proteína. Sin embargo, hay otros factores que influyen en este sentido ya que por ejemplo la propia fusión de una proteína como la EGFP puede afectar el plegado, la actividad o la localización de la proteína de interés. Si bien en muchos casos análisis bioinformáticos pueden ser de suma utilidad para predecir el impacto de este tipo de fusiones (permitiendo definir por ejemplo si es mejor que la misma sea N- o C-terminal), en casos donde la proteína de interés no presenta dominios definidos, como es el caso de BBS7, esto resulta sumamente difícil de realizar.

En esta etapa del trabajo nos centramos en la obtención de una línea celular establemente transfectada con BBS7 fusionada en el extremo C-terminal a EGFP. Para ello se construyeron los plásmidos como se explicó en la sección 2.3.1. En la figura 3.12 se muestra un esquema del proceso de clonado y los resultados obtenidos. Las células fueron transfectadas con dichos plásmidos y luego seleccionadas con neomicina el tiempo necesario para que sobrevivieran solo aquellas que habían incorporado el plásmido al genoma (proceso descrito en sección 2.3.2).

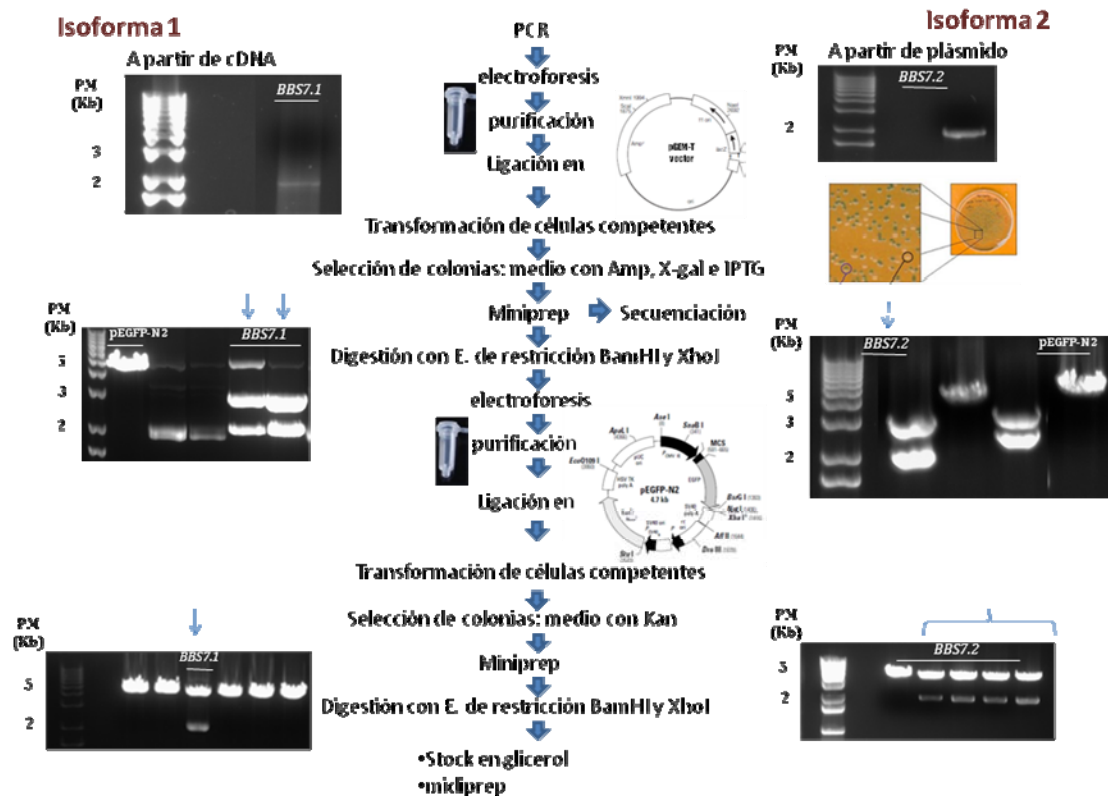


Figura 3.12. Clonado de isoformas de BBS7. Se realizó en los vectores pGEM-T y pEGFP-N2. Se muestran los gels de agarosa con bromuro de etidio revelados bajo luz UV, cada uno con su respectivo marcador de peso molecular.

3.2.3.1. Línea celular NIH3T3 expresando BBS7-EGFP en forma estable

Se realizaron dos intentos para generar una línea celular NIH3T3 que expresara establemente BBS7-GFP. Al finalizar la selección con neomicina los días necesarios para que solo sobrevivieran las células que incorporaron el plásmido de forma estable se aislaron los grupos de células que parecían proceder de una única célula en un intento de obtener poblaciones clonales (protocolo descrito en sección 2.3.2). Se observaron las células al microscopio y se observó que la fluorescencia de GFP era muy tenue o inexistente (Figura 3.13.A). Se realizó inmunofluorescencia con anti-GFP para aumentar la sensibilidad y se observó una distribución homogénea de la proteína en el citoplasma en un bajo porcentaje de células (Figura 3.13.B). Por lo tanto, pensamos que la proteína de fusión se expresa en niveles muy bajos, no detectables directamente por la emisión de EGFP, pero si se detecta con el anticuerpo anti-GFP.

La generación de una línea que exprese establemente BBS7-GFP en cantidades suficientes como para visualizarla con la emisión del GFP en esta línea celular no fue posible en el marco de este trabajo.

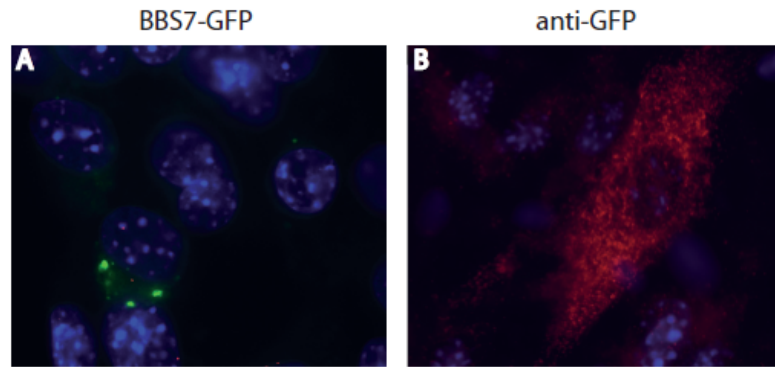


Figura 3.13. Análisis de línea celular NiH3T3 que expresa BBS7-EGFP. (A) Foto correspondiente a la visualización de la fluorescencia de EGFP. Nótese que solo se observa fluorescencia en forma de unos agregados que no se observaron con el anticuerpo anti-GFP, por lo cual se cree que es fluorescencia inespecífica. **(B)** Inmunofluorescencia para la detección de GFP, realizada con un anticuerpo anti-GFP. No es el mismo campo que en A.; En azul se visualizan los núcleos teñidos con DAPI para microscopía de epifluorescencia.

3.2.3.2. Línea celular IMCD3 expresando BBS7-GFP en forma estable

El proceso de generación de esta línea celular fue el anteriormente mencionado. Luego de la selección con neomicina se observó que no todas las células resistentes eran fluorescentes. Una posibilidad para explicar esta observación es que pudo haberse silenciado la expresión de BBS7-GFP (quizás la expresión aumentada de este tipo de proteínas sea deletérea para la célula) pero no la del gen de resistencia al antibiótico. Otra alternativa es que el número de copias integradas del plásmido o la región donde se insertó determinen una baja expresión de la proteína de fusión y por lo tanto una fluorescencia demasiado baja como para detectarse por epifluorescencia. A su vez, dentro de las células que mostraron una fluorescencia detectable se observaron distintos patrones de localización de la proteína de fusión (Figura 3.14.A-C). En algunas células la fluorescencia era principalmente citoplasmática, donde el núcleo aparecía mayoritariamente excluido (Figura 3.14.C), mientras que en otras la fluorescencia se observaba únicamente en el núcleo (Figura 3.14.B) y en algunos casos se distribuía homogéneamente en la célula (Figura 3.14.A). Para corroborar que la señal observada era la de la proteína de fusión se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GFP donde se obtuvo el mismo patrón de localización pero con una señal amplificada (datos no mostrados).

Resultó interesante el hecho de que la proteína de fusión presentara distintos patrones de localización, más aún al tener en cuenta que estos ensayos fueron realizados en cultivos no sincronizados que por lo tanto presentan células en distintas etapas del ciclo o distintos status de ciliación. Se decidió por tanto evaluar si los distintos patrones de localización se correlacionaban con la presencia/ausencia de cilios. Se analizó la localización sub-celular de EGFP y la presencia o no de cilios en un total de 198 células. Como puede observarse en el gráfico de la Figura 3.14.D

las células que mostraban fluorescencia exclusivamente nuclear, en su mayoría presentaban cilias. Ocurría lo mismo pero en menor proporción en las que la fluorescencia se observaba distribuida homogéneamente por toda la célula. Sin embargo, las células en que la fluorescencia estaba excluida del núcleo, en su mayoría no tenían cilias. Nuestros resultados por tanto sugieren que BBS7 se encontraría en el núcleo cuando la célula esta ciliada. Esto es coherente con los datos mostrados anteriormente de inmunofluorescencia y Western blot en los que BBS7 aparecía en el núcleo cuando la célula se encontraba en el estadio G0 y no en S.

Para confirmar que la fluorescencia era debida a la EGFP fusionada a BBS7 realizamos Western blot de extractos obtenidos de los cultivos usando un anticuerpo anti-GFP. Sin embargo no detectamos ninguna banda utilizando este anticuerpo (no se muestra). Esto no es de extrañar, ya que cuando analizamos los cultivos por citometría de flujo únicamente un 2% de las células mostraban fluorescencia, por lo que la proteína de fusión debería ser un porcentaje ínfimo de las proteínas totales de un extracto del cultivo entero. Por lo tanto, era imprescindible enriquecer los cultivos en las células que expresaran la proteína de fusión. Para ello realizamos citometría de flujo y "sorting". Sin embargo no tuvimos éxito dado que las células IMCD3 son grandes y tapaban la boquilla del equipo. Actualmente nos encontramos a la espera de un cambio en la boquilla del equipo que nos permita realizar el enriquecimiento y posterior clonado de esta línea estable.

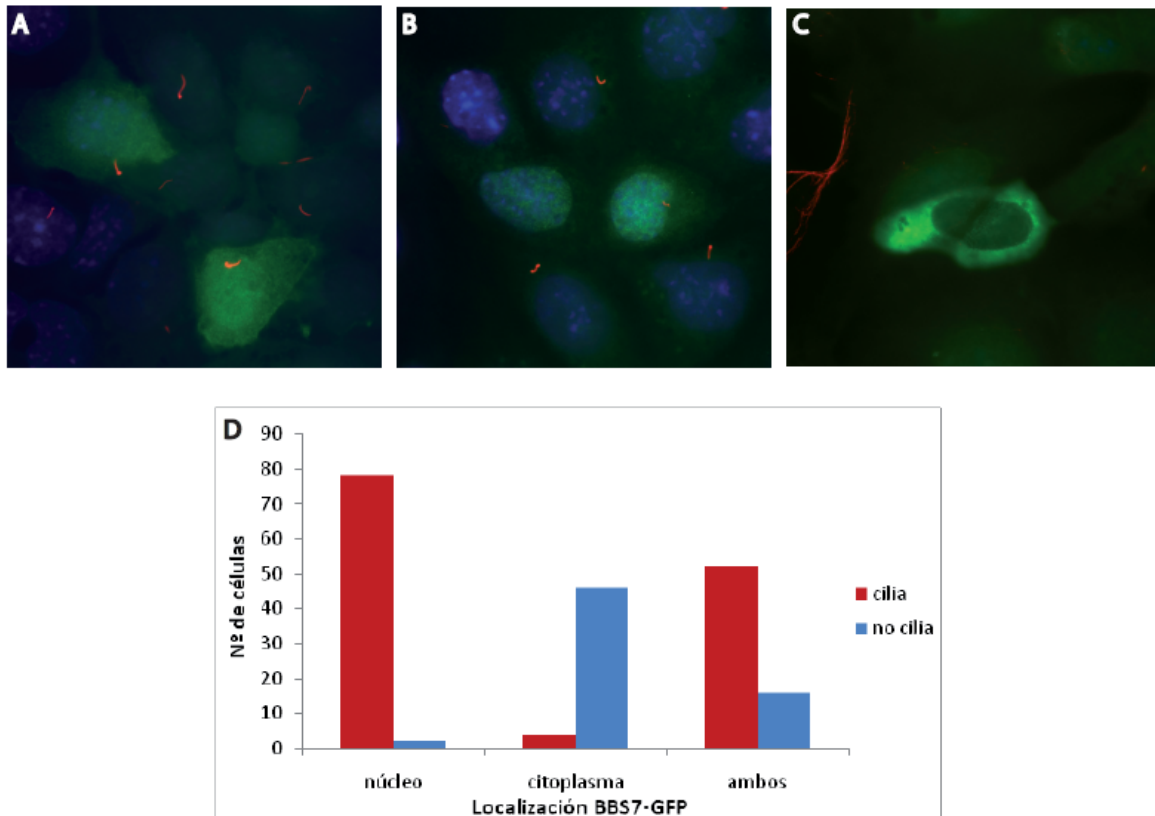


Figura 3.14. Estudio de la localización sub-celular de BBS7 usando una línea celular que expresa BBS7-EGFP (A-C) Inmunofluorescencia de células IMCD3 expresando establemente BBS7-GFP. En verde se observan distintos patrones de localización de BBS7-EGFP: **(A)** homogénea distribución en toda la célula **(B)** nuclear **(C)** citoplasmática con exclusión nuclear; en rojo cilias (tubulina acetilada), en azul núcleos teñidos DAPI para microscopía de epifluorescencia. **(D)** Gráfico que muestra la relación entre la localización BBS7-GFP y la presencia/ausencia de cilias.

4. Discusión y Conclusiones

En los últimos años diversas líneas de investigación han demostrado que BBS es una ciliopatía, una patología humana desencadenada por el mal funcionamiento de la cilia primaria, organelo involucrado en importantes vías de señalización. Uno de los datos relevantes en este sentido es que las proteínas BBS caracterizadas hasta la fecha se han localizado en cilias, cuerpo basal y/o centrosoma (Tabla 1.1). Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio han mostrado que algunas de estas proteínas, BBS2 y BBS7, tienen la capacidad de entrar al núcleo donde interactúan con al menos una proteína nuclear, RNF-2, regulando la transcripción génica (Gascue et al., 2011). A su vez, datos de nuestro laboratorio indican que la localización de estas proteínas es dinámica, tanto en lo que respecta a su localización nuclear como en lo que tiene que ver con su capacidad de entrar en las cilias. Sin embargo, no se conoce cuál o cuáles son las señales que dirigen estos cambios en la localización.

En este contexto pensamos que para poder entender el rol biológico de estas proteínas es necesario no solo conocer su localización subcelular sino también comprender que mecanismos la regulan o a qué responden los cambios en estos patrones. Así, en este trabajo nos propusimos comenzar a abordar estas preguntas enfocándonos en estudiar la localización de distintas proteínas BBS y analizar si los cambios en su localización se relacionan con la progresión del ciclo celular, basándonos en la estrecha relación existente entre el ciclo celular y la ciliación.

Primero se realizó un escaneo de patrones de localización de las proteínas para las que había anticuerpos disponibles en el laboratorio (BBS1, BBS2, BBS4, BBS7 y BBS8). Para ello utilizamos inmunofluorescencia en células NIH3T3 en cultivos no sincronizados. El análisis de BBS1 mostró un patrón similar al de BBS7 dado que ambas proteínas se localizaron primariamente en centrosomas y cuerpo basal. Además se las pudo observar dentro de las cilias, aunque no en todas las células ciliadas, sugiriendo que su capacidad de ingresar a este organelo está regulada. También de forma similar a lo previamente descrito para BBS7 (Gascue et al., 2011), pudimos observar a BBS1 dentro del núcleo en algunas células. Por el contrario, en el caso de BBS4, si bien pudimos recapitular la localización previamente reportada a centrosomas y cuerpo basal, no se observaron evidencias de localización nuclear. La localización de BBS2 observada varió según el anticuerpo utilizado. Con el antisuero se observó un patrón de localización nuclear (gránulos nucleares), mientras que con el anticuerpo comercial se mostró co-localización con la cilia. Esto puede deberse a que cada anticuerpo reconoce diferentes epítopes, alguno de los cuales podría estar enmascarado en alguno de los compartimientos por modificaciones post-traduccionales involucradas en la localización. A su vez, estos resultados ponen en evidencia algunas de las limitaciones de la inmunofluorescencia para los análisis de localización. En este sentido es crítico contar con anticuerpos que reconozcan la proteína de interés con gran especificidad y que la señal de ruido sea baja para que no interfiera en la visualización. Para alcanzar esto lo mejor es contar con anticuerpos purificados por afinidad, los cuales no siempre están disponibles. A su vez es importante realizar controles negativos utilizando los sueros pre-inmunes de los conejos que luego son inmunizados para generar los anticuerpos, de manera de corroborar que la señal que se observa con el anticuerpo de interés es específica. En nuestro caso no contábamos con los sueros pre-inmunes correspondientes a nuestros antisueros por lo que utilizamos unos obtenidos de otros conejos. En el caso de los anticuerpos purificados por afinidad lo correcto es utilizar inmunoglobulinas irrelevantes, control que también realizamos. Si bien con ambos controles se observaron diferentes patrones de tinción, nunca se observó tinción nuclear o ciliar como la vista para BBS1 y BBS2. Con el objetivo de sortear las limitaciones de la técnica de inmunofluorescencia y poder confirmar la presencia de proteínas en el núcleo se realizó fraccionamiento subcelular y

Western blot. Esto fue posible en el caso de BBS7, que se detectó la proteína endógena en el núcleo, tal como había sido demostrado previamente (Gascue et al., 2011). En el caso de BBS1, BBS2 y BBS4 hubo dificultad para observar las proteínas endógenas por Western blot. Esto resulta raro ya que los antisueros fueron preparados contra péptidos de la proteína, y sería de esperar que funcionaran en Western blot donde las proteínas están desnaturalizadas. Una explicación posible es que haya baja cantidad de proteína endógena en los lisados totales y las fracciones haciendo difícil su detección. En el caso de BBS2 este parecería ser el problema ya que fue posible detectar BBS2 en el núcleo al utilizar fracciones de células transfectadas donde la proteína fue sobre-expresada. Sin embargo, al momento de interpretar este resultado se debe tomar en cuenta que la sobre-expresión de proteínas puede alterar o no recapitular el patrón de localización de la proteína endógena. Dicho esto, BBS2 es una proteína que no debería poder entrar al compartimento nuclear por simple difusión ya que es una proteína de aproximadamente 80 KDa. Por lo tanto, es de esperar que si no existen mecanismos que la lleven a ese compartimento, por más que aumente su concentración no debería entrar al núcleo. En el caso de BBS1 y BBS4 no utilizamos esta estrategia ya que no disponíamos de los plásmidos para sobre-expresar la proteína. Por este motivo, pensamos que será necesario desarrollar mejores anticuerpos, purificados por afinidad para aumentar la especificidad del reactivo, y que sean capaces de reconocer la proteína endógena en Western blot. Otra forma de confirmar que la localización nuclear de la proteína de interés es específica es observar si la tinción nuclear desaparece al disminuir la cantidad de proteína usando ARNi, un ARN doble cadena capaz de silenciar genes. En lo que respecta a BBS7, se vió que su localización nuclear es dinámica y por lo tanto difícil de observar por inmunofluorescencia. En este sentido, se ha mostrado que BBS7 es exportada activamente fuera del núcleo utilizando una señal NES y por tanto se puede visualizar más fácilmente en este compartimento tratando las células con agentes químicos que inhiben el proceso de exportación nuclear, como por ejemplo la leptomicina B, o mutando la señal NES y verificando el aumento de la tinción nuclear (Gascue et al., 2011). Teniendo esto en cuenta, será interesante realizar inmunofluorescencia para BBS1, BBS2 y BBS4 en células donde la exportación nuclear ha sido inhibida así como testear la funcionalidad de las señales NES putativas presentes en estas proteínas. Como tercer método para evaluar la localización de estas proteínas se están generando líneas estables donde la proteína de interés se expresa fusionada a GFP. Las líneas celulares que expresan establemente una proteína de interés fusionada a GFP son una herramienta que permite observar la localización de la proteína por microscopía de fluorescencia sin necesidad de utilizar anticuerpos. A su vez, al no tener que fijar el preparado permite observar la proteína en la célula en tiempo real, siendo una herramienta importante para el análisis de cambios dinámicos de localización. Además, aumenta la probabilidad de poder recapitular la

localización fisiológica de la proteína ya que dependiendo del número de copias del plásmido de expresión que se integren al genoma, se puede expresar la proteína en niveles más bajos que en una transfección transiente, en algunos casos similares a los endógenos. En el marco de este trabajo, se desarrolló una línea BBS7-EGFP utilizando la línea celular murina IMCD3. A pesar de que obtuvimos un bajo porcentaje de células fluorescentes (2%) los resultados preliminares obtenidos muestran una localización dinámica para BBS7, concordante con los datos reportados y también con nuestros resultados obtenidos con el anticuerpo anti-BBS7. En estas células se observaron distintos patrones de localización: citoplasmática con exclusión nuclear, exclusivamente nuclear y distribución homogénea en la célula. Debido al bajo porcentaje de células fluorescentes no se pudo confirmar por Western blot que la fluorescencia corresponde a la proteína de fusión y no únicamente a EGFP. Sin embargo, es difícil que se exprese solo EGFP porque es una fusión C-terminal por lo que el codón de inicio de la traducción está en BBS7. La clonación de esta línea no fue exitosa usando el citómetro de flujo y “sorting” por lo que queda pendiente realizar primero un enriquecimiento en células fluorescentes y luego el clonado, para trabajar con células que tengan integrado el mismo número de copias del plásmido y en el mismo lugar del genoma. A partir de allí confirmar por Western blot con el anticuerpo anti-GFP que la proteína que se expresa es BBS7-GFP. Luego se pretende continuar con el análisis de localización tanto en células fijadas como en células vivas, y también sincronizando cultivos.

Es interesante que de las proteínas testeadas, BBS1, BBS2 y BBS7 son las que parecen tener la capacidad de entrar al núcleo. Estas proteínas comparten una región de homología, no presente en otras proteínas BBS, conformando un subgrupo dentro de las BBS. En este contexto resulta interesante especular sobre la posibilidad de que estas proteínas compartan el mecanismo de regulación que les permite ingresar al núcleo celular, y que el mismo se asocie a la región de homología entre ellas. De hecho, esta región de homología comprende repetidos WD40. Varios de estos forman los dominios WD40, presentes en una gran cantidad de proteínas. Generalmente estos dominios se han asociado a la coordinación de ensamblajes multiproteicos. Una forma experimental de testear esta posibilidad sería expresar proteínas fusionadas a un marcador (Myc o HA por ejemplo) en las que se eliminaran regiones de la zona de homología para poder evaluar que sucede con la localización nuclear de la proteína. Sería interesante también testear otras proteínas BBS como por ejemplo BBS6, BBS10 o BBS12, las cuales conforman otro subgrupo con similitudes a chaperoninas de tipo II y ver si estas también logran ingresar al núcleo.

En resumen, nuestros datos indican que las proteínas BBS testeadas se localizarían en diferentes compartimentos celulares posiblemente de forma dinámica. Sin embargo, aún no se sabe que

estímulos son los responsables de estos cambios de localización. Una opción puede ser que la re-localización de estas proteínas centrosómicas/ciliares se dé en respuesta a la presencia/ausencia de las cilia o a la participación de estos organelos en importantes vías de señalización (Wnt, Shh y PDGF- α). Para comenzar a testear la primera posibilidad, y partiendo de la base que el ensamblaje/desensamblaje de la cilia y el ciclo celular están estrechamente regulados, se decidió estudiar el efecto del ciclo celular sobre la localización de estas proteínas. Para esto se puso a punto cultivos sincronizados y evaluamos la localización de nuestras proteínas de interés en dos condiciones: una fase asociada con la ausencia de cilia como es fase S, y el estadio G0, una etapa compatible con la presencia de estos organelos. En este sentido es importante destacar que datos preliminares para BBS2 mostraron ausencia de gránulos nucleares en células en las etapas finales de la división celular, indicando que existirían diferencias de localización entre etapas del ciclo. El patrón de localización nuclear de BBS2 anteriormente observado se repitió en células en G0 pero desapareció en células en fase S. Esto es coincidente con una posible disminución de la proteína en el núcleo cuando la célula está en proliferación activa. Lamentablemente estos resultados preliminares no se pudieron confirmar por Western blot porque los anticuerpos disponibles no lo permitieron. Como alternativa para futuros experimentos pensamos que será posible corroborar estos resultados mediante el análisis de las fracciones subcelulares por espectrometría de masa para detectar la presencia de BBS2. Los resultados sobre BBS7 fueron interesantes dado que las diferencias de localización observadas se correlacionaron no con la división/confluencia o presencia/ausencia de cilia sino con el método utilizado para la sincronización en G0. Cuando se sincronizaron células por ausencia de suero la localización observada fue perinuclear al igual que en fase S. En cambio las células arrestadas en G0 por estar confluentes mostraron por inmunofluorescencia una distribución homogénea de la proteína en la célula, incluyendo al núcleo, resultado que pudo corroborarse por Western blot. Por lo tanto, estos cambios de localización subcelular podrían estar relacionados no solo a la presencia de cilia sino también a factores presentes en el suero que podrían operar a través de la cilia. Interesantemente, estos datos a su vez son compatibles con nuestros resultados preliminares con la línea estable BBS7-GFP, en que la localización nuclear coincidía con la presencia de cilia en la célula.

En resumen, los resultados obtenidos en el marco de este trabajo indican que BBS2 y BBS7 se localizarían en el núcleo cuando la célula está ciliada. Será importante por tanto testear esta posibilidad por ejemplo mediante la utilización de técnicas de ARNi para interferir con la formación y/o mantenimiento de las cilia. Como ya mencionamos, las cilia dependen tanto estructuralmente como funcionalmente del mecanismo de IFT, por lo que disminuyendo los

niveles del motor molecular Kif3A así como otras proteínas involucradas en este proceso, podemos efectivamente eliminar las ciliadas en células en cultivo. A futuro será importante también generar otras líneas que expresen establemente otras proteínas BBS, como BBS1 o BBS2, fusionadas a GFP para poder hacer este tipo de análisis. A su vez, siendo una de las limitantes de este tipo de experimentos el no poder recapitular exactamente el patrón de localización de la proteína endógena, será importante testear el efecto de utilizar promotores débiles y no solo fuertes como el CMV.

En definitiva, creemos que nuestro trabajo arroja datos preliminares interesantes que refuerzan y complementan datos previos del laboratorio en lo que respecta a la capacidad de las proteínas BBS de entrar al núcleo celular y cambiar su patrón de localización en distintas condiciones de crecimiento o cultivo. En particular, creemos que el vínculo potencial de la presencia de ciliadas con la capacidad de estas proteínas de entrar al núcleo es sumamente interesante ya que podría darnos pistas para entender como señales que son captadas por estos organelos son transmitidas hacia el núcleo para en definitiva afectar transcripción génica como es el caso de BBS7 (Gascue et al., 2011). Entender este tipo de regulación será sin dudas importante para continuar disecando el rol biológico de las proteínas BBS y obtener pistas para entender la base celular de los distintos fenotipos que caracterizan esta patología y posiblemente otras ciliopatías.

5. Referencias

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., *et al.* (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **425**, 628-633.

Badano, J.L., Ansley, S.J., Leitch, C.C., Lewis, R.A., Lupski, J.R., and Katsanis, N. (2003a). Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *American journal of human genetics* **72**, 650-658.

Badano, J.L., Kim, J.C., Hoskins, B.E., Lewis, R.A., Ansley, S.J., Cutler, D.J., Castellan, C., Beales, P.L., Leroux, M.R., and Katsanis, N. (2003b). Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Human molecular genetics* **12**, 1651-1659.

Badano, J.L., Leitch, C.C., Ansley, S.J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R.A., Beales, P.L., Dietz, H.C., Fisher, S., and Katsanis, N. (2006a). Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **439**, 326-330.

Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., and Katsanis, N. (2006b). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annual review of genomics and human genetics* **7**, 125-148.

Beales, P.L., Badano, J.L., Ross, A.J., Ansley, S.J., Hoskins, B.E., Kirsten, B., Mein, C.A., Froguel, P., Scambler, P.J., Lewis, R.A., *et al.* (2003). Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *American journal of human genetics* **72**, 1187-1199.

Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A.S., Parker, D., and Flinter, F.A. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *Journal of medical genetics* **36**, 437-446.

Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology* **100**, 243-255.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**, 1513-1523.

Blacque, O.E., Reardon, M.J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M.R., Ansley, S.J., Badano, J.L., Mah, A.K., Beales, P.L., Davidson, W.S., *et al.* (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes & development* **18**, 1630-1642.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* **28**, 495-503.

Campisi, J., Morreo, G., and Pardee, A.B. (1984). Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors. *Exp Cell Res* **512**, 459-466.

Cardenas-Rodriguez, M., and Badano, J.L. (2009). Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *American journal of medical genetics* **151C**, 263-280.

- Chen, C.W., and Thomas, C.A., Jr. (1980). Recovery of DNA segments from agarose gels. *Anal Biochem* *101*, 339-341.
- Chen, Z., Indjeian, V.B., McManus, M., Wang, L., and Dynlacht, B.D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Developmental cell* *3*, 339-350.
- Chiang, A.P., Beck, J.S., Yen, H.J., Tayeh, M.K., Scheetz, T.E., Swiderski, R.E., Nishimura, D.Y., Braun, T.A., Kim, K.Y., Huang, J., *et al.* (2006). Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 6287-6292.
- Chiang, A.P., Nishimura, D., Searby, C., Elbedour, K., Carmi, R., Ferguson, A.L., Secrist, J., Braun, T., Casavant, T., Stone, E.M., *et al.* (2004). Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *American journal of human genetics* *75*, 475-484.
- Christensen, S.T., Pedersen, L.B., Schneider, L., and Satir, P. (2007). Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *8*, 97-109.
- Debec, A., Sullivan, W., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cell Mol Life Sci* *67*, 2173-2194.
- Dishinger, J.F., Kee, H.L., Jenkins, P.M., Fan, S., Hurd, T.W., Hammond, J.W., Truong, Y.N., Margolis, B., Martens, J.R., and Verhey, K.J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nature cell biology* *12*, 703-710.
- Edde, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F., and Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science (New York, NY)* *247*, 83-85.
- Fan, Y., Esmail, M.A., Ansley, S.J., Blacque, O.E., Boroevich, K., Ross, A.J., Moore, S.J., Badano, J.L., May-Simera, H., Compton, D.S., *et al.* (2004). Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nature genetics* *36*, 989-993.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* *84*, 7413-7417.
- Fliegau, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews* *8*, 880-893.
- Gascue, C., Tan, P.L., Libisch, G., Cardenas-Rodriguez, M., Fernandez-Calero, T., Liu, Y.P., Astrada, S., Robello, C., Naya, H., Katsanis, N., *et al.* (2011). A Direct Role of Bardet-Biedl Syndrome Proteins in Transcriptional Regulation. *Journal of cell science* *in press*.
- Geng, L., Okuhara, D., Yu, Z., Tian, X., Cai, Y., Shibasaki, S., and Somlo, S. (2006). Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *Journal of cell science* *119*, 1383-1395.

Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghoul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., DeMartino, G.N., Fisher, S., *et al.* (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nature genetics* *39*, 1350-1360.

Gherman, A., Davis, E.E., and Katsanis, N. (2006). The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nature genetics* *38*, 961-962.

Gonzalez-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A., and Cantiello, H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 1182-1187.

Graham, F.L., and van der Ebb, A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* *54*, 536-539.

Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science (New York, NY)* *283*, 851-854.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* *426*, 83-87.

Hurd, T.W., Fan, S., and Margolis, B.L. (2011). Localization of retinitis pigmentosa 2 to cilia is regulated by Importin beta2. *Journal of cell science* *124*, 718-726.

Irigoin, F., and Badano, J.L. (2011). Keeping the Balance Between Proliferation and Differentiation: The Primary Cilium. *Current Genomics* *12*.

Jackman, J., and O' Connor, P.M. (2001). Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. In *Current protocols in cell biology*, J.S. Bonifacino, ed.

Jenkins, P.M., Hurd, T.W., Zhang, L., McEwen, D.P., Brown, R.L., Margolis, B., Verhey, K.J., and Martens, J.R. (2006). Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Curr Biol* *16*, 1211-1216.

Jin, H., White, S.R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Bazan, J.F., and Nachury, M.V. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* *141*, 1208-1219.

Katsanis, N. (2004). The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Human molecular genetics* *13 Spec No 1*, R65-71.

Katsanis, N., Ansley, S.J., Badano, J.L., Eichers, E.R., Lewis, R.A., Hoskins, B.E., Scambler, P.J., Davidson, W.S., Beales, P.L., and Lupski, J.R. (2001b). Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science (New York, NY)* *293*, 2256-2259.

Katsanis, N., Lupski, J.R., and Beales, P.L. (2001a). Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Human molecular genetics* *10*, 2293-2299.

Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J., *et al.* (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar

region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nature genetics* 36, 462-470.

Kim, J.C., Ou, Y.Y., Badano, J.L., Esmail, M.A., Leitch, C.C., Fiedrich, E., Beales, P.L., Archibald, J.M., Katsanis, N., Rattner, J.B., *et al.* (2005). MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *Journal of cell science* 118, 1007-1020.

Kim, S.K., Shindo, A., Park, T.J., Oh, E.C., Ghosh, S., Gray, R.S., Lewis, R.A., Johnson, C.A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N., *et al.* (2010). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science (New York, NY)* 329, 1337-1340.

Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., and Rosenbaum, J.L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5519-5523.

Kreda, S.M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J.R., and Boucher, R.C. (2005). Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Molecular biology of the cell* 16, 2154-2167.

Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9112-9117.

Leitch, C.C., Zaghoul, N.A., Davis, E.E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Alfadhel, M., Lewis, R.A., Eyaid, W., Banin, E., *et al.* (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nature genetics* 40, 443-448.

Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., *et al.* (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117, 541-552.

Loktev, A.V., Zhang, Q., Beck, J.S., Searby, C.C., Scheetz, T.E., Bazan, J.F., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., Jackson, P.K., and Nachury, M.V. (2008). A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Developmental cell* 15, 854-865.

Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J.M., Mandel, J.L., and Dollfus, H. (2009). Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1820-1825.

Marko, M.A., Chipperfield, R., and Birnboim, H.C. (1982). A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* 121, 382-387.

May-Simera, H.L., Ross, A., Rix, S., Forge, A., Beales, P.L., and Jagger, D.J. (2009). Patterns of expression of Bardet-Biedl syndrome proteins in the mammalian cochlea suggest noncentrosomal functions. *The Journal of comparative neurology* 514, 174-188.

Mazelova, J., Astuto-Gribble, L., Inoue, H., Tam, B.M., Schonteich, E., Prekeris, R., Moritz, O.L., Randazzo, P.A., and Deretic, D. (2009). Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. *The EMBO journal* **28**, 183-192.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., *et al.* (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science (New York, NY)* **272**, 1339-1342.

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., *et al.* (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* **129**, 1201-1213.

Nishimura, D.Y., Swiderski, R.E., Searby, C.C., Berg, E.M., Ferguson, A.L., Hennekam, R., Merin, S., Weleber, R.G., Biesecker, L.G., Stone, E.M., *et al.* (2005). Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *American journal of human genetics* **77**, 1021-1033.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-837.

Otto, E.A., Hurd, T.W., Airik, R., Chaki, M., Zhou, W., Stoetzel, C., Patil, S.B., Levy, S., Ghosh, A.K., Murga-Zamalloa, C.A., *et al.* (2010). Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nature genetics* **42**, 840-850.

Ou, G., Blacque, O.E., Snow, J.J., Leroux, M.R., and Scholey, J.M. (2005). Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* **436**, 583-587.

Ou, G., Koga, M., Blacque, O.E., Murayama, T., Ohshima, Y., Schafer, J.C., Li, C., Yoder, B.K., Leroux, M.R., and Scholey, J.M. (2007). Sensory ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*: assignment of IFT components into distinct modules based on transport and phenotypic profiles. *Molecular biology of the cell* **18**, 1554-1569.

Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 1286-1290.

Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science (New York, NY)* **246**, 603-608.

Pazour, G.J., San Agustin, J.T., Follit, J.A., Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in *orpk* mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* **12**, R378-380.

Pedersen, L.B., and Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Current topics in developmental biology* **85**, 23-61.

Rieder, C.L., Jensen, C.G., and Jensen, L.C. (1979). The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *Journal of ultrastructure research* **68**, 173-185.

Robert, A., Margall-Ducos, G., Guidotti, J.E., Bregerie, O., Celati, C., Brechot, C., and Desdouets, C. (2007). The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *Journal of cell science* **120**, 628-637.

- Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nature reviews* 3, 813-825.
- Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., *et al.* (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nature genetics* 37, 1135-1140.
- Santos, N., and Reiter, J.F. (2008). Building it up and taking it down: the regulation of vertebrate ciliogenesis. *Dev Dyn* 237, 1972-1981.
- Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology* 69, 377-400.
- Schneider, L., Clement, C.A., Teilmann, S.C., Pazour, G.J., Hoffmann, E.K., Satir, P., and Christensen, S.T. (2005). PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol* 15, 1861-1866.
- Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* 8, 9-22.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., *et al.* (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nature genetics* 37, 537-543.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., and Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* 130, 678-690.
- Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E.E., Zaghloul, N.A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C.C., Sarda, P., *et al.* (2007). Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *American journal of human genetics* 80, 1-11.
- Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., and Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* 389, 963-966.
- Tan, P.L., Barr, T., Inglis, P.N., Mitsuma, N., Huang, S.M., Garcia-Gonzalez, M.A., Bradley, B.A., Coforio, S., Albrecht, P.J., Watnick, T., *et al.* (2007). Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17524-17529.
- TEPKD Consortium (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77, 881-894.
- Wheatley, D.N. (1995). Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology* 63, 222-238.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, Y., and Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11, 223-232.

Yoder, B.K., Hou, X., and Guay-Woodford, L.M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* *13*, 2508-2516.

Zhang, Q., Nishimura, D., Seo, S., Vogel, T., Morgan, D.A., Searby, C., Bugge, K., Stone, E.M., Rahmouni, K., and Sheffield, V.C. Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 20678-20683.